

Kutatócsoportom az elmúlt 4 évben egy új agy-specifikus fehérje szerkezeti és funkcionális jellemzésében ért el jelentős eredményeket, melyeket egyrészt nemzetközi folyóiratokban publikáltunk, másrészt hazai és nemzetközi konferenciákon mutattunk be. Az eredmények, az OTKA támogatáson kívül, jelentős részben egy EU FP6 projekt támogatásának köszönhetően jöttek létre. Kutatásaink tárgya, a TPPP/p25 fehérje, melyet a fehérje funkciója (Tubulin Polymerization Promoting Protein) és molekulatömege alapján neveztünk el. Az elmúlt évben a Human Genome Committee egyetértésünkkel a fehérjét illetve két, általunk megtalált homológját mint TPPP, TPPP2 és TPPP3-at jegyezte be a HUGO-ba.

A TPPP/p25 egy szerkezet nélküli fehérje, melynek elsődleges partner fehérjéje a tubulin illetve a mikrotubuláris hálózat. Funkcióját tekintve a Mikrotubulus Asszociált Proteinek (MAPs)-re jellemző sajátságokkal rendelkezik, melyet mind *in vitro*, mind *in vivo* vizsgálatokkal bizonyítottunk. Sejtszintű vizsgálataink azt mutatták, hogy fehérje túlermelletése esetén jól karakterizált aberráns ultrastruktúrák jönnek létre: ún. „perinuclear cage” illetve „agresoma”. A speciális fehérje-aggregátum kialakulása modellként szolgált azon vizsgálataink értelmezéséhez, melyekben a TPPP/p25 felhalmozódásának hatását vizsgáltuk idegrendszeri megbetegedések esetén.

EGFP-TPPP/p25 fehérjét stabilan expresszáló neuroblasztóma sejtvonalat szelektáltunk, jellemeztük a TPPP/p25 hatására bekövetkező morfológiai, ultrastrukturális, valamint az energia-metabolizmust befolyásoló lokális és rendszerszintű változásokat. Matematikai modellt dolgoztunk ki az energiaháztartás jellemzésére, valamint a molekuláris szintű változások értelmezésére. Ezen kísérletes vizsgálataink, valamint a modellezés alapul szolgált hasonló típusú, de állatkísérletes munkáinkhoz. Huntington kóros transzgenikus valamint neurotoxinnal kezelt állatok agyszöveti extraktumával kapott eredményeink, összhangban a sejtes adatokkal, azt mutatták, hogy a zárványtestek kialakulása az energia metabolizmus stimulációját idézi elő, mely az ATP szint jelentős növelését eredményezi. Ez az állapot az idegsejtek elhalását megelőző kompenzációs mechanizmusnak tudható be, melyben jelentős szerepe lehet az idegsejtekkel metabolikus kapcsolatban álló glia sejtekben bekövetkezett fokozott metabolizmusnak.

Azonosítottunk szarvasmarha extraktumban a tubulinon kívül további kölcsönható partner fehérjéket, melyek közül néhány esetben sikerült funkcionális relevanciát is megállapítani. Így pl. a MAP kinázok csoportjába tartozó ERK2 esetén igazoltuk, hogy a TPPP/p25 Thr14, Ser-18 és Ser-160 oldalláncait specifikusan foszforilálja, melyek közül az első kettő a fehérje különösen kitekeredett N-terminális szegmensén található, *in vivo* is foszforilált, és ez a módosulás gátolja a fehérje alapfunkcióját, azaz a tubulin polimerizációt indukáló hatását. A fehérje néhány mutánsát, valamint proteolitikus fragmensét előállítottuk és azonosítottuk, melyek szintén a fehérje különböző régióinak szerepét segítik tisztázni. Gén-szekvencia analízissel azonosítottunk két szekvenciát a humán genomban, melyek homológjai a TPPP/p25-nek: p20 és p18. Molekulatömegük kisebb, 20 illetve 18 kDa, mely az N-terminális szegmens deléciójának köszönhető. A p20 fehérjét sikerült izolálnunk szarvasmarha agyból, mellyel bizonyítottuk annak fehérje szintű kifejeződését. A humán TPPP fehérjéket klónoztuk és izoláltuk. A fehérjék biokémiai és sejtszintű összehasonlító analízisét elvégezve megállapítottuk, hogy a p20 mutat hasonlóságot a TPPP/p25-höz leginkább tubulin-keresztkötő aktivitását tekintve, mind izolált fehérjékkel, mind transzfektált sejtek esetén; a p18 viszont alapvetően különbözik a két homológjától: meghatározott szerkezettel rendelkezik, és nem mutat kölcsönhatást sem a tubulinnal, sem pedig mikrotubulussal. Ezen adatok rávilágítottak arra a fontos szerkezeti tulajdonságra, hogy a TPPP fehérjék tubulinnal való kölcsönhatásához alapvető jelentőségű az „unfolded” karakter.

Számos idegrendszeri megbetegedés markerfehérjéje szerkezet nélküli: így pl. az alfa-szinuklein a Parkinson-kór (PD), a tau fehérje az Alzheimer-kór (AD) vagy a mutáns huntingtin fehérje a Huntington-kór esetén. Kutatásaink egyik igen fontos eredménye annak bizonyítása volt, hogy a TPPP/p25 szelektíven fejeződik ki, és halmozódik fel a szinukleinopátiák esetén a patológiás agyszöveti zárványokban és tökéletes kolokalizációt mutat alfa-szinukleinnel, egy, a szinukleinopátiákra jellemző marker fehérjével, részleges kolokalizációt a tubulinnal valamint egy glikolitikus enzimmel, a GAPDH-val. A tauopátiákra jellemző neurofibrilláris kötegekben nem találtunk immunpozitivitást specifikus anti-TPPP/p25-tel, ami egyébként egyértelmű immunpozitivitást mutatott anti-tau antitestekkel. Érdekes módon TPPP/p25 kimutatható volt a neurofibrilláris köteg kialakulásának kezdeti stádiumában, ami a két, különböző típusú idegrendszeri rendellenesség (PD és AD) közös eredetű sajátságaira utalhat.

Specifikus antitestek előállítása, azok jellemzése különösen hangsúlyt kapott kutatásaink során. Sikerült valóban nagy hatékonyságú olyan specifikus anti-TPPP/p25 antitesteket előállítanunk, melyek nem ismerték fel a két homológ fehérjét, más, agyszöveti homogenizátumban lévő fehérjével sem adtak keresztreakciót. Azonban közelmúltban jutottunk arra a lényeges felismerésre, hogy a rendelkezésünkre álló antitestek, a 186-200 szekvenciárészletet magába foglaló konjugátum és a humán rekombináns fehérje ellen patkányban termeltetett poliklonális antitestek a TPPP/p25 vonatkozásában különböző specificitást mutatnak: míg az előbbi szelektíven jelöli a normál agyszöveti oligodendrocitákat, mint domináns TPPP/p25-öt expresszáló sejteket, addig az utóbbi a zárványtestek vonatkozásában mutat immunpozitivitást. Az antitesteknek ez a tulajdonsága nyilvánvalóan rendkívüli jelentőséggel bír humán patológiai kutatásokban, illetve biomarkerként szolgálhat idegrendszeri kórképek azonosítására.