

Köszönöm bírálónak a részletes, alapos bírálati munkát, és a kérdéseket, amikre az ő szavaival élve „precíznek és kielégítőnek” szánt válaszok elkészítése közben is tudtam még a témával kapcsolatban új információkra lelteni. Először a megjegyzéseire reagálnék.

A szerin hidroxilcsoportja konvencionális jelölésének tévesztésével és a „vad egrek” elírással kapcsolatban azt tudom mondani, hogy az évek múlásával egyre inkább „bőrömmön érzem” az öregedő agy hibás működésének következményeit, ami például olyan jellegű félrekapcsolásokban nyilvánulhat meg, mint az amúgy tananyagként oktatott jelölés tévesztése, vagy helytelen szóhasználat. A javításukra tett igyekezet 100 %-os volt részemről, az eredményessége viszont már sajnos nem. A szignifikancia-szintek jelölésének hiányára azt tudom válaszolni, hogy egységes volt a közölt eredményekben, értékét a „4.8 Mérések kiértékelése, statisztikai módszerek” című fejezetében adtam meg, ami $p < 0,05$ volt. Valószínűleg célszerűbb lett volna minden érintett ábra mellett megadni a szignifikancia-szintet.

A bíráló által feltett kérdéseket a következők szerint válaszolom meg.

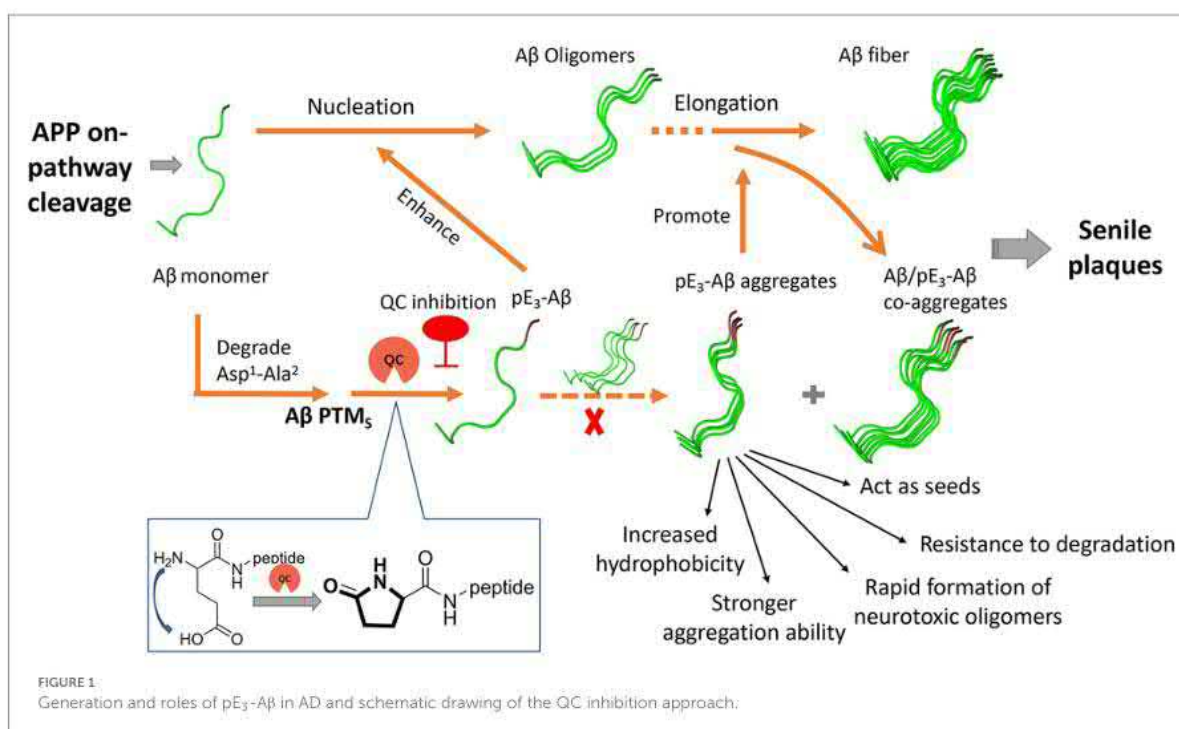
1. Az APP szekretázok általi lebomlása és a keletkező fragmensek keletkezése igen jól dokumentált. Viszont nagyon érdekesnek találtam, az általam eddig nem ismert az A β 3-42 fragmens keletkezését, amely Glu-t tartalmaz az N-terminálison, ami piroglutaminsavvá alakul, és ez a fragmens megnövekedett aggregációs hajlammal rendelkezik. Tudomásom szerint az N-terminális szabad Glu ciklizációs képessége a Gln-nal és védett (pl. Bzl-védett) Glu-nal ellentétben viszonylag csekély. Mit lehet tudni ennek az átalakulásnak a kinetikájáról? Mi hasítja le az N-terminális dipeptidet az A β 1-42-ről, és vannak-e olyan terápiás kutatások, amelyek ezt a hasadást és/vagy a piroglutamisav képződését gátolják?

Válasz:

Az A β 1-42 peptid enzimatis hasításával keletkezik az A β 3-42 csonkolt szekvencia, melyet már 1992-ben sikerült izolálnia Mori és csoportjának emberi agyból 2D-gélelektroforézissel, majd tömegét azonosítani az akkoriban alkalmazott tömegspektrometriás eljárások segítségével [1]. Már ők leírták, hogy az enzimatis emésztéssel kapott 3-16-os fragmens N-terminálisán a glutamát helyett valószínűleg piroglutamát áll, ők azonban nem zárták még ki annak a lehetőségét, hogy ez a módosítás a feldolgozás következménye. 1995-ben Saido csoportja specifikus antitest alkalmazásával immunhisztokémiai módszerekkel is igazolta az amiloid plakokban a piroglutamát-végű csonkolt A β jelenlétét [2]. Shirotani 2002-ben publikálta azon *in vitro* kísérleteit, melyek során primer kortikális neuronokban termeltetett olyan mutáns, csonkolt A β szekvenciákat, amikben a 3-as pozícióban glutaminsav illetve glutamin állt. Az ő modellrendszerükben csak a spontán és enzimatis ciklizációra egyaránt hajlamos A β (³Q-42)-nél tudták igazolni a ciklizált termék képződését, a A β (³E-42) formánál nem [3]. 2008-ban egy osztrák kutatócsoport, mellyel mi is együttműködtünk, igazolta 2 féle transzgén egérmodellen, hogy az A β (³pE-42) forma a glutaminil-cikláz enzim hatására

keletkezik, inhibitor alkalmazásával a képződése visszaszorítható [4], illetve arra is bizonyítékot találtak, hogy humán AK-ban az enzim szintje megemelkedett. Az aggregáció kinetikáját tekintve feltételezték, hogy a piroglutamát forma az A β 1-42 peptiddel közösen olyan LMW oligomert képez, amelynek toxicitása meghaladja a nem csonkolt szekvenciákból álló oligomereket [5], illetve hogy kialakulásukat a tau protein katalizálja.

Az A β (³pE-42) hatását az A β 42 konvencionális aggregációjára, illetve a glutaminil-cikláz gátlásának hatását az alábbi ábra foglalja össze [6].



A humán glutaminil-cikláz inhibitorok (QCI) tervezése és AK-ban való alkalmazhatóságuk vizsgálata az elmúlt évtizedben legalább olyan kedvelt alternatív kutatási irányvá vált, mint a gyulladáscsökkentők, vagy aggregációs inhibitorok témája. Klinikai vizsgálatig azonban csak néhány vegyület jutott el, a már említett kutatócsoport által fejlesztett PQ912 (Varoglutamstat) vegyülettel pedig klinikai vizsgálatok is indultak. Sajnos 2024 áprilisában a tulajdonos cég bejelentette, hogy az eredmények negatívak, a vegyület fázis2 vizsgálaton nagy létszámú csoporton nem bizonyult hatékonynak. A hGC inhibitorok fejlesztésével párhuzamosan az Eli Lilly kifejlesztett két specifikus antitestet az A β (³pE-42) ellen, a Donanemabot és a Remternetugot. A Donanemab a dolgozat írása óta letelt időben megkapta az alkalmazási engedélyt az Egyesült Államokban az FDA-tól, 2024. júliusa óta Kisunla néven kereskedelmi forgalomban kapható. A dózisa 700 mg/hó egyszeri infúziós bejuttatással, majd 1400 mg/hó, ameddig szükséges. A Remternetuggal jelenleg is folyamatban vannak F3 vizsgálatok, és tervezik a Varoglutamsttal való kombinációs terápiára irányuló klinikai vizsgálatokat is.

2. Kérdések az izoA β 1-42-vel kapcsolatban:

a) A szintézis során (Boc-technika), a Ser észter beépítése után, hogy végezték a semlegesítési lépéseket (ez az Értekezésből nem derül ki)? Kellett-e *in situ* semlegesítést végezni vagy a külön lépéses semlegesítés során sem láttak O-N acilvándorlást?

Válasz:

a) Az izopeptid szintézise esetén a savas körülmények között is nagy stabilitású 2-Cl-Z védőcsoportot alkalmaztuk a Ser α -aminocsoportján. Feltételezésünk szerint ez a védőcsoport nem hasad le a neutralizációs lépésben, így megakadályozza az O-N acilvándorlást szintézis közben. A semlegesítést konvencionálisan és *in situ* is több esetben alkalmaztuk, nem tapasztaltunk lényegi különbséget a melléktermékeket, illetve a szintézis eredményességét illetően a két módszer között.

b) Mennyire válik el a HPLC-ben az A β 1-42 és az izo-származéka? Nyilván a két termék MS-ben nem különböztethető meg, tehát egy O-N acilvándorlást ezzel nem mutatható ki. A csúcs kicsit vállasnak tűnik 10.A ábrán. Az *in vitro* vizsgálatokban milyen gyorsan történik meg az acilvándorlás, és ez hogyan viszonyul az aggregáció sebességéhez?

Válasz:

b) Valóban, a kromatogramból nem lehet arra következtetni, hogy van-e jelen az O-N acilvándorlason átesett peptid a nyers termékben. A csúcs válla az átvándorolt mellékterméket, vagy akár kis mértékű aggregáció esetén oligomerképződést is jelezhet. Szerencsére az átvándorolt termék nem egy „nem kívánt” melléktermék, az aggregáció kinetikáját befolyásolhatja, de tekintetbe véve az A β 1-42 peptid szintézisekor fellépő problémákat, ezt a lehetőséget, hogy a peptid egy része a konvencionális szekvenciába alakul át, nem gondolom problémásnak.

c) Ezt az acilvándorlást és az ezt követő aggregációs folyamatot Ca és Mg ionok segítik, ha jól értem. Ez hogy változtatja meg az átalakulás kinetikáját *in vivo* körülmények között? Bár ha jól következtetek, akkor talán ez az oka annak, hogy inkább az *in vitro* (pl. kötődési) vizsgálatokban alkalmazható ez a származék? Mennyire relevánsak az ezzel az anyaggal kapott eredmények a természetes folyamatokra, ha másféle aggregációs folyamat játszódik le az izoA β 1-42 és az A β 1-42 alkalmazásakor? **A 62. oldalon ezzel kapcsolatban azt írja a Jelölt, hogy „Ez azonban nem okoz olyan kiküszöbölhetetlen problémát, ami az izo-A β alkalmazását ellehetetlenítené. Körültekintő kísérlettervezéssel a peptid előnyösen alkalmazható megfelelő toxicitású A β aggregátumok nagy mennyiségben és reprodukálható módon történő előállítására. Ezt esetleg kifejtene jobban, hogy ez alatt mit kell érteni?**

Válasz:

c) Az O-N acilvándorlás sebessége pH-függő, és mivel maga az aggregáció is az, így a bíráló következtetései, miszerint a két folyamat együttesen játszódik le, helyénvaló. Így annak a lehetősége is fennáll, hogy az acilvándorlással keletkező peptid konformációja

nem azt az aggregációs utat járja be, ami a biológiailag releváns, toxikus konformációkat eredményezné. Eredményeink szerint az alkáliföldfém-ionok nem a kívánt irányba vitték el az izopeptidből keletkező A β aggregációját, amit a peptidoldat toxikus hatásának csökkenéseként észleltünk. Mivel azonban ez a peptid csak *in vitro* kísérletekben, vagy *in vivo* bejuttatásos vizsgálatokban alkalmazható, szerencsére könnyen megoldható a mintaelőkészítési protokoll átalakítása. Ez jelenti a peptid előkezelését kaotróp oldószerrel az esetleges aggregátumok feloldására, egy vizes előkezelést, mely során a viszonylag magas koncentráció a peptid-törzsoldatban a vándorlást és aggregációt kevésbé támogató, enyhén savas pH-n valósul meg, majd az ezt követő, hígítással együtt végzett átpufferelést a fiziológiás pH-ra, mely elegendő időt ad az O-N acilvándorlásra a lassú aggregáció mellett. A bíráló jól érti, az izopeptid úgy alkalmazható biológiai vizsgálatokban (*in vitro*, vagy kezelést követő *in vivo* kísérletekben is), ha biztosítjuk a helyes konformáció kialakulását alkáliföldfém-ionok jelenléte NÉLKÜL. Emiatt dolgoztunk ki olyan protokollokat, amikben javasoltuk az izopeptid alkáliföldfém-mentes pH=7.4-es pufferben történő előaggregáltatását, majd a peptidoldat felhasználás előtt közvetlenül történő kiegészítését a fiziológiás körülményeket biztosító Ca²⁺ és Mg²⁺ ionokkal. Azt gondolom, hogy az izopeptid alkalmazása ezen protokollbeli módosítások nélkül a természetes folyamatokkal nehezebben összeegyeztethető eredményekhez vezet.

3. Az Fmoc-kémiával szintetizált peptid-amidokat Rink-Amid gyantán készítette. Egyes vélemények szerint ilyenkor C-terminális N-alkilezett peptid amidok képződhetnek. Nem tapasztaltak ilyeneket? Bár a Rink-Amid MBHA gyantáról nehezebb lehasítani a peptideket, ami gond lehet az A β -peptidek esetén, de kevesebb mellékterméket eredményez. Van-e összehasonlításuk és tapasztalatuk a két gyanta típus alkalmazása esetén A β -peptidek esetén?

Válasz:

Rink-amid gyantán egyrészt nagy számú aggregáció módosító (AM) peptidet és peptidomimetikumot, valamint az A β 1-40 és A β 25-35 fragmenseket állítottam elő. A rövid szekvenciák szintézise legtöbbször problémamentesen zajlott, jelentős melléktermék-képződést nem tapasztaltam, ha volt is, nem derítettem fel a szerkezetét. Az amiloid fragmensek szintézise, különösen a 40-es fragmensé, számos helyen problémás, így nyilván különféle melléktermékek képződésével kellett számolnom. Ezek analízise és azonosítása sem volt minden esetben teljes, de legtöbbször aminosav-deléciók felléptét, védőcsoportok elégtelen eltávolítását detektáltam. Az N-alkilezett amidok képződését külön nem tapasztaltam, de nem zárom ki a lehetőségét, hogy volt ilyen melléktermék is az elegyben. A Rink-Amid-MBHA gyantáról van tudomásom, magam azonban még peptidszintézishez nem használtam ezt a gyantatípust.

4. Az egyik mintaelőkészítő protokollnál azt írja, hogy az A β 25-35 peptidet 5 percig ultrahangos kezelésnek veti alá. Nem tapasztalt aggregációt? Igaz, hogy az A β 1-42 esetében, de a mi tapasztalatunk az volt, hogy az ultrahangozás nem hogy segített volna a feloldásban, hanem kimondottan segítette az aggregálódást.

Válasz:

A bíráló kísérleti tapasztalatait csak megerősíteni tudom: az A β 1-42 peptid aggregációját az ultrahangozás, különösen 10 μ M koncentráció felett elősegíti. Ugyanez nem teljesül a rövidebb, aggregációra kevésbé hajlamos A β 25-35 fragmensre, ami ennél az értéknél magasabb koncentrációban is tolerálta az ultrahangos előkezelést.

5. Az LPFFD-amid szintézise és alkalmazása során nem merült fel a szukcinimid gyűrűn keresztüli LPFFN képződés lehetősége? Általában kerülni szokták az Asp-amid C-terminálisú peptidek szintézisét.

Válasz:

Igen, a szakirodalomban részletesen tárgyalt a C-terminálison Asp-t tartalmú, karboxamid végű peptideket érintő mellékreakció, a szukcinimid-képződés, illetve a szukcinimid felnyílásával képződő izomerizáció, racemizáció, vagy az aszparagin képződésének lehetősége. Az LPFFD Claudio Soto munkatársai által közölt, általuk legjobbnak tartott aggregáció-gátló molekula volt, melyet csoportunk LPYFD-re módosított. A szekvenciára alapozva, további aggregáció módosító (AM) vegyületek azonosítása érdekében számos származékot előállítottunk, a karboxamid végű pentapeptideken kívül C-terminálison karboxilátot tartalmazó vegyületeket, rövidített, inverz és D-inverz szekvenciákat is. Toxikus A β -oligomerekkel végzet *in vitro* életképességi tesztben neuroblasztóma sejtvonalon vizsgáltuk az anyagok AM, és feltételezeten ebből következő védőhatását. Méréseink szerint a D aminosavnak nincs szerepe a védőhatás kialakításában, valószínűsíthetően az LPYF szekvenciarészlet elégséges már az AM tulajdonsághoz, a D és inverz, valamint D-inverz, aszpartátot, láncvégi karboxilátot nem tartalmazó szekvenciák is hatékonyak bizonyultak. A szintézisek során igyekeztünk a peptideket a melléktermékektől elválasztani, de természetesen nem lehet kizárni, hogy akár a felhasználás során bekövetkezhet mellékreakció. Mivel azonban úgy tűnik, hogy a biológiai hatás független a peptid ezen szerkezeti elemeitől, így azt gondolom, hogy ha képződtek is melléktermékek a biológiai reakciók során, azok nem módosították mérési eredményeinket érdemben.

6.

a) A foldamer-dendrimerek hatásának vizsgálatakor felmerül a kérdés, hogy a β -rétegek kimutatására használt ThT vagy ellenanyagok kötődése nem gátolt-e a dendrimerek kötődése által, és nem ez okozhatja-e a kisebb aggregálódás detektálását?

Válasz:

a) A kérdés abszolút jogos, munkák egy része éppen a ThT-mérések bizonytalanságát támasztotta alá a béta-réteges szerkezet mennyiségének meghatározását illetően. Ezért a ThT-mérést minden esetben kiegészítő mérésként használtuk, egyéb, kötődés jellemzésére alkalmas metodikák mellett (NMR, ITC).

b) Tudunk valamit az egyes komponensek kötődési helyéről? Esetleg van mód a dendrimer- kötött szerkezetek röntgen diffrakciós vizsgálatára?

Válasz:

b) Az oligomereken található kötőhelyek feltérképezését illetően nagyon gyerekcipőben járnak még a kutatások, köszönhetően a szerkezeti sokféleségüknek és a flexibilitásuknak. Míg A β fibrillumok szerkezetének meghatározását már többféle technikával is elvégezték (NMR, röntgendiffrakció, cryo-EM), addig az oligomerek szerkezetének pontos ismerete, kis molekulák kötőhelyeinek pontos feltérképezése még mindig egy megoldatlan probléma. 2022-ben publikálta Gupta és csoportja azt a technikát, amivel LMW oligomerek szerkezetéről lehetséges információt nyerni [7]. Ez az „X-ray footprinting with Mass spectrometry” nevet viseli, és a szerzők szerint az oligomerek gyors változékonysága mellett is lehetővé teszi a ThT kötőhelyének meghatározását az oligomeren. Konkrét mérést és belőle nyert eredményeket viszont azóta sem publikált a csoport. Így akár a ThT, akár bármely AM vegyületünk, vagy a foldamerek pontos kötőhelyéről sajnos jelenleg nem lehet információt szerezni.

c) Van valamilyen tapasztalat az ilyen típusú aggregációt módosító vegyületek sejtbejutási, illetve vér-agy gáton történő átjutási képességéről? Ha nem, akkor mit tudna a Jelölt elképzelni ezen molekulák olyan módosítására, amelyek ezt elősegíthetik? Azért is kérdezem ezt, mert a Jelölt az összefoglalóban azt írja, hogy „A kismolekulás AM-ek átjutása a vér-agy gáton könnyebben megvalósulhat, mint az antitesteké,..... a kismolekulás AM-ek esetében ezért törekedni kell a célhelyre történő hatékonyabb eljutás elősegítésére.”

Válasz:

c) Ami a vér-agy-gáton történő átjutás és a sejtbe bejutás kérdését illeti, ebben a témában az elmúlt években többféle irányban is végeztünk vizsgálatokat. Szabadalmaztatott vegyületeink esetében Prof. Dr. Deli Mária kutatócsoportjával együttműködve vizsgáltuk *in vitro* kísérletekben egér primer endothél kultúra és humán endothél sejt vonal alkalmazásával is a leghatékonyabb vegyületek átjutási képességét. Megvizsgáltuk a molekulák enzimatisz stabilitását, és a kísérletek eredményeiből azt is feltételeztük,

hogy egy intraperitoneális beadást követően át kellett jusson az anyag a vér-agy gáton az élő állatban is, hiszen mértünk konkrét biológiai hatást. Emellett egyik, 2022-ben zárult GINOP pályázatunk (GINOP 2.3.2-15-2016-00036, Új gyógyszer hatóanyagok és célba juttatásuk új hordozórendszerekkel) témája volt olyan sejtpenetráló peptideken alapuló bejuttató rendszer tervezése és vizsgálata, mellyel a potenciális gyógyszerjelöltek hatása növelhető lehet. Ez utóbbi fejlesztés főleg a P53 vegyület és társvegyületeinek vizsgálatához kapcsolódott, és az Alzheimer-kórral kapcsolatos gyógyszerfejlesztés eredménytelensége miatt gondoltunk arra, hogy a hatásosság azért marad el a várt mértéktől, mert az intracelluláris oligomereket megcélzó molekuláknak át kell jutni a sejtmembránon. A kationos sejtpenetráló peptidek mellett természetesen egyéb bejuttatási formák, pl. lipid nanopartikulumok is szóba jöhetnek alkalmas bejuttató rendszerként. A dendrimer-foldamer konjugátumok esetében ilyen irányú fejlesztésen nem gondolkoztunk. Bár az eredmények alapján a konjugátumok alkalmasak LMW oligomerek neutralizálására, a téma fejlesztése inkább a diagnosztikai eszköz irányában történt, elsősorban liquorban és egyéb biológiai eredetű folyadékmintákban történő meghatározást terveztünk, így a bejutás problémájával itt nem szembesültünk.

7. A 31. ábrán összehasonlító vizsgálatot mutat be Dr. Fülöp Livia a multivalencia (különböző foldamer-dendrimer szerkezetek) és a biológiai hatásosság összefüggésére. A különböző anyagok viselkedése, hatás mechanizmusa (értve ez alatt a toxikus oligomer mennyiségének eltolása a kisebb oligomerek illetve a nagyobb aggregátumok irányába) mennyire egységes, és ha nem, akkor mennyire összehasonlíthatók ezek az adatok? Vagy ez annyira nem is releváns, mert csak a kialakult hatás (viabilitás érték) a fontos?

Válasz:

A 31. ábrán két viabilitás-mérés összehasonlítása látható. A mérések közös eleme az alkalmazott A β kezelőoldat összetétele, ezek a standardizált oligomerkészítési protokoll szerint izopeptidből előállított oligomerek voltak. Előzetes eredményeink alapján feltételeztük, hogy a foldamer-dendrimer konjugátumok úgy fejtik ki védőhatásukat a toxikus A β oligomerek ellen, hogy a kisebb méretű, LMW oligomereket „becsomagolják”, a HMW frakciót pedig precipitálják. Feltételezésünk szerint a különböző méretű, geometriájú és multivalenciájú (azaz eltérő mennyiségű felismerő foldamer-szekvenciát tartalmazó) konjugátumok hatására nem tolódik el az LMW és HMW frakció, valamint egyéb aggregációs formák (pl. protofibrillumok) mennyiségi aránya, hanem a neutralizációjuk határfoka fog megváltozni a konjugátum szerkezete függvényében. Így azt gondolom, a konjugátumok közötti különbségek egységes hatásmechanizmus érvényesülése mellett értelmezhetők. A két viabilitási tesztben az eltérő felépítésű konjugátumok nem azonosan bizonyultak hatásosnak vagy kevésbé hatásosnak, ennek azonban oka lehet a kísérleti rendszerek eltérősége. A túlélő agyszeleten teljes szöveti környezetben teszteltünk rövid távú hatást, mert a megfelelő reaktivitás és állapot biztosítása 4 óra időtartamig lehetséges. A rövid idő és a szövetbe történő diffúzió

korlátoltsága miatt feltételezhetően az LMW oligomerek által kiváltott toxikus hatással szemben vizsgálhatóak az anyagok. A sejtenyészetben egyrészt nagyobb felületen, közvetlenül érintkezhetnek a sejtek az oligomerekkel, másrészt az időablak is hosszabb (24-48 óra múlva detektáltunk), így ott az LMW oligomerek mellett a HMW-oligomerekre gyakorolt hatás is hozzájárul a biológiai végeredményhez. A két mérést nem feleltetném meg egymásnak, az eltérő körülmények miatt az eredmények inkább kiegészítik egymást.

8. A 91.oldalon Dr. Fülöp Livia azt írja, hogy „Az A β oligomerek detektálására kifejlesztett ELISA eredményei is csak akkor megbízhatóak, ha az oligomerek és a foldamer között fellépő kölcsönhatás specifikus, az adott biológiai mátrixban jelen levő egyéb fehérjék a meghatározást nem zavarják.” Majd vizsgálva az A β oligomerek és a szérum fehérjék kölcsönhatását arra a következtetésre jut, hogy nagy mennyiségben jelen levő szérumfehérjék és detergens sem zavarja az oligomerek specifikus detektálását. A kérdésem az lenne, hogy vizsgálták-e, hogy a foldamer-dendrimerek hogyan hatnak kölcsön ezekkel a fehérjékkel, és ez befolyásolhatja-e az aggregáció módosító hatásukat (pl. koncentráció függést)?

Válasz:

A bíráló által idézett megállapítást alátámasztó mérés eredményei a 34.A ábrán láthatóak. A biológiai minták modellezésére 1% FBS-t tartalmazó DMEM sejtnövesztő tápoldatot alkalmaztunk, mert az FBS-t megfelelően összetett rendszernek gondoltuk ehhez a modellkísérlethez. A gyártói leírás szerint ez az FBS kb 38 mg/ml fehérjetartalmú, ami a kész oldatunkban 380 mg/dm³ tömegkoncentrációt eredményezett. A fehérjetartalom főleg BSA-ból, növekedési, illetve adhézión faktorokból tevődik össze az egyéb komponensek mellett. Eredményeink szerint a foldamer-dendrimer konjugátum oligomerkötő képessége ebben az oldatban nem különbözött a PBS-ben mért értékektől. Ezt a kísérletet csak egyféle FBS-koncentrációval végeztük el, és nem vizsgáltuk a foldamerek specifikus plazmafehérjékkel történő egyedi kölcsönhatását sem. Talán az „adott biológiai mátrix” kifejezés valóban túl általános, hiszen a forrástól függően egészen nagy koncentrációtartományban mozoghat ezeknek az oldatoknak a fehérjetartalma. Irodalmi adatok szerint a vérérszérum totál fehérjetartalma az általunk alkalmazottnál több nagyságrenddel nagyobb, 60-80 g/dm³. Ellenben a humán cerebrospinális folyadék fehérjetartalma már jóval kisebb, kb. 500 mg/dm³ középtételekre tehető [8]. Valóban célszerűbb lett volna több koncentráció mellett is megvizsgálni az általunk fejlesztett ELISA-rendszer oligomerkötő képességét, de azt gondolom, hogy a kiválasztott koncentráció jól megközelíti a CSF-ben található állapotokat, ami számunkra azért volt elégséges, mert az ELISA-rendszerrel elsősorban a CSF-mintákban szeretnénk volna meghatározni az A β oligomerek mennyiségét.

9. A 44. ábrán mivel magyarázhatók, hogy kicsit random módon nőnek és csökkennek az értékek a hónapok előre haladtával. Van ennek valami biológiai magyarázata, vagy mérési hibából adódnak? Ha esetleg ez utóbbi, akkor a szignifikancia értékek mennyire tekinthetők pontosnak? Általában hány párhuzamos mérés alapján számolták ki a szórásokat?

Válasz:

A 44. ábra immunhisztológiai eredményeket mutat be az APPxPS1-es transzgén állatok és a vad típusú C57BL/6 egerek agyában detektálható glia-aktivációt jelző markerek (Iba1 és GFAP) mennyiségi jellemzésére. A kísérlet célja elsősorban nem az egyes egértörzsek egyedeinek kor szerinti összehasonlítása volt, ami valóban mutat random változásokat, hanem minden életkorban a transzgén és vad típusú állatok közötti különbségek felfedése, azzal a céllal, hogy megállapítsuk, melyik életkortól lehet az A β túltermelése következtében a gyulladásos folyamatok felerősödését detektálni ebben a transzgén egértörzsben. A kísérlet összesen 208 állattal zajlott, ami egy igen nagy állatmennyiség, de figyelembe kell vennünk, hogy a kísérletsorozat több hónapig folyt, és minden hónapban elegendő mennyiségű állattal kellett dolgoznunk a szignifikancia elérése érdekében. Csoportonként 5 állatunk volt, minden állatból 12 agyszelet analízisét végeztük el a gyrus dentatus és a hippocampus területén, így egy-egy érték összesen 5 biológiai párhuzamosból nyert 12 technikai párhuzamos mérés, azaz 60 adatpont átlagát és szórását reprezentálja. Ezek statisztikai összehasonlítása ANOVA utáni független mintákra alkalmazható Student-féle t-próbával történt, a szignifikanciát $p \leq 0,05$ szinten állapítottuk meg. Ezek alapján azt gondolom, hogy a kapott szignifikanciák a két állattörzs között egy adott életkorban mindenképpen erősen megalapozottak statisztikai szempontból. Egy törzsön belül a longitudinális változást nem értékeltük statisztikai szempontból, a randomításra nem tudok magyarázatot adni, a biológiai rendszerek változékonyságát tudom egyedüli okként felhozni a jelenségre.

10. A 94. oldalon azt olvashatjuk, hogy „Egy határkoncentráción túl a keletkező A β 1-42 ezekben az állatokban plakkokat képezhet, melyeket 4G8 antitesttel detektáltunk (45.C ábra).” Ez az ellenanyag a 18-23-as szekvencia részt ismeri fel az irodalom alapján. Lehetséges, hogy akkor az esetlegesen keletkező A β 3-42 peptidet és esetleg más fragmenteket is kimutatja? Tehát lehet, hogy ilyen szempontból nem szelektív az A β 1-42 peptidre? Persze lehet, hogy ennek megint nincs igazán jelentősége a vizsgálat szempontjából.

Válasz:

A 4G8 antitest az egyik legrégebbi és leggyakrabban alkalmazott monoklonális antitest, mely a legújabb eredmények szerint valóban nem a korábban évtizedekig feltételezett 17-24-es epitópot, hanem a 18-23-as epitópot ismeri fel szelektíven. Ez azonban nem befolyásolja lényegében az antitesttel kimutatható azon A β szekvenciák készletét, melyek a C- vagy az N-terminálison térnek el egymástól. Így egyetértek a bírálóval, ez az antitest

a 3-42, 1-40 és egyéb szekvenciájú, 18-23-as epitópot tartalmazó A β peptideket is felismeri. Ennek azonban a mi vizsgálatunk szempontjából valóban nincs jelentősége, mert a fragmensek emberben kimutatott mennyiségi arányai ebben az egértörzsben nem érvényesek. Ilyen jellegű vizsgálatot 5xFAD egerekre írtak le az irodalomban, APPxPS1-es egerekre nem találtam ilyen irányú adatot. Számunkra az amiloid-aggregátum teljes mennyiségének változása volt érdekes az életkor függvényében, az aggregátum peptidösszetételét az egyes szekvenciákra nem gondoltuk elemezni.

11. A 94. oldalon bemutatott táblázat az életkorral összefüggő neurogenezist és A β -patológiát érintő változások felderítését mutatja be APPxPS1-es transzgén egérmodellben. A táblázat tartalmaz irodalmi adatokat is, amelyek többször eltérnek a saját mérésektől. Dr. Fülöp Livia ezt azzal magyarázza, hogy „Az ellentmondások oka nagy valószínűséggel a detektálási metodikák különbözősége”. Ezekben az esetekben nem vetődött fel, hogy érdemes lenne ezeket a vizsgálatokat azonos módszerekkel összehasonlítani az irodalmi adatokkal, hogy ezt a következtetést igazolni lehessen?

Válasz:

A kísérlet tervezése során saját, nem AK-t érintő egérkísérletes tanulmányok alapján beállított mérési protokolljainkat alkalmaztuk a reprodukálhatóság és a statisztikai értékelhetőség biztosítása érdekében. Mindenképpen olyan longitudinális kísérletet akartunk elvégezni, amelyben minél többféle paraméter változását folyamatosan, hónapról-hónapra kísérve tudtuk elvégezni, mert az előzetes irodalmazás alapján látszott, hogy a fellelhető adatok csak néhány korcsoportra voltak érvényesek, és ennyiféle paramétert sem vizsgáltak az adott tanulmányok végzői. A metodikák összehasonlítása azt is felfedte, hogy egymáshoz hasonlóan is ezek a tanulmányok bőven tartalmaznak diszkrepanciákat. Néhány metodika pontos adaptálásával is megpróbálkoztunk az idézett publikációkból, azonban nem kaptunk értékelhető eredményt. Emiatt „arany-standardként” alkalmazható, konszenzusos metodikát nem tudtunk azonosítani az irodalomban minden mérésre, így döntöttünk a saját módszerek fejlesztése mellett. Eredményeink összehasonlítását az irodalmi adatokkal természetesen meg kellett tenni, de úgy gondolom, azok rendszerezése és a mi eredményeinkkel történő összehasonlítása, majd az esetleges különbözősége inkább előnye ennek a munkának, mint hátránya, mivel véleményem szerint a mi adataink „hiányzó láncszemeket” pótolnak, és az egy, nagyszámú populáción hónapokig végzett megfigyelések erősítik az általunk levont következtetések hitelességét.

12. A 96. oldalon bemutatott *in vivo* dozírozást („3-9 hónapos koruk között, heti 5 alkalommal, 5 mg·kg⁻¹ dózisban”) hogy választották ki? Nem sok ez? Nem lehetne kevesebb? Hogy bírták ezt az egerek 6 hónapon keresztül?

Válasz:

A szükséges dozírozás megállapításakor két tényezőt vettünk figyelembe. Az egyik a humán vizsgálatok dozírozásának leképezése egérre, a másik pedig a bíráló által már kért vért-agy-gáton történő átjutás, illetve intracelluláris hasznosulás problémája. Az első kérdést megvizsgálva az 5 mg/ttkg dózis egy átlag 30 grammos egeret és benne keringő 1,5 ml vért alapnak tekintve 0,1 mg/ml koncentrációt eredményez. Ezzel analóg az emberben 5 L vértérfogatban 500 mg hatóanyagot feltételezne, ami jóval nagyobb, mint pl. a peptid-típusú szemaglutidé (jelenleg 24 mg a legmagasabb fenntartó dózisa naponta). Így azt mondhatjuk, hogy egy tényleges terápiás szerhez képest ez valóban egy magas dózis volt. Nem szabad azonban elfelejteni, hogy az anyag biodisztribúciójának vizsgálata egy következő lépése a hatásvizsgálatnak, a kutatások kezdetén még jelentős rábiztosítással juttatjuk be a hatóanyagot a modellállat szervezetébe. Toxicitást ennél az anyagnál nem tapasztaltunk *in vitro* körülmények között, az elhullás ebben a kísérletben is a szokásos havi 1-2 állat körül mozgott. Ezek többnyire a transzgén csoportból kerültek ki, ezek az állatok ugyanis fenotípusosan sokkal érzékenyebbek, mint a vad típusúak. Az elhullást belekalkulálva úgy terveztük meg a kísérleteket, hogy minden állatcsoportban meglegyen a statisztikai érvényesség biztosításához szükséges állatszám (min. 5 vizsgálható állat). Az állatok intraperitoneálisan kapták az anyagot, kollégáim nagy biztonsággal és rutinnal hajtották végre a mindennapi oltás műveletét, az állatoknak a legkisebb terhelést okozva. Biztosan lehetett volna kisebb koncentrációt is alkalmazni, de hosszú éveken át folytatott állatkísérletes tapasztalataink ezekkel a nem toxikus peptid-típusú vegyületekkel azt mutatta, hogy ez a dózis alkalmazható az egérmodelles állatkísérletekben.

13. Az eredmények alapján megállapítja a Jelölt, hogy igazolták ezzel a hipotézisüket, hogy az amiloid-patológia ellen lehetőleg minél korábbi időpontban elkezdett kezelés célszerű.

a) Ez az emberre levetítve mit jelenthet? Hisz az egereknél a 3 hónapos kórál történő kezelés még bőven neurogenesis mutatók jelentős csökkenése előtt van.

Válasz:

a) Egerek esetében a transzgén csoport kifejezetten rövid életű, élettartama kb. 50-70 %-a az egészséges egerekének. Ezek az állatok korán ivarérettek lesznek, ezért öregedésük nem vethető lineárisan össze az emberrel. Emberre levetítve a korai diagnózis a familiáris esetek miatt már kb. 30 éves kortól jelenthetné a rendszeres időközönként végzett szűréseket egyes biomarkerekre, eltérés esetén pedig mélyebb analíziseket.

b) Később az összefoglalásban ezzel kapcsolatban a következőket írja Dr. Fülöp Livia „A korai fázisra jellemző biomarkerek azonosításával és szűrővizsgálat-szerű bevezetésével,

illetve az AK-hoz rendelhető genetikai mintázatok definiálásával el lehetne különíteni azokat a csoportokat, amelyeknek korai kezelése által szignifikánsan csökkenthető lenne a súlyos AK-ra jellemző tünetek kifejlődése.” Vannak erre irányuló kísérletek és tudunk már ilyen jól diagnosztizálható markerekről, amelyek nagy bizonyossággal előrevetítik a betegség várható kialakulását?

Válasz:

b) Az AK korai diagnosztikájával foglalkozó kutatások régóta vezetnek arra a közös álláspontra, hogy el kell különíteni a familiáris és sporadikus AK-t egymástól abban a tekintetben, hogy míg az előbbihez nagy biztonsággal hozzárendelhetők azok a genetikai mutációk, melyek a kialakulást valószínűsítik (APP, PSEN1 és PSEN2), addig a sporadikus esetben eddig egyetlen olyan gént. az ApoE-t tudták azonosítani, ami növeli az AK kialakulási valószínűségét, de ez sem szükségszerű. A sporadikus esetek genetikai analízise egy állandóan bővülő mutációs génkészletet tárt fel, azonban ezek tényleges korrelációja az AK fellépésével nagy erőforrásigényű összehasonlító vizsgálatokat igényel. A genetikai feltérképezés mellett a korai fázist jelezni képes biomarkerek felfedezése is jelenleg erősen kutatott terület. Erőfeszítések folynak olyan biomarkerek azonosítására, melyek a CSF helyett kevésbé invazív módszerekkel nyerhető mintából, plazmából, vizeletből, nyálból, könnyből azonosítható, megbízható prediktorként szolgálhatnának. Az Alzforum.org oldalon a biomarkereket összefoglaló adatbázist Henrik Zetterberg, Kaj Blennow, és kollégái (University of Gothenburg) állították össze, ennek 2021-es változata érhető el jelenleg. Ebben az adatbázisban kikereshetők azok a biomarkerek, amik mind az egészséges kontrollokhoz képest, mind más demencia-állapotokhoz, illetve az MCI-hez viszonyítva is jellemzőnek bizonyultak eddig az AK-ra a publikált tanulmányok alapján. Jellemzően a kognitív tünetek megjelenése előtt is már detektálható bizonyos biomarkerek szintjének szignifikáns emelkedése. Ezek a tau p181 (a kognitív tünetek megjelenése előtt már emelkedett a szintje), a tau p217 (szintje jellemzően a preklinikai fázisban mutat emelkedést). Ezenkívül AK-specifikus, nem APP-hez vagy tauhoz kapcsolódó biomarker még a neuroinflammációt jelző „glial fibrillar acidic protein” (GFAP) és YKL-40, a neurogranin, mely egy szinaptikus fehérje, a „neurofilament light chain” (NFL), mely egy axonális citoszkeleton-fehérje, a „brain-derived neurotrophic factor” (BDNF), mely a neuronok éréséért felelős molekula, és az AK kezdeti fázisában jelentősen emelkedett a szintje, illetve a visinin-like protein 1 (VLP1), mely egy kalcium-jelző molekula a neuronokban, a neuronális károsodás jelzője [9]. Ezek közül a GFAP, a tau(p181) és a tau (p217), valamint az NFL vérplazmában is $p < 0,0001$ konfidenciaszinten detektálható emelkedett mértékben az egészséges emberekhez képest (Alzforum.org).

c) Ha vannak is ilyenek, azok mennyire adnak információt az alkalmazandó terápiával kapcsolatban? Ezek mennyire befolyásolhatják a további kutatási irányokat?

Válasz:

c) Hogy mennyire képesek ezek a markerek előrevetíteni a betegség kialakulását, az jelenleg még kevésbé kutatott. Számos ország egészségügyi ellátó rendszere jelenleg még a diagnosztikai módszerek és a terápiás lehetőségek elérhetősége terén is komoly korlátozásokkal működik, a betegség fellépése előtt akár több évvel megkezdett szűrővizsgálatokra, az említett markerek szintjének nagyszámú mintán történő longitudinális mérésére, illetve ezzel párhuzamosan a kognitív zavarok felderítésére jelenleg az ellátórendszerekből hiányzik az anyagi forrás. Így amit dolgozatomban írtam, sajnos leginkább egy vágyott állapot, nem pedig a realitás.

A fent említett biomarkerek a korai szinaptikus károsodást, a neuroinflammáció megjelenését és vele a gliális aktiválódást, illetve a sejtek mikrostruktúrájának sérülését (mikrotubulus-rendszer sérülése, axonális támasztórendszer sérülése) jelzik az AK tüneteinek fellépése előtti fázisban. Azt gondolom, a gyógyszerkutatás már elmozdult ezekbe az irányokba, terápiás fejlesztések jelenleg is folyamatban vannak ezeknek a folyamatoknak a megakadályozására. Ezért lehet jelentősége pl. az általunk fejlesztett S1R modulátoroknak, vagy az Fe65 működését befolyásoló P33 vegyületnek is az AK megelőző, vagy korai terápiájában.

14. Az S1R működésére alapozott gyógyszerfejlesztés eredményei résszel kapcsolatban úgy érzem, hogy ezek még igen kezdetleges eredmények, több feltételezett hatás mechanizmus még igazolásra szorul, de ezt Dr. Fülöp Livia is megfelelően érzékelteti a leírásokban. Azonban a 102. oldalon a haloperidol > cutamesin közé nem tennék kisebb-nagyobb jelet, mivel a szórások mértéke (10. táblázat) ezt a hatásbeli megkülönböztetést nem indokolja. Ezen az oldalon található DTG rövidítés feloldását nem találtam a dolgozatban (sem a rövidítésjegyzékben, sem a kísérleti részben).

Válasz:

Köszönöm az észrevételt. A kérdéses mondat valójában részemről tartalmaz egy pontatlan fogalmazást, az eredeti publikációban ugyanis a K_i értékek nagyságrendje szerinti sorba állítás szerepel. Valóban, a szórások alapján ez a különbség a haloperidol és cutamesin általunk mért kísérleti K_i értékei, így nagyságrendjei között sem szignifikáns, így helyesebb lett volna a „közelítően azonos $\approx$ ” jelet rakni a kért mért érték közé. A tendencia azonban így is jól követi az irodalomban közölt értékek összehasonlításával kapható tendenciát.

A DTG rövidítés feloldásának hiányáért elnézést kérek, többszöri szisztematikus ellenőrzésen „csúszott át” ez a rövidítés, melynek feloldása: 1,3-di-o-toluilguanidin, a magyar IUPAC-nevezéktan szerint N,N'-bis(2-metilfenil)guanidin.

Hivatkozott irodalmak:

1. Mori, H., et al., *Mass Spectrometry of Purified Amyloid Beta Protein in Alzheimer's Disease*. J Biol Chem, 1992. **267**(24): p. 17082.
2. Saido, T.C., et al., *Dominant and Differential Deposition of Distinct B-Amyloid Peptide Species, A β N3 (Pe), in Senile Plaques*. Neuron, 1995. **14**(2): p. 457.
3. Shirotani, K., et al., *Generation of Amyloid B Peptide with Pyroglutamate at Position 3 in Primary Cortical Neurons*. Neuroscience Letters, 2002. **327**(1): p. 25.
4. Schilling, S., et al., *Glutaminyl Cyclase Inhibition Attenuates Pyroglutamate A β and Alzheimer's Disease-Like Pathology*. Nature Medicine, 2008. **14**(10): p. 1106.
5. Nussbaum, J.M., et al., *Prion-Like Behaviour and Tau-Dependent Cytotoxicity of Pyroglutamylated Amyloid-B*. Nature, 2012. **485**(7400): p. 651.
6. Chen, D., et al., *Development and Evolution of Human Glutaminyl Cyclase Inhibitors (Qcis): An Alternative Promising Approach for Disease-Modifying Treatment of Alzheimer's Disease*. Frontiers in Aging Neuroscience, 2023. **15**.
7. Gupta, S., J.A. Raskatov, and C.Y. Ralston, *A Hybrid Structural Method for Investigating Low Molecular Weight Oligomeric Structures of Amyloid Beta*. Chembiochem, 2022. **23**(23): p. e202200333.
8. Fautsch, K.J., et al., *Population-Based Evaluation of Total Protein in Cerebrospinal Fluid*. Mayo Clin Proc, 2023. **98**(2): p. 239.
9. Krishnamurthy, H.K., et al., *An Overview of the Genes and Biomarkers in Alzheimer's Disease*. Ageing Research Reviews, 2025. **104**: p. 102599.

Szeged, 2025. március 7.



Dr. Fülöp Livia