

Bodai László

**A Huntington kór patogenezisének  
vizsgálata *Drosophila* modell  
felhasználásával**

a doktori (PhD) értekezés tézisei

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi Kar  
Biológia Doktori Iskola

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

2004.

## BEVEZETÉS

Legalább kilenc öröklődő neurodegeneratív megbetegedés kiváltó oka a betegségért felelős génben található instabil CAG trinukleotid ismétlődés megsokszorozódása. A megsokszorozódott CAG ismétlődések megszakításoktól mentes poliglutamin (polyQ) doméneket alakítanak ki. Bizonyos ismétlődésszámnál hosszabb polyQ domének patológiás hatásúak és felelőssé tehetőek a betegségek kialakulásáért. Ezen betegségek közé tartozik a Huntington kór, a spinal and bulbar muscular atrophy, a dentatorubral-pallidoluisian atrophy és többféle spinocerebelláris ataxia, melyekre domináns öröklésment és későn manifesztálódó progresszív tünetek jellemzők.

A patológiás hosszúságú poliglutamin domének strukturális változásokat idéznek elő az érintett fehérjékben és abnormális fehérje-fehérje kölcsönhatásokhoz vezetnek. Ezek a kölcsönhatások felelősek az extra- és intranukleáris polyQ aggregátumok kialakulásáért, valamint megváltoztathatják az illető fehérje más faktorokhoz való kötődésének specificitását és erősségét is. Az ilyen direkt kölcsönhatások gátolhatják a kölcsönható partnerek biológiai aktivitását, illetve elősegíthetik aggregátumokba tömörödésüket, mely hatások végül zavarhoz vezetnek a sejt anyagcsere- és szabályozó folyamataiban. Az elmúlt években több ilyen, a betegségek kialakulásában szerepet játszó folyamatot azonosítottak. Ezek közé tartozik a fehérje anyagcsere, a transzkripció szabályozása, a  $Ca^{2+}$  homeosztázis, egyes mitokondriális funkciók, az apoptózis és az intracelluláris anyagtranszport.

A poliglutamin betegségek molekuláris

patomechanizmusában szerepet játszó folyamatok *in vivo* vizsgálatára létrehoztunk egy modellt *Drosophila melanogaster*-ben. A modell *huntingtin* illetve polyQ transzgének idegsejt specifikus expresszióján alapul. A transzgenikus modell alkalmasnak bizonyult a poliglutamin expresszió kiváltotta patológiás folyamatokat befolyásoló kémiai és genetikai faktorok azonosítására.

A hiszton acetiltranszferáz (HAT) enzimek az egyik olyan fehérjecsoport, amely kölcsönhat a polyQ peptidekkel. A HAT fehérjék fontos szerepet játszanak a transzkripció aktivitási mintázat kialakításában és számos más sejtszintű folyamat szabályozásában. A megfelelő acetilációs mintázat kialakításához elengedhetetlen a HAT fehérjék és az ellentétes hatású enzimcsoport, a hiszton deacetilázok (HDAC) összehangolt működése. Minthogy a polyQ peptidek és a HAT enzimek katalitikus doménje között kialakuló fizikai kölcsönhatás gátolja a HAT fehérjék enzimaktivitását *in vitro*, feltételeztük, hogy a megzavart acetilációs egyensúly is szerepet játszik a poliglutamin betegségek patogenezisében. Transzgenikus *Drosophila* modell rendszerünk segítségével igazoltuk a poliglutamin domént tartalmazó peptidek és a HAT fehérjék közti molekuláris kölcsönhatás *in vivo* jelentőségét. Munkánkkal kimutattuk a sejt felborult acetilációs egyensúlyának a poliglutamin patogenezisben betöltött szerepét és azonosítottunk egy a polyQ kiváltotta tünetek *in vivo* kezelését lehetővé tevő új vegyületcsoportot, a HDAC inhibitorokat.

## CÉLKITŰZÉSEK

- 1.** Jellemezzük az *UAS-polyglutamin* illetve *UAS-huntingtin* transzgéneket hordozó *Drosophila* törzsek neuron specifikus GAL4 driverekkel mutatott fenotípusát. Kiválasztjuk azokat a kombinációkat, melyek fenotípusa alkalmas a polyQ kiváltotta folyamatok vizsgálatára.
- 2.** Optimalizáljuk a transzgenikus törzsekkel való vegyület tesztelés körülményeit.
- 3.** Ismert hatású kémiai és genetikai faktorok felhasználásával megvizsgáljuk, hogy a felállított *Drosophila* modell megfelelően reagál-e (érzékeny-e) a polyQ expresszió által kiváltott patológias folyamatokat módosító hatásokra.
- 4.** Megvizsgáljuk, hogy a sejtek deacetiláz aktivitását csökkentő, funkcióvesztéses *Sin3A* mutáció szuppresszálja-e a polyQ kiváltotta fenotípusokat *in vivo*.
- 5.** Kimutatjuk a HDAC inhibitor vegyületek polyQ fenotípusokra gyakorolt hatását.
- 6.** Megvizsgáljuk, hogy az acetilációs egyensúlynak a polyQ kiváltotta patológias folyamatokra gyakorolt hatásának hátterében több additív hatású faktor áll-e, vagy kis számú, kulcsfontosságú fehérje csökkent aktivitása a meghatározó.

## **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

Poliglutamin tartalmú fehérjék kifejeztetése transzgenikus legyekben az UAS/GAL4 expressziós rendszer felhasználásával.

Vegyületesztelés és genetikai interakciós tesztek transzgenikus legyeken.

Az adult retina pseudopupil analízise.

Lárvális agy extraktumok western analízise.

Deléciók térképezése genomi PCR-ral.

Statisztikai analízis.

## EREDMÉNYEK

1. Laboratóriumunkban számos *Q48*, *Q108*, *Q50Httexon1* illetve *Q93Httexon1* UAS konstrukciót hordozó transzgenikus *Drosophila* törzset hoztak létre. Az UAS konstrukciók idegrendszerben való kifejeződését neuron specifikus GAL4 driver törzsek felhasználásával biztosítottuk. Olyan driver – recipiens törzs kombinációk kiválasztását tűztük ki célul, melyek fenotípusuk módosulása által alkalmasak a poliglutamin kiváltotta patológiás folyamatokban beálló változások jelzésére. Mivel a GAL4 transzaktiváló hatása hőmérséklet függő, törzseink fenotípusát három hőmérsékleten vizsgáltuk. E vizsgálat eredményeképpen három transzgenikus vonalat (egy *Q48*, egy *Q108* és egy *Q93Httexon1* törzset) választottunk ki további vizsgálatainkhoz, melyek a transzgenek expressziós szintjétől függő súlyos szemilevális fenotípust mutattak.

2. Annak érdekében, hogy a transzgenikus modell megbízható eredményeket szolgáltató rendszerként működjön, optimalizáltuk a kísérleti körülményeket. A kiválasztott törzsek 27 °C-on mindkét irányba módosítható fenotípust mutattak, ezért ezt a tenyésztési hőmérsékletet alkalmaztuk a legtöbb kísérlet során. A laboratóriumunkban hozzáférhető táptalajok közül kiválasztottuk azt, mely a vad típusú muslincák egyenletes egyedfejlődését leginkább biztosította (Heidi food). Vad típusú törzsek felhasználásával vizsgáltuk a vegyületek oldószereként felhasznált DMSO toxicitásának dózisfüggését. Megállapítottuk hogy a DMSO legmagasabb kísérleteinkben felhasználható koncentrációja 0,05%.

**3.** Mielőtt a *Drosophila* modellt kísérletekben felhasználtuk volna, megvizsgáltuk, hogy képes-e a polyQ okozta patológiás folyamatokat befolyásoló ismert tényezőket fenotípus változáson keresztül jelezni. E célból a fejlődő legyeket az aggregátumok kialakulását gátló Congo reddel etettük. A Congo red szuppresszálta a polyQ indukálta szemiletális és neurodegenerációs fenotípusokat. Ezek után megvizsgáltuk, hogy a *C-terminal Binding Protein* funkcióvesztéses mutációja hogyan befolyásolja a transzgenikus legyek fenotípusát. Transzgenikus SCA1 modellben kapott eredményeknek megfelelően mi is a fenotípus erősödését figyeltük meg. Ezzel bebizonyosodott, hogy modell rendszerünk a polyQ patológiára ható mind kémiai mind genetikai faktorok detektálására alkalmas.

**4.** A polyQ domént tartalmazó fehérjékhez számos más fehérje képes kötődni, melyek közül jó néhány a hiszton acetiltaranszferázok csoportjába sorolható. A HAT enzimek más fehérjék kovalens módosítása által befolyásolják a sejtek transzkripciós aktivitását. Azon *in vitro* kísérletek, melyek demonstrálták, hogy polyQ peptidek direkt kölcsönhatnak HAT fehérjékkel és gátolják azok aktivitását, arra sarkalltak bennünket, hogy megvizsgáljuk e jelenség *in vivo* jelentőségét. Feltételeztük, hogy amennyiben a HAT enzimek gátlása jelentőséggel bír a polyQ patogenezis szempontjából, akkor a sejt deacetiláz aktivitásának csökkentésével a polyQ indukálta fenotípusok szuppresszálhatóak. Hogy hipotézisünket teszteljük, a sejtek deacetiláz aktivitását a HDAC co-represszor *Sin3A* gén funkcióvesztéses alléljének felhasználásával

csökkentettük. A *Sin3A* gén hipomorf mutációja a *Q93Httexon1* transzgén indukálta fenotípus szuppresszorának bizonyult.

**5.** Hogy kizárjuk annak a lehetőségét, hogy a *Sin3A* mutációja nem az acetilációs egyensúly befolyásolásán, hanem a *Sin3A* génre specifikus egyéb kölcsönhatásokon keresztül fejt ki hatását, megvizsgáltuk, hogy HDAC inhibitor vegyületek alkalmazásával szuppresszálható-e a polyQ indukálta fenotípus. Mindkét vizsgált vegyület, a butirát és a SAHA is szuppresszálta az általunk vizsgált polyQ okozta fenotípusokat. Így az etetési kísérletekkel sikerült igazolnunk a felborult acetilációs egyensúlynak a polyQ patogenezisben játszott szerepét és a HDAC inhibitorok képében azonosítottuk egy olyan vegyületsoportot, mely *in vivo* rendszerben hatásosnak bizonyult a polyQ expresszió tüneteinek kezelésében.

**6.** Miután beláttuk, hogy a fehérje acetilációnak fontos szerepe van a polyQ patogenezisben, kíváncsiak voltunk, hogy e jelenségben kis számú kiemelt fontosságú enzim játszik kulcsszerepet, vagy az acetilációs egyensúlyt kialakító számos faktor additív hatása érvényesül-e. E problémát genetikai interakciós kísérletekkel vizsgáltuk, melyekben HAT és HDAC gének funkcióvesztéses alléljeit, illetve amennyiben ezek nem álltak rendelkezésre, az azokat átfedő deléciókat használtuk fel. Igazoltuk, hogy a felhasznált deléciók valóban érintik a vizsgálni kívánt géneket. A HAT mutációkkal végzett keresztezésekkel megállapítottuk, hogy többféle fehérje családba tartozó acetiltranszferáz enzim



csökkent aktivitása is fokozza a polyQ expresszió okozta fenotípust. Hasonlóképpen, különböző katalitikus mechanizmussal rendelkező HDAC enzimek csökkent aktivitása is a polyQ fenotípus szuppresszorának bizonyult. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a poliglutamin betegségekben az acetilációs egyensúly általános felborulása, nem pedig néhány kiemelt faktor specifikus funkciójának kiesése a döntő tényező.

## **AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK**

Steffan, J. S., **Bodai, L.**, Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B. L., Kazantsev, A., Schmidt, E., Zhu, Y. Z., Greenwald, M., Kurokawa, R., Housman, D. E., Jackson, G. R., Marsh, J. L., Thompson, L. M. (2001). Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413, 739-743.

IF: 30,4

Apostol, B. L., Kazantsev, A., Raffioni, S., Illes, K., Pallos, J., **Bodai, L.**, Slepko, N., Bear, J. E., Gertler, F. B., Hersch, S., Housman, D. E., Marsh, J. L., Thompson, L. M. (2003). A cell-based assay for aggregation inhibitors as therapeutics of polyglutamine-repeat disease and validation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5950-5955.

IF: 10,7

**Bodai, L.**, Pallos, J., Thompson, L. M., and Marsh, J. L. (2003). Altered protein acetylation in polyglutamine diseases. *Curr Med Chem* 10, 2577-2587.

IF: 5,8

## **AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ SZABADALOM**

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