

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
MULTIDISZCIPLINÁRIS ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

A prion fehérjecsald citoprotektív és toxikus funkciói

Tézisfüzet

Nyeste Antal

Témavezető: Dr. Welker Ervin

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
SZEGEDI BIOLOGIAI KÖZPONT
BIOKÉMIAI INTÉZET

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KUTATÓKÖZPONT
ENZIMOLÓGIAI INTÉZET

Szeged, 2016

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

- I. **Nyeste, A.**, Bencsura, P., Vida, I., Hegyi, Z., Homolya, L., Fodor, E., and Welker, E. (2016) Expression of the Prion Protein Family Member Shadoo Causes Drug Hypersensitivity That Is Diminished by the Coexpression of the Wild Type Prion Protein. *J. Biol. Chem.* 291, 4473–86

- II. Cingaram, P. K. R., **Nyeste, A.**, Dondapati, D. T., Fodor, E., and Welker, E. (2015) Prion Protein Does Not Confer Resistance to Hippocampus-Derived Zpl Cells against the Toxic Effects of Cu²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ and Co²⁺ Not Supporting a General Protective Role for PrP in Transition Metal Induced Toxicity. *PLoS One.* 10, e0139219

Egyéb publikációk:

- I. Schäfer, B., Orbán, E., Borics, A., Huszár, K., **Nyeste, A.**, Welker, E., and Tömböly, C. (2013) Preparation of semisynthetic lipoproteins with fluorescent cholesterol anchor and their introduction to the cell membrane with minimal disruption of the membrane. *Bioconjug. Chem.* 24, 1684–1697

- II. Tóth, E., Huszár, K., Bencsura, P., Kulcsár, P. I., Vodicska, B., **Nyeste, A.**, Welker, Z., Tóth, S., and Welker, E. (2014) Restriction enzyme body doubles and PCR cloning: on the general use of type IIs restriction enzymes for cloning. *PLoS One.* 9, e90896

Bevezetés

Prion fehérje

A prion fehérje (PrP) egy többféle sejtípusban kifejeződő sejt felszíni glikoprotein, mely legmagasabb szinten a központi idegrendszer neuronjaiban expresszál. Az érett fehérje két doménból áll, egy rendezetlen N-terminális farki régióból és egy globuláris C-terminális doménból.

A prion fehérje leginkább az átvihető szivacsos agysorvadásokban (transmissible spongiform encephalopathies – TSE) betöltött szerepéről ismert. Ezek ritka, gyógyíthatatlan és minden esetben halálos kimenetelű neurodegeneratív betegségek, amelyek számos emlős fajt, köztük az embert is érintik. A TSE fertőző ágensének fő komponense a prion fehérjének egy megváltozott konformációjú izoformája. A betegség során a prion fehérje konformációja megváltozik, a fiziológias formából (PrP^C) az abnormális formába (PrP^{Sc}) alakul át. Ez a változás feltehetően kulcsfontosságú esemény a TSE-k patogenezisében.

Számos bizonyíték támogatja azt a hipotézist, amely szerint a TSE során bekövetkező neurodegenerációt nem egy vitális PrP^C funkció elvesztése (*loss of function*), sem pedig pusztán egy toxikus PrP^{Sc} funkció megjelenése (*gain of function*), hanem valószínűleg **a PrP^C egy nem-toxikus és nem esszenciális funkciójának a megváltozása okozza** (*subversion or corruption of function*).

Ebből a hipotézisből az következik, hogy a prion fehérje citoprotektív és/vagy toxikus funkcióinak megismerése és vizsgálata segíthet a TSE során végbemenő neurodegeneráció okának a megértésében.

A prion fehérje citoprotektív funkciói

A prion fehérje funkciói közül számos hozható kapcsolatba különféle stresszorok elleni védelemmel. Állat és sejt kultúra modellekben a PrP kifejezése védelmet fejtett ki a glutamát, kainát és NMDA excitotoxicitással szemben, illetve leírták a fehérje

szuperoxid-dizmutáz aktivitását, amely oxidatív stressz elleni védelemben játszott szerepet.

Ezt támasztják alá azok a kísérletek, melyekben a prion fehérjét expresszáló, hippocampus eredetű immortalizált sejtvonalak ellenállóbbak voltak oxidatív stressz indukálta apoptózis, valamint szérumelvonás ellen, mint a prion fehérjét nem expresszáló kontroll sejtek.

A prion fehérje toxikus funkciói

Ismertek olyan prion fehérje mutánsok, amelyek neurodegeneratív hatást képesek kifejteni anélkül, hogy fertőző anyag, vagy PrP^{Sc} keletkezne.

A PrP hidrofób doménje (HD) egy rövid, alaninban, glicinben és valinban gazdag szakasz a fehérje N-terminális rendezetlen régiójában. Ezzel egy átfedő rész az úgynevezett centrális régió (CR). Olyan PrP transzgeneknek az expressziója, amelyekből a HD vagy a CR hiányzik (továbbiakban PrP Δ HD, illetve PrP Δ CR-nek jelölve), PrP^C *knock-out* egérben neurodegenerációt, illetve PrP^C *knock-out* primer kisagyi szemcsesejt, vagy idegi őssejt tenyészetekben megnövekedett mértékű sejtpusztulást okoznak. Ez a sejtpusztulás nem köthető a prion fehérje megváltozott konformációjú izoformájához, mert sem a transzgen egerekben, sem pedig sejt kultúrában nem keletkezik PrP^{Sc}, vagy fertőző anyag.

Ugyanez a jelenség nem figyelhető meg immortalizált sejt kultúrában. Ezzel szemben a deléciós mutáns PrP-ket kifejező sejteknek egy különös fenotípusát írták le: A PrP Δ CR, és számos hasonló PrP mutáns érzékenységet okozott két antibiotikum-osztály pozitív töltéssel bíró tagjaira: G418 és hygromycin (aminoglikozidok), illetve bleomycin és zeocin (glikopeptidok). Kinetikai vizsgálatok felfedték azt is, hogy a mutáns prion fehérjék megnövelték a sejtekben a G418 és a Zeocin felvételét, valamint teljes sejt patch clamp (whole cell patch clamping) technikával kimutatták, hogy ezek a PrP mutánsok spontán, a sejtbe befelé irányuló kation áramokat indukáltak.

A vad típusú PrP koexpressziója gátolja a PrP Δ HD és PrP Δ CR fehérjék összes vizsgált toxikus funkcióit, dózisfüggő módon csökkenti, vagy teljesen megszünteti a deléciós mutáns fehérjék hatásait.

Shadoo fehérje

A Shadoo fehérje (Shadow of the prion protein, Shadoo, Sho) a prion fehérjecsalád legkésőbb felfedezett tagja, amely a prion fehérjéhez hasonlóan szintén a központi idegrendszerben fejeződik ki legmagasabb szinten. A két fehérje hasonló motívumokat tartalmaz, habár nincs hosszabb szekvenciális hasonlóság közöttük. A Shadoo egy rendezetlen fehérje, és a prion fehérje N-terminális farkának szerkezeti analógiának tekinthető. Mindkét érett fehérje egy pozitívan töltött extrém N-terminális szegmással kezdődik, amelyeket egy-egy olyan szakasz követ a két fehérjében, amelyek egy aminosav motívum többszöri ismétlődéséből állnak. A PrP esetén ez egy 8 aminosav szekvencia ötszöri ismétlődése (octarepeat régió), a Shadoo esetén pedig egy 4 aminosavas szekvencia ismétlődése nyolcszor [(RXXX)₈ régió]. A Shadoo fehérjében is található egy főleg alanin, glicin illetve valinokból álló hidrofób domén, amely a prion fehérje hidrofób domén megfelelőjének tekinthető.

Érdekes módon nem csak szerkezeti hasonlóság létezik a Shadoo és a PrP N-terminális doménje között, hanem funkcionális is: a WT PrP-hez hasonlóan, a Shadoo jelenléte is megszünteti a PrP Δ HD mutánsok által okozott sejtpusztulást primer és immortalizált sejt kultúrákban. Továbbá immortalizált sejt kultúrában mind a vad típusú prion fehérje, mind a Shadoo kifejeződése is védelmet biztosított a glutamát excitotoxicitás okozta sejtpusztulással szemben.

Azt azonban, hogy a Shadoo képes-e megszüntetni a PrP Δ CR által okozott drog érzékenységet, illetve ionáramokat, korábban még nem vizsgálták.

Célkitűzések

Sok irodalmi adat támasztja alá azt a hipotézist, amely szerint a prion fehérjéhez köthető citoprotektív és toxikus hatások játszhatnak szerepet a TSE során végbemenő neurodegenerációban, ezért a prion fehérjecsalád ilyen funkcióinak vizsgálatát tűztük ki célul.

Modellünkben olyan humán eredetű és egyéb emlős immortalizált sejtvonalatokat választottunk, amelyekben a prion fehérje génje ki volt ütve, vagy alacsony endogén PrP expresszió jellemezte őket, mivel az endogén vad típusú PrP jelenléte potenciálisan befolyásolhatja a vizsgálni kívánt transzgenek hatását.

Két modellt hoztunk létre:

Az első modellben a prion fehérje és a szérumelvonás okozta sejtpusztulás kapcsolatát vizsgáltuk sejt kultúrában. Az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Nyújt-e a vad típusú PrP védelmet a szérumelvonás okozta apoptózissal szemben?
2. Megnöveli-e a PrP Δ CR expressziója a sejtek érzékenységét szérumelvonásra?
3. Okoz-e a PrP Δ CR kifejeződése sejtpusztulást?

A második modellben a korábban leírt PrP Δ CR indukálta Zeocin és G418 érzékenységet vizsgáltuk. Az első kérdésünk az irodalomból ismert Shadoo és a vad típusú PrP átfedő funkcióin alapult, és arra irányult, hogy a Shadoo képes-e megszüntetni a PrP Δ CR okozta Zeocin és G418 érzékenységet. Meglepő módon a Shadoo fehérje nem csak, hogy nem szüntette meg a megnövekedett antibiotikum-érzékenységet, hanem önmaga is ilyen érzékenységet okozott.

A további munkánk során a Shadoo fehérjének ezt a hatását jellemeztük.

Ebben a témakörben az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Képes-e a vad típusú PrP megszüntetni a Shadoo által okozott antibiotikum érzékenységet?
2. A Shadoo mely régiói szükségesek a fehérje drog-érzékenyítő hatásához?
3. Hasonlóan a PrP^ΔCR-hez, a Shadoo fehérje esetén is a kezdeti drogfelvétel megnövekedése állhat a megnövekedett drog érzékenység mögött?

Kísérletes módszerek

- A kísérletekben felhasznált különféle PrP és Shadoo konstrukciókat kódoló plazmid vektorok standard molekuláris biológiai technikákkal készültek el.
- A kísérleteinket az alábbi immortalizált emlős sejtvonalakon végeztük el: Zpl2-1, egy PrP knock-out egér hippocampus eredetű sejtvonal, HEK293, egy humán embrionális vese eredetű sejtvonal, valamint SH-SY5Y, egy humán neuroblastoma sejtvonal.
- A PrP, illetve Shadoo konstrukciók stabil expresszióját Sleeping Beauty transzpozon-alapú génbevitel rendszerrel, valamint egy 3. generációs lentivírus rendszerrel hoztuk létre a fenti sejtvonalakban. A PrP és Shadoo konstrukcióink mellett egy fluoreszcens zöld (EGFP, vagy piros (mCherry) riporter gén lett egyidejűleg beépítve a genomba. Az EGFP, illetve mCherry pozitív sejteket fluoreszcencia-aktivált sejtiszortolás (fluorescence-activated cell sorting, FACS) segítségével gyűjtöttük ki.
- Kísérleteinket monoklonális sejt kultúra helyett a transzgéneket stabilan kifejező sejtek populációin végeztük, ami által a transzgének genomi integrációjának pozícióhatását kiküszöböltük. A riporterfehérjék expresszióját rendszeresen ellenőriztük fluoreszcens mikroszkópos vizsgálattal. Amikor szükséges volt, a populációkból újra kiválogattuk a GFP, illetve mCherry pozitív sejteket. A PrP és Shadoo transzgének expressziói Western Blottal voltak ellenőrizve.

- A szérumelvonás modellben, 2, illetve 3 nap szérumelvonás után a halott, illetve korai apoptotikus sejtek arányát a populációkon belül annexin-V (korai apoptotikus sejteket jelöli), és 7-aminoactinomycin-D (7-AAD, késői apoptotikus és nekrotikus sejteket jelöli) festések után áramlási citometriával határoztuk meg.
- A drog érzékenység modellben PrP, és Shadoo transzgéneket kifejező sejtek életképességét vizsgáltuk MTT, illetve PrestoBlue esszékkel, 48 óra Zeocin, G418, vagy puromycin kezelés után.
- A sejtek kezdeti Zeocin felvétele egy óra Zeocin kezelést követően a drog által okozott DNS kettősszál törés detektálásával történt. A pozitív sejtmagok arányát a populációkon belül High Content Screening mikroszkópiával határoztuk meg.

Eredmények

1. Létrehoztuk különféle PrP és Shadoo transzgéneknek valamint fluoreszcens fehérjéknek a stabil koexpresszióját immortalizált egér hippocampus eredetű PrP knock-out sejtvonalban (Zpl2-1), illetve két humán eredetű sejtvonalban (SH-SY5Y és HEK293), amelyekben az endogén prion fehérje szint alacsony volt. A PrP és Shadoo fehérjék valamint a riporterfehérjék expressziója kapcsolt volt, ami által lehetőségünk nyílt fluoreszcensen (pl. fluoreszcens proteinnel fuzionált) nem jelölt fehérjék vizsgálatára.
2. A szérumelvonásos kísérletekben, két, illetve három nap szérumelvonás után nem mértünk a vad típusú prion fehérjét kifejező sejtekben magasabb életképességet a kontroll sejtvonalakhoz képest.
3. Annak ellenére, hogy a PrP^ΔCR expressziója nem okozott letális fenotípust, a mutáns PrP jelenléte gyengén megnövelte a Zpl2-1 sejtek érzékenységét a szérumelvonásra.

4. A drog érzékenység modellben azt találtuk, hogy a Shadoo fehérje – ellentétben az irodalomban leírt egyéb vizsgált modellel, ahol a Shadoo egy WT PrP funkcionális analógjaként viselkedik – nem állította helyre PrP Δ CR által okozott megnövekedett drog érzékenységet az egyik vizsgált sejtvonalon sem (SH-SY5Y és HEK293). Ezt a jelenséget egy a prion fehérjéhez képest alacsonyabb Shadoo expresszió okozta.
5. A mentés hiányának okaként azt találtuk, hogy a Shadoo, a PrP Δ CR fehérjéhez hasonlóan, önmaga is megnövelte a sejtek Zeocin és G418 érzékenységét, de a puromycin érzékenységet nem. Az érzékenység növekedésének mértéke összefüggött a Shadoo fehérje expressziós szintjével.
6. Azt találtuk, hogy a vad típusú PrP jelenléte megszüntette a Shadoo által okozott drog érzékenységet, hasonlóan, ahogy a PrP Δ CR által okozott hasonló fenotípust is.
7. Rövid ideig tartó Zeocin kezelés után azt tapasztaltuk, hogy a Shadoo, hasonlóan a PrP Δ CR-hez, megnövelte a sejtek kezdeti Zeocin felvételét, viszont azt a PrP Δ CR-nél kisebb mértékben tette.
8. Kísérleteinkben a Shadoo fehérje N-terminális (RXXX)₈ motívumának törlése, vagy az argininek helyettesítése glutammal megszüntette a fehérje által okozott drog érzékenységet, ami ennek a motívumnak a folyamatban betöltött esszenciális szerepére utalt.
9. A Shadoo fehérje hidrofób doménjének kitörlése nem szüntette meg a fehérje által okozott drog érzékenységet, viszont a fehérje saját HD-jának lecserélése a fehérjében a prion fehérje HD-val lecsökkentette a fehérje érzékenyítő aktivitását. Ez arra utalt, hogy a Shadoo HD-nak nincs esszenciális szerepe ebben a folyamatban, viszont valamilyen módon befolyásolja azt.

Konklúziók

Szérumelvonás modell

1. Modellünkben nem volt a vad típusú PrP-nek semmilyen kimutatható védő hatása a szérumelvonás okozta apoptózis ellen.
2. Habár a PrP Δ CR expresszió nem volt toxikus a Zpl2-1 sejtekben, a mutáns fehérje jelenléte gyengén megnövelte a sejtek érzékenységét a szérumelvonásra a kontroll sejtekhez képest.

Drog érzékenység modell

3. Modellünkben a Shadoo fehérje expressziója megnövelte a sejtek érzékenységét Zeocinra valamint G418-ra, de puromycinre nem.
4. Az eredményeink arra utalnak, hogy a Shadoo és a PrP Δ CR fehérjék által okozott drogérzékenységek mögött álló mechanizmusok szorosan összefüggenek:
 - 4.1. A két fehérje azonos antibiotikumokra okozott érzékenységet: Zeocinra és G418-ra igen, de puromycinre nem. Az érzékenység súlyossága függött a fehérjék expressziós szintjétől.
 - 4.2. A vad típusú PrP jelenléte mindkét vizsgált sejtvonalban megakadályozta a két fehérje által okozott G418 és Zeocin érzékenység kialakulását.
 - 4.3. Shadoo, a PrP Δ CR-hez hasonlóan, ám annál kisebb mértékben, megnövelte a sejtek kezdeti Zeocin felvételét.
5. Azonosítottuk az érett Shadoo fehérje egy régióját, az (RXXX)₈ motívumot, amelynek a jelenléte esszenciális a Shadoo által okozott drogérzékenység kialakulásában.

Köszönetnyilvánítás

Legelőször is, szeretném kifejezni őszinte hálámat a témavezetőmnek, Dr. Welker Ervinnek az útmutatásért, és, hogy megtanította a kontrollok fontosságát, valamint, hogy mit jelent kutatónak lenni. Továbbá szeretnék köszönetet mondani neki a türelméért és bátorításért a PhD-s éveim alatt, és amiért lehetőséget biztosított nekem a csoportjában a munkára.

Hálás vagyok Bencsura Petrának, Dr. Várady Györgynek, és Vida Istvánnak. A szaktudásuk és felbecsülhetetlen értékű segítségük nélkül ez a történet sokkal rövidebb lenne.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Német Katalinnak és a csoportjának a segítségért, amit a lentivírus-munkában biztosítottak. A lentivírusok használata transzfekció helyett megmentett attól, hogy idő előtt megöszüljek.

Hálás vagyok Kucsma Nórának és Dr. Fodor Elfriedának a sok hasznos tanácsért, és segítségért, amit a munkám során nyújtottak.

Külön hálával tartozom Dr. Welker Ervinnek, Dr. Telbisz Ágnesnek, Pravda Szilviának, és Dr. Tóth Eszternek a dolgozatom türelmes és kritikus olvasásáért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak, barátaimnak, a volt és jelenlegi kollegáimnak és doktorandusztársaimnak, akiknek a támogatása segített az Élet és Tudomány nehézségein túljutni.

