

Pallos Judit

**A Huntington kór patogenezisében
szerepet játszó hiszton deacetilázok
azonosítása és részletes vizsgálata**
Drosophila melanogasterben

A PhD értekezés tézisei

Témavezető: Prof. J. Lawrence Marsh
Department of Developmental and Cell Biology
University of California, Irvine
Irvine, CA, USA

2011.

BEVEZETÉS

A Huntington-kór egy későn megnyilvánuló neurodegeneratív megbetegedés, amely elsősorban a striátumot érinti, és fokozatosan kialakuló motoros, kognitív és pszichológiai zavarokkal jár. A Huntington-kór egy legalább kilenc domináns módon öröklődő neurodegeneratív megbetegedést magába foglaló csoport tagja. Ezeknek az ún. poliglutamin betegségeknek a kiváltó oka a betegségekért felelős génekben található instabil CAG trinukleotid ismétlődések megsokszorozódása, amelyek fehérje szinten egy megnyúlt poliglutamin domént kódolnak. A mutáns Huntingtin (Htt) fehérjék kölcsönhatásba lépnek egymással, ami oligomerek és aggregátumok különböző formáinak felhalmozódását eredményezi. Az aggregátumok kialakulása önmagában is káros lehet a sejt számára; de a mutáns Htt ezen túlmenően számos más fehérjével is aberráns módon hat kölcsön, ami a sejt homeosztázisának felborulásával, az idegrendszer működésének zavarásával, és végül halállal jár.

Az abnormális interakciókban egyes transzkripciós regulátorok, mint például a hiszton acetiltranszferázok és metiltranszferázok is részt vesznek, ami a nukleoszóma módosítások egyensúlyának felborulásához és a transzkripció diszregulációjához vezet. Azok a vegyületek, amelyek képesek helyreállítani az acetilációs egyensúlyt, számos modell rendszerben ígéretesnek bizonyultak a mutáns poliglutamin fehérje káros hatásainak enyhítésére, közülük néhány hiszton deacetiláz (HDAC) gátló szer klinikai vizsgálat alatt áll. Az itt leírt kutatási eredmények a hiszton deacetilázoknak a Huntington-kór patogenezisében játszott szerepét kívánják megvilágítani.

Mivel a Huntington-kór egygénes öröklődésű, a betegség folyamatát jól lehet modell szervezetekben vizsgálni, amelyek egyike a *Drosophila*

melanogaster. Laboratóriumunkban létrehoztuk a kór muslica modelljét, amely a humán megbetegedés számos vonását, így az intracelluláris aggregátumok megjelenését, a fokozatos neurodegenerációt, a motoros funkció zavarait, alvás problémákat és a korai halált is mutatja. A *Drosophilában* rendelkezésre álló genetikai eszközök és technikák széles tárházát kihasználva megvizsgáltuk a mutáns Htt fehérjét kifejező állatok fenotípusának változásait a HDAC aktivitás függvényében. Eredményeink szerint csupán néhány hiszton deacetiláz gátlása növeli az állatok életképességét, csökkenti a fotoreceptor neuronok degenerációját és javítja a muslicák mozgásképeségét. Kimutattuk, hogy hatásukat az aggregáció folyamatának befolyásolása nélkül fejtik ki. A sirtuin HDAC dózisának csökkentése a legyek éjszakai alvászavarait is menekíti. Kimutattuk, hogy a muslicák etetése butirát HDAC gátló vegyülettel korrigálja a H3 hiszton K27 lizinének hipoacetilációját, valamint hogy a HDAC aktivitás módosítása képes helyreállítani diszregulált gének egy csoportjának transzkripcióját.

Eredményeink arra utalnak, hogy azok a stratégiák, amelyek az Rpd3, a Sir2 és a Sirt2 hiszton deacetilázok aktivitásának specifikus gátlását célozzák meg, különösen amennyiben kombinációban alkalmazzák őket, hatékonyak lehetnek neuronok védelmében, így ígéretes terápiának bizonyulhatnak a Huntington kór kezelésére.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Új technikákat fejlesztünk ki a mutáns Huntingtin okozta degeneráció mérésére, melyekkel megerősítjük azt az eredményt, hogy a hiszton deacetiláz gátló vegyületek csökkentik a fotoreceptor neuron degenerációt.
2. Leteszteljük a sirtuin gátló vegyületek Htt patogenezisre gyakorolt hatását.
3. HDAC gének mutáns alléljeinek felhasználásával azonosítjuk a Huntington-kór patogenezisében szerepet játszó deacetilázokat.
4. Megvizsgáljuk, hogy a HDAC aktivitás manipulálása meghosszabbítja-e a rövid életű *Httex1p Q93* legyek élettartamát.
5. Jellemezzük a mutáns Htt-t expresszáló állatok cirkadián ritmusát. Korrigálja-e a Sir2 szintjének csökkentése az abnormális alvás fenotípust?
6. Leteszteljük a széles spektrumú HDAC inhibitor butirátnak a mutáns Huntingtin aggregációjára gyakorolt hatását.
7. Megvizsgáljuk, hogy a globális hiszton acetiláció szintje megváltozik-e *Httex1p Q93* legyekben. Amennyiben igen, helyreállítható-e HDAC inhibitorok alkalmazásával?
8. Megvizsgáljuk, hogy HDAC mutánsok milyen hatást gyakorolnak olyan gének expressziójára, amelyek transzkripciójának szabályozása zavart szenved mutáns Htt jelenlétében.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

- Vegyületek ill. mutáns allélek hatásának tesztelése *UAS-Httex1p Q93* transzgént kifejező legyekben
- RNS interferencia vonalak létrehozása
- A neuron degeneráció vizsgálata a pszeudopupil technika alkalmazásával
- A mutáns Htt-t kifejező legyek motoros aktivitásának tanulmányozása
- Az összetett szem pigment tartalmának mérése
- A cirkadián ritmus vizsgálata TriKinetics monitorok segítségével
- Lárvális agyminták konfokális mikroszkóppal való vizsgálata
- Adult fejminták western analízise
- Génexpresszió szintjének mérése kvantitatív real-time PCR-rel
- Statisztikai analízis

EREDMÉNYEK

1. Korábban kimutattuk, hogy széles spektrumú hiszton deacetiláz gátló szerek (butirát és SAHA) csökkentik a *Httex1p Q93* muslicák fotoreceptor neuronjainak degenerációját. Hogy ezt az eredményt független módszerekkel megerősítsük, a *Httex1p Q93* legyek progresszív motoros zavarait mértük negatív geotropizmuson alapuló mászási teszttel illetve kilenc utas geotaxis labirintus segítségével. Azt találtuk, hogy a butirát javítja a mutáns Htt-t expresszáló legyek mozgásképességét.

Szem-specifikus *gmr-Gal4* driverrel kifejezve a *Httex1p Q93* transzgént azt találtuk, hogy a szempigmentek mennyisége az öregedő *Httex1p Q93* legyekben csökken, ami a pigmentsejtek fokozatos vesztésére utal. Butirát etetése ezt a folyamatot lassítja.

2. A *Drosophila* tíz hiszton deacetiláz enzimje közül öt a NAD-függő sirtuin osztályba tartozik, amelyekre a butirátnak és a SAHA-nak nincsen hatása. Annak eldöntésére, hogy a HDAC-ok ezen osztálya is szerepet játszik-e a mutáns Htt indukálta patogenezisben, sirtuin gátló szerekkel, köztük niacinnal, nikotinamiddal és több, Sirt2 specifikus vegyülettel etettük a legyeket, és azt találtuk, hogy mindegyik csökkenti a *Httex1p Q93* muslicák fotoreceptor neuron degenerációját.

3. A HDAC inhibitorok nagy többsége számos fehérjére hat, így az etetésük során megfigyelt neurodegeneráció csökkenés is lehet számos hiszton deacetiláz gátlásának eredménye, de az is elképzelhető, hogy elsősorban egy vagy néhány HDAC gátlása a felelős a megfigyelt hatás zöméért. Hogy e lehetőségek között különbséget tegyünk, genetikai módszerekhez fordultunk,

és az összes deacetylázt egyenként leteszteltük mutáns allélek segítségével (ezek egy részét mi hoztuk létre). Azt találtuk, hogy a *Httex1p Q93* patológia három HDAC, az *Rpd3*, a *Sir2* és a *Sirt2* szintjére érzékeny elsősorban, minthogy csak ezek részleges redukciója csökkenti a fotoreceptor neuronok degenerációját. Azt is kimutattuk, hogy azok az állatok, amelyek e három HDAC közül bármely kettőre egyszerre mutánsak, az egyedi mutációt hordozó legyeknél gyengébb fenotípussal rendelkeznek. Ez arra utal, hogy a deacetylázok egymástól függetlenül fejtik ki hatásukat.

4. A mutáns *Htt* transzgen expressziója jelentősen csökkenti a legyek élettartamát. Emellett ismert, hogy több hiszton deacetyláz fontos szerepet játszik az élethossz szabályozásában. Annak eldöntésére, hogy a neurodegeneráció lassítása az öregedés folyamatának befolyásolásán keresztül történik-e, megvizsgáltuk, hogy azon HDAC-ok, amelyek részleges gátlása neuroprotektív hatású, meghosszabbítják-e a muslicák élettartamát. Vizsgálataink azt mutatják, hogy nem ez a helyzet: csak az *Rpd3* mutációja növelte meg a *Httex1p Q93* legyek élettartamát és csak igen kis mértékben. Ezzel szemben a sirtuin aktivitás növelése *Sir2* overexpresszááló mutáció segítségével jelentősen megnyújtotta az élettartamot, viszont nem csökkentette a neurodegenerációt. Következésképpen az élethossz növelését és a sejthalál gátlását szabályozó folyamatok nem azonosak.

5. A Huntington-kór egyik következménye a normális alvás mintázat szétesése. A SIRT1/Sir2 hiszton deacetyláz aktivitása cirkadián szabályozottságot mutat, és a fehérje számos clock gén promóteréhez kötődik. Az viszont nem ismert, hogy a *Sir2* aktivitásának megváltoztatásával az állatok ébrenléti és alvás ciklusa befolyásolható-e. Megfigyeltük a vad típusú és a mutáns *Htt*-t kifejező legyek aktivitási mintázatát mind normális, mind *Sir2* mutáns háttéren, és azt találtuk, hogy a *Httex1p Q93* muslicák az

alvászavar számos jelét mutatják: alvásuk fragmentált, azaz számos rövid szakaszból áll, és nehezen is alszanak el. A *Sir2* gén dózisének csökkentése ezeket a problémákat korrigálja. Érdekes módon a *Sir2* mutációja nem segít a nappali alvászavarokon, ami arra utal, hogy a *Sir2*-nek külön szerepe van az éjszakai és a nappali aktivitás szabályozásában, ami genetikailag és farmakológiailag is kettéválasztható lehet.

6. A Huntington-kór egyik jellegzetessége a nagyméretű sejten belüli aggregátumok megjelenése, amelyek a Huntingtin fehérje vad típusú és mutáns formáiból, valamint számos egyéb sejtfehérjéből állnak; az aggregátumok szerepe a betegség patológiájában azonban nem tisztázott. Butiráttal etetett, mutáns Huntingtint kifejező lárvák agyában vizsgálva az aggregációt azt találtuk, hogy a Htt aggregátumok mennyisége nem változik jelentősen a kontroll csoporthoz képest. Ez arra utal, hogy a hiszton deacetiláz inhibitor neurodegenerációra gyakorolt pozitív hatása nem a mutáns fehérje aggregációs tulajdonságainak befolyásolásán keresztül valósul meg.

7. A hiszton fehérjék poszttranszlációs módosításai jelentősen befolyásolják a gének transzkripció szintjét. A mutáns Huntingtin fehérje abnormális kölcsönhatásban áll számos hiszton acetiltransferáz és egyéb hiszton módosító enzimmel, ami a nukleoszóma módosítások zavarához vezet. Vizsgálataink szerint a H3K27 lizin acetilációs szintje *Httex1p Q93* legyekben erősen csökkent mértékű. A muslicák butirátot tartalmazó táppal való etetése helyreállítja a vad típusra jellemző acetilációs szintet, ami arra utal, hogy a butirát neurodegenerációt csökkentő hatása legalábbis részben a hisztonok acetilációjának, és ezzel együtt a diszregulált gének transzkripciójának helyreállításával jár.

8. Annak kimutatásához, hogy a HDAC aktivitás manipulálása csökkenti a transzkripció diszregulációt *Httex1p Q93* legyekben, először azonosítanunk kellett olyan géneket, amelyek mutáns Htt-t expresszáló muslicákban abnormálisan fejeződnek ki. Ezt egy a laboratóriumunkban korábban végrehajtott microarray kísérlet eredményeit felhasználva kvantitatív PCR segítségével végeztük el. Ezek után megvizsgáltuk e gének mRNS szintjét az *Rpd3*, *Sir2* vagy *Sirt2* génekre heterozigóta, mutáns Htt-t kifejező muslicákban, és azt találtuk, hogy a HDAC aktivitás csökkentése a gének egy részének transzkripcióját helyreállítja.

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. McConoughey SJ, Basso M, Niatetskaya ZV, Sleiman SF, Smirnova NA, Langley BC, Mahishi L, Cooper AJ, Antonyak MA, Cerione RA, Li B, Starkov A, Chaturvedi RK, Beal MF, Coppola G, Geschwind DH, Ryu H, Xia L, Iismaa SE, **Pallos J**, Pasternack R, Hils M, Fan J, Raymond LA, Marsh JL, Thompson LM, Ratan RR.

Inhibition of transglutaminase 2 mitigates transcriptional dysregulation in models of Huntington disease.

EMBO Mol Med. 2010 Sep;2(9):349-70.

IF: 8,833

2. Luthi-Carter R, Taylor DM, **Pallos J**, Lambert E, Amore A, Parker A, Moffitt H, Smith DL, Runne H, Gokce O, Kuhn A, Xiang Z, Maxwell MM, Reeves SA, Bates GP, Neri C, Thompson LM, Marsh JL, Kazantsev AG.

SIRT2 inhibition achieves neuroprotection by decreasing sterol biosynthesis.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Apr 27;107(17):7927-32.

IF: 9,771

3. **Pallos J**, Bodai L, Lukacsovich T, Purcell JM, Steffan JS, Thompson LM, Marsh JL.

Inhibition of specific HDACs and sirtuins suppresses pathogenesis in a Drosophila model of Huntington's disease.

Hum Mol Genet. 2008 Dec 1;17(23):3767-75.

IF: 7,249

4. Apostol BL, Simmons DA, Zuccato C, Illes K, **Pallos J**, Casale M, Conforti P, Ramos C, Roarke M, Kathuria S, Cattaneo E, Marsh JL, Thompson LM.

CEP-1347 reduces mutant huntingtin-associated neurotoxicity and restores BDNF levels in R6/2 mice.

Mol Cell Neurosci. 2008 Sep;39(1):8-20.

IF: 3,934

5. Desai UA, **Pallos J**, Ma AA, Stockwell BR, Thompson LM, Marsh JL, Diamond MI.

Biologically active molecules that reduce polyglutamine aggregation and toxicity.

Hum Mol Genet. 2006 Jul 1;15(13):2114-24.

IF: 8,099

6. Apostol BL, Illes K, **Pallos J**, Bodai L, Wu J, Strand A, Schweitzer ES, Olson JM, Kazantsev A, Marsh JL, Thompson LM.

Mutant huntingtin alters MAPK signaling pathways in PC12 and striatal cells: ERK1/2 protects against mutant huntingtin-associated toxicity.

Hum Mol Genet. 2006 Jan 15;15(2):273-85.

IF: 8,099

7. Agrawal N*, **Pallos J***, Slepko N, Apostol BL, Bodai L, Chang LW, Chiang AS, Thompson LM, Marsh JL. (** contributed equally*)

Identification of combinatorial drug regimens for treatment of Huntington's disease using *Drosophila*.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Mar 8;102(10):3777-81.

IF: 10,231

8. Steffan JS, Agrawal N, **Pallos J**, Rockabrand E, Trotman LC, Slepko N, Illes K, Lukacsovich T, Zhu YZ, Cattaneo E, Pandolfi PP, Thompson LM, Marsh JL.

SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology.

Science. 2004 Apr 2;304(5667):100-4.

IF: 31,853

9. Pollitt SK, **Pallos J**, Shao J, Desai UA, Ma AA, Thompson LM, Marsh JL, Diamond MI.

A rapid cellular FRET assay of polyglutamine aggregation identifies a novel inhibitor.

Neuron. 2003 Nov 13;40(4):685-94.

IF: 14,109

10. Bodai L, **Pallos J**, Thompson LM, Marsh JL.

Altered protein acetylation in polyglutamine diseases.

Curr Med Chem. 2003 Dec;10(23):2577-87.

IF: 4,409

11. Marsh JL, **Pallos J**, Thompson LM.

Fly models of Huntington's disease.

Hum Mol Genet. 2003 Oct 15;12 Spec No 2:R187-93.

IF: 8,597

12. Apostol BL, Kazantsev A, Raffioni S, Illes K, **Pallos J**, Bodai L, Slepko N, Bear JE, Gertler FB, Hersch S, Housman DE, Marsh JL, Thompson LM.

A cell-based assay for aggregation inhibitors as therapeutics of

polyglutamine-repeat disease and validation in *Drosophila*.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 May 13;100(10):5950-5.
IF: 10,272

13. Steffan JS, Bodai L, **Pallos J**, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu YZ, Greenwald M, Kurokawa R, Housman DE, Jackson GR, Marsh JL, Thompson LM.
Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*.
Nature. 2001 Oct 18;413(6857):739-43.
IF: 27,955

Kumulatív impakt faktor: 153,411

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ SZABADALMAK:

Steffan, J. S., Thompson, L. M., Marsh, J. L., Bodai, L., **Pallos, J.**
(14.11.2002) Method for treating neurodegenerative, psychiatric and other disorders with deacetylase inhibitors
International publication number: WO 02/090534 A1

Steffan JS, Thompson LM, Marsh JL, Bodai L, **Pallos J**, Hockly E, Bates G.
(2005). Methods and reagents for treating neurodegenerative diseases and motor deficit disorders.
US2005227915(A1)