

Mariusz Waluś

Institute for Basic Research in Developmental Disabilities
Staten Island, NY, USA

Znaczenie mutacji genu trójpeptydylopeptydazy I dla syntezy, dojrzewania i funkcjonalności jego produktu

Streszczenie

Trójpeptydylopeptydaza I (TPPI, białko CLN2, EC 3.4.14.9) jest lizosomalną egzo-peptydazą biorącą udział w sekwencyjnym odcinaniu trójpeptydów z niezmodyfikowanego N-końca polipeptydów. Gen *CLN2* kodujący TPPI znajduje się w chromosomie 11p15. Enzym ten jest syntetyzowany w postaci 563-aminokwasowego prekursora zawierającego 19-aminokwasowy peptyd sygnałowy i 176-aminokwasowy prosegment. Mutacje genu *CLN2* prowadzą do ciężkiego, recesywnie dziedziczonego schorzenia wynikającego z braku aktywności TPPI, klasycznej późnoniemowłęcz ceroidolipofuscynozy neuronalnej (cLINCL, CLN2).

W celu zbadania molekularnych mechanizmów choroby CLN2 wybraliśmy 14 mutacji zmiany sensu genu *CLN2*, z których 2 znajdowały się w części kodującej prosegment a pozostałe w części kodującej dojrzały enzym. cDNA TPPI z pojedynczo wprowadzonymi mutacjami poddano stabilnej ekspresji w komórkach jajnika chomika chińskiego (komórki CHO). Zaplanowane eksperymenty pozwoliły początkowo na określenie poziomu ekspresji i wewnątrzkomórkowej lokalizacji mutein. Następnie zbadano wpływ mutacji na transport, dojrzewanie, glikozylację, tworzenie mostków dwusiarczkowych, degradację i aktywność enzymatyczną TPPI. W celu zbadania zmian termodynamicznej stabilności natywnej struktury pro-TPPI pod wpływem mutacji zastosowano podejście doświadczalne i teoretyczne. Zbadano też potencjał obniżonej temperatury oraz chaperonów chemicznych i farmakologicznych do zapobiegania/odwracania efektów badanych mutacji.

Jedenaście z badanych mutacji zaburzało prawidłowe dojrzewanie i transport TPPI do lizosomów i tylko jedna z jedenastu mutein (TPPI-Gly77Arg) wykazywała aktywność enzymatyczną, niemniej jednak na poziomie tylko ~12% aktywności TPPI typu dzikiego (wtTPPI). Muteiny charakteryzujące się nieprawidłowym dojrzewaniem wykazywały również częściowo lub całkowicie zahamowany eksport z ER. Część zmutowanych wariantów z całkowicie lub prawie całkowicie zahamowanym transportem do lizosomów była przemieszczana na zewnątrz komórek w postaci proenzymu. Co więcej, nienatywna dimeryzacja proenzymów niektórych mutein (TPPI-Pro202Leu, -Gly284Val, -Asn286Ser, -

Ile287Asn) w ER wydawała się sprzyjać ich sekrecji i jednocześnie zapobiegać ich degradacji na drodze ERAD.

Tylko jedna z dwóch mutacji zlokalizowanych w prosegmentie TPPI (G77R) zaburzała dojrzewanie i aktywność enzymu podczas gdy druga (R127Q) nie wykazywała żadnych negatywnych efektów w porównaniu z wtTPPI.

Inkubacja komórek w obniżonej temperaturze (28°C) indukowała 12- i 5-krotny wzrost poziomu dojrzałej formy enzymu, o masie cząsteczkowej ~46 kDa w muteinach odpowiednio, TPPI-Val277Met i TPPI-Arg447His. Dodatkowo, komórkowa aktywność TPPI-Arg447His wzrosła proporcjonalnie do poziomu dojrzałej postaci tej muteiny (do 10% poziomu aktywności w wtTPPI). Poza poprawą dojrzewania TPPI-Val277Met w wyniku inkubacji komórek z 1.5% DMSO pozostałe chaperony chemiczne (TMAO i 4-PBA), jak i specyficzny inhibitor TPPI, (AAF-CMK) mający pełnić w tym przypadku rolę chaperonu farmakologicznego, nie poprawiły ani dojrzewania ani komórkowej aktywności badanych mutein.

Przeprowadzone badania wykazały zatem nieprawidłowe fałdowanie w ER i zahamowanie transportu proenzymu TPPI do lizosomów dla większości zbadanych mutein jako podstawowe przyczyny braku aktywności TPPI w komórkach pacjentów dotkniętych CLN2. Ponadto, wyniki inkubacji w obniżonej temperaturze i w obecności niskocząsteczkowych związków chaperonowych pomogą w oszacowaniu przydatności odpowiednich metod terapeutycznych do zapobiegania temu schorzeniu w przypadkach związanych z poszczególnymi mutacjami.