

K68464 OTKA pályázat szakmai zárójelentés

A fehérjeaggregáció és amiloidképződés szerkezeti alapjai; a különféle morfológiájú aggregátumok kialakulásának körülményei és *in vivo* hatásuk vizsgálata

Vezető kutató: Kardos József, ELTE TTK Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék

Összefoglaló

Fehérjeaggregációra, amiloidképződésre vezethető vissza számos neurodegeneratív betegség. Az újabb eredmények szerint e betegségek kialakulásában az amiloid formán kívül szerepet játszanak az egyéb aggregátumok, pl. az oligomerek, szférikus aggregátumok, protofilamentumok, amelyek toxikusabbak lehetnek az élő sejtek számára. Míg a natív, globuláris fehérjék foldingja jól ismert, keveset tudunk az amiloid szálak szerkezetéről, kialakulásuk mechanizmusáról, és az őket stabilizáló tényezőkről. Az általunk kidolgozott izotermális titrációs kalorimetriai eljárással és a fehérjeaggregátumok magas hőmérséklet indukálta disszociációjának vizsgálatával lehetővé vált az amiloidképződés termodinamikai jellemzése, a fehérjeaggregátumok stabilitását meghatározó tényezők felderítése. Az amiloid- β peptid fragmentumaiból és más fehérjékből különféle morfológiájú aggregátumokat képeztünk (oligomerek, szférikus aggregátumok, protofilamentumok, amiloid szálak). Vizsgáltuk, hogyan határozzák meg a környezeti feltételek ezek kialakulását, milyen kapcsolat van a morfológia és a másodlagos szerkezet között. Nem tisztázott, hogy az Alzheimer-kór korai szakaszában milyen aggregátumok felelősek a memóriefunkciók zavaráért, azok hol és hogyan fejtik ki hatásukat. Eljárást dolgoztunk ki az aggregátumok oligomerizációs fokának fluoreszcens jelöléssel való detektálására. *In vivo* mérésekkel tanulmányoztuk a különféle aggregátumok idegrendszeri hatását. Felderítettük a lizofoszfolipidek szerepét az amiloidképződésben. A terv megvalósításához komplex biofizikai, fiziko-kémiai és elektrofiziológiai módszereket használtunk.

A pályázatban elért konkrét eredmények rövid ismertetése

1. Az általunk korábban kidolgozott izotermális titrációs kalorimetriai módszer segítségével meghatároztuk az Alzheimer β -amiloid, a β_2 -mikroglobulin K3 fragmentuma és más peptidok polimerizációjának termodinamikai paramétereit. A reakcióhoz tartozó entalpia és fajhőváltozás eredmények arra világítanak rá, hogy az amiloid szerkezetet stabilizáló

kölcsönhatások súlya jelentősen eltér a globuláris fehérjék már jól ismert esetétől. Az eredményeket összefoglaló kézirat publikálás alatt áll.

2. Kimutattuk, hogy a β 2m amiloid szálak hő hatására lebonthatóak, amely reverzibilis, gyors egyensúlyra vezető folyamat. Magas hőmérsékleten az amiloid szálakkal a monomer molekulák tartanak egyensúlyt. A hő-indukált depolimerizáció mechanizmusát két folyamat határozza meg, a szálvégekről történő disszociáció, és a szálak törése. Felvetődött a kérdés, hogy a szálak törése vajon végbemehet-e fiziológiás hőmérsékleten is. Jól ismert, hogy az amiloidképződés erősen nukleációfüggő, a tisztán monomereket tartalmazó oldat polimerizációja csak hosszú lag-fázis után indul el. Magok hozzáadására azonban a β 2m késedelem nélkül amiloid szálakat képez. Az irodalomban a spontán nukleáció jelenségével magyarázzák a lag-fázis végét jelentő felgyorsult reakciót. Egy másik lehetséges magyarázat a szálak törése és így polimerizációra képes új szálvégek keletkezése. Hipotézisünket a reakció kinetikájának fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatával és elektronmikroszkópos felvételekkel bizonyítottuk. Kimutattuk, hogy a szálak érzékenyek a mechanikai behatásokra is. Eredményeink arra utalnak, hogy a szálak törése *in vivo* szerepet játszhat a betegség időbeli lefutásában és akár egyetlen β 2m amiloid szál kialakulása is elindíthatja a betegség kifejlődését.

Vizsgálati módszerünk alkalmasnak bizonyult az amiloid szálak szerkezeti stabilitásának jellemzésére és különböző adalékanyagok hatásának érzékeny vizsgálatára. További méréseket végeztünk a β 2m amiloid szálakon és megmutattuk, hogy a stabilitás nagyon erősen függ az ionerősségtől, továbbá kimutattuk speciális ionok stabilitásra gyakorolt hatását. Ilyen volt a szulfátion, amely már 2 mM koncentrációban is jelentős stabilizáló hatást fejtett ki. Tanulmányozandó, hogy vajon a feltárt törvényszerűségek általánosíthatók-e más fehérjékre is, a vizsgálatokat elvégeztük a β 2m fehérje úgynevezett K3 fragmentumán és a Parkinson-kórban szerepet játszó α -synuclein fehérjén is. Mindkét esetben az amiloid szálak hő hatására disszociálódtak, megerősítve, hogy az amiloid szálak a korábbi vélekedésekkel ellentétben dinamikus szerkezetű fehérjepolimerek, amelyekben az egyensúly eltolható a disszociáció irányába.

Az eredményeket a *Biochemistry* folyóiratban publikáltuk (*Biochemistry*, (2011) 50, 3211-3220.). Mivel a vizsgálati módszer jól használható az aggregációt gátló gyógyszermolekulák kifejlesztéséhez, felkeltette a *Global Medical Discovery* folyóirat figyelmét akik engedélyt

kértek a Biochemistryben megjelent cikkünk absztraktjának a “Top Scientific Articles” rovatban történő közlésére.

3. *In vitro* semleges pH értéken a β 2m csak adalékanyagok hatására képez amiloid szálakat. Központi kérdés, hogy *in vivo* milyen tényezők játszanak szerepet a fehérje polimerizációjában és lerakódásában. Korábban kimutattuk, hogy a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) semleges pH mellett amiloidképződést indukál. Ebből kiindulva megvizsgáltuk az SDS-hez hasonló felépítésű, fiziológiásan előforduló lizofosfolipidek szerepét a β 2m polimerizációjában. A monomerek szerkezetére és stabilitására gyakorolt hatást CD spektroszkópiával és kalorimetriával vizsgáltuk, az amiloid szálakat fluorimetriás mérésekkel, illetve elektronmikroszkópiával detektáltuk. Megmutattuk, hogy a lizofoszfatisav (LPA), egy a vérben jelenlévő lizofosfolipid, képes speciális kölcsönhatásba lépni a fehérjével. Az LPA a natív, monomer fehérje szerkezetét destabilizálja, illetve magok jelenlétében elősegíti az amiloidszálak képződését. Ez felveti az LPA és a hozzá hasonló lipidek szerepét a vesedialízishez kötött amiloidózis kialakulásában. Az eredményeket több nemzetközi és hazai konferencián mutattuk be, az eredményeket összefoglaló cikket a Biochemistry folyóiratban publikáltuk (Biochemistry (2009) 48, 5689–5699.).

In silico dokkolás segítségével feltérképeztük β 2m amiloidképződését elősegítő nátrium dodecil szulfát valószínűsíthető kötőhelyét. Kimutattuk, hogy a lizofoszfatisav, amely eredményeink alapján hasonló specifikus hatással rendelkezik, ugyanazt a kötőhelyet preferálja a β 2m molekula felszínén. Limitált proteolízissel vizsgáltuk, hogy az SDS és LPA hatására fellazuló monomer β 2m molekulában milyen hasítóhelyek exponálódnak. Ezeket tömegspektrometriával azonosítottuk, és megállapítottuk, hogy a megjósolt SDS-kötőhely közelében helyezkednek el. Az eredmények alapján fehérjemutánsokat terveztünk. Az expresszált és megtisztított töltésmutánsokon megvizsgáltuk a lizofoszfatisav és az SDS natív szerkezetre gyakorolt destabilizáló hatását CD és FTIR spektroszkópia segítségével, illetve tanulmányoztuk a mutációk polimerizációra gyakorolt hatását is. Az eredmények igazolják hipotézisünket a lipidkötődés helyét és mechanizmusát illetően.

4. *In vivo* kísérleteket végeztünk patkányokon és egereken a fehérjeaggregáció hatásának tanulmányozására Dr Juhász Gábor vezetésével működő Proteomikai (Neurobiológiai) Kutatócsoporttal együttműködve. A rágcsálók (egér) substantia innominata - nucleus basalis magnocellularis (SI-NB) magkomplexe megfeleltethető az ember Meynert rétegének. A sejtcsoport kolinerg neuronjai az Alzheimer-kórban elsőként pusztulnak el. Sikert a

betegség egy (in vivo) állatmodelljét beállítanunk, melyen tanulmányozni lehet különböző neuroprotektív anyagok hatását. Az Alzheimer-kórban szerepet játszó A β (1-42) peptid injektálásával reprodukálható sejtpusztulást váltottunk ki, és ezt mind a kolinerg neuronok számában, mind a kortikális rostsűrűségben kimutattuk. 2D-DIGE módszerrel vizsgáltuk az A β (1-42) aggregátumainak egér agyi proteómra gyakorolt hatását és összefüggést találtunk az aggregációs fok és a kifejtett hatás között. A beinjektálandó peptid aggregációs fokát atomerőmikroszkópia (Prof. Kellermayer Miklós laboratóriumában), amiloid specifikus thioflavin-T fluoreszcencia és fényszórás segítségével követtük. Az eredményeket a *Neuroendocrinology* folyóiratban közzétettük (*Neuroendocrinology*, (2011) 93, 90-105.).

Patkányokon az Alzheimer-kórban szerepet játszó A β (1-42) peptid amyloid aggregátumainak hippocampális „population spike”-ra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Az elektrofiziológiai mérések altatásban és szabadonmozgó állatokban is elvégzésre kerültek. Emellett AFM és fluoreszcenciaspektroszkópia segítségével elvégeztük az aggregátumok *in vitro* karakterizálását. Megállapítottuk, hogy a beinjektált monomer peptid nem fejt ki elektrofiziológiai hatást, míg a kisméretű oligomerek excitatorikus hatást fejtenek ki. Meglepő módon a nagyobb méretű aggregátumok, amiloid szálak gátló hatást fejtenek ki. Ezek az eredmények magyarázatot adtak az irodalomban található ellentmondásos eredményekre is, mivel a korábbi elektrofiziológiai munkákban nem vizsgálták (vagy nem megfelelő körültekintéssel) az aggregált peptid oligomerizációs fokát.

Az eredményeket Prágában az AD/PD 2009 konferencián (9th International Conference on Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease) illetve a *Brain Research* című folyóiratban elfogadott cikkben publikáltuk, melynek megosztott utolsó szerzője Kardos József (*Brain Research*, (2010) 1354, 227-235.).

5. A fehérjeaggregátumok kialakulásában és stabilitásában fontos szerepet játszik a fehérjemolekulák felszínének a körülöttük lévő víz molekulákkal történő kölcsönhatása. Az amiloid szerkezet hidratációs viszonyait tanulmányozzuk Tompa Kálmánnal és csoportjával (KFKI) illetve Tompa Péterrel (Enzimológiai Intézet) együttműködésben. NMR kísérletekkel meghatároztuk a β m különböző konformációihoz (natív, rendezetlen, amiloid) tartozó hidratációs burok méretét és tulajdonságait.

6. Korábbi munkánk folytatásaként elsőként sikerült a C1r moduláris szerin proteáz katalitikus fragmentumát kristályosítani és Röntgen-szerkezetét megoldani. A C1r molekula a

komplement rendszer első, C1 komplexének enzim alkotója, mely képes autoaktivációra és a kaszkád következő enzimjének, a C1s-nek a hasítására. A szerkezet ismeretében új modellt alkottunk az autoaktiváció mechanizmusára vonatkozóan. Eredményeinket a *Molecular Immunology* folyóiratban publikáltuk (*Molecular Immunology* (2008) 45, 1752–1760.). Elkezdjük az amiloid aggregátumok komplement rendszert aktiváló hatásának vizsgálatához a kísérletek beállítását, számos nehézséggel találva szembe magunkat.

7. Az amiloidképződés és más molekuláris kölcsönhatások vizsgálatára általunk alkalmazott módszereket, mint például az izotermális titrációs kalorimetria, sikerrel alkalmaztuk a Prof. Závodszy Péter kutatócsoportjával való kollaboráció keretében az IPMDH enzim katalizálta reakció termodinamikájának tanulmányozására. Az eredményeket a *Biophysical Journal* című folyóiratban publikáltuk (*Biophys. J* (2009) 96, 5003–5012.).

8. Vizsgáltuk, hogy a β 2m különböző körülmények között növesztett amiloid szálai azonos szerkezetűek-e. A kérdés ott nyer fontosságot, hogy a polimerizációra gyakran használt alacsony pH-jú körülmény távol áll a fiziológiástól, míg a betegség esetében az amiloid szálak közel semleges pH-n alakulnak ki. Ezért SRCD és FTIR spektroszkópia segítségével összevetettük a savas pH képzett szálakat a semleges pH-n SDS illetve LPA jelenlétében növesztett szálakkal. Az SRCD mérésekhez sikerrel pályáztunk gépidőt a SOLEIL French Synchrotron Radiation Facility intézménynél.

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia kiválóan alkalmas a fehérjék másodlagos szerkezetének vizsgálatára, ezen belül elsősorban az α -hélix tartalom mérésére. Nagy β -szerkezet tartalom esetén azonban használhatósága korlátozott, ami különösen igaz az amiloid szálakra. Ennek oka egyrészt az amiloid oldat nehéz mérhetősége, másrészt a másodlagos szerkezet becslésénél használt referenciaspektrumok hiánya. Célul tűztük ki, hogy szinkrotron-CD (SRCD) spektroszkópia segítségével, mely szélesebb hullámhossz-tartományt és nagyon fényintenzitást biztosít, minél több fehérje amiloid formáját mérjük ki, amelyekből referencia adatbázist készítünk, és módszert dolgozunk ki a fehérjeaggregátumok másodlagos szerkezetének pontosabb meghatározására. Sikerült megmérnünk a β -amiloid, β 2m, K3, és α -synuclein fehérjék különböző formáinak spektrumait, az eredmények kiértékelése folyamatban van. Jó esélyünk van rá, hogy ismét sikerrel pályázzunk gépidőre a SOLEIL French Synchrotron Radiation Facility intézménynél a mérések folytatására.

9. Együttműködésben Prof Yuji Goto laboratóriumával tanulmányoztuk a β 2m fehérjével homológ immunglobulin könnyű lánc konstans doménjének (CL) amiloidképződésben betöltött szerepét. Megállapítottuk hogy a CL domén a β 2m-hez hasonlóan viselkedik, és nem kizárt, hogy szerepet játszik a könnyűlánc asszociált amiloidózis betegség kialakulásában. Az eredmények a FEBS Letters folyóiratban elfogadott cikkben publikáltuk (FEBS Letters, (2010) 584, 3348-3353.).

10. A β 2m-lipid kölcsönhatás vizsgálatánál alkalmazott izotermális titrációs kalorimetriai módszert sikerrel alkalmaztuk egy másik modellrendszerre, mégpedig a kalmodulin-SPC (szfingozilfoszforil kolin) interakció vizsgálatára. Az eredményeket a FASEB Journal folyóiratban közzétettük (FASEB J. (2010) 24, 3829-3839.) a cikkben Kardos József és Liliom Károly megosztott utolsó szerzők.

11. A fehérjék stabilitásának és esetleges rendezetlenségének működésben betöltött szerepét tanulmányoztuk az C1r komplement komponens CUB2 doménjének H/D kicserélődés, CD spektroszkópia, DSC és ITC módszerekkel történő vizsgálatával. Kimutattuk, hogy a CUB2 domén biztosítja a C1r molekula működéséhez szükséges nagymértékű flexibilitást, mégpedig szerkezetének destabilizációja, rendezetlenné válása által. A munka Dr. Gál Péter és Dr. Závodszy Péterrel együttműködésben történt, és bár szorosabban véve nem amiloid témájú, azonban ahhoz közel áll a rendezett-rendezetlen-polimer egymással kölcsönhatásban lévő fehérje konformációs állapotok megértésére irányuló törekvésben. Ráadásul az amiloidképződés és más molekuláris kölcsönhatások vizsgálatára általunk alkalmazott módszereket tudtuk kiválóan alkalmazni a projektben. Az eredményeket a Journal of Biological Chemistry folyóiratban közzétettük (J. Biol. Chem. (2010) 285, 11863-11869.) Kardos József megosztott első szerző.

12. Előállítottuk az Alzheimer-kór kialakulásáért felelős β -amiloid peptid rekombináns DNS konstrukcióit. A 40 ill. 42 aminosav hosszúságú A β változatokat sikerrel fejeztük ki E. coliban, és eljárást dolgoztunk ki az olcsó és hatékony tisztításra. Ezen eredmény jelentősége abban áll, hogy így olcsón és megfelelő mennyiségben tudjuk előállítani a peptidet nagy anyagigényű kísérletek számára is, továbbá ezzel lehetőségünk nyílik izotópjelölt peptid előállítására is NMR mérések számára. Az általunk előállított A β peptid amiloidképzését atomerőmikroszkópia segítségével vizsgáltuk Prof. Kellermayer Miklós csoportjával együttműködésben (SE Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet), illetve az ELTE Biológiai Intézetének saját új transzmissziós elektromikroszkópjával.

FRET jelenségre alkalmas Bodypi fluoreszcens festékpárok segítségével jelölt A β peptideket állítottunk elő. Alaphipotézisünk szerint a két féle jelölt peptid keverékének aggregátumai által adott FRET hatások függ az aggregátumok molekuláris szerveződésétől és morfológiájától. Ezáltal a FRET méréséből az aggregátumok, amiloid szálak típusa azonosíthatóvá válhat. Ennek jelentősége abban áll, hogy alkalmas lehet *in vivo* minták esetében a lerakódott amiloid aggregátumok morfológiájának, oligomerizációs fokának *in situ* meghatározására. Jelenleg csak néhány többé kevésbé oligomerizációs fok-specifikus antitest használható ilyen célra. Az aggregátumok szövetből történő visszaizolálása és azonosítása anélkül, hogy azok konformációja ne módosuljon, nehéz, ha nem lehetetlen feladat. A jelölt peptidek hatásának vizsgálatával reményeink szerint közelebb kerülhetünk az oligomerizáció és morfológia - *in vivo* hatás összefüggések meghatározásához. Jelenleg a munka az *in vitro* kísérleteknél tart, sikerült a FRET hatékonyságban különbséget kimutatni a kisméretű oligomerek és az amiloidszálak esetében.

13. Vizsgáltuk a Tc5b minifehérje különböző formáinak amiloidképzését CD és FTIR spektroszkópia, ThT fluoreszcencia és elektronmikroszkópia segítségével, Prof. Perczel Andrással együttműködve. Az eredmények azt mutatták, hogy a minifehérje kitűnő modell a fehérjék különféle konformációs állapotainak tanulmányozására. Az eredményeket összefoglaló kéziratot beküldtük, elbírálás alatt áll.

A pályázat eredményessége

Pályázatunkat sikeresen végrehajtottuk, ennek során eddig 9 közleményünk jelent meg referált nemzetközi folyóiratban, melyek össz impaktfaktora 37. A munkába számos alap és mesterszakos hallgató, illetve több doktorandusz is bekapcsolódott, így a pályázat anyagából több szakdolgozat és disszertáció is született. Pál Gábor Henrietta 2011-ben sikeresen megvédte doktori disszertációját, Micsonai András pedig a tervek szerint 2013-ban fog védeni. A pályázat keretében végzett *in vivo* kísérletekre alapozva Dr. Juhász Gábor kutatócsoportjában Orbán Gergely szintén idén fogja doktori munkáját megvédeni. Mindezek az OTKA támogatása nélkül nem valósulhattak volna meg.