

# **MTA doktori értekezés tézisei**

**Az Alzheimer-kór kezelésére alkalmazható potenciális  
gyógyszerjelölt vegyületek fejlesztése**

***Dr. Fülöp Livia***

*Szegedi Tudományegyetem  
2024*



## Előzmények és célkitűzés

Doktori munkámban az Orvosi Vegytani Intézet Neurodegeneratív Betegségek Kutatócsoportjában 2005-2023 közötti időszakban általam végzett, illetve irányított kutatási témákat és az elért eredményeket összegzem. A munka középpontjában az Alzheimer-kórral (AK) kapcsolatos gyógyszerfejlesztés áll, egyrészt potenciális hatóanyagok tervezése, másrészt az ezek teszteléséhez szükséges kísérleti rendszerek kidolgozása és optimalizálása. A következő célokat fogalmaztuk meg:

### ***I. Szintetikus amiloidot alkalmazó kísérleti rendszerek fejlesztése***

A béta-amiloid (A $\beta$ ) biológiai kísérletekben alkalmazható, különböző hosszúságú, esetenként kémiaiailag módosított (pl. fluoreszcens kromofórral jelölt) változatainak nagy mennyiségben történő előállításához optimalizált szintézis eljárásokra van szükség. Az irodalomban közölt protokollok sokszor hiányosak, a peptid karakterét figyelembe vevő metodikai megoldásokat nem részletezik. Az A $\beta$  izopeptid formájának korábban leírt szintézise számos melléktermék képződéséhez vezetett. Ezért szükség volt a meglévő eljárások megfelelő kiegészítésére, adott esetben célzott átalakítására. Emellett a szintetikus peptid alkalmazhatóságát megkönnyítő, standardizált mintakészítési eljárásokat kellett bevezetni, amikkel javulhat a kísérleti eredmények reprodukálhatósága.

Annak megállapítására, hogy az izo-A $\beta$  peptidből képződő oligomerek szerkezetük, illetve biológiai hatásuk tekintetében mutatnak-e eltérést a konvencionális szintetikus A $\beta$ -ból előállítható aggregátumoktól, szükséges volt az aggregáció fizikai-kémiai vizsgálati módszerekkel történő jellemzése. A protokollok kidolgozása során figyelembe kellett vennünk a biológiai vizsgálati rendszerek sajátosságait és tesztelnünk a fiziológiás körülményeket biztosító kísérleti paraméterek hatását az aggregáció folyamatára. A lejátszódó szerkezeti változások elméleti módszerekkel történő modellezése segíthet felderíteni lehetséges metodikai „csapdákat”, melyek elkerülésével javult a mérési eljárások robusztussága.

### ***II. Az A $\beta$ -ra, mint terápiás célpontra irányuló mechanizmus-kutatás, mérési eljárás- és gyógyszerfejlesztés***

Az AK-ban túltermelődt A $\beta$  eltávolítása mellett terápiás jelentőséggel bírhatnak olyan eljárások, melyekkel a peptid neurotoxikus hatása csökkenthető. Ehhez azonosítani kell azokat a kölcsönhatásokat, amelyek révén az A $\beta$  oligomerek toxicitása érvényesül. Célunk volt a kölcsönható partnerek azonosításával új mechanizmus-utak feltérképezése, azok AK-ban betöltött relevanciájának funkcionális vizsgálatokkal történő bizonyítása.

A neurotoxicitás megakadályozására tervezett potenciális gyógyszerjelölt vegyületek pontos hatásmechanizmusának felderítése terén is mutatkoztak hiányosságok. Az agyban előforduló A $\beta$  fibrillumok szerkezetének megtörése előnytelen is lehet, mivel az így szabaddá váló monomerek kisebb méretű, de valószínűleg erős neurotoxikus hatással rendelkező oligomereket képezhetnek. Ezért kísérletet tettünk az általunk tervezett, az aggregáció folyamatát megváltoztató molekulák (peptidek és peptidomimetikumok) hatásának fizikai-kémiai módszerekkel történő feltérképezésére, illetve megpróbáltuk az aggregáció megváltozása és a biológiai kísérletben mérhető hatás közötti összefüggéseket is feltárni.

A molekulatervezések során az aggregációt befolyásoló szekvenciákon alapulva megkíséreltük olyan önrendező foldamerek előállítását, melyek az A $\beta$  oligomerekhez nagy affinitással tudnak kötődni. A kötés erősségének növelése érdekében a foldamereket különböző méretű és topológiájú dendrimer-alapvázakhoz kapcsoltuk. A változatos szerkezetű konjugátumok az A $\beta$  oligomerekkel, azok méretétől függően, eltérő erősségű kölcsönhatásba tudnak lépni, neurotoxikus hatásukat képesek lehetnek semlegesíteni. A méretszelektív kölcsönhatás kiindulási pont lehet egy olyan *in*

*vitro* kísérleti rendszer kidolgozásához is, mellyel az enzimkapcsolt immunoszorpciós esszékhez (ELISA) hasonló kísérletben a bioaktív A $\beta$  oligomer mennyiségi meghatározása is lehetővé válik.

### **III. Az AICD képződésének szerepe az AK-ban**

A fibrilláris A $\beta$ -val kölcsönható fehérjék hasonlóságának bioinformatikai módszerekkel történő elemzésével megkíséreltünk olyan közös szekvenciaelemeket azonosítani, melyeken alapulva a kölcsönhatás befolyásolására alkalmas molekulák tervezhetők. A hatásmechanizmusuk felderítése során felmerült lehetőségként az AICD működésének befolyásolása, annak Fe65-tel való kölcsönhatása révén. Az AICD az Fe65 fehérjéhez kapcsolódva az A $\beta$  termelődést közvetlenül befolyásolhatja, ezért a kölcsönhatást megváltoztató molekulák alternatív terápiás megoldást jelenthetnek az A $\beta$ -t közvetlenül célzó vegyületek mellett. Az azonosított rövid peptidszekvenciák, PXP motívumot tartalmazó szerkezetük miatt, a prolinban gazdag fehérjékhez hasonlóan kötődhetnek bizonyos WW-doménekhez. Az Fe65-ben található ilyen domén, így kötési kísérletekkel kívántuk bizonyítani az általunk tervezett, *in vitro* biológiai vizsgálatokban leghatásosabbnak bizonyult molekula, a P33 és az Fe65-WW domén közötti specifikus kölcsönhatást. A P33 vegyület hatását az APP feldolgozására, az A $\beta$  termelődésére és a gyulladással kapcsolatos folyamatokra *in vivo* kísérlettel is igazolni kívántuk, APPxPS1-es transzgen egértörzsből, 3 hónapon át tartó krónikus kezelési séma alkalmazása mellett.

### **IV. Neurogenesis felnőtt korban, összefüggés az AICD-kapcsolt mechanizmusokkal**

A neurogenesis és az amiloid patológia egymásra hatását jelenleg csak élőállatos modellben tudjuk vizsgálni. Ehhez viszont szükséges az állatmodellben a kérdéses folyamatok időbeliségének tanulmányozása. Tudomásunk szerint az APPxPS1-es transzgen egértörzsszel korábban végzett ilyen irányú kutatások nem fedték le az állatok teljes élettartamát, így célul tűztük ki az állatok születéstől 18 hónapos korig tartó követő vizsgálatával az amiloid-patológia bizonyos jegyeinek (neurotoxikus oligomerek képzése, plakkok kialakulása, neuronflammáció, tanulási és memória-képességek romlása) illetve a neurogenesisnek az időbeli feltérképezését ebben a modellben. Az ok-okozati viszonyok és időbeli kapcsolódások feltárása után a P33 vegyülettel történő kezelési séma is optimalizálhatóvá vált a legkedvezőbb hatás elérése céljából. Feltételezésünk szerint a P33 molekulával kapott eredmények más, az AK-ban alkalmazható potenciális terapeutikum alkalmazásánál is segítséget nyújthatnak a kezelési protokoll kidolgozásában.

### **V. Szigma-1 receptor modulátorok hatása a neuroinflammációra és a neurogenesisre**

A szigma-1 receptor (S1R) működésének befolyásolása már megjelent az AK terápiás megközelítései között. Igény mutatkozik az eddigi vegyületek mellett új szerkezetű S1R modulátorok felfedezésére, melyhez a leghatékonyabb eszköz egy *in silico* szűrésre alkalmas, elméleti kémiai módszereket alkalmazó rendszer lehet. Ezért egy olyan virtuális szűrőeljárást (VS) kívántunk kidolgozni, mely az eddig leírt S1R agonista és antagonisták jellegű kötési konformációkat kombinálja, ami révén feltételezhetően a kiválasztott molekulák kötődési jellegéről is kaphatunk becslést. A VS segítségével saját molekulakönyvtárunkból kíséreltünk meg az eddig azonosított S1R modulátoroktól eltérő szerkezetű, új potenciális S1R modulátorokat azonosítani.

A neurogenesis és a gyulladással kapcsolatos folyamatok összefüggését megerősítő további vizsgálatokhoz, illetve S1R modulátorok neurogenesisre kifejtett hatásának teszteléséhez a korábbi kísérletekben alkalmazott transzgen állatmodellt ki akartuk váltani egy olcsóbb, gyorsabb kísérleti rendszerrel. Ezért kifejlesztettünk egy A $\beta$ -injektációs egérmódellet, melyben igazolni kívántuk, hogy egyszeri A $\beta$  oligomer-adagolással kiváltható a neurogenesis molekuláris szintű megzavarása. Ebben a modellben teszteltük az endogén S1R-agonista DMT, illetve a szintetikus agonista PRE-084 neurogenesisre és gyulladásra kiváltott hatását.

## Alkalmazott módszerek

A molekulák előállítását célzó, általunk alkalmazott szintetikus eljárások többsége a szilárd fázisú peptidszintézis (SPPS) metodikáján alapul. Az A $\beta$  kémiaiilag módosított származéka, az izo-A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptid, amiből fiziológias pH-n egy O $\rightarrow$ N acilvándorlást követően keletkezik a konvencionális szerkezetű A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Az SPPS standard Boc-kémián alapuló lépéseinek optimalizált alkalmazásával lehetővé vált az izo-A $\beta$ <sub>1-42</sub> nagy mennyiségben előállítása. A neurotoxikus A $\beta$  oligomerek hatását kivédő peptidok, peptidomimetikumok, foldamerek, és foldamer-dendrimer konjugátumok szintéziséhez szintén SPPS-metodikákat alkalmaztunk, a konjugátumok esetében pedig a dendrimer alapvázakhoz a foldamereket oldatfázisban, tiol-maleimid reakcióval kapcsoljuk.

Az A $\beta$  peptid aggregációjának modellezésére replika-kicserélődéses molekuladinamikai számításokat végeztünk. A másodlagos szerkezet változása követhető ThT-kötődésen alapuló spektrofotometriával, CD- vagy NMR-spektroszkópiával. Az aggregátumok méreteloszlását dinamikus fényszórás mérés, méretkizárásos kromatográfia, illetve mikroszkópos vizualizáció (TEM, AFM) segítségével jellemeztük. Az amiloid aggregációt módosító, illetve AICD-n keresztül ható molekulák hatásmechanizmusának fizikai-kémiai vizsgálatához rendelkezésre állnak a már említett spektroszkópiai módszerek. A kötési affinitás jellemzésére a szaturációtranszfer-differencia NMR-t, az izoterm titrációs kalorimetriát (ITC), és az ELISA tesztet alkalmaztunk. Az AK patomechanizmusának megismeréséhez hozzájárultak azok a vizsgálataink, melyekkel igazoltuk az A $\beta$  oligomerek transzlációs folyamatokra tett hatását. Az oligomerek és a riboszómák közötti kölcsönhatás kimutatására kidolgoztunk egy speciális, tisztított riboszóma frakciót alkalmazó ELISA eljárást. Emellett egy *in vitro* transzlációs tesztben, nyúl retikulocita lizátum felhasználásán alapuló lumineszcenciás méréssel igazoltuk a transzlációs fehérjerendszer funkcionális érintettségét is, A $\beta$  oligomerek hatására. Ugyancsak az ELISA mérési elvén alapul az a saját fejlesztésű tesztünk, mely optimalizált szerkezetű foldamer-dendrimer konjugátumot alkalmaz A $\beta$  oligomerek oldatfázisban történő kvantitatív meghatározására.

A molekulák hatásának biológiai kísérletekben történő vizsgálata során számos konvencionális, *in vitro* eljárást alkalmaztunk. A sejtek életképességének változását MTT-tesztben sejttenyészetben, illetve patkányagyból izolált agyszöveten is vizsgáltuk. További viabilitásra utaló adatot szolgáltatnak a valós idejű impedanciamérések sejttenyészeteken. Molekuláris szintű változásokat mind sejttenyészetből, mind kezelt állatok agyszövetéből nyert mintákon végzett western blot, dot blot és ELISA tesztek segítségével azonosítottunk, illetve a megfelelő agyi területek hisztológiai, immunhisztokémiai vizsgálatával igazoltunk. Ezek a mérések, valamint a patkány agyszöveteken végzett elektrofiziológiai vizsgálatok egyaránt alkalmasak voltak anyagok tesztelésére, illetve hatásmechanizmus tisztázására is.

A hatásmechanizmus felderítése *in vivo* élőállatos modellekben is történhet. Ilyen modell lehet vad típusú egér kezelése A $\beta$  peptiddel és a kiváltott biológiai hatás vizsgálata. Ezt a megközelítést alkalmaztuk a neurogenesis és a neuroinflammáció bizonyos molekuláris jellemzőinek tanulmányozására egy optimalizált injektációs egérmodellben. Emellett APPxPS1-es transzgen egérmodellt is alkalmaztunk, az állatokban feltérképeztük az amiloid-patológia, a neuroinflammáció és neurogenesis változását életkoruk függvényében. A kezeléseket követően az állatok tanulási képességét és memória funkcióit Morris Water Maze kísérletekkel teszteltük.

Új szerkezetű S1R modulátorok azonosítása lehetséges *in silico* modellezést alkalmazó szűrés eljárással. Ehhez két, irodalomban leírt S1R-szerkezetet használtunk, amikre nagy affinitással kötődő molekulákat, valamint véletlenszerűen válogatott „csali” molekulákat dokkoltunk. Ebben a dokkolási modellben, saját, kb. 4000 molekulát tartalmazó könyvtárunk szűrésével azonosítottunk 40, potenciálisan az S1R-hez kötési affinitást mutató vegyületet. Ezután a kötődést radioligand-kötődési vizsgálatokkal igazoltunk.

## Új tudományos eredmények

### ***I. Szintetikus A $\beta$ peptidek (A $\beta$ <sub>1-42</sub>, A $\beta$ <sub>25-35</sub>, AMCA-jelölt A $\beta$ <sub>1-42</sub>) biológiai kísérletekben történő felhasználására alkalmas protokollok kidolgozása***

Az amiloid kaskád hipotézis oligomerekre történő kiterjesztése után, körülbelül a 2000-es évek elejétől egyre nagyobb szerephez jutott a különböző hosszúságú, szintetikus forrásból származó A $\beta$  peptidek felhasználása a kísérleti modellekben. Ezek fiziológias körülmények közötti felhasználhatóságát erőteljesen korlátozza kifejezett aggregációs hajlamuk, ami már viszonylag rövid fragmensek (pl. az A $\beta$ <sub>25-35</sub>) esetén is érvényesül. Tapasztalatunk szerint a biológus kooperáló partnerek részéről mindig mutatkozott egyfajta bizalmatlanság a szintetikus forrásból származó A $\beta$ -val szemben. Ez köszönhető egyrészt a szintézis során keletkező deléciós szekvenciák nehéz eltávolíthatóságának, másrészt a peptid aggregációs karakterisztikája az egyes szintetikus sarzsok között is eltér, illetve tárolása során is megváltozhat a külső körülmények (pl. tárolás formája, levegő páratartalma) miatt. A konvencionális SPPS-sel előállított peptidek aggregációs tulajdonságainak ellenőrzésére rendszeresítettünk fizikai-kémiai metodikákat, illetve olyan mintakészítési eljárásokat dolgoztunk ki, melyekkel a kívánt aggregációs állapot az alkalmazás ideje alatt fenntartható. Ilyen minták felhasználásával sikerült kapcsolatot találni az A $\beta$ <sub>25-35</sub> és A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptid által kiváltott epileptiform aktivitás és a peptid aggregációs állapota között *in vitro* elektrofiziológiai kísérletben, mely során sikerült bizonyítani, hogy valószínűleg a fibrilláris aggregátumok felelősek az észlelt hatásért.

### ***II. Az izo-A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptid optimalizált szintézise, a peptid felhasználásával standardizált oligomer- és fibrillum készítési protokollok kidolgozása***

Az A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptid kémiai módosításával egy, a kísérletekhez előnyösebben alkalmazható formához (izo-A $\beta$ <sub>1-42</sub>) jutottunk, mely savas pH-tartományban megtartja módosított kémiai szerkezetét, míg semleges vagy bázikus közegben egy O $\rightarrow$ N acilvándorlás révén átalakul a konvencionális kémiai szerkezetű A $\beta$  peptiddé. Az izopeptidre építve protokollokat dolgoztunk ki a két fő aggregációs (oligomer és fibrilláris) forma előállítására. A szintetikus módosítás és a standardizált protokollok együttesen növelték a kísérletek reprodukálhatóságát, illetve lehetővé tették olyan kísérleti tervek megvalósítását, amelyben az A $\beta$ -mintaoldatot egyszerű módszerekkel előállítva, akár egy kezelési napon át szignifikáns változást nem mutató aggregátum-eloszlási állapotban lehetett tartani. Nem volt szükség kaotróp oldószer adagolására a mintához, a mérések többszöri ismétléséhez az izo-A $\beta$  formából előállított törzsoldat akár nagy koncentrációban, aggregáció nélkül tárolható volt, az egyes törzsoldat-részletekből készített minták a fiziológias pH és ionkoncentráció kezdeti beállítását követően időben jól jellemezhető, reprodukálhatóan azonos aggregációs kinetikával rendelkeztek. A folyamatos vizsgálatok alapján bizonyossá vált, hogy az izo-A $\beta$ <sub>1-42</sub>-ből előállítható aggregátumok jelentős neurotoxikus hatást tudnak kiváltani, mellyel sejtes kísérletekben életképességbeli változás idézhető elő, *ex vivo* agyszöveten történő elektrofiziológiai mérésekben tapasztalható az LTP megváltozása, rágcslókra kidolgozott injektációs modellben igazolható a HC-ban csökkent dendrittüske-sűrűség, illetve előidézhető magatartás- és tanulásbeli zavarás. Fluoreszcens kromofórral jelölt konvencionális A $\beta$ <sub>1-42</sub> és izo-A $\beta$ <sub>1-42</sub> keverékéből SOP-vel előállított oligomerek alkalmazásával bizonyítottuk, hogy az agykamrai injektálás esetén az oligomerek a glimfatikus rendszer segítségével viszonylag gyorsan eljuthatnak az agyszövet különböző területeire, ami a kísérleti modellekben történő alkalmazhatóság alapfeltétele.

A kísérletek folyamatos elemzése arra is rávilágított, hogy az izo-A $\beta$ <sub>1-42</sub> aggregációját a fiziológias összetételű mintapufferekben található alkáliföldfém-ionok nem kívánt irányban befolyásolják. Ez a jelenség megmagyarázható az izopeptid egyedi kiindulási szerkezetével. A konvencionális A $\beta$ <sub>1-42</sub> aggregációja során egy  $\beta$ -hajtú konformáció alakul ki, aminek a stabilizációjában szerepet játszó oldalláncok az izopeptidben más orientáltságúak, ezért ha az O $\rightarrow$ N acilvándorlás a feloldás során Ca<sup>2+</sup>

vagy  $Mg^{2+}$ -ionok jelenlétében következik be, az izopeptidből képződő monomer kiinduló konformációja eltérő lesz a konvencionális  $A\beta_{1-42}$  kiindulási konformációjától. A kétféle monomer más aggregációs kinetikájú utat jár be, így a képződő aggregátumok morfológiája és biológiai hatása is különbözhet. Egy ilyen nem várt metodikai „csapda” felismerése és kiküszöbölése elengedhetetlen a széles körű felhasználáshoz; ebben az esetben az alkáliföldfém-ionoknak az oligomerizációt elindító pH-beállítást követő hozzáadása az oldathoz egyszerű megoldást nyújt a problémára.

### III. $A\beta_{1-42}$ oligomerekkel kölcsönható fehérjék azonosítása a AK patológiájában

Máig nem tisztázott, hogy az  $A\beta$  pontosan milyen fehérjékkel történő kölcsönhatások révén fejti ki neurotoxikus hatását. Szerkezete révén számos proteinhoz mutat kötődési affinitást, emiatt az AK szempontjából ténylegesen releváns kölcsönhatások azonosítása problémás. Az interaktóma-kutatás célja az eddig még fel nem derített fehérje-fehérje kölcsönhatások azonosítása, eredményeit viszont funkcionális vizsgálatokkal igazolni kell. A szintetikus  $A\beta_{1-42}$  peptidből készített oligomereket proteinchipen végrehajtott kötési vizsgálatban alkalmazva sikerült olyan fehérjecsaládokat azonosítanunk, melyek igazolták az  $A\beta$  oligomerek intracelluláris folyamatokban betöltött szerepét. A fehérjepochipen végrehajtott kísérlet eredményei szerint a leginkább reprezentált molekula-család a transzlációs masinériát alkotó fehérjéké volt. Ezt a megállapítást funkcionális tesztekkel is igazoltuk, megmutattuk az  $A\beta$  oligomerek koncentrációfüggő kötődését patkány-agyból izolált riboszóma-frakcióhoz, illetve egy transzlációs *in vitro* tesztben kimutattuk az oligomerek gátló hatását a luciferáz-enzim expressziójára is. Az eredmények magyarázatul szolgálhatnak az AK-ban tapasztalható mitokondriális diszfunkcióra és a vele összefüggő molekuláris stresszfolyamatok felerősödésére.

### IV. AM típusú vegyületek hatásmechanizmusának felderítése

A 2005-2015 közötti évtized AK-val kapcsolatos alaputatásának egyik fő irányát az  $A\beta$  aggregációját közvetlenül befolyásoló vegyületek vizsgálata jelentette. Az akkor uralkodó, ú.n. BSB („beta-sheet-breaker”) elmélet szerint az  $A\beta$  egyes részleteivel azonos peptidszekvenciákkal a monomerek önrendeződése befolyásolható, a fibrillumok szerkezete megtörhető, képződésük folyamata visszafordítható lehet. Ezt a vezérelvet követve doktori munkám során előállítottunk olyan peptidcsaládokat, melyek tagjai biológiai modellrendszerekben az  $A\beta$  aggregátumok neurotoxikus hatását változó hatékonysággal tudták kivédeni. A vegyületek hatásmechanizmusának elemzésére viszont már a doktori munka lezárultát követő időszakban került sor. Más csoportok kísérleteinek reprodukciója során vált egyre biztosabbá, hogy az  $A\beta$  aggregációjának gátlása nem feltétlenül jelenti annak a kezdeti monomer/kis méretű oligomer formában történő befagyasztását. Mikroszkópos elemzéssel a BSB-k alkalmazása mellett is megfigyelhettük nagyobb méretű aggregátumok képződését, illetve spektrofluorimetriával a  $\beta$ -redős réteghez rendelhető specifikus ThT-kötődést. A fizikai-kémiai vizsgálatok eredményei alapján javasoljuk a peptid-típusú BSB-k hatásmechanizmusának revízióját, mely szerint a biológiai kísérletekben tapasztalt védőhatás valószínűleg nem a fibrillumok szerkezetének felbomlásával magyarázható, hanem a BSB és az aggregátumok közötti kölcsönhatás eredményeként bekövetkező flokkulációval, ami a biológiai célponttal történő kölcsönhatásra alkalmas kontaktfelület csökkenését eredményezi. Mivel azonban a  $\beta$ -redős szerkezet teljes felbomlása, illetve keletkezésének teljes gátlása ilyen vegyületek alkalmazásával sem kerülhető el, a „BSB” nomenklatúra helyett célszerűbb az „aggregáció módosító” (AM) megnevezés használata.

Az  $A\beta$  oligomerek AM-típusú molekulákkal való kölcsönhatásakor a toxikus felszín csökkenése, az oligomer „becsomagolása” megakadályozza az oligomer célmolekulákhoz való kötődését. A KLVFFAE molekula szekvenciáján alapuló, foldamer-típusú vegyületeket centrális szimmetriájú PAMAM dendrimerekkel konjugálva olyan molekuláris eszközt szintetizáltunk, mely izo- $A\beta_{1-42}$  peptidből SOP-vel készített oligomerekkel kölcsönhatásba lépve azok toxikus hatását neutralizálta. Ez valószínűleg

kétféle hatás eredőjének tekinthető: a nagyobb méretű (HMW) oligomereket a tetraavalens foldamer-dendrimer konjugátum keresztkötések révén precipitálni képes, ezáltal a klasszikus AM vegyületek hatásmechanizmusához hasonlóan csökkenti az aggregátumok kontaktfelületét, míg több foldamer szekvencia optimális geometriai elhelyezkedése és kölcsönhatása révén becsomagolhatja az LMW oligomereket. A foldamer-dendrimer konjugátum enzimatis stabilitása kedvező, kémiai szintézise és tisztítása viszonylag nagy mennyiségben is könnyen megoldható feladat, szerkezete könnyen finomhangolható, így egy antitestes terápiához mérve olcsóbb, könnyebben kezelhető alternatívát nyújthat.

#### **V. Foldamer-dendrimer konjugátumon alapuló ELISA rendszer kidolgozása**

A konjugátum centrális geometriájának fokálisra változtatásával új hasznosítási lehetőséget nyertünk. A molekula megtartotta méretszelektív affinitását az A $\beta$  oligomerekhez, viszont az aszimmetrikus szerkezet lehetővé tette azt, hogy szilárd hordozón történő rögzítés esetén sem lépett fel térgátlás a kötődési folyamatban. A legjobb affinitást mutató konjugátum azonosítása érdekében külön kísérletsorozatokban meghatároztuk a multivalencia hatását a kötés erősségére, illetve a tetraavalens poli-lizin dendronhoz módosított szerkezetű foldamereket kapcsoltunk, megvizsgálva az oldalláncok térkitöltésének, töltésének és pozíciójának szerepét a kialakuló kölcsönhatásban. A legoptimálisabb kötődést kialakító konstruktot egy olyan ELISA rendszer kidolgozására használtuk fel, mely alkalmas A $\beta$  oligomerek mennyiségi meghatározására, akár összetett biológiai mintából is. Ebben a specifikus ELISA-tesztben a protokoll optimalizálásával elérhető detektálási határ (LOD, 3 $\sigma$ ) 5 pM-ra becsülhető, a lineáris tartomány pedig 10-500 pM közé esik ( $R^2=0,9974$ ). Oligomerek meghatározására jelenleg nincs a klinikumban alkalmazott rendszer, a konvencionális, A $\beta$ -alapú diagnosztikai módszerek szekvenciaspecifikusak, oligomerizálódó A $\beta$ -ra torzított eredményt adnak. Az AKH-n alapuló mechanizmus kutatás szempontjából mindenképpen fontos lépés lenne az A $\beta$  oligomerek meghatározásának beépítése a diagnosztikai protokollba, az általunk fejlesztett diagnosztikai eszköz kiegészítheti a jelenleg alkalmazott, oldható A $\beta$ -t kimutató ELISA teszt eredményeit.

#### **VI. Az Fe65-AICD kölcsönhatást befolyásoló P33 molekula hatásmechanizmusának felderítése**

Az AK multifaktoros természetéből adódóan számos új célpont kínálkozik fejlesztési lehetőségként. Kézenfekvő lehet megvizsgálni az APP, illetve a lebontásával keletkező, A $\beta$ -tól különböző fragmensek szerepét, és a termelődésük megváltoztatásával elérhető esetleges terápiás előnyöket. Saját kutatási eredményeinkkel sikerült olyan AK-ban releváns folyamatokat azonosítani, melyek kulcseleme az APP lebontásával keletkező AICD.

A fibrilláris A $\beta$ -val kölcsönható fehérjék azonosítását és szerkezetük hasonlóságának bioinformatikai módszerekkel történő elemzését követően 65 peptid- és peptidomimetikum-típusú, biológiailag aktív vegyületet szintetizáltunk és szabadalmaztattunk. A legígéretesebb molekula, a P33 célzott tesztelésével bizonyítottuk az Fe65-AICD kölcsönhatás modulálásán alapuló hatást. A P33 valószínűleg allosztérikus módon gátolja az AICD-aktivált Fe65 fehérjekomplex kialakulását, az Fe65 WW-doménjéhez kötődő specifikus kölcsönhatás révén. A kölcsönhatást *in vitro* kísérletekben bizonyítottuk, emellett igazoltuk a P33 kedvező hatását az amiloid-patológiára a FAK egyik alapmodelljeként alkalmazott APPxPS1-es egerekkel végzett kísérletben is. A transzgén egerekben az A $\beta$  túltermelésének következményeként kialakuló gyulladást is sikerült mérsékelni, így valószínűsíthető, hogy a molekuláris szinten aktiválódó stresszfolyamatok is csökkennek a kezelés hatására.

#### **VII. A neurogenesis folyamatának feltérképezése transzgén egértörzsben, a P33 kezelés hatása a neurogenesisre**

A P33 további vizsgálata felfedte, hogy a kezelés az egerekben zajló, a felnőttkori neurogenesishez kapcsolható biológiai folyamatokat is kedvező irányban befolyásolja. Az állatok folyamatos



követésével igazoltuk, hogy az APPxPS1-es állattörzsben az amiloid patológia fellépése, az oligomerek kimutathatósága, és a káros sejtszintű stresszfolyamatok aktiválódása megelőzi a neurogenesis folyamatainak zavarát, ami nyomon követhető mind a neuronális összejt-osztódás, mind az éretlen neuronokká differenciálódás mértékének változásában. Míg a plakk-képződés, a gyulladáshoz vezető folyamatok felerősödése 5-6 hónapos korban jelentkezik, addig a neurogenesis károsodása a 8-11 hónapos életkorra tehető ebben a modellben. A P33-kezelés megindítása az állatok fiatal korában (3 hónapos kortól) nagy mértékben javítja mind az AK-t modellező patológiai jellemzőket, mind a neurogenesiset. Habár az állatkísérletek eredményeinek humán transzlációja csak korlátozottan és nagy körültekintéssel lehetséges, úgy gondoljuk, hogy általános érvényű lehet az a megállapítás, amely szerint a korai fázisban, az AK tüneteinek megjelenése előtt elkezdett terápia lenne a leghatékonyabb kezelési mód.

### **VIII. Két S1 modulátor neurogenesisre kifejtett hatásának vizsgálata *in vivo* A $\beta$ -injektációs modellben**

Széles körben elfogadott, hogy a neuroinflammáció és a molekuláris stressz mérséklése az AK, és általában a fehérjekonformációs betegségek esetében célravezető terápia lehet. Erre alkalmasak lehetnek S1R modulátorok, melyekkel kapcsolatban már folynak klinikai vizsgálatok.

A molekulák teszteléséhez kidolgoztunk egy új kísérleti modellt, mely a transzgén állatokkal szemben gyorsabban és költséghatékonyabban használható. C75BL/6 egerekbe juttattunk be A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomereket egyszeri, ICV injektálással, majd az állatokban igazoltuk a neurogenesis alapfolyamatainak akut károsodását, illetve az A $\beta$ -patológiát jellemző neuroinflammáció megjelenését. Természetesen ez a modell sem tekinthető teljes értékűnek, molekuláris szinten az A $\beta$  által kiváltott gyulladáshoz vezető reakció és a neurogenesis néhány alapfolyamatának megváltozása vizsgálható az alkalmazásával, de valószínű, hogy a transzgén állatokban az A $\beta$  túltermelődése következtében kialakuló további patológiai jegyek, mint a magatartás és a tanulási képességek megváltozása, megjelenhet ebben a modellben is. Az egyszerűen kivitelezhető *in vivo* kísérletek során a gyulladás és neurogenesis egymásra hatását két S1R agonista, az endogén DMT és a szintetikus PRE-084 jelenlétében vizsgáltuk. Kísérleteink bizonyították, hogy bár mindkét molekula hatást fejthet ki a két folyamatra, mégis az agonista jelleghez nem rendelhető olyan általánosan érvényes mechanizmus, amely alapján a molekula karakteréből levonhatnánk annak uniformizáltan kedvező hatására vonatkozó következtetést. Az A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomerek által kiváltott proliferáció-gátló hatáshoz hasonlóan a DMT esetében is a proliferálódo sejtek számának csökkenését észleltük. A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptiddel történő együttes alkalmazáskor a PRE-084 a gátlás mértékét ellensúlyozni tudta, míg a DMT tovább növelte azt. Az A $\beta$ <sub>1-42</sub> által kiváltott asztrocita-aktivációt mindkét anyag csökkentette, míg az aktivált mikrogliát mennyiségét nem befolyásolta egyik anyag sem. Az észlelt eltérések oka a DMT más receptoron (5HT<sub>2A</sub>) is érvényesülő hatása, és rövid biológiai féléletideje lehet.

### **IX. S1R modulátorok azonosítására alkalmas *in silico* módszer kifejlesztése és validálása**

A molekuláris stressz csökkentésére alkalmasak lehetnek olyan új típusú S1R modulátorok, melyek megnövelt szelektivitással rendelkeznek, egyéb receptorokkal szemben kevésbé promiszkuusak. Ilyen vegyületek azonosításához kidolgoztunk egy olyan *in silico* eljárást, mely egy ismert agonistára és egy antagonistára jellemző receptor szerkezethez történő dokkolás révén válogatott molekulaszettek virtuális szűrésére alkalmazható. Az eljárással az ígéretek molekulák esetében azok kötődésének jellegéről (agonista/antagonista típusú kötődési konformáció) is nyerhetünk információt. A módszerrel egy közel 4000 tagú molekulakönyvtárból azonosítottunk 40 potenciális S1R-hez kötődést mutató vegyületet, melyeknek affinitását radioligand-kötődési tesztben is meghatároztuk. A legjobb három ligandum mindkét enantiomerjét megvizsgáltuk S1R/S2R szelektivitásuk szempontjából is. Ezek a molekulák ígéretek jelöltek lehetnek az AK-ban történő terápiás felhasználásra.

## Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

#	Forrás	IF	Hiv
1	Bartus, É., Olajos, G., Schuster, I., Bozsó, Z., Deli, M. A., Veszeka, S., Walter, F. R., Datki, Z., Szakonyi, Z., Martinek, T. A., & Fülöp, L. (2018). Structural Optimization of Foldamer-Dendrimer Conjugates as Multivalent Agents against the Toxic Effects of Amyloid Beta Oligomers. <i>Molecules</i> , 23(10), 2523-2537.	3,060	6
2	Bogár, F., Simon, D., Bozsó, Z., Janáky, T., Veszeka, S., Tóth, A. E., Deli, M. A., Borics, A., Násztor, Z., Gyebrovski, A., Penke, B., & Fülöp, L. (2015). Opposite effect of Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> ions on the aggregation of native and precursor-derived A $\beta$ 42. <i>Struct Chem</i> , 26(5), 1389-1403.	1,854	2
3	Borbély, E., Horváth, J., Furdan, S., Bozsó, Z., Penke, B., & Fülöp, L. (2014). Simultaneous changes of spatial memory and spine density after intrahippocampal administration of fibrillar A $\beta$ <sub>1-42</sub> to the rat brain. <i>BioMed Res Int</i> , 2014, 345305-345314.	1,579	16
4	Borbély, E., Varga, V., Szögi, T., Schuster, I., Bozsó, Z., Penke, B., & Fülöp, L. (2022). Impact of two neuronal sigma-1 receptor modulators, PRE084 and DMT, on neurogenesis and neuroinflammation in an Abeta <sub>1-42</sub> -injected, wild-type mouse model of AD. <i>Int J Mol Sci</i> , 23(5), 2514-2534.	5,600	9
5	Bozsó, Z., Penke, B., Simon, D., Laczkó, I., Juhász, G., Szegedi, V., Kasza, Á., Soós, K., Hetényi, A., Wéber, E., Tóháti, H., Csete, M., Zarándi, M., & Fülöp, L. (2010). Controlled in situ preparation of A $\beta$ (1-42) oligomers from the isopeptide "iso-A $\beta$ (1-42)", physicochemical and biological characterization. <i>Peptides</i> , 31(2), 248-256.	2,654	20
6	Dvoráckó, S., Lázár, L., Fülöp, F., Palkó, M., Zalán, Z., Penke, B., Fülöp, L., Tömböly, C., & Bogár, F. (2021). Novel High Affinity Sigma-1 Receptor Ligands from Minimal Ensemble Docking-Based Virtual Screening. <i>Int J Mol Sci</i> , 22(15), 8112-8127.	6,208	4
7	Fülöp, L., Penke, B. & Zarándi, M. (2009). Break up or Wrap? Therapeutic Possibilities for the Treatment of Alzheimer'S Disease by Altering the Aggregation of Beta-Amyloid Peptide. In <i>Neuropeptides and Peptide Analogs</i> , M. Kovács and I. Merchenthaler (Editors). Research Signpost, 161-188.	0	0
8	Fülöp, L., Mándity, I. M., Juhász, G., Szegedi, V., Hetényi, A., Wéber, E., Bozsó, Z., Simon, D., Benkő, M., Király, Z., & Martinek, T. A. (2012). A foldamer-dendrimer conjugate neutralizes synaptotoxic $\beta$ -amyloid oligomers. <i>PLOS ONE</i> , 7(7), e39485.	3,730	25
9	Fülöp, L., Penke, B., Zarándi, M., Bozsó, Z., Berkecz, R., Janáky, T., Martinek, T. A., Datki, Z., Szegedi, V., Soós, K., Penke, Z., & Borbély, E. (2014). <i>Peptides and Peptidomimetics for the Therapy of Neurodegenerative Diseases and Use Thereof</i> (Patent) <a href="https://www.sztnh.gov.hu/sites/default/files/kiadv/szkv/201510b-pdf/SZKV_20_1510.pdf">https://www.sztnh.gov.hu/sites/default/files/kiadv/szkv/201510b-pdf/SZKV_20_1510.pdf</a>	0	0

10	Fülöp, L., Penke, B., Zarándi, M., Bozsó, Z., Virok, D. P., Janáky, T., Verdier, Y., Datki, Z., Szegedi, V., Busa-Fekete, R., Soós, K., Kasza, Á., Kocsor, A., & Borbély, E. (2014). <i>Small Peptide Inhibitors of Beta-amyloid Toxicity</i> (Patent) <a href="https://www.sztnh.gov.hu/sites/default/files/kiadv/szky/201706b-pdf/B_02_Szab_kozzetetel_12_1706.pdf">https://www.sztnh.gov.hu/sites/default/files/kiadv/szky/201706b-pdf/B_02_Szab_kozzetetel_12_1706.pdf</a>	0	0
11	Hetényi, A., Fülöp, L., Martinek, T. A., Wéber, E., Soós, K., & Penke, B. (2008). Ligand-induced flocculation of neurotoxic fibrillar Abeta(1-42) by noncovalent crosslinking. <i>Chembiochem</i> , 9(5), 748-757.	3,322	3
12	Kasza, Á., Penke, B., Frank, Z., Bozsó, Z., Szegedi, V., Hunya, Á., Németh, K., Kozma, G., & Fülöp, L. (2017). Studies for Improving a Rat Model of Alzheimer's Disease: Icv Administration of Well-Characterized $\beta$ -Amyloid 1-42 Oligomers Induce Dysfunction in Spatial Memory. <i>Molecules</i> , 22(11), 2007-2035.	3,098	54
13	Minkeviciene, R., Rheims, S., Dobszay, M. B., Zilberter, M., Hartikainen, J., Fülöp, L., Penke, B., Zilberter, Y., Harkany, T., Pitkänen, A., & Tanila, H. (2009). Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. <i>J Neurosci</i> , 29(11), 3453-3462.	7,178	483
14	Olajos, G., Bartus, É., Schuster, I., Lautner, G., Gyurcsányi, R. E., Szögi, T., Fülöp, L., & Martinek, T. A. (2017). Multivalent foldamer-based affinity assay for selective recognition of A $\beta$ oligomers. <i>Anal Chim Acta</i> , 960, 131-137.	5,123	4
15	Penke, B., Bogár, F., & Fülöp, L. (2017). Beta-Amyloid and the Pathomechanisms of Alzheimer's Disease: A Comprehensive View. <i>Molecules</i> , 22(10), 1692-1724.	3,098	78
16	Penke, B., Bogár, F., Paragi, G., Gera, J., & Fülöp, L. (2019). Key Peptides and Proteins in Alzheimer's Disease. <i>Curr Prot Pept Sci</i> , 20(6), 577-599.	2,520	31
17	Penke, B., Fülöp, L., Szűcs, M., & Frecska, E. (2018). The Role of Sigma-1 Receptor, an Intracellular Chaperone in Neurodegenerative Diseases. <i>Curr Neuropharmacol</i> , 16(1), 97-116.	4,568	88
18	Szögi, T., Borbély, E., Schuster, I., Bozsó, Z., Sántha, M., Tóth, M. E., Penke, B., & Fülöp, L. (2022). Examination of Longitudinal Alterations in Alzheimer's Disease-Related Neurogenesis in an APP/PS1 Transgenic Mouse Model, and the Effects of P33, a Putative Neuroprotective Agent Thereon. <i>Int J Mol Sci</i> , 23(18), 10364-10381.	5,600	2
19	Szögi, T., Schuster, I., Borbély, E., Gyebrovski, A., Bozsó, Z., Gera, J., Rajkó, R., Sántha, M., Penke, B., & Fülöp, L. (2019). Effects of the Pentapeptide P33 on Memory and Synaptic Plasticity in APP/PS1 Transgenic Mice: A Novel Mechanism Presenting the Protein Fe65 as a Target. <i>Int J Mol Sci</i> , 20(12), 3050-3070.	4,556	8
20	Virók, D. P., Simon, D., Bozsó, Z., Rajkó, R., Datki, Z., Bálint, É., Szegedi, V., Janáky, T., Penke, B., & Fülöp, L. (2011). Protein array based interactome analysis of amyloid- $\beta$ indicates an inhibition of protein translation. <i>J Proteome Res</i> , 10(4), 1538-1547.	5,113	26

## Tudományometriai adatok (2024.04.22.)

	Tudományos közlemények	A tud. fokozat megszerzése óta	Összesen
1.0.	Összes közleményeinek száma	72	79
1.1.	Közlemények nemzetközi folyóiratban	66	73
	ebből első vagy levelező szerzőként	11	13
	egy-szerzős közlemény	0	0
1.2.	Közlemények magyar nyelvű folyóiratban	2	2
	ebből első vagy levelező szerzőként	1	1
	egy-szerzős közlemény	0	0
1.3.	Kongresszusi kiadványban (proceedings: teljes munka, nem rövid kivonat)	0	0
1.4.	Összefoglaló közlemények	1	1
	nemzetközi folyóiratban megjelent	0	0
	magyar nyelvű folyóiratban megjelent	0	0
	önálló könyv	0	0
	könyvfejezet	1	1
	szerkesztett könyv	0	0
	tankönyv	0	0
	tankönyvi fejezet	0	0

### A publikációk hatása

Speciális adatok	Adat	Az összes %-ában
Az utolsó tudományos fokozat (PhD 2005) utáni közlemények száma, (összesített impakt faktora) és ez utóbbi részaránya a teljes impaktfaktorösszeg százalékában	66 (281,198)	92,15%
Magyar nyelven megjelent közlemények száma és részaránya az összes közlemény százalékában	2	2,53%
A legmagasabb impaktfaktoral rendelkező 5 közleményének IF-a	50,687	---
Az öt legmagasabb független idézettségű közlemény idézettségi számai <sup>3</sup>	869	---
Hirsch index az összéidézettségre számolva <sup>3</sup>	30	---

### Összes közlemény minősítése

Publikáció	$i, H$
Összes dolgozatának idézettsége, önhivatkozás nélkül ( $i$ )	2270
Szabadalmainak idézettsége, önhivatkozás nélkül ( $i$ )	0
Könyvfejezeteinek idézettsége, önhivatkozás nélkül ( $i$ )	0
<b>Közleményeinek összesített impaktfaktora (<math>H</math>)</b>	<b>304,923</b>