

fulop.livia\_187\_24

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

**MTA Doktori Értekezés**

***Dr. Fülöp Livia***

*Szegedi Tudományegyetem  
2024*

## Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés</b> .....	<b>5</b>
<b>2. Irodalmi előzmények</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1 Az AK definíciója, patológiájának jellemzői</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2 Az AK patológia lehetséges terápiás célpontjai: hipotézisek a gyógyszerkutatás tükrében</b> .....	<b>8</b>
2.2.1 Az APP szerepe az AK-ban .....	8
2.2.2 Az A $\beta$ aggregációja: az amiloid kaszkád hipotézis (AKH) .....	10
2.2.2.1 Az A $\beta$ fiziológiai szerepe és szerkezete.....	10
2.2.2.2 Az A $\beta$ aggregációs formái .....	11
2.2.2.3 Az aggregációs formák biológiai hatása.....	13
2.2.2.4 Szintetikus A $\beta$ alkalmazása biológiai vizsgálatokban.....	13
2.2.3 Az A $\beta$ oligomer, mint gyógyszerfejlesztési célpont .....	16
2.2.4 Az AICD-Fe65 kölcsönhatás, mint potenciális célpont .....	17
2.2.5 Az öregedő agy: a felnőttkori neurogenesis zavara.....	19
2.2.6 Neuroinflammáció és molekuláris stressz: a szigma-1 receptor szerepe a neurodegeneratív betegségeken .....	20
2.2.6.1. A neuroinflammáció mechanizmusa a neurodegeneratív betegségeken .....	20
2.2.6.2 A szigma-1 receptor szerepe a neurodegeneratív folyamatokban.....	22
2.2.6.3 A gyulladás és a neurogenesis összefüggése.....	24
2.2.7 Az AK egyéb hipotézisei.....	26
2.2.7.1 A kolinerg hipotézis .....	26
2.2.7.2 A Tau protein szerepe.....	26
2.2.7.3 A lipid homeosztázis zavara az AK-ban.....	26
2.2.7.4 A vaszkuláris keringési rendszer és a vér-agy-gát elégtelensége az AK-ban .....	27
<b>2.3 Gyógyszerkutatás az AK-ban: hol tartunk most?</b> .....	<b>28</b>
<b>3. Célkitűzés</b> .....	<b>34</b>
<b>4. Alkalmazott anyagok, vizsgálati módszerek és eszközök</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1. Szintézisek</b> .....	<b>36</b>
4.1.1 Az izo-A $\beta_{1-42}$ szintézise.....	36
4.1.2 Peptidszintézisek .....	36
4.1.3 Foldamer-dendrimer konjugátumok szintézise.....	37
4.1.4 Egyéb vizsgált vegyületek .....	37

<b>4.2</b>	<b>Mintakészítési protokollok.....</b>	<b>38</b>
4.2.1	<i>Az A<math>\beta</math><sub>25-35</sub> elkészítési protokolljai .....</i>	38
4.2.2	<i>A standard oligomerkészítési protokoll (SOP).....</i>	38
4.2.3	<i>A standard fibrillumkészítési protokoll (SFP) .....</i>	38
<b>4.3</b>	<b>Az A<math>\beta</math> aggregációjának tanulmányozására használt fizikai-kémiai és képköztételi eljárások .....</b>	<b>39</b>
4.3.1	<i>Dinamikus fényszórásmérés (DLS) .....</i>	39
4.3.2	<i>Cirkuláris dikroizmus mérések (CD).....</i>	39
4.3.3	<i>NMR.....</i>	39
4.3.4	<i>Izoterm titrációs kalorimetria (ITC) .....</i>	39
4.3.5	<i>Tioflavin-t (ThT) mérések .....</i>	40
4.3.6	<i>TEM és AFM vizsgálatok.....</i>	40
4.3.7	<i>Méretkizárásos kromatográfia (SEC) .....</i>	40
<b>4.4</b>	<b>Molekuláris biológiai technikák.....</b>	<b>41</b>
4.4.1	<i>Western blot (WB), dot blot (DB) és enzim-kapcsolt immunoszorpciósszé (ELISA).....</i>	41
4.4.2	<i>A saját fejlesztésű oligomerszelektív ELISA teszt leírása.....</i>	41
4.4.3	<i>Riboszómák és A<math>\beta</math><sub>1-42</sub> oligomerek kölcsönhatásvizsgálata .....</i>	42
4.4.4	<i>In vitro transzlációs vizsgálat .....</i>	42
4.4.5	<i>Radioligand-kötődési vizsgálatok .....</i>	42
4.4.6	<i>Immunhisztokémiai és egyéb hisztológiai eljárások .....</i>	43
4.4.6.1	<i>Immunhisztokémiai meghatározások.....</i>	43
4.4.6.2	<i>Golgi-festést követő dendrittüske-meghatározás .....</i>	43
4.4.6.3	<i>A neuronszám meghatározása krezilibolya festéssel (Nissl festés) .....</i>	44
4.4.6.4	<i>Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat az A<math>\beta</math><sub>1-42</sub> icv injektálást követő agyi eloszlásának meghatározására .....</i>	44
<b>4.5</b>	<b>In vitro biológiai kísérletek.....</b>	<b>44</b>
4.5.1	<i>Életképességi mérések .....</i>	44
4.5.1.1	<i>MTT-mérés sejten szinten .....</i>	44
4.5.1.2	<i>Ex vivo MTT-mérés túlélő agyszeleten .....</i>	44
4.5.1.3	<i>Impedanciamérésen alapuló viabilitás-meghatározás (RT-CES) .....</i>	44
4.5.2	<i>Elektrofiziológiai mérések agyszeleten .....</i>	45
<b>4.6</b>	<b>In vivo magatartásvizsgálatok .....</b>	<b>45</b>
4.6.1	<i>Állatkísérletes engedélyek számai .....</i>	45
4.6.2	<i>A Morris Water-maze (MWM) kísérlet .....</i>	45

<b>4.7 Molekulamodellezés, elméleti kémiai számítások .....</b>	<b>46</b>
4.7.1 REMD modellezés az $A\beta_{1-42}$ konformációjának meghatározására .....	46
4.7.2 A foldamer szekvenciák térszerkezetének modellezése.....	46
4.7.3 Az S1R modulátorok szűrésére alkalmazott modell kidolgozása.....	47
<b>4.8 Mérések kiértékelése, statisztikai módszerek.....</b>	<b>47</b>
<b>5. Eredmények és értékelésük.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1 Középpontban az AKH.....</b>	<b>49</b>
5.1.1 Szintetikus amiloidot alkalmazó kísérleti rendszerek fejlesztése.....	49
5.1.1.1 Szintetikus $A\beta$ peptidek előállítása biológiai vizsgálatokhoz.....	49
5.1.1.2 Optimalizált eljárás kidolgozása $A\beta_{1-42}$ peptid szintézisére: az izo- $A\beta_{1-42}$ .....	50
5.1.1.3 Az SOP és SFP szerint előállított aggregátumok alkalmazása biológiai modellrendszerekben .....	52
5.1.1.4 $Ca^{2+}$ és $Mg^{2+}$ ionok hatása az izo- $A\beta_{1-42}$ peptid aggregációjára .....	57
5.1.2 Az $A\beta$ mint terápiás célpont .....	63
5.1.2.1 Az o $A\beta$ -val kölcsönható fehérjék feltérképezése.....	63
5.1.2.2 Az $A\beta$ aggregátumok kölcsönhatásainak modulálása terápiás céllal .....	65
5.1.3 Molekuláris diagnosztikai módszer kidolgozása a toxikus aggregátumok kimutatására .....	74
<b>5.2 Az AICD, mint terápiás célpont.....</b>	<b>83</b>
<b>5.3 A neurogenesis zavarára alapozott kísérletek eredményei .....</b>	<b>92</b>
<b>5.4 Az S1R működésére alapozott gyógyszerfejlesztés eredményei .....</b>	<b>97</b>
5.4.1 Az S1R modulátorok szerepe a neurogenesisben.....	97
5.4.2 Új típusú S1R modulátorok azonosítása molekulakönyvtárakból .....	100
<b>6. Összefoglalás – kitekintés.....</b>	<b>106</b>
6.1 Az „amiloid-kihívás” .....	106
6.2 Az AKH-ra alapozott mechanizmus- és gyógyszerkutatás.....	107
6.3 Az $A\beta$ -tól különböző célpontokon alapuló fejlesztések relevanciája .....	109
<b>7. Tézisek .....</b>	<b>112</b>
<b>8. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>114</b>
<b>9. Rövidítésjegyzék.....</b>	<b>115</b>
<b>10. Irodalomjegyzék.....</b>	<b>118</b>



## 1. Bevezetés

*„We have slaughtered the wrong pig”*

*Winston Churchill*

A doktori értekezésem mottójául választott idézet azt jelzi, hogy az általam két évtizede kutatott téma sok kétséggel, bizonytalansággal terhelt. A kérdéses mondatot Winston Churchillnek tulajdonítják, keletkezését a második világháború végére teszik, és úgy értelmezhető, hogy Churchill, Sztálin politikai tevékenységét megtapasztalva azon véleményének adott hangot, hogy Hitler és a náci rend letörése nem feltétlenül orvosolta maradéktalanul a veszélyt, amit a nacionalizmus és fasizmus fenyegetése jelentett a nemzetekre. Neves történészek próbáltak Churchill irataiban később bizonyítékot találni arra, hogy ez a mondat valóban tőle származik, de úgy tűnik, csak olyan, a korabeli médiában található utalásokat találtak, amelyek szerint „állítólag szóban hangzott el ez a kijelentés Churchilltől”.

Miért gondoltam ezt az idézetet mégis alkalmas indításnak? A kettős bizonytalanság, azaz az idézetben megfogalmazott, illetve az idézetnek magának a hitelességét érintő kétely miatt. 2022 nyarán a Science folyóiratban megjelent egy közlemény [1], amelynek írója egy olyan kutatási csalásról szándékozott lerántani a leplet, amely befolyásolhatta az Alzheimer-kórral (AK) kapcsolatos, amiloid oligomereket célpontként alkalmazó gyógyszerfejlesztés irányát. A szerző kételyei nyomán vizsgálat indult, amely ténylegesen feltárta a mértékadó tudományos lapokban leközölt kísérleti eredmények hamisított voltát.

Megkérdőjelezi-e ez a csalás az AK kutatási eredményeinek érvényességét és jelentőségét? 2022-ben az AK központi hipotézise, az amiloid kaszkád hipotézis (AKH) [2] éppen harminc éves lett. Ám ekkorra az is nyilvánvalóvá vált, hogy a rá alapozott gyógyszerfejlesztések, a kutatási pályázatokba fektetett óriási összegek nem jártak egyértelmű sikerrel. Jelenleg úgy tűnik, hogy a késői életkorban megjelenő AK-ban szenvedő betegek számára olyan hatásos oki terápiát, mely az emberi élet minőségét teljesen leromboló memóriavesztést tartósan akár csak felfüggeszteni is képes, még nem sikerült kifejleszteni. Természetesen az AKH revíziójára, kiegészítésére a későbbiekben történtek kísérletek, [3, 4], ezzel együtt azonban felerősödtek azok a vélemények, amelyek a továbbiakban nem tudták az amiloid aggregációt az AK központi molekuláris okaként elfogadni [5, 6]. Ehhez a felismeréshez járulhat hozzá felerősítő momentumként a feltárt csalás, hiszen az érintett, Egyesült Államokban működő kutatócsoport eredményei, publikációi korábban nemcsak saját hazájukban, hanem világszerte bekerültek a témával foglalkozó kutatócsoportok (köztük a miénk) érdeklődési körébe, beépültek kísérleti terveikbe.

Kutatói munkámat az SZTE Orvosi Vegytani Intézetében 1997-ben, az AKH térnyerésének időszakában kezdtem. Kutatási irányom olyan peptid- és peptidomimetikum-típusú molekulák tervezése és szintézise volt, melyekkel a béta-amiloid (A $\beta$ ) önszerveződése befolyásolható, a következményes biológiai hatás, azaz a központi idegrendszerben kifejtett neurotoxicitás pedig meggátolható. Kifejlesztett vegyületeim alkalmasak olyan adott molekuláris szintű folyamatok hatékony megváltoztatására, mint az aggregáció, vagy egy speciális fehérje-fehérje kölcsönhatás modulálása. Emellett munkámban kiemelt szerepet kaptak olyan kutatási témák is, amelyekkel a tervezett molekulák megfelelő teszteléséhez fejlesztettünk biológiai modellrendszereket, ezáltal lehetővé téve egy teljes preklinikai dosszié összeállítását a gyógyszeripari együttműködő partnerek számára. A diagnosztikai eljárások kifejlesztése terén is értünk el olyan eredményeket, amelyekkel lehetővé válik bioaktív A $\beta$  oligomerek kimutatása különféle biológiai mintákból.

A gyógyszeripar adaptálódása a gyógyszerkutatás AKH-ra alapozott (nem kielégítő) eredményeihez arra készítette a csoportunkat, hogy az A $\beta$  szerepét kiegészítő új irányokat keressünk, új lehetséges terápiás célpontokat találjunk az AK patológiájában. Munkámban ezért jelentős részt képviselnek azok a kutatások, melyekben egyrészt a neurogenesis, másrészt a szigma-1 receptorral kapcsolatos biológiai folyamatok kapcsolatát vizsgálom az AK-val. A biológiai célpontok azonosításával lehetségessé válik olyan gyógyszerjelölt vegyületek kifejlesztése, melyek a továbbiakban valódi oki terápia megalapozására szolgáltathatnak kiindulópontot.

Végül szeretnék az AKH-ra, mint esetleges téves kutatási irányra, illetve az oligomerekkel kapcsolatos kutatási csalás hatására is reflektálni. A jelenleg zajló klinikai vizsgálatok többségében az aggregált peptid immunológiai úton történő eltávolítása a fő hatásmechanizmus, azzal a megfontolással, hogy szükség esetén egyéb kiegészítő terápiás megoldásokkal lehet majd kombinálni ezt az eljárást. Habár az eddigi eredmények szerint az A $\beta$  felszaporodásnak oka még mindig nem tisztázott, kétségtelen, hogy az AK patológiája elválaszthatatlan a plakkok megjelenésétől. A mostanra elfogadott álláspont szerint az AK egy rendkívüli heterogenitást mutató betegségcsoport, így a betegek egy részénél biztosan nem az AKH az elsődleges indító tényező, de egy ponton minden betegnél kimutatható a fő patológiai jegy, a plakkok képződése. Így az AKH-ra alapozott gyógyszerfejlesztés létjogosultsága továbbra sem kétséges. Az oligomerekkel kapcsolatos csalást illetően saját tapasztalatainkra támaszkodhatunk. A kérdéses eredményeket sem kutatócsoportunknak, sem a velünk akkoriban munkakapcsolatban álló más csoportoknak nem sikerült reprodukálni. Az A $\beta$  oligomerrel, mint célponttal kapcsolatosan, világszerte jelentős mennyiségű kutatási eredmény gyűlt össze, de véleményem szerint ezek érvényességét utólagosan nem tudja megkérdőjelezni a feltárt hamisítás.

Összegezve tehát munkám a kémiai biológia területén szolgáltat olyan új eredményeket, melyek hozzájárulnak az AK patológiás mechanizmusainak pontosabb megértéséhez, hasznosak lehetnek gyógyszerjelölt vegyületek preklinikai vizsgálatára alkalmas kísérleti modellek kidolgozásakor, illetve leghatékonyabb molekuláink olyan gyógyszerek kifejlesztését teszik lehetővé, melyek az amiloid-aggregációs elméletet kiegészítő, új patológiás célpontokra is irányulnak.

A dolgozat megírásakor igyekeztem a magyar szaknyelvi kifejezéseket használni. Munkám és eredményeim túlnyomó része jellemzően több tudományterületet is érint, a kémia mellett jelentős a biológiai folyamatokhoz kapcsolódó megállapítások mennyisége. Emiatt a szakterminológia megkívánja a latin eredetű orvosi vagy biológiai szakkifejezések használatát, melyeket dőlt betűvel jelöltem. Az idegen nyelvű szakkifejezéseket sokszor rövidített formában használjuk, ezek a tipikus rövidítések honosodtak meg sajnos a magyar szaknyelvben, sokszor még a teljes kifejezés fordítása sem használatos (jellemzően pl. a fehérjék elnevezése esetében). Emiatt egy kompromisszumos megoldást alkalmaztam. A magyar nyelven használatos kifejezések esetében magyar rövidítéseket használok (pl. az Alzheimer-kórra AK-t a közkeletűbb, angol eredetű AD helyett). Vannak olyan magyar szakkifejezések, amiknek az angol vagy latin névből származik az elfogadott rövidítése, ezeket nem magyarosítottam (pl. kis molekulatömegű (LMW)). Ahol értelmezhető, de nem rögzült a magyar fordítás és elfogadottabb az angol, ott mindkettőt megadtam, az angol kifejezést idézőjelbe téve, de rögzültsége miatt az angol rövidítést használom (pl. hibás fehérje-válasz („unfolded protein response”, UPR). A magyar szaknyelvben nem létező szakkifejezéseket csak az angol formában adtam meg és rövidítettem (pl. „large scale genome-wide association studies” GWAS). A rövidítésjegyzék a dolgozat 9. fejezetében található.

## 2. Irodalmi előzmények

### 2.1 Az AK definíciója, patológiájának jellemzői

Az Alois Alzheimer által 1906-ban először definiált AK [7] egy olyan progresszív neurodegeneratív betegség, melyet klinikailag a kognitív képességek elvesztése, memóriazavarok, nyelvhasználat korlátozottsága, feladatok végrehajtására és problémamegoldásra való képtelenség, személyiségváltozás és hangulati zavarok (ingerlékenység, majd apátia, depresszió) jellemezznek [8, 9]. *Post mortem* diagnózisakor azonosítható anatómiai képletek a nagy kiterjedésű sejtpusztulás a hippokampuszban (HC) és az entorhinális kéregben, az agyállomány sorvadása, a sejtek közötti térben megjelenő, főleg A $\beta$  peptidből felépülő amiloid plakkok, illetve a sejten belül egy másik fehérje, a Tau hiperfoszforilált származékaiból (pTau) álló neurofibrilláris kötegek jelenléte [10]. A kiterjedt mechanizmusok kutatás eredményeként ezek a patológiai jelek kiegészültek más, az AK-hoz bizonyítottan társuló jelenségekkel, mint a gyulladáshoz kapcsolódó markerek emelkedése, neuronális szinapszisvesztés, elégtelen felnőttkori neurogenesis, sejtszintű stressz-folyamatok aktiválódása, melynek következménye akár a programozott sejthalál is lehet.

Az AK-nak jelenleg két formáját különböztetjük el, az örökítő, vagy familiáris (FAK) és a sporadikus (SAK) [11] változatot. Mindkettőnél azonosíthatóak tipikus genetikai mutációk, de ezek között nincs átfedés. A FAK-ra jellemző, hogy viszonylag korai életkorban (akár már 40 éves kor körül) is megjelenhetnek az első tünetek, illetve hogy a diagnosztizált AK-s esetek kb. 5%-a sorolható ebbe a csoportba. Három gén autoszomális domináns mutációja társítható hozzá, az amiloid prekursor proteint (APP), illetve a preszenilin 1 (PS1) és preszenilin-2 (PS2) katalitikus enzim-alegységeket kódoló gének mutációi [12]. Eddig több, mint 270 mutációt azonosítottak a három génen, és számuk továbbra is nő [13]. Ezzel szemben a jellemzően 65 éves kor körül kezdődő SAK a diagnózisok 95%-t teszi ki, és a megjelenésével kapcsolatba hozható, eddig azonosított mutációk száma is több ezer. A 2010-es évek második felében kezdődött széleskörű genetikai kutatások („large scale genome-wide association studies”, GWAS) eredményei kiegészítették azt a korábbi felfedezést, hogy a SAK fellépésének valószínűségét az ApoE  $\epsilon$ 4 allél megjelenése jelentősen megnöveli [14]. A GWAS-on alapuló eredmények alapján a SAK-ra jellemző további mutációk jellemzően három nagy csoportra oszthatók az érintett fehérjék biológiai funkciója szerint: i) lipid metabolizmus, ii) komplement-rendszer érintettsége, immunválasz, neuroinflammáció, iii) sejt szinaptikus működése, endocitózis [13, 15]. Emellett egyöntetű az a vélemény, hogy a SAK-ot a különböző genetikai faktorok kombinációja ugyan valószínűsíti, de fellépéséért a genetikai érintettségén túl főleg az öregedéshez rendelhető molekuláris folyamatok (fehérjeszintézis és fehérjelebontás elégtelensége, a glimfatikus rendszer működési problémái, a vér-agy gát („blood-brain-barrier”, BBB) elégtelensége), illetve egyéb valószínűsítő tényezők (biológiai nem, korábbi fejsérülés, vaszkuláris társbetegségek, pl. szívinfarktus vagy kezeletlen magas vérnyomás, stressz, túlsúly) is felelősek [10].

A két alap patológiai jelek, az A $\beta$  és a Tau aggregátumok jelenléte miatt az AK-t az ú.n. „fehérje-konformációs” betegségek közé soroljuk. Ezek olyan, többnyire neurodegeneratív betegségek, melyekben megfigyelhető bizonyos fehérjék kóros mennyiségű felszaporodása.

Milyen úton keletkeznek a sejtekben a hibás konformációjú fehérjék? A fehérje szintézisét követően számos intramolekuláris segédmolekula (dajkafehérjék) összehangolt működése révén alakul ki a biológiai funkció betöltéséhez szükséges konformáció. Ha valamilyen okból ez nem tud megvalósulni, a sejtben olyan proteolitikus rendszerek aktiválódnak, melyek a hibás fehérjét eltávolítják a sejtéből. Így jön létre az egészséges sejtet jellemző proteosztázis, azaz a fehérjék homeosztázisa [16]. A proteosztázis kifejezés azt jelenti, hogy a proteom

szereplői a biológiai funkció betöltéséhez szükséges mennyiségben, aktív formában, a megfelelő helyen állnak rendelkezésre [17]. A proteosztázis alapfolyamatai a proteogenezis, a protein bioaktív konformációjának kialakulása („folding”), a fehérjék megfelelő transzportja a célhelyre („trafficking”), és a szükségtelen, vagy hibás molekulák lebontása. Ezek egyensúlya szükséges ahhoz, hogy a sejtet ne érje proteotoxikus stressz [18]. A fehérjekonformációs betegségek fő jellemvonása a proteosztázis zavara, melynek oka lehet maga az öregedés, neurodegeneratív folyamatok felerősödése, vagy más olyan betegségek, amelyeknek következménye a toxikus fehérjeaggregátumok feldúsulása [19]. AK-ban a felhalmozódó A $\beta$  és pTau bizonyítottan indukál olyan káros sejtszintű folyamatokat, melyek neuronális diszfunkcióhoz, esetenként apoptózishoz vezetnek.

A SAK-ra jellemző genetikai mutációs paletta analízise egyértelműen jelzi, hogy a betegség valószínűsíthetően első lépése a proteosztázis egyensúlyának megbomlása [20]. Emellett mind az AK, mind más neurodegeneratív betegség esetében is megfigyelhető számos azonos sejtszintű folyamat kialakulása, mint az excitotoxicitás, a kalcium-háztartás zavara, az oxidatív stressz, a mitokondriumok elégtelen működése és az ER-stressz.

A proteosztázis folyamatainak szabályos működése különösen fontos a poszt-mitotikus sejtek, így a neuronok esetében, mivel ezek nem, vagy nehezen képződhetnek újra. Az AK-ban a proteosztázis irányításában és fenntartásában az APP és lebontási termékei központi szerepet játszanak. Az AK-ban érintett agyi területek sejtjeinek még egészséges állapotban történő genetikai analízise felfedte, hogy a proteosztázist fenntartó fehérjék expressziója, amelyek az A $\beta$  és pTau aggregációját mindkét irányban (gátlás és elősegítés) szabályozzák, már évekkel a kór fellépése előtt jellegzetes mintázatot mutat [21]. Mind az ubikvitin-irányított, mind az autofág-lizoszomális lebontási rendszer sérülése detektálható az AK-ban, illetve általánosan a neurodegeneratív betegségekben, és jellemző rájuk olyan genetikai mutációk feldúsulása, melyek a fehérjelebontó rendszerek elemeihez társíthatók [22-24].

Ha az öregedés önmagában növeli az AK kockázatát, miért nem lesz szükségszerűen minden öregedő egyed beteg? Egyes hipotézisek szerint, az emberi evolúció során az agynak az öregedéshez való helytelen alkalmazkodása vezethetett időnként a fiziológias folyamatok károsodásához, különösen a glutamáterg rendszer serkentő kapacitásának csökkenéséhez. Ennek következménye az evolúciósan kódolt, fő excitációs útvonalak neuronjainak tovaterjedő diszfunkciója, neurofibrilláris kötegek képződése és apoptózis [25]. A fiziológias folyamatok elégtelensége az egyedekben kialakuló változatos genetikai mutációk kombinálódásának eredményeként alakulhat ki. Így valószínűsíthetjük, hogy az AK kiváltását egyedileg nem okozó mutációk együttes fellépése, társulva az öregedéssel járó fiziológias folyamatokhoz, felborítja a proteosztázis kényes egyensúlyát, és elindítja a betegséget.

## **2.2 Az AK patológia lehetséges terápiás célpontjai: hipotézisek a gyógyszerkutatás tükrében**

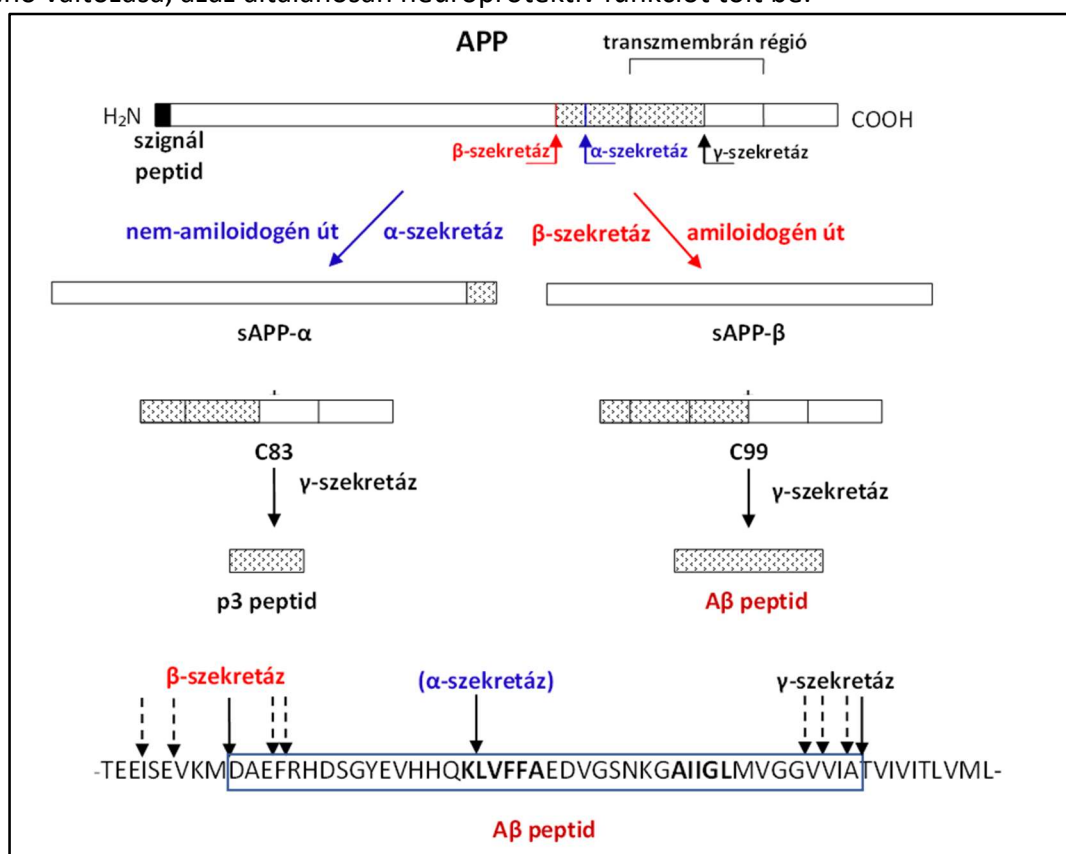
### *2.2.1 Az APP szerepe az AK-ban*

Az AK patológiájának egyik kulcseleme az extracelluláris plakkok megjelenése az agyállományban és az erek falában. Ezek az A $\beta$ , mint fő alkotó mellett pTaut, fémionokat, és egyéb fehérjéket (ApoE, katepszin D) tartalmaznak, illetve a plakk körül jellemző a lokális lipid-feldúsulás, a neuronok sorvadása és aktivált mikroglia jelenléte [10]. Az A $\beta$  az APP lebontása révén keletkezik (**1. ábra**).

Az APP egy transzmembrán glikoprotein, mely két másik fehérjével (amiloid-szerű fehérje 1 és 2) az APP-szerű fehérjék családjába tartozik. Három izoformája van (rendre 695, 751 és 770 aminosavból épülnek fel), melyek előfordulása szövetspecifikus. Kizárólag az APP695 izoforma

jelenik meg az agyban. Fiziológiás szerepe meglehetősen komplex [26], mely a belőle szabályozott membránon belüli proteolízis („regulated intramembran proteolysis” RIP) [27] révén keletkező fragmensek közvetítésével valósul meg. Fő funkciója az agyi struktúrák kialakulásának és fennmaradásának, valamint a szinaptogenezisnek a biztosítása. Bizonyítottan pozitív neurotróf hatással bír, a szinapszisok fenntartásában és a szinaptikus plaszticitás megfelelő működésében is fontos szerepet játszik [28]. Feltételezik, hogy a dendritek és axonok növekedésében, neuroprotektívban és szignáltranszdukciós folyamatokban is részt vesz [29, 30].

Az APP proteolízise 3 fő enzim, az  $\alpha$ -  $\beta$ - és  $\gamma$ -szekretáz összehangolt működése révén, két fő lebontási útvonalon mehet végbe. A nem-amiloidogén úton az  $\alpha$ -szekretáz a membránhoz közel elhasítja az APP extracelluláris szakaszát, így keletkezik az oldható APP- $\alpha$  (sAPP- $\alpha$ ), illetve a membránhoz kötött, 83 aminosav hosszúságú C-terminális fragmens (CTF vagy C83). Ebből a  $\gamma$ -szekretáz hatására képződhet a p3 peptid és az intracelluláris APP-domén (AICD). Az sAPP- $\alpha$  extracellulárisan fejti ki különféle szignáltranszdukciós utakra a hatását, melynek következménye a sejtnövekedés, a szinapszis képzés és a neuritfejlődés kedvező irányba történő változása, azaz általánosan neuroprotektív funkciót tölt be.



**1. ábra** Az APP lebontása. Az  $\alpha$ -szekretáz hatására a nem-amiloidogén úton oldható fragmensek keletkeznek (sAPP- $\alpha$ , C83, p3). A 39-43 aminosav hosszúságú A $\beta$  peptid a  $\beta$  és  $\gamma$ -szekretáz hasítása révén keletkezik, különféle alternatív hasítási helyek kombinációjával.

Az amiloidogén lebontás során a  $\beta$ -szekretáz, vagy más néven béta-pozícióban APP-t hasító enzim 1 (BACE1) hatására az sAPP- $\beta$  extracelluláris fragmens keletkezik, illetve a 99 aminosavas C99 membránba ágyazott fehérje. A két szolubilis fragmens biológiai hatása eltér, az sAPP- $\beta$  csökkent neuroprotektív képességű [31]. A C99 fragmens  $\gamma$ -szekretáz általi hasításával keletkezik az A $\beta$ , illetve ismételtelen egy AICD. Mind a BACE1, mind a  $\gamma$ -szekretáz kifejtetheti hatását alternatív hasítási pozíciókban, emiatt az A $\beta$  37-43 aminosav hosszúságú

lehet. A  $\gamma$ -szekretáz egy aszpartil-proteáz, 4 alegységből álló enzimkomplex, két katalitikus alegysége a preszenilin-1 (PS1) és preszenilin-2 (PS2). Az A $\beta$  képződéséhez az APP, BACE1 és  $\gamma$ -szekretáz kolokalizációja szükséges, ami nem szükségszerűen a sejtmembrán belső oldalán valósul meg, hanem az APP sejten belüli transzlokációja révén lizoszómákban, késői Golgi-kompartmentekben, illetve az endoplazmás retikulum (ER) mitokondriummal szomszédos határfelületén is („mitochondrial associated membrane”, MAM) [32].

Az A $\beta$ -val ellentétben a p3, mint a nem-amiloidogén út egyik terméke, nem kapott a kutatásokban különösebb figyelmet. Az irodalomban található p3-mal kapcsolatos információk ellentmondásosak [33], egyesek szerint neuroprotektív [34], oldható és nem-amiloidogén [35, 36], míg más csoportok azt találták, hogy aggregálódni képes, amorf [37], vagy fibrilláris [33] szerkezetű aggregátumokat alakít ki, és citotoxikus hatása lehet [38]. A p3 viselkedése azzal magyarázható, hogy az A $\beta$  1-16 szekvenciárészletének levágásával kapott fragmens a p3-mal azonos, egyben az A $\beta$  amiloid típusú aggregációért felelős része. Így egyértelműen nem állítható, hogy a nem-amiloidogén úton csak nem-amiloidogén fragmensek keletkeznek, ami tovább bonyolítja az AK patológiát.

2015-ben egy alternatív APP-lebontási útvonalat is azonosítottak [39]. Egy  $\eta$ -szekretáznak elnevezett enzim az 504. aminosav mellett hasítja el az APP-t, létrehozva így az sAPP $\eta$  fragmenset. Ennek a fragmensnek a további  $\alpha$ - vagy  $\beta$ -szekretázzal történő hasítása olyan fragmenseket eredményez (rendre A $\eta$ - $\alpha$  és A $\eta$ - $\beta$ ), melyek közül az A $\eta$ - $\alpha$  bizonyítottan neurotoxikus, kedvezőtlen irányban befolyásolja a hippokampális neuronok működését. Feltételezik, hogy a  $\beta$ -szekretázt gátló gyógyszerek ennek a nem kívánt fragmensnek a képződését is elősegítik.

A továbbiakban az amiloidogén lebontási út két fontos fragmensének, az A $\beta$ -nak és az AICD-nek az AK patológiában betöltött szerepét tárgyalom részletesen. Az eddigi kutatási eredmények alapján mindkét fragmens alkalmas célpont lehet az AK-ban alkalmazható oki terápiás eljárások fejlesztésére.

## 2.2.2 Az A $\beta$ aggregációja: az amiloid kaszkád hipotézis (AKH)

### 2.2.2.1 Az A $\beta$ fiziológiai szerepe és szerkezete

Genetikai vizsgálatok kimutatták, hogy a gerincesek mindegyike képes APP,  $\beta$ - és  $\gamma$ -szekretáz és A $\beta$  termelésére. A humán és egyéb emlős fajokban képződő A $\beta$  95%-nál magasabb szekvenciahomológiát mutat [40]. Ez arra enged következtetni, hogy az A $\beta$  fontos szerepet játszhat bizonyos sejtélettani folyamatokban [41]. Az eddigi kutatások alapján valószínűsíthető, hogy alacsony koncentrációban a következő funkciói lehetnek: i) a glutamáterg és kolinerg szinapszisok szabályozása, a memória-konzolidáció támogatása, ii) agy és gerincvelőállomány sérülése esetén neuroprotektív szerep, iii) vér-agy-gát sérülése esetén javító funkció, a vérben található egyéb molekulákkal együttműködve (pl. diabéteszben, magas vérnyomásos betegségben, az öregedési folyamatok során), iv) képes kölcsönhatásba lépni onkogén vírusokkal, gátolja a tumornövekedést, v) leírták antimikrobiális hatását, szerepet játszik az agyi nonspecifikus immunválasz kialakulásában is [41, 42].

Az APP lebontása során, a hasítási helyek kombinációjától függően változatos szekvenciájú A $\beta$  variánsok képződhetnek. Egy tanulmány humán agyi mintákból származó oldható aggregátumok és a plakkok nagyfelbontású tömegspektrometriás analizisével 26 különböző szekvenciát azonosított [43]. Hosszú ideig tartotta magát az a feltevés, hogy az A $\beta$ <sub>1-40</sub> és A $\beta$ <sub>1-42</sub> formák a leggyakoribbak. Manapság már az az uralkodó nézet, hogy a szekvenciák mind az N-, mind a C-terminálison tovább hasítódnak, és az ilyen csonkolt formák fordulnak elő a biológiai mintákban a legnagyobb mennyiségben. Közülük kiemelendő az N-terminálison csonkolt,

piroglutamátot tartalmazó variáns ( $A\beta$ -Glp<sub>3-42</sub>), amely megnövekedett aggregációs hajlammal rendelkezik, és jelenleg a gyógyszerkutatások egyik specifikus célpontja [44].

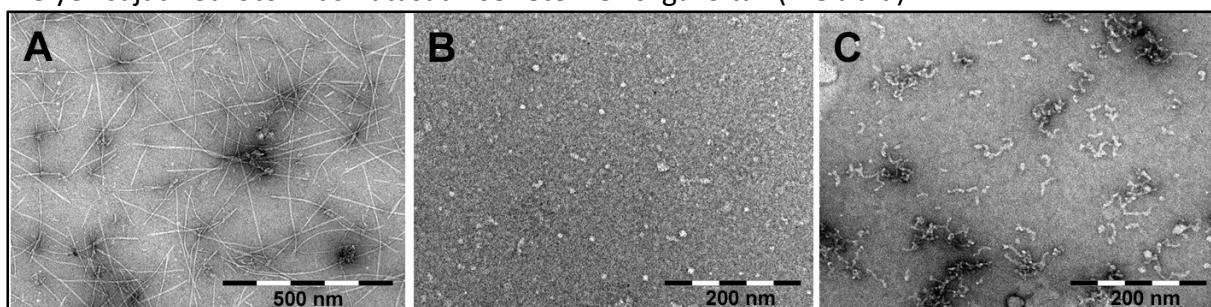
Natív formában, alacsony koncentrációban az  $A\beta$  rendezetlen konformációjú, „random coil” szerkezettel jellemezhető [45]. A lokális koncentráció növekedésével a molekula gyors konformációváltozáson megy át, és különböző toxicitási képességgel rendelkező oligomer formákat képez [46].

#### 2.2.2.2 Az $A\beta$ aggregációs formái

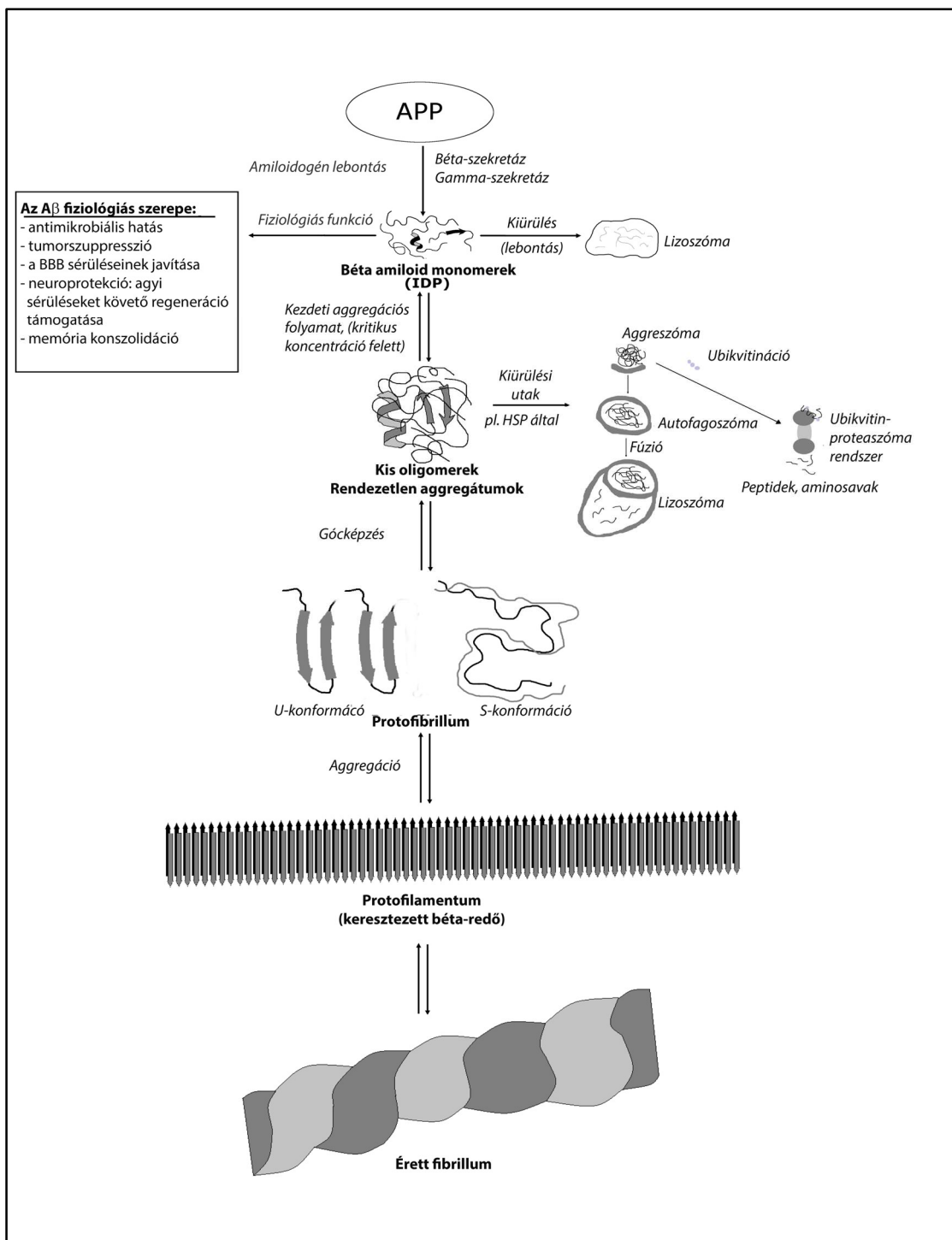
Történetileg az első azonosított képlet a legmagasabb rendezettséget mutató aggregációs forma, a fibrillum volt. Ez a szerkezet található meg a plakkokban, amelyet szerkezetvizsgáló módszerekkel (röntgenkristallográfia [47], szilárd fázisú mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) [48-50]) keresztezett  $\beta$ -réteggént azonosítottak. Eszerint mind az  $A\beta_{1-40}$ , mind az  $A\beta_{1-42}$  peptid egy sóhíddal (Asp<sup>23</sup>-Lys<sup>28</sup>) stabilizált U-alakú konformációt vesz fel, az egyes szálak pedig egymás mellé rendeződve hidrofób kölcsönhatásokkal összetartott  $\beta$ -réteget képeznek, melyekből kettős alakít ki egy csavart szál as aggregátumot. Ezeknek a protofibrillumoknak a további rendeződése alkotja az érett amiloid fibrillumot, mely jellemzően 5-15 nm vastag és akár több  $\mu$ m hosszúságú, csavarodó vagy sima, nem elágazó szalagformával rendelkezik [51] (**2.A ábra**).

Nemrég leírtak az U-forma mellett egy másik konformációt is, ez az S-alak [50]. Két ilyen peptidszál a keresztezett  $\beta$ -rétegben kettős lópatkó-formában képes összeállni, számos intra- és intermolekuláris kölcsönhatás által stabilizálva. Az S-konformáció kialakulását replika-kicserélődési molekuláris dinamikai számításokkal is alátámasztották.

Hogyan jut el az  $A\beta$  a natív, rendezetlen állapotból ebbe a magas fokú rendezettséget mutató  $\beta$ -szendvicses szuperszerkezetbe? Nyilvánvaló, hogy az aggregációs folyamatnak vannak a két végpont között átmeneti fázisai, melyben a peptid különféle tranziens formákat alakíthat ki. A köztes formákat összefoglalóan oligomereknek nevezzük, de a méret, alak, szervezethezesség függvényében az oligomerek csoportján belül különféle típusokat írtak le a kutatók. Így a szokványos oligomer  $A\beta$  ( $\alpha A\beta$ ) megnevezésén túl specifikusan azonosított globuláris formákra használatos az ADDL („amyloid derived diffusible ligand”) [52], a globulomer [53], az  $A\beta^*56$  [54] terminus, illetve egy fibrilláris köztes forma a protofibrillum [55]. A szférikus oligomerek jellemzően 2-10 nm átmérőjűek (**2.B ábra**), megtalálhatók a szinaptikus résekben [56, 57], a humán cerebrospinális folyadékban (CSF) [58], illetve a plakkok környezetében dúsulva. Habár többnyire  $\beta$ -réteges szerkezettel rendelkeznek, 2D IR-vizsgálatok kimutatták, hogy az oligomerek konformációja eltér a fibrillumban található egyes monomerek térszerkezetétől [59]. A protofibrillumok jellemzően 2-3 nm széles, max. 200 nm hosszú, fonalas struktúrák, melyek saját neurotoxikus hatását kísérletekkel is igazolták (**2.C ábra**).



**2. ábra** Az  $A\beta_{1-42}$  különböző aggregációs formái TEM felvételeken, uranyl-acetáttal történő festés után (saját felvételek) **A**: érett fibrillum, **B** oligomer, **C** protofibrillum



3. ábra Az Aβ aggregációs folyamata [51]

Az amiloid-aggregáció tehát egy olyan spontán folyamat, melyben az indukciós fázisban aggregációs góck képződnek, amelyeken beindul a monomerek fibrillumokká rendeződése. Az új fibrillumok további iniciációs felületként szolgálhatnak egy másodlagos aggregációs folyamathoz [60]. Az aggregációt egyrészt a jelenlevő aggregátumok is katalizálják, másrészt nem egyirányú folyamat, hanem a fibrilláris és a szolubilis Aβ formák közötti dinamikus egyensúly jellemzi, minek során feltételezhető, hogy a fibrillumok végpontjain megvalósuló leszakadás-beépülés révén tart a két fázis egyensúlyt egymással [61]. A biológiai mintákból izolált különféle, önmagukban viszonylag stabilnak tekintett oligomerek valószínűleg szintén dinamikus egyensúlyban állnak a fő fibrillumképzési folyamattal (3. ábra).



### 2.2.2.3 Az aggregációs formák biológiai hatása

Vitán felül áll, hogy az AK patológiájában az A $\beta$  központi szerepet játszik. A plakkok összetételének megismerésével elterjedté vált az a nézet, hogy a kór okozója az aggregált A $\beta$ , ezért egyrészt ennek az agyból történő eltávolítása, másrészt képződésének szabályozása, az aggregáció megakadályozása hatékony kell legyen terápiás szempontból. A biológiai evidenciára alapozva definiálta John Hardy és Gerald Higgins 1992-ben az AKH-t [2], ami egyértelműen az A $\beta$  aggregációjával keletkező plakkokat jelöli meg az AK patológia okozójaként, míg a többi jellemzőt, azaz a neurofibrilláris kötegek megjelenését, a sejtpusztulást, a vaszkuláris diszfunkciót és a demenciát mind a plakkok által kifejtett hatás következményének tartja. Mintegy tíz évvel később kezdődött el az a folyamat, amelyben a plakkok helyett az aggregáció korábbi fázisainak kulcsszereplőit kezdték behatóbban vizsgálni. Erre olyan ellentmondásos eredmények miatt volt szükség, amelyek feltárták, hogy a plakkok megjelenése és az AK fellépése között nincs egyértelmű korreláció; *post-mortem*, majd később pozitronemissziós tomográfia-számítógépes tomográfia (PET-CT) vizsgálatok bizonyították, hogy AK-ként diagnosztizált demencia előfordulhat plakkok nélkül is, illetve, hogy demenciával nem diagnosztizált emberek agyában is kimutathatók plakkok. A jelenlegi álláspont szerint a plakkokat két fő csoportba soroljuk, megkülönböztetünk „aktív”, toxikus plakkot, melyből az aggregáció-disszociáció dinamikus egyensúlya révén képződhetnek toxikus protofibrillumok és oligomerek, illetve „kiégett”, nyugalmi állapotba jutó plakkot, mely a szervezetben egyfajta védelmi stratégia eredményeként alakul ki. Ez utóbbi esetben a proteotoxicitás ellensúlyozására, a lebontásnak ellenálló szerkezetű A $\beta$  egy elkülönült depóba kerül, így feltehetően nem okoz további kárt.

Az izolált A $\beta$  oligomerekkel végzett számos biológiai kísérlet feltárta, hogy ezeknek az aggregációs formáknak jelentős citotoxikus hatása lehet, ami magyarázhatja az AK kialakulását. Az oA $\beta$  befolyásolja a hosszú távú potenciációt (LTP), ami a memória- és tanulási folyamatok egyik elektrofiziológiai alapfolyamata [52]. Olyan kísérletekben, melyekben a fibrilláris és az oligomer aggregátumot tartalmazó biológiai minták hatását vizsgálták, az oA $\beta$  mutatott nagyobb mértékű neurotoxicitást, ami szinaptikus diszfunkcióhoz, végül sejthalálhoz vezetett [62].

Az oligomerekkel kapcsolatos eredmények egy paradigmaváltást tettek szükségessé a AKH-t illetően. 2002-ben Hardy maga egészítette ki korábbi elméletét az oligomerekkel [3], és valószínűsítette, hogy nem az aggregációs folyamat végeredménye, hanem maga a folyamat, illetve a közben keletkező oligomerek lehetnek felelősek a kór kialakulásáért. Ez a változtatás határozta meg a következő évtizedre az uralkodó gyógyszerkutatói irányokat, melyeket egy későbbi fejezetben tárgyalok.

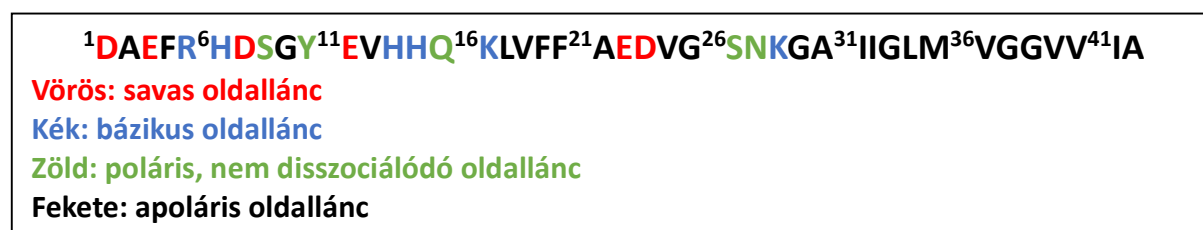
### 2.2.2.4 Szintetikus A $\beta$ alkalmazása biológiai vizsgálatokban

Az 1990-es évek elején az AK kutatásának komoly lendületet adott az A $\beta$  szekvenciájának azonosítása, illetve ezt követően a peptid szintetikus előállítása. Az A $\beta$  aggregációjának feltérképezésével központi kérdéssé vált, hogy a szintetikus A $\beta$ -ből előállítható minták használhatóak-e biológiai modellvizsgálatokban, azaz, hogy a szintetikus peptid által kialakított konformációk biológiai hatása megegyezik-e a biológiai mintákból izolált oligomerekével. Az egyezést több csoportnak is sikerült bizonyítania. Szintetikus és AK-s agymintából vizes fázisú extrakcióval izolált oA $\beta$  formák szerkezeti azonosságot mutattak [63], és mindkét forma képes volt állatmodellekben neuronális diszfunkciót okozni, befolyásolta a szinaptikus plaszticitást, a tanulási és memóriefolyamatokat [64, 65].

Az AK legjellemzőbb tüneteit reprodukáló modellek létrehozása és validálása a területen folyó gyógyszerkutató egyik alapfeladata. Egy gyógyszerjelölt molekula kémiai jellemzése,

esetleges fizikai-kémiai vizsgálatokban történő vizsgálata, illetve viselkedésének számítógépes eljárásokkal történő modellezése mellett biológiai rendszerekben is tesztelésre kerül. A neurodegeneratív betegségek összes tünetét reprezentáló kísérleti modellt természetesen nem lehet felállítani, ezért a kísérletek tervezésekor szükség van a modellalkotás irányát meghatározni. Élőállatos modellrendszer alkalmazása esetén több szempontot is figyelembe kell vennünk. A konvencionális vizsgálati módszerek általában patkány vagy egér egyedeket alkalmaznak, azok olcsósága, viszonylag kis mérete, könnyű kezelhetősége és szaporíthatósága miatt. Bár az ezekben a modellekben mért eredmények átvihetőségét a humán patológiára számos alkalommal megkérdőjelezzük, sajnos jelenleg nem rendelkezünk olyan élőállatos kísérleti rendszerrel, amely az előbbieken felsorolt előnyök mellett a humán patofiziológiai folyamatokat pontosan és hiánytalanul reprodukálni tudná. A genetikai módosítások alkalmazása ezekben az állatmodellekben egyfajta köztes megoldást szolgáltat. A transzgén állatmodellekben célzott molekuláris folyamatok indíthatók, vagy éppen blokkolhatók, akár olyanok is, amelyek csak a humán egyedre jellemzőek. Azonban a biológiai környezet továbbra is az állati szervezet által biztosított, ahol a módosításra adott sejtszintű válaszreakciók továbbra is eltérhetnek az emberi szervezetet jellemző folyamatoktól. További probléma, hogy a transzgén állattörzsek felhasználását számos nehézség terheli. Alkalmazásuk szigorú engedélyekhez kötött, szaporításukra csak minősített laboratóriumokban nyílik lehetőség, ezért meglehetősen drágák. Sok esetben a genetikai módosítás az állatok élettartamára és szaporodóképességére is kihatással van, ami gátat szabhat az állatok nagy mennyiségben történő felhasználásának, az időhatékony kísérlettervezésnek és végrehajtásnak. Az AKH-ra alapozott gyógyszerfejlesztésben ezért vonzó lehetőség lehet olyan állatmodellek alkalmazása, melyekben a genetikai módosítás helyett az  $A\beta_{1-42}$  peptidet az állat agyának megfelelő területére célzottan juttatjuk be, így váltunk ki az AK bizonyos patofiziológiai folyamatait reprodukáló hatást.

Az  $A\beta$  egy viszonylag könnyen, standard szintetikus kémiai eljárásokkal előállítható peptid, ezért egy bonyolult fehérjéhez képest kisebb anyagi ráfordítással, megfelelő időhatékonysággal, nagy mennyiségben lehet szintetizálni. A konvencionális szilárd fázisú szintézis metodikájának alkalmazása azonban elővigyázatosságot igényel. Az  $A\beta_{1-42}$  a kísérletekhez leggyakrabban használt szekvencia, ezt tekintjük alapszekvenciának (**4. ábra**).



#### 4. ábra Az $A\beta_{1-42}$ szekvenciája

A szekvencia elemzése alapján a peptid N-terminálisa túlnyomóan hidrofil oldalláncú aminosavakból áll, míg a C-terminálisa jellemző a hidrofób karakter. Ez az amfipatikus felépítés, illetve a hidrofób részhez rendelhető magas önrendeződési hajlam már a szintézis során nehézségeket okoz. A klasszikus *terc*-butil-oxikarbonil- (Boc-) vagy 9-fluorenil-metoxikarbonil- (Fmoc-) kémián alapuló szintézis esetén a hasítás körülményei között a savas oldalláncok is protonálódnak, az elegyben a peptid koncentrációja viszonylag magas, így a hidrofób C-terminális felőli molekulareszek rendeződésével elindul az aggregáció. A nyers szintetizált peptidből egy nehezen oldódó, aggregált forma keletkezik, amelyből a kívánt szekvencia további vizsgálatokra alkalmas tisztaságban történő előállítására egyedi technikák

kidolgozását teszi szükségessé. Az 1990-es évek elejétől terjedt el a szintetikus A $\beta$  alkalmazása biológiai kísérletekben, azonban a felhasználók hamar szembesültek a peptid előnytelen tulajdonságaival. Fiziológias pufferoldatokban a szintetikus peptid nagyon rosszul oldódik, a feldolgozás során kialakult aggregátumok inhomogén mintaoldatot képeznek. A peptid biológiai aktivitása esetlegessé válik, a különböző sarzsok esetében jelentős eltérést mutathat, így a mérési eredmények nehezen reprodukálhatók. A problémák megoldására különféle stratégiák születtek. Erre példa a csoportunk által az A $\beta$  peptidek szilárd fázisú szintézisére kidolgozott eljárás, melyben az egyes aminosavak kapcsolási lépéseiben az oldószer (DMF) 10 V/V% anizolt tartalmazott, ami megakadályozta a hidrofób oldalláncok kapcsoláskor bekövetkező asszociációját, így elősegítette az acilezést, növelte a kapcsolási hatékonyságot [66].

Az aggregálódó, problémás szintézisű anyagok előállításának optimalizálására tett különféle kísérletek magukban foglalták speciális oldószerek [67], vagy kaotróp sók alkalmazását [68], emelt hőmérsékleten történő szintézist [69], polietilénlikollal graftolt, vagy abból készülő hordozó alkalmazását az SPSS során [70, 71], illetve a peptid gerinc speciális védelmét a nemkívánt másodlagos térszerkezet kialakulásának megakadályozására [72, 73]. Ezeknek az eljárásoknak egyike sem tudta azonban kiküszöbölni a tisztítási körülmények között bekövetkező aggregátum-képzés okozta problémákat.

A megoldást egy kémiai módosítás jelentette, mellyel az eredeti szekvencia helyett egy prekursor peptid szintézise vált lehetővé. Sohma, [74], Carpino [75] és Dos Santos [76] egymástól függetlenül leírta egy olyan A $\beta$ -peptid szintézisét, melyben a konvencionális Fmoc-protokollt alkalmazva, a 26-os pozícióban levő Ser-t Boc-Ser-OH formában építették be, majd a szabad oldalláncot acilezték a soron következő Gly-nel. Ily módon egy észterkötést alakítottak ki, ami a szintézis elvégzése és a termék gyantáról történő hasítása után is jelen volt a szerkezetben. Ezt a formát nevezték izopeptidnek, vagy „switch” peptidnek. Az észterkötés és a Ser<sup>26</sup> szabad aminocsoportja csökkentette a peptid aggregációs hajlamát mind az előállítás, mind a tisztítás során. A biológiai kísérletekben történő felhasználást az teszi lehetővé, hogy a peptid egy O $\rightarrow$ N acilvándorlás révén, a közeg pH-jától függő sebességgel átalakulhat a konvencionális szekvenciává, ami utána bioaktív aggregátumokat képezhet. Azonban a szintézishez alkalmazott Fmoc-metodikában gyakran jelentkezik a szekvenciától függően elégtelen deprotektálás [77, 78], illetve a hasításkor esetlegesen felléphet diketo-piperazin képződés, aminek következtében az észter-kötés hidrolízisének valószínűsége megnő [79]. Az izo-A $\beta$  szintézisének optimalizálásával azonban megnyílhat a lehetőség egy biológiai kísérletekhez is előnyösebben alkalmazható peptid hatékonyabb előállítására.

Az izo-A $\beta$  alkalmazása esetén szintén feladat a peptid aggregációs tulajdonságainak feltérképezése a biológiai kísérletek körülményei között. A különféle mintapufferek, tenyésztő médiumok változatos összetétellel rendelkeznek. Közös jellemzőjük, hogy a fiziológias körülmények reprodukálása érdekében, meghatározott koncentrációban oldott ionokat (pl. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>) tartalmaznak. Az A $\beta$  élő szervezetben történő aggregációja tehát ezen ionok jelenlétében zajlik. Közismert, hogy a különféle ionok az aggregációs folyamatokat nagy mértékben befolyásolják [80]. A Hofmeister effektus a különböző ionok kozmotróp/kaotróp hatását írja le. Az effektus szerinti beosztás az ionok hatását a Na<sup>+</sup> és Cl<sup>-</sup> ionokéhoz hasonlítja [81]. A kozmotróp ionok stabilizálják a fehérjék térszerkezetét, ezzel viszont csökkentik azok oldhatóságát, tehát nagyobb precipitáló képességgel rendelkeznek, mint a Na<sup>+</sup> és Cl<sup>-</sup> ionok. A kaotróp ionok ezzel szemben elősegítik a fehérjék oldódását, a protein konformációját vizes oldatban destabilizálják, rendezetlenebbé teszik, ami az oldhatóságot növeli. Ez a beosztás a

globuláris fehérjék viselkedésére érvényes, a béta-redős szerkezetű A $\beta$  fibrillumok esetében a különféle sókkal végzett vizsgálatok más sorrendet eredményeztek a kaotróp/kozmotróp hatás szempontjából, illetve az ionok a fibrillumok szuperstruktúráját is befolyásolták [80]. Kimutatták, hogy A $\beta_{1-40}$  peptid esetében a legerősebb precipitáló hatással a Mg<sup>2+</sup> ion rendelkezik, igaz, a fiziológiás értéket többszörösen meghaladó 0,5 M-os koncentrációban alkalmazva. Más tanulmányok szerint viszont a Ca<sup>2+</sup> ionok a fiziológiás koncentrációt megközelítő mennyiségben (2 mM) jelentősen felgyorsítják az A $\beta_{1-42}$  aggregációját [82, 83]. Mivel ezek az ionok fiziológiás körülmények között mindig jelen vannak a folyadéktérben, az AK-ban bekövetkező A $\beta$ -aggregáció ezen ionok ráhatásával valósul meg. Így megválaszolandó az a kérdés, hogy az izo-A $\beta$  aggregációja során ezen ionok hatása azonos módon érvényesül-e, vagy mutatkoznak esetleg eltérések a peptid egyedi kiindulási konformációja miatt.

### 2.2.3 Az A $\beta$ oligomer, mint gyógyszerfejlesztési célpont

Az AKH fejlődésével egyre inkább megerősödött az A $\beta$  oligomerek központi szerepe az AK patológiájában. Az APP túlnyomó része a sejten belül a Golgi-apparátusba transzportálódik, majd innen a lizoszómákba, illetve az ER MAM-ba kerülve, az amiloidogén lebontási úton intracelluláris A $\beta$ -t képez [32]. Így már az AK kezdeti fázisában feltételezhető az intracelluláris oligomerképződés, ezért kézenfekvő kutatási cél lehet azon partnerek feltérképezése, melyek az oligomerekkel kölcsönhatásba lépve a patológia kialakulását eredményező folyamatokat indíthatnak el. Ilyen irányú vizsgálatokat végezhetünk célzott mechanizmuskutatással, de ma már rutinszerűen alkalmazottak olyan nagy kapacitású, molekulakészletekkel operáló vizsgálati módszerek is, melyekkel akár korábban nem feltételezett, új irányokba mutató eredményeket is nyerhetünk. Ez az interaktóma-kutatás, mely során a sejten belül kialakuló fehérje-fehérje kölcsönhatásokat rendszerezzük a kívánt szempontok alapján. Bernard Jacq csoportja alkalmazta először ezt a módszert [84], amely aztán robbanásszerűen terjedt el, köszönhetően a bioinformatika fejlődésének. Egy adott célmolekula teljes fehérje-interaktomjának feltérképezéséhez szükség van tehát olyan nagy áteresztőképességű eljárásra, amellyel időhatékonyan vizsgálhatóak a molekuláris kölcsönhatások, akár több tízezres nagyságrendben. A feltérképezett fehérjék ontológiai besorolása, a kapcsolatokból kiépíthető interaktóma-gráf kialakítása a bioinformatika feladata. A leggyakrabban alkalmazott élesztő kettős-hibrid metodika (Y2H) mellett lehetőség van olyan nyomtatott chippek beszerzésére, melyeken adott fehérjekészlet egyes tagjait egy inkubációs lépés során kölcsönhatásba vihetjük a célmolekulánkkal. Ha ez szintén egy fehérje, akkor a specifikus kötődést fluoreszcens festékekkel jelölt specifikus antitesttel történő kezelést követően detektálhatjuk. Az A $\beta$  oligomerek vizsgálhatók ilyen kísérletben, a kölcsönható partnerek azonosítása hozzájárulhat a különféle folyamatokban betöltött funkcióik megismeréséhez. Azonban az interaktóma felderítésére irányuló, nagy áteresztőképességű kísérleteket sokan bírálják amiatt, hogy a kölcsönhatások a leegyszerűsített kísérleti rendszerben nem egyeznek meg azokkal, melyek a sejten uralkodó körülmények között fellépnek. Az expresszált proteinek nem feltétlenül rendelkeznek a szükséges, fiziológiásan megvalósuló poszt-transzlációs módosításokkal, konformációjuk pedig egyrészt a szilárd hordozóhoz való rögzítés, másrészt membránfehérjék esetén a megfelelően struktúrált biológiai környezet hiányában valószínűleg nem egyezik meg a natív konformációval. A fentiek miatt az ilyen kísérletekkel nyert eredményeket mindenképpen szükséges további funkcionális vizsgálatokkal igazolni.

Az A $\beta$  oligomerek intracelluláris fehérjékkel történő kedvezőtlen kölcsönhatása feltételezetten megakadályozható lenne egyrészt oly módon, hogy az oligomert „becsomagoljuk”, csökkentve ezáltal kötődési potenciálját, másrészt elősegítjük a lebontását

az immunrendszer aktiválásával. Az oligomerek „becsomagolása”, ezáltal fehérjekölcsönhatások kialakításra alkalmas felszínük maszkolása egy lehetséges terápiás megközelítés, mivel így káros biológiai hatásuk csökkenthető.

Az A $\beta$  peptidhez szelektív affinitást mutató molekulákkal foglalkozó kutatások az AKH elterjedése után teljesedtek ki. Nagy számú nem peptid-típusú, a  $\beta$ -réteges szerkezettel kölcsönható molekulát azonosítottak a kutatók, melyek vagy ismert bioorganikus vegyületek, vagy azok kémiai módosított változatai [85]. Ezek között előfordulnak olyan molekulák, melyek más célú terápiás hatóanyagok, és alkalmazásuk AK-ra valószínűleg kiterjeszhető, míg a vegyületek másik, népeesebb családjába olyan biomolekulák és származékaik tartoznak, melyek eddig még nem törzskönyvezett, AK-ban feltehetően alkalmazható hatóanyagok. Az első csoportra példa a rifampicin [86], míg az utóbbi csoport egyik legismertebb képviselője a kurkumin, mellyel klinikai vizsgálatokat is folytattak [87].

Az A $\beta$ -val kölcsönható peptid-típusú vegyületek az AK terápiájára irányuló kutatások egyik népszerű irányát alapozták meg. Az alapgondolat az A $\beta$  aggregációjáért felelős szekvenciareszletek egymással való kölcsönhatásának blokkolása, mely az aggregáció kinetikájának módosulásához, vagy akár gátlódásához vezet [85]. Az alapelvet Tjernberg közölte [88], aki elsőként mutatta ki a A $\beta$ <sub>16-20</sub> fragmens (KLVFF) módosított formájának (Ac-QKLVFF-amid) kölcsönhatását A $\beta$  fibrillumokkal, ami konkrét biológiai hatásban megmutatkozó haszonnal is járt. Az alapszekvenciában D-aminosav-cserékkel előálló származékok nagyobb enzimikus stabilitás növekedését eredményezte [89], a KLVFF „felismerő” egység kiegészítése polikationos oldallánccal („szerkezetromboló egység”) pedig tovább növelte az aggregációt módosító és a neuroprotektív hatást [90]. Az aminosavak N-metil származékainak alkalmazása az alapszekvenciában megnövelte a szerkezet-törő hatékonyságot és a molekula oldékonyságát is [91]. A KLVFF peptiddel kapott eredményekből később egy egész kutatási irány nőtt ki, a béta-réteg törő („beta-sheet breaker”, BSB) elméletre alapozva [92, 93]. Ilyen vegyületek tervezése és hatásmechanizmusuk vizsgálata határozta meg saját csoportunk fő kutatási profilját is a 2005-2015 közötti időszakban.

Az A $\beta$ -t felismerő molekulák azonosításának és terápiás alkalmazásának egyik legnagyobb kihívása a szekvencia variabilitása és a belőlük felépülő oligomerek szerkezetét és méretét egyaránt jellemző sokféleség. Az oligomerek aktív felszínén a kötőhelyek ismétlődése érvényesülhet, mely lehetőséget nyújthat a kismolekulás megközelítésen túllépve olyan konjugátumok alkalmazására, melyek egyidejűleg a kontaktfelszín több pontján is blokkolják az oligomerek kölcsönhatását. A kötőszekvenciák kialakítására a természetes aminosavakon kívül nem természetes aminosavakból felépülő, önrendező biomimetikus polimereket, foldamereket is alkalmazhatunk. A fehérje-fehérje kölcsönhatások modulálása foldamerekkel régóta ismert [94, 95]. Szerkezetük célzott tervezésével olyan molekulák szintetizálhatók, melyek a konvencionális antitesteknél kisebb méretűek, előállításuk ezért olcsóbb, a szerkezet finomhangolásával a fehérje-foldamer kölcsönhatás erőssége szabadon beállítható, míg farmakokinetikai tulajdonságaik kedvezőbbek lehetnek [96-98]. A foldamerek megfelelő alapvázakhoz történő konjugálásával új típusú A $\beta$ -felismerő szerkezeteket nyerhetünk.

#### 2.2.4 Az AICD-Fe65 kölcsönhatás, mint potenciális célpont

Az APP-ből a RIP révén mindkét lebontási útvonalon keletkezik az AICD fragmens. Mérete a  $\gamma$ -szekretáz alternatív hasítási helyeinek függvényében 50-59 aminosav között változhat. Az AICD C-terminálisán egy erősen konzervált YENPTY-motívum található [99], mely specifikus fehérjével való kölcsönhatása révén az AICD-t fontos biológiai funkciókkal ruházza fel. Ezek alapján az AICD szerepet játszik a szignáltranszdukciós folyamatokban, az APP-transzportfolyamataiban és lebontásában, illetve a transzkripció aktivitást meghatározó

nukleáris szignalizációs utak szabályozásában [100]. Az APP-t érintő molekuláris folyamatok következményeként az AICD kölcsönhatása a fehérjékkel az A $\beta$  termelődését is befolyásolja [51].

Az AICD interakomjának tagja két fehérje, melyek számunkra szerkezeti és gyógyszerfejlesztési szempontból lettek érdekesek. Az egyik az Fe65, mely egy háromtagú fehérjecsaládba tartozik (Fe65, Fe65L1 és Fe65L2). Ez a fehérje kiemelkedő szerepet játszik az APP lebontásában és sejten belüli transzportjában, közvetlenül befolyásolva az A $\beta$  képződést [100-102]. A neuronokban expresszálandó Fe65 szabályozza az aktin citoszkeletonon belüli újrendeződését is, ennek következtében hatással van a szinaptikus plaszticitásra, a szinapszisok képződésére, a dendrittüskék kialakulására, mely folyamatok a memóriarögzülés és tanulás molekuláris alapját képezik [101, 103, 104]. A fehérje-kölcsönhatásokban az Fe65 három jellemző doménja vesz részt: az N-terminálison található WW-domén, és két foszfortirozin-kötő domén (PTB1 és PTB2). Mindhárom erősen konzervált a gerincesekben. Az AICD-Fe65 kölcsönhatást az Fe65 Thr<sup>668</sup>-on bekövetkező foszforilációja tovább erősíti [105].

Az Fe65 fontossága egyértelműen bizonyított, ellenben pontos hatása az A $\beta$  mennyiségére ellentmondásos az irodalmi adatok alapján, aminek valószínűsíthető oka az alkalmazott kísérleti modellek eltérése lehet [100, 102].

Fe65-tel transzfektált különféle sejt vonalakban (humán embrionális vese sejt (HEK293), humán H4 neuroglióma sejt, Madine-Darby kutya vese sejt (MDCK)), az Fe65 túltermelődése növelte az A $\beta$  termelést [106-109]. Ezzel egybeesően az Fe65-öt kódoló APBB1 gén csendesítésével a H4 sejt kultúrában elérhető volt a termelt A $\beta$  mennyiségének csökkentése [110]. Hasonló eredményt sikerült elérni primer kortikális neuron kultúrán is [111]. Az Fe65-A $\beta$  közötti ilyen irányú relációt tovább erősíti az a kísérlet is, melyben Fe65/Fe65L1 génkiütött egértörzsben mérték csökkent endogén A $\beta$ -szintet a kontrollcsoporthoz képest [112, 113].

Ezeknek a kísérleteknek ellentmondanak más csoportok eredményei. APP695-tel transzfektált HEK293 sejt vonalon az Fe65 ko-transzfekciója és túltermelése az A $\beta$ <sub>1-40</sub> és A $\beta$ <sub>1-42</sub> mennyiségének csökkenését okozta [114]. Ugyanitt azt is sikerült kimutatni, hogy az APP Thr<sup>668</sup>→Glu<sup>668</sup> mutációja a két A $\beta$  peptid szintjének újbóli növekedését okozta, valószínűleg a 668-as pozícióban történő foszforiláció csökkentésével, ezáltal az Fe65-APP kölcsönhatás gyengítésével. Ezt az eredményt hFe65/APP(swe) kettős transzgén egértörzs és APP-t önmagában expresszáló egértörzs összevetésével sikerült alátámasztani. Az Fe65 és APP túltermelődése a csak APP-t túltermelő állatokhoz képest csökkentette a teljes A $\beta$  és az A $\beta$ <sub>1-42</sub> szintjét, illetve a plakkok számát is az állatokban [102]. Az ellentmondások tisztázása mindenképpen további kutatásokat igényel. Ezzel együtt az APP lebontási folyamatainak, illetve az APP/AICD specifikus fehérjekölcsönhatásainak modulálása a vázolt kapcsolódási pontok miatt alternatív terápia lehetőségét nyújthat az AK kezelésére.

A WW doménre általánosan jellemző a kompakt, három szálú  $\beta$ -redős konformáció, amely lineáris peptid- és fehérjestruktúrákkal gyakran lép kölcsönhatásba [115, 116]. A WW-doméneket tartalmazó fehérjékkel kapcsolatos eredmények a csoportunk által szintetizált vegyületcsalád hatásmechanizmusának felderítéséhez nyújtottak alapot. Ismeretes, hogy WW-doménekhez a prolin-gazdag szekvenciák specifikus kötődést mutatnak [117, 118], a közepes erősségnek megfelelő, alacsony mikromoláris tartományba eső  $K_d$  értékkel [115, 119]. Az Fe65 WW-doménje számos fehérje prolin-gazdag szakaszával kölcsönhatásba léphet [101, 120-122], melyek közül egyes fehérjék befolyásolhatják az Fe65 által szabályozott transzkripció folyamatokat (SET [123]), kinázok aktivációját, az aktin polimerizációját (Mena [124, 125]), és az A $\beta$  szintézisét is (GSK3 $\beta$ , c-Abl kináz [126]).

Az AICD interaktomjában azonosítható másik, WW domént is tartalmazó fehérje a NIMA-kölcsönható peptidil-prolil cisz-transz izomeráz 1 (Pin1), melynek expressziója AK-ban csökkent mértékű. Szerepe a foszforilált AICD cisz-transz izomerizációjának szabályozása, mely hatással van az A $\beta$  szintjére is [127]. Emellett befolyásolja a Tau hiperfoszforilációját, így a neurofibrilláris kötegek képződését is [128]. A Pin1 visszaállítja a Tau mikrotubulus-kötő képességét a Tau foszfo-Thr<sup>668</sup>-Pro motívumához való kötődés által [116]. Az AICD-Pin1 kölcsönhatás az utóbbi N-terminálisán található WW-doménon keresztül valósul meg.

### 2.2.5 Az öregedő agy: a felnőttkori neurogenesis zavara

A neurogenesis sokáig a fejlődő központi idegrendszer egyik alapfolyamatának tekintették. Az 1990-es években kezdtek gyűlni olyan kísérleti bizonyítékok [129], melyek nyomán bizonyítást nyert és mára általánosan elfogadottá vált a humán felnőttkori neurogenesis létezése. Eszerint a kifejlett emberi központi idegrendszer megfelelő területein (a szubventrikuláris zónában (SVZ) a laterális ventrikulumok mentén, és szubgranuláris zónában (SGZ) a HC-ban) neuronok képződhetnek. Az SVZ-ben található neuronális őssejtekből (NSC-k), melyek gliális fibrilláris savas proteint (GFAP-t) expresszáló radiális glia sejtek, képződnek a differenciációt támogató szöveti mikrokörnyezet hatására neurális progenitor sejtek (NPC-k), melyekből utána neuroblasztómák keletkeznek [130-132]. A sejtek differenciációja és vándorlása a rosztális migrációs ösvényen (RMS) a szaglógumóba (OB) irányul, miközben jelentős morfológiai változásokon mennek át. Az OB-ban különböző növekedési faktorok hatására interneuronokká differenciálódnak, lekapcsolódnak az RMS-ről és típusuknak megfelelően integrálódnak a megfelelő sejt környezetbe [133]. Az SGZ-ben keletkező éretlen neuronok a *girus dentatus* (DG) belső granuláris sejtrétegébe vándorolnak, ahol bekapcsolódnak a meglévő neuronális körökbe [134], kezdetben az ott fellépő GABA-erg, majd glutamaterg szinaptikus impulzusoktól aktiválva. A hosszú érési folyamat során az új neuronok elektrofiziológiai tulajdonságai egyre inkább megközelítik a már meglévő neuronokét. Az egyes érési fázisok során a sejtek felépítésüktől függően különböző neuronális marker vegyületeket expresszálnak, melyek segítségével a neurogenesis során képződött sejtek mennyiségének változása immunhisztokémiai módszerekkel detektálható. Az 5-bróm-2'-dezoxiuridin (BrdU) inkorporációs módszerrel az osztódó sejtek jelölhetőek a neurogenesis korai fázisában [135]. Ennek a módszernek hátránya, hogy nemcsak a neurogenesis, hanem pl. traumás sérülés következtében felerősödő sejtosztódás eredményeként keletkező sejtek is jelölődnek a detektáló molekulával, ezért a sejtek további karakterizálása is szükséges eredetük (felnőttkori neurogenesis vagy egyéb ok) felderítése érdekében. Az éretlen neuronális fázisban a sejtek „doublecortin” fehérjét (DCX) expresszálnak, míg az érett neuronokra a neuronális nukleáris protein (NeuN) expressziója jellemző. Ezeket a markereket használva a neurogenesis folyamatai különféle kísérleti modellrendszerekben jól követhetőek. A HC-ban keletkező neuronok, integrálódva a meglévő hálózatokba, jelentős szerepet játszanak a neuronális plaszticitás fenntartásában, aminek következménye a kognitív funkciókra, tanulási és memóriarögzülési folyamatokra gyakorolt pozitív hatás [136]. A neurogenesis számos külső és belső faktor befolyásolhatja, mint pl. a stressz, az öregedés, az immunrendszer, egyes szignáltranszdukciós folyamatok aktiválódása [137-139]. A felnőttkori neurogenesisnek a korrall járó változása emberben még mindig vitatott téma. Rágcsálókban már sikerült magának a folyamatnak a meglétét igazolni [135, 140, 141]. Egy tanulmány szerint, a fiatal felnőtt egerek releváns agyi területein már kb. 7-9 hónapos korukra jelentősen csökken a neurogenesis mértéke, ami kivédhető rekombináns sAPP $\alpha$  agykamrába történő adagolásával [142]. Hogy az emberi agyban a neurogenesis hanyatlása hasonló folyamatok által valósul meg, mint a rágcsálókban, még nem tisztázott. Mivel a proliferációs faktorok

expressziója a humán HC-ban a korral csökken, feltehetően az NPC-k keletkezése is korfüggést mutat [143]. Ezt támaszthatja alá az az eredmény, mely szerint az éretlen neuronok által expresszált DCX mennyisége is csökken a korral [143].

Mi történik, ha a természetes öregedési folyamatok helyett egy neurodegeneratív betegség veszi át az irányítást? *Post mortem* humán agyi minták összehasonlításával nyert adatok szerint míg egészséges személyben az aktív felnőttkori neurogenesis 90 éves korig bizonyíthatóan működik, AK-s egyénekben a betegség előrehaladásával korreláló progresszív neurogenesis-csökkenést lehet megfigyelni [144]. Egy másik tanulmány szerint az adatok összehasonlítását erősen befolyásolhatja, hogy a detektált NPC-k mennyisége már az egészséges emberekből származó mintákban is nagy mértékű varianciát mutatott. Mégis, eredményeik megerősítették a demencia súlyossága és a csökkenő neurogenesis közötti korrelációt, nem csak diagnosztizált AK-s esetekben, hanem az AK korai „előszobájának” tartott enyhe fokú kognitív károsodással („mild cognitive impairment”, MCI) rendelkező alanyoktól származó mintákban is [145]. Ezek alapján a felnőttkori neurogenesis zavarának megszüntetése ígéretes terápiás célpontul szolgálhat a demenciával járó kórképekben.

Kutatásaink szempontjából fontos eredmény, hogy az APP lebontási útjának elemei, mint az s-APP<sub>α</sub>, az s-APP<sub>β</sub>, az Aβ és az AICD mind hatással lehetnek az NSC-k sorsának alakulására, proliferációra, neuro- és gliogenezisre, sejthalálra [146]. A már említett s-APP<sub>α</sub>-t vizsgáló tanulmány mellett [142], TG2576 transzgen egérmodellben, mely az APP egy mutációs formáját expresszálja, már az állat fiatal korában kimutatható volt az NSC-k proliferációjának csökkenése, differenciálódási képességük elvesztése [147], bizonyítva az Aβ oligomerek káros hatását a neurogenesisre. Hasonlóan fontos eredmény annak a kimutatása, hogy az AICD az Fe65-tel és a Tip60-nal egy transzkripciós aktiválási komplexet képez, amely több olyan gén működését is szabályozza, amelyek a neurogenesisben szerepet játszanak (PTCH1 [148], Sox2 [149]). Ghosal [150] olyan transzgen egértörzsben, mely Fe65-öt és AICD-t együtt termelt, kimutatta a hippokampális neurogenesis folyamatainak jelentős visszaszorulását az állatokban. Ez az eredmény ígéretes kiindulási pontként szolgálhat olyan gyógyszerjelölt vegyületek alkalmazására, melyek az Fe65-tel való kölcsönhatás révén modulálják a patológias folyamatokat.

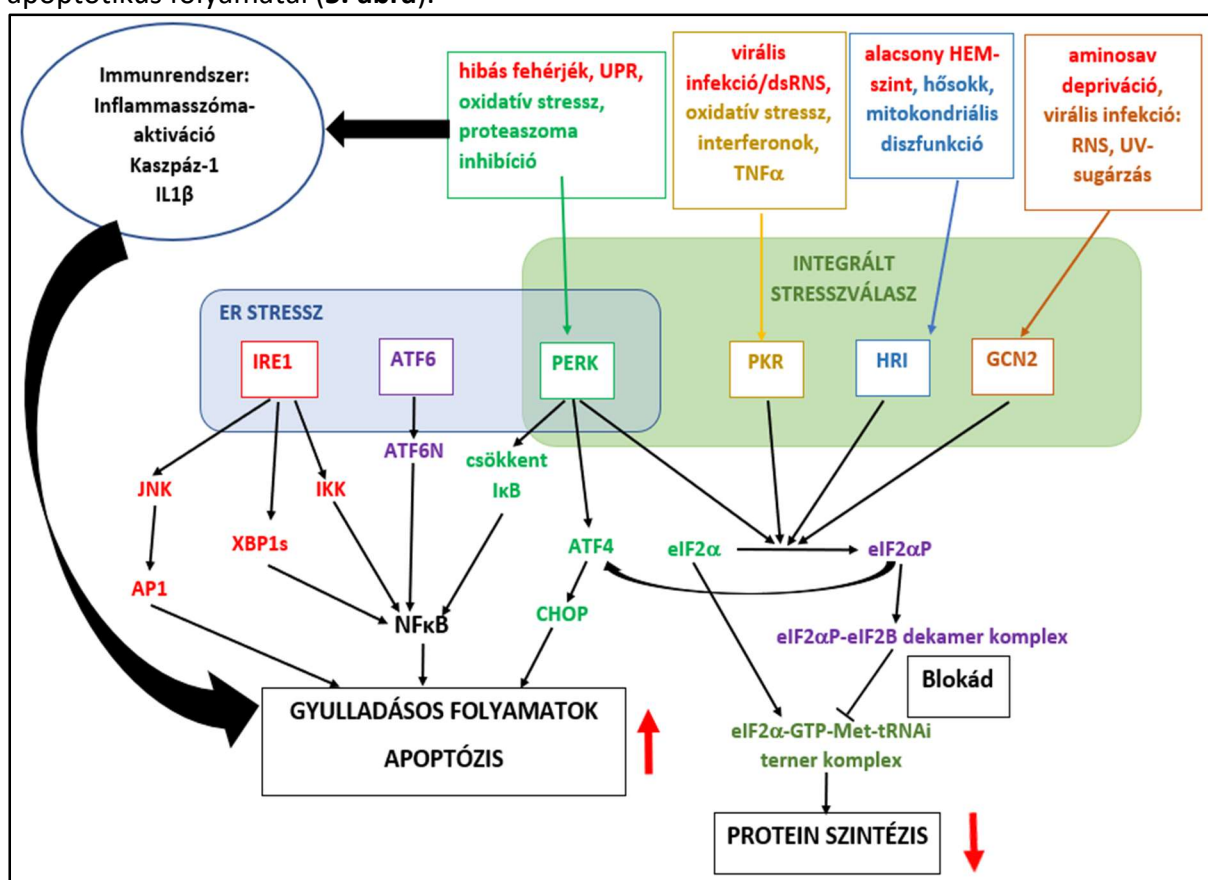
## 2.2.6 Neuroinflammáció és molekuláris stressz: a szigma-1 receptor szerepe a neurodegeneratív betegségekben

### 2.2.6.1. A neuroinflammáció mechanizmusa a neurodegeneratív betegségekben

A neurodegeneratív betegségek egyik közös patológiai jellemzője a központi idegrendszerben fellépő krónikus gyulladás. Hogy ez a folyamat oka, vagy okozója-e neuronpusztulásnak, még mindig vitatott kérdés. A betegség indulásakor az inflammációnak védő szerepe van a szervezetet ért számos károsító hatás ellen. Később viszont, ha a káros hatás nem szűnik meg, pl. a helytelen konformáció fehérjék állandó jelenléte miatt, a gyulladás krónikussá válik, ami már a sejtek halálát okozza. A betegségekhez társulva kiterjedt gliózis, azaz mikroglia és asztrocita aktiváció figyelhető meg. A mikroglia sejtjei a központi idegrendszer veleszületett immunrendszerét képező fagocitái, melyek az agy egészséges állapotának fenntartásáért felelősek. A nyugvó mikroglia sejtjei aktiválódás után gyorsan károsító, gyulladáskeltő (M1 fenotípusú) sejtekké alakulnak, melyek citokinek, kemokinek és szabadgyökök termelése révén neurotoxikus hatást fejtenek ki, amit azután folyamatosan fenntartanak [151]. A mikroglia sejtek másik csoportja neuroprotektív, javító szerepű (M2 fenotípusú) [152]. Nemrég felfedezték az agyban a mikroglia sejtjeinek egy harmadik fajtáját, ez az ún. sötét mikroglia, mely morfológiailag eltérő, hiperaktivizált és a neuronokkal a normálistól eltérő szinaptikus kapcsolatokat létesítő sejtekből áll [153]. A gliasejtek másik típusa, az asztrociták



központi szerepet játszanak az agyi homeosztázis fenntartásában, közelebről a vérkeringés szabályozásában, a neuronok energiaellátásában, a szinapszis-képzés befolyásolásában, illetve a sejtközi folyadék összetételének fenntartásában. A mikrogliahoz hasonlóan, az asztrocitáknak is leírták gyulladáskeltő (A1) és neuroprotektív (A2) alosztályait [152]. AK-ban *post mortem* mintákban kimutattak plakkokkal asszociált asztrocitákat, illetve bizonyították, hogy az asztrociták támogatják a BACE bioszintézisét, ezáltal kihatva az A $\beta$  szintézisére is [154]. Válaszul a sejtet érő zavaró hatásokra, az immunrendszer aktiválódása mellett két további molekuláris folyamat a fehérje-homeosztázis megváltozását okozza. A stresszor hatására bekövetkezik egy általános fehérjeszintézis-blokád, az ún. integrált stresszválasz („integrated stress response”, ISR), ami a stressz kiküszöböléséig tranzienst proteinszintézis-gátlódást okoz. Az ER-t érintő, rendezetlen fehérjék képződése által indukált stresszválasz („unfolded protein response”, UPR) pedig serkenti azok fiziológiás szerkezetének visszaállítását, illetve szükség szerint lebontását. Sikertelen helyreállítási kísérlet esetén az UPR révén aktiválódnak a sejt apoptotikus folyamatai (5. ábra).



5. ábra A sejtben aktiválódó ER stressz, ISR és a gyulladási folyamatok kapcsolata

Az ISR esetében 4 fő kináz, a kétszálú RNS-függő protein-kináz R (PKR), a protein kináz-szerű ER-kináz (PERK), a „general control nonderepressible 2” (GCN2) és a HEM-regulált inhibitor kináz (HRI) együttes, összehangolt hatása révén az eukarióta iniciációs faktor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) foszforilálódása gátolja az általános protein-szintézis folyamatokat [155]. Ezek között előfordulnak olyanok is, melyek stresszmentes helyzetben bizonyítottan a memória kialakulásáért, rögzüléséért felelős szinaptikus kapcsolatok kialakulását segítik elő. Az ISR révén a dendrittüskék kialakulása, pre- és poszt-szinaptikus fehérjék szintézise általánosan csökken, ami a neurodegeneratív betegségek esetében fellépő memóriaproblémák oka lehet [155, 156]. Ezt bizonyítja, hogy a közelmúltban egy ISRIB nevű vegyületet sikerrel alkalmazták az AK-

t modellező kísérleti rendszerekben a memória és a tanulás javítására [157]. A molekula a foszforilált eIF2 $\alpha$  proteinszintézist gátló hatását azzal tudja ellensúlyozni, hogy egy, a folyamatban alsóbb szinten szereplő fehérje, az eIF2B oligomerizációjának allosztérikus aktivátora, az eIF2B oligomerizáció pedig szükséges az eIF2 $\alpha$  proteinszintézist elősegítő aktiválódásához. Ez által a csökkent fehérjeszintézis helyreállítható, a memóriefunkciók javulnak.

Az ISR PERK eleme egyben az ER-stressz egyik fő aktivációs útjának iniciátora is. Az ER-stressz UPR-útján a PERK mellett az aktiváló transzkripció faktor 6 (ATF6) és a szerin/treonin-protein kináz/endoribonukleáz inozitol-függő enzim 1 (IRE1) szintje is megváltozik. Ezek a molekulák szignáltranszdukció révén olyan további folyamatokat aktiválnak, melyek vagy a hibás szerkezetű fehérje degradációjához, így a stresszfaktor megszüntetéséhez, vagy sikertelen aktiváció esetén apoptotikus folyamatok beindulásához és végső soron sejthalálhoz vezetnek. Az inflammáció ER-stresszhez és ISR-hez vezető hatása, illetve a stresszfolyamatok neuroinflammációt erősítő szerepe oda-vissza csatolásban működik, befolyásolásuk mindenképpen komoly terápiás jelentőséggel bírna.

#### 2.2.6.2 A szigma-1 receptor szerepe a neurodegeneratív folyamatokban

A központi idegrendszerben expresszáldó szigma-1 receptor (S1R) protein egy egyedülálló aminosav szekvenciával rendelkező (csak az élesztő szerin-izomerázokkal homológiát mutató [158]), nem G-protein-kapcsolt, nem ionotróp sejten belüli dajkafehérje az ER membránjában, aminek legfőbb szerepe a Ca<sup>2+</sup>-jelátvitel szabályozása. Történetileg korábban az opioid receptorcsaládhoz sorolták, egy olyan kísérlet eredményei alapján, melyben egy pszichotomimetikus anyag, az SKF-10,047 (N-allil-normetazocin) hatását nem tudták hozzárendelni az akkor már azonosított receptorcsaládokhoz [159]. Az S1R-t később az N-metil-D-aszparaginsav (NMDA) receptorcsaládba is besorolták, mert a fenilciklidin (PCP), amely az NMDA-receptorok egyik liganduma, kötődik az S1R-hez, az SKF-10,047 pedig az NMDA-receptorokhoz, azok PCP-kötőhelyén keresztül [160]. Radioaktív ligandummal végzett kötési vizsgálatok kimutatták, hogy a szigma-receptorok két alosztályba sorolhatók (S1R és S2R), melyek különböző ligandumokat kötnek, és különböző szöveti előfordulást mutatnak [161, 162].

A perifériális előfordulás [163] mellett a központi idegrendszer neuronjaiban, oligodendrocitáiban, ependimocitáiban, gliában megtalálható S1R sejten belüli dajkafehérjeként működik. Fő előfordulása az ER MAM-határfelülete [164]. Itt az S1R a kötő immunoglobulin proteinhez (Bip) kapcsolódva fordul elő, melynek szerepe az S1R transzlokációjának megakadályozása [165], illetve az ER-stressz indító elemeinek szabályozása. Stressz hatására a Bip Ca<sup>2+</sup>-függő módon diszszociál mind az S1R-ről, mind az ER-stressz indítófehérjéről, és lehetővé teszi azok aktiválódását. A Bip transzlokálódik a citoszolba, és itt hozzákapcsolódva a helytelen konformációjú fehérjékhez elősegíti azok lebontását az ER-aktivált lebontási folyamatokban. Az S1R közvetlenül az IRE1-hez kapcsolódva stabilizálja annak konformációját, lehetővé téve az aktivációját. A szabadabbá váló S1R hozzákötődik a MAM plazmamembránjában található ioncsatornákhöz, melyek modulálásával felerősödik az ER-ből a mitokondriumba irányuló Ca<sup>2+</sup>-áramlás. Az S1R az NMDA receptorok működését is elősegíti, egyrészt a Ca<sup>2+</sup>-szignalizáció befolyásolásával [166], másrészt az NMDA-receptor expressziójának növelésével [167].

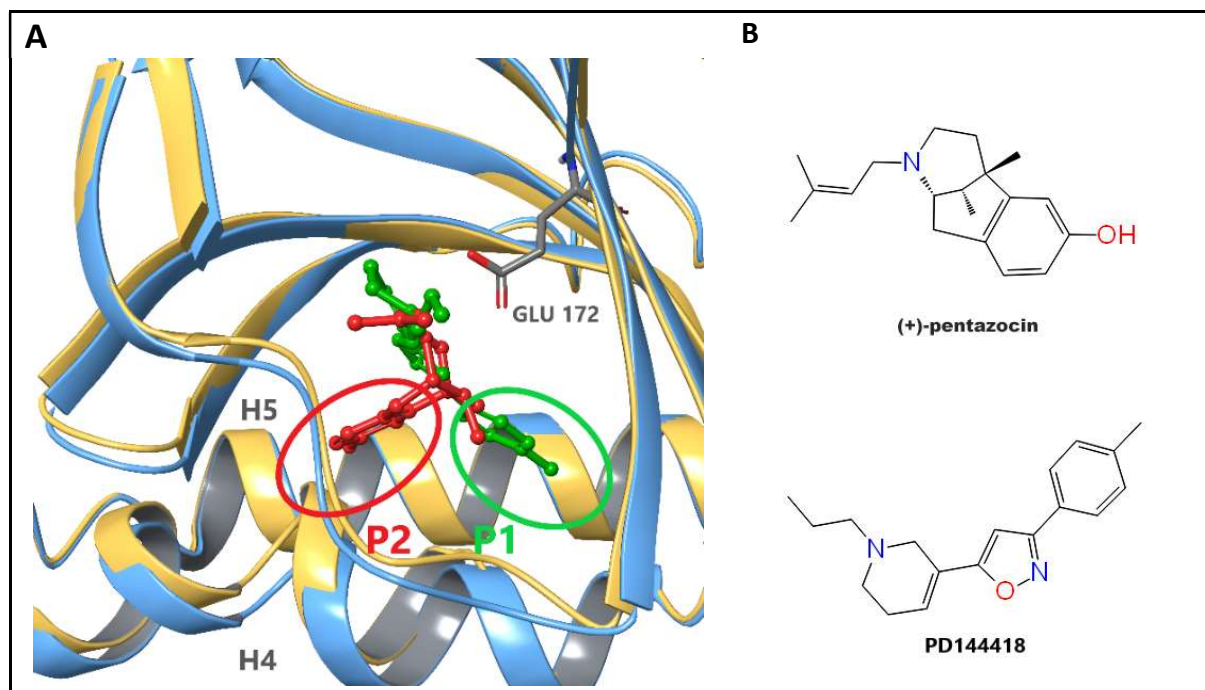
Az előbb részletezett biológiai folyamatok révén az S1R fontos szerepet játszhat az AK patomechanizmusában. Bizonyított, hogy az S1R genetikai polimorfizmusa összefüggésben áll a SAK kialakulásával [168], az S1R és APOE mutációinak bizonyos kombinációi megnövelik a SAK fellépésének valószínűségét [169]. AK-ban kimutattak csökkent S1R-expressziót [170,

171], S1R-génkiütött egérmodellben pedig bizonyos típusú, a memória-konzolidációban kulcsszerepet játszó dendrittüskék mennyiségének csökkenését figyelték meg [172].

Az S1R működését befolyásoló molekulák (modulátorok) biológiai rendszerekben kifejtett hatásának természetét nehéz egyértelmű biológiai válaszokra alapozva klasszifikálni. A vegyületek S1R-hez való kötődésének mérésére nem léteznek standardizált módszerek, agonista/antagonista jellegüket nemcsak inherens molekuláris tulajdonságaik határozzák meg, hanem az adott kísérleti rendszer felépítése, az alkalmazott biológiai preparátum összetétele is [173]. A konvencionálisan elfogadott osztályozás szerint S1R agonisták azon vegyületek, melyek élő állatot alkalmazó kísérleti modellben az S1R receptorra jellemző neurofiziológiai reakciókat indukálják, illetve olyan tünetegyüttest generálnak, melyet jellemzően az S1R túltermelődése okoz. A besoroláshoz általában az SKF-10,047 vegyület, mint első S1R-en ható molekula által kiváltott hatások szolgálnak viszonyítási alapként. Klasszikus S1R-agonistának számít a (+)pentazocin, a fluvoxamin, illetve a PRE-084, de ebbe a kategóriába sorolható endogén ligandum, az N,N-dimetiltriptamin (DMT) is [174]. S1R antagonisták azok a vegyületek, melyek önmagukban neurofiziológiai hatást nem váltanak ki, de képesek az agonisták által kiváltott hatást meggátolni, illetve az S1R-génhiányos fenotípusra jellemző tünetegyüttest okoznak. Antagonista pl. az NE-100, a BD-1047, az MR-309. Már ezekből a definíciókból látszik, hogy az osztályozásnak nincsenek egyértelműen definiált neurofiziológiai alapjai. Mégis, az irodalomban található eredmények általában az S1R receptor aktiválását okozó agonisták kedvező szerepét támasztják alá az AK-s modellekben [175-177].

A gyulladási folyamatok és az S1R működésének modulálása közötti összefüggés felállítása további bizonytalanságokkal terhelt. A perifériás gyulladás S1R agonistákkal történő kezelése az utóbbi években a COVID19 járvány miatt kiemelt jelentőségűvé vált, így előtérbe került a „drug repurposing”, azaz a már törzskönyvezett hatóanyagok terápiás spektrumának kiszélesítése révén S1R modulátorok COVID19-ben történő alkalmazásának tesztelése [178, 179]. Az agonista fluvoxamin esetében Rosen az ER-stressz IRE1-útján keresztül kifejtett hatást valószínűsíti [180]. Mindemellett a fluvoxamin az ATF4 (PERK út) transzlációjának aktiválása révén növeli az S1R expresszióját is [181]. Azonban ha figyelembe vesszük, hogy a stressz általi válasz indukciós fázisában az S1R aktivációja jellemző, a kialakuló stresszválasz csökkentésére nem S1R-agonisták, hanem antagonisták lehetnének alkalmasak. Ezt kísérletileg is sikerült alátámasztani, az S1R antagonistá BD1047 előkezelésként történő alkalmazásával, különböző akut vagy krónikus fájdalom/gyulladás modellekben sikerült a fájdalmat csökkenteni a mikrogliózis beindulásának és a következményes proinflammatorikus citokin-termelésnek a gátlásával [182]. Mindezek az eredmények arra hívják fel a figyelmet, hogy neurodegeneratív betegségek, így az AK terápiájában az S1R modulátorok gyógyszerjelöltként történő alkalmazásához szükséges a modulátor jellege és a gyulladásra gyakorolt hatása közötti összefüggések feltárása.

Az S1R receptor szekvenciáját 1996-ban derítették fel [183], aminek alapján kiderült, hogy nem mutat számottevő homológiát az eddig azonosított emlős fehérjékkel. Szerkezetileg is jelentősen különbözik a klasszikus neurotranszmitter-receptoroktól, csak egy transzmembrán régióval rendelkezik [184]. Ezért az új S1R modulátorok azonosítására csak a ligandum-alapú számítási megközelítések voltak használhatók. Az első *in silico* S1R ligandum-tervezés a Glennon modellt alkalmazta a receptor kötőhelyére és a farmakofór azonosítására [185, 186], amit aztán további farmakofór modellek felépítése követett [187].



**6. ábra A:** Schmidt által meghatározott szerkezetek az S1R ligandum-kötődésére az agonista (+)-pentazocin (vörös) és az antagonista PD144418 (zöld) esetében. (6DK1 lánc kék, 5HK1 lánc arany) [184, 188]. **B:** a két ligandum kémiai szerkezete.

2016-ban Schmidt publikálta az S1R első röntgendiffrakciós meghatározáson alapuló szerkezetét (**6.A ábra**, PDB azonosítók: 5HK1 és 5HK2, [184, 189]). Ligandumként a PD144418-at, egy nagy affinitású S1R-antagonistát (**6.B ábra**), illetve a 4IBP-t (ábra nélkül) használták, melynek farmakológiai karaktere viszont nem egyértelmű. A leírt szerkezet egy S1R-trimer, mindhárom egység egy helikális résszel ágyazódik a membránba. A receptor kötősebe egy  $\beta$ -hordó-szerű szerkezetben található, amely a „cupin”-családba tartozó oligomer-enzimekkel mutat szerkezeti rokonságot. A ligandum-kötődés egyik kulcseleme (a Glennon modellel egyezésben) egy amincsoport jelenléte a molekulában, mely elektrosztatikus kölcsönhatást alakít ki a  $^{172}\text{Glu}$ -val. 2018-ban Schmidt további röntgendiffrakciós szerkezeteket publikált [188], egy agonista, a (+)-pentazocin (**6.B ábra**, PDB azon.: 6DK1), illetve két további antagonista (haloperidol, PDB azon.: 6DK0 és NE-100, PDB azon.: 6DJZ), mint ligandum alkalmazásával. Érdekes módon a trimer szerkezet a modulátor karakterétől függetlenül minden esetben megtartott, azonban az illeszkedésben vannak közöttük azonosítható eltérések. A ligandumokra jellemző apoláris molekularészlet két különböző molekulazsebben (vörös P1 és zöld P2) helyezkedhet el az ER-membrán felszínén található H4 és H5 C-terminális hélixek között (**6.A ábra**), és a különböző elhelyezkedés a hélixek szerkezetére is hatással van. Sajnos jelenleg csak a (+)-pentazocinnal, mint agonistával felderített szerkezetet ismerjük; a további agonistákra (PRE-084, (+)-SKF-10,047) feltételeztünk a hasonló szerkezet és a P2-es kötőseb elfoglalása. Jelentősen különböző szerkezetű agonistákra (cutamesin, fluvoxamin, donepezil) nincs ismert kötési konformáció. A felsorolt szerkezetekre alapozva több farmakofór-modell is kidolgozásra került [190, 191], azonban mindegyik alapja az antagonista-szerű kötődéssel kapható 5HK1 vagy 5HK2 szerkezet volt, így a modellek alkalmazásával kiszűrt ligandumok is ilyen típusú kötődési konformációhoz mutattak optimális affinitást.

### 2.2.6.3 A gyulladás és a neurogenézis összefüggése

Jelen ismereteink szerint a gyulladáshoz vezető folyamatok társulása az AK-hoz a kór egyik fő patológiai jegye. Emellett az is valószínűsíthető, hogy a neurogenézis serkentésével kedvező hatást

érhetünk el a romló memóriefunkciók tekintetében. Kézenfekvő lehet ennek a két folyamatnak az egymásra gyakorolt hatását is feltételezni. Ezt az állítást azonban az emberi agy esetében kísérletileg még nem sikerült bizonyítani, aminek fő oka a korlátozott vizsgálhatóság. A rendelkezésre álló, *post mortem* fixált mintákban már a neurogenesis jeleinek megbízható kimutatása is számos problémával terhelt, emiatt a kísérleti körülmények gondos megválasztására van szükség [144]. A gyulladás folyamatainak erősen időfüggő alakulása kérdésessé teszi, hogy egy *post mortem* mintában detektált pillanatnyi gyulladási állapot (ha ez kimutatható) mennyire releváns a két folyamat egymásra hatása tekintetében. Ezért jelenleg a gyulladás és neurogenesis kapcsolatát csak élő állatmodellben tudjuk tanulmányozni, és ez alapján tudunk következtetni a humán agyban uralkodó állapotokra.

Számos ilyen kísérletről találunk leírást az irodalomban, az eredmények viszont azt valószínűsítik, hogy mint ahogy maga a gyulladás is „kétélű fegyver” az AK-patológiában, úgy a gyulladási folyamatok is hathatnak (azok fázisától függően) serkentően vagy gátlóan a neurogenesisre. Mindez a gyulladás elemeinek, az asztrociták, mikroglia, makrofágok aktivációjának, és az általuk termelt citokinek, kemokinek aktuális egyensúlyának a függvénye. Kísérletek szerint a bakteriális lipopoliszachariddal kiváltott gyulladás révén az aktivált mikroglia sejtjei az NPC-kből kialakuló neuroblasztok nagy részét fagocitózissal eltávolítják, amivel a neurogenesiset nagy mértékben befolyásolják [192]. A proinflammatorikus M1 típusú mikroglia kedvezőtlen hatása a neurogenesisre további kísérletekben is bizonyítást nyert [193-195]. Egy esetben ezeket a kedvezőtlen folyamatokat nem-szteroid gyulladáscsökkentővel (NSAID) sikerült visszafordítani [194]. Egy tanulmányban viszont leírták a mikroglia „felkészítő” szerepét a neuronális sejt-differenciálódásban [196], ami bizonyíthatja a mikroglia neurogenesiset támogató hatását.

A gyulladás és a neurogenesis kapcsolatát AK-modellekben is sikerült bizonyítani. A FAK egyik alapmodelljének tekintett APPxPS1-es egérben, mely a humán APP egy mutált formáját és PSEN1-et termel, az anti-inflammatorikus IL-10 citokin mennyiségének megnövelését a HC területén egy további genetikai módosítással érték el [197]. Ebben a modellben, valószínűleg a citokin védő hatásának következtében mind a reaktív mikrogliózist, mind az asztrocita-aktivációt sikerült mérsékelni, ami kedvező hatással volt a neurogenesisre. Ugyanitt *in vitro* kísérletben az IL-10 mikroglia-NSC kevert kultúrában növelte a proliferációt, alátámasztva a transzgen egérmodellel kapott eredményeket [197].

Egy, a neurogenesiset érintő, Fe65-AICD túltermelő egérben végzett vizsgálatot fontos még itt is megemlíteni [150]. Az AICD-Fe65-Tip transzkripciós komplex neurogenesisre kifejtett hatásának igazolását kiegészítik azok a gyulladási kapcsolatos eredmények, melyek szerint a CD45+ mikroglia és emelkedett proinflammatorikus citokin-szintek együttesen voltak detektálhatóak a csökkent neurogenesisrel az AICD-Fe65 túltermelő állatban. Ha ezeket az állatokat NSAID-okkal kezelték, a neurogenesis újbóli erősödését tudták megfigyelni. Az Fe65-ön keresztül történő összekapcsolódása a gyulladásnak és a neurogenesisnek az általunk előállított egyik gyógyszerjelölt-vegyületcsalád hatásmechanizmusának felderítéséhez adhat kiindulási alapot.

### 2.2.7 Az AK egyéb hipotézisei

Az AK-patológia összetettsége életre hívott egyéb elméleteket is, melyekkel a kór kialakulása megmagyarázható lehet, illetve gyógyszerfejlesztési irányoknak adhatnak alapot. Mivel ezekkel az elméletekkel kutatásaim során nem foglalkoztam, csak röviden tárgyalom őket, az eddig alkalmazott terápiás megközelítésekhez szükséges elméleti háttér bemutatása céljából.

#### 2.2.7.1 A kolinerg hipotézis

Az AK-val kapcsolatos klinikai kutatások legkorábbi felfedezése a memória folyamatok érintettsége mellett fellépő kolinerg zavar volt. Ennek alapján az első elmélet, mely az 1970-es években terjedt el, az AK okaként a kolinerg neuronok károsodását, a kolinerg jelátviteli utak sérülését a releváns agyi területeken teszi felelőssé [198, 199]. A legelső terápiák ezért a kolinerg neurotranszmitterek szintjének kolinészteráz-inhibitorok alkalmazásával történő helyreállítását célozták meg [200]. Az évtizedek alatt összegyűlt eredmények egyértelművé tették, hogy ezek a gyógyszerek a kór valódi okát nem szüntetik meg, időlegesen tüneti kezelésre alkalmasak. Ennek oka, hogy a mélyben húzódó patológiás folyamatoknak csak következménye a kolinerg rendszer sérülése.

#### 2.2.7.2 A Tau protein szerepe

A sejten belül kialakuló NFT-k fő alkotóeleme a hiperfoszforilált Tau fehérje. Az AKH evolúciójával párhuzamosan a Tau biológiai funkciójáról is egyre több információ gyűlt össze, majd az A $\beta$ -központú kutatási eredmények egyre nyilvánvalóbb elégtelensége életre hívta a Tau-központú AK-elméletet. Jelen konszenzus szerint a két út együttesen felelős az AK-patológia lefolyásáért, de valószínűleg az A $\beta$  az iniciátor. Emellett a Tau szerepe semmiképpen nem hanyagolható el, számos folyamat esetén igazolt a Tau-érintettség, ezért egy komplex terápiás profil kidolgozásakor a Tau mint célpontot is érdemesnek tűnik számításba venni.

A Tau protein megfelelő pozíciókban történő foszforilálása elengedhetetlen fiziológiás funkciójának a betöltéséhez. A pTau a mikrotubulusok rendeződését irányító molekula, AK-ban viszont a kinázok és foszfatázok egyensúlyának megbomlása következtében hiperfoszforilálttá válik. A Tau egy viszonylag nagy, rendezetlen struktúrájú, hidrofil fehérje [201], kölcsönhatását számos proteinnel leírták már [202]. A Tau 85 potenciális foszforilációs hely van, melyekből az agyból izolálható, oldható Tau kb. 10 foszforilált [203]. Az életkor előrehaladtával a foszforiláció mértéke csökken. AK-ban a hiperfoszforiláció révén a foszforilációs helyek több, mint 50%-a változatos mintázatokban foszforilálódik, ami a Tau aggregációs képességének megnövekedését okozza. A hiperfoszforilált Tauból oldhatatlan szálas Tau-aggregátumok (páros helikális filamentek (PHF) és egyenes filamentek (SF)) keletkeznek [204], melyek szerkezetét az utóbbi években krio-elektronmikroszkópos technikával sikerült felderíteni [205]. A mikrotubulusok nagy számban tartalmaznak savas oldalláncú aminosavakat, normál működés esetén ezekhez kapcsolódva a Tau aggregációja gátolt.

A Tau patológiás működése káros sejtszintű folyamatokat indukál: a citoskeleton összeomolhat, a mikrotubuláris transzport blokkolódik [206]. A Tau a mitokondriumok külső membránjában, a mitokondriumon belüli kompartmentekben és a mitokondrium belső terében is megtalálható, ahol hatással van a sejtek bioenergetikájára, ami az AK-ban jellemzően sérül. A pTau oxidatív stresszt okozhat, aminek következménye a mitokondriumok alulműködése [206].

#### 2.2.7.3 A lipid homeosztázis zavara az AK-ban

Az APP feldolgozása és a lipid homeosztázis között szoros kapcsolat áll fenn. Mind az A $\beta$ , mind az AICD számos lipid-metabolizmus utat szabályoz, és viszont, az APP lebontását is befolyásolja

a lipid-környezet [207, 208]. A kapcsolatot az AK és a lipid homeosztázis között éppen az ApoE gén  $\epsilon 4$  allél meghatározó szerepének felfedezése bizonyította, ami a SAK egyik legjellemzőbb genetikai kockázati tényezője [209, 210], az ApoE  $\epsilon 4$  megléte a SAK egyik prediktív faktora [211]. Az ApoE génnek 3 fő allélje van ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  és  $\epsilon 4$ ), melyek 3, egymástól 1-, illetve 2 aminosavban különböző fehérjét kódolnak.

Az ApoE a keringési rendszernek egy lipideket és zsírolékony vitaminokat transzportáló fehérjeje, a legfőbb koleszterin-hordozó molekula. Csökkenti a glükóz felvételét és befolyásolja az átalakulását [212], kölcsönhat a citoskeletonális és a sejten belüli transzportfolyamatokért felelős fehérjékkel [213], illetve közvetlenül befolyásolja a mitokondriumok működését [213]. Emellett az ApoE4 hatással van az A $\beta$  kiürülésére, aggregációjára, ezek következményeként a plakkok mennyiségére [214]. Az amiloidogén úton történő A $\beta$  képződés lipid raftokban, koleszterinben és szfingolipidekben gazdag membrán-mikrodoménekben történik, ahol az APP lokalizálódik a  $\beta$ - és  $\gamma$ -szekretázzal [215]. Emiatt a lipid-összetétel meghatározó szerepű az APP transzportfolyamatainak és lebontásának alakulásában. Az ApoE4 mennyiségének növekedése elégtelen agyi keringést, csökkent vaszkularizációt és a BBB átjárhatóságának megnövekedését okozza [216, 217]. A koleszterin és az A $\beta$  termelés visszacsatolásban áll egymással, a koleszterinszint kihat az APP lebontására, míg a magas A $\beta$  szint a koleszterin bioszintézisének visszaszorulását okozza. Az AK korai stádiumában bizonyították egy többszörösen telítetlen zsírsavnak, a dokozahexaénsavnak a kedvező terápiás hatását, ennek alapján jelenleg étrendkiegészítőkben is alkalmazzák. Mind az A $\beta$ , mind az AICD mennyiségének növekedése, ami a már említett Fe65 által is szabályozott, visszaszorítja a szfingolipidek bioszintézisét [218, 219]. Ezen eredmények alapján kézenfekvő terápiás eszköz lehet az A $\beta$  termelés befolyásolása lipid-homeosztázist célzó vegyületekkel.

#### *2.2.7.4 A vaszkuláris keringési rendszer és a vér-agy-gát elégtelensége az AK-ban*

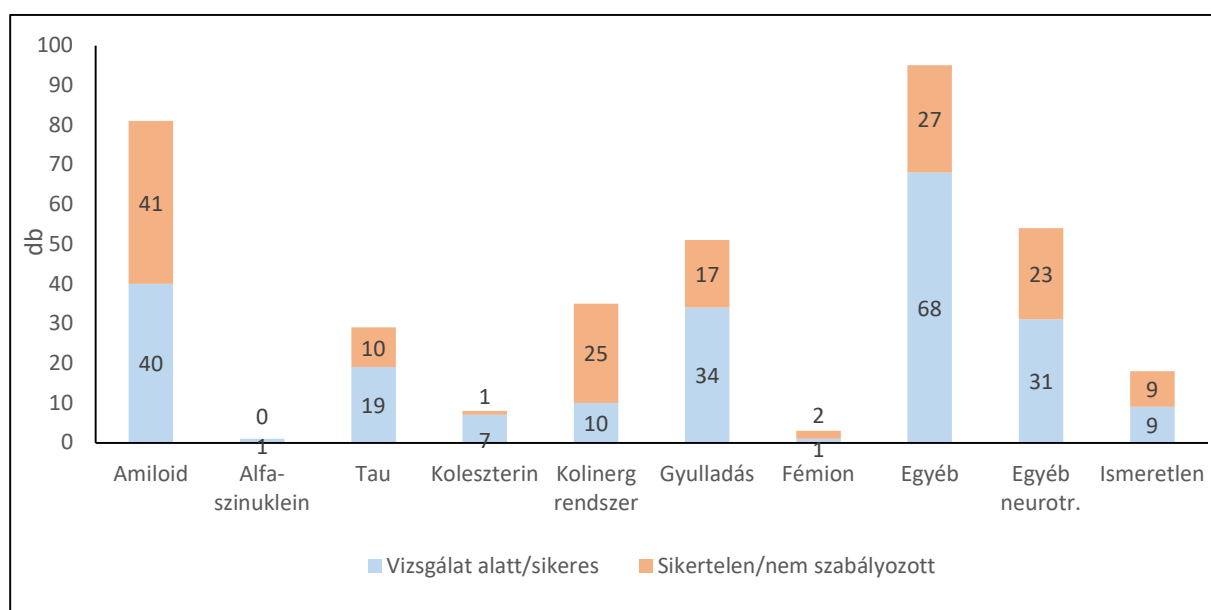
A felhalmozódott A $\beta$  eltávolítására az agyban többféle mechanizmus is működik. Az oldható formákat a mikroglia fagocitálhatja, a fehérjelebontó rendszerek enzimatikusan lebonthatják. Ezek mellett fontos szerepet játszik a CSF-be történő transzport, majd a BBB-n át a keringési rendszerbe történő kiürülés [220, 221]. A neurovaszkuláris rendszer szerkezetének és működésének megváltozása az öregedés egyik fiziológiás folyamata [222]. AK-ban kimutatható mind az agyi keringés romlása, mind a BBB progresszív sérülése, ami logikusan vezet az A $\beta$  kiürülésének elégtelenségéhez [223]. Ehhez adódik az életkorral egyre növekvő eséllyel fellépő keringési rendellenesség (magas vérnyomás, koronária-betegségek, szívinfarktus), ami az agyban sokszor hipoxiát okoz, ez pedig közvetlenül serkenti az APP amiloidogén lebontási útját [224]. Habár az agyi keringés elégtelenségének AK-val való okozati összefüggése egyértelműen bizonyított, egyes kutatók ezen túllépve az AK fő okának is tekintik [225]. A vaszkuláris elmélet szerint a következő faktorok vezetnek az AK kialakulásához: i) a CSF reabszorpciója a keringési rendszerbe csökken [226, 227], ii) a csökkent glimfatikus keringés miatt a neurotoxikus anyagok (fehérje-aggregátumok, szabadgyökök) szintje az agyban emelkedik [225, 228], iii) a BBB funkcionalitásának sérülése [229], mely specifikusan az A $\beta$  kiürülését mediáló lipoprotein receptor-függő protein1 (LRP1) és P-glikoprotein (P-gp) mennyiségének csökkenése által következhet be [230, 231], iv) a gyulladás és az oxidatív stressz, mely az A $\beta$  kiürülését gátolja, a periciták által történő felvételét elősegíti, ami a periciták károsodását okozza [221], v) az agyban neurotróf hatással rendelkező inzulin elégtelen transzportja a BBB sérülése miatt [232], ami AK-ban agyi inzulinrezisztancia kialakulásával társul [233].



### 2.3 Gyógyszerkutatás az AK-ban: hol tartunk most?

Az AK patológiájával kapcsolatos ismeretek bővülése, az elméletek fejlődése a gyógyszerkutatások irányát is dinamikusan alakította. Az AK első hipotézisének, a kolinerg hipotézisnek a felállításával párhuzamosan megjelentek a kolinészteráz-gátlók, mint feltételezetten oki terapeutikumok. Ezután az A $\beta$  felfedezése és szerkezetének azonosítása új irányt és hatalmas lendületet adott a gyógyszerkutatásnak. A Tau-hipotézis ezzel az iránnyal párhuzamosan, ám kisebb volumenben vált kiindulóponttá, valószínűleg a kísérleti modellek kialakításának nehézsége miatt, amivel a vegyületek Tau-patológiára kifejtett hatása biológiai rendszerekben megbízhatóan monitorozható lehetne.

Az *Alzforum.org* adatbázisban, mely a *clinicaltrials.gov* adatait folyamatosan elemelve, irodalmi és szabadalmi referenciákkal követi a neurodegeneratív betegségekben eddig klinikai fázisvizsgálatokra került anyagok, eljárások életútját, az AK különféle terápiás megközelítései célpont szerint csoportosíthatók (**7. ábra**). Ezeket a 2024 februári állás szerint analizálva, végkimenetelüket megvizsgálva érdekes következtetéseket vonhatunk le.



**7. ábra** Az eddig AK kezelését célzó terápiás eljárások osztályozása

A hatásmechanizmus-palettából jól látszik, hogy az előbbiekben tárgyalt fő AK-hipotézisek mindegyike szerepelt a gyógyszerkutatás célpontjaként. A kék mezős számok jelzik a még futó klinikai vizsgálati fázisban levő (F1-F4), illetve a kezelésre már törzskönyvezett anyagokat. A csoportosításnál ezeket ígéretes lehetőségként osztályoztam. A narancs mezők adatai a már biztosan hatástalannak bizonyult, vagy valamelyik kutatási fázisban beszüntetett eljárású anyagokat/eljárásokat jelölik, ezek tehát a veszteség-oldalra sorolhatók.

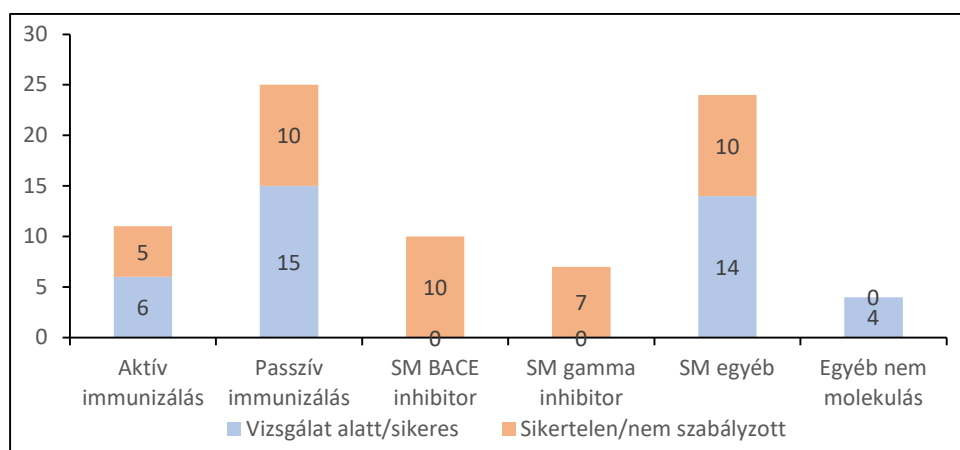
Látható, hogy az „Egyéb” csoport a legnépesebb. Ez minden olyan molekulát, eljárást magában foglal, amelynek nincs fő vezérhipotézise, hanem többnyire bizonyos molekuláris részfolyamatokat céloz meg. A teljesség igénye nélkül néhány célpont ezekben az esetekben: kalpain-inhibitor (beszüntetve), antioxidáns E-vitamin (F3), kurkumin (F2), rezveratrol (F3), lizozomális protein-degradációt serkentő molekula (F1/2), az AK-t mikrobiális behatással magyarázó elméleteken alapuló antibakteriális szer (hatástalan), antivirális molekula (F2), glükóz-metabolizmusra ható vitamin-prekursor (F2), fizikai módszerek, mint a kiürülést támogató shunt (hatástalan), vagy a gamma-sávfrekvenciás hangstimuláción alapuló nem-invazív módszer (F2), vérnyomáscsökkentők és antidiabetikumok (terápiás célpont kiszélesítése révén, F2-3), a cirkadián ritmusra ható szerek (F2). Ebben a csoportban kapott



helyet a jelenleg AK-kezelésre alkalmazni szándékozott S1R modulátor is, a Blarcamesine (Anavex, F2/3). A csoport még vizsgálat alatt levő tagjai ígéretes jelöltek lehetnek az AK kezelése szempontjából, magas számuk (68) pedig jelzi, hogy az uralkodó hipotézisekre alapozott kutatás nem vezetett eddig megnyugtató eredményre.

Az „Egyéb” kategóriába sorolt vegyületek után a 2. legnépesebb csoport az A $\beta$ -n alapuló terápiákat tartalmazza. Az A $\beta$  kémiai szerkezetének felderítése és az amiloid-hipotézis megalapozása óta összesen 81 terapeutikum klinikai vizsgálata indult el és jutott különböző fázisokba. Az A $\beta$  centrális szerepe miatt érdemes ezt a csoportot részletesebben is megvizsgálni (8. ábra).

Hardy és Selkoe már az AKH 2002-es revíziójában megjelölte az A $\beta$ -val kapcsolatos lehetséges gyógyszerkutatási célpontokat [3]. Ezek i) az A $\beta$  képződését okozó szekretázok (BACE,  $\gamma$ -szekretáz) működésének befolyásolása, ii) az oligomerizáció megakadályozása, illetve az A $\beta$  kiürülésének támogatása, iii) gyulladásgátlók alkalmazása, iv) koleszterin-homeosztázis befolyásolása, v) aggregációt befolyásoló fémionokkal kapcsolatos terápiás lehetőségek vi) az oligomerek által kiváltott szinaptotoxikus és neurodegeneratív hatások kivédése. Ezen irányok közül néhány az *Alzforum* besorolása szerint külön kategóriába került (pl. a fémkelátorok, a koleszterin-homeosztázisra ható, illetve a gyulladásgátló folyamatokat befolyásoló, esetenként már gyógyszerként törzskönyvezett molekulák).



**8. ábra** Az A $\beta$  célpontú terápiák megoszlása hatásmechanizmus és végkimenet szerint

Az aktív immunizálást alkalmazó terápiás eljárások vizsgálatainak nagy része súlyos mellékhatások megjelenése miatt felfüggesztésre került [6]. A jelenleg még folyó klinikai vizsgálatokban részt vevő anyagok esetében is megjelentek a jellemző mellékhatások, melyek egyrészt a heves immunreakció következtében fellépő agyvelőgyulladás, másrészt morfológiai elváltozások a plakkok területén, amelyek a plakkok eltávolítása következtében beinduló káros sejtszintű folyamatok (gyulladás, mikroglia-aktiváció) eredményei. Ezeket összefoglaló néven amiloid által okozott képalkotási abnormalitásoknak („amyloid-related imaging abnormalities”, ARIA) nevezzük [234]. A mellékhatások miatt ez a terápiás lehetőség jelenleg kevésbé támogatott.

A BACE- és  $\gamma$ -szekretáz inhibitorokat, hasonló eredményességük okán, érdemes együtt tárgyalni. Ezek kismolekulás hatóanyagok, így előállításuk viszonylag költséghatékonyan megoldható, szemben a (főleg passzív) immunizálási terápiákkal. Bár a gyógyszerjelölt molekulák száma a többi eljárással összemérhető, de jelenleg már nincs aktív eljárásban vizsgált képviselőjük. Ennek két oka a kezelése alatt fellépő súlyos mellékhatások, illetve a kognitív képességek javulása tekintetében tapasztalt hatástalanságuk [235-237]. A szekretázok több biológiai célpontra is hatnak, emiatt működésük befolyásolása nemkívánt

hatásokhoz is vezethet. Ezért pl. több  $\beta$ -szekretázzal kapcsolatos klinikai vizsgálat is felfüggesztésre került a májra kifejtett erős toxikus hatás miatt [238]. Hasonlóan,  $\gamma$ -szekretázok alkalmazása sok esetben vezetett bőrrák, illetve fertőzések kialakulásához. Ezek a jelenségek a  $\gamma$ -szekretáz Notch-hasításával hozhatók összefüggésbe, mivel a Notch a sejtfejlődés és sejt-differenciálódás egyik alapvető regulációs fehérjéje [239]. Az alapszerkezetek módosításával megpróbálták a szelektivitást növelni, ezáltal a mellékhatásokat csökkenteni, de ez az esetek túlnyomó többségében hatástalansághoz vezetett [239-241]. A  $\gamma$ -szekretáz inhibitorok mellett olyan NSAID-ok, vagy NSAID-származékok is klinikai vizsgálatok alá kerültek, melyek egyben  $\gamma$ -szekretáz modulátorok is. Ezek a vegyületek jellemzően úgy tudják csökkenteni az  $A\beta_{1-42}$  szintet, hogy közben az APP mennyiségét nem növelik, a teljes  $A\beta$  mennyisége a plazmában nem változik, és a Notch-szignalizációs út sem módosul [242]. Sajnos a modulátorokkal sem sikerült a kognitív képességek tartós javulását elérni [243].

Az egyéb kismolekulás és más terápiás eljárások olyan anyagokat, beavatkozásokat foglalnak magukba, melyek a nem amiloid-célpontú egyéb csoportban már tárgyalt hatásmechanizmusainak valamelyikével rendelkeznek, azzal a kiegészítéssel, hogy bizonyítottan hatással vannak az  $A\beta$  szintjének változására is. Szerepelnek itt táplálékkiegészítők, lipid-homeosztázis mediátorok, fémkelátorok, gyulladáscsökkentők, nem molekulás megközelítések. A terápiák többsége hatástalannak bizonyult, néhányal még folynak klinikai vizsgálatok.

A legfontosabb, és jelenleg leginkább kutatott csoportja a terápiáknak a passzív immunizálás. Ez egy olyan eljárás, amelyben az  $A\beta$  bizonyos hosszúságú, vagy adott aggregációs formája ellen termeltetett antitestekkel végzik az immunizálást. Előbbire példa a Donenamab, illetve követő antitestje az Remternetug, melyek az  $A\beta_{3-42}$  3-as pozícióban piroglutaminsavat tartalmazó formája (N2-pG- $A\beta$ ) ellen termeltetett antitestek. A különböző aggregációs formákat tekintve vizsgáltak  $A\beta$  monomer (LY2599666, Solanezumab), ADDL (ACU-193), fibrilláris (Aduhelm, Donanemab, PRX012, Ganterenumab, SAR228810) protofibrilláris (Lecanemab), formák elleni antitesteket is, illetve külön csoportot képeznek az AK-s betegek véréből elkülönített autoantitestek (Gammagard, Gamunex, Octagam).

Az elmúlt 5 évben a vezető gyógyszergyárak (Eli-Lilly, Eisai, Janssen-Pfizer, Hoffmann-La Roche) erőiket ezen típusú terápiák fejlesztésére koncentrálták. Sajnos az eredmények sok esetben kérdéses hatásosságot tártak fel. Egyértelmű konszenzus látszik a szükséges dózis tekintetében: az antitestes terápiának igen rossz a határfoka, az antitestek eljutása az agy megfelelő területeire nagy mértékben korlátozott. Az elsőként vizsgált Bapinezumab, mely az  $A\beta$  N-terminális részét ismeri fel szelektíven, az aggregációs foktól függetlenül, több nagy volumenű klinikai vizsgálatban is hatástalannak bizonyult [244, 245]. Mégis, a versenyhelyzet kikényszerítette a további antitestes vizsgálatokat is. A Solanezumab kifejezetten az oldható  $A\beta$  felismerésére képes, F2 vizsgálatokban a plakkok kiürülése, illetve az  $A\beta$  szintje a plazmában és a CSF-ben kedvező változást mutatott, de a kognitív képességekre nem hatott kedvezően [246]. Ennek ellenére két nagy szabású F3-vizsgálatot is indítottak, melyekben csak az egyik eredményeinek ismételt kiértékelése során tudtak enyhe hatást, igen magas ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) dózisz adagolás mellett kimutatni [247, 248]. Egy további kísérletben enyhe kognitív károsodással diagnosztizált csoportban tesztelték a Solanezumabot, ám itt sem sikerült szignifikáns hatást kimutatni [249].

A kutatói társadalom megrendüléssel fogadta a szekretázokon és immunizáláson alapuló terápiákat vizsgáló klinikai kutatások eddigi sikertelenségét. 2017-ben Hardy, az AKH atyja is összegezte a lesújtó eredményeket, és megpróbált utat keresni a további AK-val kapcsolatos

gyógyszerkutatások számára [250]. Az általános elkeseredettség a gyógyszerkutatási trendek alakulásában is megmutatkozott. Az AK kezelésre benyújtott A $\beta$  célpontú terápiák számának alakulását a 2000-es évtől 2017-ig vizsgálva megállapítható, hogy ebben az időszakban 67 klinikai vizsgálat indult, melyből 26 még ebben az időszakban, további 20 pedig a következő négy évben lezárult, és közülük csak néhány jutott el az engedélyeztetésig. Jelenleg az *Alzforum* adatbázisa szerint az Egyesült Államokban az AK kezelésére 8 terápia áll rendelkezésre. Ezek közül 5 (Donepezil, Galantamin, Memantin, Rivastigmin, Tacrine) a kolinerg rendszert, illetve más neurotranszmitterek szintjét befolyásoló, tüneti kezelést nyújtó terápiás molekula. Egy anyag (Suvorexant) egy már engedélyezett, az inszomnia kezelésére alkalmazott gyógyszer, melynek sikerült kedvező irányban befolyásolni az AK-s betegek alvásproblémáit. A két fennmaradó kezelés két passzív immunizálás alapján működő antitest, az Aduhelm (Adacantumab) és a Leqembi (Lecanemab). Ezek engedélyeztetési eljárása sem volt kétségektől mentes. Az Aduhelm klinikai vizsgálatainak lezárultával csak az igen magas, 10 mg·kg<sup>-1</sup>-os dózisú csoportban, 18 hónapon át havonta egyszer történő kezeléssel sikerült statisztikailag megalapozott javulást kimutatni a kognitív paraméterekben. 2021-ben az FDA, komoly szakmai viták után, és nem teljes támogatottsággal, de engedélyezte az Aduhelm terápiás alkalmazását, emellett előírta további F4-vizsgálatok elvégzését a hatásosság igazolása és a szükséges adagolás megállapítása céljából. Ezek a vizsgálatok jelenleg is folyamatban vannak. Az antitest gyógyszerként történő alkalmazáshoz szükséges minőségben, és a hatékony dózis nagyságából következő rendkívüli mennyiségben történő előállítására még az Egyesült Államokban is komoly anyagi forrásokat igényel. Valószínűleg emiatt, 2022 elején az USA támogatott terápiákat elbíráló szervezete, az „U.S. Centers for Medicare and Medicaid Services” (CMS) az antitest-alapú terápiák AK-kezelésben történő társadalombiztosítási támogatását csak klinikai vizsgálatokban történő részvételre korlátozta, nyílt terápiaként történő alkalmazását nem támogatja [251].

A többi antitest-terápiát fejlesztő cég, így a másik, jelenleg FDA-engedéllyel rendelkező antitest, a Leqembi gyártója is panaszt emelt a korlátozás ellen, felismerve, hogy a fejlesztés rentábilissá tétele ezzel a szabályozással veszélybe került. A Leqembi egy protofibrillumot felismerő antitest, F3-as hatásosságát szintén nagy, 10 mg·kg<sup>-1</sup>-os dózis 216 héten át, 2-4 hetente történő alkalmazásával tervezik igazolni a jelenleg is futó vizsgálatban. Időközben ez az antitest is zöld utat kapott az FDA-tól áttörési terápiaként, és elkezdtek a marketing stratégia kidolgozását, illetve elindítottak egy olyan klinikai vizsgálatot is, melyben egy anti-Tau antitesttel kombinálva alkalmazzák a Leqembit.

Meg kell említenünk még egy antitestes terápiát, mely a kiélezett versenyben komoly pozíciót szerzett. Az Eli-Lilly 2017-ben kezdte első nagyszabású F3 vizsgálatát a Donanemabbal, kezdetben az LY3202626 BACE-inhibitorral kombinálva, melyet később kivontak a vizsgálati protokollból. Az eredmények kedvezőek voltak, a kognitív képességek esetében sikerült szignifikáns javulást kimutatni a betegcsoportban, ami korrelált az amiloid plakkok mennyiségének csökkenésével is [252]. Így a Donanemab 2021-ben megkapta az FDA-tól az áttörési terápia státuszt. Sajnos 2023 januárjában, a biztonságossági adatok hiányosságára hivatkozva az FDA elutasította a Lilly gyorsított engedélyeztetési eljárásra benyújtott kérelmét. A Donanemabbal párhuzamosan viszont a cég kifejlesztett egy követő antitestet, a Remternetugot, amellyel 2021-ben kezdett F1 vizsgálatot. Az antitesttel legutóbb indított F3 vizsgálat lezárási időpontja 2025, tehát a biztató eddigi eredmények alapján mind a Donanemab, mind a Remternetug még ígéretes jelölt lehet az antitestes terápiák között.

Az eddigi eredmények tehát, bár bizakodásra adhatnak okot az AK-s betegeknek világszerte, sajnos mégis azt valószínűsítik, hogy valódi, ténylegesen hatékony, anyagilag is minden

érintett számára elérhető kezelés még hosszú ideig nem áll rendelkezésre. Erősen vitatott, hogy az antitest-terápia jó irány-e; abban minden vélemény megegyezik, hogy az antitestek hasznosulását, a célhelyre történő bejutásuk hatékonyságát mindenképpen növelni kell, ami által a szükséges dózis, ezáltal a kezelések költségei csökkenthetők lehetnének. További problémát jelenthet, hogy a bejuttatás határfokának javításával emelkedik az ARIA fellépésének valószínűsége is.

Mindezek figyelembevételével érdemes lehet a gyógyszerfejlesztéshez az AK patológiájának más, esetleg eddig kevésbé tanulmányozott célpontjait alkalmazni. A gyulladáscsökkentők esetében már történtek klinikai vizsgálatok az AK-ban történő alkalmazást célozva. Az „Anti-inflammation Prevention Trial”, mely a naproxén és celexocib hatását vizsgálta, sajnos negatív eredménnyel zárult [253]. Az eredmények átfogó analízise megállapította, hogy a kezelések csak az AK igen korai, kezdeti fázisában lehetnek hatékonyak. A rendelkezésre álló adatokat több tanulmány is rendszerezte [254-256], amelyek valószínűsítik, hogy az NSAID-ok sikertelenségének oka lehet a kísérlettervezés elégtelensége, a kezelési idő rövidege, a páciensek előrehaladott idős kora és számos társbetegsége, és a kísérleti csoportok genetikai inhomogenitása [257]. Feltételezhető, hogy a vizsgálatok tervezési hibáinak kiküszöbölésével az NSAID-ok kedvező hatása az AK lefolyására kimutathatóvá válna.

Saját kutatásaink egyik célpontja az S1R modulátorok neurodegeneratív betegségekben alkalmazható terápiás fejlesztése. Ezen a téren már találunk klinikai vizsgálati fázisban lévő anyagot is, a Blarcamesine-t (Anavex), mely egy kevert S1R/muszkarinerg agonista [258]. Jelenleg F3-vizsgálata zajlik, az eddigi eredmények szerint lassítja a kognitív képességek romlását, bár mellékhatásként szédülés és zavartság lépett fel a páciensek egy részénél. A Blarcamesine mellett számos, már klinikai forgalomban lévő, S1R-hez is kötődő gyógyszer (Fluvoxamin [181], Citalopram [259], Dexometorfán [260]) terápiás kiszélesítésére irányuló preklinikai vizsgálat is folyamatban van.

Az S1R modulátorok terápiás alkalmazása kapcsán azonban felmerülhet egy, a hatékonyságot megkérdőjelező probléma. Ismeretes, hogy két, az AK terápiájában régóta alkalmazott molekula is kimutatható kötődéssel rendelkezik az S1R-hez. A Donepezilről *in vivo* vizsgálatokban sikerült kimutatni, hogy antidepresszáns és antiamnéziás hatása S1R-mediált, ami BD1047 antagonistával felfüggeszthető [261]. Egy további kísérletben azt is igazolták, hogy *icv*-injektált  $A\beta_{25-35}$  által kiváltott neurotoxikus hatás kivédhető Donepezil adagolásával, míg három másik kolinészteráz-inhibítor, a Tacrine, a Rivastigmine és a Galantamine csak kis mértékű neuroprotektív hatást mutatott, amit S1R-antagonistával nem tudtak befolyásolni [262]. A másik terápiás vegyület a Memantine, amelyről szintén kimutatták, hogy hatásmechanizmusában szerepet játszhat az S1R-rel történő interakció [263]. Ezen eredmények tükrében kérdéses, hogy egy S1R-agonista valódi oki terápiás megoldás lehet-e az AK-ra, ugyanis a két gyógyszert már évtizedek óta nagy számú betegcsoporton alkalmazzák, mégsem jelent végleges megoldást a betegség gyógyítására. El kell fogadnunk, hogy az S1R-receptoron keresztül történő moduláció önmagában nem fog végleges megoldást adni az AK gyógyításának problémájára, valószínűleg más készítményekkel adva, szinergikus hatást kifejtve lesz célszerűbb az alkalmazása [264]. Emellett az sem zárható ki, hogy az S1R intracelluláris előfordulása miatt, az alkalmazott molekula sejtbe történő bejutásának problémája, és alacsony S1R-szelektivitása végül az értékes terápiás hatás csökkenését okozza. Ezért egy új, szelektív S1R modulátor esetében további gyógyszerfejlesztési célként jelentkezik a sejtbe történő bejutás javítása is. Végül megfontolásra érdemes az az NSAID-ok esetében már említett tényező is, amely a túl heterogén betegcsoporton későn elkezdett kezeléssel magyarázza a negatív eredményeket. Valószínűleg egy S1R modulátorokkal az AK klinikai

tüneteinek megjelenése előtt, vagy akár preventíven, fiatal életkorban elkezdett kezelés javítaná az eredményeket.

A szelektivitás kapcsán meg kell említeni egy olyan irányt, melyben szintén történik kismolekulás gyógyszerfejlesztés és klinikai vizsgálatok. Az S1 mellett felmerült az S2 receptor (S2R) szerepe az  $\alpha$ -mediált neuronális folyamatokban. Az S2R szintén egy transzmembrán receptor, mely szerkezetileg jelentős mértékben különbözik az S1R-től, de ahhoz hasonló szerepet játszik különféle jelátviteli folyamatokban. Az S2R szabályozza a  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázist, illetve az intracelluláris koleszterin transzporter 1 (NPC1) működését [265]. A központi idegrendszerben is expresszálódik [266], eddig azonban leginkább a rákkutatásban merült fel célpontként, mivel a megnövekedett proliferációs aktivitást mutató sejtekben jelentősen megemelkedik az expressziója, az exogén S2R-ligandumokkal pedig előidézhető a malignus sejtek szelektív apoptózisa.

Emellett az S2R neurodegeneratív betegségekben (AK, Parkinson kór, Lewy testes demencia) is szerepet játszhat, a központi idegrendszerben befolyásolja a fehérjetranszportot, az oxidatív stresszt, és az autofágiához kapcsolódó molekuláris folyamatokat [267]. Az AK szempontjából fontos megfigyelés, hogy bizonyos molekulák gátolni képesek az  $\alpha$  szinaptikus receptorokhoz való kötődését [268]. A molekulák vizsgálata felfedte, hogy az  $\alpha$ -leszorítási képességük pozitívan korrelál a S2R-hoz való affinitásukkal. Ennek alapján került kifejlesztésre az Elayta nevű molekula, mely S2R-antagonista, feltételezhetően az S2R-nek a progeszteron receptor-kötő membrán-komponens 1 alegységgel képződő komplexéhez kötődik, és allosztérikusan gátolja az  $\alpha$  szinaptikus receptorokhoz való kötődését. Az Elaytával jelenleg több F2-vizsgálat is folyamatban van. Az S2R érintettsége az AK patológiájában saját kutatásunknak is új irányt adhat. S1R modulátoraink S1R/S2R szelektivitásának mérése és a molekulák eszerinti kiválasztása során így érdemes lehet az S2R-mediált hatásmechanizmust is figyelembe venni.

### 3. Célkitűzés

Doktori munkám középpontjában az AK-val kapcsolatos gyógyszerfejlesztés áll, egyrészt potenciális hatóanyagok tervezése, másrészt az ezek teszteléséhez szükséges kísérleti rendszerek kidolgozása és optimalizálása. A következő tudományos problémákra szeretünk volna megoldást találni.

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

Az A $\beta$  biológiai kísérletekben alkalmazható, különböző hosszúságú, esetenként kémiaailag 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 túltermelődött A $\beta$  eltávolítása mellett terápiás jelentőséggel bírhatnak olyan eljárások, melyekkel a peptid neurotoxikus hatása csökkenthető. Ehhez azonosítani kell azokat a kölcsönhatásokat, amelyek révén az oA $\beta$  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 fA $\beta$  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 önrendeződő 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 immunoszorpciósszerű eljáráshoz (ELISA) hasonló kísérletben a bioaktív A $\beta$  oligomerek 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 felderítésére irányuló kísérletek 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 általunk 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 gyulladáshoz vezető 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 egértörzssel 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 jegeinek (neurotoxikus oligomerek képzése, plakkok kialakulása, neuronflamáció, 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. S1R modulátorok hatása a neuroinflammációra és a neurogenesisre**

Az 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 az *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 gyulladáshoz vezető 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 egérmodellt, melyben igazolni kívántuk, hogy egyszeri oA $\beta$ -adagolással kiváltható a neurogenesis molekuláris szintű megzavarása. Ebben a modellben teszteltük az endogén S1R-agonista DMT, illetve a szintetikus agonista PRE-084 neurogenesisre és gyulladáshoz vezető kiváltott hatását.

## 4. Alkalmazott anyagok, vizsgálati módszerek és eszközök

### 4.1. Szintézisek

#### 4.1.1 Az izo-A $\beta$ <sub>1-42</sub> szintézise

Az izo-A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptid optimalizált szintéziséhez 4-(hidroximetil)-fenil-acetamidometil-polisztirol- (PAM-) gyantán, a standard Boc-kémián alapuló eljárás lépéseit alkalmaztuk, a speciális szerkezethez igazítva. Ennek érdekében a Ser<sup>26</sup>  $\gamma$ -OH csoportján *terc*-butil csoporttal védett formáját az  $\alpha$ NH<sub>2</sub>-csoporton 2-klór-benzil-oxikarbonil- (2-Cl-Z) védőcsoporttal védtük, így a szintézis adott lépésében a védőcsoport-eltávolításhoz szükséges szokványos reagensekkel (50% 2,2,2-trifluoecetsav (TFA)/diklórmétán (DCM) elegy) az oldallánc védőcsoportja szelektíven eltávolítható volt. A Ser<sup>26</sup>  $\gamma$ -OH csoporton történő további lánchosszabbításhoz a következő Boc-Gly-OH aminosavat N,N'-diciklohexil-karbodiimid (DCC) és N-metil-imidazol (NMI) aktiválószerrel 10-szeres feleslegben reagáltattuk, DCM/dimetilformamid (DMF) 1:3 arányú elegyében. Az el nem reagált OH-csoportokat 0,25 M ecetsavanhidrid és 0,24 M NMI DCM-ben oldott elegyével 60 percen át kezelve blokkoltuk. A többi aminosav kapcsolási lépéseire rutinszerűen 3x felesleget használtunk, DCC/1H-benzotriazol-1-ol (HOBt), illetve DCC/3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-ol (HOAt) aktiválószer-kombinációkkal, szükség szerint ismételve a kapcsolást. A kész peptidet a gyantáról 2 V/V% anizolt, 8 V/V% dimetilszulfidot (DMS) és 1 m/V% threo-1,4-dimerkapto-2,3-butándiol (DTT) tartalmazó hidrogénfluoriddal hasítottuk le, majd fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékromatográfiás (RP-HPLC) technikával Jupiter C4 oszlopon (300 Å pórusméret, 10  $\mu$ m szemcseméret, 250x21 mm, Phenomenex) tisztítottuk. A tisztított peptid minőségét analitikai HPLC eljárással Luna C18 oszlopon (100 Å pórusméret, 5  $\mu$ m szemcseméret, 250x4,6 mm, Phenomenex) és elektropray-ionizációs tömegspektrometria (ESI-MS) vizsgálatokkal FinniganMat TSQ 7000 tömegspektrométerben ellenőriztük.

#### 4.1.2 Peptidszintézisek

A peptid típusú gyógyszerjelölt vegyületek, amiloid aggregációt módosító rövid peptidszekvenciák, az Fe-65-WW és a Pin1-WW domének, illetve az A $\beta$ <sub>25-35</sub> peptid szintéziséhez a konvencionális szilárd fázisú peptidszintézis lépéseit alkalmaztuk. Az anyagok többségét karboxamid formában szintetizáltuk, Boc-kémia esetén 4-metil-benzhidrilamin (MBHA) gyantán, Fmoc-kémia esetén Rink-amid gyantán. Aktiválószerként DCC-t, illetve DCC/HOBt vagy (dimetilamino)-N,N-dimetil[(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-ol)oxi]metanimínium-hexafluoridofoszfát(1-) (HATU)/ N,N-diizopropil-etilamin (DIEA) kombinációkat és 3x aminosav-aktiválószer felesleget alkalmaztunk. A szintézislépéseket követően a Boc-kémiával előállított anyagokat 8 V/V% DMS-t és 2 V/V% anizolt tartalmazó HF elegyével hasítottuk le a gyantáról, míg az Fmoc-szintézisek termékeihez 2,5 m/V% DTT-t, 2,5 m/V% triizopropilszilánt és 5 V/V% H<sub>2</sub>O-t tartalmazó TFA-t használtunk. A termékek tisztítására és analitikájára ESI-MS vizsgálatokat, illetve RP-HPLC-s eljárásokat alkalmaztunk, TFA/acetonitril/H<sub>2</sub>O elegyekkel kivitelezett gradiens-elúcióval.

Az A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomerek és fibrilláris aggregátumok ICV injektálást követő eloszlását az agyban a peptid fluoreszcens származékának mikroszkópos detektálásával határoztuk meg. Ennek előállítását [66] szerint végeztük. Az A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptidet védett formában, még a gyantán kötött állapotban reagáltattuk hatszoros feleslegű 1-[(7-amino-4-metil-2-oxo-2H-1-benzopirán-3-ol)acetil]oxi]pirrolidin-2,5-dionnal (AMCA-NHS), HATU/DIEA aktiválás mellett. A peptidet a Met<sup>35</sup> oxidációjának megelőzése érdekében egy komplex hasítóeleggyel kezeltük, mely 81V/V% TFA-t, 5 m/V% fenolt, 5 V/V% tioanizolt, 3 V/V% vizet, 2,5 m/V% DTT-t, 2 V/V% DMS-t és 1,5 m/V% NH<sub>4</sub>l-t tartalmazott. A nyers peptidet 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropán-2-olban



(HFIP) oldva RP-HPLC technikával tisztítottuk, a kitermelés növelése érdekében saját töltésű, kis méretű, szemipreparatív előtét-oszlopon (20 x 21 mm, Jupiter C4 300 Å pórusméretű, 10 µm szemcseméretű töltettel).

#### 4.1.3 Foldamer-dendrimer konjugátumok szintézise

A β-aminosavakat tartalmazó foldamer szekvenciák szintézisét az SPPS technika optimalizálásával végeztük el. Ez jelenti alacsony borítottságú gyanta (Tentagel R-RAM, kapacitás: 0,19 mmol g<sup>-1</sup>) alkalmazását, a szokványos Fmoc-protokollnak megfelelő védőcsoportokkal ellátott aminosavak felhasználását, HATU/DIEA aktiválást és rutinszerűen alkalmazva 2x3 órányi kapcsolást. Az Fmoc védőcsoportot 2% piperidin és 2% 2,3,4,6,7,8,9,10-oktahidropirimido[1,2-a]azepin (DBU) DMF-ben oldott elegyével végeztük, ami rövidebb idő alatt hatékonyabb védőcsoport-eltávolítást tesz lehetővé a szokványos piperidin/DMF kombinációval szemben. A dendrimer alapvázakhoz történő konjugáláshoz a szekvenciákat minden esetben a C-terminális felől egy Gly-Gly-Cys részlettel kiegészítve állítottuk elő. A fokális szimmetriájú konjugátumok biotinnal jelölt változatai esetében a foldamer-szekvenciát az N-terminálison N-biotinil-6-aminohexánsavval reagáltattuk, majd a kész biotinilált foldamert kapcsoltuk a dendrimer-vázhoz.

A konjugátumok alapvázat vagy készen vásároltuk (1,4-dimaleimido-bután 0. és 1. generációs poliamidoamin (PAMAM) dendrimerek etiléndiamin maggal), vagy előállítottuk. Az előállítás a poli-Lys szerkezetek esetében szilárd fázison történt, N<sup>α</sup>-Fmoc-L-Lys(N<sup>ε</sup>-Fmoc)-OH egységek felhasználásával, standard Fmoc-kémiai szintézislépéseket alkalmazva. A biotinilált foldamervázakhoz N<sup>α</sup>-Fmoc-L-Lys-(N<sup>ε</sup>-biotin)-OH aminosavat építettünk be a szerkezetbe.

A foldamer-dendrimer konjugálásához a dendrimerek maleimid-csoporttal történő funkcionálisítását végeztük el. Ehhez a foldamerek szabad N-terminális csoportjait 3-maleimidopropionsavval reagáltattuk HATU/DIEA aktiválás mellett. A HPLC-vel tisztított építőelemek konjugálását rutinszerűen a következő eljárással végeztük: az előállítani kívánt anyag mennyiségét és a tisztítási eljárás kapacitását figyelembe véve, 4 ml 50 mM-os NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pufferben (pH=7,0) oldottuk fel a dendrimert, majd a foldamerból a számított ekvimoláris mennyiség másfél-kétszeresét adtuk 4 ml ugyanilyen pufferben feloldva a dendrimerhez. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten egy éjszakán át kevertettük, majd másnap HPLC-re közvetlenül injektálva a reakcióelegyet, választottuk el a kívánt konjugátumot.

#### 4.1.4 Egyéb vizsgált vegyületek

Az S1R affinitásvizsgálatokban tesztelt ligandumok az SZTE GYTK Gyógyszerkémiai Intézetének molekulakönyvtárából származó vegyületek voltak. Szintézisük standard szerves kémiai eljárásokkal történt, kromatográfiás tisztításukhoz Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm) és Merck Aluminium Oxide (active neutral, 0,063-0,200 mm) fázisokat használtak. Olvadáspontjukat Hinotek X-4 készülékben, elemösszetételüket Perkin-Elmer 2400 CHNS elem-analizátorban határozták meg. Az enantiomerek optikai forgatóképességét Perkin-Elmer 341 polariméterben mérték meg. A tisztított anyagok <sup>1</sup>H-NMR és <sup>13</sup>C-spektrumai Bruker Avance DRX-400 és DRX-500 spektrométereken lettek felvéve. A pontos szintézisleírások a [269] függelékében található. A vegyületek magyar nevét a ACD/Name 2021.2.0 szoftver segítségével határoztuk meg (Advanced Chemistry Development, Inc. Toronto, Canada)

## 4.2 Mintakészítési protokollok

### 4.2.1 Az A $\beta$ <sub>25-35</sub> elkészítési protokolljai

Az A $\beta$ <sub>25-35</sub> peptid aggregációjának sebessége, a peptid aggregációs hajlama jelentősen eltér a teljes A $\beta$ <sub>1-42</sub> szekvenciától. Ezért a fibrilláris aggregátumok elkészítésekor a szintetikus peptidet kaotróp oldószerrel történő előkezelés nélkül oldottuk fel viszonylag magas, 500  $\mu$ M-os koncentrációban MilliQ ultratiszta vízben, majd 5 perc ultrahangos kezelés után inkubáltuk 37 °C-on 1 óráig. Ebből a törzsoldatból a biológiai kísérletekhez 2  $\mu$ M-os oldatot készítettünk az adott fiziológias pufferben. A A $\beta$ <sub>25-35</sub> oligomereket tartalmazó oldat előállításához a peptidből dimetilszulfoxidban (DMSO) 500  $\mu$ M-os törzsoldatot készítettünk, 5 percig ultrahangoztuk, majd a törzsoldatot sejtképző táppal 2  $\mu$ M-ra hígítottuk.

### 4.2.2 A standard oligomerkészítési protokoll (SOP)

Az izo-A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptidet HFIP-ben feloldottuk, majd a mintát vákuumos bepárló készülékben szobahőmérsékleten szárazra bepároltuk. Ezután a peptidből MilliQ ultratiszta vízben 500  $\mu$ M koncentrációjú törzsoldatot készítettünk, melyet 5 percig ultrahangoztunk, majd a törzsoldatot a következőkben leírt összetételű pufferoldatok egyikével 50  $\mu$ M-os koncentrációra hígítottuk.

1. foszfátpuffer alapú fiziológias oldat (PBS), összetétele: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 130 mM NaCl, pH=7,4
2. hidrogénkarbonát-alapú fiziológias oldat (HCBS), összetétele: 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 134 mM NaCl, átbuborékolva CO<sub>2</sub>-vel, pH=7,4
3. 2-[4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-yl]etán-1-szulfonsav (HEPES) alapú fiziológias pufferoldat (HBS), összetétele: 10 mM HEPES, 0,154 M NaCl, pH=7,4,
4. mesterséges cerebrospinális folyadék (ACSF), összetétele: 130 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,96 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM D-glükóz, pH=7,4
5. kereskedelmi forgalomban kapható egyéb sejtenyésztő médiumok (pl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium).

Ezekben a pufferekben az O $\rightarrow$ N acilvándorlást követően az A $\beta$ <sub>1-42</sub> szobahőmérsékleten 24 óra alatt oligomerekké, kis mennyiségben protofibrillumokká aggregál. 8 °C-on tárolva aggregációja jelentősen lelassul, így egy viszonylag stabil, egy napon át alkalmazható oligomerpreparátumot nyerünk. A vizes törzsoldat kis részletei gyorsfagyasztásos technológiával fagyaszthatóak, így nagyobb volumenű kísérletekhez ugyanabból a peptid mintából készíthető a szükséges mennyiségű kezelőoldat, azonos összetétellel és hasonló aggregációs tulajdonságokkal, ami a mérések reprodukálhatóságát jelentősen elősegíti.

### 4.2.3 A standard fibrillumkészítési protokoll (SFP)

Izo-A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptidből túlnyomóan fibrilláris aggregátumokat tartalmazó oldatot előállítani az előző protokoll további módosításával lehet. Itt attól függően, hogy biológiai vagy fizikai-kémiai vizsgálatokhoz használtuk a mintát, két különböző eljárást alkalmaztunk. Mindkét eljárásban szükség volt a fibrillumképzés elősegítésére, amit az oligomer-oldat beoltásával tudtunk elérni. Ehhez konvencionális A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptid vizes oldatban, 100  $\mu$ M-os koncentrációjában történő aggregáltatás során nyert fibrilláris mintából adtunk az SOP szerint előállított oligomer-oldathoz 1 V/V %-ban fibrillumoldatot, és így inkubáltuk a mintát 72 órán át 37 °C-on. Megjegyzendő, hogy a biológiai vizsgálatokhoz legtöbbször ez a minta nehezen volt alkalmazható. Így sok esetben inkább rövidebb inkubációs időt (24-48 óra) alkalmaztunk, melyben az oligomerek/protofibrillumok aránya még nagyobb volt, de a minta kevésbé volt inhomogén, injektorból könnyebben adagolható volt. A fizikai-kémiai vizsgálatokhoz, melyeknél a fiziológias körülmények betartása nem volt feltétlenül szükséges, a

fibrillumképzés elősegítése érdekében a pH=7,4-en történő kezelést egy kis pufferkapacitású pufferben végeztük, majd a minta pH-ját 3-as értékre állítottuk, és így végeztük a 3 napig történő inkubációt. Az ilyen preparátumokat a savas pH hatására keletkező, szabályos méretű és morfológiájú fibrillumok túlsúlya jellemezte.

### 4.3 Az A $\beta$ aggregációjának tanulmányozására használt fizikai-kémiai és képkalkoló eljárások

#### 4.3.1 Dinamikus fényszórásmérés (DLS)

A DLS méréseket egy termosztálható Malvern Zetasizer Nano készülékben végeztük, a méréstől függően 25 vagy 37 °C-on, 633 nm-es hullámhosszú monokromatikus fényvel világítva meg a mintákat. A translációs diffúziós koefficienseket az autokorrelációs függvények matematikai analízisével nyertük, a beépített CONTIN algoritmus segítségével (DTS 4.0 szoftver, Malvern Instruments). Feltételezve a részecskék gömbszerű alakját, a látszólagos hidrodinamikai sugár a Stokes-Einstein egyenletből számítható:  $R_h = k_B T / (6\pi\eta D_T)$ , ahol  $k_B$  a Boltzmann-állandó,  $T$  a termodinamikai hőmérséklet,  $\eta$  a közeg viszkozitása és  $D_T$  a translációs diffúziós koefficiens. A mérések során az  $R_h$  értékek eloszlási függvényének változását vizsgáltuk a mintában. Monodiszperz rendszert feltételezve a mintára jellemző „Z” eloszlás szerint súlyozott átlagos átmérő (mely egy hipotetikus mérethez rendelhető) időbeli változása jó közelítéssel nyújt információt az aggregáció mértékéről.

#### 4.3.2 Cirkuláris dikroizmus mérések (CD)

Az aggregáció közben bekövetkező fehérjekonformáció-változás vizsgálatára CD spektroszkópiai méréseket Jobin-Yvon Mark VI, illetve Jasco J815 CD spektropolarimétereken végeztünk, 1 mm, illetve 2 mm fényúthosszal rendelkező kvarc küvettában, Peltier-termosztáttal biztosítva a mérések során az állandó, 37 °C-os mérési hőmérsékletet. A CD spektrumokat jellemzően a 200-250 nm közötti tartományban rögzítettük, általában 100 nm/s szkennelési sebességgel. A spektrumokat 10 felvétel átlagolásával nyertük, a háttér korrigálását az azonos körülmények között felvett oldószer-spektrumok kivonásával végeztük el.

#### 4.3.3 NMR

Az NMR vizsgálatokat 600 MHz-es Bruker Avance III 2,5 mm-es szobahőmérsékletű  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  TCI mérőfejjel felszerelt spektrométerrel végeztük. Az A $\beta_{1-42}$  koncentrációja 100  $\mu\text{M}$ , míg a vizsgált ligandumoké (foldamerek, peptidek) 2 mM volt. A szaturációs transzfer-differencia (STD) NMR esetében 50 ms-os Gauss pulzussal az aggregátumot szelektíven 2 s-ig telítettük „on-rezonancia”-ként -1 ppm-et, és „off-rezonancia”-ként 40,0 ppm-et alkalmazva. A spektrumok 2000 scan átlagából készültek. A 2D-trNOESY kísérletek 128 inkrementummal és 256 scannel készültek, a NOE keverési idő 200 ms volt. A jel-hozzárendeléseket a 2 mM-os minta 25 °C-on felvett 2D TOCSY és ROESY spektrumai alapján végeztük.

#### 4.3.4 Izoterm titrációs kalorimetria (ITC)

Az A $\beta$  aggregátumok (jellemzően oligomerek) és kis molekulák közötti kölcsönhatás jellemzésére a kölcsönhatás hőválaszának meghatározása is lehetőséget ad. Ezzel az eljárással a kötésre jellemző  $\Delta H_b$  (kötési entalpia),  $K_d$  (disszociációs konstans) és  $N$  (egy monomerre eső kötőhelyek száma) is meghatározható. A mérést egy Microcal VP-ITC mikrokaloriméterben végeztük, 12 °C-on. A ligandumot tartalmazó oldatot mikroinjektor segítségével 10  $\mu\text{l}$ -es részletekben adagoltuk a küvettába helyezett A $\beta$  oldathoz, melynek koncentrációja 100  $\mu\text{M}$  volt. A titrálásokat a precipitáció kezdetéig végeztük, az A $\beta$  kiválása ugyanis a mérés zajosságának növekedését okozta. Kontroll kísérletekben minden esetben megállapítottuk a ligandum hígulásának hőváltozását, amit az adott mérések entalpiaváltozásaiból kivontunk. A

kísérleti adatokra a legkisebb négyzetek módszerével illesztettünk görbét. Mivel az oligomerminta inhomogén, és nem rendelkezünk jelenleg a kötődést pontosan leíró modellel, a két független kötőhelyet feltételező modellt alkalmazva végeztünk illesztést, így határozva meg a  $K_d$ ,  $\Delta H_b$  és  $N$  értékeket.

#### 4.3.5 *Tioflavin-t (ThT) mérések*

A ThT molekula fluoreszcens gerjesztési spektrumában,  $\beta$ -redős szerkezetű aggregátumokhoz kötődve egy jellegzetes vörös eltolódás következik be [270], 450 nm-en szelektíven gerjesztve a molekulát, 482 nm-en detektálható az  $A\beta$ -ThT komplexre jellemző emisszió. A jelenség detektálása fluoreszcens spektrofotometriával alkalmazható az  $A\beta$  aggregációjának időbeli követésére, kinetikai mérések kivitelezésére. Kísérleteinkben a ThT 50 mM-os  $NaH_2PO_4/Na_2HPO_4$  pufferben (pH=7,0) elkészített oldatát adagoltuk az aggregálódó  $A\beta_{1-42}$ -t tartalmazó minta részleteihez, meghatározott időpontokban, oly módon, hogy a ThT- $A\beta_{1-42}$  komplexet tartalmazó elegyekben az  $A\beta_{1-42}$  koncentrációja egységesen 4  $\mu M$  legyen. A minták emisszióját NOVOstar Optima plate-readerben  $\lambda_{ex}=450$  nm,  $\lambda_{em}=480$  nm filterpár alkalmazása mellett mértük meg, minden esetben 3 párhuzamos kísérletből számolva az átlagokat.

#### 4.3.6 *TEM és AFM vizsgálatok*

A kolloid mérettartományba eső méretű aggregátumok mind transzmissziós elektronmikroszkópiával (TEM), mind atomerő mikroszkópiával (AFM) tanulmányozhatók.

A TEM vizsgálatokat 500 mesh-es Cu-rácsra felvitt formvar polimer-grafit kompozit filmre cseppentett, beszárított mintán végeztük. A fehérjeaggregátumok láthatóvá tételéhez ebben az esetben egy festési eljárás alkalmazására is szükség van, amihez 2 m/V%-os uranil-acetát oldatot használtunk. A mikroszkópok biológiai minták vizsgálatához optimalizált alacsony gyorsítófeszültségen (100 kV) működtek, rutinszerűen x34,000, x46,000 és x64,000 (Philips CM-10 mikroszkóp), illetve x25,000 és x50,000 (Jeol JEM-1400) nagyításokon vettük fel a felvételeket, melyeket digitális képfeldolgozó program segítségével elemeztünk (AnalySis® 3.2 Soft Imaging System: Philips és EM-15300SXV Image Editor Software: JEOL).

Az AFM vizsgálatok esetén frissen hasított hidrophil szilikáthordozóra vittük fel a mintákat, itt a technika elve miatt nincs szükség az aggregátumok további kezelésére. Az AFM felvételeket tapping módban PSIA XE-100 SPM készüléken készítettük, a használt AFM-tűk 10 nm-es hegysugarú, jellemzően 5,5 N/m erőkonstansú és 150 kHz rezonanciafrekvenciájú non-contact szilika tűk voltak (Type NSG01, NT-MDT). A scannelési sebesség 1 Hz volt, az AFM felbontás 512x512 pixeles.

#### 4.3.7 *Méretkizárásos kromatográfia (SEC)*

Az aggregátumok méreteloszlásának jellemzésére, illetve további kísérletekhez méret szerinti elválasztásra a méretkizárásos kromatográfia hatékonyan alkalmazható. Két készüléket használtunk: a méreteloszlás analitikai jellemzésére BioRad Biologic Duoflow 10 középnyomású kromatográfiás rendszert, az oligomerek szemipreparatív tisztítására Äkta Purifier rendszert, mindkét esetben Superose 6 10/300 oszloppal felszerelve. Az elválasztásokat HCBS-ben végeztük, 0,5 ml/min áramlási sebességgel.

#### 4.4 Molekuláris biológiai technikák

##### 4.4.1 Western blot (WB), dot blot (DB) és enzim-kapcsolt immunoszorpciós esszé (ELISA)

A fehérjék WB-n történő analizéséhez a homogenizátumokat saját készítésű, 12-15 m/V%-os nátrium-dodecil-szulfát- (SDS-) poliakrilamid-gélekre vittük fel. A géleket BioRad MiniTransBlot elektroblot készülékben futtattuk. Kontrollnak a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz vagy a  $\beta$ -aktin fehérje jelét alkalmaztuk. A detektáláshoz a megfelelő torma-peroxidáz- (HRP-) konjugált másodlagos antitestet használtuk, a kemilumineszcens jelet a BioRad Molecular Imager ChemiDoc XRS+ géldokumentációs rendszer segítségével rögzítettük és analizáltuk (BioSense 3 szoftver, BioRad).

A DB kísérleteket Biorad dot blot készülékben, nitrocellulóz membránt alkalmazva végeztük, mely egy vákuumrendszerhez kapcsolható 96 lyukú szűrőkészülék. A membrán megfelelő kezelése és blokkolása a minták felvitele után azonos technológiával folyik, mint a szokványos WB kísérletek membrán-feldolgozási lépései.

Több alkalommal használtunk kereskedelmi forgalomban kapható, használatra kész termékeket ELISA tesztek kivitelezésére. Az  $A\beta_{1-42}$  mennyiségének meghatározását a klinikumban is használatos, validált Innotech®  $A\beta_{1-42}$  ELISA teszttel végeztük.

Az  $A\beta_{1-42}$  immunológiai módszerekkel történő detektálására többféle antitest használatos. Ezek többsége szekvenciaspecifikus, de használatosak a különböző aggregátum-formák felismerésére elfogadható szelektivitással alkalmazható konformáció-specifikus antitestek is. Az általunk használt anti- $A\beta$  antitesteket az **1. táblázat** foglalja össze.

Klón	Típus	Antigén	Vizsgálati módszer	Hígítás
6E10	szekvenciaspecifikus	$A\beta_{1-16}$	WB, DB	1:1000
BAM10	szekvenciaspecifikus	$A\beta_{1-12}$	WB, DB	WB 1:2500 DB 1:500
OC	konformáció-spec.	f $A\beta_{1-42}$	WB	1:1000
4G8	szekvencia-specifikus	$A\beta_{17-24}$	immunhisztokémia	1:10000

**1. táblázat** Az  $A\beta$  kimutatásához használt antitestek jellemzése

##### 4.4.2 A saját fejlesztésű oligomerszelektív ELISA teszt leírása

A foldamer-dendrimer konjugátumok ELISA lemezen történő rögzítése a biotin-avidin specifikus kölcsönhatás révén történt, amihez avidinnal borított lemezeket használtunk (Pierce Biotech., 125 pmol/lyuk, illetve 60 pmol/lyuk biotinkötő kapacitással). Minden lyukba 100  $\mu$ l, a biotinizált konjugátumot 10  $\mu$ g/ml koncentrációban tartalmazó PBS-ben elkészített oldatot helyeztünk, és 2 órán át inkubáltuk. Standard mosási lépéseket követően az  $A\beta_{1-42}$  oligomereket tartalmazó oldatot ( $V=100 \mu$ l) egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk a lemezen. A kötődött  $A\beta_{1-42}$  mennyiségét 6E10 elsődleges antitest és anti-mouse HRP-IgG konjugált-másodlagos antitest alkalmazásával, kemilumineszcenciás detektálással határoztuk meg. Az optimalizálás során a jel erősítésére egy speciális, mikropolimer-alapú detektálórendszert (Histols-M Hisztopatológia Kft.) használtunk, ami a konvencionális HRP-antitestet alkalmazó módszerhez hasonlóan szintén fajspecifikus, de a polimerhez konjugált HRP molekulák mennyisége érzékenyebb detektálást tesz lehetővé. 3,3',5,5'-tetrametil-benzidinnel (TMB) való kezelés után a detektálást NOVOstar Optima plate-readerben végeztük.

A kötési görbéket nemlineáris illesztési eljárással analizáltuk, az EC50 értékeket az ITC-mérésekből meghatározott kötési sztöchiometria (N) alapján rögzített ligandum- $A\beta$  monomer arány figyelembevételével optimalizáltuk [271].

#### 4.4.3 Riboszómák és A $\beta_{1-42}$ oligomerek kölcsönhatásvizsgálata

Patkányagyból irodalmi eljárást alkalmazva [272] riboszóma-frakciót izoláltunk, melynek tisztaságát WB kísérlettel ellenőriztük. Ehhez a tisztított riboszóma-frakcióból és a kiindulási agyhomogenizátumból azonos fehérjemennyiségeket vittünk fel 15%-os SDS-poliakrilamid géltre. A riboszóma kimutatására a riboszómális fehérjére specifikus RPL36 antitestet használtuk 1:1000 hígítási arányban,  $\beta$ -aktin belső kontroll mellett. Ezt követően ELISA lemezre a tisztított riboszómából lyukanként 100 ng-ot vittünk fel, majd az SOP szerint elkészített A $\beta_{1-42}$  oligomerek 0,1 nM-1  $\mu$ M koncentrációjú oldataival 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A kötött A $\beta_{1-42}$  kimutatására szekvensspecifikus BAM10 antitestet és HRP-konjugált másodlagos antitestet használtunk. A kemilumineszcens jelet FluoStar Optima Microplate Readerben detektáltuk.

#### 4.4.4 *In vitro* translációs vizsgálat

Az A $\beta_{1-42}$  oligomerek specifikus hatását a riboszómák működésére egy *in vitro* translációs vizsgálat segítségével bizonyítottuk. Ehhez egy nyúl retikulocita lizátumon alapuló, nukleázzal kezelt, *in vitro* translációs keveréket (Promega) különböző koncentrációjú (0,5-25  $\mu$ M) A $\beta_{1-42}$  oligomeroldatokkal elegyítettünk, majd előírás szerint 1  $\mu$ g Luciferáz RNS kontroll-templátot adtunk minden mintához. A kölcsönhatás specifikus voltának igazolására kontroll peptidként az A $\beta_{1-42}$  kevert szekvenciáját tartalmazó peptiddel is végrehajtottuk a kísérletet, 10 és 25  $\mu$ M-os koncentrációjú oldatokat alkalmazva. A kevert A $\beta_{1-42}$  szekvenciája a következő volt: <sup>1</sup>LKAFD <sup>6</sup>IGVEY <sup>11</sup>NKVGGE <sup>16</sup>GFAIS <sup>21</sup>HGVAH <sup>26</sup>LDVSM <sup>31</sup>FGEIG <sup>36</sup>RVDVH <sup>41</sup>QA. A kísérleti rendszer translációs működési kapacitásától függően az előírt 90 perces inkubációs idő alatt 30 °C-on a mintákban luciferáz szintetizálódik, melynek lumineszcenciáját a Promega Luciferáz esszét alkalmazva, LumiStar Optima luminométerben határoztuk meg. A mintákban expresszálandó luciferáz mennyisége párhuzamos WB-kísérlettel is meghatározásra került. Az *in vitro* translációs reakciót biotinil-L-lizil-tRNS-sel hajtottuk végre, majd a minták 2  $\mu$ l-es részleteit 10%-os SDS-poliakrilamid géltre vittük fel, és a szokásos módon elválasztottuk. A transláció során keletkező biotinil-luciferáz streptavidin-HRP-vel konjugálva, standard eljárásban a kemilumineszcens jel detektálásával kimutatható.

#### 4.4.5 Radioligand-kötődési vizsgálatok

A kötődési vizsgálatokhoz kétféle membránpreparátumot készítettünk. Tengerimalac májból készült homogenizátumot alkalmaztunk az S1R receptorhoz való kötődés vizsgálatára [174, 273-276], míg az S1R/S2R receptor szelektivitási kötésvizsgálatokat patkány máj homogenizátumon végeztük [161, 277, 278](5, 60-63). Az S1R kötésvizsgálatokhoz szükséges [<sup>3</sup>H]-(+)-pentazocint (specifikus aktivitás: 1,98 TBq/mmol) és az S2R kötésesztéhez alkalmazott [<sup>3</sup>H]-DTG-t (specifikus aktivitás: 363 GBq/mmol) magunk szintetizáltuk, a radioaktív méréseket Tri-Carb 2100 TR folyadékszintillátorban (PerkinElmer) Ultima Gold MV szintillációs koktél alkalmazásával végeztük. A disszociációs konstans értékét ( $K_d$ ) és a maximális kötőhely-számot ( $B_{max}$ ) szaturációs kötésvizsgálatokkal határoztuk meg, 37 °C-on, 50 mM-os trisz-(hidroximetil)-amino-metán (TRIS)-HCl pufferben (pH=8,0), a radioaktív ligandum emelkedő koncentrációi mellett ([<sup>3</sup>H]-(+)-pentazocin: 0,05-235 nM, [<sup>3</sup>H]-DTG: 0,2-343 nM). Az egyes ligandumok kötődési vizsgálatához 2,4 nM [<sup>3</sup>H]-(+)-pentazocint és az adott ligandumokat 0,01 nM – 10  $\mu$ M tartományban, emelkedő koncentrációban alkalmaztuk. A teljes kötődés mellett az aspecifikus kötődés meghatározására a kísérleteket 10  $\mu$ M haloperidol jelenlétében is végrehajtottuk. 90 perces inkubációt követően a mintákat hűtött TRIS-HCl kötőpufferrel hígítottuk, majd 24 lyukas Brander Cell Harvester szűrőrendszerben Whatman GF/B üvegszál membránon leszűrtük.

A DTG nem szelektív S1R/S2R ligandum, ezért az S2R-affinitás meghatározásához az S1R maszkolására ebben az esetben 100 nM (+)-pentazocint használtunk. 17 nM [<sup>3</sup>H]-DTG alkalmazása mellett a ligandumok koncentrációja 0,01 nM – 10 µM között változott, a nonspecifikus kötődés meghatározására itt is 10 µM haloperidolt adtunk a rendszerhez.

Az inhibíciós konstans ( $K_i$ ) értékeket a kicserélődési görbék inflexiós pontjaiból határoztuk meg, melyeket a legkisebb négyzetek módszerével illesztettünk a mérési pontokra, illetve a Cheng-Prusoff egyenletből számítottuk a  $K_i$ -t a következők szerint:  $K_i = EC_{50} / (1 + [ligandum] / K_d)$ .

#### 4.4.6 Immunhisztokémiai és egyéb hisztológiai eljárások

##### 4.4.6.1 Immunhisztokémiai meghatározások

Az élő állatokkal végzett kísérletek jelentős részében az állatok agyának *post mortem* vizsgálatával állapítottuk meg a különböző kezelések következtében fellépő szerkezeti és funkcionális változásokat. Ehhez a releváns agyi területek preparálását követően célzott jelölési eljárások (hisztológiai technikákkal történő festések, illetve immunhisztokémiai reakciók) alkalmazására volt szükség. A BrdU detektálása esetében, a proliferálódó sejtek jelzése érdekében, a vizsgálandó anyaggal történő kezelés után 24 órával az állatokat *in vivo* kezeltük BrdU-val intraperitoneálisan (IP), a jelzőanyagot 6 óránként 3 alkalommal injektálva, 50 mg kg<sup>-1</sup> mennyiségben. Az állatokat az utolsó kezelést követő 14. napon termináltuk, transzkardiálisan perfundáltuk 4%-os paraformaldehid-PBS oldattal, majd hűtött mikrotom segítségével a HC dorzális részétől a ventrálisig terjedően, állatonként 12 db, 20 µm vastag koronális metszetet készítettünk. Az Aβ plakkok detektálása előtt a szövet feltárása céljából a szeleteket 100%-os hangyasavval 1 órán át, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A fehérjék kimutatása esetében ilyen feltárássra nem volt szükség. A BrdU és minden vizsgálandó fehérje detektálására a felhasznált antitestet az előzetes optimalizálási protokoll kidolgozása során meghatározott hígítási arányban és inkubációs idővel alkalmaztuk. Detektálásra többnyire biotin-konjugált standard másodlagos antitesteket kombináltunk biotin-avidin erősítő rendszerrel (Vecastatin Elite ABC-peroxidase kit), illetve bizonyos esetekben (BrdU, DCX, NeuN) polimer-alapú HRP-erősítő rendszert (Super Sensitive™ One-Step Polymer-HRP Detektáló Rendszer) alkalmaztuk.

A metszeteket digitális scannerrel (Mirax Midi Panoramic Viewer 1.15.4, Case Viewer 2.1 program QuantCenter HistoQuant modullal felszerelve) fényképeztük, az analizált területen (HC és cortex (CTX)) a sejteket vagy megszámoztuk (BrdU, DCX méréseknél), vagy a számítógép által meghatározott területarányos jelsűrűséget használtuk a jellemzéshez (amiloid plakk, NeuN, GFAP, ionos kalcium-kötő adapter molekula 1 (Iba1)).

##### 4.4.6.2 Golgi-festést követő dendrittüske-meghatározás

Az állatok agyát eltávolítás után FD Rapid GolgiStain Kit oldataival előírás szerint kezeltük, mely egy több lépcsőben elvégzett, 16 napos inkubálást jelentett speciális kezelőoldatokban. Ezután az agykból vibratom segítségével 100 µm vastag koronális szekciókat készítettünk, melyeket a kit további oldataival kezeltünk, majd fénymikroszkóp alatt vizsgáltunk 100x nagyítással. A hippocampusz CA1 régiójában állatonként 25 piramis neuront analizáltunk, a szómától minimum 100 µm távolságban, a proximális apikális dendritből kiinduló, másodlagos vagy harmadlagos dendrit 100 µm hosszú szakaszán. A felvételeket digitálisan rögzítettük és analizáltuk (kamera: AxioCam MRC V5, program: AxioVision 40 4.8.1.0 mikroszkóp: Zeiss Observer Z1). A dendritekről felvétel-sorozatokat készítettünk, a dendrittüske-sűrűséget az ImageJ 1,44 képanalizáló szoftver segítségével határoztuk meg.

#### 4.4.6.3 A neuronszám meghatározása krezilibolya festéssel (Nissl festés)

Az élő neuronokban a krezilibolya festék a neuronális citoplazma savas komponenseihez kötődik, így azok száma területegységre vonatkoztatva a festést követően meghatározható. Ehhez a metszeteket 1%-os krezilibolya-oldattal 5 percig kezeltük, majd dehidratáltuk, tárgylemezre helyeztük és fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk meg.

#### 4.4.6.4 Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat az $A\beta_{1-42}$ icv injektálást követő agyi eloszlásának meghatározására

Az oligomer és fibrilláris  $A\beta_{1-42}$  peptid fluoreszcens jelzett formáit az AMCA-jelölt  $A\beta_{1-42}$  és a jelöletlen izo- $A\beta_{1-42}$  2:7 arányú elegyítésével állítottuk elő (16,7  $\mu\text{M}$  AMCA- $A\beta_{1-42}$ , 58,3  $\mu\text{M}$   $A\beta_{1-42}$ ). A standard protokollok alkalmazása után a fibrilláris aggregátumból kétoldali injektálással 10-10  $\mu\text{l}$ -t juttattunk be a patkányok agykamrájába, míg az oligomer formából egy oldalra 7,5  $\mu\text{l}$ -t injektáltunk. Az injektálás után 5, illetve 60 perccel perfundáltuk az állatokat (100 ml PBS, pH=7,4), majd az agykból 30  $\mu\text{m}$  vastag szagittális metszeteket készítettünk. A vizsgálatokat Nikon Eclipse TE2000 fluoreszcens mikroszkópban végeztük, a felvételeket Spot RT digitális kamerával (Diagnostic Instruments) készítettük.

### 4.5 *In vitro* biológiai kísérletek

#### 4.5.1 Életképességi mérések

##### 4.5.1.1 MTT-mérés sejttenyészetben

A sejtek életképességének vizsgálatára több elterjedt kolorimetriás eljárás is létezik. Ezek közül a legelterjedtebb az MTT-teszt, melyben az élő sejtek a sárga színű 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromidot (MTT) lila színű formazánná alakítják. A formazán vizes közegben rosszul oldódó kristályokat képez a sejtekben, melyek DMSO-val történő kezeléssel feloldhatók, és a keletkező oldatban a formazán mennyisége 570 nm-en történő abszorbancia méréssel meghatározható. A meghatározáshoz az adott sejttípusból (SH-SY5Y humán neuoblasztóma, egér primer neuronális, illetve patkány endothél sejt kultúra, PC12 sejtvonal, stb.) 96 lyukú lemezen készítettünk tenyészeteket, melyeket  $A\beta_{1-42}$  peptiddel, illetve a peptid toxikus hatását feltételezetten módosító egyéb molekulával különböző koncentrációarányokban kezeltünk, majd a jellemzően 24 órás, 37 °C-on történő inkubációt követően a sejtekhez DMSO-t adtunk. Az abszorbancia meghatározását Fluostar Optima plate readerben végeztük.

##### 4.5.1.2 *Ex vivo* MTT-mérés túlélő agyszeleten

Az általánosan elterjedt, sejttenyészetben végzett viabilitás-méréshez képest előnyt jelenthet egy olyan módszer alkalmazása, amellyel a sejtek életképességét a szöveti környezet fenntartása mellett vizsgáljuk [279]. Fiatal, 2 hónapos Wistar patkányok agyából preparálhatóak olyan hippokampális agyszeletek, melyek életképessége az eltávolítás után még viszonylag hosszú ideig fenntartható. Az agyszeletek 60 percig tartó glükóz- és oxigénmegvonásos állapotban tartása egyszeri alkalommal stresszt okoz, megnövelve a szeletek sejtjeinek érzékenységét. Ebben az állapotban egy további, o $A\beta_{1-42}$ -t tartalmazó oldattal (c=10  $\mu\text{M}$ ) 4 óráig szobahőmérsékleten történő kezelés hatására az agyszeletek túlélő sejtjeinek viabilitása szignifikánsan csökken, amely MTT-teszttel detektálható. A szeleteket a toxikus  $A\beta_{1-42}$  oligomerek és védő hatású molekulák kombinációjával kezelve azok hatásosságáról kaphatunk kvantitatív információt.

##### 4.5.1.3 Impedanciaméréseken alapuló viabilitás-meghatározás (RT-CES)

A sejttenyészetben végrehajtott impedancia-mérés egy korszerű, jelölésmentes, valós idejű, nem-invazív mérési lehetőséget biztosít a sejtek tapadási, növekedési és életképességének



meghatározására [280]. Ehhez egy ExCelligence készülékben (RTCS-SP instrument), specifikus, arany-elektróddal felszerelt 96 lyukú lemezen kell a sejttenyészetet növeszteni, a kísérlettől függően jellemzően 5-7 napig, miközben folyamatosan detektálható a tenyészet impedanciájának változása. A mért adat az ún. sejt-index, mely minden időpontban az  $(R_n - R_b)/15$  értékkel adható meg, ahol  $R_n$  az adott, sejttel töltött lyuk elektródja által mért impedancia, míg  $R_b$  a lyukban mérhető háttérimpedancia sejtmentes állapotban. A kiértékelés egy valós idejű sejt-analizáló szoftver segítségével történik (RTCA, Roche).

Az izo- $\text{A}\beta_{1-42}$  peptidből származó oligomerek pufferösszetételétől függő aggregációját és biológiai hatásosságát RT-CES-sel is vizsgáltuk, melyhez 2 hetes patkányok agyából izolált primer endotél sejtkultúrát készítettünk. A foldamer-dendrimer konjugátumok szerkezet optimalizálása esetén az impedanciaméréseket SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejtvonalon végeztük.

#### 4.5.2 Elektrofiziológiai mérések agyszeleten

3 hónapos patkány egyedekből 400  $\mu\text{m}$  vastag transzverzális hippokampusz-szeleteket készítettünk, melyeket ACSF-ben történő pihentetés után egy 60 elektródás multielektroda-sorral felszerelt chipre (3D-MEA, Ayuda Biosystems) helyeztünk. A chip kezelésére alkalmas MEA készülékben (Multi Channel Systems) az agyszeleteken a Schaffer-kollaterálisokat egy elektródon keresztül egy kétfázisú impulzussal ( $-100 \mu\text{s}/+100 \mu\text{s}$ ) ingereltük 0,0166 Hz-en, minden szelet esetében ugyanazon régióban. A CA1 régió *stratum radiatumjának* proximális részében detektálható excitatórikus posztszinaptikus mezőpotenciálok (fEPSP) amplitúdóit analizáltuk. 30 perccel a stimulálás után meghatároztuk az alapvonal és a maximum közötti amplitúdókülönbséget, majd a továbbiakban az ehhez rendelhető gerjesztés 30%-át alkalmaztuk. 15 percig tartó kontroll-szint mérést követően „theta-burst” stimulációs (TBS) protokollt alkalmaztunk a maximális amplitúdóval, ezzel indukálva az LTP-t, melyet 60-180 percig monitoroztuk.

## 4.6 *In vivo* magatartásvizsgálatok

### 4.6.1 Állatkísérletes engedélyek számai

Az állatokkal végzett kísérletek esetében mindenkor érvényesnek tekintettük és alkalmaztuk az Európai Közösség Tanácsának, kísérleti állatok felhasználásáról és védelméről szóló direktíváit (86/609/EEC, 2010/63/EU). A pontos kísérletekre érvényes engedélyeket mind a Csongrád-Csanád Megyei Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Főosztály, mind a Szegedi Tudományegyetem Állatkísérletes Etikai Tanácsa jóváhagyta, a következő engedélyszámok alatt:

- Oxigénmegvonásos *ex vivo* agyszeleten történő MTT-mérés: I-02442/001/2006
- RT-CES mérések: XVI/834/2012
- DMT és PRE-084 hatása a neurogenesisre: XXVI./3644/2017, I-74-16/2017
- SOP alkalmazása állatkísérletekben (Kasza): XVI/03835/001/2006
- Állatkísérletek P33-mal: XVI/1248/2017, XXVI./3644/2017
- Neurogenesis longitudinális vizsgálata: XXVI./3642/2017, XXVI./3643/2017

### 4.6.2 A Morris Water-maze (MWM) kísérlet

A kezeléseket hatása az állatok térbeli memóriájára és tanulási képességeire MWM kísérleti rendszerben került felmérésre. A kísérletek során az állatok a kezelést követő pihenési időszak után egy tanulási feladatot kapnak, melyben víz-elkerülési ösztönük motiválja őket a feladat elvégzésére. Egy nagy méretű, kör alaprajzú medencében elhelyezett platform helyzetét kell memorizálniuk, naponta kétszer, 5 napon át tartó tréning keretében. A medencében tejjel

átláthatatlanná tett 23 °C-os víz található olyan magasságban, ami az állatokat úszásra kényszeríti, a platform a medence 4 negyedének egyikében, 0,5 cm-rel a víz felszíne alatt található. A medence körül elhelyezett állandó pozíciójú tárgyak az állatok számára elősegítik a platform relatív pozíciójának memorizálását. Az állatok addig úszhatnak, míg meg nem találják a platformot, de 90 s után vagy rásegítjük, vagy ráhelyezzük őket a platformra, ahol további 15 s-ot tölthetnek el. A platform pozíciója és az állatok indulópontja a 4 kvadránsban naponta véletlenszerűen változik. Az állatok nyomvonalát egy videokamera rögzíti, mely szoftveresen vezérelt (Ethovision XT8). A nyomvonal analizáló rendszer méri a platform megtalálásához szükséges időt, az úszási sebességet, meghatározza az úzás úthosszát, és a medence négy kvadránsában eltöltött időt.

#### 4.7 Molekulamodellezés, elméleti kémiai számítások

##### 4.7.1 REMD modellezés az $A\beta_{1-42}$ konformációjának meghatározására

Az izo- $A\beta_{1-42}$  és a konvencionális  $A\beta_{1-42}$  kiindulási konformációinak jellemzésére a replika-kicserélődéses molekuladinamikai (REMD) szimulációt alkalmaztuk [281, 282]. A szimulációkat 2,2,2-trifluoroetanolban (TFE) végeztük. Ez az oldószer azonos szerkezetstabilizáló tulajdonságokkal rendelkezik, mint a HFIP, mellyel a szintetikus  $A\beta_{1-42}$ -t kezeljük a szintéziskor esetlegesen keletkező aggregátumok feloldása céljából, viszont a TFE a szimulációs modellbe könnyebben illeszthető. A szintézis és tisztítás körülményeinek megfelelően választottuk meg a két peptid protonáltságát.

Egy 2000 lépéses minimalizálást követően 300 K-en, állandó nyomáson egy 5 ns-os dinamikával alakítottuk ki a konformációs egyensúlyt a rendszerben, majd az REMD szimuláció során 300-410 K között 48 kiválasztott hőmérsékletre fűtöttük fel a replikákat, 10 ns alatt. Ezekből kiindulva 100 ns-os Langevin dinamikai szimulációkat hajtottunk végre. Az egymást követő replikák cseréjét 2 ps-ként végeztük, a végső kicserélődési valószínűség 0,15 és 0,2 közé esett. A szerkezetekhez AMBER ff98SB erőter-paramétereket rendeltünk [283], a REMD szimulációt a Gromacs 4.5 csomaggal végeztük [284]. Az izo- $A\beta_{1-42}$  módosított részéhez és a protonált csoportokhoz rendelhető paramétereket a „generalized amber force field” (GAFF) metodikával nyertük [284]. A töltések számítására a „restrained electrostatic potential” (RESP) metodikát használtuk [285].

A konvencionális és izo- $A\beta_{1-42}$  közötti konformációbeli eltérések meghatározására a legalacsonyabb hőmérsékletre tartozó szimuláció utolsó 50 ns-ának konformációs sokaságait jellemeztük. A másodlagos szerkezeti elemekre vonatkozó analízist a diéder-alapú szegmensazonosítás és besorolás (DISICL) metodika segítségével végeztük el [286]. A H-kötések felderítésére a VMD programot használtuk. Bár az alkalmazott metodika és szimulációs idő nem alkalmas a teljes szerkezet jellemzésére, a kapott eredményekből olyan lokális szerkezeti különbségeket azonosíthatunk a két peptid esetében, amelyek alapvetően meghatározzák a jellemző globális konformációs változásokat és az aggregáció folyamatát.

##### 4.7.2 A foldamer szekvenciák térszerkezetének modellezése

A molekulamechanikai számításokat a „Molecular Operating Environment”-ben (MOE) végeztük. Az energia modellezésekhez MMFF94x erőteret használtunk a van der Waals és Coulomb kölcsönhatások kizárása nélkül, GB/VI implicit víz modellel. A konformációk kijelölését a MOE-ba épített MC/MD szimulációval, 300 K-en végeztük, minden 10 MD lépés után véletlenszerű MC mintavételt alkalmazva. Az MC/MD szimulációt 2 fs/20 ns lépésekkel hajtottuk végre, a konformációkat minden 1000 MD lépés után kinyertük, így 10 ezer szerkezethez jutottunk. Az NMR-adatokhoz igazított szimulációk esetében a számított távolságok maximumának meghatározásához az izolált spin-pár közelítést használtuk, az

általánosan használt osztályozási sémával (erős: 2,5 Å, közepes: 3,5 Å, gyenge: 5,0 Å), míg az alsó határérték 1,8 Å volt. Ennek megfelelően kényszereket alkalmaztunk a szimuláció során. A végső szerkezeteket többlépcsős eljárás segítségével optimalizáltuk.

#### 4.7.3 Az S1R modulátorok szűrésére alkalmazott modell kidolgozása

A PDB adatbázisból két S1R szerkezetet használtunk az *in silico* szűrési módszer kidolgozásához, az agonista (+)-pentazocinhoz rendelt 6DK1 [188] és az antagonistá PD144418 molekulához rendelt 5HK1 [184] konformációt. Az aktív molekulaszetthez a BindingDB-ből 190, az S1R-hez nagy affinitással kötődő ligandumot választottunk ki ( $K_i \leq 1$  nM) [287]. Ezekből a Schrödinger programcsomag Canvas programja segítségével kiválasztottunk 20 egymástól a lehető legjobban eltérő szerkezettel rendelkező molekulát, majd ezek mindegyikéhez a DUD-E adatbázisból [288] hozzárendeltünk 50, hasonló fizikai-kémiai paraméterekkel rendelkező „csali”-molekulát. Ezek megfelelő mértékű szerkezeti különbözőségét az adott aktív molekulától szintén megvizsgáltuk.

A dokkoláshoz a Schrödinger programcsomag [289] „Glide-based Virtual screening” protokollját használtuk, ami becslést ad a ligandumok  $\Delta G$  kötési szabadentalpiájára is. A ligandumok dokkolásra való előkészítését a Ligprep modul segítségével végeztük, majd extra precíziós (XP) dokkolást hajtottunk végre OPLS3e erőter felhasználásával [290].

A dokkolási eljárás hatékonyságát többféle mérőszámmal is jellemeztük. Az aktív molekulák szettjét ( $S_A$ ) egyesítve a csali molekulákéval ( $S_{CS}$ ) nyerjük az  $S_{ACS}$  szettet, melyben összesen  $N$  darab molekulát feltételezve  $A$  db aktív és  $N-A$  csali molekula található. A VS eljárásunk célja egy olyan rangsor felállítása, melyben az aktivitás és a rangsorbéli pozíció jól korrelál egymással, azaz a legaktívabb molekulák a rangsor elején halmozódnak fel. Az ú.n. dúsulási faktor („enrichment factor”),  $EF_{x\%}$  megadja az adott százalékos értékhez tartozó aktív molekulák ( $a_{x\%}$ ) arányát a teljes mennyiséghez képest ebben a tartományban ( $n_{x\%}$ ), viszonyítva egy véletlenszerű sorrendből történő kiválasztásra jellemző arányhoz ( $A/N$ ) képest:

$$EF_{x\%} = \frac{a_{x\%}/n_{x\%}}{A/N} \quad (1)$$

Ez a mérőszám nem alkalmas különböző adathalmazokon alapuló VS eljárások összehasonlítására és értéke erősen függ az adatbázis méretétől, az  $A/N$  arány miatt. Irodalmi adatok szerint viszont jól alkalmazható olyan esetekre, ahol különböző receptor modellek hatékonyságát hasonlítjuk össze ugyanazon molekula könyvtár segítségével [291]. Esetünkben a rangsor felső 1%-ához, illetve 2%-ához tartozó EF-értékeket vettük figyelembe.

#### 4.8 Mérések kiértékelése, statisztikai módszerek

Az MTT-viabilitás-mérések, elektrofiziológiai mérések, immunfestések statisztikai analízisét az OriginPro 8 csomagba épített statisztikai modul alkalmazásával, illetve SPSS szoftverrel (IBM SPSS statistics 24) végeztük. Az ismételt mérések ANOVA eljárást követően Fisher LSD *post hoc* tesztet alkalmaztunk, a Golgi festést követő dendrittüske-meghatározáshoz a páronkénti összehasonlítást Student-teszttel végeztük. A WB-kiértékeléseknél szintén az SPSS szoftverrel Kruskal-Wallis nemparaméteres tesztet követően Mann-Whitney U-tesztet végeztünk a páronkénti összehasonlításokhoz. Az impedancia-mérések statisztikai kiértékelése a GraphPad Prism 5.03 verziójú szoftverébe épített ANOVA módszerrel és Bonferroni *post hoc* analízissel történt. Minden esetben az átlagok  $\pm$  standard hiba (S.E.M.) kerültek ábrázolásra, illetve a  $p < 0,05$  szignifikancia-megkötést alkalmaztuk.

A magatartásvizsgálatok statisztikai kiértékelésére kezdetben szintén az SPSS szoftverbe épített ismétléses ANOVA eljárást, ezt követően Fisher LSD *post hoc* tesztet alkalmaztunk. Később a páronkénti összehasonlításra alkalmas *post hoc* analízis helyett egy új, nem-

paraméteres eljárást dolgoztunk ki, melynek részletes leírása az „Eredmények és értékelésük” részben található. A konvencionális ANOVA eljárással történő szignifikancia-analízist követően elterjedten alkalmazott *post hoc* elemzések többnyire feltételezik az adatok normális eloszlását, ami ezeknél a méréseknél nem áll fenn, illetve csak a hibás pozitív döntés valószínűségének hibája állítható be ezeknél az eljárásoknál, a hibás negatív döntések valószínűségéről nem nyerünk információt. Az általunk kidolgozott eljárásban az egyváltozós adatsorból (úszási idők) kétváltozós modellt generáltunk: (1) a tréningnapok számának függvényében ábrázolt átlagos úszási időkre illesztett egyenes meredekségének reciproka, mely egy működő tanulási folyamatban negatív érték, illetve a hatékony tanulás esetén ez a reciprok érték közelít a nullához; (2) az utolsó tréningnaphoz rendelhető átlagos úszási idő, melynek nullához minél jobban közelítő értéke szintén a hatékony tanulást jelzi. A két változót kombinálva egyrészt egy permutációs tesztet alkalmaztunk, mely a hibás pozitív döntés hibájának meghatározását tette lehetővé, míg a hibás negatív döntés hibájának becslésére bootstrapping mintavételi eljárást alkalmaztunk. Mindkét esetben 50,000 adatsort generáltunk, melyeket egy MatLab környezetben fejlesztett szkripttel analizáltunk. A további magyarázatok az eredményeknél találhatók.

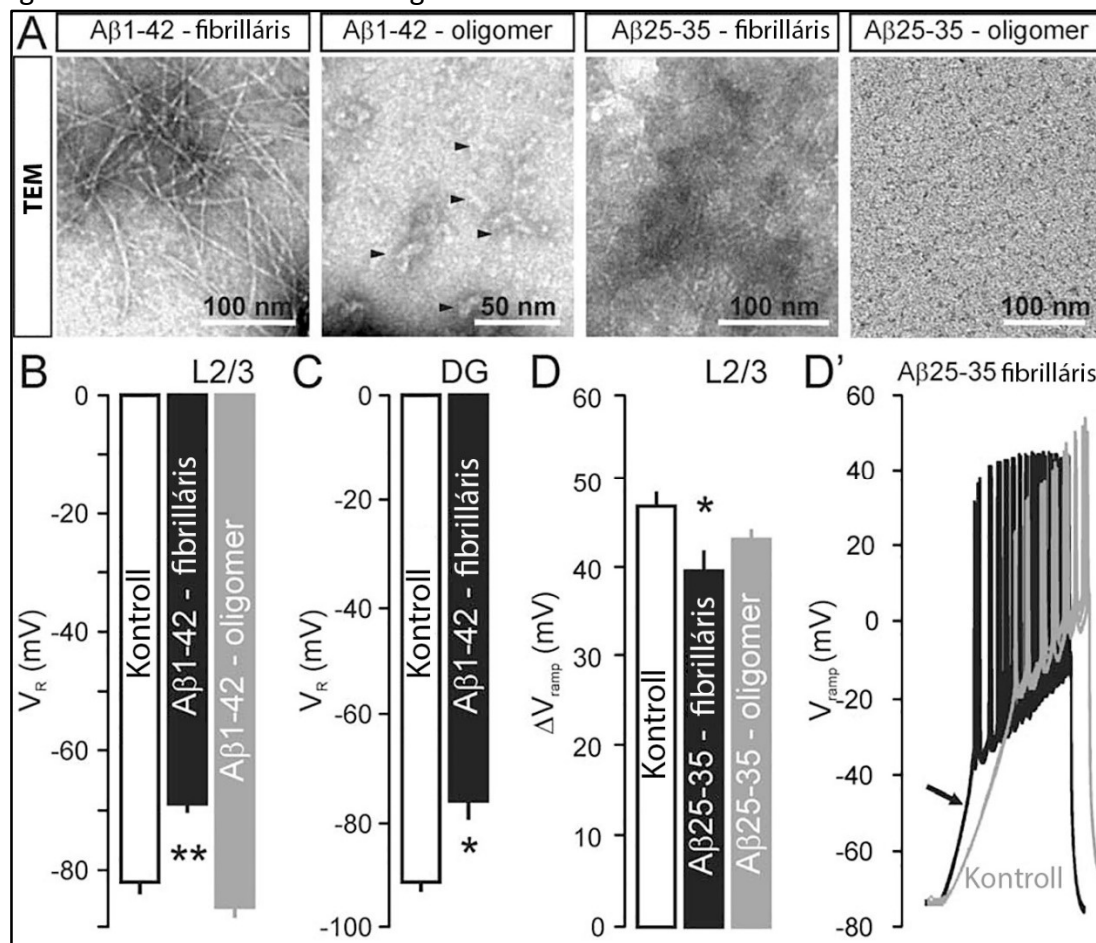
## 5. Eredmények és értékelésük

### 5.1 Központban az AKH

#### 5.1.1 Szintetikus amiloidot alkalmazó kísérleti rendszerek fejlesztése

##### 5.1.1.1 Szintetikus A $\beta$ peptidek előállítása biológiai vizsgálatokhoz

Optimalizált szintézisprotokollok és mintakészítési eljárások kombinációjával előállított különféle A $\beta$  fragmenseket több alkalommal is használtunk biológiai vizsgálatokhoz [292-296]. A következőkben részletezett kísérletben a rövidebb, de még mindig aggregálódó A $\beta$  formák felhasználásán alapuló megközelítést alkalmaztunk [297]. *In vitro* elektrofiziológiai mérésekben az SPPS-sel előállított konvencionális A $\beta_{1-42}$  mellett az A $\beta_{25-35}$  peptid hatását is megvizsgáltuk. A mintakészítési protokollok fontos részét képezte a szintetikus peptid esetenkénti előkezelése DMSO-val, mellyel a feldolgozás során keletkező aggregátumok feloldhatók. Ilyen esetben a minta természetesen tartalmazza ezt az anyagot is, mely a sejtmembrán szerkezetére is hatással van, ezért mennyiségét mindenképpen korlátozni kell. Az A $\beta_{25-35}$  fragmens aggregációját, illetve neurotoxikus hatását *in vitro* viabilitási tesztben már korábban leírta csoportunk [298, 299]. A különböző aggregációs fokú A $\beta$  preparátumok jól alkalmazhatók *in vitro* sejtenyészetek kezelésére, ahol az expozíciót nem gátolja szöveti, vagy keringési rendszer által támasztott gát.



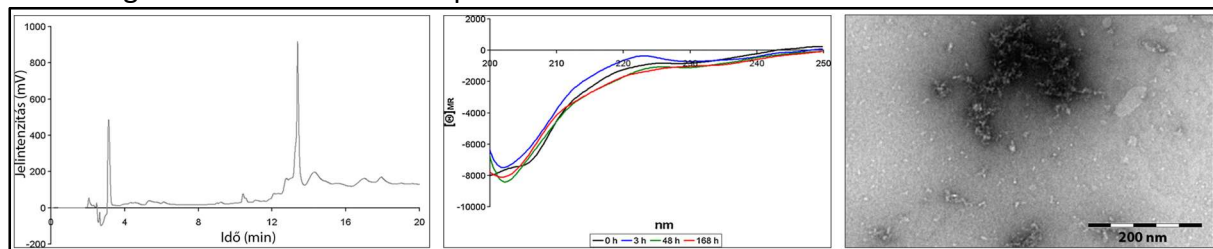
**9. ábra** A: Az agyselesten végzett *in vitro* elektrofiziológiai vizsgálatokban alkalmazott A $\beta$  minták aggregációs fokának vizsgálata TEM-mel. (nagyítás x46000, és x64000). B-C: Az A $\beta_{1-42}$  hatása a neuronok nyugalmi potenciáljára az L2/3 rétegben, illetve a DG-ben. D-D': Hasonló hatást lehetett kiváltani neurotoxikus A $\beta_{25-35}$  fibrillumok alkalmazásával. Ebben az esetben a piramissejtek a membránpotenciál „threshold”-értékét csökkentik, amit a nyíllal jelzett pontban a görbe meredekebb felfutása reprezentál.

A [297] tanulmány kísérleteiben 11-15 napos genetikailag nem módosított egerekből és patkányokból nyert agyszeletek piramis-sejtjeit vizsgáltuk fibrilláris, illetve oligomer  $A\beta_{1-42}$  és  $A\beta_{25-35}$  aggregátumokkal történő közvetlen kezelést követően, az elektrofiziológiai gerjeszthetőség szempontjából, „patch-clamp” módszerrel (**9. ábra**).

Az alkalmazott  $A\beta_{1-42}$  minták TEM-analízise (**9.A ábra**) felfedte, hogy a DMSO hatására a fibrilláris aggregátumok helyett a fekete nyilakkal jelzett, szférikus oligomerek képződtek. A kis méretű  $A\beta_{25-35}$  oligomerek detektálása az akkoriban rendelkezésünkre álló konvencionális TEM technika 2 nm-es feloldóképességi-határa miatt nem volt lehetséges. Az elektrofiziológiai mérések során az agyszelet különböző anatómiai területein a neuronok nyugalmi potenciálja megváltozott a fibrilláris  $A\beta$  formák hatására, míg az oligomerek alkalmazásával ezt a hatást nem lehetett elérni (**9.B, D**: piramis-sejtek a neokortikális 2. és 3. réteg határán (L2/3), illetve **9.C**: szemcsesejtek a DG-ben). Ez a neuronok gerjeszthetőségének mértékét befolyásolja, ami feltételezésünk szerint magyarázatot adhat az AK-ban fellépő epileptiform agyi tünetek fellépésre. Korábbi tanulmányok [300] leírják a transzgén állatokban termelődő  $A\beta$  által okozott membrán-depolarizáció és az epilepsziás rohamok fellépése közötti erősítő összefüggést. Ezeket az eredményeket erősítik meg a mi kísérleteink, melyek szerint a patkány agyszeleteken végzett *in vitro* kísérletben detektálható erőteljes nyugalmi potenciál csökkenés a vizsgált neuronok extrém hiperexcitabilitását jelzi, illetve azt is sikerült bizonyítani, hogy valószínűleg a fibrilláris neurotoxikus aggregátumok felelősek ezért a hatásért.

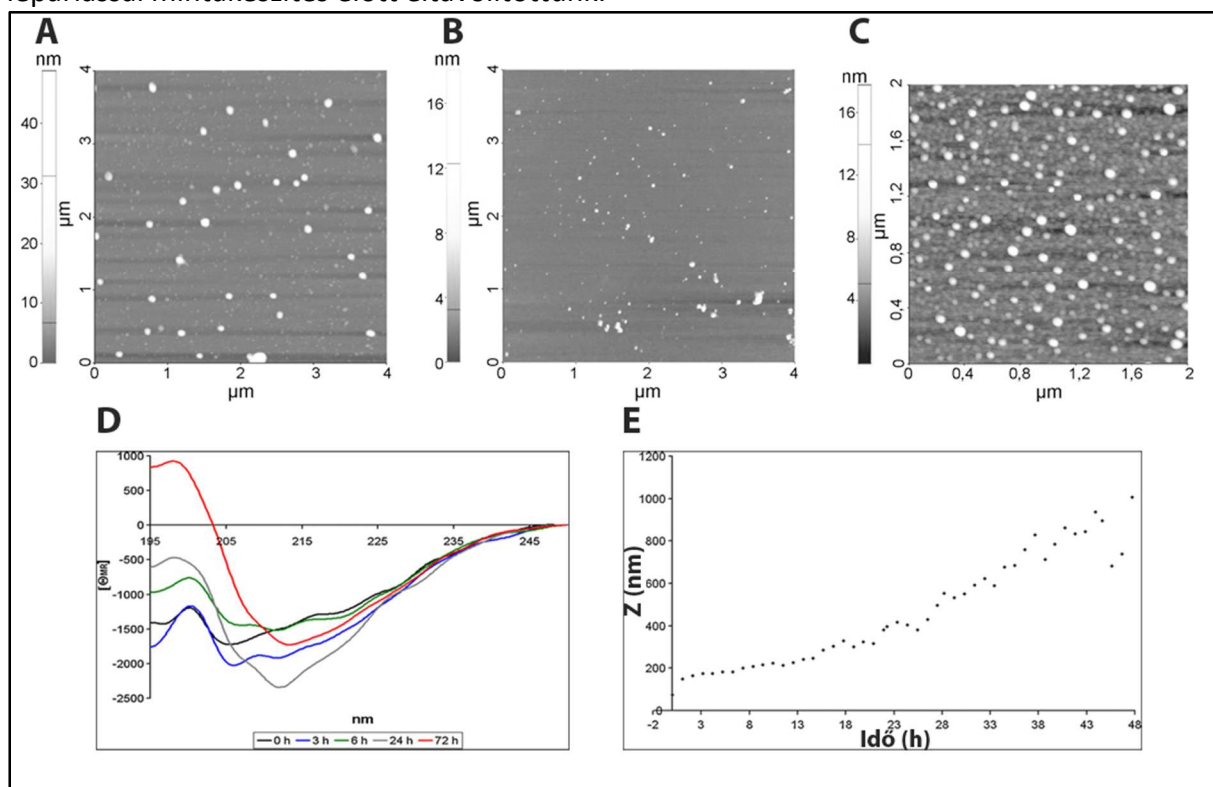
#### 5.1.1.2 Optimalizált eljárás kidolgozása $A\beta_{1-42}$ peptid szintézisére: az izo- $A\beta_{1-42}$

A 2.2.2.4-es fejezetben részletezett megfontolások miatt csoportunk célul tűzte ki a már leírt szintézis-módszerek további optimalizálását, illetve annak bizonyítását, hogy a keletkező peptid kedvezőbb tulajdonságokkal bír, de felhasználásával a konvencionális szekvenciával megegyező bioaktivitású preparátum állítható elő [301]. Az Fmoc-metodikában esetlegesen fellépő elégtelen deprotektálás illetve a hasításkor bekövetkező diketo-piperazin képződés Boc-szintézis alkalmazásával kiküszöbölhető. A szintézis lépései a 4.1.1 fejezetben találhatóak. A nyers terméket kromatográfiával analizálva sem diketopiperazin-képződés, sem hidrolízis termék jelenlétét nem tudtuk kimutatni, a fő csúcs MS-analízisével a kívánt terméket tudtuk főtermékként azonosítani (**10.A ábra**). A tisztított izo- $A\beta_{1-42}$  2-es pH-jú TFA-s oldatának CD vizsgálata szerint (**10.B ábra**) az oldatfázisban található molekulák többnyire rendezetlen konformációval jellemezhetők, ami szobahőmérsékleten akár egy héten át változatlan marad. Habár a megváltozott szerkezetnek köszönhetően az aggregáció visszaszorulását vártuk, a tisztított peptid savas oldatában TEM vizsgálattal kimutatható volt fibrilláris szerkezethez közelítő aggregátumok jelenléte (**10.C ábra**). Ez azzal magyarázható, hogy a peptid, hidrofób szekvenciarezszeleteinek köszönhetően még ebben a megtört formában is képes bizonyos fokú önrendeződésre, habár láthatóan nem a konvencionális sima felületű, akár mikrométeres hosszúságot is elérő fibrillumok képződnek.



**10. ábra** Az izo- $A\beta_{1-42}$  peptid jellemzése (0,1% TFA/ $H_2O$  elegyben,  $c = 50 \mu M$ ). **A**: nyers peptid kromatogramja. **B**: A tisztított peptid CD spektrumának változása az idő függvényében. **C**: a peptidoldatban található aggregátumok TEM-vizsgálata

AFM vizsgálatokkal sikerült igazolnunk, hogy az izo-A $\beta_{1-42}$  peptidből lehetséges viszonylag nagy koncentrációjú (50  $\mu\text{M}$ ), A $\beta$  oligomereket tartalmazó preparátum készítése oly módon, hogy a peptidet előzetesen kaotróp oldószerben történő feloldással (HFIP) kezeltük, amit vákuum-lepárlással mintakészítés előtt eltávolítottunk.



**11. ábra A-C:** AFM vizsgálatok: az izo-A $\beta_{1-42}$  peptidből pH=7,4-es PBS pufferben történő közvetlen oldáskor ( $c=50 \mu\text{M}$ ) keletkező oligomerek (A), a peptid d.i. vízben történő előoldását követő 7,4-es pH beállításával kapott oligomerek (B), majd ugyanezen minta AFM vizsgálata 1 h szobahőmérsékleten történő inkubáció után (C). **D:** az SOP-vel nyert minta konformációváltozásának követése CD-spektroszkópiával. **E:** az SOP-vel nyert minta aggregációjának követése DLS-sel.

Az izo-A $\beta_{1-42}$  pH=7.4-es pufferoldatban, pl. PBS-ben történő előoldása során már szférikus oligomerek képződnek (**11.A ábra**), melyek átmérője 5-10 nm. A peptid ioncserélt vízben történő előzetes feloldása, majd azt követően az O $\rightarrow$ N acilvándorláshoz szükséges semleges pH beállítása viszont kisebb átmérőjű (2-5 nm) oligomerek képződését eredményezi (**11.B ábra**). A vízzel történő előkezelés előnye, hogy nem szükséges a biológiai rendszerek által esetleg nehezen tolerálható kaotróp oldószer jelenléte a mintaoldatban. Az eljárás leírása a 4.2.2 fejezetben található, „standard oligomerizációs protokollként” (SOP) hivatkozom rá. Ilyen minta aggregációjának követése látható a **11.C ábrán** (AFM felvétel), a konformáció változása megfigyelhető a **11.D ábrán** (CD vizsgálat), ahol a  $\beta$ -rétegre jellemző spektrum kialakulása figyelhető meg az idő előrehaladásával, illetve az oligomerek méretnövekedése is detektálható DLS mérésel (**11.E ábra**).

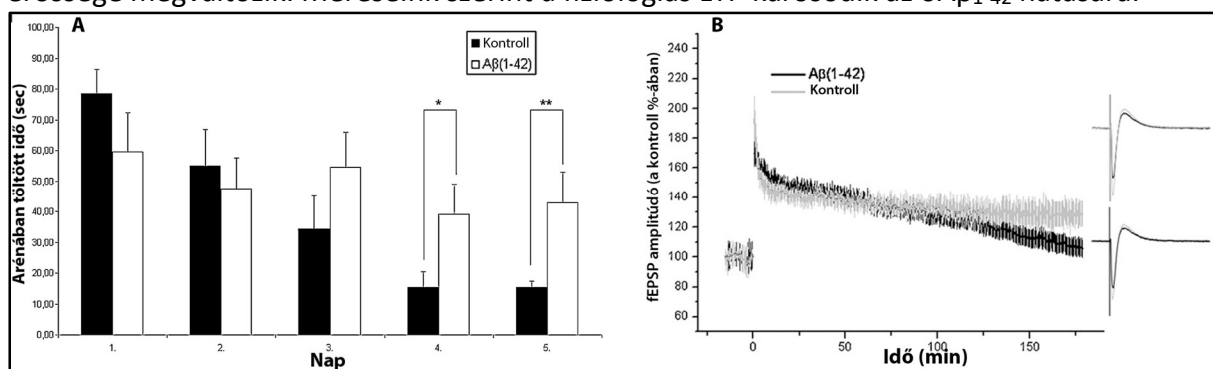
Az SOP alkalmazásakor tehát viszonylag hosszú ideig stabilis, aggregálódó, de a szférikus formát megtartó oligomerek képződnek. Ezzel párhuzamosan az izo-A $\beta_{1-42}$  peptidből fibrillaris szerkezetű aggregátumok előállítására kidolgoztunk egy standardizált fibrillumképzési protokollt (SFP), mely magában foglal egy több lépcsőben történő pH-változtatást. A kiindulási vizes oldást követően a pH-t először 7,4-re, majd a fibrillumképződéshez kedvező 3-as értékre állítjuk és az oldatot preformált fibrillumok vizes oldatával beoltjuk, így inkubáljuk 3 napig 37 °C-on, a fibrillumképzés maximalizálása érdekében.

### 5.1.1.3 Az SOP és SFP szerint előállított aggregátumok alkalmazása biológiai modellrendszerekben

Az AKH-n alapuló biológiai modellek többségében az AK-ra jellemző egyes molekuláris szintű mechanizmusok aktiválhatók A $\beta$  peptid bejuttatásával a kísérleti rendszerbe. A bejuttatás módja, illetve a bejuttatott A $\beta$  mennyisége és a különböző aggregációs formák aránya a mintában hatással van a vizsgálni kívánt biológiai folyamatra. Kutatócsoportunk ezért számos alkalommal próbálta az SOP-t, illetve SFP-t alkalmazó különböző kísérleti tervek eredményességét és reprodukálhatóságát meghatározni, a kapott eredményeket pedig metodikai fejlesztéseként publikáltuk.

Az SOP-vel nyert oligomerek biológiai aktivitását több kísérletben is sikerült igazolni. A további fejezetekben leírásra kerülő eljárások és a kapott eredmények oligomer A $\beta_{1-42}$  alkalmazása esetén ezen a protokollon alapultak. Az izo-A $\beta_{1-42}$  peptidből kiinduló SOP kifejtésével egyidőben a módszert validáltuk egy *in vivo* kísérletben is, mely során az oligomerek memóriára és tanulási képességre kifejtett hatását a peptid patkány egyedekbe történő ICV injektálását követően MWM kísérletben vizsgáltuk (**12.A ábra**). A kezelt állatok 20 °C-on 12 órán át aggregált peptid 50  $\mu$ M-os HCBS-es oldatát kapták, 7,5-7,5  $\mu$ l oldat mindkét oldali, egyszeri injektálásával. A patkányok tanulási tesztjére az injektálást követő 8. naptól került sor. Az ábrán az arénában platformkereséssel töltött átlagos idő látható, a kezelt és a kontroll, csak mintapufferrel oltott állatokat összehasonlítva. Az eredményekből látszik, hogy az oligomerek injektálása olyan agyi folyamatokat indított meg az állatokban, mely a tanulási képességüket a kísérlet 4-5. napján már szignifikánsan lerontotta, a platform megtalálásához szükséges idő ezen állatok esetében jelentősen hosszabb volt.

Az oA $\beta_{1-42}$  *in vitro* elektrofiziológiai kísérletben kifejtett hatása a **12.B ábrán** látható. Patkány HC agyszeleten a CA1 neuronoknak a Schaffer-kollaterális ingerlésének hatására kialakuló fEPSP-jét az oA $\beta_{1-42}$  modulálni képes. A szinaptikus plaszticitás széles körben alkalmazott modellje szerint az alapszinten mérhető fEPSP amplitúdó „theta-burst” ingerlési protokoll hatására tartósan megnövekszik, hosszútávú potencírozódás jelensége alakul ki, a szinapszisok erőssége megváltozik. Méréseink szerint a fiziológiás LTP károsodik az oA $\beta_{1-42}$  hatására.



**12. ábra, A:** a standard mintakészítési protokollal előállított oligomer A $\beta_{1-42}$  hatása patkányok memóriára és tanulási folyamataira MWM kísérletben. **B:** Patkány HC agyszeleten a CA1 régióban kiváltott LTP károsodik A $\beta_{1-42}$  oligomerek hatására.

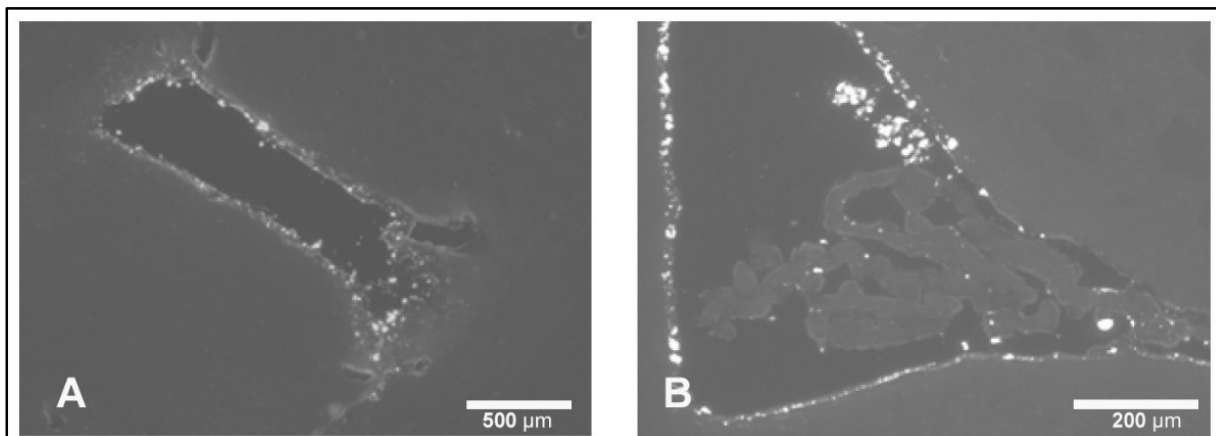
A következő eredményeink jól illeszkednek ahhoz a mostanra a humán gyógyszerkutatásban is egyre inkább érvényesülő irányhoz, ami az oligomerek mellett a protofibrillumokat is terápiás célpontként jelöli meg [302].

Az injektációs modellek kialakításánál kulcsfontosságú a bejuttatás módjának gondos megtervezése. Már a 4,5 kDa-os A $\beta_{1-42}$  monomer diffúziója az injektálás helyétől a célsejtek felszínére is problémás lehet, ami hatványozottan jelentkezik a nagyobb méretű oligomerek és fibrillaris aggregátumok esetében. Fluoreszcens kromofórral (AMCA) N-terminálison jelzett



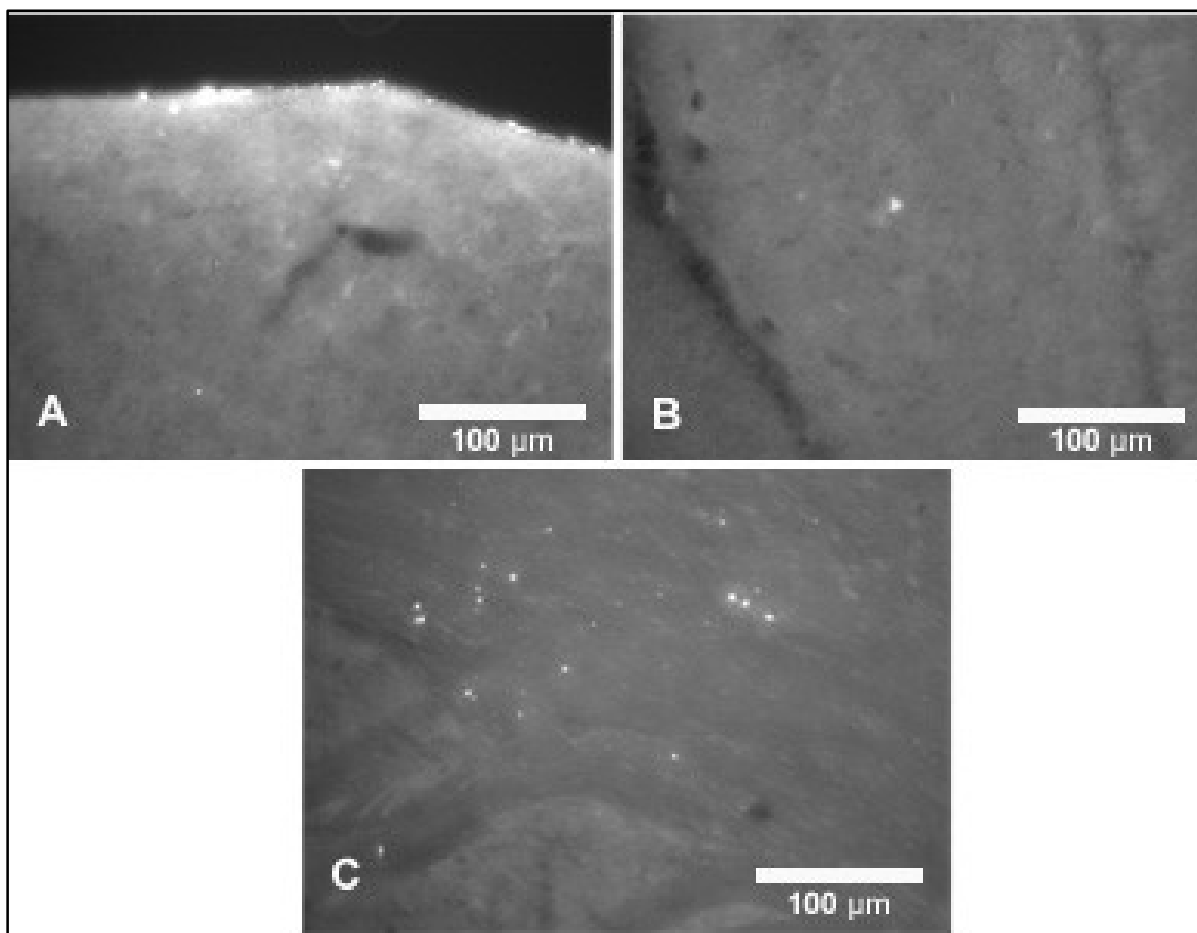
$A\beta_{1-42}$  és izo- $A\beta_{1-42}$  peptid 2:7 molarányú elegyének felhasználásával, az SOP és SFP protokollok szerint állítottunk elő aggregátumokat, amiket patkányok agykamrájába injektáltunk. Ezután az állatokat a bejuttatáshoz képest különböző időpontokban terminálva megvizsgáltuk, hogy mely agyterületeken detektálható fluoreszcens  $A\beta_{1-42}$  aggregátumok jelenléte. Az ilyen jellegű bejuttatási kísérleteket sokszor éri az a kritika, hogy mivel csak a fluoreszcens kromofórtól származó jelet detektáljuk, nincs arról bizonyítékunk, hogy az a teljes szekvenciájú peptidtől, vagy lebontási termékétől származik. Az  $A\beta_{1-42}$  esetében ezt a problémát a peptid aggregációja, a kromofór pozíciója a peptiden, és a fluoreszcens mikroszkópia standard felbontási képességének korlátossága együttesen küszöböli ki. Az általunk alkalmazott nagyításokon csak a viszonylag nagy méretű aggregátumoktól származó jelek látszanak, amik egyértelműen több  $A\beta_{1-42}$  molekula összerendeződésével képződnek. A peptid N-terminálisa az aggregátumok külső felszínén helyezkedik el, ami természetesen enzimek által támadható. Az esetleg ily módon képződő fluoreszcens fragmensek aggregációs készsége viszont elhanyagolható, belőlük a mikroszkópos vizsgálatban észlelhető méretű aggregátum nem képződik, önállóan viszont, kis méretük miatt, az alkalmazott nagyítások mellett nem detektálhatóak.

A **13. ábrán** két, patkány agykamráról készített reprezentatív képet láthatunk a fibrillumok ICV injektálása után 60 perccel. Jól látszik, hogy ezek az aggregátumok kitapadnak az agykamra falára, diffúziójuk az agyszövetbe nagy mértékben gátolt. Az aggregátumok jelenléte az agy más területein nem észlelhető (kép nélkül).



**13. ábra** Reprezentatív felvételek ICV bejuttatású, fluoreszcens kromofórral jelölt  $A\beta_{1-42}$  fibrillumok detektálásáról 1 h-val a bejuttatás után. A fibrillumok nem jutnak túl az agykamra falán, a falhoz tapadva és a kamratérben észlelhetők.

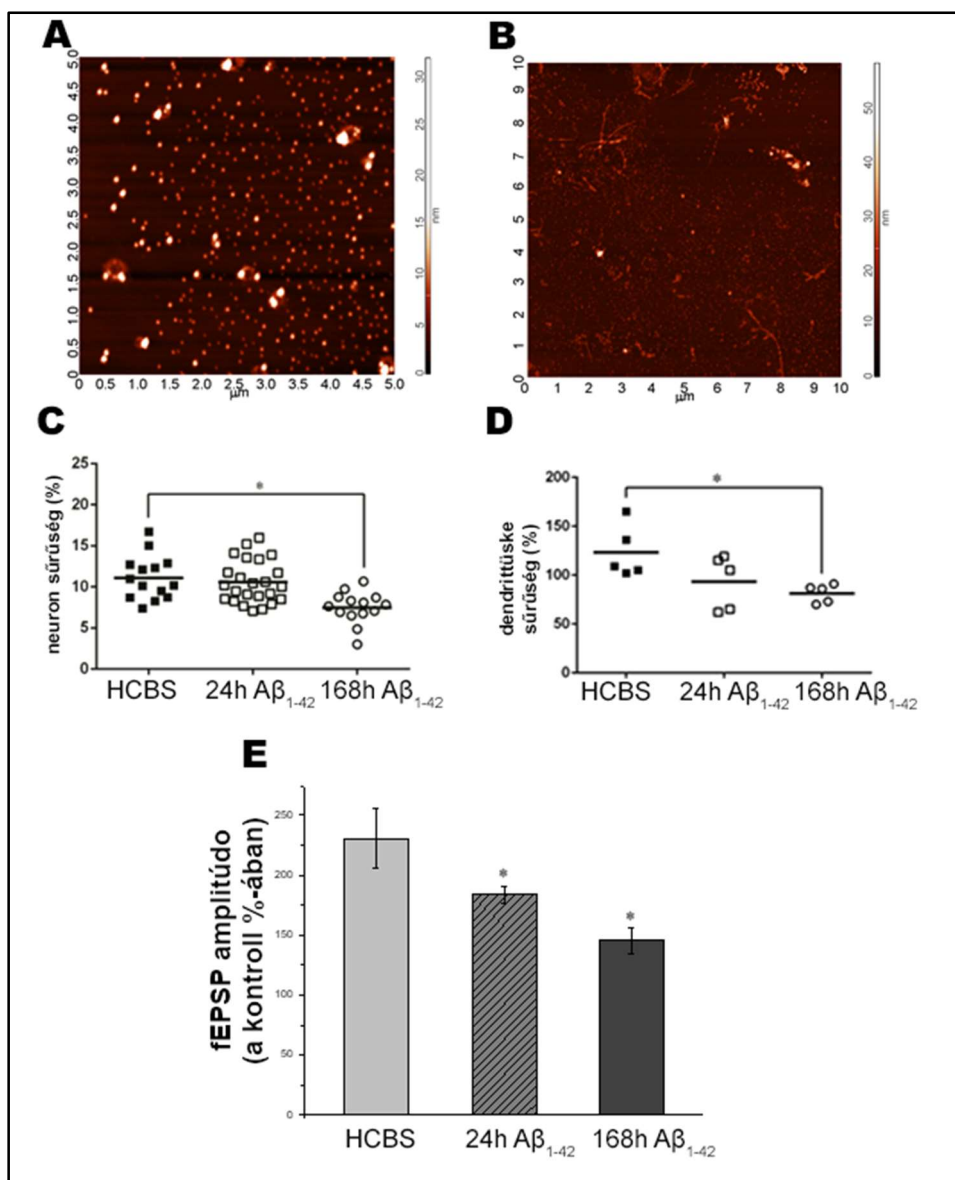
Oligomereket alkalmazva (**14.A ábra**) már 5 perccel az injektálás után észlelhetjük azok kamrából történő kijutását, illetve a HC területén is detektálhatunk már fluoreszcens jelet (**14.B ábra**). 60 perccel a bejuttatás után az agy különböző területein egyértelműen azonosíthatók az aggregátumoktól származó fluoreszcens jelek (**14.C ábra**), bizonyítva, hogy a glimfatikus rendszer segítségével a megfelelő méretű aggregátumok viszonylag gyorsan eljutnak az agyszövet különböző területeire.



**14. ábra** Fluoreszcens  $A\beta_{1-42}$  oligomerek észlelése ICV bejuttatás után. **A:** az oligomerek 5 perccel a bejuttatás után kijutnak az agykamrából. **B:** fluoreszcens jel észlelhető a HC-ban 5 perccel injektálás után, **C:** 60 perccel bejuttatás után az agyállomány különböző területein.

Az izo- $A\beta_{1-42}$  peptid alkalmazása lehetővé teszi jellemzően szférikus oligomereket tartalmazó minták alkalmazását viszonylag hosszú kísérleti időintervallumokban. Ez a módosított AKH szerint előnyös, hiszen így az aggregáció korai szakaszát jellemző toxikus forma vizsgálható, a kívánt hatás eléréséhez szükséges mennyisége a koncentráció gondos megválasztásával optimálisan beállítható. Az aggregáció időfüggését viszont minden esetben figyelembe kell venni, és az alkalmazott protokollt az aggregátumok morfológiai vizsgálatával is ki kell egészíteni. A **15.A-B** ábrák az SOP segítségével előállított oligomerek morfológiáját mutatják AFM vizsgálatokban, 37 °C-on 24 óra (**15.A ábra**), illetve 168 óra (**15.B ábra**) inkubáció után. Az AFM mérésekből nyerhető egyik kvantitatív paramétert, az adott felületen mérhető átlagos z-irányú kitérést összehasonlítva (**15.A:** 6.5 nm, **15.B:** 8,2 nm) megállapítható, hogy mindkét esetben a viszonylag kis átmérőjű aggregátumok jelenléte a meghatározó, ellenben a morfológiában jelentős eltérést tapasztaltunk; míg 24 óra alatt túlnyomóan szférikus oligomerek képződtek, 168 óra után protofibrillumok is azonosíthatók voltak.

Patkány egyedekbe ICV injektálással bejuttatva az oligomereket, és az általuk kiváltott biológiai válaszokat elemezve (**15. C-E ábrák**) arra a következtetésre juthatunk, hogy a hosszabb aggregációs idő a hatást növeli. Mind a neuronok száma (**15.C**), mind a dendritsűrűség (**15.D**) erőteljesebben csökken a 168 órás aggregátumok alkalmazása esetében. *Ex vivo* elektrofiziológiai mérésekben, melyek során a kezelt állatokból izolált hippokampális agyseleteken indukáltunk LTP választ (**15.E**), szintén a 168 órás aggregátumok erősebb hatását tudtuk detektálni.

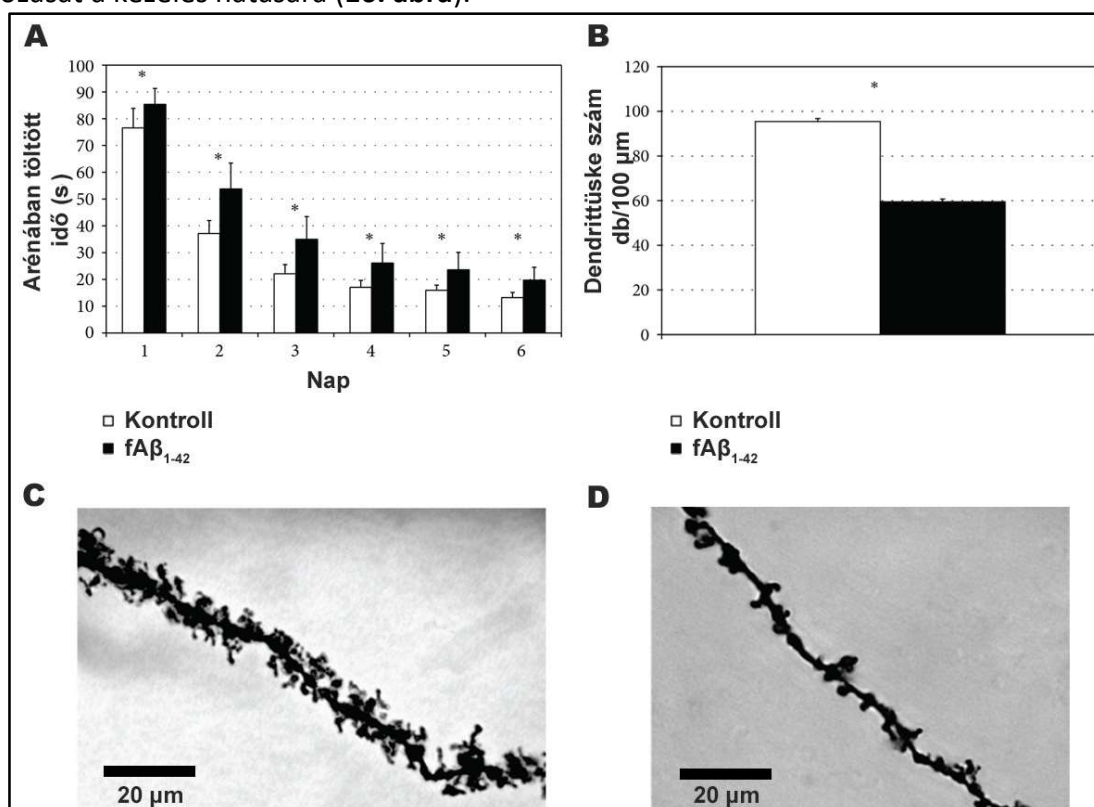


**15. ábra A-B.** A 25  $\mu\text{M}$ -os koncentrációjú  $\text{A}\beta_{1-42}$  oldat 37 °C-on, PBS-ben történő inkubálásával kapott aggregátumok AFM felvételei csillám felületen. **A:** 24 óra, **B:** 168 óra. **C:** krezilibolya festéssel detektálható neuronok sűrűsége patkányok agyában a HC területén, 7 nappal a kétféle aggregátummal történő kezelés után. **D:** ugyanezen állatokban meghatározott dendrittszűrűség alakulása. **E:** LTP mérés a kétféle aggregátummal kezelt egyedek agyából származó hippocampális szeletek CA1 régiójában.

Az eredmények alapján logikus feltételezni a protofibrillumok nagyobb mértékű toxikus hatását. A fibrillumok diffúziójára vonatkozó eredmények viszont azt valószínűsítik, hogy a fibrillaris struktúrák nem, vagy csak igen korlátozott mértékben jutnak el az agyszövetbe. Az ellentmondás feloldására két magyarázat is lehet. Egyrészt a fluoreszcens kísérletben jellemzően nagyobb méretűek voltak a fibrillaris struktúrák, akár  $\mu\text{m}$ -es hossz és átlagosan 6-10 nm átmérő jellemezte őket, míg a protofibrillumok 2-300 nm hosszúsággal és az oligomerek átmérőjét közelítő 2-5 nm-es vastagsággal rendelkeztek, ezáltal feltételezhetően diffúziójuk kevésbé volt gátolt. A másik magyarázat szerint az aggregációnak ezen szakaszában a protofibrillumokkal egyensúlyt tartó oligomerek szerkezete is eltérő lehet a korai oligomerekétől, ami nagyobb toxicitást eredményezhet. Az eredményeink humán AK-ra történő transzlációja természetesen erősen korlátozott, ennek ellenére mégis érdekes lehet

annak a ténynek a tükrében, hogy a jelenleg fejlesztés alatt álló, még ígéretesnek tartott humán antitestes terápiák a jobban aggregálódó, ezért fibrillumképzésre inkább hajlamos piroglutamát- $A\beta_{3-42}$ -t, illetve a protofibrillumot alkalmazzák antigénként.

Az  $fA\beta_{1-42}$  aggregátum biológiai hatásáról további bizonyítékokat nyertünk abban a kísérletsorozatban, ahol a korlátozott diffúzió problémájának kiküszöbölése céljából a peptidoldatot közvetlenül a patkányok hippokampuszába injektáltuk [303]. Ehhez az SFP-t alkalmaztuk, majd centrifugálással kinyertük a fibrillumokat tartalmazó pelletet, amit azután 100 mM-os HEPES pufferben (pH=7,5) szuszpendáltunk 222  $\mu$ M-os végkoncentrációt beállítva. Egyszeri, egy oldali injektálást követően 14 nap múlva az állatok tanulási képességét MWM kísérletben teszteltük, illetve hisztológiai vizsgálatokkal megállapítottuk a dendrittüske-szám változását a kezelés hatására (**16. ábra**).



**16. ábra** Az  $fA\beta_{1-42}$  IHC injektálást követően befolyásolja az állatok tanulási képességét, illetve a neuronok nyúlványain a dendrittüske-számot. **A:** MWM kísérletben az  $fA\beta$ -val kezelt állatok minden tanulási napon szignifikánsan hosszabb idő alatt találták meg a platformot, mint a PBS-sel kezelt kontroll állatok. **B:** a HC CA1 régiójában, a neuronok nyúlványain, a dendrittüskék száma szignifikánsan kisebb az  $fA\beta_{1-42}$ -val kezelt állatokban, mint a kontroll csoportban. **C:** egy analizált axon reprezentatív képe a kontroll csoportból. **D:** hasonló axon képe az  $fA\beta_{1-42}$ -val kezelt csoportból.

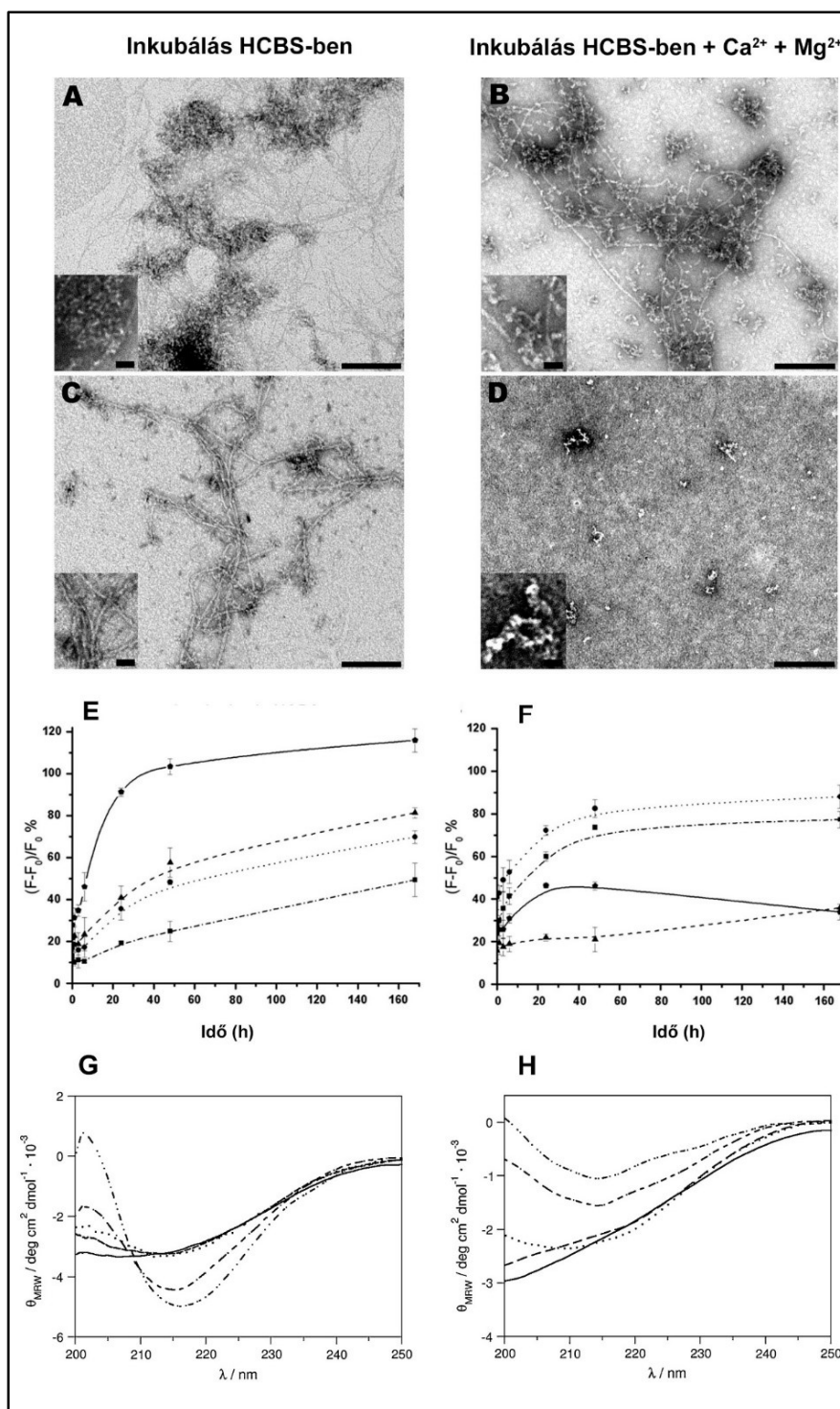
Mind viselkedésvizsgálatban, mind sejtszinten bizonyítható volt az  $fA\beta_{1-42}$  hatása. A peptiddel kezelt állatok szignifikánsan hosszabb idő alatt találták meg a platformot (**16.A ábra**), illetve a HC területén vizsgált piramis neuronok dendrittüske-száma is szignifikánsan csökkent ezekben az állatokban (**16.B-D ábrák**). Figyelembe véve a neuronális plaszticitás és a memóriarögzülés közötti kapcsolatot, elmondhatjuk, hogy az  $fA\beta_{1-42}$ -nek az agy memóriáért felelős célterületére való közvetlen bejuttatása a várt, AK-ban is fellépő patofiziológiai elváltozáshoz vezet, így ez a modell is alkalmas lehet preklinikai vizsgálati módszerként gyógyszerjelölt vegyületek tesztelésére. Hátránya viszont a hangsúlyosan invazív jelleg, az állatok ilyen műtéte fokozott precizitást igényel, illetve belőle a felépülés is hosszú ideig tart, emiatt ismételt adagolást kivitelezni nem lehetséges.

#### 5.1.1.4 $Ca^{2+}$ és $Mg^{2+}$ ionok hatása az izo- $A\beta_{1-42}$ peptid aggregációjára

Az izo- $A\beta_{1-42}$  peptid biológiai kísérletekben történő alkalmazásához meg kell vizsgálnunk az SOP-vel létrejövő oligomerek viselkedését a különféle kísérleti modellek körülményei között is. Az ilyen irányú vizsgálataink során egy érdekes jelenséget figyelhettünk meg, mely aztán egy mélyrehatóbb elméleti irányba vezette az aggregációval kapcsolatos kutatásainkat [304]. Állíthatjuk-e, hogy a kísérleti rendszerek könnyebb kezelhetősége céljából tervezett izo- $A\beta_{1-42}$  egy fiziológiás ion-homeosztázis esetén ugyanazt az aggregációs utat járja be, mint nem módosított társa? A kérdés megválaszolásához a konvencionális és az izo forma aggregációját többféle technika segítségével, 37 °C-on, kísérlettől függően több különböző koncentrációban (12,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M és 75  $\mu$ M), HCBS-ben vizsgáltuk, esetenként  $Ca^{2+}$  (2,3 mM) és  $Mg^{2+}$  (1 mM) ionok fiziológiás mennyiségének jelenlétében (**17. ábra**).

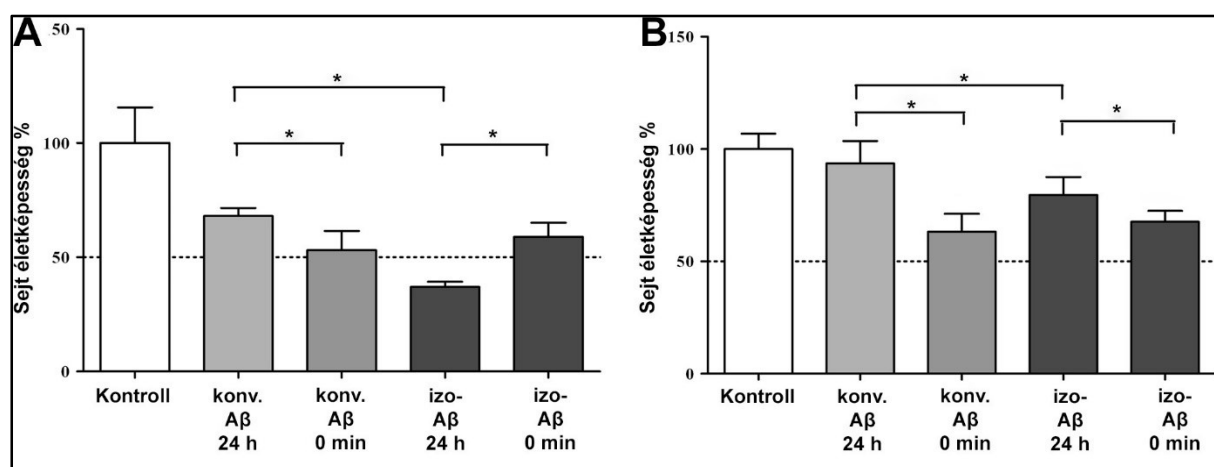
A TEM-vizsgálatok szerint, HCBS-ben 168 órán át tartó inkubációt követően mind a konvencionális (**17.A ábra**), mind az izo- $A\beta$  (**17.C ábra**) reguláris szerkezetű fibrillumokat képez ( $t=37$  °C,  $c=75$   $\mu$ M). A fibrillumok makroszkopikus megjelenése azonban eltérő. Míg a konvencionális peptidből összeragadt fibrillum-telepek alakultak ki, addig az izo-formából sima felületű, hosszú fibrillumok képződtek, melyek mellett szférikus oligomerek is láthatók. A HCBS-hez  $Ca^{2+}$  és  $Mg^{2+}$  ionokat adva a konvencionális  $A\beta$  fibrillumok méreteloszlása megváltozott (**17.B ábra**): számos aggregációs csírából kiindulva kiterjedt fibrillum- és protofibrillum-képződést tudtunk megfigyelni. Ugyanilyen körülmények között az izo- $A\beta$  viszont teljesen más karakterisztikájú aggregációt mutatott (**17.D ábra**). A szokványos  $\beta$ -réteges szerkezetű fibrillumok képződését nem tudtuk észlelni, a mintában szférikus oligomereket és gyöngysorokhoz hasonlító rövid fibrillumszerű aggregátumokat azonosítottunk. Az aggregációs folyamatot 37 °C-on ThT-kötéstartással is követtük, a peptideket 2 koncentrációban (25 és 75  $\mu$ M) vizsgáltuk, HCBS-ben vagy a HCBS-t  $Ca^{2+}$  és  $Mg^{2+}$  ionokkal kiegészítve (**17.E, F ábrák**). A  $\beta$ -réteg képződésének kinetikája a mérések szerint jelentősen függ az alkalmazott peptid típusától, koncentrációjától, és a kétféle fémion jelenlététől is. Ezek hiányában, HCBS-ben mindkét peptidből képződik  $\beta$ -redős szerkezetű forma (**17.E ábra**), a képződés az izo- $A\beta$  esetében kifejezettebb.  $Ca^{2+}$  és  $Mg^{2+}$  ionok jelenlétében a tendencia megfordul, az izo- $A\beta$  szerkezetváltozása mindkét koncentrációban csak mérsékelt (**17.F ábra**), ami a TEM-eredmények alapján magyarázható lehet a fibrilláris struktúrák képződésének elmaradásával.

Mindkét mérés tanúsága szerint az izo- $A\beta$  aggregációjára a  $Ca^{2+}$  és  $Mg^{2+}$  ionok jelenléte döntő hatással van. Eredményeink alátámasztására ECD vizsgálatokat is végeztünk ezzel a peptiddel, 12,5  $\mu$ M-os koncentrációban (**17.G, H ábrák**). A makroszkopikus aggregátumképzést, ezáltal az oldatfázisban detektálható peptid mennyiségének kritikus csökkenését az egy hétig tartó aggregációs periódus alatt a csökkentett koncentráció alkalmazásával kívántuk elkerülni. Mindkét pufferben ( $Ca^{2+}$  és  $Mg^{2+}$  ionok nélkül és jelenlétében) megfigyelhető a feloldáskor jellemzően rendezetlen szerkezetű peptid lassú konformációváltozása, mely 48 óra után válik a két esetben jelentősen különbözővé. Ebben az időpontban HCBS-ben 215 nm-nél detektálható egy erőteljes minimum (**17.G ábra**, szaggatott- pontozott görbe), mely  $Ca^{2+}$  és  $Mg^{2+}$  jelenlétében jelentősen kisebb intenzitással érvényesül (**17.H ábra**, szaggatott-pontozott görbe), illetve a rendezetlen konformációra jellemző 200 nm-es tartományban is eltér a két görbeintenzitás, ami a HCBS-ben már 48 óra alatt bekövetkező erőteljes rendezetlen  $\rightarrow$   $\beta$ -réteg transzformációt valószínűsít.  $Ca^{2+}$  és  $Mg^{2+}$  jelenlétében ez az átalakulás lelassul, még 168 óra után sem jelenik meg a béta-rétegre jellemző karakterisztikus ECD-spektrum, 215 nm-nél a görbe intenzitása elmarad az ionok hiányban detektálható értéktől (**17.G, H**, szaggatott-duplán pontozott görbék).



**17. ábra A-D:** TEM felvételek a peptidek HCBS-ben, 37°C-on, 168 órán át történő inkubációjával képzett aggregátumokról. **A:** konvencionális Aβ c=75 μM. **B:** konvencionális Aβ c=75 μM Ca<sup>2+</sup> és Mg<sup>2+</sup> jelenlétében. **C:** iso-Aβ c=75 μM. **D:** iso-Aβ c=75 μM Ca<sup>2+</sup> és Mg<sup>2+</sup> jelenlétében. A nagy képen a mérték 100 nm, az inzerteken 20 nm. **E-F:** ThT-kötési teszt a β-réteg mennyiségi változásának időbeli követésére 37 °C-on. **E:** HCBS-ben, **F:** HCBS-ben, Ca<sup>2+</sup> és Mg<sup>2+</sup> jelenlétében. Pontozott-szagattott vonal: konvencionális Aβ c=25 μM, pontozott vonal: konvencionális Aβ c=75 μM, szaggatott vonal: iso-Aβ c=25 μM, folytonos vonal: iso-Aβ c=75 μM. **G-H:** az iso-Aβ peptid 37°C-on bekövetkező másodlagos szerkezetének változása ECD-vel követve. A peptid koncentrációja c=12,5 μM volt. **G:** HCBS-ben, **H:** HCBS-ben, Ca<sup>2+</sup> és Mg<sup>2+</sup> jelenlétében. Folytonos vonal: feloldás után közvetlenül, szaggatott vonal: 1 h múlva, pontozott vonal: 6 h múlva, szaggatott-pontozott vonal: 48 óra múlva, szaggatott-duplán pontozott vonal: 168 óra múlva.

A különböző eredetű és aggregáltsági fokú peptidok hatását biológiai rendszerben RT-CES módszerrel, patkányból nyert primer agyi endothél sejt kultúrán vizsgáltuk (**18.A, B ábrák**). Az RT-CES módszerrel lehetséges a sejtek valós idejű, jelölésmentes vizsgálata impedanciaméréssel, mely a sejtek életképességével azáltal korrelál, hogy kitapadásuk, ezáltal a rajtuk mérhető elektromos ellenállás a fiziológias állapotuk függvénye. Az eredmények szerint az A $\beta$ -val történő kezelés jelentősen befolyásolja a sejtek életképességét, de az aggregáció foka és a mért hatás már nem feltétlenül mutat lineáris összefüggést. HCBS-ben már feloldás után képződnek olyan toxikus oligomerek, amelyek a viabilitást jelentős mértékben csökkentik (konvencionális A $\beta$ : 53,2 $\pm$ 8,3%, izo-A $\beta$ : 58,8 $\pm$ 6,3%, **18.A ábra**). 24 óra aggregáció után az izo-A $\beta$  eredetű aggregátumok még erősebb toxikus hatást mutatnak (viabilitás: 37,1 $\pm$ 2,3%), míg a konvencionális A $\beta$  esetében a toxicitás csökken (viabilitás: 68,0 $\pm$ 3,5%). Ez valószínűleg a minta inhomogenitásának a következménye, a nagy mértékű aggregáció által létrejövő peptid-„csomok” a sejtekkel érintkező hatófelületet csökkentik. Ca<sup>2+</sup> és Mg<sup>2+</sup> jelenlétében hasonló értékeket kapunk a frissen feloldott peptidok toxicitására, mint anélkül (mért viabilitások: konvencionális A $\beta$  63,2 $\pm$ 7,9%, izo-A $\beta$  67,7 $\pm$ 4,7%, **18.B ábra**), ellenben 24 óra aggregációt követően mindkét peptidnél jelentős hatáscsökkenést tapasztaltunk (viabilitások: konvencionális A $\beta$  93,6 $\pm$ 9,9%, izo-A $\beta$  79,5 $\pm$ 8,0%). Ez a konvencionális peptid esetében szintén a nagy méretű, éppen ezért csökkent diffúziós képességű és bioaktív felületű aggregátum-csomók képződésével magyarázható. Az izo-A $\beta$  esetében a fizikai-kémiai vizsgálatok eredményeit figyelembe véve lehetséges, hogy a feloldást követően még toxicitást mutató minta 24 óra múlva azért veszíti el ezt a tulajdonságát, mert egyrészt aggregációja jelentősen lelassul, másrészt kialakulhatnak nem-toxikus konformációk a peptidből.



**18. ábra** Agyi endothél sejtek viabilitásának változása A $\beta$  kezelés hatására, RT-CES módszerrel vizsgálva ( $c=75 \mu\text{M}$ ,  $t=37^\circ\text{C}$ , aggregáció ideje: 0 perc, 24 óra). **A:** HCBS-ben, **B:** HCBS-ben Ca<sup>2+</sup> és Mg<sup>2+</sup> jelenlétében történő aggregáltatás. A peptid-törzsolatokat a sejteken sejt kultúra-médiummal 50  $\mu\text{M}$ -ra hígítva alkalmaztuk.

Hogyan magyarázhatjuk a Ca<sup>2+</sup> és Mg<sup>2+</sup> ionok hatását az izo-A $\beta$  konformációjának kialakulására és aggregációs folyamatának megváltozására? Ennek magyarázatához REMD szimulációkkal modelleztük mind a konvencionális A $\beta$ , mind az izo-A $\beta$  kezdeti konformációját. Mivel a protokolljaink tartalmaznak egy HFIP-vel történő előkezelést, ami a tisztításkor esetlegesen keletkezett aggregátumok feloldását segíti elő, a modellezést egy, a HFIP-vel megegyező hatású, modellezéshez egyszerűbben alkalmazható oldószerben, TFE-ben, pH=2,0 értéket beállítva végeztük. A kétféle peptid által felvett konformációkat a 300 K-es replika utolsó 50 ns-ában felvéve, elemeztük a másodlagos szerkezeti elemek előfordulási arányait (**2. táblázat**).



Másodlagos szerkezeti elem	konvencionális A $\beta$ (%)	izo-A $\beta$ (%)
$\beta$ -redő	8,3	10,1
$\beta$ -kanyar	8,0	7,8
$\alpha$ -hélix	1,6	5,7
$3_{10}$ hélix	3,6	3,7

**2. táblázat** A konvencionális és izo-A $\beta$  peptidekben REMD módszerrel kapott 300 K-es replika utolsó 50 ns-ban azonosítható konformereinek analízise a másodlagos szerkezeti elemek relatív előfordulási arányainak megállapítására.

Az adatok szerint a kétféle peptidben kialakuló másodlagos szerkezeti elemek előfordulási arányai TFE-ben nem térnek el jelentősen egymástól, illetve az alacsony értékek azt is mutatják, hogy a szerkezetek csak kis mértékű rendezettséget mutatnak. Csak a  $\beta$ -redő és a  $\beta$ -kanyar fordul elő 7%-ot alig meghaladó gyakorisággal.

A REMD módszerrel kapott konformációkban analizáltuk az egyes oldalláncok H-kötésben való részvételi gyakoriságát is. Ez számunkra két okból is fontos lehet. Egyrészt a konvencionális A $\beta$  esetében az aggregáció egyik fontos szerkezeti eleme az Asp<sup>23</sup> és Lys<sup>28</sup> között kialakuló sóhid [305]. Az izo-A $\beta$  szerkezetében a Gly<sup>25</sup> és Ser<sup>26</sup> közötti izopeptid-kötés ennek a sóhidnak a kialakulását a kiindulási konformációban megakadályozza. A **3. táblázat** a Lys<sup>28</sup> és potenciális H-kötésbeli partnerei között kialakuló H-kötések előfordulási gyakoriságát adja meg a vizsgált 300 K-es replika utolsó 50 ns-ának szerkezeteiben. Az adatokból jól látszik, hogy az izo-A $\beta$  peptidben a Lys<sup>28</sup> H-kötésben való részvétele kevésbé valósul meg. A konvencionális peptidben a Lys<sup>28</sup>, a szomszédos aminosavak mellett, a hajtú szerkezet miatt térközelbe kerülő Asp<sup>23</sup> oldallánccal is H-kötésben található a szerkezetek 21,1%-ában. Ugyanakkor az izo-A $\beta$  megváltozott topológiája ezeknek a kölcsönhatásoknak a megvalósulását megakadályozza, a kanyar ellentétes oldalán található lehetséges partnerektől túl nagy távolságba kerül. Így a pH-emelésekor bekövetkező O $\rightarrow$ N acilvándorlással előálló pillanatnyi, az aggregációt elindító szerkezet jellemzően nincs „előformálva” a hajtú szerkezet kialakítására.

Akceptor	konvencionális A $\beta$ (%)	izo-A $\beta$ (%)
Asn <sup>27</sup> oldallánc	44,1	12,3
Asn <sup>27</sup> főlánc	9,1	13,5
Ser <sup>26</sup> oldallánc	26,2	43,9
Ser <sup>26</sup> főlánc	21,6	0,0
Val <sup>24</sup> főlánc	21,2	2,0
Asp <sup>23</sup> oldallánc	21,1	2,6

**3. táblázat** REMD analízis, a 300 K-es replika utolsó 50 ns-ában kialakuló konformerekben a Lys<sup>28</sup> és különböző potenciális oldalláncok között kialakult H-hidak előfordulási gyakorisága.

A kétértékű fémionok aggregációt befolyásoló hatásának felderítésében is segíthet a H-kötésekben részt vevő oldalláncok elemzése. Ez esetben a potenciális fémion-kötő karboxilcsoportok, azaz az Asp és Glu oldalláncok és a C-terminális karboxilcsoport H-kötésben való részvételét érdemes vizsgálni. A **4. táblázatban** a REMD modellszerkezetek elemzésével kapott átlagos H-kötések számát adtam meg a karboxilcsoportot tartalmazó aminosavakra, az összehasonlítandó adatpárokban a nagyobb értéket megjelölve. Eszerint a konvencionális A $\beta$  hajtú-régiójában található karboxilcsoportok nagyobb arányban vesznek részt H-kötésben, míg az izo-A $\beta$ -ban az N-terminális felőli karboxilok lépnek főleg kötésbe. A H-kötésben való részvétel a karboxilcsoport fémion-kötési képességét befolyásolhatja, hiszen egy nagyobb szabadsági fokú, kevésbé kötött csoport nagyobb eséllyel tud a fémionhoz koordinálódni. Az

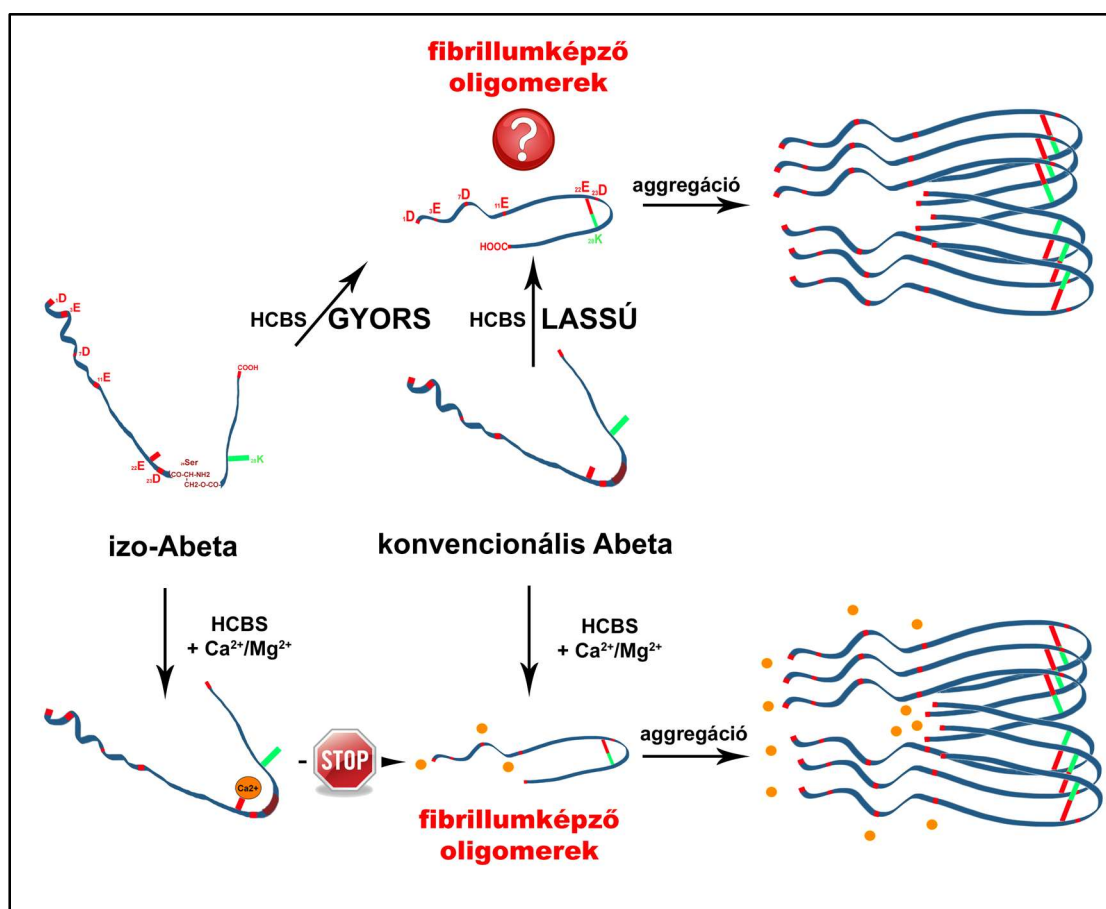


izo-A $\beta$  esetén egyértelműen látszik a hajtű szakaszon található savas oldalláncok kisebb mértékű foglaltsága, ami pedig növeli a fémionokkal való koordináció valószínűségét.

Aminosav	konvencionális A $\beta$	izo-A $\beta$
Asp <sup>1</sup>	1,5	3,1
Glu <sup>3</sup>	1,7	2,7
Asp <sup>7</sup>	3,9	2,6
Glu <sup>11</sup>	3,3	1,7
Glu <sup>22</sup>	3,2	1,6
Asp <sup>23</sup>	3,6	1,8
-COOH (C-term.)	1,7	1,3

**4. táblázat.** A REMD-szerkezetek karboxilcsoportjai által kialakított H-kötések átlagos száma a konvencionális A $\beta$  és az izo-A $\beta$  esetén (300 K-es replika, utolsó 50 ns analízise).

Kísérleteink feltárták, hogy a kétféle szintetikus A $\beta$  forma aggregációja már kétértékű fémionok jelenléte nélkül is jelentősen eltér egymástól. A ThT mérések szerint az izopeptid gyorsabban és nagyobb mennyiségben képez  $\beta$ -redős szerkezetet, mint a konvencionális peptid. A TEM-felvételek a keletkező aggregátumok között morfológiai különbségeket is kimutattak. Az aggregáció korai fázisában a (proto)fibrillum-oligomer arány a két peptidforma esetében jelentősen eltérő lehet, ami az aggregáció kinetikájára jelentős hatással van. A **19. ábra** felső részén ezt a folyamatot szemléltettük, feltételezve, hogy az izo-A $\beta$  kiindulási konformációja kedvez az olyan (pontosan még nem felderített) szerkezetű oligomerek képződésének, melyekből aztán az aggregáció a fibrillumképződés irányában folytatódik. A konvencionális A $\beta$  ezzel szemben lassabban alakul át ilyen oligomerekké, így ez esetben a fibrillumképzés is lassabban megy végbe.



**19. ábra** A konvencionális és az izo-A $\beta$  peptid feltételezett aggregációs folyamata.

A  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  ionok jelenléte tapasztalataink szerint nem várt módon képes befolyásolni az előnyösnek gondolt izo-A $\beta$  peptid aggregációját (**19. ábra** alsó rész), és mint a kísérletek szemléltették, biológiai aktivitását is. Számos kooperáló partnerünk használta az általunk előállított peptidet biológiai kísérletekhez, amelyekben azonban ezek az ionok mindig jelen voltak a különféle kezelő médiumokban, fiziológias koncentrációban. Ezért az izo-A $\beta$  ionok jelenlétében történő viselkedését érintő megfigyeléseink rendkívül fontossá váltak, a sikeres kísérletvezetéshez szükséges volt olyan oligomer- és fibrillumképzési aggregáltatási protokollokat kidolgozni, amelyekben a „zavaró” ionokat később, az inkubációs idő leteltével adtuk hozzá a mintákhoz. A molekulamodellezés rávilágított az izo-A $\beta$  sajátos viselkedésére; az izopeptid-kötés következtében a kezdeti konformációk többségében a hajtú szerkezet stabilizálásához szükséges aminosavak csökkent mértékben alakítanak ki egymással H-kötéssel alapuló szerkezetstabilizáló kapcsolatokat, az oldalláncok elérhetőbbek a  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  ionok számára, ami feltehetően megakadályozza a fibrillumképzéshez szükséges szerkezettel rendelkező oligomerek keletkezését. Ez azonban nem okoz olyan kiküszöbölhetetlen problémát, ami az izo-A $\beta$  alkalmazását ellehetetlenítené. Körültekintő kísérlettervezéssel a peptid előnyösen alkalmazható megfelelő toxicitású A $\beta$  aggregátumok nagy mennyiségben és reprodukálható módon történő előállítására.

## 5.1.2 Az A $\beta$ mint terápiás célpont

### 5.1.2.1 Az oA $\beta$ -val kölcsönható fehérjék feltérképezése

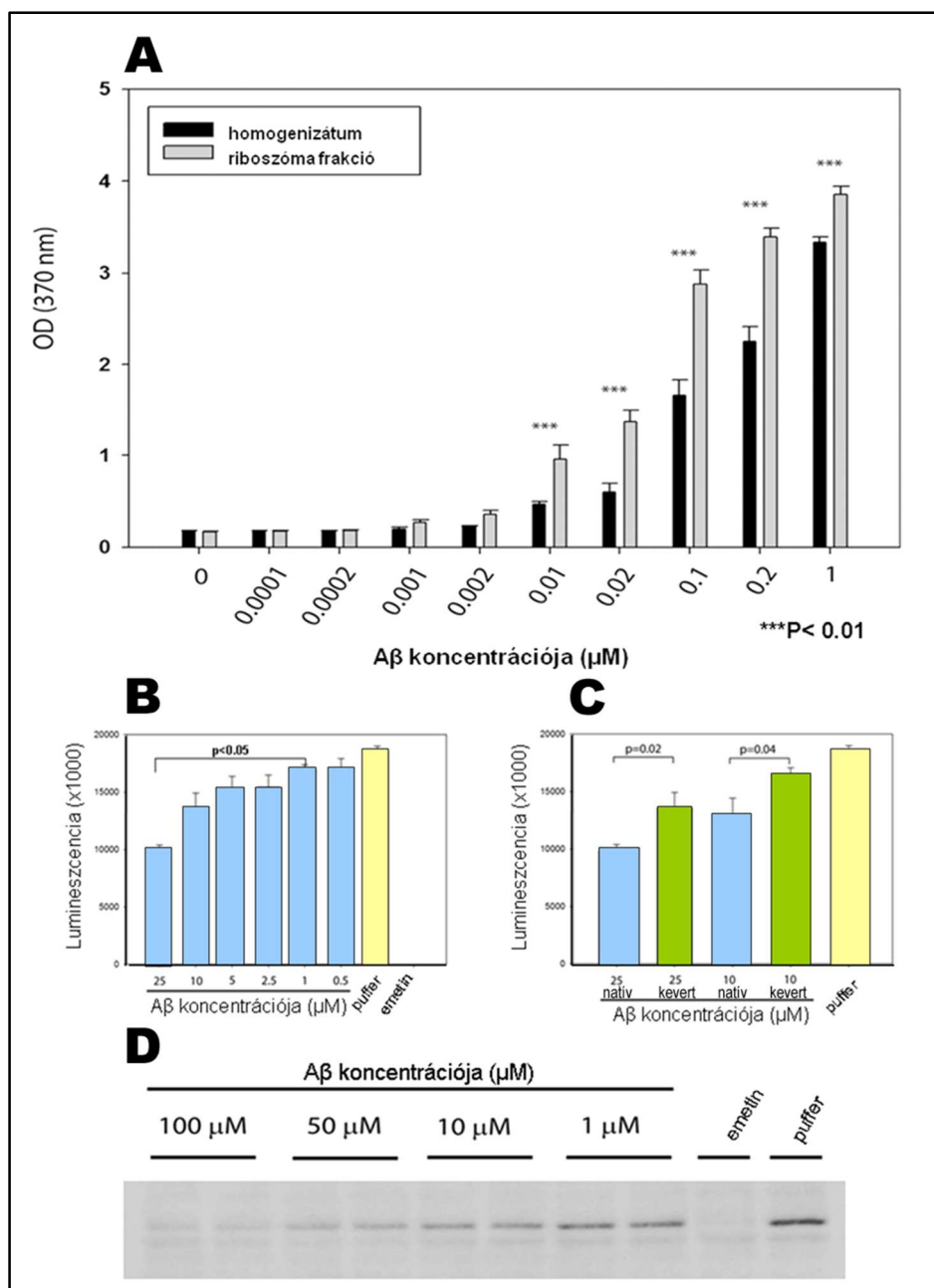
A 2.2.3-as fejezetben felvezetett kutatási problémához, az oA $\beta$ -val kölcsönható fehérjék feltérképezéséhez kézenfekvő választás volt az izo-A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptidből stabil formában előállítható oligomer preparátum alkalmazása, fehérjechip-alapú nagy áteresztőképességű kísérletekben [306]. A chip 8136 humán expresszálatott fehérjét tartalmazott. Az eredmények analízise az oA $\beta$  324 fehérjéhez való specifikus kötődését valószínűsítette. Ezek funkcionális elemzése felfedte, hogy a kölcsönható partnerek között a leginkább reprezentált család a fehérjetranszlációt irányító fehérjéké. 24 fehérje tartozott ide, közöttük különböző mitokondriális és nem-mitokondriális riboszomális fehérjék, transzlációs iniciációs faktorok stb. Emellett egyéb transzlációs proteinek, RNS-feldolgozásban részt vevő fehérjék, a sejt-ciklus fenntartásához kapcsolódó proteinek is azonosításra kerültek, mint kölcsönható partnerek. A feltárt kölcsönhatásokat további funkcionális vizsgálatokkal validáltuk, így a riboszomális fehérjerendszer elemeinek érintettségét több kísérlettel is igazolni tudtuk.

Patkány HC-ből izoláltunk riboszóma-frakciót, melynek tisztaságát WB kísérlettel ellenőriztük. Saját fejlesztésű ELISA tesztünkben az eredeti, izolálatlan agyhomogenizátummal, illetve a tisztított riboszóma-frakcióval borított lemezeket készítettünk, melyekben az A $\beta$  oligomerek koncentrációfüggő kötődését A $\beta$ -specifikus BAM10 antitesttel és szokványos HRP-konjugált másodlagos antitesttel kezeléssel, a lumineszcens jel detektálásával határoztuk meg (**20.A ábra**). Az eredmények alapján a riboszóma-frakció nagyobb mértékű kötési képességgel rendelkezik, ami alátámasztja a chip kísérlet eredményeit.

A kötődésen túl azt is bizonyítani akartuk, hogy az A $\beta$  oligomerek a transzlációs rendszer működését is befolyásolják. Ehhez egy *in vitro* funkcionális tesztet dolgoztunk ki, amelynek alapja egy nukleázzal kezelt nyúl retikulocita lizátummal végzett transzlációs reakció. Kezelés nélkül a rendszerben expresszált luciferáz enzim mennyisége kimutatható, illetve aktivitása megfelelő szubsztrát jelenlétében lumineszcencia mérésével meghatározható. Kontrollként emetint használtunk, ami egy ismert transzlációs inhibitor.

A kísérletben az oligomer A $\beta$  koncentrációfüggő módon képes volt a luciferáz aktivitását csökkenteni (**20.B ábra**). Annak igazolására, hogy a hatás a peptidből képződő megfelelő konformációjú és aggregációs fokú oligomereinek tulajdonítható, az A $\beta$  szekvenciájának összekeverésével kapott „kevert” A $\beta$  peptiddel kontroll-kísérletet végeztünk (ennek szekvenciája az „Alkalmazott anyagok, vizsgálati módszerek és eszközök” rész 4.4.4-es fejezetében található). Az irodalomban megoszlanak a vélemények a kevert szekvencia hasznosságát illetően, főleg amiatt, mert a számos lehetséges új szekvencia esetében lehetetlen előre megjósolni, melyikük mutat majd biológiai aktivitást. Ennek ellenére gyakran elvárt a biológiai vizsgálatokban kontrollként a „kevert” peptidek alkalmazása. A transzlációs kísérletben általunk alkalmazott „kevert” A $\beta$  hatásához képest az A $\beta$  oligomerek szignifikánsan erősebb gátló hatást tudtak kifejteni (**20.C ábra**).

Annak bizonyítására, hogy az A $\beta$  oligomerek nem a luciferázhoz történő közvetlen kapcsolódással okozzák az enzim funkciójának csökkenését, hanem annak transzlációját befolyásolják, a kísérletekben keletkező luciferáz mennyiségét WB-n is meghatároztuk (**20.D ábra**). Ennek alapján igazolást nyert, hogy az A $\beta$  oligomerek koncentrációfüggő módon képesek a luciferáz bioszintézisét meggátolni.



**20. ábra A:** Aβ oligomerek koncentrációfüggő kötődése patkány HC-ból nyert riboszóma frakcióhoz, kontroll agyhomogenizátumhoz hasonlítva (\*\*\*)  $p < 0,05$ ). **B-D:** *in vitro* translációs inhibíció tesztelése Aβ alkalmazásával. **B:** Aβ oligomerek koncentrációfüggő hatása a luciferáz enzim expressziójára. A luciferáz aktivitás a lumineszcencia intenzitásával arányos, gátló kontrollként emetin használtunk. **C:** az Aβ oligomerek szerkezetfüggő hatásának validálása, kevert szekenciájú Aβ alkalmazásával történő összehasonlítás révén. **D:** az Aβ oligomerek gátló hatást fejtenek ki a luciferáz-expresszióra koncentrációfüggő módon: WB kísérlet.

A szakirodalomban ismert, hogy az AK-ban jellemző a proteinszintézis sejt szintű gátlódása a molekuláris stressz elemeinek és a gyulladáshoz kapcsolódó folyamatoknak egymással összehangolt hatása révén (ISR). Emellett az előbb részletezett eredményeink valószínűsítik az Aβ oligomerek proteinszintézisre kifejtett közvetlen gátló hatását is. Kísérleteinkben igazolást nyert a riboszomális proteinekkel való kölcsönhatás. Korábban Robledo azonosított 9 kis és 6 nagy riboszomális alegységet kódoló gént [307], melyek gátlása a teljes riboszomális szintézis gátlását okozta. Az általuk vizsgált riboszomális fehérjék közül hármat (RPS16, RPS19 és RPL11)

mi is azonosítottunk az oligomer A $\beta$  potenciális kötőpartnereként. Emellett fontos kiemelni azokat az eredményeinket, melyek a mitokondriális fehérjeszintézis elemeivel való kölcsönhatást támasztják alá. Kötőpartnerként azonosítottuk a mitokondriális transzláció iniciációjában szereplő metionil-tRNS-formiltranszferázt [308], illetve további 6 mitokondriális riboszomális fehérjét (L3, L24, L34, L35, L49, S18A). Az AK-ban fellépő mitokondriális működési zavar egyértelműen elfogadott, oka azonban jelenleg még nem tisztázott. Eredményeink hozzájárulhatnak ennek a kóros folyamatnak a molekuláris szintű megértéséhez. Ha bizonyítottnak tekintjük a mitokondriális proteinszintézis A $\beta$  oligomerek általi gátlásának lehetőségét, akkor ezt a hatást a mitokondriumok diszfunkciójának egyik okaként azonosíthatjuk. Ezt támasztják alá olyan eredmények, melyek szerint egyes genetikai betegségekben, mint a Pearson-szindrómában, vagy a Kearns-Sayre szindrómában a mitokondriumok elégtelen működésének oka a proteinszintézis defektusa [309].

#### 5.1.2.2 Az A $\beta$ aggregátumok kölcsönhatásainak modulálása terápiás céllal

A BSB elméletet követve csoportunk az A $\beta$  alapszekvencia több fragmensét, illetve azok módosított változatait is vizsgálta biológiai hatásosságuk szempontjából [310]. A kísérleteink eredményeit röviden az **5. táblázat** foglalja össze. Az LPYFD-NH<sub>2</sub> molekulán alapuló peptidomimetikum típusú vegyületeinket potenciális neuroprotektív terápiás szerekként szabadalmaztattuk [311].

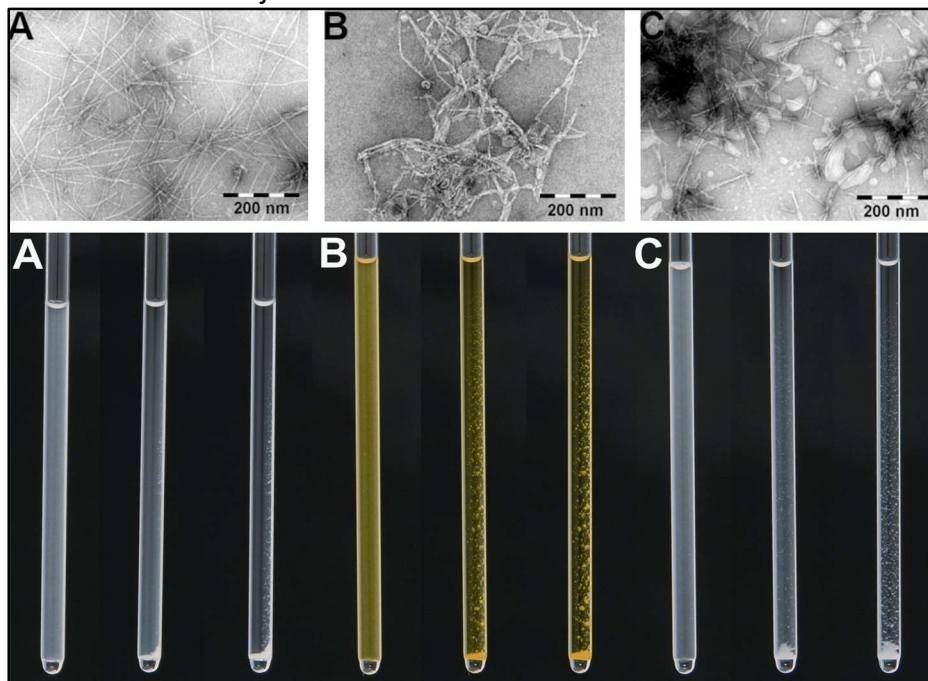
Pentapeptid (A $\beta$ alap- szekvencia)	MTT viabilitási teszt	<i>In vitro</i> elektrofiziológia	<i>In vivo</i> elektrofiziológia	
			ko-iontoforézises bejuttatás	keverékben bejuttatás
RVVIA-NH <sub>2</sub> (A $\beta$ <sub>38-42</sub> )	hatástalan	hatástalan	hatástalan	hatástalan
LPYFD-NH <sub>2</sub> (A $\beta$ <sub>17-21</sub> )	védő	védő	védő	védő
F/GRHDS- NH <sub>2</sub> (A $\beta$ <sub>4-8</sub> )	védő	védő	védő	hatástalan
RIIGL-NH <sub>2</sub> (A $\beta$ <sub>31-35</sub> )	védő	védő	hatástalan	védő

**5. táblázat** Az A $\beta$  peptid különböző fragmenseiből származó rövid peptidek biológiai hatásossága toxikus fA $\beta$ <sub>1-42</sub> aggregátumokkal szemben.

Azzal kapcsolatban, hogy a BSB peptidek védőhatása ténylegesen a kialakult  $\beta$ -redős szerkezet fellazításával valósul-e meg, azaz alkalmasak-e ezek a molekulák az AK-ban kialakuló fibrillumok szerkezetének megbontására, a fibrillumképződés visszafordítására, számos tanulmány született. Ezen a területen is végeztünk kutatásokat [312], melyekben megvizsgáltuk az LPFFD-amid, egy BSB-ként azonosított pentapeptid [93], hatását az A $\beta$ <sub>1-42</sub> aggregációjára. Eredményeink azt valószínűsítik, hogy *in vitro* körülmények között az LPFFD-amid, illetve valószínűleg a BSB-peptidek többsége nem képes a béta-réteg megtörésére, hanem bevonja az A $\beta$  aggregátumok felszínét és flokkulálja azokat.

A fibrilláris szerkezet felbomlásának követésére használt konvencionális eljárás a ThT-kötési teszt. DLS mérések, szaturáció transzfer-NMR vizsgálatok (ábrák nélkül) és az aggregátumokról készített TEM-felvételek (**21. ábra**) alapján valószínűsíthetjük, hogy a ThT-teszt eredményeinek értékelése kis molekulák BSB-hatásának vizsgálata esetén nem egyértelmű, a jelintenzitás csökkenése nem jelenti feltétlenül a  $\beta$ -redős szerkezet mennyiségének csökkenését. Két kötésre képes molekula (esetünkben a BSB-ként alkalmazott LPFFD-amid és

a ThT) együttes jelenlétekor a ThT specifikus intenzitáseltolódását befolyásolhatja versengésük az A $\beta$  aggregátumok felszíni kötőhelyeiért, illetve hatásuk az aggregátumok egymással történő asszociációja is.



**21. ábra** A ThT és az LPFFD-amid hatása az A $\beta_{1-42}$  aggregációjára pH=7,4 foszfátpufferben, szobahőmérsékleten. Felső ábrarész: TEM felvételek a friss mintákból. Alsó ábrarész: makroszkopikus méretű aggregátumok detektálhatók a mintákban (balról jobbra: 0 perc, 6 óra, 24 óra múlva fényképezett minták). **A:** A $\beta_{1-42}$  100  $\mu$ M-os oldata. **B:** 100  $\mu$ M A $\beta_{1-42}$ + 500  $\mu$ M ThT, **C:** 100  $\mu$ M A $\beta_{1-42}$ + 500  $\mu$ M LPFFD-amid

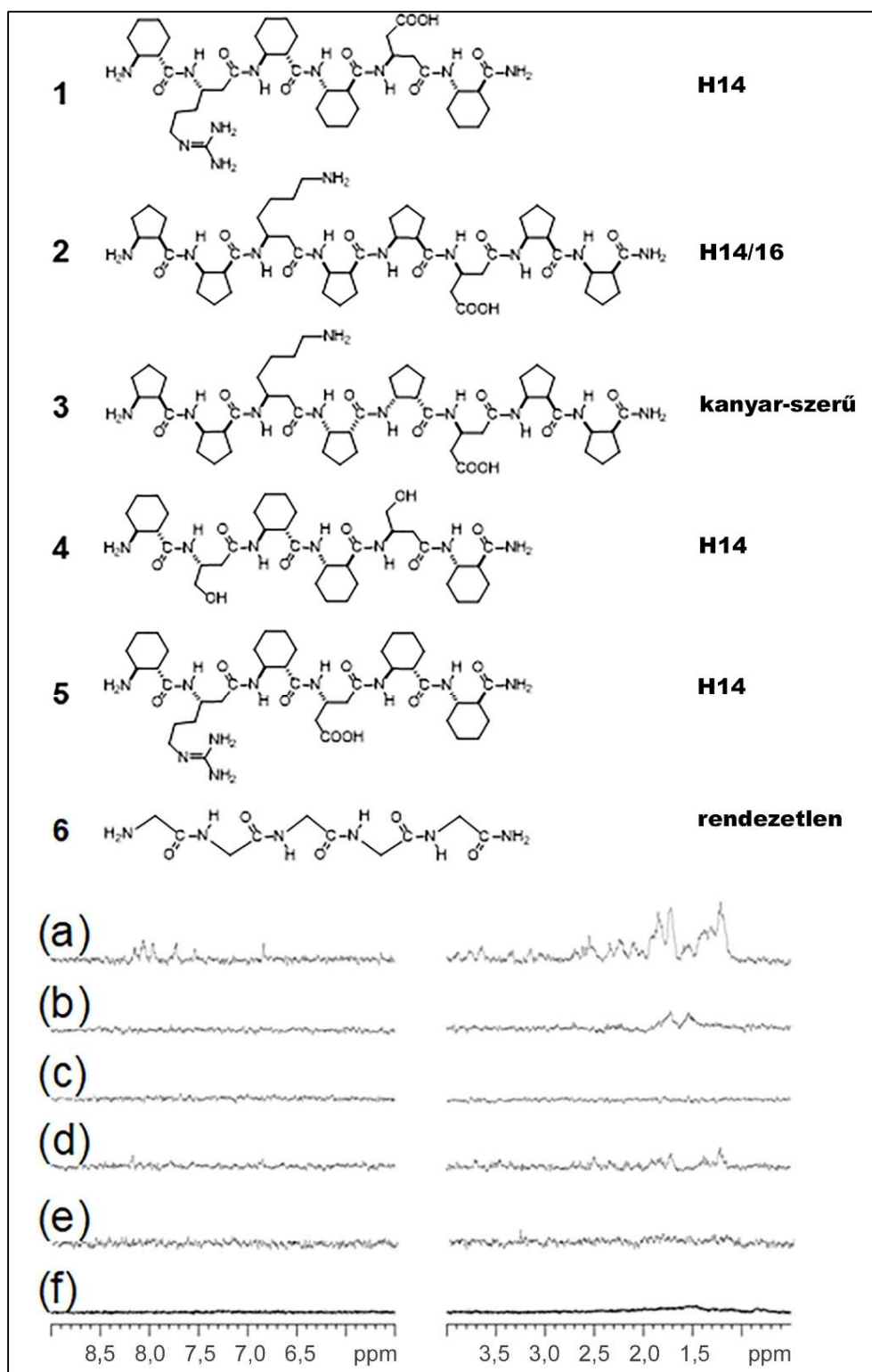
Látható, hogy mind a ThT (**21. ábra** felső sor **B**), mind az LPFFD-amid (**21. ábra** felső sor **C**) a mintakészítés időpontjában az A $\beta_{1-42}$  fibrillumok gyors asszociációját okozza. Idővel a flokkuláció olyan mértékűvé válik, hogy a kis molekulák hatására szabad szemmel észlelhető méretű aggregátumok képződnek a mintákban (**21. ábra** alsó sor, időpontok rendre 0 perc, 6 óra, 24 óra. **A:** A $\beta_{1-42}$ , **B:** A $\beta_{1-42}$  + ThT, **C:** A $\beta_{1-42}$  + LPFFD-amid).

A folyamatot bonyolítja, hogy mind a BSB-k, mind a ThT az aggregátumok felületének töltését, így a  $\zeta$ -potenciált is megváltoztatják, ami a flokkuláció hajtóerejévé válik. Ily módon az adagolás sorrendje (a BSB és a ThT együttes, vagy egymást követő alkalmazása) is befolyásolhatja a kötési egyensúlyokat, amit a ThT mérések értelmezésekor figyelembe kell venni.

A vázolt eredmények alapján két megállapítást nagy biztonsággal tehetünk: i) a rövid, A $\beta$ -fragmenseken alapuló peptidszekvenciák képesek az aggregátumok felületéhez gyenge kölcsönhatások révén kötődni, ii) feltételezhetően az aggregátumok kontaktfelületének csökkentése révén biológiai kísérletekben hatékonyan védik ki az A $\beta$  toxikus hatását.

A BSB peptidokkal kapott eredményekre alapozva olyan foldamer-szekvenciákat terveztünk, melyek az A $\beta$  oligomerekkel kölcsönhatásba lépve, a hatófelület leárnyékolásával azok kedvezőtlen biológiai hatását ellensúlyozhatják [313]. Ehhez a KLVFFAE szekvenciareészlet (A $\beta_{16-22}$ ) szerkezetéből indultunk ki, ami egy hidrofób magot tartalmaz, illetve a két terminális aminosav oldalláncán keresztül sóhíd kialakítására is képes. 5- és 6-tagú ciklikus aminosavak különböző diasztereomereinek, proteinogén oldalláncú  $\beta^3$ -aminosavaknak és  $\alpha$ -aminosavaknak a kombinálásával különböző szerkezetű és töltésmintázatú helikális szekvenciák tervezhetők [314]. A módszerrel olyan, a KLVFFAE szekvencián alapuló

foldamereket állítottunk elő, melyek lefedték a lehetséges helikális struktúrák készletét (22. ábra).



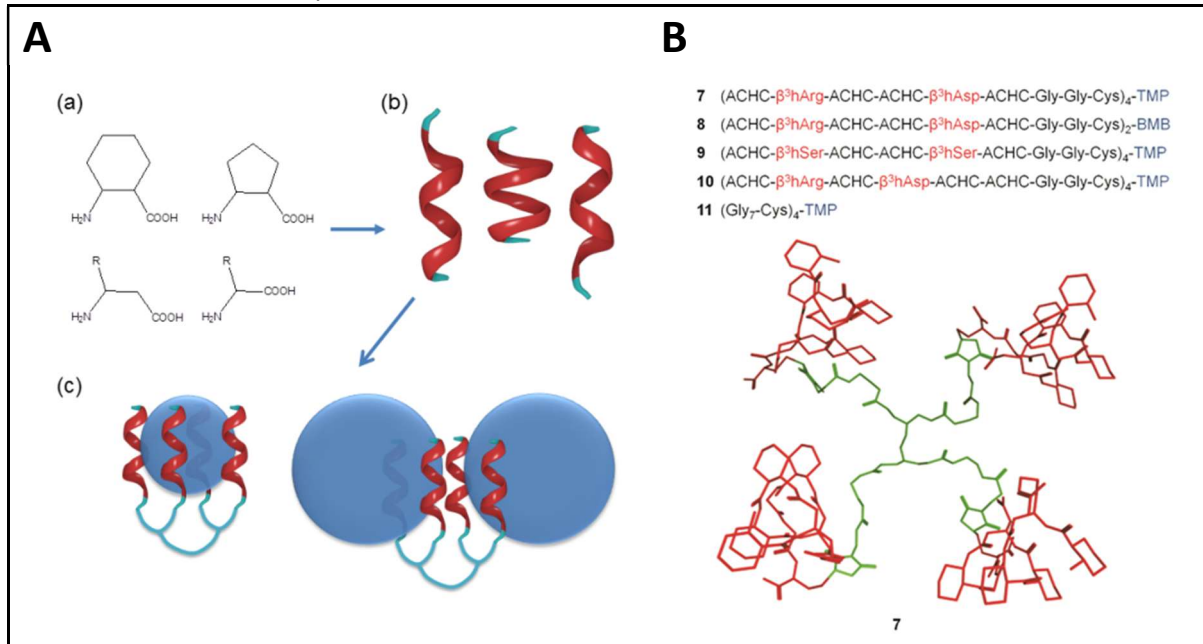
22. ábra A KLVFFAE szekvencián alapuló foldamerek szerkezete, konformációja és STD méréseik spektrumainak informatív részletei (1-6 rendre a-f).

Az A $\beta$  oligomereket izo-A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptidből a már ismertetett SOP szerint állítottuk elő. Szaturációs transzfer differencia (STD) NMR (22. ábra, 1-6 rendre a-f) és transzfer-NOE spektroszkópia (ábra nélkül) segítségével jellemeztük a foldamerek A $\beta$  oligomerekhez való



kötődési képességét és a jellemző kötési konformációikat. Ezek alapján **1** erős STD effektust mutatott (**22.a** spektrum), H14-es konformációt felvéve az aggregátumok felszínén is, míg a szerkezetileg hasonló **2** és **4** STD jeleinek intenzitása kisebbnek bizonyult (rendre **22.b** és **d** spektrumok). **3** esetén nem tudtunk kötődést kimutatni (**22.c** spektrum), ami bizonyítja, hogy a kötődéshez a helikális konformáció és az ikerionos karakter együttese szükséges. **5** esetében az ionizálódó oldalláncokat egymás mellé helyezve, ezáltal térben egymástól eltávolítva (ellentétes irányba mutatnak a térszerkezetben) szintén nem tudtunk STD-jelet kimutatni, illetve a szerkezettel nem rendelkező, kontrollként alkalmazott **6** sem mutatott kötődést (rendre **22.e** és **f** spektrumok).

Az **1**-es molekula tehát gyenge kötődést mutat az A $\beta$  oligomerekhez. Az aggregátumok periodikus szerkezete miatt feltételeztük, hogy **1** számára több kötőhely is rendelkezésre áll az oligomer felszínén, illetve a foldamer multivalens formában történő alkalmazása kedvezően hathat a kötődés specifikusságára és erősségére. Ezért előállítottuk minden kötődő foldamer, azaz **1**, **4**, **5** és **6** egy 0. generációs, tetra-valens poliamidoamin (TMP: tetra-maleimido-PAMAM) dendrimerhez konjugált formáját (rendre **7**, **9**, **10**, **11**). A dendrimer szabad aminocsoportjait maleimido-propionsavval konjugáltuk, míg a foldamer-szekvenciákat a C-terminálison egy Gly-Gly-Cys szekvenciával egészítettük ki, majd egy tiol-maleimid kapcsolást (Michael-addíciót) hajtottunk végre enyhén lúgos (pH=8,0) vizes közegben. A multivalencia szerepének vizsgálata céljából elkészítettük **1** bivalens konjugátumát is, ahol bisz-baleimidobutánnal (BMB) konjugáltuk a foldamert (**8**). A **23. ábrán** egyrészt a tervezési stratégia (**23.A ábra**), másrészt a konjugátumok szerkezete, illetve **7** NMR-vizsgálaton („long-range” NOE) alapuló térszerkezeti modellje látható, mely szerint a foldamer a konjugátumban is H14-es hélix konformációt vesz fel (**23.B ábra**, vörös molekularészletek), míg a PAMAM hordozó szerkezete rendezetlen (**23.B ábra**, zöld molekularész).

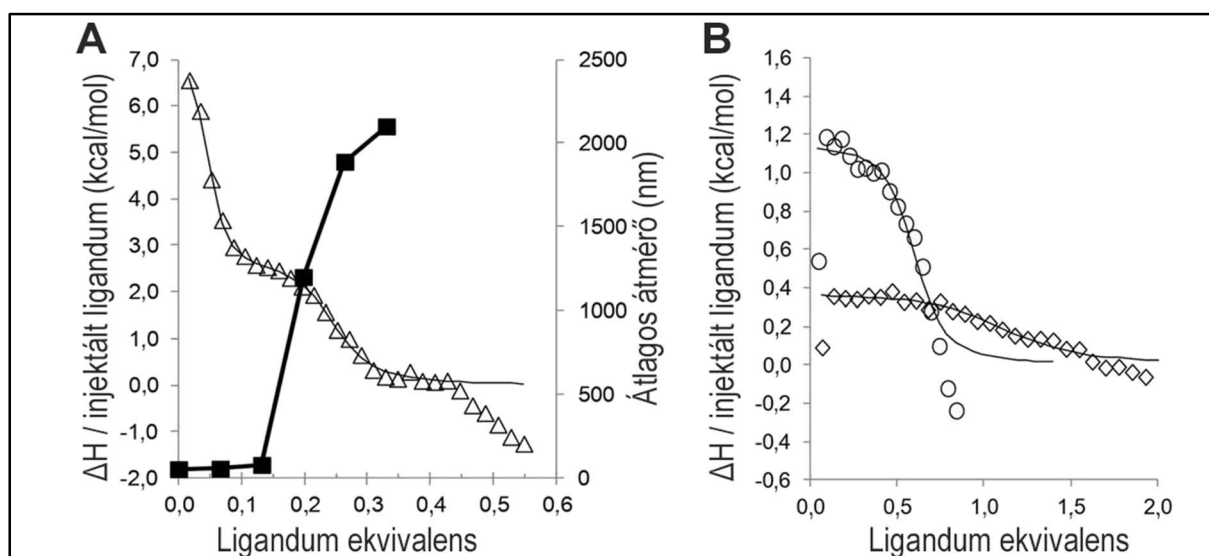


**23. ábra A:** a foldamer-dendrimer konjugátumok tervezési stratégiája: **(a)** az alkalmazott nem-természetes aminosav monomerek, **(b)** a helikális foldamerek ábrázolása, **(c)** feltételezett méretszelektív hatásmechanizmus. A kék gömbök a különböző méretű A $\beta$  oligomereket reprezentálják. **B:** a foldamer-dendrimer konjugátumok felépítése, illetve **7** térszerkezete.

A konjugátumok A $\beta$  oligomerekhez történő kötődését többféle módszerrel jellemeztük. A kötés erősségről közvetlen információt adnak az ITC mérések (**24.A ábra**, háromszöges pontsor), illetve az oligomerek esetleges méretváltozását követhetjük párhuzamos kísérletben



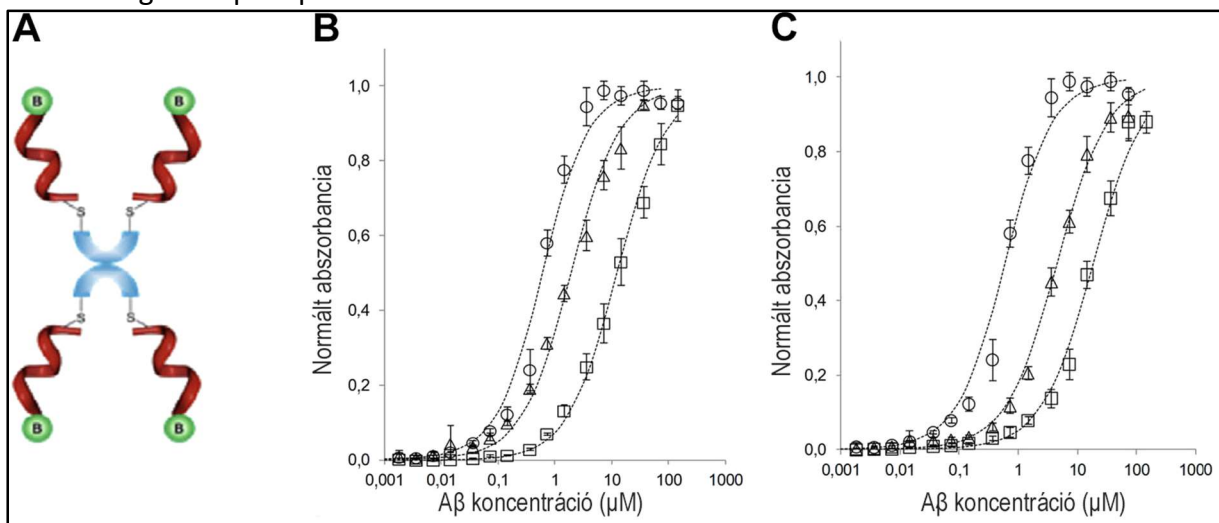
DLS-sel (**24.A ábra**, négyzetes pontsor). **7** alkalmazásakor egy bizonyos koncentrációaránynál erőteljes precipitációt észleltünk, amit a DLS mérések is alátámasztottak. Az ITC mérések zaját az oldat inhomogenitása jelentősen növeli, ám így is észlelhető volt egy kétlépcsős kötődés. Az első kötődési egyensúlyra az ITC-mérés kiértékelésével kapott adatok:  $K_D=6.9\pm 1,4$  nM,  $\Delta H_B=7,24\pm 0,5$  kcal mol<sup>-1</sup>,  $N=0,041\pm 0,00089$ . A második kötési egyensúlyra, aminek esetében a DLS mérések szerint a precipitáció az ekvivalenciapont környékén kezdődött, a kapott adatok:  $K_D'=281,1\pm 38,7$  nM,  $\Delta H_B'=2,58\pm 0,02$  kcal mol<sup>-1</sup>,  $N'=0,18\pm 0,002$ . Az adatok az A $\beta$  oligomerek és **7** között fellépő szoros kötődést támasztják alá. A monomer **1**, illetve ugyanezt a szekvenciát dimerként tartalmazó **8** entalpogramjai **24.B ábrán** láthatók. Párhuzamos DLS mérésekben egyik anyag alkalmazása esetén sem tapasztaltunk precipitációt. **8** esetén a meghatározható kötési paraméterek a következők:  $K_D=721,4\pm 120,1$  nM,  $\Delta H_B=8,1\pm 0,12$  kcal mol<sup>-1</sup>,  $N=0,53\pm 0,003$ , az adatok a **7** esetében tapasztalt 2. kötési lépcső adataihoz hasonló nagyságrendűek. **1** entalpogramjának az illesztése a  $\Delta H$  kis értéke ( $0,36\pm 0,05$  kcal mol<sup>-1</sup>) miatt problémás, a  $K_D=2376.1\pm 214,4$  nM-os értéknek adódott, a kötési sztöchiometria viszont közel 1:1 ( $N=0,97\pm 0,05$ ).



**24. ábra A:** A $\beta$  oligomerek ( $c=72$   $\mu$ M) ITC titrálása **7**-tel (0,55 ekvivalensig, háromszögek, bal oldali skála). Az illesztés a két független kötőhelyes modellel történt. A párhuzamos DLS vizsgálattal követhető átlagos átmérváltozást a grafikon jobb oldali skálájához tartozó, négyzetes pontsor ábrázolja. **B:** ITC-entalpogramok **1** (rombusz) és **8** (kör) vizsgálata esetén, 72  $\mu$ M A $\beta$  oligomerkoncentrációt alkalmazva.

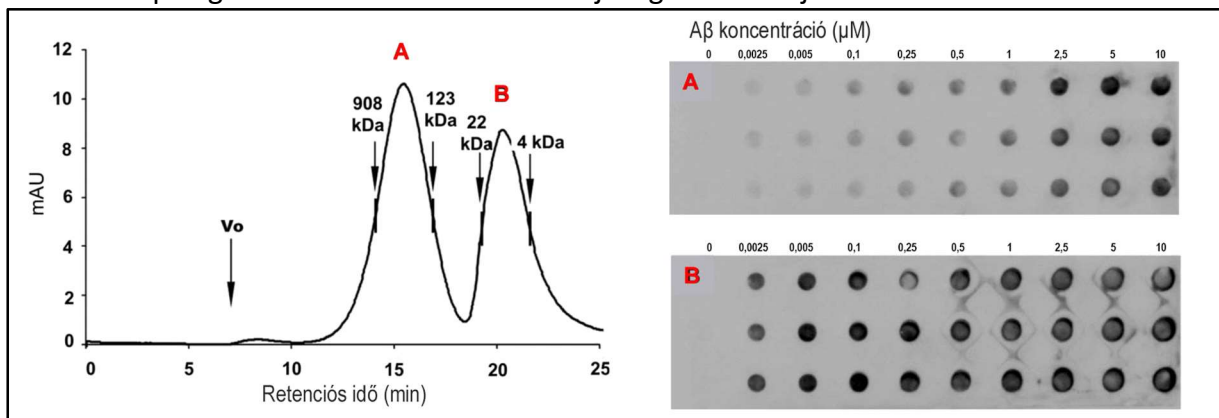
**1**, **4**, **5**, **6** szekvenciáját biotinil-aminohexanoil-Gly-Gly részlettel kiegészítve, majd ezekből a konjugátumok biotinilált formáit előállítva, lehetséges a molekulák streptavidinnel borított ELISA-lemezre történő lekötése. Ebben a kísérleti rendszerben heterogén fázisban határozható meg az A $\beta$  oligomerek affinitása a foldamer-dendrimer konjugátumokhoz, melyek közül a tetra-valens forma sematikus ábrázolása a **25.A ábrán** látható. Lyukanként 5 pmol anyagot vittünk fel a lemezre, a kapott kötődési görbék a **25. ábra B** és **C** grafikonján láthatók. A molekulák szilárd hordozóhoz kötése miatt fellépő esetleges sztérikus gátlás miatt természetesen az ITC és ELISA vizsgálatokból kapott eredmények nem mutatnak egyezést, de a kötési erősség-változások trendje igen. Az EC<sub>50</sub> érték biotinil-**7**-re 126 nM, biotinil-**8**-ra 933 nM, biotinil-**1** esetén 12  $\mu$ M (**25.B ábra**), ami jól mutatja a kötési affinitás változását az összekapcsolt foldamer-szegmensek számával. A mérések alapján egyértelmű, hogy a **7**-es konjugátum prezentálja a legnagyobb kötési affinitást az oligomerekhez. A divalens

konjugátum (**8**) szintén szubmikromoláris kötési erősséggel kötődik a felszínhez, de nem indukál oligomer-precipitációt.



**25. ábra** ELISA kísérletek, melyekben biotinilált foldamer-dendrimer konjugátumokkal (**A**) borítottunk streptavidinnel kezelt lemezt, majd a konjugátumokhoz kötődő A $\beta$  oligomerek mennyiségét szekvensspecifikus anti-A $\beta$  BAM10 antitesttel határoztuk meg. **B**: **7** (kör), **8** (háromszög) és **1** (négyzet) kötődési görbéi, **C**: **7** (kör), **9** (háromszög) és **10** (négyzet) kötődési görbéi.

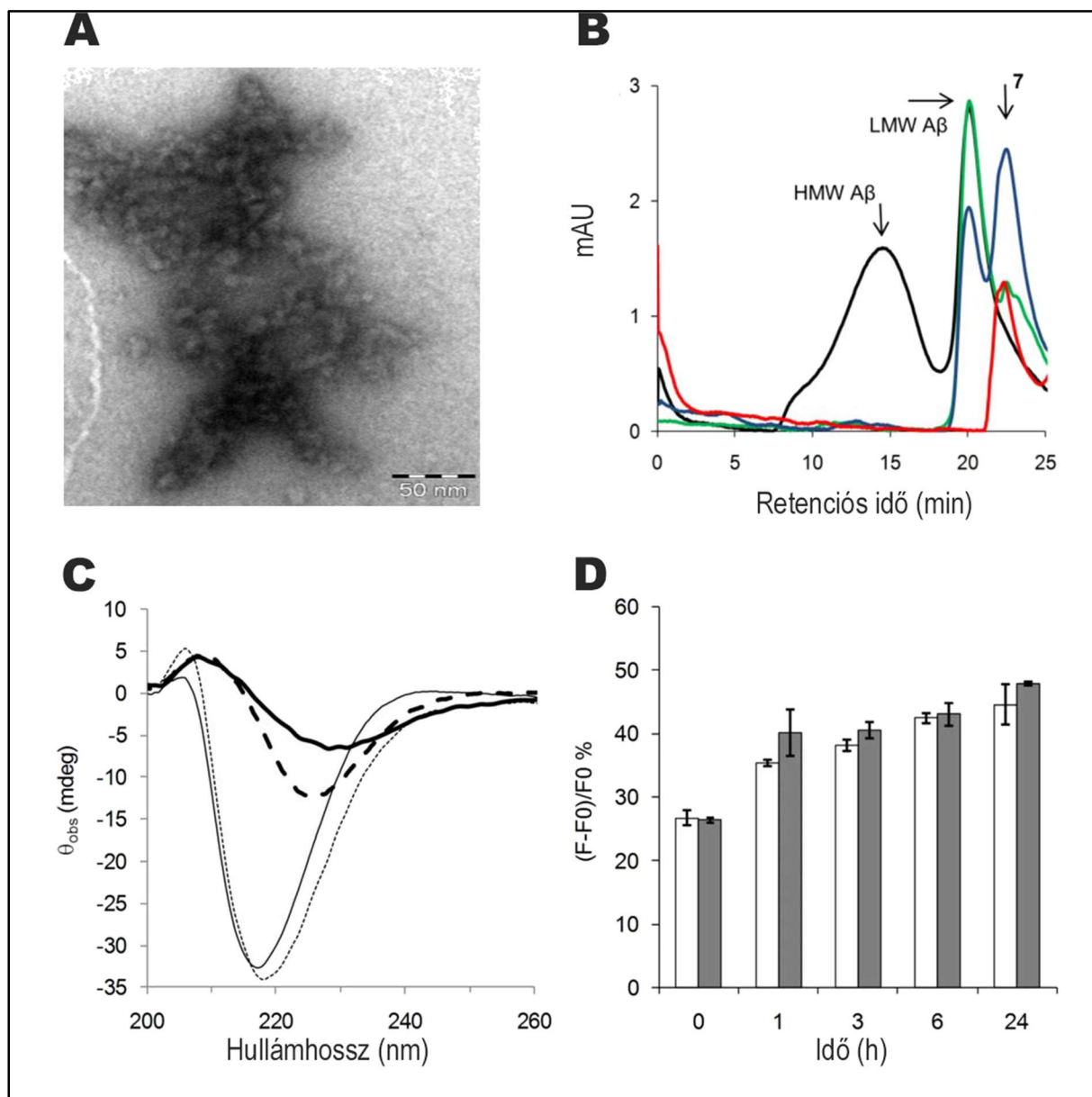
A foldamer szerkezetének szerepe tanulmányozható a biotinil-**7** (126 nM), **-9** (4,4  $\mu$ M) és **-10** (18,5  $\mu$ M) kötődési eredményeinek összehasonlításával (**25.C ábra**). Az ELISA mérések jól alátámasztják az ITC-adatok alapján levonható következtetéseket: az erős kötéshez szükséges mind az ionos oldalláncok jelenléte (**9**-ből hiányoznak), mind a  $\beta^3$ -hAsp megfelelő pozíciója (**10**-ben egy pozícióval eltolva, ezáltal ellentétes térállásba került), hiszen mindkét változtatás a kötési affinitás jelentős csökkenését eredményezte. Ezek az eredmények a foldamer-A $\beta$  oligomer kölcsönhatás szelektív jellegét támasztják alá.



**26. ábra** SEC kísérletben elválasztott HMW (**A** csúcs) és LMW (**B** csúcs) oligomer frakció kölcsönhatásának vizsgálata **7**-tel DB kísérletben. Foltokként 10  $\mu$ g **7**-hez adtuk az oligomer-frakciókat különböző koncentrációkban.

**7** ITC méréseiből kapott nagy affinitású kötéshez tartozó kötési sztöchiometria rendkívül alacsony értéke ( $N=0,041$ ) azt valószínűsíti, hogy az erős kölcsönhatásban részt vevő molekulák hányada a teljes mennyiséghez képest jelentősen kisebb. SEC technikával az A $\beta$  oligomer mintából nagy molekulatömegű (HMW, **26. ábra A** csúcs) és kis molekulatömegű (LMW, **26. ábra B** csúcs) frakciókat tudtunk elkülöníteni, melyeket koncentrációjuk meghatározása után adott koncentrációsorban, DB kísérletben, **7** meghatározott mennyiségével vittük kölcsönhatásba. A kötődött LMW és HMW oligomerek mennyiségét A $\beta$

szekvenca-specifikus antitest segítségével határoztuk meg. A foltok intenzitását összehasonlítva látható, hogy a HMW frakció (26.A blot) jellemzően magasabb koncentrációknál eredményezi a jelintenzitás telítődését: a jelentős intenzitásnövekedés a  $\mu\text{M}$ -os koncentráció tartományban jelentkezik. Ezzel szemben az LMW frakció (26.B blot) már a nM-os tartományban is magas jelintenzitást produkál. Ez a mérés az ITC és ELISA eredményeinket egyaránt megerősíti, azzal a többletinformációval, hogy a nagyobb affinitású kötődést a kisebb méretű oligomerekhez rendelhetjük.



**27. ábra** **7** hatása az A $\beta$  oligomerek szerkezetére és méreteloszlására. **A:** A $\beta$  oligomer precipitációja **7** hatására (1:0,5 molarány) TEM felvételen. **B:** SEC vizsgálatok: A $\beta$  oligomerek (50  $\mu\text{M}$ , fekete), **7** (50  $\mu\text{M}$ , piros), illetve A $\beta$  oligomerek + **7** 1:1 (kék) és 1:0,25 (zöld) molarányban. A mintákat szűrés után injektáltuk a SEC oszlopra. **C:** ECD mérések: A $\beta$  oligomerek (36  $\mu\text{M}$ , vastag folytonos), **7** (9  $\mu\text{M}$ , vékony folytonos), illetve A $\beta$  oligomerek + **7** 1:0,25 (vastag szaggatott) molarányban vizsgálva. A vékony szaggatott görbe a két anyag spektrumának hipotetikus összegét reprezentálja. **D:** ThT-kötődési vizsgálat fluoreszcens spektrofotometriával, A $\beta$  oligomerek (36  $\mu\text{M}$ , fehér oszlop), és A $\beta$  oligomerek + **7** 1:1 molarányban (szürke oszlop) vizsgálva.

Arra a kérdésre, hogy befolyásolja-e **7** kölcsönhatása az A $\beta$  oligomerekkel azok másodlagos szerkezetét, további fizikai-kémiai vizsgálatok eredményei adtak választ (**27. ábra**).

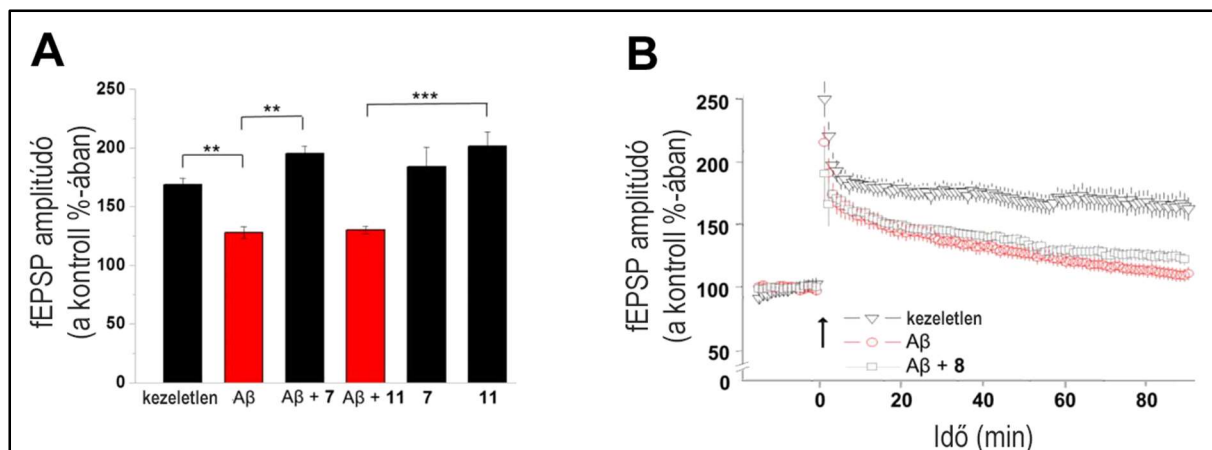
**7**-et szubekvivalens molarányban alkalmazva, TEM vizsgálatok során észleltük a szférikus oligomerek hosszú láncokká, kötegekké történő asszociációját, az érett fibrillumok morfológiájától eltérő aggregátumok képződését (**27.A ábra**). Annak eldöntésére, hogy a precipitáció az LMW frakciót milyen mértékben érinti, SEC vizsgálatokat végeztünk. A $\beta$  oligomerek 50  $\mu$ M-os oldatát kromatografáltuk, szűrés után önmagában (fekete görbe), illetve **7** 12,5  $\mu$ M-os (zöld), és 50  $\mu$ M-os koncentrációja (kék) mellett (**27.B ábra**). Az A $\beta$  oligomerek két frakciója (LMW és HMW) jól elkülönül egymástól. **7** önmagában, kompakt szerkezetének köszönhetően hosszabb retenciós idővel eluál az oszlopról, mint az oligomerek (piros görbe). Ugyanakkor **7** hatására már szubekvimoláris arányban is tapasztalható a HMW frakció „eltűnése”, ami valószínűleg a precipitálódott anyag kiszűrésének a következménye. Az LMW frakció intenzitása **7** szubekvimoláris mennyiségének hatására nem csökken, 1:1 molarány esetén viszont tapasztalható kis mértékű intenzitás-csökkenés. Az LMW frakcióban kötött formában, az A $\beta$ -val összemérhető mennyiségben jelen levő **7** az LMW-frakció LC-MS analízisével is kimutatható (ábra nélkül). Az eredmények alapján tehát az LMW oligomer frakció precipitációra való hajlama csak nagy konjugátum-koncentráció jelenlétében, és akkor is csak részlegesen érvényesül.

Kiseb koncentrációt alkalmazva, de szintén 1:0,25 molarányt tartva az A $\beta$  oligomerek és **7** között, ECD mérésekkel sikerült bizonyítani, hogy a kötődés révén az oligomerekben nem következik be a másodlagos szerkezet jelentős megváltozása. Szerkezetükben főleg  $\beta$ -réteges és rendezetlen szakaszok találhatóak (**27.C ábra**, vastag folytonos görbe), amikben **7** hatására nem következett be a  $\beta$ -réteg mennyiségének megnövekedése (**27.C ábra**, vastag szaggatott görbe). **7** ECD-spektruma igazolja annak korábban NMR-vizsgálatokkal bizonyított helikális szerkezetét (ábra C, vékony folytonos görbe). Az oligomerekkel való kölcsönhatás révén a **7**-re jellemző 220 nm körüli minimum eltűnt a spektrumból, de ezzel együtt nem jelentkezett változás a 210 nm alatti tartományban, amiből feltételezhető, hogy a foldamer helikális konformációja nem változott a kötődés miatt. A foldamerek CD spektruma érzékenyen reagál a rövid szekvenciában bekövetkező konformációváltozásra, viszont rendezetlen szerkezet felvételére jellemző kék eltolódást nem detektáltunk.

A  $\beta$ -réteges szerkezet fennmaradása az oligomerekben **7** jelenlétében ThT-kötéstezztel is igazolható volt (**27.D ábra**). Összehasonlítva a  $\beta$ -réteghez kötődő ThT-re jellemző fluoreszcencia-intenzitásokat, még az alkalmazott 1:1 molarány (oA $\beta$ :**7**) mellett sem detektáltunk szignifikáns eltérést a  $\beta$ -réteg mennyiségében (oA $\beta$ : fehér oszlop, oA $\beta$  + **7**: szürke oszlop).

*In vitro* elektrofiziológiai kísérletben, patkány agyszeleten teszteltük a tetraavalens **7**, a hordozót és pentaglicint, mint kontrollszekvenciát tartalmazó **11**, és a bivalens **8** hatását az oA $\beta$  által indukált LTP-csökkenésre (**28. ábra**).

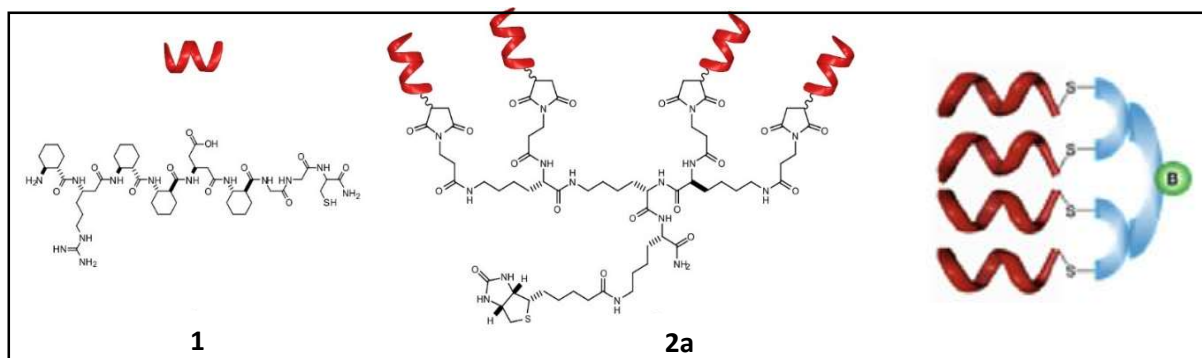
A csak pufferoldattal kezelt szeleteken, az ingerlés után 180 perccel 175 $\pm$ 5% nagyságú fEPSP átlagos amplitúdót detektáltunk (**28.A ábra**). A $\beta$  kezelés hatására (c=720 nM) az LTP értéke jelentősen csökken (128 $\pm$ 5%), míg **7** (c=950 nM) ezt a hatást ellensúlyozni tudta (195 $\pm$ 5%). A kontrollként alkalmazott **11** nem mutatott védőhatást, A $\beta$ -val együtt adagolva az LTP értéke 130 $\pm$ 3% volt. A két vegyület önmagában nem befolyásolta az LTP nagyságát a kezeletlen esethez képest (**7**: 184 $\pm$ 16%, **11**: 200 $\pm$ 14%). A bivalens konjugátum (**8**) ugyanebben a kísérleti elrendezésben nem tudott védőhatást kifejteni (**28.B ábra**), az anyag oA $\beta$ -val való együttes alkalmazása esetén (fekete négyzet) az fEPSP amplitúdó alakulása követi a csak oA $\beta$ -val kapott görbét (piros kör).



**28. ábra** *In vitro* LTP vizsgálatok patkány agyszeleten. **A:** A stimulust követő 180. percben detektálható jelintenzitások a kezelést megelőző kontrollszint %-ában ábrázolva. A $\beta$  c=720 nM, **7**, ill. **11** c=950 nM. **B:** a bivalens **8** alkalmazása esetén az LTP mértéke nem normalizálódik.

Az eredményeket összegezve tehát megállapítható, hogy szerkezeti optimalizált foldamer hélixekből tetra- vagy penta-valens konjugátumot felépítve olyan molekuláris eszközhöz juthatunk, amely szelektíven képes A $\beta$  oligomerek biológiai modellkísérletekben kifejtett hatását csökkenteni. A foldamer szekvencia esetében a kötődés létrejöttéhez szükséges a hidrofób rész mellett az ikerionos szerkezet is, és az ionizálódó oldalláncok pozíciója is döntő a kötési erősség szempontjából. Más csoportok kísérletei szerint a KLVFF szerkezeten alapuló dimer konjugátumok képesek LMW A $\beta$  oligomerekhez kötődve azok beépülését a fibrillumokba gátolni [92, 315, 316], feltételezhetően a  $\beta$ -réteges szerkezet megtörésével. Bizonyították a dimerek aggregációt gátló hatását is, a molekulák biológiai hatásosságát viszont nem vizsgálták. Kísérleteinkben az **1**-es foldamer szekvenciát tartalmazó bivalens konjugátum (**11**) esetén nem tapasztaltunk aggregáció-gátlást, illetve a konjugátum biológiai környezetben sem tudta az A $\beta$  hatását kivédeni. Ezzel szemben a tetra- vagy penta-valens szerkezet (**7**) szignifikáns védőhatást mutatott, ám hatásmechanizmusa a fizikai-kémiai vizsgálatok eredményei szerint nem az aggregáció gátlásán, és a  $\beta$ -réteges szerkezet modulálásán alapul. Míg **7** a nagyobb méretű aggregátumokat a gyenge kötődés következtében kialakuló keresztkötések révén precipitálni képes (23.A/c ábra), addig a kisebb méretű oligomerekhez egy szubmikromólos tartományba eső kötési erősségi állandóval jellemezhető affinitást prezentál, azok precipitációja, aggregációs egyensúlyának eltolása (akár monomer, akár nagyobb oligomer irányba), illetve konformációjuk jelentős megváltoztatása nélkül. Ehhez az erős kötődéshez valószínűleg szükséges a konjugátum mind a négy foldamer-szegmensének az oligomer szabad kötési helyeihez történő hozzáférése (23.A/c ábra).

5.1.3 *Molekuláris diagnosztikai módszer kidolgozása a toxikus aggregátumok kimutatására*  
 Az AK patológiájában központi szerepet játszó A $\beta$  oligomerek biológiai környezetben történő mennyiségi meghatározására jelenleg nincs elfogadott kísérleti eljárás. Azonban az előbbieken bemutatott tetraavalens foldamer konjugátum szelektív, kis méretű A $\beta$  oligomereket felismerő tulajdonsága révén alkalmas lehet biológiai mintákból történő oligomer-kimutatásra, a metódika standardizálásával pedig mennyiségi meghatározásra is [317, 318]. A szimmetrikus, PAMAM-dendrimer vázra épített konjugátum heterogén fázisú tesztrendszerben használt hordozóra (ELISA lemez, SPR chip stb.) való rögzítése azonban geometriailag nem optimális, hiszen molekulánként egy foldamer egység a felszínhez rögzítve az oligomerek számára sztérikusan gátolttá válik. Ezért a multivalenciát biztosító váz áttervezésére volt szükség. A **29. ábra 1**-es vegyülete a korábbi kísérletek alapján legnagyobb affinitással rendelkező szekvencia, melyet egy tetraavalens, poli-lizin vázhoz kapcsolunk a már alkalmazott maleimid-tiol konjugációval (**29. ábra, 2a**). A váz fokálisan szimmetrikus, fókuszpontjában funkcionálizálható egy biotin-egységgel. Ezen keresztül egy streptavidinnel borított felülethez egyszerűen lehorgonyozható, míg a molekula geometriája miatt minden foldamer egység elérhetővé válik az A $\beta$  oligomerek számára.

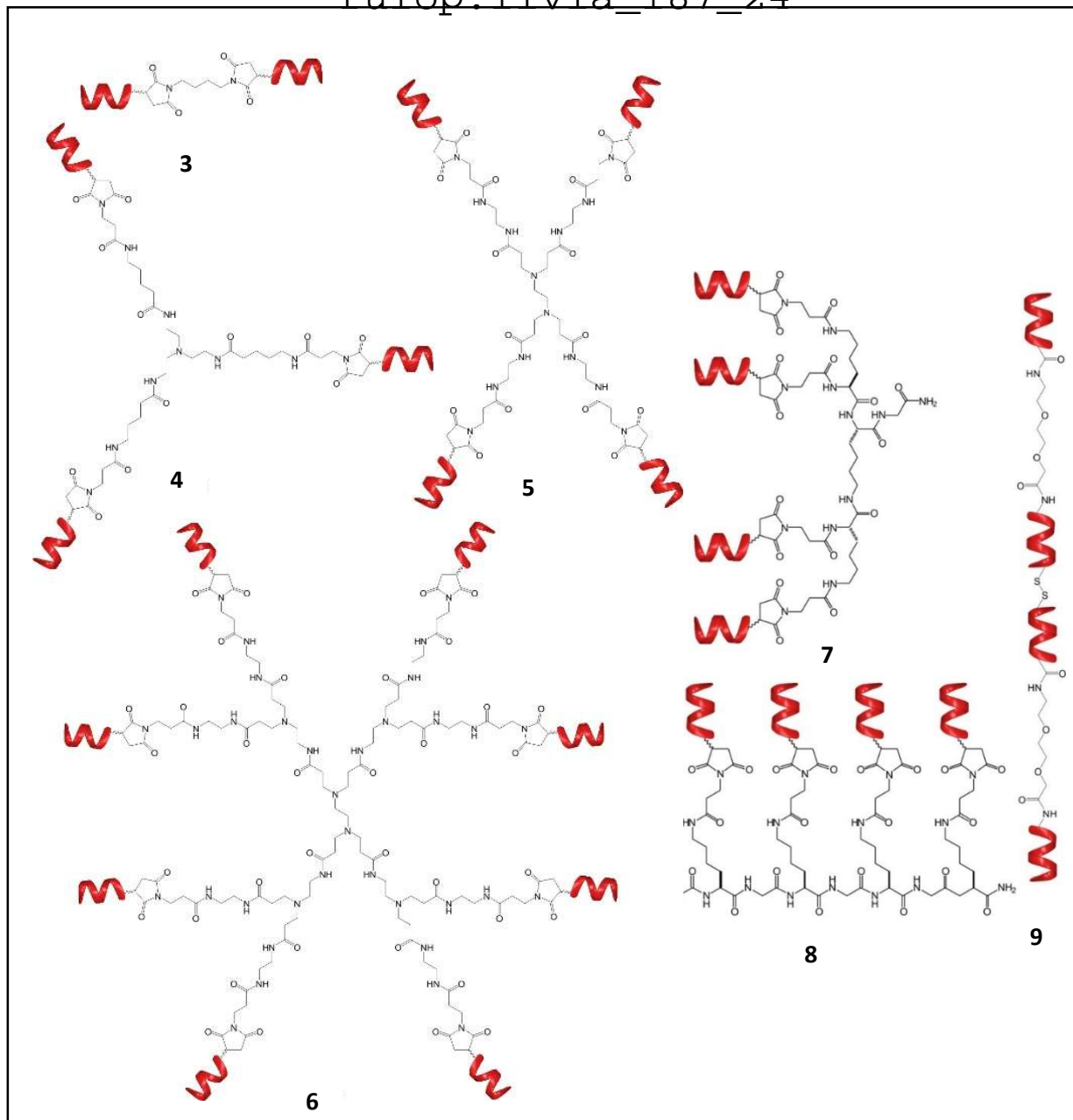


**29. ábra** Az A $\beta$  oligomerek szelektív kimutatására tervezett, heterogén fázisú tesztrendszerben alkalmazható foldamer-dendrimer konjugátum felépítése. **1**: a foldamer szerkezete, **2**: a fokálisan szimmetrikus tetramer konjugátum szerkezete és sematikus ábrázolása.

Az A $\beta$  oligomerekkel kialakuló kölcsönhatás optimalizálásához a molekula jellemző paramétereinek szisztematikus változtatásával juthatunk el. Ez esetünkben jelenti a multivalencia és a geometria együttes optimalizálását, illetve a foldamer szekvencia szerkezetének további vizsgálatát a legmegfelelőbb szerkezetű vázhoz kapcsolva.

A korábban vizsgált divalens (**30. ábra 3**), illetve a tetraavalens, centrálisan szimmetrikus (**30. ábra 5**) konjugátumok mellett elkészítettük a centrálisan szimmetrikus trivalens (**30. ábra 4**), centrálisan szimmetrikus oktavalens (**30. ábra 6**), illetve a már említett tetraavalens fokálisan szimmetrikus molekulákat (**30. ábra 7**). Ez utóbbi molekula a **2a**-tól csak annyiban tér el, hogy a biotin horgonyt nem tartalmazza. A tetramer konjugátum esetén a topológiát is változtattuk. Egyrészt egy ismétlődő szekvenciájú vázmolekulát alkalmaztunk, melyre a helikális foldamerek szimmetrikusan, egymással párhuzamosan lettek felkötve (**30. ábra 8**), másrészt egy másik változatban a helikális szerkezeteket egymás mögé, azonos irányítottsággal, megfelelő távköztartó egységek közbeépítésével kapcsoltuk össze (**30. ábra 9**).





**30. ábra** A molekula geometriájának és a foldamer szegmensek számának változtatásával kapott szerkezetek. Dimer (3), centrálisan szimmetrikus trimer (4), centrálisan szimmetrikus tetramer (5), centrálisan szimmetrikus oktamer (6), fokálisan szimmetrikus tetramer (7), "párhuzamos" tetramer (8), "soros" lineáris tetramer (9).

A vegyületek kötődését az A $\beta$  oligomerekhez ITC vizsgálatokkal jellemeztük (6. táblázat). 1, 3 és 5 értékei a korábbi publikációban [313] közöltekkel egyezők. A centrálisan szimmetrikus geometriájú konjugátumok kötődését jellemző adatokat összehasonlítva, a felismerő szekvenciák számától függő kötése erősségről nyerhetünk információt (1, és 3-6). Megállapíthatjuk, hogy 3 foldamer szekvenciától (4-6) megjelenik a kétlépcsős kötődési forma, ezzel párhuzamosan a kisebb méretű oligomerekhez való kötődést jellemző  $K_{D,1}$  értékek a nanomólos nagyságrendbe kerülnek. A legkedvezőbb kötődést a tetraavalens 5 esetén tapasztaltuk. A multivalencia további növelése (6) nem vezetett a kötése erősség további javulásához, aminek oka valószínűleg a konjugátum zsúfolt, térgátolt geometriája. Azon konjugátumok esetén, melyekben a négy foldamert különböző relatív térbeli elhelyezkedést biztosító hordozókhoz kapcsoltuk (7-9), nem tapasztaltunk jelentős változást az 5-höz képest.

Az első kötődési lépcsőt tekintve a lineárisan sorba kapcsolt tetramer (**9**) esetén a kapott  $K_D$  érték enyhe emelkedése mutatja, hogy ez a szerkezet valószínűleg szterikus szempontból a legkevésbé kedvező. Bár **8** az **5**-tel megegyező, kedvező affinitást mutatott a kis méretű A $\beta$  oligomerekhez, a későbbi felhasználást szem előtt tartva a **7**-ben található fokális poli-lizin hordozót részesítettük előnyben a további kísérletekhez. Ez esetben a váz fókuszpontjában lehet a konjugátumba biotint beépíteni, ami szilárd felületen annak szimmetrikus, középpontban történő rögzítését teszi lehetővé, így segítve elő az A $\beta$  oligomerek számára a kedvezőbb hozzáférést.

Vegyület	$K_D$ (nM <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (kcal M <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (kcal M <sup>-1</sup> )	$-\Delta S$ (kcal M <sup>-1</sup> )
<b>1</b>	2376.1 $\pm$ 214,4	-7,42 *	0,36	7,77
<b>3</b>	721,4 $\pm$ 120,1	-8,10 *	1,14	9,24
<b>4</b>	18,5 $\pm$ 13,9 <sup>1</sup>	-10,20	2,16	12,36
	155,0 $\pm$ 130,9 <sup>2</sup>	-8,98	0,28	9,26
<b>5</b>	6,9 $\pm$ 1,4 <sup>1</sup>	-10,38	10,01	20,39
	281,1 $\pm$ 38,7 <sup>2</sup>	-8,25	2,55	10,80
<b>6</b>	69,0 $\pm$ 12,0 <sup>1</sup>	-9,45	49,4	58,85
	193,4 $\pm$ 30,5 <sup>2</sup>	-8,88	0,31	9,17
<b>7</b>	16,2 $\pm$ 8,9 <sup>1</sup>	-10,27	9,29	19,56
	127,6 $\pm$ 56,7 <sup>2</sup>	-9,09	0,23	9,32
<b>8</b>	4,1 $\pm$ 2,5 <sup>1</sup>	-11,07	2,31	13,38
	374,0 $\pm$ 102,0 <sup>2</sup>	-8,48	0,51	8,99
<b>9</b>	35,0 $\pm$ 19,7 <sup>1</sup>	-9,83	6,01	15,84
	372,1 $\pm$ 212,8 <sup>2</sup>	-8,48	1,18	9,66

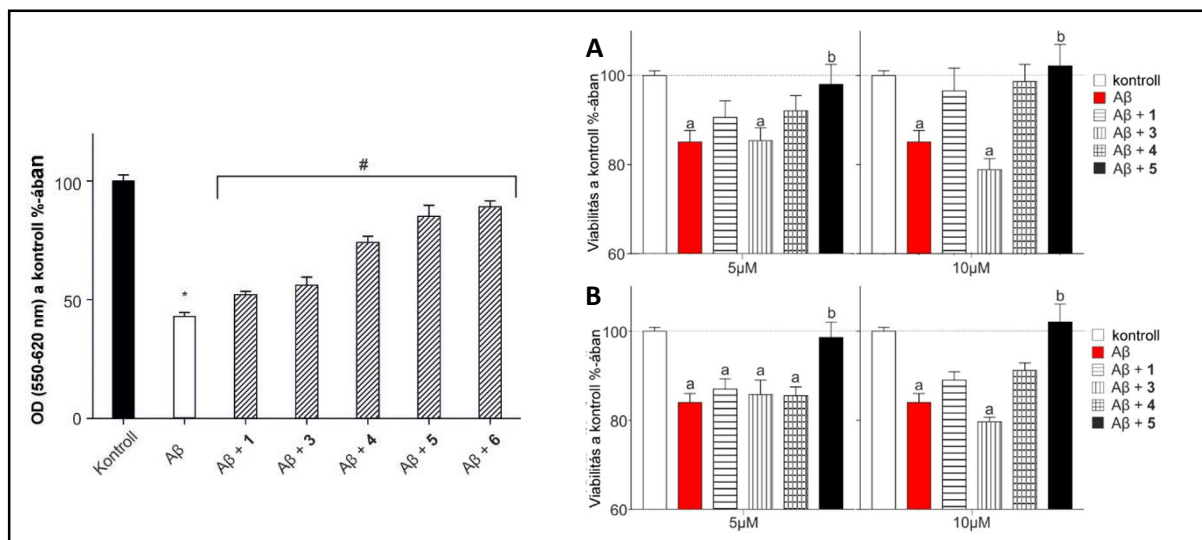
<sup>1</sup> Az 1. kötődési lépcsőhöz tartozó  $K_D$ . <sup>2</sup> A 2. kötődési lépcsőhöz tartozó  $K_D$ .

**6. táblázat** Az **1, 3-10** vegyületek ITC méréseiből nyerhető termodinamikai jellemzők.

A multivalencia és a biológiai hatásosság összefüggésének felderítésére két *in vitro* kísérleti módszert alkalmaztunk (**31. ábra**). Patkány agyszeletekből nyert hippokampális metszetek izolálása után végeztünk szöveti környezetben *ex vivo* viabilitás-mérést, aminek során a szeleteket A $\beta$  oligomerekkel, illetve az oligomerek és az **1, 3-6** anyagok ekvimoláris kombinációjával kezeltük. Az agyszeletek ilyen körülmények közötti túlélése rövid távú hatásvizsgálatra ad lehetőséget. A kísérletben 10  $\mu$ M-os A $\beta$ -kezelés hatására a viabilitás szignifikánsan csökkent (**31. ábra bal oldal**, fehér oszlop, 43,2 $\pm$ 1,6% a kontrollhoz képest). A különböző multivalens konjugátumokkal kezelve a szeleteket a foldamer szekvenciák száma jól korrelált a biológiai hatásossággal. 4 foldamer számig (**1, 3-5**) a hatásosság folyamatosan növekedett, a tetraavalens foldamer esetén (**5**) 85,5 $\pm$ 4,8% lett a relatív viabilitás, 8 egység alkalmazásával (**6**) viszont már nem tapasztaltunk további javulást (89,3 $\pm$ 2,7%). Az ITC és MTT eredmények alapján a **6**-os vegyületet a másik viabilitási tesztben emiatt már nem vizsgáltuk. Az RT-CES módszerrel SH-SY5Y sejtenyészet viabilitását mértük az idő függvényében, impedanciamérésre alapozva (**31. ábra jobb oldal**). Az alkalmazott A $\beta$  koncentráció megegyezett az előző kísérlettel (10  $\mu$ M), a foldamer-konjugátumokat viszont 1:0,5 és 1:1 molarányban is megvizsgáltuk. Ez a mérés alkalmas a sejtek viabilitásának (CV) hosszabb idejű követésére, a **31. jobb oldal A** ábrán a 24 órás végpont, a **31. jobb oldal B** ábrán pedig a 48 órás végpont eredményei láthatók. Az A $\beta$  kedvezőtlen hatása a sejtek viabilitására már 24 óra után szignifikáns volt (CV<sub>A $\beta$</sub>  = 85,1 $\pm$ 2,6%). Két vegyület, **1** és **4** 24 óra után megnövelte a sejtek életképességét mindkét koncentrációban (**31. ábra jobb oldal A**; CV<sub>(1; 5  $\mu$ M)</sub> = 90,6  $\pm$  3,7%; CV<sub>(1; 10  $\mu$ M)</sub> = 96,6  $\pm$  5,1%; CV<sub>(4; 5  $\mu$ M)</sub> = 92,1  $\pm$  3,4%; CV<sub>(4; 10  $\mu$ M)</sub> = 98,7  $\pm$  3,8%), de hatásuk 48 óra után már csak az emelt koncentrációban volt kimutatható (**31. ábra jobb oldal, B**; CV<sub>(1; 5  $\mu$ M)</sub> = 87,0



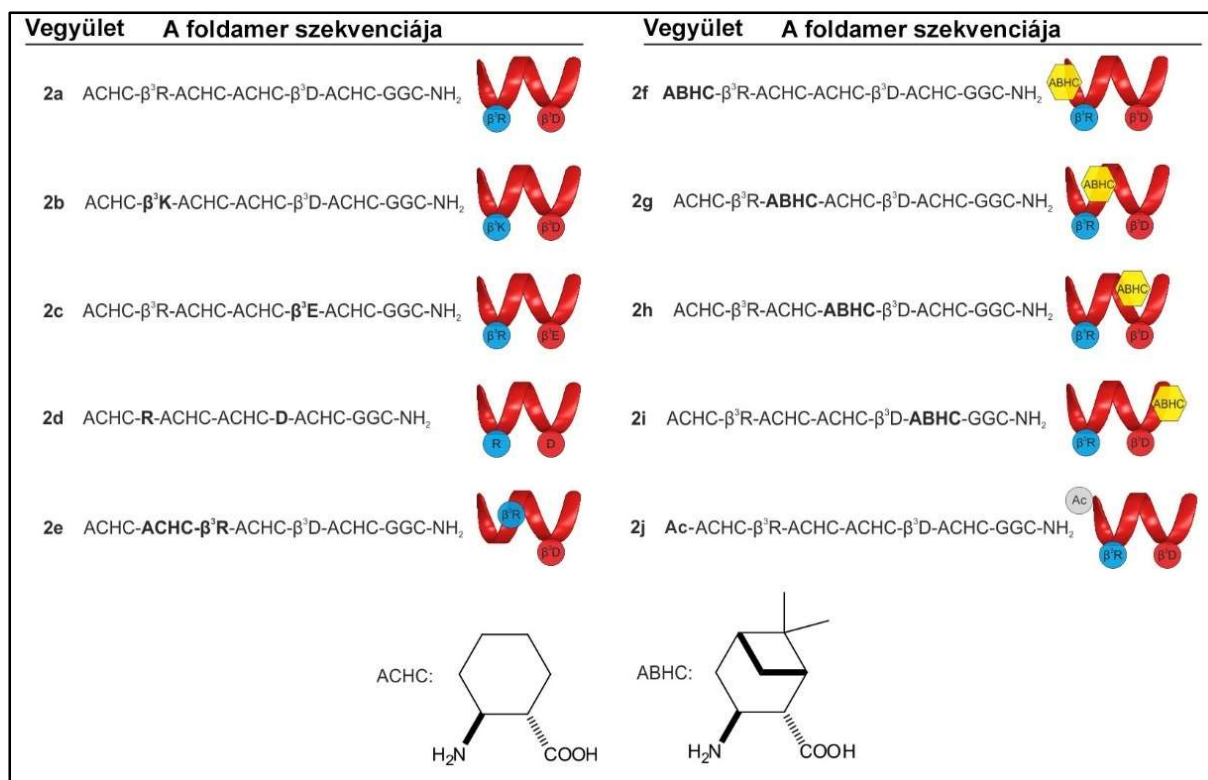
$\pm 2,3\%$ ;  $CV_{(1; 10 \mu M)} = 89,0 \pm 1,9\%$ ;  $CV_{(4; 5 \mu M)} = 85,5 \pm 2,0\%$ ;  $CV_{(4; 10 \mu M)} = 91,2 \pm 1,7\%$ ). A tetravalens **5** esetén tapasztaltuk a legkifejezettebb védőhatást, mely mindkét koncentrációban és időpontban szignifikánsan érvényesült (24 óra:  $CV_{(5; 5 \mu M)} = 98,0 \pm 4,5\%$ ;  $CV_{(5; 10 \mu M)} = 102,2 \pm 4,8\%$ ; 48 óra:  $CV_{(5; 5 \mu M)} = 98,6 \pm 3,4\%$ ;  $CV_{(5; 10 \mu M)} = 102,1 \pm 4,0\%$ ). A **3**-mal történő  $5 \mu M$ -os kezelés egyik időpontban sem volt hatásos (24 óra:  $CV_{(3; 5 \mu M)} = 85,4 \pm 2,9\%$ , 48 óra:  $CV_{(3; 5 \mu M)} = 85,8 \pm 3,2\%$ ), sőt a koncentráció növelése csökkentette a mért viabilitást (24 óra:  $CV_{(3; 10 \mu M)} = 78,9 \pm 2,4\%$ , 48 óra:  $CV_{(3; 10 \mu M)} = 79,7 \pm 1,0\%$ ).



**31. ábra** A multivalencia és a biológiai hatásosság összefüggésének vizsgálata. Bal oldal: ex vivo agyszeleten végzett MTT viabilitási teszt  $10 \mu M$  A $\beta$  oligomerrel történő kezelés (fehér oszlop), és oligomer + **1, 3-6** 1:1 molarányban történő alkalmazása esetén (csíkozott oszlopok) (\*: kontrollhoz viszonyított, #: A $\beta$ -hoz viszonyított szignifikancia). Jobb oldal: SH-SY5Y sejten végzett RT-CES mérések. Az A $\beta$  oligomereket  $10 \mu M$ -os, az **1, 3-5** anyagokat  $5$  és  $10 \mu M$ -os koncentrációban alkalmaztuk. A viabilitást 24 óra (A) és 48 óra (B) után vizsgáltuk (a: kontrollhoz, b: A $\beta$ -hoz viszonyított szignifikancia).

A két viabilitás-mérésben tapasztalható hatásosság-különbség valószínűleg az eltérő biológiai rendszerekkel magyarázható. Az agyszeletben a neuronok természetes környezetükben, sejt kapcsolataikat és gliális környezetüket megtartva vizsgálhatók, így a kezelések hatása is komplexebb. Az észlelt toxicitáshoz és a védelemhez rendelhető mechanizmusok itt több tényezőtől függhetnek, mint a monokultúras exCELLigence mérésekben. Ez a különbség vezethet eltérő életképességhez a vizsgált sejtek tekintetében.

A fokálisan szimmetrikus tetravalens, és a fókuszpontban biotinnal jelölt hordozóra az **1**-es, korábbi munkánkban NMR-vizsgálatok alapján optimalizált foldamer szekvencia rákötésével kaptuk a **2a** vegyületet (**29. ábra**). A foldamer szerkezetének további optimalizálására is kísérletet tettünk, és mivel ITC vizsgálatok mellett ELISA mérésekben is meg kívántuk vizsgálni az anyagok hatásosságát, mindegyik foldamert a biotinilált poli-lizin hordozóra kapcsoltuk fel. Az eredeti **2a**-ban található foldamer és a módosításokkal kapott szekvenciák (**2b-2j**) a **32. ábrán** láthatók. A főbb változtatási irányelvek a következők voltak: az oldallánc szerkezetének megváltoztatása a töltés befolyásolása nélkül (**2b-2d**), az ionos oldallánc pozíciójának módosítása (**2e**), nagyobb térkitöltésű biciklusos oldallánc beépítése (**2f-2i**), illetve a főlánc terminális töltésének eliminálása acetilezéssel (**2j**).



**32. ábra** A tetraavalens, biotinnal jelölt poli-Lys hordozóhoz kapcsolt foldamerek szerkezete.

A tetraavalens foldamer-dendrimer konjugátumok kötődési affinitását az Aβ oligomerekhez ismét ITC-vizsgálatokkal határoztuk meg. Mivel több esetben az ITC görbék kiértékelése az alacsony entalpiaváltozás, vagy a vegyületek rossz oldhatósága miatt nem volt lehetséges, minden anyagot megvizsgáltunk ELISA-mérésekben is (**7. táblázat**).

Vegyület	K <sub>D</sub> ITC (nM <sup>-1</sup> )	ΔG (kcal M <sup>-1</sup> )	ΔH (kcal M <sup>-1</sup> )	-TΔS (kcal M <sup>-1</sup> )	EC50 ELISA (nM)
2a	27,63 ± 7,74 <sup>1</sup>	-9,97	51,33	61,30	0,95 ± 0,06
	239,62 ± 68,67 <sup>2</sup>	-8,73	0,31	9,04	
2b	53,20 ± 38,70 <sup>1</sup>	-9,59	6,57	16,16	5,36 ± 1,42
	373,40 ± 104,33 <sup>2</sup>	-8,78	0,64	9,42	
2c	2,53 ± 1,81 <sup>1</sup>	-11,34	1,96	13,30	1,92 ± 0,21
	175,20 ± 46,41 <sup>2</sup>	-8,91	0,76	9,67	
2d	NA	NA	NA	NA	7,70 ± 3,06
2e	NA	NA	NA	NA	2,71 ± 0,21
2f	19,30 ± 9,40 <sup>1</sup>	-10,17	2,48	12,66	1,79 ± 0,09
	816,40 ± 466,90 <sup>2</sup>	-8,03	0,27	8,30	
2g	34,10 ± 10,00 <sup>1</sup>	-9,85	4,88	14,73	1,34 ± 0,04
	652,30 ± 158,50 <sup>2</sup>	-8,16	0,37	8,53	
2h	8,61 ± 5,64 <sup>1</sup>	-10,64	7,39	18,02	1,35 ± 0,08
	78,99 ± 45,92 <sup>2</sup>	-9,37	0,35	9,72	
2i	NA	NA	NA	NA	1,59 ± 0,08
2j	7,06 ± 0,99 <sup>1</sup>	-10,75	2,44	13,19	30,16 ± 2,27
	79,03 ± 7,46 <sup>2</sup>	-9,36	0,28	9,65	

NA = nem meghatározott. <sup>1</sup> Az 1. kötődési lépcsőhöz tartozó K<sub>D</sub>. <sup>2</sup> A 2. kötődési lépcsőhöz tartozó K<sub>D</sub>.

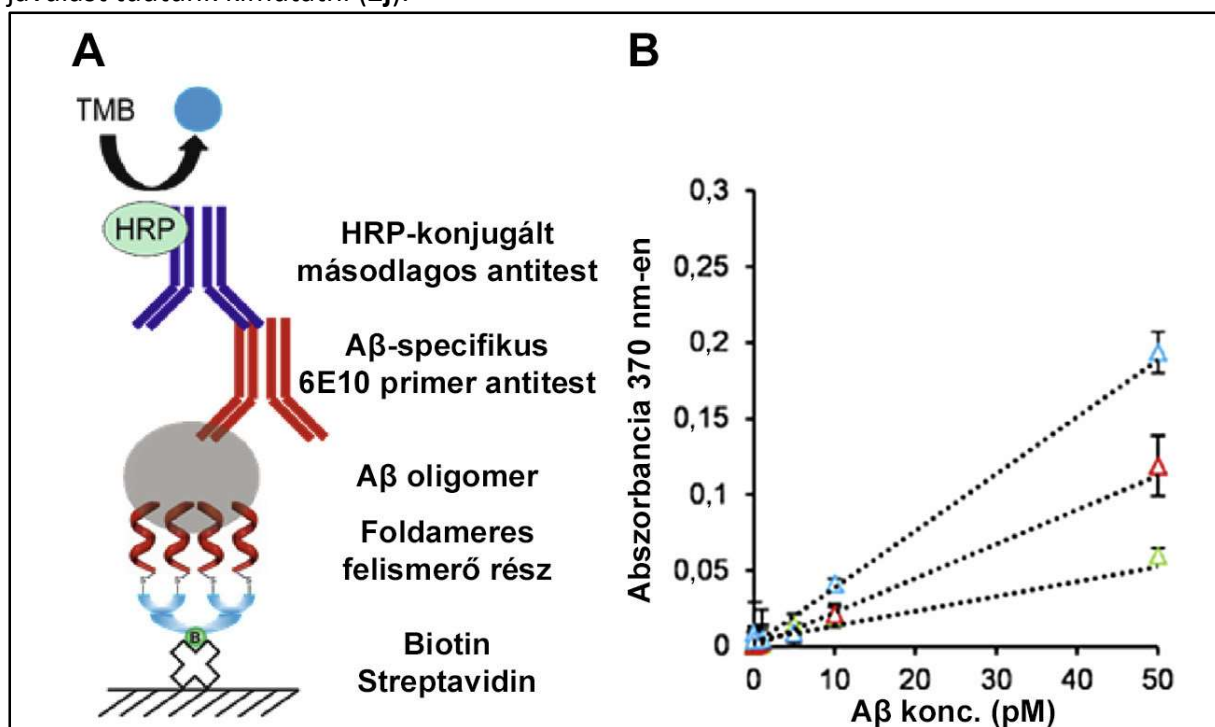
**7. táblázat** Az ITC mérésekből nyerhető termodinamikai paraméterek a **2a–2j** vegyületekre, és az ELISA mérések kvantitatív kiértékelésével kapott K<sub>D</sub> értékek.

Az ITC eredmények alapján a tetraavalens, biotinnal kiegészített konjugátum (**2a**), hasonlóan a centrálisan szimmetrikus korábban vizsgált rokonvegyülethez, kétlépcsős kötődési profillal rendelkezett. Az első kötődési lépcsőt viszonylag nagy kötési affinitás jellemezte ( $K_{D1} = 27,63 \pm 7,74$  nM). Az oldalláncok homológ cseréje nem okozott jelentős változást a kötési affinitásokban: a  $\beta^3\text{hArg} \rightarrow \beta^3\text{hLys}$  csere a kötési affinitás enyhe csökkenéséhez vezetett (**2b**), míg a  $\beta^3\text{hAsp} \rightarrow \beta^3\text{hGlu}$  cserével az affinitás kismértékű javulását sikerült elérni (**2c**). A kationos oldallánc megváltoztatása mind geometriai, mind töltéssűrűségbeli eltérésekhez vezet [319], ami a kötéserősséget kedvezőtlenül befolyásolja, míg az anionos oldallánc cseréjének hatásából arra következtethetünk, hogy a negatív töltés szükségessége, amit a korábbi optimalizálás során igazoltunk, nem feltétlenül párosul erős geometriai követelményekkel, hiszen a hosszabb oldallánc extra kötéserősséget biztosított.

A  $\beta^3\text{hAsp} \rightarrow \text{Asp}$  és  $\beta^3\text{hArg} \rightarrow \text{Arg}$  cserével kapott **2d** vegyület esetében a kapott híválasz kis értéke miatt a görbe kiértékelése nem volt lehetséges, ezért itt csak az ELISA mérések eredményei állnak rendelkezésre. Ugyanezt tapasztaltuk a **2e** vegyületnél is, amiben a  $\beta^3\text{hArg}$  pozícióját változtattuk meg.

Az ACHC egységek ABHC-re történő szisztematikus cseréjével sem sikerült nagyságrendileg növelni a kötési affinitást (**2f-2i**). A vegyületek nagy térkitöltésű, hidrofób oldallánca viszont csökkentette az oldhatóságot, ami ezekben az esetekben az ITC entalpogramok zajosságát okozta, így az illesztések nagyobb bizonytalansággal terheltek voltak, **2i** esetében pedig nem lehetett kiértékelni a mérést.

A foldamerek N-terminálisán a töltés hatása az ITC mérések alapján nem számottevő, az acetilezés eredményeként kis mértékű, de nagyságrendben nem változó kötéserősség-javulást tudtunk kimutatni (**2j**).



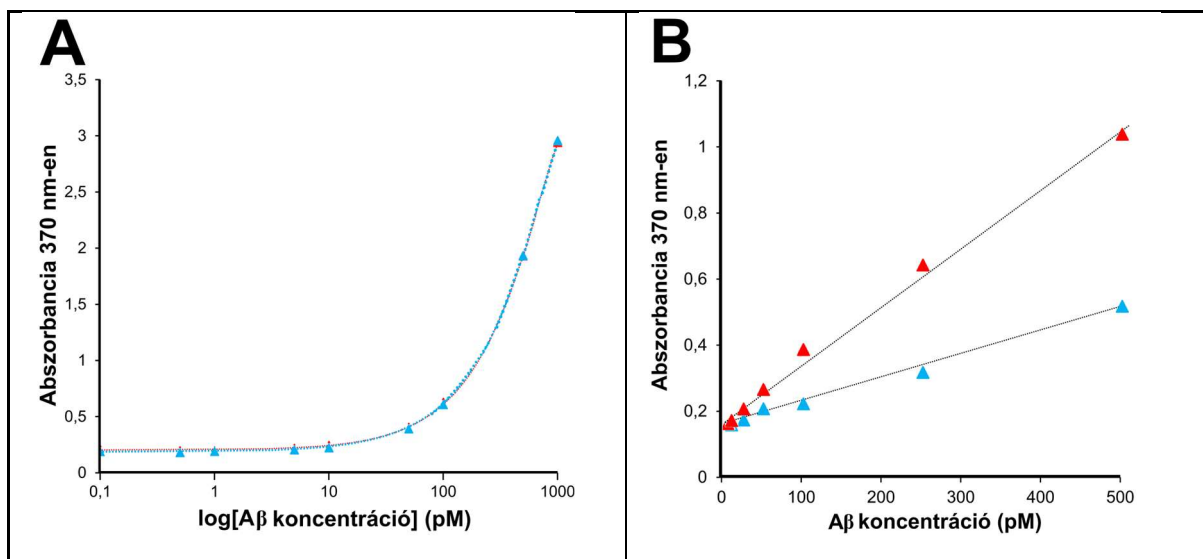
**33. ábra** **A:** A tetramer foldamer-konjugátumot alkalmazó ELISA rendszer felépítése. **B:** Az ELISA rendszer jelerősség-optimalizálása. Zöld: jelintenzitások az A ábra szerinti kísérleti rendszerrel, vörös: Histols-M jelerősítő rendszer alkalmazásával, kék: Histols-M és kisebb felületi borítottságú ELISA-lemez együttes alkalmazásával.

A tetraavalens, biotinilált Lys-dendronos konjugátummal kidolgozott ELISA rendszer sematikus felépítése a **33.A** ábrán látható. Az ELISA lemez streptavidinnel borított. Az eljárás újdonsága, hogy a szelektív kölcsönhatást antitest helyett a fokálisan szimmetrikus foldamer-dendrimer konjugátum biztosítja. Mivel ez az antitestnél kisebb méretű, a szilárd felülethez történő rögzítés esetén kulcsfontosságú az optimális geometria, mely által sztérikus gátlástól mentes kölcsönhatás alakulhat ki a célmolekula és a felismerő rész között. Az A $\beta$  oligomerek kimutatására szekvensspecifikus anti-A $\beta$  6E10 antitestet használtunk.

A **2a-2j** konjugátumokat ilyen rendszerben vizsgálva, a kapott görbék analízisével nyert EC<sub>50</sub> értékeket a **7. táblázat** utolsó oszlopa tartalmazza. Ezekben a kísérletekben az ITC mérésekkel nem meghatározható kölcsönhatásokról is nyertünk információt. Az eredmények szerint a szerkezeti módosítások nem befolyásolták jelentősen az affinitás-értékeket. A legkedvezőbb értékkel a **2a** vegyület rendelkezett, ezért ezt a molekulát használtuk a továbbiakban az ELISA rendszer paramétereinek finomhangolásához, habár az ITC és ELISA mérések együttes értékelése alapján további molekulák (pl. **2c** és **2h**) is nagy valószínűséggel sikeresen alkalmazhatók lehetnek A $\beta$  oligomerek szelektív felismerésén alapuló mérések kivitelezésére. Az AK diagnosztikájának egyik eleme az A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub> arány meghatározása a betegek CSF mintájából. AK-ban az A $\beta$ <sub>1-42</sub> mennyiségének csökkenése a Tau/pTau mennyiségének növekedéséhez társulva 80% feletti specifitással és szenzitivitással alkalmazható az AK diagnosztikai faktoraként [320]. A mérésekhez standardizált ELISA protokollokat alkalmaznak, melyekhez az egyik leggyakrabban használt kit az Innostest® cég ELISA kitje [321]. A mérések szerint az egészséges ember CSF-jében a kimutatható A $\beta$ <sub>1-42</sub> koncentrációja 200 pmol/dm<sup>3</sup> alatti érték, míg az AK-ra jellemzően 100 pmol/dm<sup>3</sup> alatti mért értékek jellemzőek. Annak eldöntése, hogy a mérhető A $\beta$ <sub>1-42</sub> mennyiségéből mennyi a monomer és mennyi fordul elő valamilyen oligomer-formában, szükséges lenne az oligomer-szelektív ELISA eljárás érzékenységének az említett határértékek figyelembevételére szerinti növelése.

Az érzékenység növelhető a szokványos HRP-jelölt másodlagos antitest helyett (**33.B ábra**, zöld görbe) specifikus, mikropolimer-alapú detektálórendszer használatával (Histols-M. Ezzel szintén fajspecifikusan detektálhatók immunoglobulinok, de a szokványos metodikához képest magasabb HRP-mennyiséggel, ami a jelintenzitás növelését, az aspecifikus háttérjel csökkenését okozza (**33.B ábra**, piros görbe). A Histols-alapú detektálás mellett a sztérikus gátlás hatását a jel intenzitására úgy vizsgáltuk meg, hogy az alapként használt, lyukanként 125 pmol biotin-kötőhellyel rendelkező ELISA lemez helyett csökkentett borítottságú, lyukanként 60 pmolos kapacitású lemezt alkalmaztunk (**33.B ábra**, kék görbe). Változatlan EC<sub>50</sub> érték mellett a jelintenzitás további növekedését tapasztaltuk, ami igazolja a sztérikus gátlás intenzitás-befolyásoló hatását. A protokoll optimalizálásával elérhető detektálási határ (LOD, 3 $\sigma$ ) 5 pM-ra becsülhető (n=12), a lineáris tartomány pedig 10-500 pM közé esik (R<sup>2</sup>=0,9974).

Az ELISA meghatározás alapja az a specifikus kölcsönhatás, amely az elkapó immunoglobulin és a meghatározandó fehérjében reprezentált antigén között alakul ki. Az A $\beta$  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. Ennek igazolására összehasonlítottuk az A $\beta$  oligomerek koncentrációfüggő jelintenzitását két különböző oldatban: PBS-ben (**34.A ábra**, vörös görbe), amit az ELISA kísérletekben a minta hígítására használunk, illetve 1% magzati borjúszérummal (FBS) és 0,1% Tween20 detergenssel kiegészített DMEM sejtenyésző médiumban (**34.A ábra**, kék görbe). Látható, hogy a két oldatkörnyezetben az A $\beta$  oligomerek azonos intenzitású jelet adnak, azaz a nagy mennyiségben jelen levő szérumfehérjék és detergens sem zavarja az oligomerek specifikus detektálását.



**34. ábra A:** A biológiai mátrix hatása a jelintenzitásra. A $\beta$  oligomerek növekvő koncentrációjához rendelhető mért jelintenzitások PBS-ben (vörös görbe), illetve DMEM sejtnevelő tápoldatban (kék görbe, 1% FBS és 0,1% Tween20). **B:** Oligomer (vörös görbe) és hígított fibrillaris (kék) A $\beta$  koncentrációfüggő jelintenzitásainak összehasonlítása.

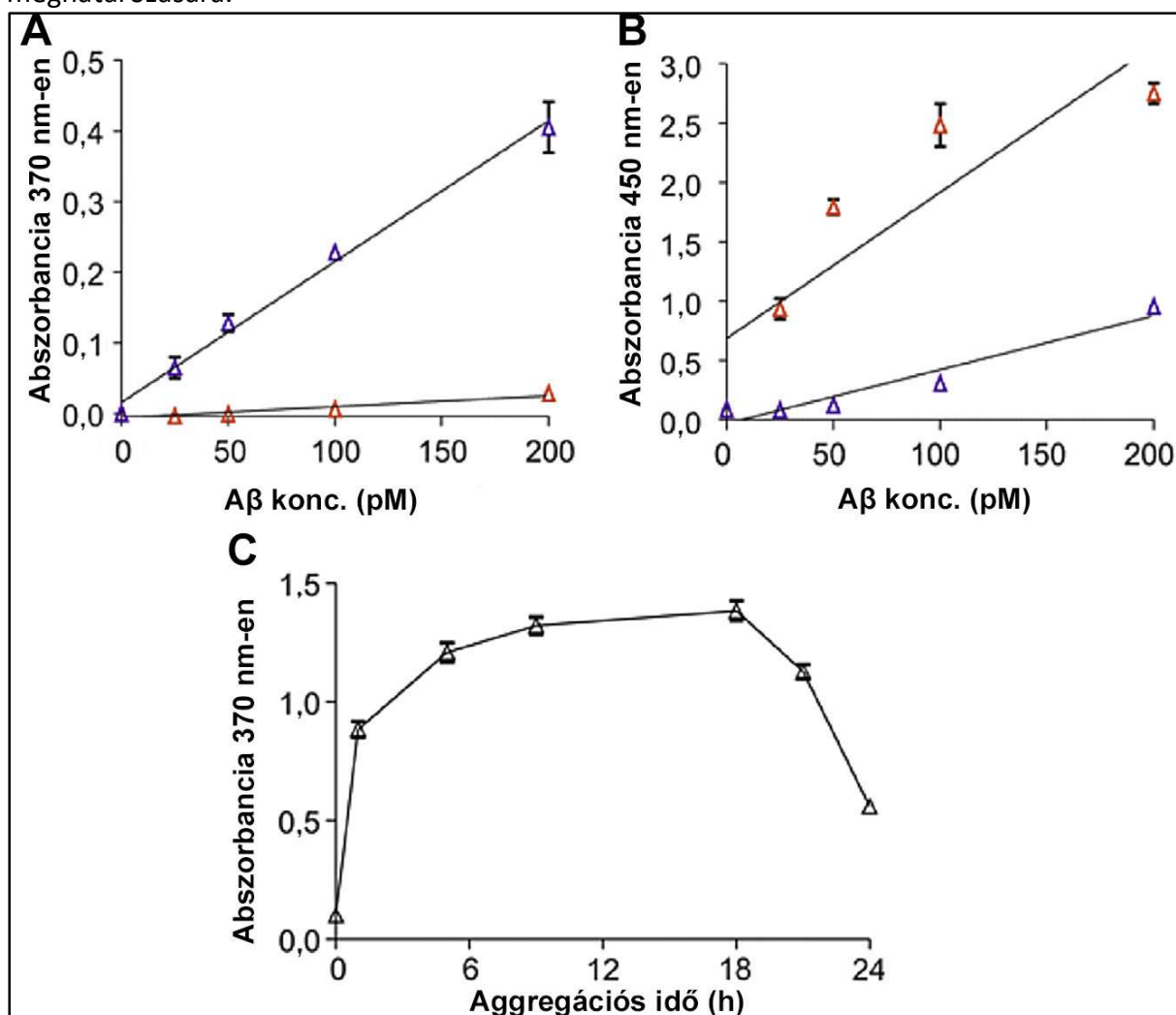
Az utolsó tényező, mely az A $\beta$  oligomerek detektálását befolyásolhatja, maga az aggregációs folyamat. A centrálisan szimmetrikus tetramerrel végzett korábbi kísérleteink bizonyították, hogy az aggregáció korai fázisában képződő kis méretű szférikus oligomerek kötődnek a legnagyobb affinitással a foldamer-konjugátumhoz. A **34.B ábrán** az SOP-val készített A $\beta$  oligomerek és az SFP-val készített fibrillumok hígítási sorának ELISA-rendszerben mért intenzitásai szerepelnek. A mérések szerint a rendszerben az oligomerek nagyobb intenzitású jelet adnak, de a fibrillaris formát tartalmazó mintákban is mérhető jelentős jelintenzitás. Ez azonban nem feltétlenül annak a következménye, hogy a foldamer a fibrillumokkal is erős kölcsönhatásba lép, hiszen a mintából nem különítettünk el fibrillaris aggregátumokat, ezért az valószínűleg egy oligomer-fibrillum elegy, melyben az oligomer-frakció kötődhet a foldamer-konjugátumhoz.

A foldamer-konjugátum oligomer-specifikusságát a jellemzően A $\beta$  monomereket tartalmazó, frissen készített minta analízisével teszteltük (**35.A ábra**). Az A $\beta$  oligomerekre jellemző, 20-200 pM koncentrációtartományban lineáris jelválaszhoz képest a monomer minta alig produkált mérhető jelintenzitást, LOD értéke a mérés alapján 3600 pM-ra becsülhető.

Ugyanezeket a mintákat a kereskedelmi forgalomban kapható, az AK diagnózist megerősítő, A $\beta$ -kimutatásra használt Innostest<sup>®</sup> rendszerben is megvizsgáltuk (**35.B ábra**). Ez a teszt, mivel szekvencia-érzékeny antitesttel működik, a frissen elkészített A $\beta$  esetében jelentősen nagyobb jelintenzitást produkált, mint az oligomerek meghatározása során. Ez utóbbi mintában az alapvonalától eltérő intenzitást 100 pM-os koncentrációban mértünk, az oligomerek szerkezetéből adódóan az antitest számára elérhető antigén látszólagos koncentrációja kisebb, mint a tényleges amiloid-koncentráció.

Végül a jelintenzitás aggregáció-függését is megvizsgáltuk egy olyan kísérleti rendszert alkalmazva, amelyben az SOP-t követve előállítottunk egy 50  $\mu$ M koncentrációjú A $\beta$  oldatot, majd 37 °C-on inkubáltuk 24 óráig. Meghatározott időközönként mintát vettünk az aggregátumból, 500 pM-ra hígítottuk, és az ELISA rendszerben megmértük a jelintenzitást (**35.C ábra**), illetve minden vizsgált időpontban TEM-mel megvizsgáltuk a képződött aggregátumok morfológiáját (kép nélkül). Az intenzitás először gyors növekedést mutatott, majd ezt követte egy jelentős lassulás (3-6 h között), majd egy platófázisba jutott, végül 18 óra

után csökkenni kezdett. Ezzel párhuzamosan megfigyelhettük a szférikus oligomerek keletkezését, majd a platófázisban már megjelentek a protofibrilláris elemek, míg 24 óra múlva a mintában a fibrillumok túlsúlya volt észlelhető. Bizonyítottá vált tehát, hogy a foldamer-konjugátumhoz az oligomer-forma kötődik nagy affinitással, a fibrillumokhoz rendelhető kötés-affinitás valószínűleg jóval kisebb. Ennek pontos meghatározása a monomer-oligomer-fibrillum aggregáció dinamikus egyensúlya, és a hígítás hatására a folyamat kisebb aggregációs formák felé történő eltolódása miatt nem lehetséges [322]. Ez azonban nem rontja az általunk kidolgozott ELISA-rendszer használhatóságát, melyben a **2a** foldamer-konjugátum, illetve egyes módosított változatai is alkalmazhatóak lehetnek mind természetes, mind mesterséges eredetű A $\beta$ -oligomerek nagy érzékenységgű mennyiségi meghatározására.



**35. ábra** A foldamer-konjugátumon alapuló ELISA teszt oligomer-szelektivitásának vizsgálata. **A:** monomer (vörös) és oligomer (kék) A $\beta$  koncentrációfüggő intenzitásgörbéje. **B:** ugyanezen minták vizsgálata Innostest® rendszerben (vörös: monomer, kék: oligomer A $\beta$ ). **C:** az aggregáció időben történő előrehaladása befolyásolja az oligomer-specifikus ELISA rendszerben detektálható jel intenzitását.



## 5.2 Az AICD, mint terápiás célpont

Az elméleti összefoglalóban részletesen bemutattam az AICD AK-patológiában betöltött szerepét, illetve az Fe65-AICD fehérje kölcsönhatást, ami kiindulópontként szolgálhat alternatív terápiás fejlesztésekhez. Munkánk során azonban ehhez a célponthoz egészen más elméleti irányból jutottunk el. Az A $\beta$  oligomerek lehetséges sejten belüli kötőpartnereinek azonosítása mellett (5.1.2.1 fejezet) fibrilláris A $\beta$  aggregátumokkal is kísérleteztünk, de ebben az esetben a sejtek membránfehérjéire fókuszáltunk a fibrilláris forma extracelluláris előfordulása miatt [323]. Ez a munka doktori dolgozatom része volt, de a folytatásából származó eredmények vezettek egy új lehetséges gyógyszerjelölt vegyület kifejlesztéséhez. Ko-precipitációs kísérletekben patkány agyból származó szinaptikus membránfrakcióból izolált fehérjekeveréket elegyítettünk az A $\beta$  és  $\beta$ -krisztallin fibrillumokkal, utóbbit kontrollként alkalmazva. Összesen 88, az A $\beta$  fibrillumokhoz kötődő fehérjét tudtunk azonosítani, közülük 53-at két vagy több peptidszekvencia alapján is. Ezekből 40 mutatott specifikusan csak az A $\beta$ -hoz kötődést, 13 a  $\beta$ -krisztallinhoz is kötődött. A 40 azonosított fehérjéből 20 volt membránfehérje.

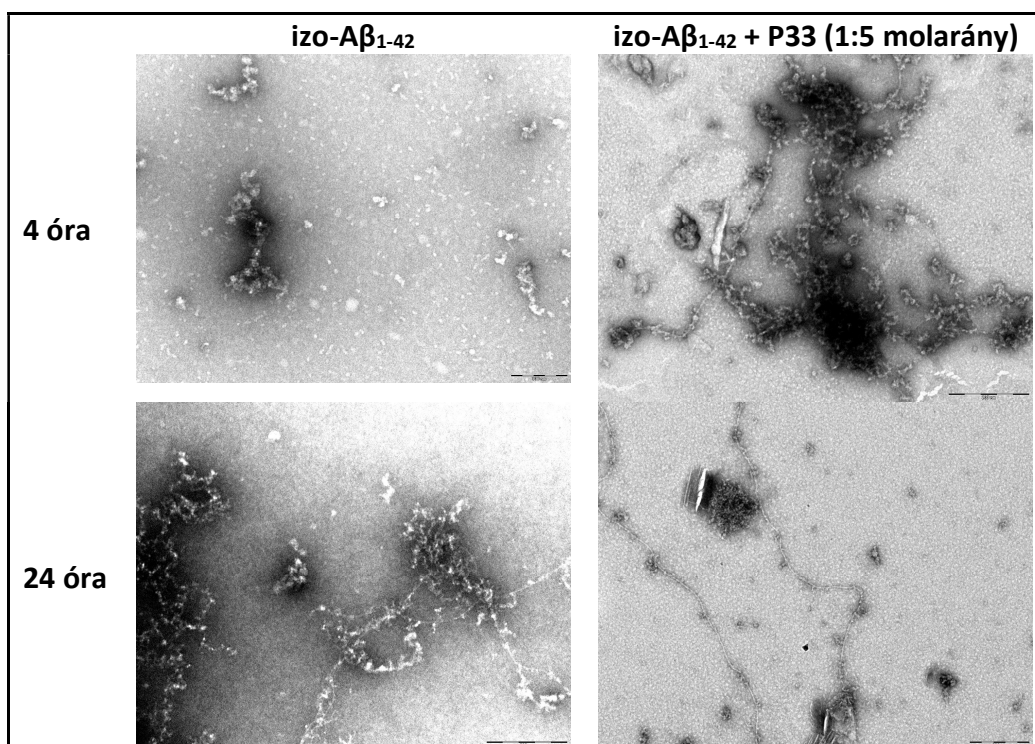
Azon túl, hogy az érintett fehérjék vizsgálatával azonosíthatók új, az AK patológia szempontjából releváns specifikus kölcsönhatások, a fehérjekészlet elemzése egy másik probléma megoldásához is segítséget nyújthat. Ez pedig olyan közös kötőszekvenciák azonosítása, melyek valószínűsíthetően „ragadós” felszínt szolgáltathatnak az A $\beta$  fibrillum számára. Adott hosszúságú fragmensek hasonlósága biostatistikai módszerekkel meghatározható olyan adatbázisok segítségével, melyek az aminosavakat összetett szempontrendszer szerint, hasonlóságukat, illetve egymással való helyettesíthetőségüket tekintve osztályozni tudják. A BLOSUM („Blocks Amino Acid Substitution Matrices”, [324]) fehérjék konzervált szakaszainak statisztikai analízisén alapuló hasonlósági mátrix, aminek segítségével két szekvencia tetszőleges hosszúságú (esetünkben 5 aminosavból álló) fragmensei a bennük található aminosavak hasonlósága és helyettesítési valószínűsége alapján kerülnek osztályozásra. Az elemzés eredményeként egy olyan táblázatot kaptunk, mely az A $\beta$ -val együtt precipitálódó fehérjékből képzett pentapeptideket az előbbi szempontrendszer szerint rendezve megadja, hogy az öt pozícióban mely aminosavak fordulnak elő a leggyakrabban a hasonlóságot mutató szekvenciákban. Az eredmények szerint az N-terminális felőli első aminosav a leggyakrabban ionizálható oldalláncú (a kationos oldallánc jelentősen magasabb előfordulással reprezentált, mint az anionos), melyet egy PXP motívum követ, amiben X a legvalószínűbben szintén prolin, illetve második leggyakoribb aminosavként alanin. Az 5. pozícióban több aminosav közel azonos gyakorisággal fordul elő, jellemzően elágazó apoláris vagy poláris, nem ionizálódó oldallánccal. A gyakorisági táblázat alapján 65 peptidből álló peptid-könyvtárat szintetizáltunk (**8. táblázat**), hatásosságukat toxikus A $\beta$  aggregátumok ellen többféle biológiai rendszerben (*in vitro* viabilitási vizsgálatok SH-SY5Y sejtvonalon, *in vitro* LTP vizsgálatok patkány agyszeleten) is teszteltük. A vegyületeket az A $\beta$  toxicitását gátló molekulákként szabadalmaztattuk [325]. A biológiai vizsgálatokban legígéretesebbnek bizonyult, P33 jelű anyag (szerkezete a **37. ábra** alsó részén látható) lehetséges hatásmechanizmusának felderítésére fizikai-kémiai vizsgálatokat is végeztünk, ezek azonban nem várt eredményt hoztak. A TEM vizsgálatok szerint (**36. ábra**) a P33 anyag nem akadályozta meg az A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptid aggregációját, már 4 óra után kimutatható volt fibrillumok jelenléte a mindkét anyagot tartalmazó mintában is, és 24 óra után volt észlelhető a P33 anyag hatása az aggregátumok morfológiájára. Ezt az eredményt a DLS vizsgálatok is alátámasztották, míg ECD vizsgálatokkal csak gyenge intermolekuláris kölcsönhatások

fellépését tudtuk igazolni a P33 és az  $A\beta_{1-42}$  között, az  $A\beta_{1-42}$  másodlagos szerkezetének lényegi megváltozása nélkül (ábra nélkül).

Jelölés	Szekvencia	Jelölés	Szekvencia	Jelölés	Szekvencia
P1	DP-NH <sub>2</sub>	P23	Propionil-PAPA-NH <sub>2</sub>	P45	E-Sar-A-Sar-A-NH <sub>2</sub>
P2	EP-NH <sub>2</sub>	P24	Iminodiacetil-PAPA-NH <sub>2</sub>	P46	apapq
P3	Szukcinil-P-NH <sub>2</sub>	P25	Propionil-pape-NH <sub>2</sub>	P47	apapd-NH <sub>2</sub>
P4	Szukcinil-PA-NH <sub>2</sub>	P26	Propionil-papq-NH <sub>2</sub>	P48	apapn
P5	Szukcinil-pa-NH <sub>2</sub>	P27	apap-NH <sub>2</sub>	P49	apapq-NH <sub>2</sub>
P6	Glp-G	P28	EPAPA	P50	apapn-NH <sub>2</sub>
P7	Acetil-Glp-G	P29	EPPPA	P51	apape
P8	glp-G	P30	APAPE-NH <sub>2</sub>	P52	apGpe-NH <sub>2</sub>
P9	Glp-D-NH <sub>2</sub>	P31	epapa-NH <sub>2</sub>	P53	ap-(N-Me-ala)-pe-NH <sub>2</sub>
P10	glp-d-NH <sub>2</sub>	P32	epppa-NH <sub>2</sub>	P54	a-tic-ape-NH <sub>2</sub>
P11	EPA-NH <sub>2</sub>	P33	apape-NH <sub>2</sub>	P55	apa-tic-e-NH <sub>2</sub>
P12	Acetil-EPA-NH <sub>2</sub>	P34	apppe-NH <sub>2</sub>	P56	ap-tic-pe-NH <sub>2</sub>
P13	EPP-NH <sub>2</sub>	P35	RPAPA-NH <sub>2</sub>	P57	a-Sar-ape-NH <sub>2</sub>
P14	ape-NH <sub>2</sub>	P36	KPAPA-NH <sub>2</sub>	P58	apa-Sar-e-NH <sub>2</sub>
P15	Acetil-ape-NH <sub>2</sub>	P37	RPPPA-NH <sub>2</sub>	P59	a-pip-ape-NH <sub>2</sub>
P16	GABA-pe-NH <sub>2</sub>	P38	KPPPA-NH <sub>2</sub>	P60	apa-pip-e-NH <sub>2</sub>
P17	DPA-NH <sub>2</sub>	P39	DPAPA-NH <sub>2</sub>	P61	Gpape NH <sub>2</sub>
P18	EPAP-NH <sub>2</sub>	P40	$\beta$ -Ala-PAPA-NH <sub>2</sub>	P62	(N-Me-ala)-pape-NH <sub>2</sub>
P19	Acetil-EPAP-NH <sub>2</sub>	P41	E-Sar-APA-NH <sub>2</sub>	P63	ap-Aib-pe-NH <sub>2</sub>
P20	pape-NH <sub>2</sub>	P42	EPA-Sar-A-NH <sub>2</sub>	P64	Aib-pape-NH <sub>2</sub>
P21	pppe-NH <sub>2</sub>	P43	E-Pip-APA-NH <sub>2</sub>	P65	APEPA-NH <sub>2</sub>
P22	Szukcinil-PAPA-NH <sub>2</sub>	P44	EPA-Pip-A-NH <sub>2</sub>		

*Aib: 2-amino-vaajsav; Glp: L-piroglutaminsav; Sar: szarkozin; Pip: L-pipekolinsav; GABA: gamma-aminovajsav; tic, tetrahydro-izokinolin-3-karbonsav, N-Me-ala: N-metil-D-alanin.*

**8. táblázat** A gyakorisági táblázat alapján szintetizált 65 vegyület szekvenciája

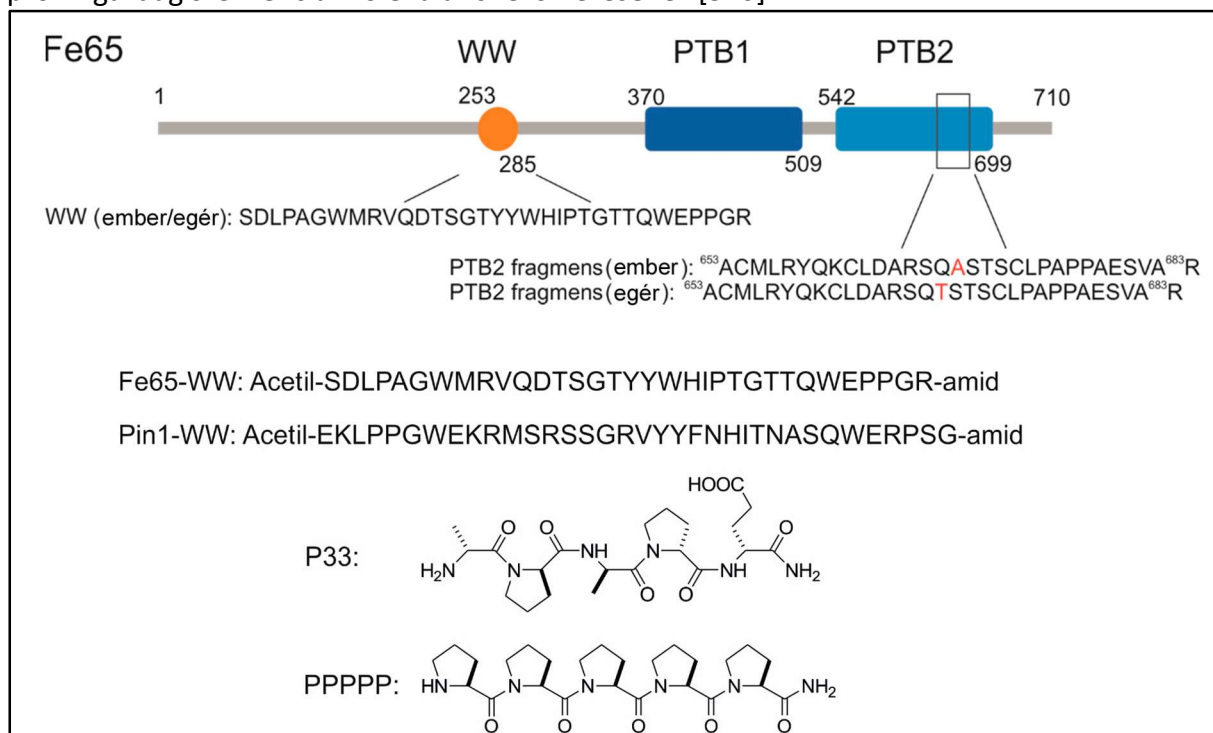


**36. ábra** A P33 hatása az  $A\beta_{1-42}$  aggregációjára: TEM felvételek. Mérték: 200 nm.



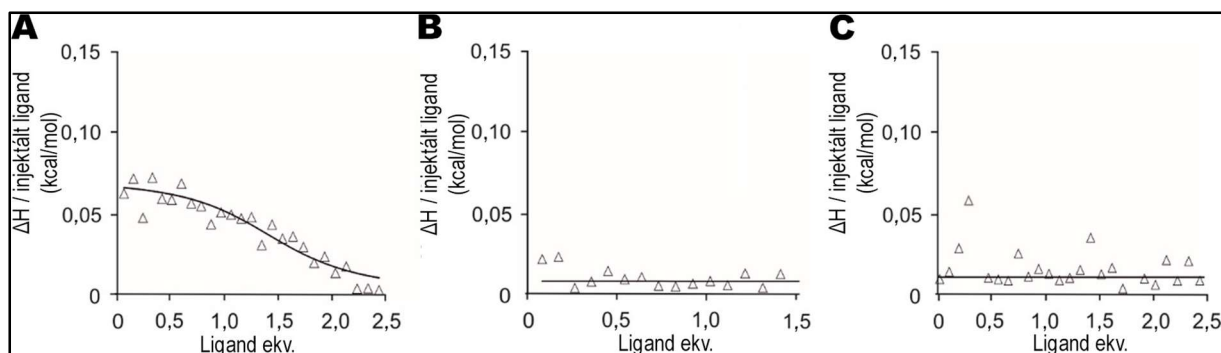
Az *in vitro* viabilitás-mérésekben a peptidkönyvtár tagjainak többsége reprodukálható hatásosságot mutatott (ábra nélkül), amit azonban a leghatékonyabb molekulára (P33) alapozott fizikai-kémiai vizsgálatok tükrében nem lehetett az aggregáció gátlásával, vagy az aggregátumokkal kialakított specifikus kölcsönhatás következtében fellépő védőmechanizmussal magyarázni. A prolin oldalláncok felülreprezentáltsága a szekvenciákban viszont egy új elméletnek adott kiindulási alapot.

Irodalomból ismert fehérjeszerkezeti elem a WW-domén, ami prolin-gazdag szekvenciákkal specifikus kölcsönhatást alakíthat ki. A 2.2.4-es fejezetben részletesen bemutatott Fe65 és Pin1 működésének szabályozása a WW-doménon keresztül lehetőséget adhat az AK folyamatainak AICD-n keresztül történő befolyásolására. Az Fe65 WW doménjének elsődleges szerkezete emberben és egérben azonos (**37. ábra**). Ez számunkra a kísérleti modell választása miatt volt lényeges tulajdonság, ugyanis a kísérletekben nem humán expresszálatott Fe65 fehérjét vizsgáltunk, hanem a kísérleti állatok endogén Fe65-szintjének és funkciójának változását. Bár az Fe65 és Pin1 WW-doménjainak funkciója hasonló, szekvenciáikban jelentős eltérés mutatkozik (**37. ábra**). Az Fe65 WW-doménje a WW-domének alosztályokba való besorolása alapján II-es típusú, amely szerint preferáltan a PPLP motívumot ismeri fel, míg a Pin1 WW-doménje IV-es típusú, mely esetben egy (foszfo-T/foszfo-S)-P egység szükséges a prolin-gazdag szekvencia molekuláris felismeréséhez [326].



**37. ábra** Az Fe65 sematikus szerkezete, a humán és egér fehérjék WW és PTB2 doménjének összehasonlítása. Az *in vitro* kísérletekben alkalmazott, szintetikus forrásból származó WW-domének és vizsgált pentapeptidek szekvenciái.

Annak érdekében, hogy feltérképezzük a P33 vegyület kölcsönhatásának erősségét és specifikusságát az Fe65 WW-doménjével, *in vitro* kötődési vizsgálatokat végeztünk [327]. Ezek során a Pin1 WW-doménjét használtuk kontrollként a fehérje-célpontra irányuló szelektivitás teszteléséhez, illetve a P33 szekvencia-specifikusságát egy pentaprolin peptid kontrollként való alkalmazásával próbáltuk felderíteni.



**38. ábra** ITC vizsgálatok. Az injektált pentapeptid moláris mennyiségére normált kötési entalpia értéke ábrázolása a pentapeptid mennyiségének függvényében, pH 7,4-en, PBS-ben 37 °C-on. **A:** Fe65-WW titrálása P33 peptid növekvő mennyiségével. **B:** Fe-65 titrálása P33 peptiddel. **C:** Pin1 titrálása P33 peptiddel.

A kötéserősség oldatfázisban történő meghatározásához pH=7,4-es PBS-ben, 37 °C-on ITC méréseket végeztünk (**38.ábra**). Az Fe65-WW doménjéhez növekvő mennyiségben P33-t adagolva a kötési entalpiaváltozás értékéből meghatározható disszociációs állandó  $K_d=4,68\pm 0,04$   $\mu\text{M}$ , míg a sztöchiometria-faktor  $N=1,14$ , ami közel ekvimoláris aránynak felel meg (**38.A ábra**). A poliprolin-szerkezetet önmagában reprezentáló P33 peptid nem mutatott kötődést az Fe65-WW-hez, amivel igazoltuk a szekvencia-specifikusságot (**38.B ábra**). Hasonlóan, a Pin1 WW-doménje és a P33 között sem sikerült ITC-vel mérhető erősségű kötődést kimutatnunk (**38.C ábra**). Így az állatkísérleteink esetében kizárhatjuk a Pin1-involválts, a Tau foszforilációjára irányuló molekuláris mechanizmusokat a P33 hatásának lehetséges magyarázatai közül.

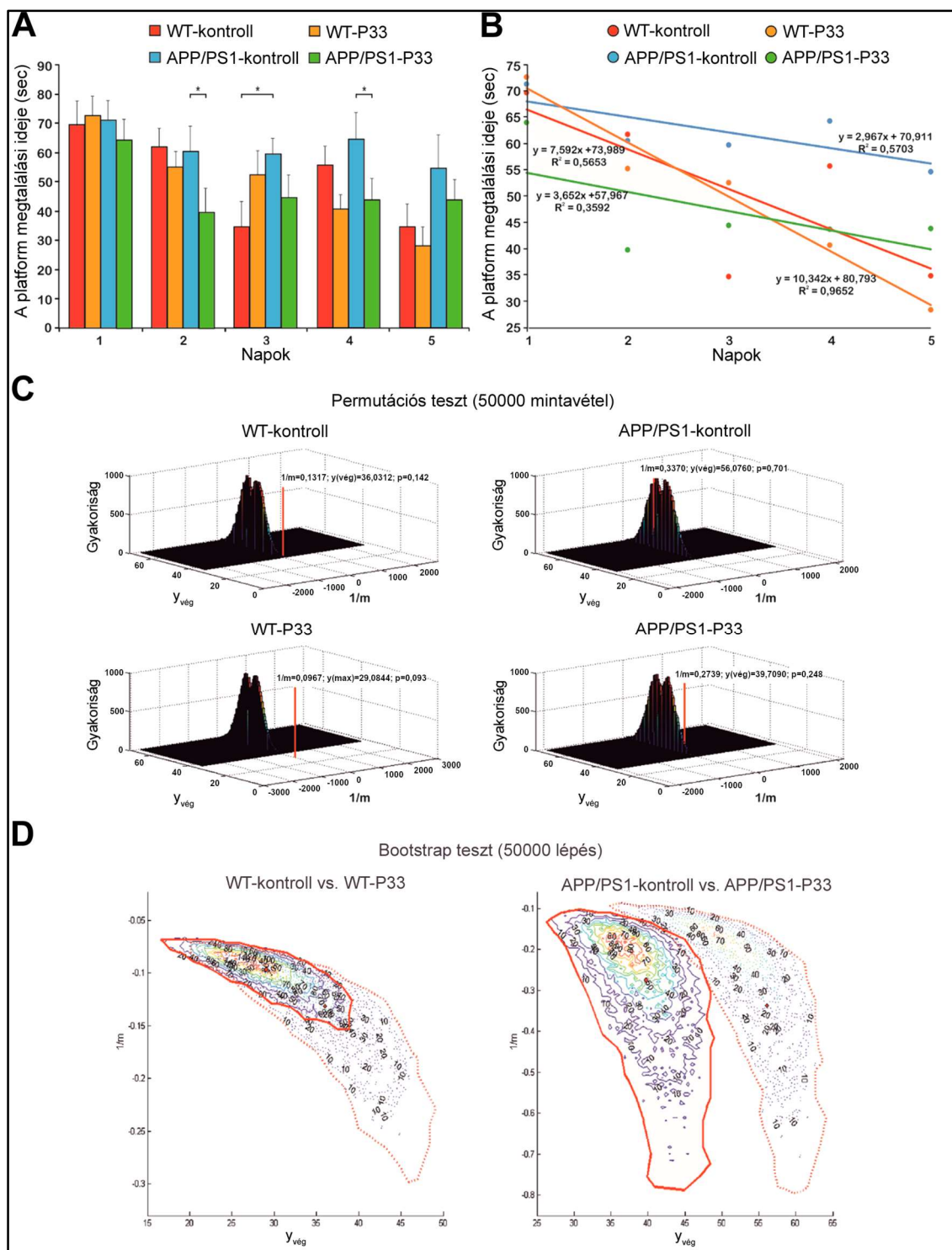
A P33 peptid biológiai hatását APPxPS1 transzgen egértörzsben vizsgáltuk meg, kontrollként C57BL/6J egereket alkalmaztunk. Az egereket 3 hónapos koruktól 6 hónapon át kezeltük P33 anyaggal (IP injektálással,  $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  mennyiséggel, hetente 5 alkalommal). A kezelés végeztével magatartás-vizsgálatokat végeztünk, majd az állatok terminálása után, az agyukból származó mintákban monitoroztuk az A $\beta$ -patológia molekuláris jellemzőinek változását.

A P33 anyag hatását a memóriára és tanulási képességekre MWM kísérletben teszteltük. Az öt napos tanítási periódusban megmértük a vízbe merített platform megtalálásáig eltelt úszási időket (**39.A, B ábra**). A statisztikai kiértékelés (ismétléses ANOVA) szignifikáns eltéréseket tárt fel a mért paraméterek között, és a *post hoc* analízis kimutatta, hogy az APPxPS1-es kontroll csoport egyedeinek szignifikánsan hosszabb időre volt szüksége a platform megtalálásához.

Ezen a ponton érdemes mélyebben megvizsgálni az ilyen típusú magatartás-vizsgálatok eredményeinek statisztikai kiértékelését. A konvencionális, az irodalomban rutinszerűen alkalmazott parametrikus eljárások többsége feltételezi az adatok normális eloszlását. Ez a kritérium azonban a MWM kiértékelésekor nyert adathalmazra nem feltétlenül teljesül. Emellett az egymást követő napokon végrehajtott mérések adatai nem függetlenek egymástól, ezért a többszörös tesztelés esetén előálló esetleges fals pozitív vagy fals negatív döntések azonosítása a konvencionális statisztikai módszerek alkalmazása esetén nem lehetséges. Ezen problémák miatt egy új, nem-parametrikus statisztikai módszert fejlesztettünk ki az adatok minél kisebb hibával történő értékelésére.

A **39.A ábrán** az úszási idők átlagai láthatók a napok függvényében. A **39.B ábrán** ugyanezek az adatok találhatók pontdiagramon, az egyes állatcsoportokat jellemző adatsorokra illesztett egyenesekkel, illetve a hozzájuk rendelhető egyenletekkel és  $R^2$  értékekkel. Elgondolásunk szerint az egyenes jellemző paramétereinek vizsgálatával megítélhető, hogy egy bizonyos hatásra adott választ (tanulás miatt csökkenő úszási időt) detektáltunk, vagy egy véletlen

eseményt, illetve, hogy az egyes állatcsoportokat jellemző tanulási folyamatok szignifikánsan eltérnek-e egymástól.



**39. ábra** Az MWM teszt statisztikai értékelése. **A:** az egerek platform megtalálási idejének átlaga ábrázolva az egyes csoportokra a tanulási napok függvényében. **B:** Az A ábra adatai x,y diagramon ábrázolva, az adatokra illesztett egyenesekkel. **C:** A permutációs tesztek 3D eloszlási térképei.  $y_{\text{vég}}; (1/m)$  adatpárok gyakorisági eloszlásának ábrázolása a négy állatcsoportra. **D:** A „bootstrapping” mintavétellel kapott  $y_{\text{vég}}; (1/m)$  adatpárok 2D eloszlási kontúrdiagramja. Bal oldal: vad típusú kezelt (vörös folytonos görbe és kör középpont) és kezeletlen (vörös szaggatott görbe és rombusz középpont) állatok, jobb oldal: APPxPS1-es kezelt (vörös folytonos görbe és kör középpont) és kezeletlen (vörös szaggatott görbe és rombusz középpont) állatok adatai.

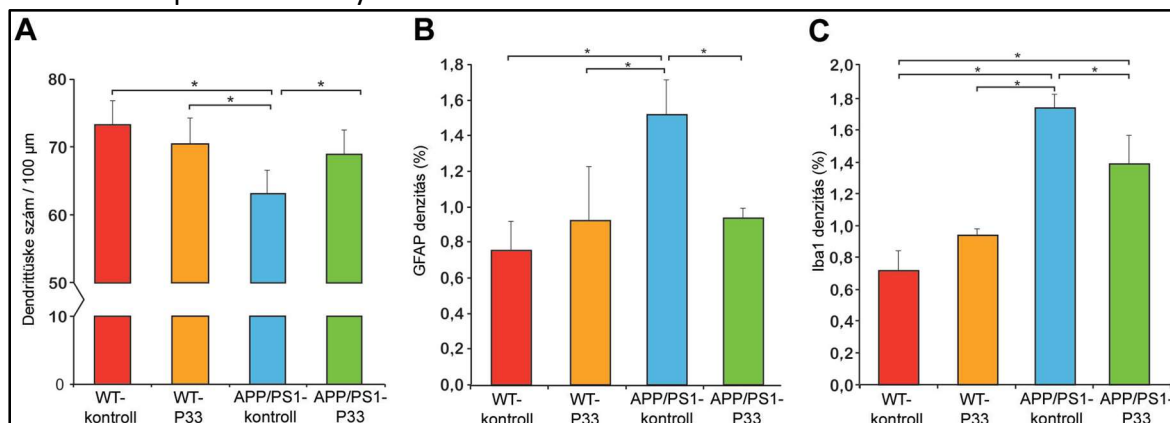
A fals pozitív döntési hiba kizárására (azaz, hogy egy változást tévesen szignifikánsnak ítélünk) permutációs módszert alkalmaztunk. Ehhez a teljes mért adatkészletből (minden állat minden nap mért adatát véve), 50 ezer különböző adatszettet állítottunk elő, és ezeket 2 származtatott adattal jellemeztünk (2-változós modell): 1) az illesztett egyenes meredekségének reciproka ( $1/m$ ), melynek nullához közeli negatív értéke az állatok tanulási képességének napról-napra bekövetkező erőteljes javulásával korrelál, 2) az utolsó napra eső úszási idő ( $y_{vég}$ ), melynek nullához közelsége szintén a tanulási folyamat eredményességét mutatja. Ezek az adatképek az  $y_{vég};(1/m)$  kétdimenziós adattérben az 50 ezer véletlenszerű mintában különböző gyakorisággal fordulnak elő, az így kapott gyakorisági eloszlásokat reprezentáló 3D eloszlási térképek a **39.C ábrán** láthatók.

Minden ábrán szerepel az adott ténylegesen mért adatsort jellemző egyeneshez tartozó  $y_{vég};(1/m)$  adatkép is, ez pirossal van jelölve. A piros érték elkülönülése a fekete adatmezőtől azt jelenti, hogy a véletlenszerű esetektől statisztikailag jól elválik a mért adatsor, tehát az állításunk annak szignifikanciájára vonatkoztatva igaz. Ezt az elgondolást elfogadva megállapíthatjuk, hogy a vad állatok esetében mind a kezeletlen kontroll csoportot, mind a P33-mal kezelt csoportot jellemző  $y_{vég};(1/m)$  adatkép kívül esik a véletlenszerű zónán, adatsoruk tehát szignifikánsan különbözik a véletlenszerű esetektől. Az APPxPS1-es kezeletlen állatokat jellemző adatsor viszont statisztikailag nem különül el a véletlenszerű generált esetektől, tehát ott nem beszélhetünk tényleges, javuló tendenciát mutató tanulásról. Az APPxPS1-es állatok P33-mal történő kezelése hatására előálló adatsor  $y_{vég};(1/m)$  értéke a véletlenszerű tartományon kívülre esik, ami a kezelés hatásosságát bizonyítja.

A fals negatív döntési hiba bekövetkeztének valószínűségét egy másik módszerrel, a „bootstrapping” eljárással becsültük meg (**39.D ábra**). Ez egy ismétléses mintavételi eljárás, azaz egy adat, kiválasztása után, visszakerül a szettbe. Ezzel a minta változékonyságára is tehető becslés. A módszer alkalmazásához szükséges alapfeltevés, hogy az eredeti adathalmaz a populáció reprezentatív mintája volt. A módszerrel ismét 50 ezer adatszettet generáltunk a mérési adatokból, és a  $y_{vég};(1/m)$  2-változós modellt vizsgáltuk. A cél a P33 kezelés hatékonyságának eldöntése az adott állatcsoportra, ezért a vad típusú kezeletlen (**39.D ábra** bal oldal, vörös rombusz és vörös szaggatott kontúr) és kezelt állatokat (**39.D ábra** bal oldal, vörös kör és vörös folytonos kontúr), illetve az APPxPS1-es kezeletlen (**39.D ábra** jobb oldal, vörös rombusz és vörös szaggatott kontúr) és kezelt (**39.D ábra** jobb oldal, vörös kör és vörös folytonos kontúr) állatokat hasonlítottuk össze egymással. A vastag kontúrokkal határolt területek az adatok 90%-át tartalmazzák. A bal oldali ábrán a két adatmező nagy arányban fed át egymással (a kezeletlen adatmező területének 32%-a fed át a kezelt adatmező területének 89%-ával), aminek alapján kimondhatjuk, hogy a két csoportot leíró változóban nincs szignifikáns eltérés, azaz a vad kezeletlen és a vad P33-mal kezelt egerek hasonló mértékben voltak képesek az információt megtanulni. Az APPxPS1-es állatok esetében viszont (jobb oldal) az átfedés kicsi (mindkét adatmező teljes területének kb. 2%-a fed csak át), ami viszont azt jelzi, hogy a transzgén állatok esetében a tanulási képességekben megnyilvánuló különbség szignifikáns. Ez a vizualizáció azt is megmutatja, hogy mérési adataink nem követik a Gauss-eloszlást, mivel ebben az esetben az adatmezőknek szimmetrikusan elliptikusnak kellene lenniük. Általánosan levonható tanulság tehát, hogy ha az adatok eloszlása a tanulási folyamat által szisztematikusan egy irányban befolyásolt, a szokványos statisztikai eljárások nem alkalmazhatóak. Ilyen esetben a nem-paraméteres statisztikai eljárások használata javasolt.

A magatartás-tesztek mellett az AK egyes jellemző molekuláris folyamatait is megvizsgáltuk a kísérleti állatokban. A neurotoxikus oligomerek képződése, illetve az amiloid plakkok kialakulása hatással van a neuronális plaszticitásra, amivel összefüggést mutat az idegsejtek

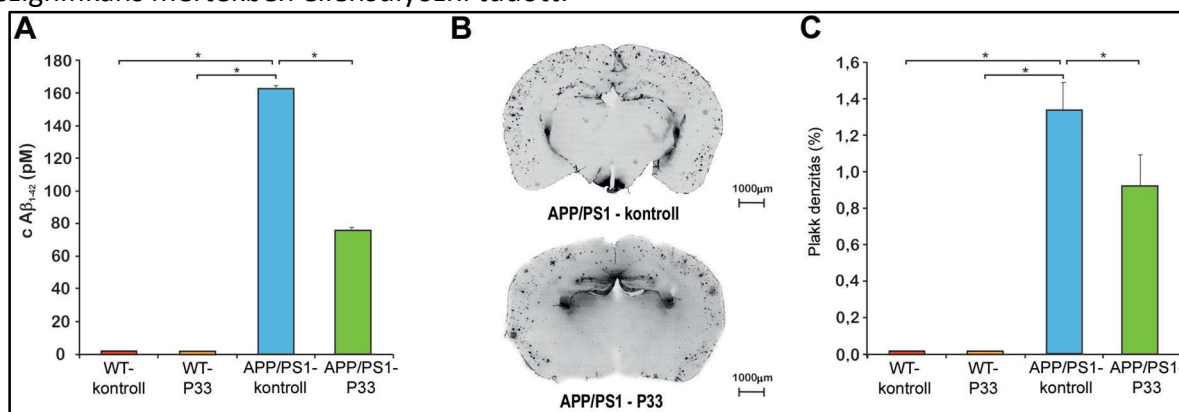
nyúlványain kialakuló dendrittüskék száma és morfológiája. A dendrittüske-képződést többféle módon lehet kvantitatívan jellemezni. Az egyik ilyen, időigényessége miatt kevésbé kedvelt módszer a dendrittüskék mennyiségének standardizált körülmények között történő megszámlálása. Ehhez a neuronok speciális festése szükséges (Golgi-impregnálás). A módszerrel kapott eredmények a **40.A** ábrán láthatók.



**40. ábra** A P33 kezelés *in vivo* hatásának tanulmányozása: hisztológiai vizsgálatok. **A:** A dendrittüskeszám vizsgálata Golgi festés alkalmazásával, P33-mal kezelt vad típusú és transzgén egerekben. **B:** az asztrocita-aktiváció mértékét jellemző GFAP jelintenzitás változása az állatcsoportokban. **C:** az aktivált mikroglia mennyiségi változásának detektálása Iba1 immunfestéssel.

Az APPxPS1-es állatokban, valószínűleg az amiloid-patológia megjelenésének következményeként, csökkent dendrittüske-sűrűséget találtunk, amit a P33-mal történő kezelés újra a vad típusú állatokban mért szinthez közeli értékre állított vissza. További lehetőség a dendrittüskeszámmal korreláló szinaptikus fehérjék mérése, amivel a számolásnál gyorsabban, de a WB módszert jellemző pontossággal nyerhetünk kvantitatív információt. A posztzinaptikus sűrűség fehérje 95 (PSD95) mennyiségének változását megvizsgálva a dendrittüskeszám alakulásával jól egyező eredményeket kaptunk (ábra nélkül).

Az amiloid patológia fellépésnek következménye az állatok immunrendszerének aktiválódása, ami az agyban a glia-típusú sejtek aktivációjában nyilvánul meg. Ez mind az asztrociták, mind a mikroglia esetében kimutatható a megfelelő fehérje (GFAP, illetve Iba1) immunhisztokémiai meghatározásával (rendre **40. ábra B és C**). A kísérletek szerint a GFAP és Iba1 szintje az APPxPS1-es állatokban szignifikánsan magasabb volt, mint a vad típusú állatokban, amit a P33 kezelés az asztrocita-aktiváció esetében szinte teljesen, a mikroglia esetén részben, de szignifikáns mértékben ellensúlyozni tudott.

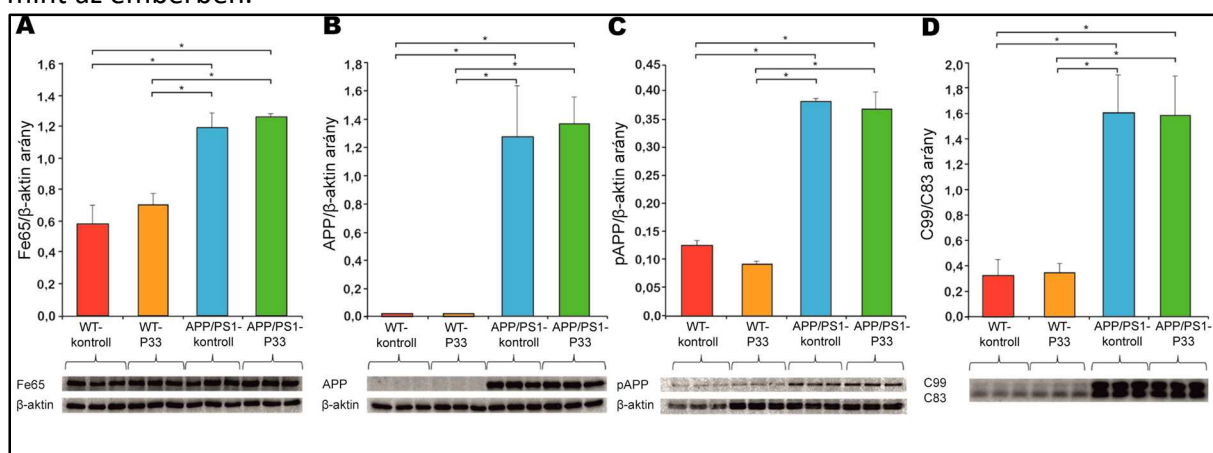


**41. ábra** **A:** A HC és CTX területén az oldható A $\beta_{1-42}$  mennyiségének meghatározása ELISA méréssel. **B:** Reprezentatív felvétel az amiloid plakkok festéséről az A $\beta_{1-42}$  C-terminálisára specifikus 4G8 antitesttel. **C:** Az amiloid plakk-sűrűség meghatározása az egyes állatcsoportokban.



Az APPxPS1-es transzgén egértörzs egyedeiben a képződő A $\beta$ -ból kezdetben valószínűsíthetően toxikus oligomerek, később az agyi struktúrában kimutatható plakkok keletkeznek. Ez utóbbiak a 9 hónapos állatokban immunhisztokémiai módszerekkel már nagy biztonsággal határozhatók meg, az A $\beta$ <sub>1-42</sub> C-terminálisára specifikus 4G8 antitestet alkalmazva. Az oldható A $\beta$  frakciót Shankar eljárása alapján izoláltuk [328], majd a csak humán A $\beta$ <sub>1-42</sub> szekvenciára specifikus 3D6 antitestten alapuló ELISA-tesztel mutattuk ki. Az ELISA mérések alapján a P33 kezelés hatására a transzgén állatokban mind az oldható A $\beta$  frakció (**41.A ábra**), mind a plakkok (reprezentatív agyszeletek képei: **41.B ábra**, plakkok denzitása az egyes csoportokban: **41.C ábra**) mennyisége szignifikánsan csökkent.

A P33 vegyület pontos hatásmechanizmusának felderítése érdekében az állatcsoportokban megvizsgáltuk az Fe65 fehérje szintjének alakulását is. Bár az állatmodellünk nem tartalmazott humán Fe65 expresszióját kiváltó genetikai módosítást, az egyedek termelnek endogén Fe65-öt, ami valószínűsíthetően hasonló szerkezettel és funkcióval rendelkezik ebben a fajban is, mint az emberben.



**42. ábra** Egér endogén Fe65 szint (A), humán APP (B), pThr<sup>668</sup>-APP (C), és a C99/C83 arány (D) vizsgálata APPxPS1 transzgén és CLB6 kontroll egerekben, WB módszerrel.

Az endogén Fe65 szintje (**42.A ábra**) az APPxPS1-es állatokban már P33 kezelés nélkül is szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint a vad típusú állatokban. Ennek oka valószínűleg az APP túltermelődéséből következő visszacsatolós erősödés, amit más transzgén állatmodellben is igazoltak [329]. A jelenségnek az AK-ban is van relevanciája, emberi AK-s agyminták *post mortem* elemzése során a HC területén emelkedett Fe65-immunoreaktivitást detektáltak, aminek mértéke korrelált az AK súlyosságával [330]. Modellünkben a P33 kezelés viszont érdemben nem befolyásolta az Fe65 szintjét.

Az APP-nek 8 jellemző foszforilációs helye van a citoplazmába nyúló régióban, melyek közül a Thr<sup>668</sup> poszttranszlációs módosítása felelős az Fe65-höz történő kötődésért, illetve az ezt követő APP transzlokációért és a megemelkedett A $\beta$  szintért [106, 331]. Emberi AK-s mintákban *post mortem* vizsgálatokban emelkedett pThr<sup>668</sup>APP-szintet detektáltak [331]. Így a hatásmechanizmus felderítésének következő logikus lépése az APP (**42.B ábra**) és a pThr<sup>668</sup>APP (**42.C ábra**) mennyiségének meghatározása az egyes állatcsoportokban, annak felderítésére, hogy a P33 befolyásolja-e az Fe65-pThr<sup>668</sup>APP kölcsönhatást. A vártak megfelelően mind az APP, mind a pThr<sup>668</sup>APP mennyisége megnőtt a transzgén állatokban, amit azonban a P33 kezelés nem változtatott meg. A **42.C ábrán** az is látható, hogy az alkalmazott anti-pThr<sup>668</sup>APP antitest mutat egy bizonyos szintű aspecifikus kötődést is a mintában jelen lévő egyéb (valószínűleg foszforilált) fehérjeszekvenciákhoz, hiszen a vad állatokban is detektálható gyenge jelintenzitás. A transzgén állatok mintáiból származó

intenzitások viszont jelentősen magasabbak, így a mérés eredményeiből levont következtetések helytállóak.

Lehetséges-e, hogy a P33 valamilyen módon az APP két lebontási útjának befolyásolásán keresztül fejti ki hatását, ami mind az oldható, mind a plak-formában dúsuló A $\beta$  mennyiségének észlelt csökkenését okozná? Ezt eldöntendő, a két úton képződő lebontási termékek (amiloidogén: C99 fragmens, nem-amiloidogén: C83 fragmens) mennyiségének arányát is meghatároztuk (**42.D ábra**). A vártnak megfelelően a transzgén állatokban szignifikánsan emelkedett a C99/C83 arány, reprezentálva az amiloidogén lebontási út érvényesülését, ez viszont a P33 kezelés hatására nem változott.

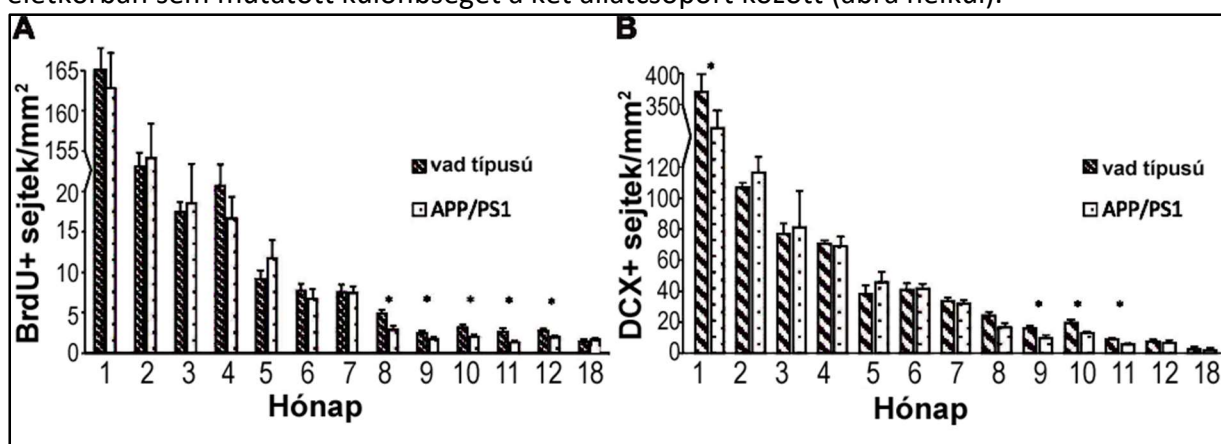
Ha a P33 az előzőekben részletezett módok egyikén sem tudta befolyásolni az A $\beta$  képződését, viszont bizonyítottuk kötődését az Fe65 WW-doménjéhez, akkor hatását feltehetően közvetlenül ezen kapcsolódás révén fejtheti ki, amely által az Fe65 további, az AK-patológiában fontos szerepet játszó fehérjékkel történő kölcsönhatását gátolja. Ez a gátlás irodalmi adatok szerint az Fe65 konformációjának megváltozása révén történhet. Az Fe65 működésekor bekövetkező konformáció-módosulást Cao [332] írta le először. Feltételezése szerint inaktív állapotban a WW és a PTB2 domén kölcsönhatása révén az Fe65 zárt konformációja alakul ki. Az APP, egyéb specifikus membrán-asszociált faktorok (pl. PIP2) segítségével, képes ezt a konformációt megnyitni és a PTB2-doménhez kapcsolódni, ezáltal az Fe65-öt aktiválni. Feilen [333] kimutatta, hogy az Fe65 a zárt konformáció kialakítása mellett, AICD hiányában, az APP-kötőhelyek összekapcsolódásával homodimert képezhet, illetve további bizonyítékokat talált a zárt konformáció felnyílására az AICD-vel történő kapcsolódáskor, ami szükségszerűen a WW-PTB2 kölcsönhatás meggyengülésével jár [332, 333]. Ezt a gondolatmenetet alapul véve feltételezhető, hogy a P33 a WW-doménnel kölcsönhatásba lépve befolyásolja a különféle térszerkezetek között alapesetben kialakuló egyensúlyt, ezáltal befolyásolva az Fe65-irányított APP-lebontást.

A 2.2.4-es fejezetben részleteztem az Fe65 amiloid-termelésre kifejtett hatásának ellentmondásos eredményeit. A magyarázatot viszont általában az Fe65 expressziós szintjének változásán alapuló kísérletek szolgáltatják, nem a fehérje esetleges konformációváltozásának vizsgálata. Esetünkben az egerek genetikai módosítása az APP és PS1 termelésére irányult, az Fe65 szintet genetikailag közvetlenül nem befolyásoltuk. Mégis megemelkedett Fe65-szintet tapasztaltunk a transzgén állatokban, amit viszont, az A $\beta$ -szintek befolyásolása mellett, a P33 kezelés nem módosított szignifikánsan. Bár a genetikai módosítás visszacsatoló hatása érvényesül az Fe65-szint növekedésében, a P33 hatását közvetlenül az Fe65 fehérjéhez történő kapcsolódás révén fejtheti ki, a fehérjeszintek módosítása nélkül. Az irodalomban található ellentmondásos hipotézisek közül eredményeink azt a verziót támasztják alá, amely szerint az aktív formájú Fe65 mennyiségének feltételezett csökkenése kedvező irányban befolyásolja a túltermelődt APP lebontási folyamatait, de a két út arányának eltolása nélkül. Emellett az a lehetőség sem zárható ki, hogy a P33 hatása olyan Fe65-fehérje kölcsönhatásokra irányul, melyekben a partnerfehérje résztvevője az AK valamely molekuláris folyamatának (pl. Mena, Abl kináz, GSK-3 $\beta$ ), és a specifikus kölcsönhatás a fehérje saját PXP-motívumán keresztül valósul meg. Ennek tisztázása további érdekes irányokat nyithat kutatásaink számára a témában.

### 5.3 A neurogenesis zavarára alapozott kísérletek eredményei

Az elméleti áttekintésben részletezett okok miatt a neurogenesis változása a természetes öregedéssel és AK-ban kiindulási alapként szolgálhat új típusú, nem kizárólag az A $\beta$ -patológiára alapozott gyógyszerfejlesztéshez. A neurogenesis vizsgálatát megfelelő modellrendszerben végezhetjük el, a gyógyszerjelölt vegyületek tesztelésével kapott eredmények megértéséhez viszont szükséges a modellrendszerben a folyamat részletes tanulmányozása, a változásokról minél több információ gyűjtésével. Bizonyos életkorú APPxPS1-es egerekben leírtak már neurogenesiset célzó vizsgálatokat, azonban az AK-patológia és a neurogenesis szisztematikus, korral járó változását, és esetleges egymásra hatását mi elemeztük először, egy nagy állatszámú tervezett kísérletben [334].

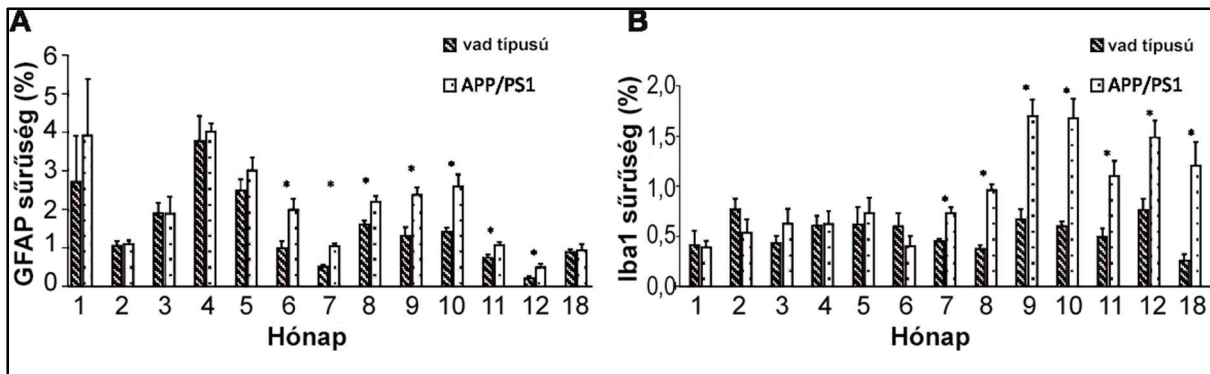
1-12 hónapos korig havonta, majd 18 hónapos korban vizsgáltuk a neurogenesis két fázisára jellemző markerek alakulását vad C57BL/6J kontroll és APPxPS1 transzgen egerekben. Immunhisztokémiai vizsgálatokban a neurogenesis korai fázisát jellemző neuronális őssejt-osztódást a DG területén BrdU-beépüléssel tanulmányoztuk (**43.A ábra**). Mind a vad, mind a transzgen állatokban az életkorral jelentősen csökkent az osztódó őssejtek száma, a két állatcsoport között a különbség 8-12 hónapos kor között vált szignifikánssá. A differenciációt követően kialakuló éretlen neuronok mennyisége a rájuk jellemző DCX-expresszió mértékével jellemezhető, ez 1, majd 9-11 hónapos korban szignifikánsan kisebb volt a transzgen állatokban (**43.B ábra**). Az érett neuronok számával arányos NeuN-intenzitás viszont egyik életkorban sem mutatott különbséget a két állatcsoport között (ábra nélkül).



**43. ábra** Neurogenesis markerek változása az életkorral a DG területén, vad C57BL/6J és APPxPS1 transzgen egerekben (immunhisztokémiai vizsgálatok). **A:** A BrdU+ sejtek számának alakulása, **B:** a DCX+ sejtek mennyiségének változása.

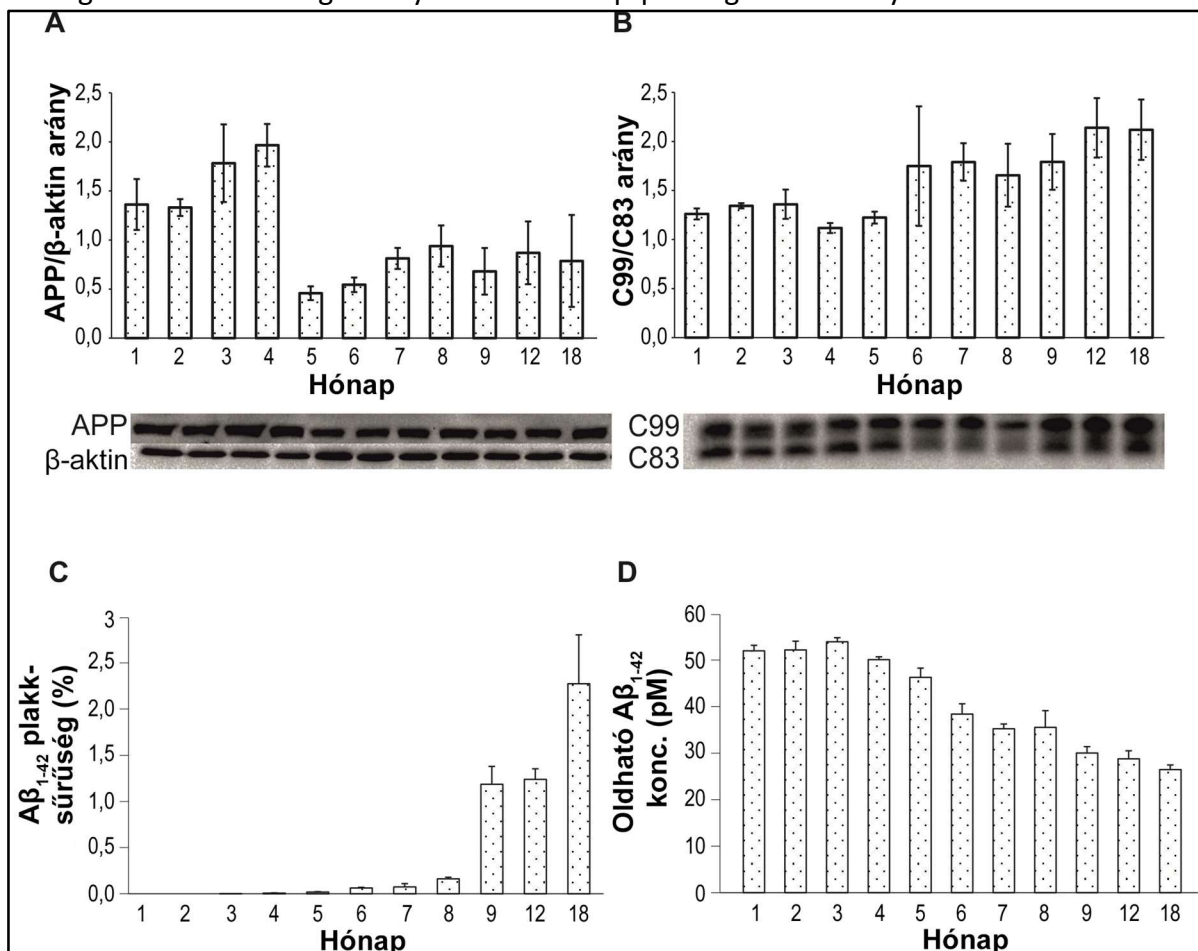
A genetikai módosítás következtében keletkező A $\beta$  akkumulációja a transzgen állatokban az agy védekezőrendszerének aktiválódásához, gyulladáshoz vezet. Az asztrocita-aktiváció a GFAP expresszió mértékével jellemezhető. Immunfestéssel meghatározva a GFAP-szintet, a két egércsoport között 6-12 hónapos korban találtunk szignifikáns eltérést (**44.A ábra**). Az A $\beta$  eltávolításában és az egészséges állapotra jellemző sejt-környezet visszaállításában fontos szerepet játszó mikroglia aktivációja Iba1 immunfestéssel került meghatározásra. 7-18 hónapos korban az APPxPS1-es állatokban szignifikánsan emelkedett Iba1 szintet tudtunk mérni a vad típusú állatokhoz képest (**44.B ábra**).





**44. ábra** Az agyi immunválaszért felelős gliózis alakulása a vad típusú és APPxPS1-es állatok agyában a DG területén (immunhisztokémiai vizsgálatok). **A:** az asztrocita-aktivációt jellemző GFAP-szint változása, **B:** az aktivált mikroglia mennyiségével korreláló Iba1 változása.

Az eredményekből arra a következtetésre juthatunk, hogy a transzgén állatokban a gyulladós folyamatok korábban okoznak detektálható elváltozásokat (6-7 hónapos kor körül), mint amikor a neurogenézist érintő különbségek megjelennek (8-9 hónap). A BrdU és DCX első hónapban tapasztalt kiugróan magas értéke nem a felnőttkori, hanem az újszülöttkori neuronális érési folyamatokat tükrözi, a DCX-szint szignifikáns csökkenése a transzgén állatokban még bizonyosan nem az A $\beta$ -patológia eredménye.



**45. ábra** Az A $\beta$ -patológia változása a kora APPxPS1 egerekben. **A:** a transzgén módosítás következtében expresszált APP mennyiségének változása (WB kísérlet). **B:** az amiloidogén/nem amiloidogén úton keletkező lebontási termékek (C99/C83) arányának alakulása (WB kísérlet). **C:** az A $\beta$ <sub>1-42</sub> plakkok mennyiségének változása (immunhisztokémiai vizsgálat). **D:** az oldható A $\beta$ <sub>1-42</sub> frakció koncentrációjának változása az állatokban (ELISA meghatározás).

Az A $\beta$ -patológia alakulását az életkorral többféle vizsgálattal jellemeztük. Az expresszált APP mennyiségét a HC és CTX területekből készített agyhomogenizátumban WB-technikával határoztuk meg (**45.A ábra**), a detektálható mennyiség az 5. hónaptól jelentősen visszaesett a transzgen állatokban. Az amiloidogén és nem amiloidogén lebontási utak érvényesülése a C99/C83 aránnyal jellemezhető (**45.B ábra**), a 6. hónaptól emelkedés tapasztalható az amiloidogén termék képződése irányába. Egy határkoncentráción túl a keletkező A $\beta$ <sub>1-42</sub> ezekben az állatokban plakkokat képezhet, melyeket 4G8 antitesttel detektáltunk (**45.C ábra**). A plakkok megjelenése az állatok 5 hónapos korától volt jellemző. Az agyhomogenizátumban ELISA teszt segítségével kimutatható oldható A $\beta$ <sub>1-42</sub> mennyisége 4 hónapos kortól lassú csökkenést mutat (**45.D ábra**). Az eredményeket összegezve feltételezzük, hogy az állatok kb. 5-6 hónapos koruk körül kezdenek az amiloidogén lebontási út egyre kifejezettebb érvényesülése miatt olyan mennyiségben toxikus aggregátumokat termelni, aminek hatására az agyukban kimutathatóvá válik az immunrendszer aktiválódása és a gyulladás.

Marker		Hónap						
		2	3	5	6	9	10	12
BrdU	Saját	M	M	M	A	A-S	A-S	A-S
	Ref.	A-S [335]	A-S [336-338]	A-S [337]; A [339]	NA	A-S [339, 340]	A-S [337]	NA
DCX	Saját	M	M	M	M	A-S	A-S	A
	Ref.	A-S [335]	M [337, 338], A-S [336]	A [337]; M [339]	A-S [336]	A-S [339]	A-S [336, 337], A [338]	A-S [336]
NeuN	Saját	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK
	Ref.	NA	NA	NA	NA	NA	NK [341]	NK [336]
GFAP	Saját	M	A	M	M-S	M-S	M-S	M-S
	Ref.	NA	A [336]	NA	M-S [336]	NA	M-S [336, 341]	M-S [336]
Iba1	Saját	A	M	A	M	M-S	M-S	M-S
	Ref.	NA	M [338], A [336]	NA	M-S [336]	NA	M-S [336, 341]	M-S [336]
A $\beta$ plakk	Saját	ND	ND	+	+	+	NA	+
	Ref.	NA	ND [336], + [337, 342]	+	+	+	+	+
oldható A $\beta$	Saját	+	+	-	-	-	NA	-
	Ref.	+ [335]	NA	+	+	+	NA	NA
APP	Saját	+	+	-	-	-	NA	-
	Ref.	+ [335]	NA	NA	NA	NA	+ [341]	NA

**9. táblázat** Az életkorral összefüggő neurogenezist és A $\beta$ -patológiát érintő változások felderítése APPxPS1-es transzgen egérmodellben. A vizsgált paraméterek általunk tapasztalt változásának összehasonlítása az irodalomban található adatokkal. A: alacsonyabb, mint a vad típusú állatokban. A-S: szignifikánsan alacsonyabb, mint a vad típusú állatokban. M: magasabb, mint a vad típusú állatokban. M-S: szignifikánsan magasabb, mint a vad típusú állatokban. NK: nincs különbség a két állatcsoport között. NA: nem meghatározott. ND: nem kimutatható -: kimutatható és csökken, +: kimutatható (saját mérésekben nő).

Az APPxPS1-es egértörzsre jellemző neurogenesis és A $\beta$  patológia kapcsolatát meghatározott életkorú egyedekben más csoportok is vizsgálták. Eredményeik a mi észleléseinkkel összehasonlítva a **9. táblázatban** láthatók. A 1-12 hónap között a hiányzó hónapokra (1,4, 7-8,11) csak mi vizsgáltuk az állatokat, ezekre az életkorokra vonatkozó referencia adatot nem találtunk. A vastagítással kiemelt adatmezők ellentmondásos eredményeket jeleznek, közülük három esetben (3 hó DCX, Iba1 és A $\beta$  plakk) már az irodalmi források is ellentmondásosak. A korai hónapok (2. és 3.) neurogenesisrel kapcsolatos adatai esetében megjegyzendő, hogy az általunk talált eredmények nem szignifikánsak, nem mutatnak statisztikailag alátámasztott eltérést a vad típusú állatoktól. Az ellentmondások oka nagy valószínűséggel a detektálási metodikák különbözősége. A BrdU vizsgálat nem egy szokványos immunhisztokémiai eljárás, amiben egy adott célfehérje antitest-antigén kölcsönhatáson keresztül detektálható, hanem egy inkorporációs módszer, ahol az osztódó sejtek S-fázisában a DNS-be timidin helyett beépülő BrdU mennyisége határozható meg a DNS-szál sav vagy hő általi feltárása után, specifikus antitestes kölcsönhatással. A módszer sajátosságai miatt, az injektált BrdU mennyisége, az injektálások száma, és az injektálás és az állatok terminálása között eltelt idő, befolyásolja az észlelt intenzitást, ezáltal nehezítve az összehasonlítást [343]. Esetünkben 6 napon át tartó, viszonylag nagy (100 mg·kg<sup>-1</sup>) dózisú BrdU injektálással a lehető legtöbb proliferáló sejt jelölését céloztuk meg [344], illetve a hosszú (14 napos) inkubációs idővel a hosszú távon túlélő őssejteket tudtuk detektálni [345]. Mivel az általunk kapott DCX-eredmények is hasonlóan eltérnek az irodalmi adatoktól, feltételezhető, hogy a metodikai különbségeken túl ebben az életkorban a genetikai módosításhoz alkalmazott C57BL/6J egértörzs esetleges generációs szám-beli különbsége (10 felett vagy alatt) befolyásolhatja a méréseket, amire szintén található irodalmi adat [338, 340].

Az amiloid patológia esetében az oldható A $\beta$ -ra vonatkozó 5, 6 és 9 hónapos eredményeink állnak látszólag ellentmondásban az irodalommal, de ez csak a jelölésrendszer sajátossága, ugyanis csak a mi mérésünk követi időben a szint változását, ami ezekben a hónapokban csökkenő tendenciát mutat, de a kontrollhoz képest ez is emelkedett és detektálható. Az irodalmi adatok [339] izolált eredményeket mutatnak (detektálható mennyiségű oldható A $\beta$ ), tendenciát nem.

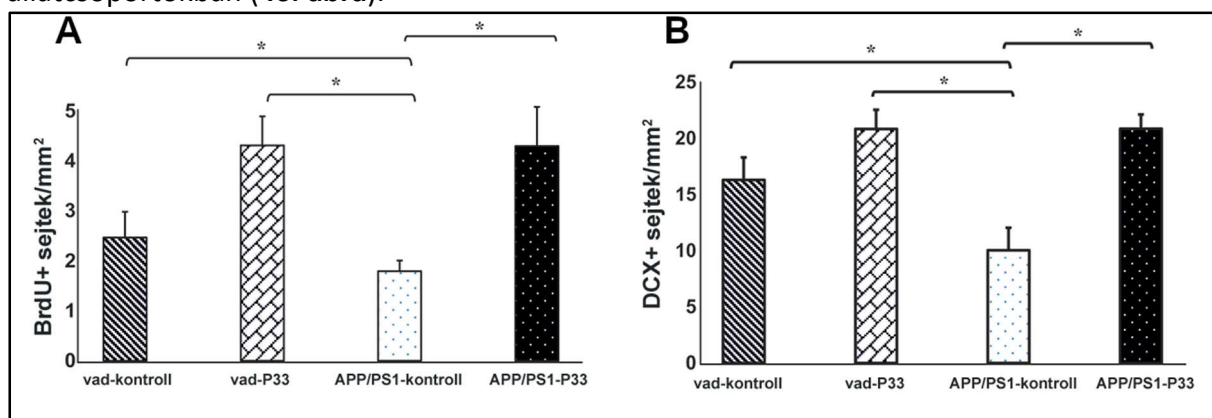
A teljes képet elemezve tehát a következő megállapításokat tehetjük. A neurogenesis mértékét jellemző markerek (BrdU és DCX) az első hónapban kiugróan magas értéket mutatnak, ami még az újszülöttkori extrém plaszticitással magyarázható [346]. A neurogenesis mindkét csoportban folyamatosan csökken az életkorral, eredményeink szerint szignifikáns eltérés viszont csak későbbi életkorban mutatkozik az állatok között. Az érett neuronok mennyiségében viszont nem detektáltunk különbséget a két állatcsoport között, összhangban más csoportok eredményeivel [336, 341].

Az amiloid-patológiában a transzgén állatok 5 hónapos kora körül következik be egy fordulat, ami egyre erősödő amiloidogén lebontást, ennek következményeként megnövekedett C99/C83 arányt, illetve az oldható A $\beta$  mennyiségének lassú csökkenését okozza. Ezzel párhuzamosan elkezdődik a plakkok képződése, melyek szintén ezen életkor körül, egy bizonyos méret felett válnak immunhisztokémiai módszerekkel detektálhatóvá. A változásokat magyarázhatja a BACE1 enzim aktivitásának növekedése a transzgén állatok öregedésével [347].

A neurogenesis sérülését a transzgén állatokban egyértelműen későbbi életkorban találtuk jellemzőnek, mint az amiloid-patológia kiteljesedését, a plakkok megjelenését és ezzel párhuzamosan a gyulladási folyamatok felerősödését. Más kutatócsoportok változatos eredményekre jutottak: korai plakk-megjelenést azonnal követő neurogenesis-módosulást (3

hó: Hickmann [342] 4 hó: Unger [338]), korai neurogenesis-változást (3 hó), majd ezt követő plakk-megjelenést (6 hó, Liu [336]), illetve velünk egyezően 5 hó körül plakkok megjelenését és 9 hónap körül neurogenesis-károsodást (Taniuchi [339]). Az állatok első évének minden hónapjában kivitelezett vizsgálatok validálják az eredményeinket, hiszen a tendenciák egyértelműen megfigyelhetőek a folyamatok változásában.

Ha elfogadjuk az amiloid patológiai szükséges elsőbbségét a neurogenesis megváltozásához, logikusan arra a következtetésre juthatunk, hogy a patológiát célzó terápia valószínűleg a neurogenesis folyamataira is kihatással lesz. Kedvező hatás elérése érdekében tehát célszerű korábban indítani a kezelést. A hipotézis tesztelésére egy krónikus kezelési sémát alkalmaztunk, melyben a korábban már a gyulladásos és kognitív folyamatokat kedvező irányba befolyásoló P33 vegyületet adagoltuk C57BL/6J kontroll és APPxPS1-es transzgén állatoknak, intraperitoneálisan, 3-9 hónapos koruk között, heti 5 alkalommal, 5 mg·kg<sup>-1</sup> dózisban, majd a 9. hónapban megvizsgáltuk a BrdU és DCX markerek szintjét az állatcsoportokban (**46. ábra**).



**46. ábra** P33-mal 6 hónapig kezelt C57BL/6J és APPxPS1-es egerekben a neurogenesis markereinek szintje a DG területén. **A:** BrdU+ sejtek sűrűsége, **B:** DCX+ sejtek sűrűsége. Az ábrán csak az APP/PS1-kontrolltól való szignifikáns eltérések vannak jelölve.

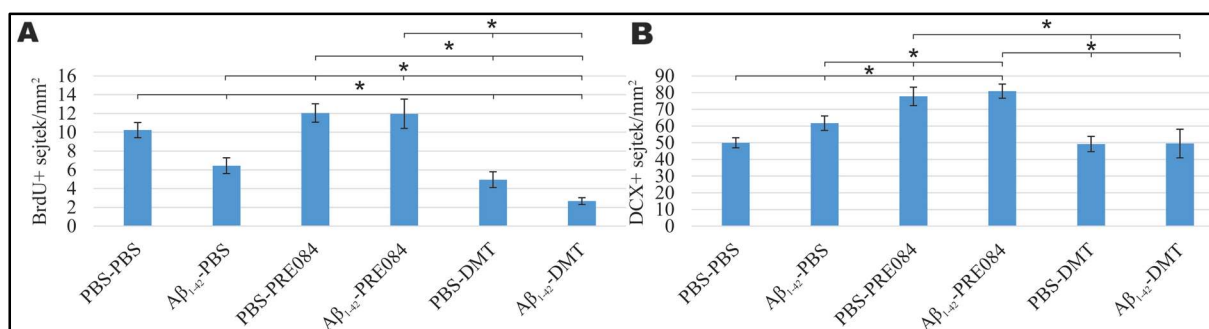
A P33-mal történő krónikus kezelés mind a vad típusú, mind a transzgén állatok neurogenesis-folyamataira kedvező hatást fejtett ki, jelentősen emelkedett intenzitásokat tapasztaltunk a BrdU+ (**46.A ábra**) és DCX+ (**46.B ábra**) sejtek vizsgálatakor a kezelt csoportokban a ezeletlenekhez viszonyítva. A neurogenesis hanyatlása a vad típusú állatokban is végbemegy a kora, aminek mechanizmusában az endogén APP feldolgozása és a keletkező transzkripciósnan aktív AICD kölcsönhatása az Fe65-tel a genetikailag nem módosított állatokban is szerepet játszhat, amit a P33 az egészséges állatokban is kedvezően befolyásolhat. A vegyület hatása az APPxPS1-es állatokban mindkét jellemző markert tekintve erőteljesen érvényesül, igazolva ezzel hipotézisünket az amiloid-patológia ellen lehetőleg minél korábbi időpontban elkezdett kezelés célszerűségét illetően.

## 5.4 Az S1R működésére alapozott gyógyszerfejlesztés eredményei

### 5.4.1 Az S1R modulátorok szerepe a neurogenézisben

Az S1R és a neurogenézis összefüggése az elméleti áttekintésben részletezettek alapján izgalmas területe lehet az AK patomechanizmus-kutatásának. Az előzőekben bemutatott munka modellrendszere az APPxPS1-es transzgen egértörzs volt, melyben a genetikai módosítás következtében termelődő APP amiloidogén lebontásával keletkező termékek hatása együttesen érvényesül. A modell alkalmazása viszont időigényes, körülményes és drága. Ezért ismét felmerül a kérdés, hogy kidolgozható-e egy olcsóbb és gyorsabb injektációs modell, amelyben detektálhatók lehetnek a neurogenézist érintő változások, illetve gyógyszerjelölt vegyületek is vizsgálhatóak lennének *in vivo* körülmények között, költség- és időhatékony módon.

A neurogenézis és az S1R modulálása közötti kapcsolat tisztázására Li dolgozott ki egy viszonylag egyszerű modellt, aminek alapja az A $\beta$ <sub>25-35</sub> C75BL/6 egerekbe IHC úton történő bejuttatása [348]. Ebben az egyszeri injektációs modellben a korai fázisban a BrdU+ sejtek mennyiségének növekedését tapasztalták, majd 14-28 nappal a peptid bejuttatását követően csökkent a sejt-proliferáció, a neuron-nyúlványosodás, valamint az éretlen neuronok mennyisége is. Eredményeik szerint a dehidroepiandroszteron, ami egy S1R agonista neuroszteroid, az A $\beta$ <sub>25-35</sub> által kiváltott hatásokat kivédte, feltételezhetően az S1R-et érintő mechanizmusok révén. Korábbi tapasztalataink alapján az A $\beta$ <sub>25-35</sub> helyett kézenfekvőbb választás lehet az izo-A $\beta$ <sub>1-42</sub>-ből SOP-vel előállítható neurotoxikus oligomer-preparátum, melyet ICV injektálva is mérhető hatást tudunk indukálni, azzal a további előnnyel, hogy a teljes szekvencia biológiailag relevánsabb eredményt ad, mint az undekapeptid. Ezért a Li által alkalmazott modellt adaptáltuk A $\beta$ <sub>1-42</sub>-re, és további két S1R modulátort, az endogén agonista DMT-t és a szintetikus agonista PRE-084-et is megvizsgáltunk az új kísérleti rendszerben [349]. Izo-A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptid SOP szerint elkészített 50  $\mu$ M-os oldatát rövid inkubációs időt követően, egyszeri alkalommal, unilaterálisan injektáltuk az állatokba, majd 14 nap múlva detektáltuk a változásokat. A BrdU festéshez [348] protokollját alkalmaztuk az eredmények összehasonlíthatósága érdekében. A BrdU+ sejteket a DG szubgranuláris zónájában detektáltuk (**47.A ábra**). Az eredmények szerint az A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptiddel kezelt csoportban a proliferálódó sejtek mennyisége szignifikánsan csökkent. Érdekes módon a DMT önmagában is hasonló változást okozott, míg a PRE084-nek nem volt szignifikáns hatása a proliferációra. Az A $\beta$ <sub>1-42</sub> által kiváltott proliferáció-csökkenést a PRE-084 ellensúlyozta, a DMT csökkentő hatása viszont összeadódott az amiloidéval.

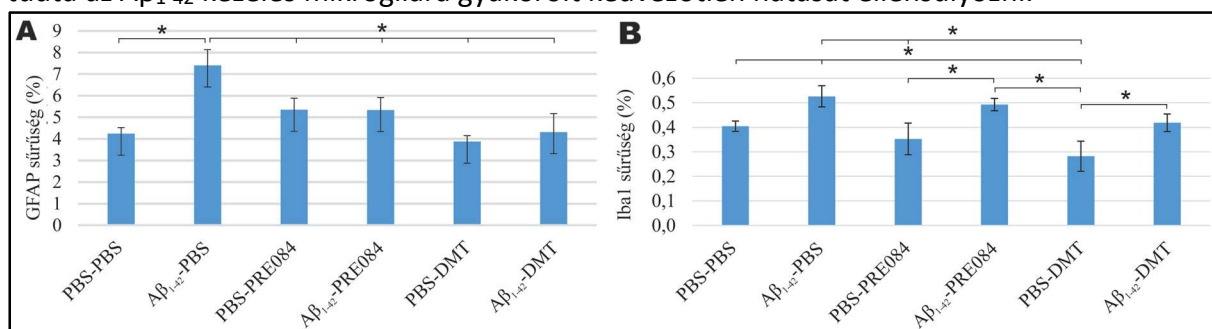


**47. ábra** Az A $\beta$ <sub>1-42</sub> egyszeri ICV injektálása által kiváltható a neurogenézis sejt-szintű folyamatainak megváltozása C75BL/6 egerekben melyet a PRE-084 és a DMT tovább módosít. **A:** BrdU-festés a proliferálódó őssejtek detektálásra, **B:** DCX-festéssel meghatározható az éretlen neuronok mennyisége.

Az éretlen neuronok számára (**47.B ábra**) ellenkező hatással volt a kezelés, az A $\beta$ <sub>1-42</sub> hatására nőtt a mennyiségük, amit a PRE-084 tovább növelt, míg a DMT szignifikánsan nem befolyásolt.

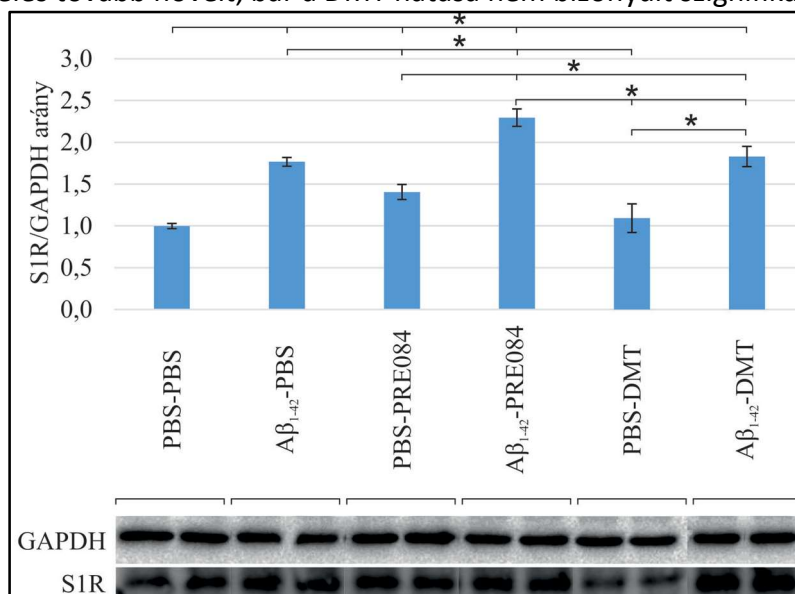
Ugyanakkor az érett neuronok mennyiségére már nem volt hatással az  $A\beta_{1-42}$ -vel történő kezelés (NeuN-festés, kép nélkül).

Az  $A\beta_{1-42}$  hatására aktiválódó immunfolyamatokat a HC-területén elvégzett immunhisztokémiai eljárásokkal vizsgáltuk, a már szokványos GFAP és Iba1 festésekkel jellemeztük a gliózis mértékét az állatok agyában (**48. ábra**). Mindkét folyamat erősödése volt tapasztalható. Az S1R modulátorok önmagukban nem befolyásolták az asztrocita-aktivációt (**48.A ábra**), az  $A\beta_{1-42}$  hatását viszont ellensúlyozták. Az aktivált mikroglia mennyisége DMT hatására csökkent (**48.B ábra**), a PRE-084 önmagában hatástalan volt, míg egyik anyag sem tudta az  $A\beta_{1-42}$  kezelés mikrogliaira gyakorolt kedvezőtlen hatását ellensúlyozni.



**48. ábra** Az  $A\beta_{1-42}$  hatására aktiválódnak az agyi gyulladási folyamatok, melyekre a PRE-084, illetve DMT-kezelés hatással lehet. **A:** asztrocita-aktiváció mértékének meghatározása a GFAP szintjének vizsgálatával, **B:** Iba-1 festés az aktivált mikroglia vizsgálatára.

Az agyban fellépő gyulladások, stresszfolyamatok hatására az S1R működése megváltozik. Emellett megfigyelhető a receptor mennyiségének változása is, ami fehérje-szinten WB-kísérletekkel vizsgálható. A kísérleti állatok agyhomogenizátumában az egyes kezelések hatására megváltozott S1R szinteket találtunk (**49. ábra**). Az  $A\beta_{1-42}$  kezelés hatására az S1R mennyisége növekedett a kontroll csoporthoz képest, amit mind a PRE-084-gyel, mind a DMT-vel történő kezelés tovább növelt, bár a DMT hatása nem bizonyult szignifikánsnak.



**49. ábra** Az S1R szintjének vizsgálata a kísérlet egyes állatcsoportjaiban WB technikával.

Eredményeink igazolják, hogy az egérben az  $A\beta_{1-42}$  bejuttatásával befolyásolható a neurogenesis és aktiválható az immunrendszer, amire hatással lehetnek az S1R-receptor modulátorok. Azonban az adott modulátor agonista jellege önmagában nem dönti el a hatás irányát, amit alátámaszt a két általunk alkalmazott agonistával kapott eredmények eltérése.



Az A $\beta$  neurogenesisre kifejtett hatását illetően az irodalomban ellentmondásos adatokat találunk. Az A $\beta_{25-35}$  hatása a proliferációra Li szerint függvénye a kezeléstől a vizsgálatig eltelt időnek [348]. Számos csoport szerint az A $\beta$  kezelés hatására az új neuronok képződése visszaszorul, a neuronális őssejtek túlélése romlik [335, 337, 350-352]. Más szerzők szerint viszont az A $\beta$  erősíti a proliferációt mind transzgén egértörzsekben [338, 353, 354], mind sejtes modellekben [355, 356]. Ez utóbbi esetekben többször találtak az A $\beta$  peptidfragmens hosszától (25-35, 1-40 vagy az 1-42 fragmens) függő hatást. Kísérleteinkben a kétféle neurogenesis-marker ellenkező irányú változását tapasztaltuk, a csökkenő BrdU+ sejttség mellett emelkedett DCX-intenzitást detektáltunk, amit egy kompenzációs mechanizmus magyarázhat. A neuronális őssejtek osztódásának lassulása miatt felborul a neurogén folyamatokat támogató sejtökörnyezet homeosztázisa, amit az újszülött neuronok fokozott túlélésével kompenzálhat a szervezet. Az érett neuronok mennyiségét viszont ez az egyszeri A $\beta$ -kezelés nem befolyásolja.

Az A $\beta$ -val történő kezelés az állatokban gyulladási folyamatokat indukál. A védelmi rendszer elsődleges aktivációja a proinflammatorikus citokinek mennyiségének megnövekedésében is megnyilvánul, melyek a proliferáció visszaszorításával a neurogenézist jelentősen befolyásolják, de ezzel egyidejűleg a sejtek nagyobb mértékű differenciációja is tapasztalható [357]. Ezért a neurogenesis közvetlen befolyásolásán túl az A $\beta$  az állandó, enyhe gyulladási környezet fenntartása révén is hat a neurogenesisre.

Az S1R receptor A $\beta$  hatására történő aktivációja látszólag ellentmondásban áll azokkal az irodalmi áttekintésben részletezett humán vizsgálati eredményekkel, amelyek AK-ban az S1R expressziójának csökkenéséről, illetve ligandum-kötő képességének kedvezőtlen változásáról számolnak be [170, 171]. Figyelembe véve, hogy az alkalmazott modell nem krónikus, hanem egyszeri A $\beta$ -adagolás által kiváltott hatásokat reprezentál, feltételezhetően az S1R mennyiségének növekedése a neurotoxikus ágens által kiváltott káros folyamatok kompenzációs fázisát jelzi [165]. Az S1R túltermelődésével csökken a stresszutas aktiválódásának mértéke, helyreáll az ion-homeosztázis, és javulhat a neuronális plaszticitás is.

Az S1R modulátorok hatásának vizsgálata egy adott biológiai folyamatra elővigyázatot igényel, ugyanis a legtöbb molekula nem tisztán S1R-en hat, hanem más receptorokhoz is mutat jelentős affinitást. Ez adhat magyarázatot a DMT-vel kapcsolatos eredményeinkre, melyek szerint a DMT erős negatív hatást fejtett ki a neuronális őssejtek proliferációjára. Hasonló jelenséget tapasztaltak egy másik triptamin, a pszilocibin (4-foszforiloxi-N,N-dimetiltriptamin) esetében, melynek kémiai szerkezete hasonló a DMT-hez, és nagy affinitással kötődik az 5HT<sub>2A</sub> receptorokhoz is ( $K_d = 6$  nM). A pszilocibin mind a proliferációt, mind a neuronok túlélését rontotta [358]. Egyes tanulmányokban viszont a DMT és 5-metoxi-DMT neuroprotektív és neurogenesis-stimuláló hatását írták le a szerzők *in vitro* sejtes és transzgén állatmodellekben [359-361]. Az eredmények eltérésére két magyarázat is szolgálhat. Egyrészt a DMT S1R-hez és 5HT<sub>2A</sub>-hoz való affinitását összehasonlítva ((DMT-S1R  $K_d = 14,75$   $\mu$ M, DMT-5-HT<sub>2A</sub>  $K_d = 130$  nM) feltételezhető, hogy a DMT az 5-HT<sub>2A</sub> receptoron kötődik nagyobb affinitással, így kísérletünkben az S1R-en ez a koncentráció nem volt elég pozitív hatáshoz, ellenben a pszilocibinhez hasonlóan egy negatív hatás érvényesülhetett az 5HT<sub>2A</sub> receptoron keresztül. Kérdéses, hogy az általunk alkalmazott koncentráció (1 mg·kg<sup>-1</sup>) miért nem volt elég az S1R-en történő hatás eléréséhez. Ehhez figyelembe kell venni, hogy a DMT féléletideje az élő szervezetben viszonylag rövid (~15 min, [362]), az aktív koncentráció igen gyorsan változik. Esetünkben lehetséges, hogy a DMT IP adagolását követően már nem volt elég a CNS-ben érvényesülő koncentráció az anyag S1R-en történő hatásának kifejtéséhez.

A DMT gyulladásszerű folyamatokra kifejtett hatására szintén találunk ellentmondó adatokat az irodalomban. Egyes szerzők szerint a DMT az S1R aktiválása révén kedvezően befolyásolja az oxidatív stresszt, ezáltal a reaktív asztrociták mennyisége csökken [363, 364], azonban itt sem zárható ki a szerotoninerg receptorok hozzájárulása az észlelt hatáshoz [365]. Morales-Garcia szerint viszont a DMT növeli a GFAP+ asztrociták számát, amelyek aztán neuronális irányban differenciálódhatnak, így támogatva a neurogenézist [360]. Kísérleteinkben a GFAP+ sejtek mennyiségének növekedését tapasztaltuk, de a neurogenesis serkentését nem. Erre ismét magyarázatot adhat egyrészt a BrdU-detektálás esetében fellépő, korábban már említett metodikai érzékenység, illetve a DMT bioaktív koncentrációjának esetlegesen alacsony értéke. Az S1R-hez nagy affinitással kötődő, szintetikus agonista PRE-084 ( $K_d = 2,2 \text{ nM}$ , [366]) kedvező hatással volt a neurogenesisre. Mivel a kezelés hatására az S1R expressziójának növekedését tapasztaltuk, feltehetően az S1R receptor aktiválása révén az anyag növelte a neuronális őssejtek proliferációját és az éretlen neuronok számát is. A gyulladásszerű folyamatokat tekintve az  $A\beta_{1-42}$  által kiváltott asztroglizis mértékét hatékonyan csökkentette. Emellett viszont nem tudtunk hatást detektálni a mikroglia-aktivációra, aminek viszont az lehet a magyarázata, hogy irodalmi adatok szerint a PRE-084 eltérően hat a mikroglia két típusára; az anti-inflammatórikus M2 típusú sejtek proliferációját elősegíti, míg a pro-inflammatórikus M1 típusú sejteket gátolja, ezáltal fenntartva a támogató és gyulladásszerű glia-fenotípusok közötti érzékeny egyensúlyt [367, 368]. A mikroglia típusának részletes analízisét nem végeztük el, így feltételezzük, hogy a kapott eredmény a kétféle hatás eredőjének köszönhető. Az eredmények alapján bizonyos, hogy a PRE-084 kedvezőbb hatást tudott kifejteni a DMT-nél az adott kísérletben.

#### 5.4.2 Új típusú S1R modulátorok azonosítása molekulakönyvtárakból

Új molekulák felfedezésére több okból is szükség lehet az S1R ismert természetes és szintetikus modulátorai mellett. Egyrészt kívánatos lenne nagyobb szelektivitással rendelkező molekulák azonosítása, másrészt az eddigi S1R agonisták és antagonisták elkülönítése sem pontosan definiált, illetve az sem pontosan tisztázott, hogy milyen karakterű vegyülettel érhetnénk el jobb terápiás hatást. Célszerű lenne ezért olyan módszerrel keresni új modulátorokat, amely a kötődésbeli különbséget az agonisták és antagonisták között figyelembe tudja venni.

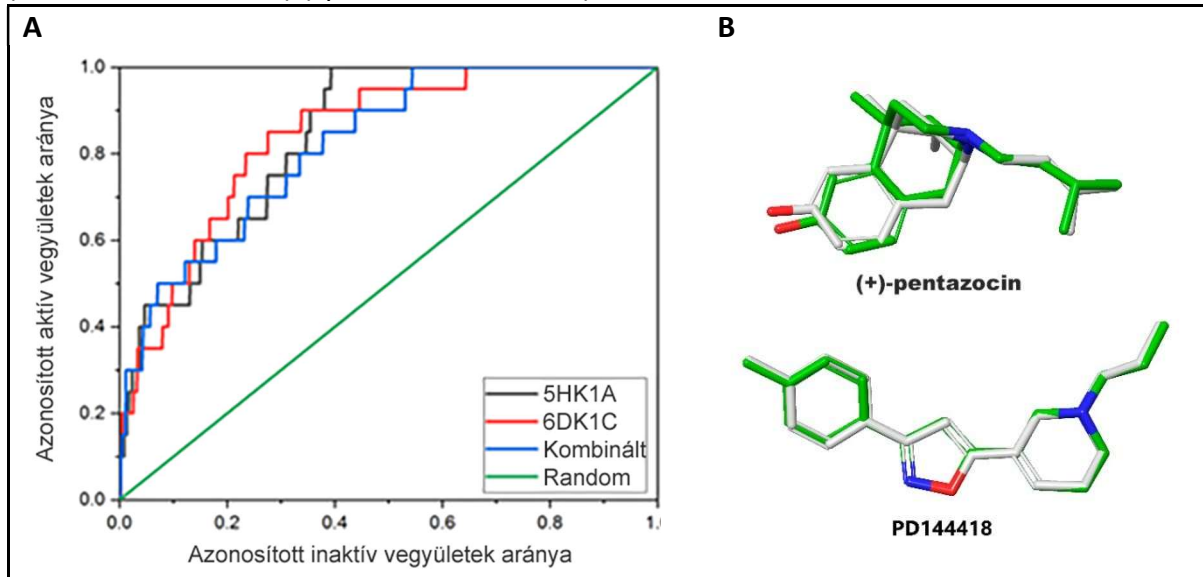
Célunk egy olyan VS protokoll kidolgozása volt, amely kombinálja az irodalmi áttekintésben részletezett, jelenleg rendelkezésre álló antagonistá jellegű (PDB:5HK1) és agonista jellegű (PDB:6DK1) kötéshez rendelhető kísérleti szerkezetet is [269]. A 'sokasági' dokkolás (konformációk kombinált sokaságán alapuló dokkolás) módszerét [369] alapul véve egy két célpontos dokkolási metodikát dolgoztunk ki, melyben az eredeti módszer szerint molekuladinamikai számításokkal kapott receptor-konformációk sokaságát két, az antagonistá és az agonista kötésére optimalizált, röntgendiffrakciós vizsgálatokból nyert konformációra szűkítettük. A ligandumokat dokkoltuk mindkét szerkezetbe és a kedvezőbb becsült kötési szabadentalpiát rendeltük hozzá a receptor kötéséhez.

A metodika validálásához a BINDINGDB adatbázisból 20, egymástól szerkezetileg lényegesen különböző, szubnanomoláris kötődési affinitással rendelkező S1R ligandumot választottunk ki [287], míg csali-szettnek a DUD-E adatbázisból generált, 1000 db egyszeresen pozitívan töltött vegyületből álló molekulakönyvtárat használtunk [288]. Mivel mindkét modell trimer szerkezetű, ezért az őket alkotó monomerek mindegyikére (A,B,C) elvégeztük a dokkolást, és az aktív molekulák korai fázisban történő dúsulását 3 paraméterrel jellemeztük („robust initial enhancement” (RIE), „enrichment factor” (EF), és „Boltzman enhanced discrimination of the ROC curve” (BEDROC)). Ezek a mérőszámok azt hivatottak jelezni, hogy az adott



konformációba történő dokkolás milyen jól tudja az aktív molekulákat megkülönböztetni a csali-molekuláktól. Ezek alapján az 5HK1 szerkezet A-monomerjéhez és a 6DK1 szerkezet C monomerjéhez történő dokkolás eredményezte a legjobb kötődési paramétereket. A két modell kombinálásával kapott jósági paraméterek kis mértékű romlást mutattak a két különálló szerkezet alkalmazásához képest, de a korai dúsulást tekintve, ami a felső 1%-ba sorolható molekulák kiválasztását segíti, a két modell kombinációjával végrehajtott sokasági dokkolás adta a legjobb eredményeket. A dokkolási modell jósága a ROC-görbével jellemezhető (**50.A ábra**). Ezt úgy kapjuk, hogy a ligandumokat a dokkolásból kapott  $\Delta G$  becsült kötési szabadentalpia értékek szerint rangsoroljuk csökkenő kötése erősség szerint. Majd a rangsoron végig haladva megadjuk az adott pozícióig az aktív/inaktív vegyületek kumulált hányadát. A ROC ábrán az aktív vegyületeknek így kapott arányát ábrázoljuk az inaktív vegyületekre kapott arány függvényében. Ha az aktív molekulák véletlenszerűen oszlanak el a rangsorban (nem működő modell), 1 meredekségű egyenest kapunk (**50.A ábra**, zöld görbe), ha eljárás előrébb sorolja az ismert aktív ligandumokat, akkor a ROC görbe ezen egyenes felett fut. Optimális esetben, amikor az összes aktív molekula a rangsor elejére kerül, a ROC görbe az azonosan 1 értéket veszi fel. Az **50.A ábra** alapján látható, hogy a sokasági modell (kék görbe) a korai fázisra jobb eredményt ad, mint az 5HK1A (**50.A ábra**, fekete) vagy a 6DK1C (**50.A ábra**, vörös), de globálisan nem bizonyul jobb teljesítőképességűnek, mint a két külön modell.

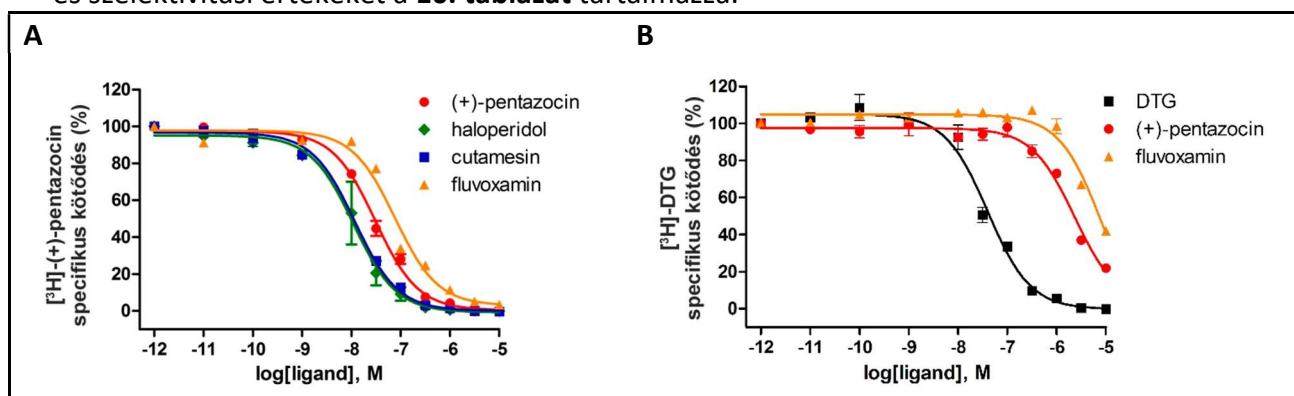
Annak vizsgálatára, hogy a sokasági modell milyen pontossággal reprodukálja a (+)-pentazocin és a PD144418 röntgendiffrakciós mérések alapján meghatározható szerkezetét, összehasonlítottuk ezeket a dokkolással kapott legmagasabb rangú konformációival (**50.B ábra**). A nehéz atomokra meghatározott RMSD-értékek mindkét ligandumra 1 Å-nél kisebbek (PD144418: 0,151 Å, (+)-pentazocin: 0,448 Å).



**50. ábra A:** a sokasági dokkolás eredményességének ábrázolása ROC-görbéken az 5HK1A monomer modell (fekete), a 6DK1C monomer modell (vörös), és a két modell kombinációjának (kék) felhasználásával, illetve véletlenszerű kiválasztás esetén (zöld). **B:** a sokasági dokkolással kapott legmagasabb rangú (+)-pentazocin és PD144418 konformerek (zöld) összehasonlítása a röntgendiffrakciós mérésekből kapott szerkezeteikkel (szürke).

A molekulák S1R-hez való kötődésének jellemzését tengerimalac májsejtekből származó membránpreparátumon végeztük, míg az S1R-S2R receptorselektivitási vizsgálatokhoz patkány májból izoláltunk hasonló eljárással membránfrakciót, mivel ebben az S2R sűrűség

magasabb, mint a tengerimalac máj-homogenizátumban [277]. [ $^3\text{H}$ ]-(+)-pentazocint használtunk a mérésekhez, ami a tengerimalac-preparátumon telíthető, nagy affinitású kötést mutatott, 37 °C-on  $K_d=1,8$  nM, míg  $B_{\max}= 1072$  fmol $\cdot$ mg $^{-1}$  protein értéknek adódott. A nem szelektíven kötődő [ $^3\text{H}$ ]-DTG patkány-membránfrakción az S1R receptorok maszkolására alkalmazott (+)-pentazocin 100 nM-os koncentrációja mellett 47 nM-os  $K_d$  értékkel kötődött. Az egyes ligandumok kötési affinitását a radioaktív jelzett ligandumokkal együtt alkalmazva, kompetíciós kötési tesztekben vizsgáltuk. Ismert S1R ligandumokra a kapott kötési görbék az **51. ábrán** láthatók (**51.A ábra**: [ $^3\text{H}$ ]-(+)-pentazocinnal, **51.B ábra**: [ $^3\text{H}$ ]-DTG-vel szemben), a  $K_d$  és szelektivitási értékeket a **10. táblázat** tartalmazza.



**51. ábra** *In vitro* kompetíciós kötődési vizsgálatok. **A:** tengerimalac membrán-preparátumon [ $^3\text{H}$ ]-(+)-pentazocinnal mért leszorítási görbék, **B:** patkány máj-preparátumon [ $^3\text{H}$ ]-DTG-vel kapott leszorítási görbék

Az S1/S2 szelektivitási kísérletben ismét 100 nM (+)-pentazocin jelenlétében határoztuk meg az értékeket. A vizsgált anyagokra nM-os  $K_i$  értékeket kaptunk, a ligandumok affinitása a (+)-pentazocin>haloperidol>cutamesin>fluvoxamin sorban csökkent, ami összhangban áll az irodalomban található farmakológiai adatokkal [370-374].

Ligand	S1R	S2R	Szelektivitás (S2R/S1R)
	$K_i \pm \text{S.E.M. (nM)}$	$K_i \pm \text{S.E.M. (nM)}$	
(+)-pentazocin	$4,8 \pm 0,4$	$1698 \pm 103$	354
DTG	n.m.	$29 \pm 4$	n.m.
fluvoxamin	$31 \pm 3$	$6187 \pm 296$	200
haloperidol	$5,2 \pm 1,3$	n.m.	n.m.
cutamesin	$5,5 \pm 1,1$	n.m.	n.m.

n.m.: nem meghatározott

**10. táblázat** A kompetíciós kötési vizsgálatokkal kapott  $K_i$  értékek és szelektivitási arányok.

A sokasági modellel saját, közel 4000 molekulát tartalmazó molekulakönyvtárunk *in silico* szűrését is elvégeztük, új, potenciális S1R-kötő szerkezeteket keresve. Ezek a molekulák 1,2- illetve 1,3-bifunkciós vegyületek, aminosavak, aminoalkoholok, hidroxikarbonsavak, diaminok, változatos (aciklusos, aliciklusos, heterociklusos) alapvázakkal. A kötődési rangsor felső 1%-ába került 40 vegyületet választottuk ki *in vitro* kötődési vizsgálatokhoz, ezek becsült  $\Delta G$  értékei -9,38 kcal/mol és -13,76 kcal/mol közé estek. Az előbbieken részletezett kompetíciós kötési vizsgálattal meghatároztuk a molekulák  $K_i$  értékét. A ligandumok a radioaktív kötéstesztben racém állapotban kerültek vizsgálatra.

fulop.livia\_187\_24

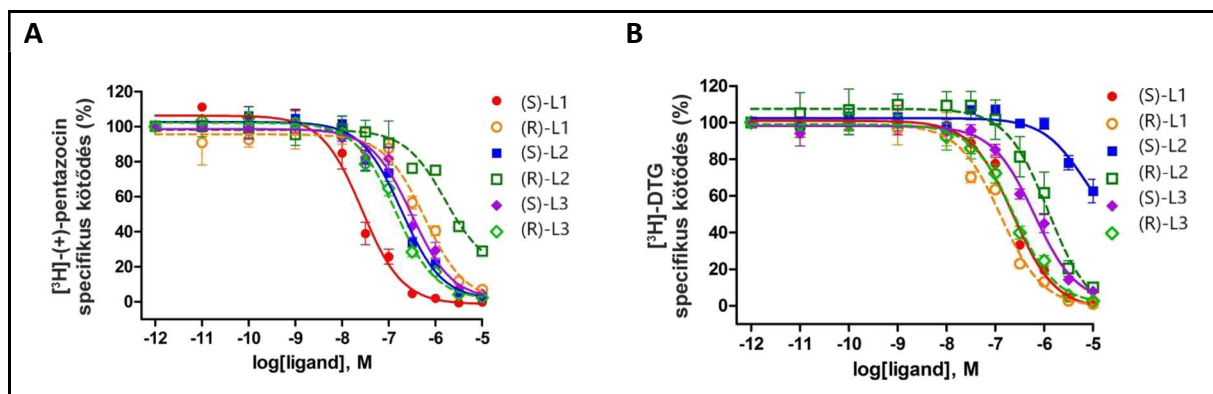
Azonosító	Mért Ki (nM)	Számolt ΔG (kcal/mol)	Kémiai név	Szerkezet
L1 <sup>1</sup>	32,0	-11,62	(±) <i>N</i> -benzil-2-[6,7-dimetoxi-1,2,3,4-tetrahydroizokinolin-1-il]etán-1-amin	
L2 <sup>1</sup>	91,0	-12,41	(±) 3-amino-3-fenil- <i>N</i> -{[2-fluor-3-(trifluormetil)fenil]metil}propánamid	
L3 <sup>2</sup>	110,0	-11,95	(±) 1-(3,4-dihydroizokinolin-2(1 <i>H</i> )-il)-3-(4-metoxifenoxi)propán-2-ol	
L4 <sup>1</sup>	420,0	-12,47	(±) 3-amino-3-fenil- <i>N</i> -{[3-fluor-5-(trifluormetil)fenil]metil}propánamid	
L5 <sup>1</sup>	463,0	-10,74	(±) 3-amino-1'-benzil-4a,5,8,8a-tetrahidro-1 <i>H</i> -spiro[5,8-metanokiazolin-2,4'-piperidin]-4(3 <i>H</i> )-on	
L6 <sup>2</sup>	1036,0	-11,12	(±) benzil-[[9-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i> ]indol-1-il]metil]karbamát	
L7 <sup>2</sup>	1381,0	-11,56	(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i> )-3-[(benzilamino)metil]-7,7-dimetilbiciklo[4.1.0]heptán-3,4-diol	
L8 <sup>2</sup>	1534,0	-10,68	(±) 3-amino- <i>N</i> -{[2-fluor-3-(trifluormetil)fenil]metil}-2-metilpropánamid	

Azonosító	Mért $K_i$ (nM)	Számolt $\Delta G$ (kcal/mol)	Kémiai név	Szerkezet
L9 <sup>1</sup>	1716,0	-10,87	(±) benzil-[[2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il]metil]karbamát	
L10 <sup>1</sup>	2154,0	-11,58	4-[(4R*,11bS*)-9,10-dietoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirimido[6,1-a]izokinolin-4-il]-N,N-dimetilanilin	
L11 <sup>1</sup>	2381,0	-10,55	(±) benzil-[[6,7-dimetoxi-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-1-il]metil]karbamát	
L12 <sup>2</sup>	3266,0	-9,69	(1R*,9bR*)-7,8-dietoxi-1-[[4-klórfenil]szulfanil]metil]-1,4,5,9b-tetrahidro-2H-azeto[2,1-a]izokinolin	

**11. táblázat** A 4000-es molekulakönyvtár szűrésével kiválasztott 12 legjobb vegyület becsült  $\Delta G$  és kompetíciós kötésvizsgálatban meghatározott  $K_i$  értéke tengerimalac membránpreparátumon [<sup>3</sup>H]-(+)-pentazocinnal szemben. <sup>1</sup> preferált target: 6DKC1, <sup>2</sup> preferált target: 5HK1A.

A **11. táblázat** a 12 legjobb *in silico* affinitással rendelkező molekula szerkezetét, a mért  $K_i$ -ket és a becsült  $\Delta G$  értékeket tartalmazza. Ez utóbbi adatok közepes korrelációt mutatnak, az  $R^2$  értéke 0,41. A kiválasztott ligandumok közös szerkezeti tulajdonságai megegyeznek a Glennon-féle farmakofór-moddal. Mind tartalmaz bázikus nitrogént, melyet két nagyobb kiterjedésű, aromás/heteroaromás, szerkezetileg rigid molekularész határol. 7 molekula a 6DKC1, míg 5 molekula az 5HK1A szerkezetet preferálja inkább. Csak egy molekula (L7) preferálja a (+)-pentazocinra jellemző P2-kötőzsebbe kötést, ez viszont alacsony affinitást mutatott a kötésteszten (K<sub>i</sub>=1381 nM).

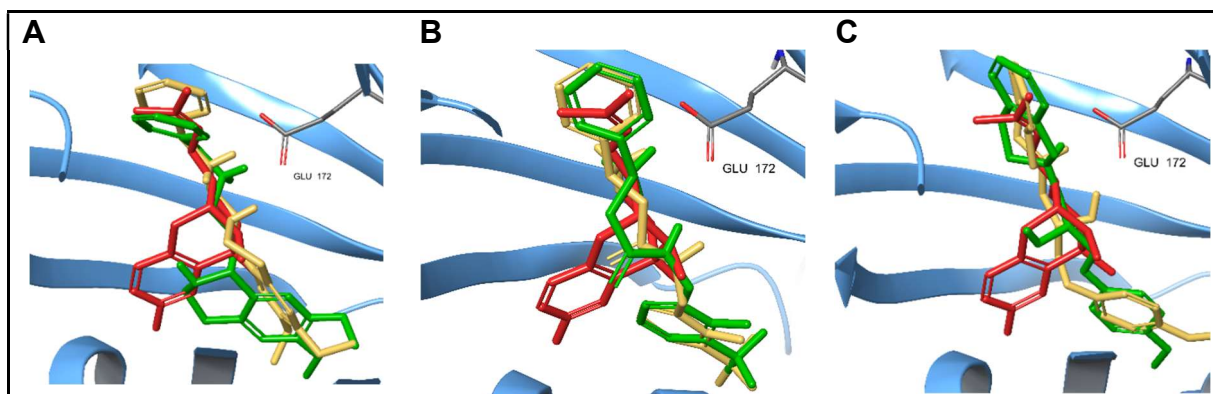
A három legmagasabban rangsorolt molekula enantiomerjeinek kötési affinitását és S2R/S12 szelektivitását szétválasztás után, tiszta állapotban is meghatároztuk (**52. ábra, 12. táblázat**). Az (S)-L1 (K<sub>i</sub> = 11 nM) jelentős S1R -szelektivitással rendelkezett, hasonlóan az irodalomban közölt S1R-agonista cutamesinhez, melyre a K<sub>i,S2R</sub>/K<sub>i,S1R</sub> arány 14,1 volt [373]. Az (S)-L2 (K<sub>i</sub> = 81 nM) közepes kötési affinitást, emellett a legjobb S1R szelektivitást prezentálta a molekulák közül (K<sub>i,S2R</sub>/K<sub>i,S1R</sub> = 63). A többi molekula kis szelektivitást és közepes-gyenge kötési affinitást mutatott.



**52. ábra** Az L1-L3 ligandumok enantiomereinek *In vitro* kompetíciós kötődési vizsgálata. **A:** tengerimalac membrán-preparátumon [<sup>3</sup>H]-(+)-pentazocinnal mért leszorítási görbék, **B:** patkány máj-preparátumon [<sup>3</sup>H]-DTG-vel kapott leszorítási görbék

Ligand	S1R	S2R	Szelektivitás (S2R/S1R)
	K <sub>i</sub> ± S.E.M. (nM)	K <sub>i</sub> ± S.E.M. (nM)	
(S)-L1	11 ± 3	169 ± 15	15,4
(R)-L1	252 ± 12	94 ± 5,5	0,4
(S)-L2	81 ± 3	5108 ± 960	63
(R)-L2	699 ± 57	920 ± 25	1,3
(S)-L3	132 ± 23	463 ± 33	3,5
(R)-L3	58 ± 3	176 ± 21	3

**12. táblázat** Az L1-L3 ligandumok enantiomereinek kötődésvizsgálata kompetíciós radioaktív tesztben, és az S2R/S1R szelektivitás meghatározása.



**53. ábra** A 3 legmagasabb rangsorú ligandum (L1-L3) enantiomereinek kötési konformációi a sokasági modellben. Vörös: (+)-pentazocin, zöld: R, arany: S enantiomer. **A:** L1, **B:** L2, **C:** L3.

A kötési konformációikat tekintve mindhárom ligandum enantiomerei az antagonistákra jellemző kötési pózokat részesítik előnyben (**53. ábra**). A (+)-pentazocin (**53. ábra**, vörös szerkezet) által favorizált, agonista kötődést jellemző P2 zsebet csak az (R)-L1 foglalja el részlegesen (**53.A ábra**, zöld). A molekulák preferenciától függően vagy a 6DK1C konformációhoz (R/S-L1, S-L2) vagy az 5HK1A konformációhoz (R-L2, R/S-L3) mutatnak nagyobb affinitást. Az eredmények alapján ezek az új szerkezetű ligandumok alkalmasak lehetnek az S1R-t célzó gyógyszerfejlesztésre.

## 6. Összefoglalás – kitekintés

### 6.1 Az „amiloid-kihívás”

Az AKH kiterjesztése után, körülbelül a 2000-es évek elejétől egyre nagyobb szerephez jutott a különböző hosszúságú, szintetikus forrásból származó A $\beta$  peptidok felhasználása a kísérleti modellekben. A peptid fiziológiai körülmények közötti felhasználhatóságát erőteljesen korlátozza kifejezett aggregációs hajlama, ami akár viszonylag rövid fragmensek (pl. az A $\beta_{25-35}$ ) 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 rekombináns forrásból származó A $\beta$  peptid elfogadottsága ezért látszólag nagyobb volt, hiszen itt a deléciós szekvenciák jelenléte kizárt. A szintézis viszont ebben az esetben is nehezített, a peptid csekély vízdékonysága miatt inklúziós testekben tárolódik a szintézishez alkalmazott (legtöbbször bakteriális) sejtekben, amiből a tisztítás más biomolekulák szennyezése nélkül problémás, illetve a sarzsoként tapasztalható változó aggregációs hajlam a rekombináns A $\beta$  esetében is fellép.

Több kutatócsoporttal történő együttműködésünk során azt tapasztaltuk, hogy az aggregáció reprodukálhatósága tekintetében az izo-A $\beta_{1-42}$  peptid alkalmazásával egy sokkal könnyebben, megbízhatóbban alkalmazható anyaghoz jutottunk. 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 fiziológiai pH és ionkoncentráció kezdeti beállítását követően időben jól jellemezhető, reprodukálhatóan azonos aggregációs kinetikával rendelkeztek. A teljes körű analitikai és fizikai-kémiai jellemzés biztosításával elértük, hogy számos együttműködő partnerünk szívesen alkalmazta az izo-A $\beta_{1-42}$  peptidet biológiai kísérletekhez. A folyamatos vizsgálatok és az összegyűlt tapasztalatok alapján bizonyossá vált, hogy az izo-A $\beta_{1-42}$ -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, rágcsálókra kidolgozott injektációs modellben kiválthatóak sejtszintű elváltozások, illetve előidézhető magatartás- és tanulási zavarás.

A kísérletek folyamatos elemzése arra is rávilágított, hogy az izo-A $\beta_{1-42}$  aggregációját a fiziológiai összetételű mintapufferekben található alkáliföldfém-ionok nem kívánt irányban befolyásolják. Ez a jelenség megmagyarázható az izopeptid egyedi kiindulási szerkezetével. A konvencionális A $\beta_{1-42}$  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 $^{2+}$  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-beállítás utáni hozzáadása az oldathoz egyszerű megoldást nyújt a problémára.

## 6.2 Az AKH-ra alapozott mechanizmus- és gyógyszerkutatás

Doktori értekezésem eredményeinek jelentős részét az A $\beta$  aggregációját moduláló molekulák vizsgálata, alkalmazási lehetőségeik feltérképezése alkotja. Az AKH folyamatos fejlődésével változatos lehetőségek nyíltak számunkra az A $\beta$ -patológia különböző lépéseire potenciális terapeutikumokat fejleszteni.

Máig nem tisztázott, hogy az A $\beta$  pontosan milyen fehérjékkel történő kölcsönhatások révén fejti ki neurotoxikus hatását. Szerkezete révén számos proteinhez 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 $\beta$ <sub>1-42</sub> peptidből készített oligomereket protein-chipen végrehajtott kötési vizsgálatban alkalmazva sikerült olyan fehérjecsaládokat azonosítanunk, melyek igazolták az A $\beta$  oligomerek intracelluláris folyamatokban betöltött szerepét. Az A $\beta$  fibrillumok extracelluláris jelenléte miatt a kaszkád korai fázisában megjelenő oligomerek lehetséges intracelluláris előfordulását és hatását sokáig hipotézisként kezelték, melyet aztán a kísérleti adatok egyre növekvő mennyisége is megerősített. A fehérjechipen végrehajtott kísérlet eredményei szerint a leginkább reprezentált molekula-család a transzlációban résztvevő 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.

A 2005-2015 közötti évtized AK-val kapcsolatos alapkutatásának egyik fő irányát az A $\beta$  aggregációját közvetlenül befolyásoló vegyületek vizsgálata jelentette. Az akkor uralkodó elmélet szerint a hatásmechanizmus alapja a károsnak tekintett A $\beta$  fibrillumok szerkezetének felbontása, a keletkező A $\beta$  monomerek kiürülésének és lebontásának elősegítése. Számos, különböző alapszerkezettel definiálható vegyület esetében tapasztalták, hogy a fibrillumképzést képes megakadályozni. A BSB-elmélet alapján az A $\beta$  egyes részleteivel azonos peptidszekvenciákkal a monomerek önrendeződése befolyásolható 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 megismétlése során vált egyre biztosabbá, hogy az A $\beta$  aggregációjának gátlása nem feltétlenül jelenti annak a kezdeti monomer/kis méretű oligomer formában történő befagyasztását, hiszen mikroszkópos elemzéssel a BSB-k alkalmazása mellett is megfigyelhettük nagyobb méretű aggregátumok képződését, illetve spektrofluorimetriával a  $\beta$ -redős réteghez rendelhető specifikus ThT-kötődés is sok esetben mérhető volt. Fizikai-kémiai vizsgálatok eredményei alapján javasoltuk 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” nomenklátúra helyett célszerűbb az „aggregáció módosító” (AM) megnevezés használata.



Alkalmazható-e ez a jelenség akár gyógyszerfejlesztési elvként? Az AKH kiszélesítése előtérbe helyezte az A $\beta$  oligomereket, melyek szintén kölcsönhatásba léphetnek megfelelő BSB-típusú, vagy egyéb, AM molekulákkal. Ebben az esetben a kölcsönhatás révén a toxikus felszín csökken, az oligomer „becsomagolása” megakadályozza a célmolekulákhoz való kötődést. Az AM vegyületek megfelelő geometriájú és méretű, biológiailag tolerálható hordozó molekulákkal való kombinációjával olyan konstruktokat alkothatunk, melyek akár méretszelektíven képesek bizonyos oligomerekkel kölcsönhatásba lépni. A KLVFFAE molekula szerkezetét követő, foldamer-típusú vegyületeket centrális szimmetriájú PAMAM dendrimerekkel konjugálva olyan molekuláris eszközt szintetizáltunk, mely az izo-A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptidből SOP-val 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 kontaktfelszínét, míg több foldamer szekvencia optimális geometriai elhelyezkedése és kölcsönhatása révén becsomagolhatja az LMW oligomereket. A foldamer-dendrimer konjugátum enzimatiszta 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.

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 fokálisan szimmetrikus tetraavalens, poli-lizin dendronra épített konstruktot egy olyan ELISA rendszer kidolgozására használtuk fel, mely alkalmas A $\beta$  oligomerek mennyiségi meghatározására, akár összetett biológiai mintából is. Oligomerek meghatározására jelenleg nincs a klinikumban alkalmazott kísérleti rendszer, a konvencionális, A $\beta$ -alapú diagnosztikai módszerek szekvensziaspecifikusak, oligomerizálódó A $\beta$ -ra torzított eredményt adnak. Az AKH-n alapuló mechanizmuskutató szempontjából mindenképpen fontos lépés lenne az A $\beta$  oligomerek meghatározásának beépítése a diagnosztikai protokollba, ez azonban jelenlegi állás szerint még nem történt meg.

Az AK-ra irányuló gyógyszerfejlesztésben a közvetlenül az amiloid aggregátumokkal kölcsönható gyógyszerjelöltek klinikai vizsgálatai jelenleg alulreprezentáltak. A legkorábbi 3-as fázisú klinikai vizsgálatra került molekula a tramiprosate volt (Alzhemed, [375]), mely bizonyítottan megakadályozza az A $\beta$  aggregációját, emellett gyulladáscsökkentő és GABA-receptor aktivitással is rendelkezik. A molekula nagy volumenű klinikai vizsgálatokban sajnos hatástalannak bizonyult. Az A $\beta$ -t célzó kismolekulás terápiák a továbbiakban a szekretázok működésének szabályozására irányultak, így érve el az A $\beta$  aggregátumok mennyiségének csökkenését. A keletkezett aggregátumok eltávolítását immunológiai módszerek (antitestes terápiák), illetve a kiürülést támogató lehetséges gyógyszerek (transzporterek aktivitására ható szerek) alkalmazásával tervezték megoldani. Mivel azonban az eltelt években a kísérleti eredmények szerint ezen megközelítések eredményessége kérdéses az AK tartós gyógyításában, illetve súlyos mellékhatások társultak az alkalmazásukhoz, kialakult egyfajta bizalmatlanság és távolságtartás az A $\beta$  aggregációját célzó terápiákkal szemben [376], ami nagy mértékben csökkentette a gyógyszeripari partnerek érdeklődését az általunk fejlesztett AM vegyületek irányában is. Peptid és peptidomimetikum típusú molekuláinkból jó farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkező vezérvegyület fejlesztése lehetséges, és a kismolekulás AM-ek nagyobb eséllyel lennének képesek a sejten belül kialakuló, neurotoxikus



LMW oligomerek elérésére, hatásuk semlegesítésére. Azonban az intracelluláris oligomerek nehezen elérhetőek, így a molekula szerkezetoptimalizálásán túl, annak bejuttatása a sejtbe külön fejlesztési feladatot jelent. Ez a tény is hozzájárult az AM vegyületek iránti csökkent érdeklődéshez.

Az alapkutatással kapcsolatos szakirodalom vizsgálata azonban azt mutatja, hogy a kutatók még jelenleg sem zárják ki ezt a lehetőséget az ígéretes terápiák sorából. A PubMed adatbázisában az „amyloid aggregation inhibitor” kifejezésre a 2022-2023 éves időszakra végrehajtott keresés, az eredményeket leszűkítve az AK-ra és az A $\beta$ -ra, kb. 100 publikációt eredményezett. A már korábban ismert AM molekulák további vizsgálata mellett új anyagok is megjelennek, pl. különféle növényekből nyert, eddig AK-ban nem alkalmazott gyógyhatású vegyület klasszikus aggregáció-gátló hatással [377-382], illetve multimerek/dendrimerek [383, 384], fémkelátorok [385] és poliolionos anyagok [386-389], mint AM-molekulák is szerepelnek a publikációkban. Külön csoportot képeznek azok a multi-target alapú megközelítések, amelyek esetében már egy adott hatásmechanizmussal rendelkező gyógyszert vizsgálnak a kutatók az aggregációra kifejtett hatás szempontjából. Egy tanulmány szerint az AK-ban 2021–22 között regisztrált klinikai vizsgálatok kb. 43%-a a költséghatékony fejlesztési lehetőséget jelentő „repurposing” elven alapul [390]. A vegyületek egy része AM hatással rendelkezik, ezáltal lehetséges terápiás felhasználási körének kiterjesztése (összefoglalva [379]-ben). További, még nem törzskönyvezett, de preklinikai szinten kiterjedten vizsgált molekulák a multitarget-családban egyes enzim-inhibitorok [391-393], vagy Tau-aggregációt módosító anyagok [394], amelyek rendelkeznek AM aktivitással is. Ezek az eredmények is mutatják, hogy az AM vegyületek alkalmazása terén még vannak kihasználatlan lehetőségek. Így lenne létjogosultsága az ilyen irányú fejlesztéseknek, hiszen ezek a terápiák az antitesten alapuló eljárásokat kiegészíthetnék, támogathatnák. A kismolekulás AM-ek átjutása a vér-agy gáton könnyebben megvalósulhat, mint az antitesteké, melyek esetében a hatásossághoz szükséges extrém nagy dózis valószínűleg a rossz biodisztribúciós profil eredménye. Mind az antitestek, mind a kismolekulás AM-ek esetében ezért törekedni kell a célhelyre történő hatékonyabb eljutás elősegítésére.

### **6.3 Az A $\beta$ -tól különböző célpontokon alapuló fejlesztések relevanciája**

A 2020-as években indított gyógyszerfejlesztési vizsgálatok jelentős része az AKH-n túlmutató, vagy attól teljesen eltérő, alternatív mechanizmusokat részesít előnyben. Természetesen az eddigi kísérletekből is le kellett vonni a megfelelő konzekvenciákat, aminek központjában a sikertelenség okainak feltárása áll.

Az AKH centrális szerepének gyengülése mellett más tényezők is megnevezésre kerültek, úgymint a betegcsoportok helytelen összeállítása a klinikai kísérletekhez, ami az AK heterogenitásából, és a társbetegségek befolyásoló hatásából fakad, illetve a klinikai vizsgálatok helytelen végpont-definiálása. Ez utóbbi főleg annak tudható be, hogy az AK korai diagnosztikája még mindig nem megoldott, így a betegcsoportok általában már rendkívül előrehaladott stádiumú betegekből állnak, akik esetében a memóriára, tanulásra alapozott végponti mutatók javulása nagyon nehezen mutatható ki. Így a klinikai vizsgálatok stratégiájának áttervezése, kisebb, homogén vizsgálati célcsoportok összeállítása, az F2-F3 vizsgálatok végpontjainak finomított, célzott, molekuláris szintű változásokat is magában foglaló definiálása segíthetne hatékonyabb terápiákat azonosítani [395]. Ezeket a szempontokat az utóbbi években tervezett F3 vizsgálatokban (pl. a Donanemab esetében) már figyelembe vették.

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. Az eddig klinikai vizsgálatoknak alávetett molekulák közül csak egy, a Buntanetap (Posiphen) célpontja az APP, más fragmenseket célzó vegyületeket pedig nem találunk a gyógyszerjelöltek között. A Buntanetap AK-ban jelenleg F2 vizsgálati szakaszban van, enantiomer párjával, a Phenserinnel azonos hatásmechanizmus szerint gátolja az APP mRNS-ének átíródását, ezzel csökkentve az APP expresszióját [396]. A molekula F1 vizsgálatban jól tolerálhatónak bizonyult, jelentős mellékhatások fellépését nem tapasztalták [397]. Az eredmények szerint az amiloid és Tau biomarkerek mennyisége szignifikánsan csökkent, míg a neurodegenerációt jellemző biomarker esetében nem volt szignifikáns a csökkenés. Parkinson kóros betegcsoporton vizsgálva az anyag hatását a gyulladáshoz kapcsolódó markerek szignifikáns csökkenését tapasztalták.

Saját kutatási eredményeinkkel sikerült olyan AK-ban releváns folyamatokat azonosítani, melyek kulcseleme az APP lebontásával keletkező AICD. Az AICD-Fe65 kölcsönhatást egy olyan peptid-típusú molekulával (P33) tudtuk befolyásolni, mely az Fe65 szerkezeti sajátosságait használja ki: a WW-doménhez kötődő specifikus kölcsönhatás révén, valószínűleg allosztérikus módon gátolja az AICD-aktivált Fe65 fehérjekomplex kialakulását. 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 transzgen egerekben az A $\beta$  túltermelődésének következményeként kialakuló gyulladást is sikerült mérsékelni, így valószínűsíthető, hogy a molekuláris szinten aktiválódó stresszfolyamatok is csökkennek a kezelés hatására.

A P33 további vizsgálata felfedte, hogy a kezelés az egerekben zajló, a felnőttkori neurogenesishez kapcsolható biológiai folyamatokat is kedvező irányban befolyásolja. A transzgen egerekben 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 kapcsolódó 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 translációja 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. 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.

Az AKH központi szerepének gyengüléséhez az AK-ban nagy mértékben hozzájárult az a felismerés, hogy az aggregátumok megjelenése és az AK tünetei között nincs egyértelmű ok-okozati összefüggés [398]. Egyes felfogások szerint az aggregátumok csak kísérői az egyéb, feltételezetten sejtszinten felerősödő stresszfolyamatoknak, de nem rendelkeznek káros hatással, illetve ha igen, akkor az aggregátumok „kiégett” plakkokba szerveződését egyfajta védelmi mechanizmusként foghatjuk fel. Emiatt a degradációjuk, eltávolításuk nem vezet szükségszerűen a tünetek javulásához, ahogy az az eddigi vizsgálatok esetében sokszor tapasztalható is volt. Ennek az álláspontnak a létjogosultsága még szintén nem bizonyított, az viszont már széles körben elfogadott, hogy a neuroinflammáció és a molekuláris stressz

mérséklése az AK, és általában a fehérjekonformációs betegségek esetében célravezető terápia lehet.

Az S1R modulátorok ilyen célú felhasználására már van példa, az Anavex eddigi F3-as eredményei ígéretesek. Erről a molekuláról is ismert, hogy kevert agonista, az S1R modulálása mellett muszkarinerg hatással is bír. A cél olyan S1R modulátor fejlesztése, mely megnövelt szelektivitással rendelkezik, egyéb receptorokkal szemben kevésbé promiszkuis. Új vegyületek *in silico* azonosítására alkalmas dokkolási eljárásunkkal az ígéretes molekulák esetében azok kötődésének jellegéről (agonista/antagonista típusú kötődési konformáció) is nyerhetünk információt. A legjobb 3 azonosított szerkezetből a sztereoizomereket is figyelembe véve 6 különböző molekulát találtunk, melyek potenciális S1R modulátorként szolgálhatnak vezérvegyület fejlesztéséhez.

Az S1R modulátorokkal kapcsolatos vizsgálataink feltártak olyan összefüggéseket is, melyek alapján az AK különböző kórfolyamatainak kölcsönös egymásra hatására nyertünk újabb bizonyítékokat. Ehhez kidolgoztunk egy új kísérleti modellt, mely a transzgén állatokkal szemben gyorsabban és költséghatékonyabban használható. 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 a korábbi *in vivo* kísérletekben az aggregált A $\beta$ -felhasználásával kapott eredményeink valószínűsítik, hogy a transzgén állatokban az A $\beta$  túltermelődése következtében kialakuló további patológiai jelek, mint a magatartás és a tanulási képességek megváltozása, megjelenhetnek ebben a modellben is. Az egyszerűen kivitelezhető *in vivo* kísérletek során a gyulladás és neurogenesis egymásra hatását S1R modulátorok jelenlétében vizsgáltuk. Kísérleteink bizonyították, hogy bár mindkét S1R agonista hatást fejthet ki a két molekuláris folyamatra, mégis az agonista jelleghez nem rendelhető olyan általánosan érvényes mechanizmus, amely alapján a molekula karakteréből levonhatnánk annak uniformizáltan kedvező hatására vonatkozó következtetést.

A két anyag hatásmechanizmusában észlelt különbségek gyarapítják az irodalomban az S1R modulátorok eredményességével kapcsolatos kérdések, tisztázatlan pontok számát. Ezért az AKH-n alapuló gyógyszerfejlesztés során nyert tapasztalatok itt is érvényesek, a sikeres S1R-alapú terápiás megközelítés kidolgozásához is elengedhetetlen az adott molekula hatásmechanizmusának minél részletesebb felderítése, humán klinikai vizsgálatban pedig a betegcsoport körütekintő kiválasztása és a terápiás célokhoz a felderített hatásmechanizmust is figyelembe vevő megfogalmazása. Az AK gyógyszerkutatásának eddigi, átütő sikereket nélkülöző története egyértelművé tette, hogy ez a betegség sem különbözik a többi nagy, megoldatlannak tekintett kórtól, amennyiben a multifaktoros kórkép miatt valószínűleg elérhetetlen álmá marad egyetlen molekula, mint hatékony terápia felfedezése. Sokkal inkább számíthatunk sikerre majd abban az esetben, ha képesek leszünk a különféle mechanizmusokat célzó leghatékonyabb molekulákat megtalálni, és azok kombinációján alapuló, akár élethosszig alkalmazható kezelési protokollokat felállítani.

## 7. Tézisek

A doktori értekezésemben bemutatott eredmények tézisszerű rövid összefoglalása:

### 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**

A konvencionális SPPS-sel előállított peptidek aggregációra hajlamosak, ezért tulajdonságaik ellenőrzésére rendszeresítettünk olyan fizikai-kémiai metodikákat, illetve kidolgoztunk olyan mintakészítési eljárásokat, 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, és 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 izo-A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptid szintézisének optimalizálásával egy, a kísérletekhez előnyösebben alkalmazható formához jutottunk, amire építve protokollokat dolgoztunk ki a két fő aggregációs (oligomer és fibrilláris) forma előállítására. Vizsgálataink bizonyították, 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, rágcsálókra kidolgozott injektációs modellben igazolható a HC-ban csökkent dendrittüske-sűrűség, illetve előidézhető magatartás- és tanulási zavarás. Fluoreszcens kromofórral jelölt 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.

Megvizsgáltuk a peptid aggregációs karakterisztikáját, illetve modelleztük kiindulási konformációját, amivel megmagyaráztuk a konvencionális formától eltérő viselkedését fiziológias körülmények között, Ca<sup>2+</sup> és Mg<sup>2+</sup> ionok jelenlétében. Ennek ismeretében módosított protokollokat javasoltunk az izo-A $\beta$ <sub>1-42</sub> biológiai kísérletekben történő felhasználására.

### III. **A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomerekkel kölcsönható fehérjék azonosítása a AK patológiájában**

Chip felületén rögzített fehérjék kölcsönhatását elemeztük oligomer A $\beta$ <sub>1-42</sub>-val, majd az eredményeket igazoló funkcionális tesztekkel kimutattuk, hogy ezek az aggregátumok gátolják a mitokondriális proteinszintézist, ami magyarázatul szolgálhat az AK-ban tapasztalható mitokondriális diszfunkcióra és a vele összefüggő molekuláris stresszfolyamatok felerősödésére.

### IV. **AM típusú vegyületek hatásmechanizmusának felderítése**

A korábban uralkodó BSB elmélet helyett javasoltuk az „aggregáció módosító” (AM) megjelölés alkalmazását azon kismolekulás anyagokra, melyek az A $\beta$  aggregátumokkal kölcsönhatásba lépnek. Foldamer típusú AM vegyületek dendrimer típusú molekuláris hordozókhoz történő kapcsolásával, illetve a szerkezeti elemek optimalizálásával olyan molekulákat állítottunk elő, melyek méretszelektíven képesek az A $\beta$  oligomereket felismerni, biológiai kísérletekben azok kedvezőtlen kölcsönhatását gátolni.

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

A tetraavalens, fokálisan szimmetrikus foldamer-dendrimer konjugátumot szilárd hordozóhoz rögzítve a standard ELISA rendszer módosított változatát nyertük, mely alkalmas LMW A $\beta$  oligomerek mennyiségének kvantitatív meghatározására biológiai mintákból. Ez a diagnosztikai eszköz kiegészítheti a jelenleg alkalmazott, szolubilis A $\beta$ -t kimutató ELISA teszt eredményeit.

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

A fibrilláris A $\beta$ -val kölcsönható fehérjék azonosítását és szerkezetük hasonlóságának bioinformatikai eszközökkel történő elemzését követően 65 peptid- és peptidomimetikum-típusú, biológiailag aktív vegyületet szintetizáltunk és szabadalmaztattunk. A legígéretesebb molekula, a P33 célzott tesztelésével bizonyítottuk az Fe65 fehérje modulálásán alapuló hatást, mely valószínűleg az Fe65-AICD kölcsönhatás révén kedvező irányban módosítja az A $\beta$ -patológiát APPxPS1-es transzgén egérmodellben.

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

A neurogenesis folyamatának összefüggését az A $\beta$ -patológiával a FAK egyik alapmodelljeként alkalmazott APPxPS1-es állattörzsben, az állatok folyamatos követésével vizsgáltuk meg. Eredményeink szerint a modellben az A $\beta$ -patológia megelőzi a neurogenesis károsodását, míg a neuroprotektív P33 molekula korai időponttól kezdett, krónikus adagolása kedvezően hat a neurogenesis folyamataira, valószínűleg az amiloidpatológiára gyakorolt pozitív hatása révén.

**VIII. *Két S1R modulátor neurogenesisre kifejtett hatásának vizsgálata in vivo A $\beta$ -injektációs modellben***

A transzgén modellnél könnyebben alkalmazható, A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomerek egyszeri, közvetlen injektálásával előálló kísérleti rendszerben igazoltuk a neurogenesis alapfolyamatainak akut károsodását, illetve az A $\beta$ -patológiát jellemző neuroinflammáció megjelenését. Két S1R agonista, az endogén DMT és a szintetikus PRE-084 hatását ebben a modellben megvizsgálva kimutattuk, hogy az agonista jelleg nem feltétlenül párosul egyik vizsgált tényező esetében sem azonos hatással, jelezve ezzel az S1R-t érintő folyamatok összetettségét. Az észlelt eltérések oka a DMT más receptoron (5HT<sub>2A</sub>) érvényesülő hatása és rövid biológiai féléletideje lehet.

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

Megfelelően válogatott molekulaszettek virtuális szűrésére alkalmazható protokollt dolgoztunk ki, mely kombinál egy ismert agonistához és egy antagonistához kötött receptor szerkezetet. A módszerrel egy közel 4000 tagú molekulakönyvtárból azonosítottunk 40 potenciális S1R-hez kötődést mutató vegyületet, melyek affinitását radioligand-kötődési tesztben is meghatároztuk. A legjobb három ligandum mindkét enantiomerjét megvizsgáltuk S1R/S2R szelektivitásuk szempontjából is. Ezek a molekulák ígéretes jelöltek lehetnek az AK-ban történő terápiás felhasználásra.

## 8. Köszönetnyilvánítás

A kémia művelése iránt érzett lelkesedésem és szeretetem általános iskolás koromtól kezdve töretlen. Szerencsésnek tartom magam, hogy az SZTE Orvosi Vegytani Intézetében megkaptam a lehetőséget ahhoz, hogy a szeretett tárgyból hivatás váljon, bár külön kiemelném, hogy a kutatással egyenrangúan fontos feladatnak gondolom a kémia oktatását is, amit itt egyetemi oktatóként szintén végezhetek. Az iskolai éveimből ezért kiemelném két meghatározó személy szerepét, akiknek az erős alapokat köszönhetem: Molnár Józsefné Terikének, aki általános iskolai, illetve Meleg Istvánnak, aki gimnáziumi kémia tanáromként mutatott nekem pedagógiai példát és adott életre szólóan hasznos tudást.

Az egyetemen számos oktatóm formálta mind az oktatáshoz, mind a kutatáshoz fűződő szemléletemet. Molnár Árpád professzor úr alapos, szisztematikus szerves kémiai oktatása tovább erősítette bennem a korábban már formálódó érdeklődést a kémia ezen területe iránt, amiért mindig hálás leszek. Köszönöm Penke Botond professzor úrnak, hogy szakdolgozónak felvett az Intézetébe, ahol elkezdhettem az kutatómunkát.

Botond mellett Zarándi Márta professzor asszony volt az első témavezetőm, akitől megtanulhattam a peptidszintézis módszerét, és aki mind tudományosan, mind emberileg mindig maximálisan támogatott, ha arra volt szükségem. Nagyon köszönöm neki az induló éveket.

Botondnak nem tudok eléggé hálás lenni minden támogatásért és lehetőségért, amit tőle az elmúlt majdnem három évtizedben kaptam. A kutatócsoportot tőle megörökölve igyekeztem legjobb tudásom szerint tovább vinni a megkezdett munkát, művelni az Alzheimer-kórral kapcsolatos gyógyszerkutatás tudományát. Megtanulhattam tőle a kitartást, a precizitást, és azt is, hogy hogyan lehet a nehézségeket előnnyé fordítva építkezni tovább.

Természetesen soha nem egyedül értem el az eredményeket, kutatócsoportunk minden tagjára hálával gondolok, és köszönöm a közös munkát. Így a kezdeti években Jostné Balaton Krisztina, Nagy Katalin és Dósai-Molnár Éva segítségét a laboratóriumi munka megtanulásában, később Boros Mihályné Annamarinak, Horváth Évának és Pataki Szilviának a laboratóriumi asszisztensi segítséget. Szeretném kiemelni három barátommá vált munkatársamat, Datki Zsolt Lászlót, Paragi Gábort és Bogár Ferencet, akik az állandó szakmai támogatás mellett emberileg is a maximumot adva segítettek nekem boldogulni, haladni. Hálás szívvel emlékezem Rázga Zsoltra, aki az elektron mikroszkópia megismerését és mérés technikájának elsajátítását tette lehetővé számomra. Köszönöm a későbbi intézetvezetőknek, Tóth K. Gábornak és Martinek Tamásnak a támogatást és az együttes munkát. Három doktoranduszom, Simon Dóra, Borbély Emőke és Szilágyi-Szőgi Titanilla, valamint további volt és jelenlegi közvetlen kollégáim, Janáky Tamás, Mándity István, Szegedi Viktor, Virók Dezső, Bozsó Zsolt, Schuster Ildikó, Papp Ibolya Zita, Hetényi Anasztázia, Bartus Éva, Olajos Gábor, Kele Zoltán, illetve az Orvosi Vegytani Intézet minden egykori és jelenlegi munkatársa részére is szeretném köszönetem kifejezni, nélkülük a kutatási eredményeink nem születhettek volna meg ebben a formában. Köszönöm Zentai Máriának a szöveg nyelvi ellenőrzését.

Az értekezés alapjául szolgáló eredmények megszületését következő pályázatok tették lehetővé: EU-FP7 MEMOLOAD 201159, KTIA\_13\_NAP-A-III/7, 2017-1.2.1-NKP-2017-00002-III/8, 20391-3/2018/FEKUSTRAT, GINOP 2.3.2-15-2016-00036.

Végül szeretném megköszönni Gábornak, Ákosnak, Ákos fiamnak, családom minden további tagjának, és két barátnőmnek, Juditnak és Erzsónak az elmúlt évek minden türelmét, és a szeretetet, amivel körülvettek, erős háttérrel biztosítva nekem a mindennapokban.

## 9. Rövidítésjegyzék

2-Cl-Z: 2-klorobenziloxikarboniloxi  
A $\beta$ : béta-amiloid  
ACSF: mesterséges cerebrospinális folyadék  
AFM: atomerő mikroszkópia  
AICD: intracelluláris APP-domén  
AK: Alzheimer-kór  
AKH: amiloid kaszkád hipotézis  
AM: aggregáció módosító  
AMCA: 7-amino-4-metil-3-kumarinilacetil-  
AMCA-NHS: 7-amino-4-metil-3-kumarinilecetsav N-szukcinimid észter  
APP: amiloid prekursor protein  
ARIA: amiloid által okozott képzőanyagok abnormalitások  
ATF6: aktiváló transzkripció faktor 6  
BACE: béta-pozícióban APP-t hasító enzim  
BBB: vér-agy gát  
BCA: bicinkoninsav  
Bip: kötő immunoglobulin protein  
BMB: bisz-maleimido-bután  
Boc: *tert*-butil-oxikarbonil  
BrdU: 5-bróm-2'-deoxiuridin  
CD: cirkuláris dikroizmus  
CSF: cerebrospinális folyadék  
CTF C-terminális fragmens  
CV: sejtek viabilitása („cell viability”)  
DB: „dot blot”  
DBU: 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-én  
DCC: N,N'-diciklohexilkarbodiimid  
DCX: „doublecortin”  
DG: girus dentatus  
DIEA: N, N-diizopropiletilamin  
DISICL: diéder-alapú szegmensazonosítás  
DMF: dimetilformamid  
DMS: dimetilszulfid  
DMSO: dimetilszulfoxid  
DMT: N,N-dimetiltriptamin  
DTT: threo-1,4-dimerkapto-2,3-butándiol  
EF: dúsulási faktor („enrichment factor”)  
eIF2 $\alpha$ : eukarióta iniciációs faktor 2 $\alpha$   
ELISA: enzim-kapcsolt immunoszorpció esszé  
ER: endoplazmás retikulum  
ESI-MS: elektropray-ionizációs tömegspektrometria  
fA $\beta$ : fibrilláris béta amiloid  
FAK: familiáris, öröklődő Alzheimer-kór  
FBS: magzati borjúsérum  
fEPSP: excitatórikus posztzinaptikus mezőpotenciál  
Fmoc: fluorenil-metoxikarbonil

GABA: gamma-aminovajsav  
GAFF: „generalized amber force field”  
GCN2: „general control nonderepressible 2”  
GFAP: gliális fibrilláris savas protein  
GWAS: „large scale genome-wide association studies”  
HATU: 1-[Bisz(dimetilamino)metilén]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinium 3-oxid hexafluorofoszfát  
HBS: HEPES alapú fiziológiás puffer  
HC: hippokampusz  
HCBS: hidrogénkarbonát-alapú fiziológiás puffer  
HEK: humán embrionális vese sejt  
HEPES: 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etánszulfonsav  
HFIP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropán-2-ol  
HMW oligomer frakció: nagy molekulatömegű oligomer frakció  
HOAt: 1-hidroxi-7-azabenzotriazol  
HOBt: 1-hidroxi-benotriazol  
HRI: HEM-regulált inhibitor kináz  
HRP: torma-peroxidáz  
Iba1: ionos kalcium-kötő adapter molekula 1  
ICV: agykamrai  
IHC: intrahippokampális  
IL: interleukin  
IP: intraperitoneális  
IRE1: szerin/treonin-protein kináz/endoribonukleáz inozitol-függő enzim 1  
ISR: integrált stresszválasz („integrated stress response”)  
ITC: izoterm titrációs kalorimetria  
LMW oligomer frakció: kis molekulatömegű oligomer frakció  
LOD: detektálási határ  
LTP: hosszú távú potenciáció  
MAM: ER mintokondriummal közös határfelülete („mitochondrial associated membrane”)  
MBHA: ( $\alpha$ -amino- $\alpha$ -p-xilil hidroklorid)polisztirol-divinilbenzol kopolimer  
MCI: enyhe kognitív károsodás („mild cognitive impairment”)  
MC/MD: Monte Carlo/Molekuláris dinamika  
MOE: „Molecular Operating Environment”  
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid  
NeuN: neuronális nukleáris protein  
NMDA: N-metil-D-aszparaginsav  
NMI: N-metil-imidazol  
NMR: mágneses magrezonancia spektroszkópia  
NPC: neurális progenitor sejt  
NSAID: nem-szteroid gyulladáscsökkentő  
NSC: neuronális őssejt  
oA $\beta$ : oligomer béta amiloid  
OB: szaglógumó  
PAM: 4-(Hidroximetil)fenilacetamidometil-polisztirol  
PAMAM dendrimer: poliamidoamin dendrimer  
PCP: fenilciklidin



PERK: protein kináz-szerű ER-kináz  
PET-CT: pozitronemissziós tomográfia – számítógépes tomográfia  
PHF: páros helikális filament  
PKR: RNS-függő protein-kináz R  
Pin1: NIMA-kölcsönható peptidil-prolil cisz-transz izomeráz 1  
PS1 és PS2: preszenilin 1 és preszenilin 2  
PSD95: posztszinaptikus sűrűség fehérje 95  
pTau: hiperfoszforilált Tau  
REMD: replika kicserélődéses molekuláris dinamika  
RESP: „restained electrostatic potential”  
RIP: szabályozott intramembrán proteolízis („regulated intramembran proteolysis”)  
RMS: rosztales migrációs ösvény  
RP-HPLC: fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia  
S1/2R: szigma-1/2 receptor  
sAPP- $\alpha$ /  $\beta$ : oldható amiloid prekursor protein  $\alpha$ / $\beta$ -fragmens  
SAK: sporadikus Alzheimer-kór  
SDS: nátrium-dodecil-szulfát  
SF: egyenes filament  
SGZ: szubgranuláris zóna  
SPPS: szilárd fázisú peptidszintézis  
STD: szaturáció-transzfer-differencia  
SVZ: szubventrikuláris zóna  
TBS: „theta-burst” stimuláció  
TEM: transzmissziós elektronmikroszkópia  
TFA: 2,2,2-trifluoecetsav  
TFE: 2,2,2-trifluoroetanol  
ThT: tioflavin-T  
TMB: 3,3',5,5' tetrametilbenzidin  
TMP: tetra-maleimido-PAMAM  
TRIS: trisz-(hidroximetil)-amino-metán  
UPR: hibás fehérje-válasz („unfolded protein response”)  
VS: virtuális szűrő eljárás  
WB: „western blot”  
XBP1 spliced: hasított X-boksz kötő fehérje 1

## 10. Irodalomjegyzék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények vastag szedéssel jelölve.

1. Piller, C., *Blots on a Field?* Science, 2022. **377**(6604): p. 358.
2. Hardy, J.A. and G.A. Higgins, *Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis*. Science, 1992. **256**(5054): p. 184.
3. Hardy, J. and D.J. Selkoe, *The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics*. Science, 2002. **297**(5580): p. 353.
4. Karran, E., M. Mercken, and B.D. Strooper, *The Amyloid Cascade Hypothesis for Alzheimer's Disease: An Appraisal for the Development of Therapeutics*. Nat Rev Drug Disc, 2011. **10**(9): p. 698.
5. Karran, E. and B. De Strooper, *The Amyloid Cascade Hypothesis: Are We Poised for Success or Failure?* J Neurochem, 2016. **139 Suppl 2**: p. 237.
6. Ricciarelli, R. and E. Fedele, *The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind*. Curr Neuropharmacol, 2017. **15**(6): p. 926.
7. Alzheimer, A., *Über Eine Eigenartige Erkrankung Der Hirnrinde*. Allg Zeitschr Psych Psych-ger Med, 1907. **64**: p. 146.
8. Mucke, L., *Alzheimer's Disease*. Nature, 2009. **461**(7266): p. 895.
9. Lam, B., et al., *Clinical, Imaging, and Pathological Heterogeneity of the Alzheimer's Disease Syndrome*. Alzheimers Res Ther, 2013. **5**(1): p. 1.
10. Castellani, R.J., R.K. Rolston, and M.A. Smith, *Alzheimer Disease*. Dis Mon, 2010. **56**(9): p. 484.
11. Blennow, K., M.J. de Leon, and H. Zetterberg, *Alzheimer's Disease*. The Lancet, 2006. **368**(9533): p. 387.
12. Tanzi, R.E., *The Genetics of Alzheimer Disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(10).
13. Giri, M., M. Zhang, and Y. Lu, *Genes Associated with Alzheimer's Disease: An Overview and Current Status*. Clin Interv Aging, 2016. **11**: p. 665.
14. Piaceri, I., B. Nacmias, and S. Sorbi, *Genetics of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease*. Front Biosci Elite, 2013. **5**(1): p. 167.
15. Bettens, K., K. Sleegers, and C. Van Broeckhoven, *Genetic Insights in Alzheimer's Disease*. Lancet Neurol, 2013. **12**(1): p. 92.
16. Goloubinoff, P., *Mechanisms of Protein Homeostasis in Health, Aging and Disease*. Swiss Med Weekly, 2016. **146**(1314): p. w14306.
17. Balch, W.E., et al., *Adapting Proteostasis for Disease Intervention*. Science, 2008. **319**(5865): p. 916.
18. Yerbury, J.J., et al., *Walking the Tightrope: Proteostasis and Neurodegenerative Disease*. J Neurochem, 2016. **137**(4): p. 489.
19. Wang, Y.-C., E. Lauwers, and P. Verstreken, *Presynaptic Protein Homeostasis and Neuronal Function*. Curr Opin Genet Dev, 2017. **44**: p. 38.
20. Ciryam, P., et al., *A Transcriptional Signature of Alzheimer's Disease Is Associated with a Metastable Subproteome at Risk for Aggregation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(17): p. 4753.
21. Freer, R., et al., *A Protein Homeostasis Signature in Healthy Brains Recapitulates Tissue Vulnerability to Alzheimer's Disease*. Science Adv. **2**(8): p. e1600947.
22. Nixon, R.A., *The Role of Autophagy in Neurodegenerative Disease*. Nature Med, 2013. **19**(8): p. 983.
23. Whyte, L.S., et al., *Endo-Lysosomal and Autophagic Dysfunction: A Driving Factor in Alzheimer's Disease?* J Neurochem, 2017. **140**(5): p. 703.
24. Khalil, H., et al., *Aging Is Associated with Hypermethylation of Autophagy Genes in Macrophages*. Epigenetics, 2016. **11**(5): p. 381.
25. Neill, D., *Should Alzheimer's Disease Be Equated with Human Brain Ageing?: A Maladaptive Interaction between Brain Evolution and Senescence*. Ageing Res Rev, 2012. **11**(1): p. 104.

26. van der Kant, R. and L.S.B. Goldstein, *Cellular Functions of the Amyloid Precursor Protein from Development to Dementia*. Dev Cell, 2015. **32**(4): p. 502.
27. Ebinu, J.O. and B.A. Yankner, *A Rip Tide in Neuronal Signal Transduction*. Neuron, 2002. **34**(4): p. 499.
28. Deyts, C., G. Thinakaran, and A.T. Parent, *App Receptor? To Be or Not to Be*. Trends Pharm Sci, 2016. **37**(5): p. 390.
29. Zheng, H. and E.H. Koo, *Biology and Pathophysiology of the Amyloid Precursor Protein*. Mol Neurodegener, 2011. **6**(1): p. 27.
30. Kent, S.A., T.L. Spires-Jones, and C.S. Durrant, *The Physiological Roles of Tau and A $\beta$ : Implications for Alzheimer's Disease Pathology and Therapeutics*. Acta Neuropathol, 2020. **140**(4): p. 417.
31. Chasseigneaux, S. and B. Allinquant, *Functions of A $\beta$ , Sapp $\alpha$  and Sapp $\beta$  : Similarities and Differences*. J Neurochem, 2012. **120**(s1): p. 99.
32. **Penke, B., F. Bogar, and L. Fulop, *Beta-Amyloid and the Pathomechanisms of Alzheimer's Disease: A Comprehensive View*. Molecules, 2017. 22(10).**
33. Kuhn, A.J. and J. Raskatov, *Is the P3 Peptide (A $\beta$ <sub>17-40</sub>, A $\beta$ <sub>17-42</sub>) Relevant to the Pathology of Alzheimer's Disease?* J Alzheimers Dis, 2020. **74**(1): p. 43.
34. Han, W., et al., *Peptide P3 May Play a Neuroprotective Role in the Brain*. Med Hypotheses, 2011. **76**(4): p. 543.
35. Naslund, J., et al., *The Metabolic Pathway Generating P3, an A $\beta$ -Peptide Fragment, Is Probably Non-Amyloidogenic*. Biochem Biophys Res Com, 1994. **204**(2): p. 780.
36. Coronel, R., et al., *Role of Amyloid Precursor Protein (App) and Its Derivatives in the Biology and Cell Fate Specification of Neural Stem Cells*. Mol Neurobiol, 2018. **55**(9): p. 7107.
37. Lalowski, M., et al., *The "Nonamyloidogenic" P3 Fragment (Amyloid B17-42) Is a Major Constituent of Down's Syndrome Cerebellar Preamyloid\**. J Biol Chem, 1996. **271**(52): p. 33623.
38. Jang, H., et al., *Truncated Beta-Amyloid Peptide Channels Provide an Alternative Mechanism for Alzheimer's Disease and Down Syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(14): p. 6538.
39. Willem, M., et al., *H-Secretase Processing of App Inhibits Neuronal Activity in the Hippocampus*. Nature, 2015. **526**(7573): p. 443.
40. Tharp, W.G. and I.N. Sarkar, *Origins of Amyloid-B*. BMC Genomics, 2013. **14**(1): p. 290.
41. Brothers, H.M., M.L. Gosztyla, and S.R. Robinson, *The Physiological Roles of Amyloid-B Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease*. Front Aging Neurosci, 2018. **10**.
42. Soscia, S.J., et al., *The Alzheimer's Disease-Associated Amyloid B-Protein Is an Antimicrobial Peptide*. PLOS ONE, 2010. **5**(3): p. e9505.
43. Wildburger, N.C., et al., *Diversity of Amyloid-Beta Proteoforms in the Alzheimer's Disease Brain*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 9520.
44. Frost, J.L., et al., *Pyroglutamate-3 Amyloid-B Deposition in the Brains of Humans, Non-Human Primates, Canines, and Alzheimer Disease-Like Transgenic Mouse Models*. Am J Pathol, 2013. **183**(2): p. 369.
45. Roche, J., et al., *Monomeric A $\beta$ <sub>1-40</sub> and A $\beta$ <sub>1-42</sub> Peptides in Solution Adopt Very Similar Ramachandran Map Distributions That Closely Resemble Random Coil*. Biochemistry, 2016. **55**(5): p. 762.
46. Condello, C. and J. Stöehr, *A $\beta$  Propagation and Strains: Implications for the Phenotypic Diversity in Alzheimer's Disease*. Neurobiol Dis, 2018. **109**: p. 191.
47. Sunde, M. and C. Blake, *The Structure of Amyloid Fibrils by Electron Microscopy and X-Ray Diffraction*, in *Adv Protein Chem*, F.M. Richards, D.S. Eisenberg, and P.S. Kim, Editors. 1997, Academic Press. p. 123.
48. Colvin, M.T., et al., *Atomic Resolution Structure of Monomorphic A $\beta$ <sub>42</sub> Amyloid Fibrils*. J Am Chem Soc, 2016. **138**(30): p. 9663.

49. Lu, J.-X., et al., *Molecular Structure of Beta-Amyloid Fibrils in Alzheimer's Disease Brain Tissue*. Cell, 2013. **154**(6): p. 1257.
50. Wälti, M.A., et al., *Atomic-Resolution Structure of a Disease-Relevant A $\beta$ (1–42) Amyloid Fibril*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(34): p. E4976.
51. **Penke, B., et al., *Key Peptides and Proteins in Alzheimer's Disease*. Curr Protein Pept Res, 2019. 20(6): p. 577.**
52. Lambert, M.P., et al., *Diffusible, Nonfibrillar Ligands Derived from A $\beta$ 1–42 Are Potent Central Nervous System Neurotoxins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6448.
53. Barghorn, S., et al., *Globular Amyloid Beta-Peptide Oligomer - a Homogenous and Stable Neuropathological Protein in Alzheimer's Disease*. J Neurochem, 2005. **95**(3): p. 834.
54. Lesné, S., et al., *A Specific Amyloid-B Protein Assembly in the Brain Impairs Memory*. Nature, 2006. **440**(7082): p. 352.
55. Walsh, D.M., et al., *Amyloid Beta-Protein Fibrillogenesis: Detection of a Protofibrillar Intermediate*. J Biol Chem, 1997. **272**(35): p. 22364.
56. Pickett, E.K., et al., *Non-Fibrillar Oligomeric Amyloid-B within Synapses*. J Alzheimers Dis, 2016. **53**: p. 787.
57. Gouras, G.K., et al., *Intraneuronal B-Amyloid Accumulation and Synapse Pathology in Alzheimer's Disease*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(5): p. 523.
58. Georganopoulou, D.G., et al., *Nanoparticle-Based Detection in Cerebral Spinal Fluid of a Soluble Pathogenic Biomarker for Alzheimer's Disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(7): p. 2273.
59. Lomont, J.P., et al., *Spectroscopic Signature for Stable B-Amyloid Fibrils Versus B-Sheet-Rich Oligomers*. J Phys Chem B, 2018. **122**(1): p. 144.
60. Cohen, S.I.A., et al., *Proliferation of Amyloid-B42 Aggregates Occurs through a Secondary Nucleation Mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(24): p. 9758.
61. Qiang, W., K. Kelley, and R. Tycko, *Polymorph-Specific Kinetics and Thermodynamics of B-Amyloid Fibril Growth*. J Am Chem Soc, 2013. **135**(18): p. 6860.
62. Viola, K.L. and W.L. Klein, *Amyloid B Oligomers in Alzheimer's Disease Pathogenesis, Treatment, and Diagnosis*. Acta Neuropathol, 2015. **129**(2): p. 183.
63. Gong, Y., et al., *Alzheimer's Disease-Affected Brain: Presence of Oligomeric A $\beta$  Ligands (Addls) Suggests a Molecular Basis for Reversible Memory Loss*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10417.
64. Walsh, D.M., et al., *Naturally Secreted Oligomers of Amyloid B Protein Potently Inhibit Hippocampal Long-Term Potentiation in Vivo*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 535.
65. Klyubin, I., et al., *Alzheimer's Disease A $\beta$  Assemblies Mediating Rapid Disruption of Synaptic Plasticity and Memory*. Mol Brain, 2012. **5**(1): p. 25.
66. Zarándi, M., et al., *Synthesis of A $\beta$ [1-42] and Its Derivatives with Improved Efficiency*. J Pept Sci, 2007. **13**(2): p. 94.
67. Hyde, C., et al., *Some 'Difficult Sequences' Made Easy. A Study of Interchain Association in Solid-Phase Peptide Synthesis*. Int J Pept Protein Res, 1994. **43**(5): p. 431.
68. Hendrix, J.C., et al., *A Novel Solvent System for Solid-Phase Synthesis of Protected Peptides: The Disaggregation of Resin-Bound Antiparallel  $\beta$ -Sheet*. J Org Chem, 1990. **55**(15): p. 4517.
69. Varanda, L.M. and M.T. Miranda, *Solid-Phase Peptide Synthesis at Elevated Temperatures: A Search for and Optimized Synthesis Condition of Unsulfated Cholecystinin-12*. J Pept Res, 1997. **50**(2): p. 102.
70. Kates, S.A., et al., *Optimized Preparation of Deca(L-Alanyl)-L-Valinamide by 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) Solid-Phase Synthesis on Polyethylene Glycol-Polystyrene (Peg-Ps) Graft Supports, with 1,8-Diazobicyclo [5.4.0]-Undec-7-Ene (Dbu) Deprotection*. Pept Res, 1996. **9**(3): p. 106.
71. Meldal, M., *Pega: A Flow Stable Polyethylene Glycol Dimethyl Acrylamide Copolymer for Solid Phase Synthesis*. Tetrahedron Lett, 1992. **33**(21): p. 3077.

72. Johnson, T., M. Quibell, and R.C. Sheppard, *N,O-Bisfmoc Derivatives of N-(2-Hydroxy-4-Methoxybenzyl)-Amino Acids: Useful Intermediates in Peptide Synthesis*. *J Pept Sci*, 1995. **1**(1): p. 11.
73. Clippingdale, A.B., et al., *Synthesis and Secondary Structural Studies of Penta(Acetyl-Hmb)a Beta(1-40)*. *J Pept Res*, 1999. **53**(6): p. 665.
74. Sohma, Y., et al., *Design and Synthesis of a Novel Water-Soluble A $\beta$ 1-42 Isopeptide: An Efficient Strategy for the Preparation of Alzheimer's Disease-Related Peptide, A $\beta$ 1-42, Via O-N Intramolecular Acyl Migration Reaction*. *Tetrahedron Lett*, 2004. **45**(31): p. 5965.
75. Carpino, L.A., et al., *Synthesis of 'Difficult' Peptide Sequences: Application of a Depsipeptide Technique to the Jung-Redemann 10- and 26-Mers and the Amyloid Peptide A $\beta$ (1-42)*. *Tetrahedron Lett*, 2004. **45**(40): p. 7519.
76. Dos Santos, S., et al., *Switch-Peptides: Controlling Self-Assembly of Amyloid B-Derived Peptides in Vitro by Consecutive Triggering of Acyl Migrations*. *J Am Chem Soc*, 2005. **127**(34): p. 11888.
77. Dettin, M., et al., *Spps of Difficult Sequences. A Comparison of Chemical Conditions, Synthetic Strategies and on-Line Monitoring*. *J Pept Res*, 1997. **49**(1): p. 103.
78. Larsen, B.D. and A. Holm, *Incomplete Fmoc Deprotection in Solid-Phase Synthesis of Peptides*. *Int J Pept Protein Res*, 1994. **43**(1): p. 1.
79. Coin, I., et al., *Depsipeptide Methodology for Solid-Phase Peptide Synthesis: Circumventing Side Reactions and Development of an Automated Technique Via Depsidipeptide Units*. *J Org Chem*, 2006. **71**(16): p. 6171.
80. Klement, K., et al., *Effect of Different Salt Ions on the Propensity of Aggregation and on the Structure of Alzheimer's A $\beta$ (1-40) Amyloid Fibrils*. *J Mol Biol*, 2007. **373**(5): p. 1321.
81. Baldwin, R.L., *How Hofmeister Ion Interactions Affect Protein Stability*. *Biophys J*, 1996. **71**(4): p. 2056.
82. Isaacs, A.M., et al., *Acceleration of Amyloid B-Peptide Aggregation by Physiological Concentrations of Calcium*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(38): p. 27916.
83. Ahmad, A., M. Muzaffar, and V.M. Ingram, *Ca<sup>2+</sup>, within the Physiological Concentrations, Selectively Accelerates A $\beta$ 42 Fibril Formation and Not A $\beta$ 40 in Vitro*. *Biochim Biophys Acta-Protein and Proteom*, 2009. **1794**(10): p. 1537.
84. Sanchez, C., et al., *Grasping at Molecular Interactions and Genetic Networks in Drosophila Melanogaster Using Flynets, an Internet Database*. *Nucl Ac Res*, 1999. **27**(1): p. 89.
85. **Fülöp, L., B. Penke, and M. Zarándi, Break up or Wrap? Therapeutic Possibilities for the Treatment of Alzheimer'S Disease by Altering the Aggregation of Beta-Amyloid Peptide, in Neuropeptides and Peptide Analogs, M. Kovács and I. Merchenthaler, Editors. 2009, Research Signpost p. 161.**
86. Tomiyama, T., et al., *Inhibition of Amyloid Beta Protein Aggregation and Neurotoxicity by Rifampicin. Its Possible Function as a Hydroxyl Radical Scavenger*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(12): p. 6839.
87. Cole, G.M., B. Teter, and S.A. Frautschy, *Neuroprotective Effects of Curcumin*. *Adv Exp Med Biol*, 2007. **595**: p. 197.
88. Tjernberg, L.O., et al., *Arrest of Beta-Amyloid Fibril Formation by a Pentapeptide Ligand*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(15): p. 8545.
89. Tjernberg, L.O., et al., *Controlling Amyloid Beta-Peptide Fibril Formation with Protease-Stable Ligands*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(19): p. 12601.
90. Pallitto, M.M., et al., *Recognition Sequence Design for Peptidyl Modulators of Beta-Amyloid Aggregation and Toxicity*. *Biochemistry*, 1999. **38**(12): p. 3570.
91. Gordon, D.J., R. Tappe, and S.C. Meredith, *Design and Characterization of a Membrane Permeable N-Methyl Amino Acid-Containing Peptide That Inhibits A $\beta$ 1-40 Fibrillogenesis*. *J Pept Res*, 2002. **60**(1): p. 37.
92. Chafekar, S.M., et al., *Branched Klvff Tetramers Strongly Potentiate Inhibition of Beta-Amyloid Aggregation*. *ChemBiochem*, 2007. **8**(15): p. 1857.

93. Soto, C., et al., *Inhibition of Alzheimer's Amyloidosis by Peptides That Prevent Beta-Sheet Conformation*. *Biochem Biophys Res Com*, 1996. **226**(3): p. 672.
94. Seebach, D. and J. Gardiner, *B-Peptidic Peptidomimetics*. *Acc Chem Res*, 2008. **41**(10): p. 1366.
95. Horne, W.S. and S.H. Gellman, *Foldamers with Heterogeneous Backbones*. *Acc Chem Res*, 2008. **41**(10): p. 1399.
96. Ross, N.T., W.P. Katt, and A.D. Hamilton, *Synthetic Mimetics of Protein Secondary Structure Domains*. *Phil Trans Series A, Math Phys Eng Sci*, 2010. **368**(1914): p. 989.
97. Goodman, C.M., et al., *Foldamers as Versatile Frameworks for the Design and Evolution of Function*. *Nat Chem Biol*, 2007. **3**(5): p. 252.
98. Martinek, T.A. and F. Fülöp, *Side-Chain Control of B-Peptide Secondary Structures*. *Eur J Biochem*, 2003. **270**(18): p. 3657.
99. King, G.D. and R. Scott Turner, *Adaptor Protein Interactions: Modulators of Amyloid Precursor Protein Metabolism and Alzheimer's Disease Risk?* *Exp Neurol*, 2004. **185**(2): p. 208.
100. Bukhari, H., et al., *Small Things Matter: Implications of App Intracellular Domain Aicd Nuclear Signaling in the Progression and Pathogenesis of Alzheimer's Disease*. *Prog Neurobiol*, 2017. **156**: p. 189.
101. McLoughlin, D.M. and C.C.J. Miller, *The Fe65 Proteins and Alzheimer's Disease*. *J Neurosci Res*, 2008. **86**(4): p. 744.
102. Santiard-Baron, D., et al., *Expression of Human Fe65 in Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice Is Associated with a Reduction in B-Amyloid Load*. *J Neurochem*, 2005. **93**(2): p. 330.
103. Sabo, S.L., et al., *The Alzheimer Amyloid Precursor Protein (App) and Fe65, an App-Binding Protein, Regulate Cell Movement*. *J Cell Biol*, 2001. **153**(7): p. 1403.
104. Shasta, L.S., et al., *The Amyloid Precursor Protein and Its Regulatory Protein, Fe65, in Growth Cones and Synapses in Vitro and in Vivo*. *J Neurosci*, 2003. **23**(13): p. 5407.
105. Tamayev, R., D. Zhou, and L. D'Adamio, *The Interactome of the Amyloid B Precursor Protein Family Members Is Shaped by Phosphorylation of Their Intracellular Domains*. *Mol Neurodegener*, 2009. **4**(1): p. 1.
106. Chang, Y., et al., *Generation of the Beta-Amyloid Peptide and the Amyloid Precursor Protein C-Terminal Fragment Gamma Are Potentiated by Fe65l1*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(51): p. 51100.
107. Guénette, S.Y., et al., *Hfe65l Influences Amyloid Precursor Protein Maturation and Secretion*. *J Neurochem*, 1999. **73**(3): p. 985.
108. Sabo, S.L., et al., *Regulation of Beta-Amyloid Secretion by Fe65, an Amyloid Protein Precursor-Binding Protein*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(12): p. 7952.
109. Tanahashi, H. and T. Tabira, *Characterization of an Amyloid Precursor Protein-Binding Protein Fe65l2 and Its Novel Isoforms Lacking Phosphotyrosine-Interaction Domains*. *Biochem J*, 2002. **367**(3): p. 687.
110. Xie, Z., et al., *Rna Interference Silencing of the Adaptor Molecules Shcc and Fe65 Differentially Affect Amyloid Precursor Protein Processing and Abeta Generation*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(7): p. 4318.
111. Suh, J., et al., *Fe65 Proteins Regulate Nmda Receptor Activation-Induced Amyloid Precursor Protein Processing*. *J Neurochem*, 2011. **119**(2): p. 377.
112. Guénette, S., et al., *Essential Roles for the Fe65 Amyloid Precursor Protein-Interacting Proteins in Brain Development*. *EMBO J*, 2006. **25**(2): p. 420.
113. Wang, B., et al., *Isoform-Specific Knockout of Fe65 Leads to Impaired Learning and Memory*. *J Neurosci Res*, 2004. **75**(1): p. 12.
114. Ando, K., et al., *Phosphorylation-Dependent Regulation of the Interaction of Amyloid Precursor Protein with Fe65 Affects the Production of Beta-Amyloid*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(43): p. 40353.
115. Macias, M.J., et al., *Structure of the Ww Domain of a Kinase-Associated Protein Complexed with a Proline-Rich Peptide*. *Nature*, 1996. **382**(6592): p. 646.

116. Sudol, M., K. Sliwa, and T. Russo, *Functions of Ww Domains in the Nucleus*. FEBS letters, 2001. **490**(3): p. 190.
117. Staub, O. and D. Rotin, *Ww Domains*. Structure, 1996. **4**(5): p. 495.
118. Sudol, M., et al., *Characterization of a Novel Protein-Binding Module—the Ww Domain*. FEBS letters, 1995. **369**(1): p. 67.
119. Kato, Y., et al., *Determinants of Ligand Specificity in Groups I and Iv Ww Domains as Studied by Surface Plasmon Resonance and Model Building*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10173.
120. Bórquez, D.A. and C. González-Billault, *The Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain-Fe65 Multiprotein Complexes: A Challenge to the Amyloid Hypothesis for Alzheimer's Disease?* Int J Alzheimers Dis, 2012. **2012**.
121. Masin, M., et al., *Fe65 Interacts with P2x2 Subunits at Excitatory Synapses and Modulates Receptor Function*. J Biol Chem, 2006. **281**(7): p. 4100.
122. Meiyappan, M., G. Birrane, and J.A. Ladias, *Structural Basis for Polyproline Recognition by the Fe65 Ww Domain*. J Mol Biol, 2007. **372**(4): p. 970.
123. Telese, F., et al., *Transcription Regulation by the Adaptor Protein Fe65 and the Nucleosome Assembly Factor Set*. EMBO Rep, 2005. **6**(1): p. 77.
124. Lambrechts, A., et al., *Camp-Dependent Protein Kinase Phosphorylation of Evl, a Mena/Vasp Relative, Regulates Its Interaction with Actin and Sh3 Domains*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 36143.
125. Ermekova, K.S., et al., *The Ww Domain of Neural Protein Fe65 Interacts with Proline-Rich Motifs in Mena, the Mammalian Homolog of Drosophilaenabled*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 32869.
126. Vargas, L., et al., *Amyloid-B Oligomers Synaptotoxicity: The Emerging Role of EphA4/C-Abl Signaling in Alzheimer's Disease*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018. **1864**(4): p. 1148.
127. Pastorino, L., et al., *The Prolyl Isomerase Pin1 Regulates Amyloid Precursor Protein Processing and Amyloid-B Production*. Nature, 2006. **440**(7083): p. 528.
128. Liou, Y.-C., et al., *Role of the Prolyl Isomerase Pin1 in Protecting against Age-Dependent Neurodegeneration*. Nature, 2003. **424**(6948): p. 556.
129. Eriksson, P.S., et al., *Neurogenesis in the Adult Human Hippocampus*. Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1313.
130. Kempermann, G., *Adult Neurogenesis: An Evolutionary Perspective*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. **8**(2).
131. Gage, F.H., *Adult Neurogenesis in Mammals*. Science, 2019. **364**(6443): p. 827.
132. Ma, D.K., et al., *Adult Neural Stem Cells in the Mammalian Central Nervous System*. Cell Res, 2009. **19**(6): p. 672.
133. Lledo, P.-M., M. Alonso, and M.S. Grubb, *Adult Neurogenesis and Functional Plasticity in Neuronal Circuits*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(3): p. 179.
134. Ge, S., et al., *Synaptic Integration and Plasticity of New Neurons in the Adult Hippocampus*. J Physiol, 2008. **586**(16): p. 3759.
135. Kuhn, H.G., H. Dickinson-Anson, and F.H. Gage, *Neurogenesis in the Dentate Gyrus of the Adult Rat: Age-Related Decrease of Neuronal Progenitor Proliferation*. J Neurosci, 1996. **16**(6): p. 2027.
136. Bruel-Jungerman, E., S. Davis, and S. Laroche, *Brain Plasticity Mechanisms and Memory: A Party of Four*. The Neuroscientist, 2007. **13**(5): p. 492.
137. Lazarov, O., et al., *When Neurogenesis Encounters Aging and Disease*. Trends Neurosci, 2010. **33**(12): p. 569.
138. Ming, G.L. and H. Song, *Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions*. Neuron, 2011. **70**(4): p. 687.
139. Shruster, A., E. Melamed, and D. Offen, *Neurogenesis in the Aged and Neurodegenerative Brain*. Apopt Int J Prog Cell Death, 2010. **15**(11): p. 1415.
140. Brett, A.S., et al., *Spatiotemporal Changes to the Subventricular Zone Stem Cell Pool through Aging*. J Neurosci, 2012. **32**(20): p. 6947.



141. Miranda, C.J., et al., *Aging Brain Microenvironment Decreases Hippocampal Neurogenesis through Wnt-Mediated Survivin Signaling*. *Aging Cell*, 2012. **11**(3): p. 542.
142. Demars, M.P., et al., *Soluble Amyloid Precursor Protein-A Rescues Age-Linked Decline in Neural Progenitor Cell Proliferation*. *Neurobiol Aging*, 2013. **34**(10): p. 2431.
143. Knoth, R., et al., *Murine Features of Neurogenesis in the Human Hippocampus across the Lifespan from 0 to 100 Years*. *PLOS ONE*, 2010. **5**(1): p. e8809.
144. Moreno-Jimenez, E.P., et al., *Adult Hippocampal Neurogenesis Is Abundant in Neurologically Healthy Subjects and Drops Sharply in Patients with Alzheimer's Disease*. *Nat Med*, 2019. **25**(4): p. 554.
145. Tobin, M.K., et al., *Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer's Disease Patients*. *Cell Stem Cell*, 2019. **24**(6): p. 974.
146. Coronel, R., et al., *Physiological Effects of Amyloid Precursor Protein and Its Derivatives on Neural Stem Cell Biology and Signaling Pathways Involved*. *Neural Regen Res*, 2019. **14**(10).
147. Scopa, C., et al., *Impaired Adult Neurogenesis Is an Early Event in Alzheimer's Disease Neurodegeneration, Mediated by Intracellular A $\beta$  Oligomers*. *Cell Death Diff*, 2020. **27**(3): p. 934.
148. Trazzi, S., et al., *App-Dependent up-Regulation of Ptch1 Underlies Proliferation Impairment of Neural Precursors in Down Syndrome*. *Human Mol Genet*, 2011. **20**(8): p. 1560.
149. Sarlak, G., et al., *Sox2 Functionally Interacts with Bapp, the Bapp Intracellular Domain and Adam10 at a Transcriptional Level in Human Cells*. *Neuroscience*, 2016. **312**: p. 153.
150. Ghosal, K., A. Stathopoulos, and S.W. Pimplikar, *App Intracellular Domain Impairs Adult Neurogenesis in Transgenic Mice by Inducing Neuroinflammation*. *PLOS ONE*, 2010. **5**(7): p. e11866.
151. Dukay, B., B. Csoboz, and M.E. Tóth, *Heat-Shock Proteins in Neuroinflammation*. *Front Pharm*, 2019. **10**: p. 920.
152. Kwon, H.S. and S.-H. Koh, *Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders: The Roles of Microglia and Astrocytes*. *Transl Neurodegen*, 2020. **9**: p. 1.
153. Tay, T.L., et al., *Microglia across the Lifespan: From Origin to Function in Brain Development, Plasticity and Cognition*. *J Physiol*, 2017. **595**(6): p. 1929.
154. Preman, P., et al., *Astrocytes in Alzheimer's Disease: Pathological Significance and Molecular Pathways*. *Cells*, 2021. **10**(3): p. 540.
155. Costa-Mattioli, M. and P. Walter, *The Integrated Stress Response: From Mechanism to Disease*. *Science*, 2020. **368**(6489).
156. Bond, S., et al., *The Integrated Stress Response and Phosphorylated Eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$  in Neurodegeneration*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2020. **79**(2): p. 123.
157. Oliveira, M.M., et al., *Correction of Eif2-Dependent Defects in Brain Protein Synthesis, Synaptic Plasticity, and Memory in Mouse Models of Alzheimer's Disease*. *Sci Signal*, 2021. **14**(668): p. eabc5429.
158. Moebius, F.F., et al., *High Affinity of Sigma1-Binding Sites for Sterol Isomerization Inhibitors: Evidence for a Pharmacological Relationship with the Yeast Sterol C8-C7 Isomerase*. *Br J Pharmacol*, 1997. **121**(1): p. 1.
159. Martin, W.R., et al., *The Effects of Morphine- and Nalorphine- Like Drugs in the Nondependent and Morphine-Dependent Chronic Spinal Dog*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1976. **197**(3): p. 517.
160. Vaupel, D.B., *Naltrexone Fails to Antagonize the  $\Sigma$  Effects of Pcp and Skf 10,047 in the Dog*. *Eur J Pharmacol*, 1983. **92**(3): p. 269.
161. Hellewell, S.B., et al., *Rat Liver and Kidney Contain High Densities of  $\Sigma$ 1 and  $\Sigma$ 2 Receptors: Characterization by Ligand Binding and Photoaffinity Labeling*. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol*, 1994. **268**(1): p. 9.
162. Bowen, W.D., S.B. Hellewell, and K.A. McGarry, *Evidence for a Multi-Site Model of the Rat Brain  $\Sigma$  Receptor*. *Eur J Pharmacol*, 1989. **163**(2): p. 309.

163. Pabba, M., *The Essential Roles of Protein–Protein Interaction in Sigma-1 Receptor Functions*. Front Cell Neurosci, 2013. **7**.
164. Hayashi, T., et al., *Targeting Ligand-Operated Chaperone Sigma-1 Receptors in the Treatment of Neuropsychiatric Disorders*. Exp Op Ther Targ, 2011. **15**(5): p. 557.
165. Hayashi, T. and T.-P. Su, *Sigma-1 Receptor Chaperones at the Er- Mitochondrion Interface Regulate Ca<sup>2+</sup> Signaling and Cell Survival*. Cell, 2007. **131**(3): p. 596.
166. Monnet, F.P., et al., *N-Methyl-D-Aspartate-Induced Neuronal Activation Is Selectively Modulated by Sigma Receptors*. Eur J Pharmacol, 1990. **179**(3): p. 441.
167. Pabba, M., et al., *Nmda Receptors Are Upregulated and Trafficked to the Plasma Membrane after Sigma-1 Receptor Activation in the Rat Hippocampus*. J Neurosci, 2014. **34**(34): p. 11325.
168. Fehér, Á., et al., *Association between a Variant of the Sigma-1 Receptor Gene and Alzheimer's Disease*. Neurosci Letters, 2012. **517**(2): p. 136.
169. Huang, Y., et al., *Genetic Polymorphisms in Sigma-1 Receptor and Apolipoprotein E Interact to Influence the Severity of Alzheimer's Disease*. Curr Alzheimer Res, 2011. **8**(7): p. 765.
170. Jansen, K.L., et al., *Loss of Sigma Binding Sites in the Ca1 Area of the Anterior Hippocampus in Alzheimer's Disease Correlates with Ca1 Pyramidal Cell Loss*. Brain Res, 1993. **623**(2): p. 299.
171. Mishina, M., et al., *Low Density of Sigma1 Receptors in Early Alzheimer's Disease*. Ann Nucl Med, 2008. **22**(3): p. 151.
172. Tsai, S.Y., et al., *Sigma-1 Receptors Regulate Hippocampal Dendritic Spine Formation Via a Free Radical-Sensitive Mechanism Involving Rac1xgtp Pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(52): p. 22468.
- 173. Penke, B., et al., *The Role of Sigma-1 Receptor, an Intracellular Chaperone in Neurodegenerative Diseases*. Curr Neuropharmacol, 2018. **16**(1): p. 97.**
174. Fontanilla, D., et al., *The Hallucinogen N,N-Dimethyltryptamine (Dmt) Is an Endogenous Sigma-1 Receptor Regulator*. Science, 2009. **323**(5916): p. 934.
175. Ryskamp, D., et al., *Pridopidine Stabilizes Mushroom Spines in Mouse Models of Alzheimer's Disease by Acting on the Sigma-1 Receptor*. Neurobiol Dis, 2019. **124**: p. 489.
176. Fisher, A., et al., *Af710b, a Novel M1/Σ1 Agonist with Therapeutic Efficacy in Animal Models of Alzheimer's Disease*. Neurodegener Dis, 2016. **16**(1-2): p. 95.
177. Lahmy, V., et al., *Blockade of Tau Hyperphosphorylation and Aβ<sub>1-42</sub> Generation by the Aminotetrahydrofuran Derivative Anavex2-73, a Mixed Muscarinic and Σ<sub>1</sub> Receptor Agonist, in a Nontransgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease*. Neuropsychopharmacology, 2013. **38**(9): p. 1706.
178. Hashimoto, K., *Repurposing of Cns Drugs to Treat Covid-19 Infection: Targeting the Sigma-1 Receptor*. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2021. **271**(2): p. 249.
179. Vela, J.M., *Repurposing Sigma-1 Receptor Ligands for Covid-19 Therapy?* Front Pharmacol, 2020. **11**: p. 582310.
180. Rosen, D.A., et al., *Modulation of the Sigma-1 Receptor–Ire1 Pathway Is Beneficial in Preclinical Models of Inflammation and Sepsis*. Sci Transl Med, 2019. **11**(478): p. eaau5266.
181. Omi, T., et al., *Fluvoxamine Alleviates Er Stress Via Induction of Sigma-1 Receptor*. Cell Death Dis, 2014. **5**(7): p. e1332.
182. Ruiz-Cantero, M.C., et al., *Sigma-1 Receptor: A Drug Target for the Modulation of Neuroimmune and Neuroglial Interactions During Chronic Pain*. Pharmacol Res, 2021. **163**: p. 105339.
183. Hanner, M., et al., *Purification, Molecular Cloning, and Expression of the Mammalian Sigma1-Binding Site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 8072.
184. Schmidt, H.R., et al., *Crystal Structure of the Human Σ1 Receptor*. Nature, 2016. **532**(7600): p. 527.
185. Glennon, R.A., et al., *Structural Features Important For. Sigma. 1 Receptor Binding*. J Med Chem, 1994. **37**(8): p. 1214.

186. Glennon, R., *Pharmacophore Identification for Sigma-1 (Sigma1) Receptor Binding: Application of the "Deconstruction-Reconstruction-Elaboration" Approach*. *Mini Rev Med Chem*, 2005. **5**(10): p. 927.
187. Pascual, R., et al., *A New Pharmacophore Model for the Design of Sigma-1 Ligands Validated on a Large Experimental Dataset*. *Front Pharmacol*, 2019. **10**: p. 519.
188. Schmidt, H.R., et al., *Structural Basis for  $\Sigma 1$  Receptor Ligand Recognition*. *Nat Struct Mol Biol*, 2018. **25**(10): p. 981.
189. Alexander, S.P., et al., *The Concise Guide to Pharmacology 2013/14: Overview*. *British J Pharm*, 2013. **170**(8): p. 1449.
190. Christ, M.G., A.M. Clement, and C. Behl, *The Sigma-1 Receptor at the Crossroad of Proteostasis, Neurodegeneration, and Autophagy*. *Trends Neurosci*, 2020. **43**(2): p. 79.
191. Rossino, G., et al., *Setup and Validation of a Reliable Docking Protocol for the Development of Neuroprotective Agents by Targeting the Sigma-1 Receptor (S1r)*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(20): p. 7708.
192. Sierra, A., et al., *Microglia Shape Adult Hippocampal Neurogenesis through Apoptosis-Coupled Phagocytosis*. *Cell Stem Cell*, 2010. **7**(4): p. 483.
193. Ekdahl, C.T., et al., *Inflammation Is Detrimental for Neurogenesis in Adult Brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(23): p. 13632.
194. Monje, M.L., H. Toda, and T.D. Palmer, *Inflammatory Blockade Restores Adult Hippocampal Neurogenesis*. *Science*, 2003. **302**(5651): p. 1760.
195. Belarbi, K., et al., *Chronic Neuroinflammation Impacts the Recruitment of Adult-Born Neurons into Behaviorally Relevant Hippocampal Networks*. *Brain Behav Immun*, 2012. **26**(1): p. 18.
196. Walton, N.M., et al., *Microglia Instruct Subventricular Zone Neurogenesis*. *Glia*, 2006. **54**(8): p. 815.
197. Kiyota, T., et al., *Aav Serotype 2/1-Mediated Gene Delivery of Anti-Inflammatory Interleukin-10 Enhances Neurogenesis and Cognitive Function in App+Ps1 Mice*. *Gene Ther*, 2012. **19**(7): p. 724.
198. Bowen, D.M., et al., *Neurotransmitter-Related Enzymes and Indices of Hypoxia in Senile Dementia and Other Abiotrophies*. *Brain*, 1976. **99**(3): p. 459.
199. Whitehouse, P.J., et al., *Alzheimer Disease: Evidence for Selective Loss of Cholinergic Neurons in the Nucleus Basalis*. *Ann Neurol*, 1981. **10**(2): p. 122.
200. Doody, R.S., *Current Treatments for Alzheimer's Disease: Cholinesterase Inhibitors*. *J Clin Psychiatry*, 2003. **64 Suppl 9**: p. 11.
201. Mukrasch, M.D., et al., *Structural Polymorphism of 441-Residue Tau at Single Residue Resolution*. *PLOS Biology*, 2009. **7**(2): p. e1000034.
202. Mandelkow, E.M. and E. Mandelkow, *Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(7): p. a006247.
203. Noble, W., et al., *The Importance of Tau Phosphorylation for Neurodegenerative Diseases*. *Front Neurol*, 2013. **4**: p. 83.
204. Crowther, R.A., *Straight and Paired Helical Filaments in Alzheimer Disease Have a Common Structural Unit*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(6): p. 2288.
205. Fitzpatrick, A.W.P., et al., *Cryo-Em Structures of Tau Filaments from Alzheimer's Disease*. *Nature*, 2017. **547**(7662): p. 185.
206. Pérez, M.J., C. Jara, and R.A. Quintanilla, *Contribution of Tau Pathology to Mitochondrial Impairment in Neurodegeneration*. *Front Neurosci*, 2018. **12**.
207. Grimm, M.O.W., D.M. Michaelson, and T. Hartmann, *Omega-3 Fatty Acids, Lipids, and Apoe Lipidation in Alzheimer's Disease: A Rationale for Multi-Nutrient Dementia Prevention: Thematic Review Series: Apoe and Lipid Homeostasis in Alzheimer's Disease*. *J Lipid Res*, 2017. **58**(11): p. 2083.
208. Grimm, M.O.W., et al., *App Function and Lipids: A Bidirectional Link*. *Front Mol Neurosci*, 2017. **10**.

209. Corder, E.H., et al., *Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families*. Science, 1993. **261**(5123): p. 921.
210. Sadigh-Eteghad, S., M. Talebi, and M. Farhoudi, *Association of Apolipoprotein E Epsilon 4 Allele with Sporadic Late Onset Alzheimer's Disease. A Meta-Analysis*. Neurosciences (Riyadh), 2012. **17**(4): p. 321.
211. Hauser, P.S. and R.O. Ryan, *Impact of Apolipoprotein E on Alzheimer's Disease*. Curr Alzheimer Res, 2013. **10**(8): p. 809.
212. Brandon, J.A., et al., *ApoE and Alzheimer's Disease: Neuroimaging of Metabolic and Cerebrovascular Dysfunction*. Front Aging Neurosci, 2018. **10**: p. 180.
213. Wolf, A.B., et al., *ApoE and Neuroenergetics: An Emerging Paradigm in Alzheimer's Disease*. Neurobiol Aging, 2013. **34**(4): p. 1007.
214. Holtzman, D.M., J. Herz, and G. Bu, *Apolipoprotein E and Apolipoprotein E Receptors: Normal Biology and Roles in Alzheimer Disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(3).
215. Harris, B., I. Pereira, and E. Parkin, *Targeting Adam10 to Lipid Rafts in Neuroblastoma Sh-Sy5y Cells Impairs Amyloidogenic Processing of the Amyloid Precursor Protein*. Brain Res, 2009. **1296**: p. 203.
216. Alata, W., et al., *Human Apolipoprotein E E4 Expression Impairs Cerebral Vascularization and Blood-Brain Barrier Function in Mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2015. **35**(1): p. 86.
217. Bell, R.D., et al., *Apolipoprotein E Controls Cerebrovascular Integrity Via Cyclophilin A*. Nature, 2012. **485**(7399): p. 512.
218. He, X., et al., *Deregulation of Sphingolipid Metabolism in Alzheimer's Disease*. Neurobiol Aging, 2010. **31**(3): p. 398.
219. Grimm, M.O., et al., *Intracellular App Domain Regulates Serine-Palmitoyl-Coa Transferase Expression and Is Affected in Alzheimer's Disease*. Int J Alzheimers Dis, 2011. **2011**: p. 695413.
220. Zlokovic, B.V., *Clearing Amyloid through the Blood-Brain Barrier*. J Neurochem, 2004. **89**(4): p. 807.
221. Di Marco, L.Y., et al., *Vascular Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease — a Review of Endothelium-Mediated Mechanisms and Ensuing Vicious Circles*. Neurobiol Dis, 2015. **82**: p. 593.
222. de la Torre, J.C., *Vascular Risk Factor Detection and Control May Prevent Alzheimer's Disease*. Aging Res Rew, 2010. **9**(3): p. 218.
223. Zenaro, E., G. Piacentino, and G. Constantin, *The Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease*. Neurobiol Dis, 2017. **107**: p. 41.
224. Salminen, A., A. Kauppinen, and K. Kaarniranta, *Hypoxia/Ischemia Activate Processing of Amyloid Precursor Protein: Impact of Vascular Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease*. J Neurochem, 2017. **140**(4): p. 536.
225. Banks, W.A., *From Blood-Brain Barrier to Blood-Brain Interface: New Opportunities for Cns Drug Delivery*. Nat Rev Drug Disc, 2016. **15**(4): p. 275.
226. Alafuzoff, I., et al., *Blood-Brain Barrier in Alzheimer Dementia and in Non-Demented Elderly. An Immunocytochemical Study*. Acta Neuropathol, 1987. **73**(2): p. 160.
227. Banks, W.A., et al., *Impairments in Brain-to-Blood Transport of Amyloid-B and Reabsorption of Cerebrospinal Fluid in an Animal Model of Alzheimer's Disease Are Reversed by Antisense Directed against Amyloid-B Protein Precursor*. J Alzheimers Dis, 2011. **23**(4): p. 599.
228. Kress, B.T., et al., *Impairment of Paravascular Clearance Pathways in the Aging Brain*. Ann Neurol, 2014. **76**(6): p. 845.
229. Zlokovic, B.V., *Neurovascular Mechanisms of Alzheimer's Neurodegeneration*. Trends Neurosci, 2005. **28**(4): p. 202.
230. Silverberg, G.D., et al., *Amyloid Efflux Transporter Expression at the Blood-Brain Barrier Declines in Normal Aging*. J Neuropathol Exp Neurol, 2010. **69**(10): p. 1034.
231. Wijesuriya, H.C., et al., *Abc Efflux Transporters in Brain Vasculature of Alzheimer's Subjects*. Brain Res, 2010. **1358**: p. 228.

232. Craft, S., et al., *Cerebrospinal Fluid and Plasma Insulin Levels in Alzheimer's Disease: Relationship to Severity of Dementia and Apolipoprotein E Genotype*. *Neurology*, 1998. **50**(1): p. 164.
233. Talbot, K., et al., *Demonstrated Brain Insulin Resistance in Alzheimer's Disease Patients Is Associated with Igf-1 Resistance, Irs-1 Dysregulation, and Cognitive Decline*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(4): p. 1316.
234. Alves, F., P. Kalinowski, and S. Ayton, *Accelerated Brain Volume Loss Caused by Anti-B-Amyloid Drugs: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Neurology*, 2023. **100**(20): p. e2114.
235. Miller, B.W., K.C. Willett, and A.R. Desilets, *Rosiglitazone and Pioglitazone for the Treatment of Alzheimer's Disease*. *Ann Pharmacother*, 2011. **45**(11): p. 1416.
236. Doody, R.S., et al., *A Phase 3 Trial of Semagacestat for Treatment of Alzheimer's Disease*. *N Engl J Med*, 2013. **369**(4): p. 341.
237. Doody, R.S., et al., *Peripheral and Central Effects of  $\Gamma$ -Secretase Inhibition by Semagacestat in Alzheimer's Disease*. *Alzheimer's Res Ther*, 2015. **7**(1): p. 36.
238. Barão, S., et al., *Bace1 Physiological Functions May Limit Its Use as Therapeutic Target for Alzheimer's Disease*. *Trends Neurosci*, 2016. **39**(3): p. 158.
239. Zhang, X., et al., *The  $\Gamma$ -Secretase Complex: From Structure to Function*. *Front Cell Neurosci*, 2014. **8**: p. 427.
240. Gillman, K.W., et al., *Discovery and Evaluation of Bms-708163, a Potent, Selective and Orally Bioavailable  $\Gamma$ -Secretase Inhibitor*. *ACS Med Chem Lett*, 2010. **1**(3): p. 120.
241. Coric, V., et al., *Targeting Prodromal Alzheimer Disease with Avagacestat: A Randomized Clinical Trial*. *JAMA Neurol*, 2015. **72**(11): p. 1324.
242. Weggen, S., et al., *A Subset of Nsaids Lower Amyloidogenic Abeta42 Independently of Cyclooxygenase Activity*. *Nature*, 2001. **414**(6860): p. 212.
243. Green, R.C., et al., *Effect of Tarenflurbil on Cognitive Decline and Activities of Daily Living in Patients with Mild Alzheimer Disease: A Randomized Controlled Trial*. *Jama*, 2009. **302**(23): p. 2557.
244. Salloway, S., et al., *A Phase 2 Multiple Ascending Dose Trial of Bapineuzumab in Mild to Moderate Alzheimer Disease*. *Neurology*, 2009. **73**(24): p. 2061.
245. Salloway, S., et al., *Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease*. *N Engl J Med*, 2014. **370**(4): p. 322.
246. Farlow, M., et al., *Safety and Biomarker Effects of Solanezumab in Patients with Alzheimer's Disease*. *Alzheimers Dement*, 2012. **8**(4): p. 261.
247. Doody, R.S., et al., *Phase 3 Trials of Solanezumab for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease*. *N Engl J Med*, 2014. **370**(4): p. 311.
248. Siemers, E.R., et al., *Phase 3 Solanezumab Trials: Secondary Outcomes in Mild Alzheimer's Disease Patients*. *Alzheimers Dement*, 2016. **12**(2): p. 110.
249. Honig, L.S., et al., *Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease*. *N Engl J Med*, 2018. **378**(4): p. 321.
250. Hardy, J. and B. De Strooper, *Alzheimer's Disease: Where Next for Anti-Amyloid Therapies?* *Brain*, 2017. **140**(4): p. 853.
251. Brockmann, R., et al., *Impacts of Fda Approval and Medicare Restriction on Antiamyloid Therapies for Alzheimer's Disease: Patient Outcomes, Healthcare Costs, and Drug Development*. *Lancet Reg Health Am*, 2023. **20**: p. 100467.
252. Shcherbinin, S., et al., *Association of Amyloid Reduction after Donanemab Treatment with Tau Pathology and Clinical Outcomes: The Trailblazer-Alz Randomized Clinical Trial*. *JAMA Neurol*, 2022. **79**(10): p. 1015.
253. Imbimbo, B.P., *An Update on the Efficacy of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Alzheimer's Disease*. *Exp Op Invest Drugs*, 2009. **18**(8): p. 1147.
254. Bronzuoli, M.R., et al., *Targeting Neuroinflammation in Alzheimer's Disease*. *J Inflamm Res*, 2016. **9**: p. 199.

255. Ardura-Fabregat, A., et al., *Targeting Neuroinflammation to Treat Alzheimer's Disease*. CNS Drugs, 2017. **31**(12): p. 1057.
256. Ali, M.M., et al., *Recommendations for Anti-Inflammatory Treatments in Alzheimer's Disease: A Comprehensive Review of the Literature*. Cureus, 2019. **11**(5): p. e4620.
257. Kaduševičius, E., *Novel Applications of Nsaids: Insight and Future Perspectives in Cardiovascular, Neurodegenerative, Diabetes and Cancer Disease Therapy*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(12): p. 6637.
258. Villard, V., et al., *Anti-Amnesic and Neuroprotective Potentials of the Mixed Muscarinic Receptor/Sigma1 ( $\Sigma$ 1) Ligand Anavex2-73, a Novel Aminotetrahydrofuran Derivative*. J Psychopharmacol, 2010. **25**(8): p. 1101.
259. Sheline, Y.I., et al., *An Antidepressant Decreases Csf A $\beta$  Production in Healthy Individuals and in Transgenic Ad Mice*. Sci Transl Med, 2014. **6**(236): p. 236re4.
260. Cummings, J.L., et al., *Effect of Dextromethorphan-Quinidine on Agitation in Patients with Alzheimer Disease Dementia: A Randomized Clinical Trial*. Jama, 2015. **314**(12): p. 1242.
261. Maurice, T., et al., *Interaction with Sigma(1) Protein, but Not N-Methyl-D-Aspartate Receptor, Is Involved in the Pharmacological Activity of Donepezil*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **317**(2): p. 606.
262. Meunier, J., J. Ieni, and T. Maurice, *The Anti-Amnesic and Neuroprotective Effects of Donepezil against Amyloid Beta25-35 Peptide-Induced Toxicity in Mice Involve an Interaction with the Sigma1 Receptor*. Br J Pharmacol, 2006. **149**(8): p. 998.
263. Peeters, M., et al., *Involvement of the Sigma 1 Receptor in the Modulation of Dopaminergic Transmission by Amantadine*. Eur J Neurosci, 2004. **19**(8): p. 2212.
264. Maurice, T., *Protection by Sigma-1 Receptor Agonists Is Synergic with Donepezil, but Not with Memantine, in a Mouse Model of Amyloid-Induced Memory Impairments*. Behav Brain Res, 2016. **296**: p. 270.
265. Ahmed, I.S., C. Chamberlain, and R.J. Craven, *S2r(Pgrmc1): The Cytochrome-Related Sigma-2 Receptor That Regulates Lipid and Drug Metabolism and Hormone Signaling*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2012. **8**(3): p. 361.
266. Karlsson, M., et al., *A Single-Cell Type Transcriptomics Map of Human Tissues*. Sci Advances, 2021. **7**(31): p. eabh2169.
267. Lizama, B.N., et al., *Sigma-2 Receptors—From Basic Biology to Therapeutic Target: A Focus on Age-Related Degenerative Diseases*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(7): p. 6251.
268. Rishton, G.M., et al., *Discovery of Investigational Drug Ct1812, an Antagonist of the Sigma-2 Receptor Complex for Alzheimer's Disease*. ACS Med Chem Lett, 2021. **12**(9): p. 1389.
269. **Dvoráckó, S., et al., Novel High Affinity Sigma-1 Receptor Ligands from Minimal Ensemble Docking-Based Virtual Screening**. Int J Mol Sci, 2021. **22**(15): p. 8112.
270. LeVine, H., 3rd, *Stopped-Flow Kinetics Reveal Multiple Phases of Thioflavin T Binding to Alzheimer Beta (1-40) Amyloid Fibrils*. Arch Biochem Biophys, 1997. **342**(2): p. 306.
271. Liliom, K., et al., *Quantitative Evaluation of Indirect Elisa Effect of Calmodulin Antagonists on Antibody Binding to Calmodulin*. J Immun Met, 1991. **143**(1): p. 119.
272. Langstrom, N.S., et al., *Alzheimer's Disease-Associated Reduction of Polysomal Mrna Translation*. Mol Brain Res, 1989. **5**(4): p. 259.
273. Fontanilla, D., et al., *Probing the Steroid Binding Domain-Like I (Sbdli) of the Sigma-1 Receptor Binding Site Using N-Substituted Photoaffinity Labels*. Biochemistry, 2008. **47**(27): p. 7205.
274. de Costa, B.R., et al., *Synthesis and Evaluation of Optically Pure [3h]-(+)-Pentazocine, a Highly Potent and Selective Radioligand for  $\Sigma$  Receptors*. FEBS Lett, 1989. **251**(1-2): p. 53.
275. Ramachandran, S., et al., *Purification and Characterization of the Guinea Pig Sigma-1 Receptor Functionally Expressed in Escherichia Coli*. Protein Exp Purif, 2007. **51**(2): p. 283.
276. Chu, U.B. and A.E. Ruoho, *Sigma Receptor Binding Assays*. Curr Prot Pharmacol, 2015. **71**(1): p. 1.34.1.
277. Fishback, J.A., et al., *A 96-Well Filtration Method for Radioligand Binding Analysis of  $\Sigma$  Receptor Ligands*. J Pharm Biomed Anal, 2012. **71**: p. 157.

278. Gebreselassie, D. and W.D. Bowen, *Sigma-2 Receptors Are Specifically Localized to Lipid Rafts in Rat Liver Membranes*. Eur J Pharmacol, 2004. **493**(1): p. 19.
279. Mozes, E., et al., *A Novel Method for the Rapid Determination of Beta-Amyloid Toxicity on Acute Hippocampal Slices Using Mtt and Ldh Assays*. Brain Res Bull, 2012. **87**(6): p. 521.
280. Kiss, L., et al., *Kinetic Analysis of the Toxicity of Pharmaceutical Excipients Cremophor El and Rh40 on Endothelial and Epithelial Cells*. J Pharm Sci, 2013. **102**(4): p. 1173.
281. Hukushima, K. and K. Nemoto, *Exchange Monte Carlo Method and Application to Spin Glass Simulations*. J Phys Soc Japan, 1996. **65**(6): p. 1604.
282. Sugita, Y. and Y. Okamoto, *Replica-Exchange Molecular Dynamics Method for Protein Folding*. Chem Phys Lett, 1999. **314**(1): p. 141.
283. Duan, Y., et al., *A Point-Charge Force Field for Molecular Mechanics Simulations of Proteins Based on Condensed-Phase Quantum Mechanical Calculations*. J Comp Chem, 2003. **24**(16): p. 1999.
284. Wang, J., et al., *Development and Testing of a General Amber Force Field*. J Comp Chem, 2004. **25**(9): p. 1157.
285. Bayly, C.I., et al., *A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The Resp Model*. J Phys Chem B, 1993. **97**(40): p. 10269.
286. Nagy, G. and C. Oostenbrink, *Dihedral-Based Segment Identification and Classification of Biopolymers I: Proteins*. J Chem Inf Model, 2014. **54**(1): p. 266.
287. Liu, T., et al., *Bindingdb: A Web-Accessible Database of Experimentally Determined Protein-Ligand Binding Affinities*. Nucl Acids Res, 2007. **35**(Database issue): p. D198.
288. Mysinger, M.M., et al., *Directory of Useful Decoys, Enhanced (Dud-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking*. J Med Chem, 2012. **55**(14): p. 6582.
289. *Schrödinger Release 2019-4*. 2019, Schrödinger LLC: New York, NY, USA.
290. Roos, K., et al., *Opls3e: Extending Force Field Coverage for Drug-Like Small Molecules*. J Chem Theor Comp, 2019. **15**(3): p. 1863.
291. Truchon, J.-F. and C.I. Bayly, *Evaluating Virtual Screening Methods: Good and Bad Metrics for the "Early Recognition" Problem*. J Chem Inf Model, 2007. **47**(2): p. 488.
292. Shemer, I., et al., *Non-Fibrillar Beta-Amyloid Abates Spike-Timing-Dependent Synaptic Potentiation at Excitatory Synapses in Layer 2/3 of the Neocortex by Targeting Postsynaptic Ampa Receptors*. Eur J Neurosci, 2006. **23**(8): p. 2035.
293. Szegedi, V., et al., *Endomorphin-2, an Endogenous Tetrapeptide, Protects against Abeta1-42 in Vitro and in Vivo*. Faseb J, 2006. **20**(8): p. 1191.
294. Verdier, Y., et al., *Characterization of the Interaction between Abeta 1-42 and Glyceraldehyde Phosphodehydrogenase*. J Pept Sci, 2008. **14**(6): p. 755.
295. Deli, M.A., et al., *Protection of the Blood-Brain Barrier by Pentosan against Amyloid-B-Induced Toxicity*. J Alzheimers Dis, 2010. **22**(3): p. 777.
296. Juhász, G.J., et al., *Fibrillar Abeta (1-42) Enhances Nmda Receptor Sensitivity Via the Integrin Signaling Pathway*. J Alzheimers Dis, 2010. **19**(3): p. 1055.
- 297. Minkeviciene, R., et al., Amyloid Beta-Induced Neuronal Hyperexcitability Triggers Progressive Epilepsy. J Neurosci, 2009. 29(11): p. 3453.**
298. Laskay, G., et al., *A Putative Tetrapeptide Antagonist Prevents Beta-Amyloid-Induced Long-Term Elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in Rat Astrocytes*. Biomed Biophys Res Comm, 1997. **235**(3): p. 479.
299. Fülöp, L., *Aggregation Studies, Design and Synthesis of Amyloid Aggregation Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease*, in Department of Medical Chemistry. 2005, University of Szeged: Szeged. p. 61.
300. Del Vecchio, R.A., et al., *Increased Seizure Threshold and Severity in Young Transgenic Crnd8 Mice*. Neurosci Lett, 2004. **367**(2): p. 164.
- 301. Bozso, Z., et al., Controlled in Situ Preparation of Aβ(1–42) Oligomers from the Isopeptide "Iso-Aβ(1–42)", Physicochemical and Biological Characterization. Peptides, 2010. 31(2): p. 248.**

302. Kasza, Á., et al., *Studies for Improving a Rat Model of Alzheimer's Disease: Icv Administration of Well-Characterized B-Amyloid 1-42 Oligomers Induce Dysfunction in Spatial Memory*. *Molecules*, 2017. 22(11): p. 2007.
303. Borbély, E., et al., *Simultaneous Changes of Spatial Memory and Spine Density after Intrahippocampal Administration of Fibrillar A $\beta$ <sub>1-42</sub> to the Rat Brain*. *BioMed Res Int*, 2014. 2014: p. 345305.
304. Bogár, F., et al., *Opposite Effect of Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> Ions on the Aggregation of Native and Precursor-Derived A $\beta$ 42*. *Struct Chem*, 2015. 26(5): p. 1389.
305. Sciarretta, K.L., et al., *A $\beta$ 40-Lactam (D23/K28) Models a Conformation Highly Favorable for Nucleation of Amyloid*. *Biochemistry*, 2005. 44(16): p. 6003.
306. Virok, D.P., et al., *Protein Array Based Interactome Analysis of Amyloid-B Indicates an Inhibition of Protein Translation*. *J Proteome Res*, 2011. 10(4): p. 1538.
307. Robledo, S., et al., *The Role of Human Ribosomal Proteins in the Maturation of Rna and Ribosome Production*. *Rna*, 2008. 14(9): p. 1918.
308. Takeuchi, N., T. Ueda, and K. Watanabe, *Expression and Characterization of Bovine Mitochondrial Methionyl-Trna Transformylase*. *J Biochem*, 1998. 124(6): p. 1069.
309. DiMauro, S., *Mitochondrial Diseases*. *Biochim Biophys Acta -Bioenergetics*, 2004. 1658(1-2): p. 80.
310. Szegedi, V., et al., *Pentapeptides Derived from Abeta 1-42 Protect Neurons from the Modulatory Effect of Abeta Fibrils--an in Vitro and in Vivo Electrophysiological Study*. *Neurobiol Dis*, 2005. 18(3): p. 499.
311. Fülöp, L., et al. *Peptides and Peptidomimetics for the Therapy of Neurodegenerative Diseases and Use Thereof*. 2014. P1400207/16 U.o. Szeged, [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).
312. Hetényi, A., et al., *Ligand-Induced Flocculation of Neurotoxic Fibrillar Abeta(1-42) by Noncovalent Crosslinking*. *Chembiochem*, 2008. 9(5): p. 748.
313. Fülöp, L., et al., *A Foldamer-Dendrimer Conjugate Neutralizes Synaptotoxic B-Amyloid Oligomers*. *PLOS ONE*, 2012. 7(7): p. e39485.
314. Mándity, I.M., et al., *Design of Peptidic Foldamer Helices: A Stereochemical Patterning Approach*. *Angew Chem Intl Ed Eng*, 2009. 48(12): p. 2171.
315. Reinke, A.A. and J.E. Gestwicki, *Insight into Amyloid Structure Using Chemical Probes*. *Chem Biol Drug Des*, 2011. 77(6): p. 399.
316. Reinke, A.A., et al., *Chemical Probes That Selectively Recognize the Earliest Abeta Oligomers in Complex Mixtures*. *J Am Chem Soc*, 2010. 132(50): p. 17655.
317. Olajos, G., et al., *Multivalent Foldamer-Based Affinity Assay for Selective Recognition of A $\beta$  Oligomers*. *Anal Chim Acta*, 2017. 960: p. 131.
318. Bartus, É., et al., *Structural Optimization of Foldamer-Dendrimer Conjugates as Multivalent Agents against the Toxic Effects of Amyloid Beta Oligomers*. *Molecules*, 2018. 23(10): p. 2523.
319. Li, L., I. Vorobyov, and T.W. Allen, *The Different Interactions of Lysine and Arginine Side Chains with Lipid Membranes*. *J Phys Chem B*, 2013. 117(40): p. 11906.
320. Blennow, K. and H. Hampel, *Csf Markers for Incipient Alzheimer's Disease*. *Lancet Neurol*, 2003. 2(10): p. 605.
321. Le Bastard, N., et al., *Comparison of Two Analytical Platforms for the Clinical Qualification of Alzheimer's Disease Biomarkers in Pathologically-Confirmed Dementia*. *J Alzheimers Dis*, 2013. 33(1): p. 117.
322. Carulla, N., et al., *Structure and Intermolecular Dynamics of Aggregates Populated During Amyloid Fibril Formation Studied by Hydrogen/Deuterium Exchange*. *Acc Chem Res*, 2010. 43(8): p. 1072.
323. Verdier, Y., et al., *Identification of Synaptic Plasma Membrane Proteins Co-Precipitated with Fibrillar Beta-Amyloid Peptide*. *J Neurochem*, 2005. 94(3): p. 617.



324. Henikoff, S. and J.G. Henikoff, *Performance Evaluation of Amino Acid Substitution Matrices*. Proteins, 1993. **17**(1): p. 49.
325. Fülöp, L., et al. **Small Peptide Inhibitors of Beta-Amyloid Toxicity**. 2014. P1600222/30 U.o. Szeged, [https://www.sztnh.gov.hu/sites/default/files/kiadv/szkv/201706b-pdf/B\\_02\\_Szab\\_kozzetetel\\_12\\_1706.pdf](https://www.sztnh.gov.hu/sites/default/files/kiadv/szkv/201706b-pdf/B_02_Szab_kozzetetel_12_1706.pdf).
326. Sudol, M. and T. Hunter, *New Wrinkles for an Old Domain*. Cell, 2000. **103**(7): p. 1001.
327. Szögi, T., et al., **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**. Int J Mol Sci, 2019. **20**(12): p. 3050.
328. Shankar, G.M., et al., *Amyloid-Beta Protein Dimers Isolated Directly from Alzheimer's Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory*. Nat Med, 2008. **14**(8): p. 837.
329. Mucke, L., et al., *High-Level Neuronal Expression of Abeta 1-42 in Wild-Type Human Amyloid Protein Precursor Transgenic Mice: Synaptotoxicity without Plaque Formation*. J Neurosci, 2000. **20**(11): p. 4050.
330. Delatour, B., et al., *Fe65 in Alzheimer's Disease: Neuronal Distribution and Association with Neurofibrillary Tangles*. Am J Pathol, 2001. **158**(5): p. 1585.
331. Lee, M.S., et al., *App Processing Is Regulated by Cytoplasmic Phosphorylation*. J Cell Biol, 2003. **163**(1): p. 83.
332. Cao, X. and T.C. Südhof, *Dissection of Amyloid-Beta Precursor Protein-Dependent Transcriptional Transactivation*. J Biol Chem, 2004. **279**(23): p. 24601.
333. Feilen, L.P., et al., *Fe65-Ptb2 Dimerization Mimics Fe65-App Interaction*. Front Mol Neurosci, 2017. **10**: p. 140.
334. Szögi, T., et al., **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**. Int J Mol Sci, 2022. **23**(18).
335. Demars, M., et al., *Impaired Neurogenesis Is an Early Event in the Etiology of Familial Alzheimer's Disease in Transgenic Mice*. J Neurosci Res, 2010. **88**(10): p. 2103.
336. Liu, L., et al., *Multiple Inflammatory Profiles of Microglia and Altered Neuroimages in App/Ps1 Transgenic Ad Mice*. Brain Res Bull, 2020. **156**: p. 86.
337. Hamilton, A. and C. Holscher, *The Effect of Ageing on Neurogenesis and Oxidative Stress in the App(Swe)/Ps1(Deltae9) Mouse Model of Alzheimer's Disease*. Brain Res, 2012. **1449**: p. 83.
338. Unger, M.S., et al., *Early Changes in Hippocampal Neurogenesis in Transgenic Mouse Models for Alzheimer's Disease*. Mol Neurobiol, 2016. **53**(8): p. 5796.
339. Taniuchi, N., et al., *Decreased Proliferation of Hippocampal Progenitor Cells in Appsw/Ps1de9 Transgenic Mice*. NeuroReport, 2007. **18**(17).
340. Niidome, T., et al., *Differential Regulation of Neurogenesis in Two Neurogenic Regions of Appsw/Ps1de9 Transgenic Mice*. NeuroReport, 2008. **19**(14).
341. Zhang, J., et al., *Long-Term Treadmill Exercise Attenuates A $\beta$  Burdens and Astrocyte Activation in App/Ps1 Mouse Model of Alzheimer's Disease*. Neurosci Lett, 2018. **666**: p. 70.
342. Suzanne, E.H., K.A. Elizabeth, and K. Joseph El, *Microglial Dysfunction and Defective B-Amyloid Clearance Pathways in Aging Alzheimer's Disease Mice*. J Neurosci, 2008. **28**(33): p. 8354.
343. Llorens-Martín, M. and J.L. Trejo, *Multiple Birthdating Analyses in Adult Neurogenesis: A Line-up of the Usual Suspects*. Front Neurosci, 2011. **5**.
344. Wojtowicz, J.M. and N. Kee, *BrdU Assay for Neurogenesis in Rodents*. Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1399.
345. Kuipers, S.D., J.E. Schroeder, and A. Trentani, *Changes in Hippocampal Neurogenesis Throughout Early Development*. Neurobiol Aging, 2015. **36**(1): p. 365.
346. He, J. and F.T. Crews, *Neurogenesis Decreases During Brain Maturation from Adolescence to Adulthood*. Pharm Biochem Behav, 2007. **86**(2): p. 327.

347. Zhang, X.M., et al., *Beta-Secretase-1 Elevation in Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease Is Associated with Synaptic/Axonal Pathology and Amyloidogenesis: Implications for Neuritic Plaque Development*. Eur J Neurosci, 2009. **30**(12): p. 2271.
348. Li, L., et al., *Dhea Prevents Aβ<sub>25–35</sub>-Impaired Survival of Newborn Neurons in the Dentate Gyrus through a Modulation of Pi3k-Akt-Mtor Signaling*. Neuropharmacol, 2010. **59**(4): p. 323.
- 349. Borbély, E., et al., *Impact of Two Neuronal Sigma-1 Receptor Modulators, Pre084 and Dmt, on Neurogenesis and Neuroinflammation in an Aβ<sub>1-42</sub>-Injected, Wild-Type Mouse Model of Ad***. Int J Mol Sci, 2022. **23**(5): p. 2514.
350. Ramírez, E., et al., *Neurogenesis and Morphological-Neural Alterations Closely Related to Amyloid B-Peptide (25-35)-Induced Memory Impairment in Male Rats*. Neuropeptides, 2018. **67**: p. 9.
351. Verret, L., et al., *Alzheimer's-Type Amyloidosis in Transgenic Mice Impairs Survival of Newborn Neurons Derived from Adult Hippocampal Neurogenesis*. J Neurosci, 2007. **27**(25): p. 6771.
352. Hu, Y.S., et al., *Complex Environment Experience Rescues Impaired Neurogenesis, Enhances Synaptic Plasticity, and Attenuates Neuropathology in Familial Alzheimer's Disease-Linked Appsw/PS1deltae9 Mice*. Faseb j, 2010. **24**(6): p. 1667.
353. Jin, K., et al., *Increased Hippocampal Neurogenesis in Alzheimer's Disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): p. 343.
354. López-Toledano, M.A. and M.L. Shelanski, *Increased Neurogenesis in Young Transgenic Mice Overexpressing Human App Sw,Ind*. J Alzheimers Dis, 2007. **12**: p. 229.
355. Itokazu, Y. and R.K. Yu, *Amyloid B-Peptide 1-42 Modulates the Proliferation of Mouse Neural Stem Cells: Upregulation of Fucosyltransferase Ix and Notch Signaling*. Mol Neurobiol, 2014. **50**(1): p. 186.
356. Fonseca, M.B., et al., *Amyloid B Peptides Promote Autophagy-Dependent Differentiation of Mouse Neural Stem Cells*. Mol Neurobiol, 2013. **48**(3): p. 829.
357. Fuster-Matanzo, A., et al., *Role of Neuroinflammation in Adult Neurogenesis and Alzheimer Disease: Therapeutic Approaches*. Mediators of Infl, 2013. **2013**: p. 260925.
358. Catlow, B.J., et al., *Effects of Psilocybin on Hippocampal Neurogenesis and Extinction of Trace Fear Conditioning*. Exp Brain Res, 2013. **228**(4): p. 481.
359. Lima da Cruz, R.V., et al., *A Single Dose of 5-Meo-Dmt Stimulates Cell Proliferation, Neuronal Survivability, Morphological and Functional Changes in Adult Mice Ventral Dentate Gyrus*. Front Mol Sci, 2018. **11**.
360. Morales-Garcia, J.A., et al., *N,N-Dimethyltryptamine Compound Found in the Hallucinogenic Tea Ayahuasca, Regulates Adult Neurogenesis in Vitro and in Vivo*. Transl Psychiatr, 2020. **10**(1): p. 331.
361. Inserra, A., *Hypothesis: The Psychedelic Ayahuasca Heals Traumatic Memories Via a Sigma 1 Receptor-Mediated Epigenetic-Mnemonic Process*. Front Pharm, 2018. **9**.
362. Ly, C., et al., *Psychedelics Promote Structural and Functional Neural Plasticity*. Cell Rep, 2018. **23**(11): p. 3170.
363. Szabo, A., et al., *The Endogenous Hallucinogen and Trace Amine N,N-Dimethyltryptamine (Dmt) Displays Potent Protective Effects against Hypoxia Via Sigma-1 Receptor Activation in Human Primary Ipsc-Derived Cortical Neurons and Microglia-Like Immune Cells*. Front Neurosci, 2016. **10**.
364. Szabo, A. and E. Frecska, *Dimethyltryptamine (Dmt): A Biochemical Swiss Army Knife in Neuroinflammation and Neuroprotection?* Neural Regen Res, 2016. **11**(3): p. 396.
365. Szabo, A., *Psychedelics and Immunomodulation: Novel Approaches and Therapeutic Opportunities*. Front Immunol, 2015. **6**.
366. Wang, J., et al., *Comparison of Sigma 1 Receptor Ligands Sa4503 and Pre084 to (+)-Pentazocine in the Rd10 Mouse Model of Rp*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2020. **61**(13): p. 3.

367. Peviani, M., et al., *Neuroprotective Effects of the Sigma-1 Receptor (S1r) Agonist Pre-084, in a Mouse Model of Motor Neuron Disease Not Linked to Sod1 Mutation*. Neurobiol Dis, 2014. **62**: p. 218.
368. Jia, J., et al., *Sigma-1 Receptor-Modulated Neuroinflammation in Neurological Diseases*. Front Cell Neurosci, 2018. **12**: p. 314.
369. Amaro, R.E., et al., *Ensemble Docking in Drug Discovery*. Biophys J, 2018. **114**(10): p. 2271.
370. Hayashi, T. and T.-P. Su,  *$\Sigma$ -1 Receptor Ligands: Potential in the Treatment of Neuropsychiatric Disorders*. CNS Drugs, 2004. **18**: p. 269.
371. Cobos, E., et al., *Pharmacology and Therapeutic Potential of Sigma1 Receptor Ligands*. Curr Neuropharmacol, 2008. **6**(4): p. 344.
372. Narita, N., et al., *Interactions of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors with Subtypes of  $\Sigma$  Receptors in Rat Brain*. Eur J Pharmacol, 1996. **307**(1): p. 117.
373. Lever, J.R., et al.,  *$\Sigma$ 1 and  $\Sigma$ 2 Receptor Binding Affinity and Selectivity of Sa4503 and Fluoroethyl Sa4503*. Synapse, 2006. **59**(6): p. 350.
374. Ishima, T., Y. Fujita, and K. Hashimoto, *Interaction of New Antidepressants with Sigma-1 Receptor Chaperones and Their Potentiation of Neurite Outgrowth in Pc12 Cells*. Eur J Pharmacol, 2014. **727**: p. 167.
375. Gervais, F., et al., *Targeting Soluble Abeta Peptide with Tramiprosate for the Treatment of Brain Amyloidosis*. Neurobiol Aging, 2007. **28**(4): p. 537.
376. Asher, S. and R. Priefer, *Alzheimer's Disease Failed Clinical Trials*. Life Sci, 2022. **306**: p. 120861.
377. Kubo, K., et al., *Chemical Analysis of Amyloid B Aggregation Inhibitors Derived from Geranium Thunbergii*. Bioorg Med Chem, 2022. **68**: p. 116840.
378. Li, S., et al., *A Novel Pectin-Like Glycopeptide Isolated from the Fruit of Fructus Mori Impedes Aggregation and Production of A $\beta$ (42)*. J Agric Food Chem, 2022. **70**(32): p. 9908.
379. Tan, M.A., H. Ishikawa, and S.S.A. An, *Pandanus Amaryllifolius Exhibits in Vitro Anti-Amyloidogenic Activity and Promotes Neuroprotective Effects in Amyloid-B-Induced Sh-Sy5y Cells*. Nutrients, 2022. **14**(19).
380. Kalmankar, N.V., B.R. Gehi, and R. Sowdhamini, *Effects of a Plant Cyclotide on Conformational Dynamics and Destabilization of B-Amyloid Fibrils through Molecular Dynamics Simulations*. Front Mol Biosci, 2022. **9**: p. 986704.
381. Banerjee, S., et al., *B-Carotene, a Potent Amyloid Aggregation Inhibitor, Promotes Disordered A $\beta$  Fibrillar Structure*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(6).
382. Othman, A., et al., *Possible Neuroprotective Effects of Amide Alkaloids from Bassia Indica and Agathophora Alopecuroides: In Vitro and in Silico Investigations*. RSC Advances, 2022. **12**(29): p. 18746.
383. Ngwa, D.N. and A. Agrawal, *Structurally Altered, Not Wild-Type, Pentameric C-Reactive Protein Inhibits Formation of Amyloid-B Fibrils*. J Immunol, 2022. **209**(6): p. 1180.
384. Cho, I., et al., *Immobilized Amyloid Hexamer Fragments to Map Active Sites of Amyloid-Targeting Chemicals*. ACS Chem Neurosci, 2023. **14**(1): p. 9.
385. Kalita, S., et al., *Copper Chelating Cyclic Peptidomimetic Inhibits A $\beta$  Fibrillogenesis*. RSC Med Chem, 2022. **13**(6): p. 761.
386. Wang, X., et al., *Chondroitin Sulfate E Alleviates B-Amyloid Toxicity in Transgenic Caenorhabditis Elegans by Inhibiting Its Aggregation*. Int J Biol Macromol, 2022. **209**(Pt A): p. 1280.
387. Uchimura, K., et al., *Design and Synthesis of 6-O-Phosphorylated Heparan Sulfate Oligosaccharides to Inhibit Amyloid B Aggregation*. Chembiochem, 2022. **23**(15): p. e202200191.
388. Matsubara, T., et al., *Ganglioside Nanocluster-Targeting Peptidyl Inhibitor Prevents Amyloid B Fibril Formation on the Neuronal Membrane*. ACS Chem Neurosci, 2022. **13**(13): p. 1868.
389. Puneeth Kumar, D.R., et al., *A Cationic Amphiphilic Peptide Chaperone Rescues A $\beta$ 42 Aggregation and Cytotoxicity*. RSC Med Chem, 2023. **14**(2): p. 332.

390. Kumar, D., et al., *Emerging Therapeutic Developments in Neurodegenerative Diseases: A Clinical Investigation*. Drug Discov Today, 2022. **27**(10): p. 103305.
391. García Marín, I.D., et al., *New Compounds from Heterocyclic Amines Scaffold with Multitarget Inhibitory Activity on A $\beta$  Aggregation, Ache, and Bace1 in the Alzheimer Disease*. PLOS ONE, 2022. **17**(6): p. e0269129.
392. Fidan, G.S., et al., *Design, Synthesis, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, and Amyloid-B Aggregation Inhibition Studies of Substituted 4,4'-Diimine/4,4'-Diazobiphenyl Derivatives*. Arch Pharm (Weinheim), 2022. **355**(12): p. e2200152.
393. Seong, S.H., et al., *Phytoestrogen Coumestrol Selectively Inhibits Monoamine Oxidase-a and Amyloid B Self-Aggregation*. Nutrients, 2022. **14**(18).
394. Gandini, A., et al., *Discovery of Dual A $\beta$ /Tau Inhibitors and Evaluation of Their Therapeutic Effect on a Drosophila Model of Alzheimer's Disease*. ACS Chem Neurosci, 2022. **13**(23): p. 3314.
395. Gregory, S., S. Saunders, and C.W. Ritchie, *Science Disconnected: The Translational Gap between Basic Science, Clinical Trials, and Patient Care in Alzheimer's Disease*. Lancet Healthy Longev, 2022. **3**(11): p. e797.
396. Lahiri, D.K., et al., *The Experimental Alzheimer's Disease Drug Posiphen [(+)-Phenserine] Lowers Amyloid-Beta Peptide Levels in Cell Culture and Mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **320**(1): p. 386.
397. Fang, C., et al., *Buntanetap, a Novel Translational Inhibitor of Multiple Neurotoxic Proteins, Proves to Be Safe and Promising in Both Alzheimer's and Parkinson's Patients*. J Prev Alzheimers Dis, 2023. **10**(1): p. 25.
398. Espay, A.J., et al., *Revisiting Protein Aggregation as Pathogenic in Sporadic Parkinson and Alzheimer Diseases*. Neurology, 2019. **92**(7): p. 329.