

Dr. Fülöp Livia „Az Alzheimer-kór kezelésére alkalmazható potenciális gyógyszerjelölt vegyületek fejlesztése” című MTA Doktori Értekezésének bírálata

Az Alzheimer-kór korunk egyik legelterjedtebb betegsége, ami ugyan közvetlenül nem halálos, de a kognitív funkciók beszűkülésével, magatartásváltozással, elbutulással (demencia), majd gyors biológiai leépüléssel járó neurodegeneratív kórkép nagy kihívás a beteg, a környezete és a társadalom számára. Úgy vélik, a betegek száma a világban meghaladhatja a 65 millió betegszámot 2030-ra. Ez a szám a társadalom előregedésével csak nőni fog, mivel a kor előrehaladtával nőnek az esetszámok is (a 65 év feletti kb. 5 százalékát, a 80 év feletti kb. 20 százalékát érinti). A nem túl biztató előrejelzések oka, hogy még mindig nem értjük teljesen a kiváltó okokat és minél több ismeretre teszünk szert, annál jobban látjuk a folyamat összetettségét, így egyben a gyógyítás nehézségét is. Ezért az Alzheimer-kór elleni gyógyszerfejlesztés is problémás, nincs is igazán megfelelő gyógyszer a betegség gyógyítására, és már annak is örülünk, ha olyan hatóanyagot találunk, ami lassítja a demencia kialakulásának folyamatát és/vagy csökkenti az ezzel járó tünetegyüttes megjelenését. Ha még ehhez hozzájárul az is, amit Dr. Fülöp Livia az értekezés bevezetőjében leír, hogy az irodalomban megjeleik olyan munka, amely hamis eredményekre épül, és ebből következtetéseket von le, évtizedekre félre viheti a kutatók munkáját, amely mind anyagi, mind időbeli veszteséget okoz a kutatóknak. Sajnos a jelölt csoportja is belefutott ebbe a problémába. Mindezek ellenére az Alzheimer-kór gyógyszeres kezelésére irányuló kutatások töretlenek, minden ezen a téren tett kis lépés is érdekes lehet, és hozzájárulhat ahhoz, hogy a végén ez a betegség is gyógyítható legyen. Ezért Dr. Fülöp Livia témaválasztása továbbra is időszerű és az elért eredményei jelentős érdeklődésre tarthatnak számot.

A Doktori Értekezés mind formai mind szakmai szempontból megfelel az MTA Kémiai Tudományok Osztálya doktori követelményrendszerének. Ezért a formai felépítésre (oldalszámok említésével) nem térnék ki. Az értekezés jól megírt mű, minimális elütési hibával, a Jelölt jól alkalmazza a szakmai szöveg magyar nyelvű helyesírási szabályait. Talán csak két apróbb pontatlanságot említenék meg. Így az aminosavak funkciós csoportját azzal a C-atommal jellemezzük, amelyhez a funkciós csoport kapcsolódik. Ezért a Ser γ -OH csoportja helyett β -OH-t kellene írni. Egy helyen pedig a vad típusú állat helyett vad állat szerepel, ami inkább egy aranyos tévesztés. Az irodalmi áttekintés (2. fejezet) közel 270 irodalmi hivatkozással nagyon jól és alaposan feldolgozza az Alzheimer-kórral és terápiájukkal kapcsolatos jelen tudásunkat, kitérve a bizonytalanságokra és ellentmondásokra is. A „Célkitűzések” részben (3. fejezet) Dr. Fülöp Livia öt pontban határozza meg a kutatásai során megoldandó azon problémákat, amelyekre válaszokat keres. Ezek a célkitűzések az Alzheimer-kór kimutatásával és terápiájával kapcsolatos, az adott időben releváns problémák megoldására fókuszálnak. Az „Alkalmazott anyagok, vizsgálati módszerek és eszközök” részben (4. fejezet) nagyon precízen, részletesen és jól követhetően mutatja be a kísérleti munka menetét. Az 5. fejezetben az eredmények bemutatása és értékelése, informatív ábrák és táblázatok segítségével, többnyire sikeresen megoldja és megválaszolja a problémákat és a kitűzött célokat. Csak egy megjegyzés az ábrákkal kapcsolatban, hogy csillaggal/csillagokkal jelölt szignifikancia értékek magyarázata többnyire nem szerepel az ábra aláírásokban. Természetesen ezek az eredmények nem feltétlenül végleges megoldásokat jelentenek, sokszor újabb kérdéseket vetnek fel, ahogy ezt az összefoglalóban is jelzi Dr. Fülöp Livia. Minden

esetre az elvitathatatlan, hogy az elvégzett kutató munka és a kapott, előremutató eredmények nagymértékben segítik az Alzheimer-kórral kapcsolatos kutatások további sikeres előremozdítását. Dr. Fülöp Livia az Értekezés végén 9 tézispontban foglalja össze azokat az eredményeket, amelyeket a legfontosabbnak tart az elmúlt kb. másfél évtizedes kutatómunkájából, amit kutatótársaival 20 publikáció és szabadalom formájában jelentettek meg. A magam részéről valamennyi tézis ponttal egyetértek és el tudom fogadni.

Az Értekezés olvasása közben az opponensben számos kérdés merült fel részben a munkával, részben az irodalomban leírtakkal kapcsolatban. A következőkben ezeket szeretném leírni.

1. Az APP szekretázok általi lebomlása és a keletkező fragmensek keletkezése igen jól dokumentált. Viszont nagyon érdekesnek találtam, az általam eddig nem ismert az $A\beta_{3-42}$ fragmens keletkezését, amely Glu-t tartalmaz az N-terminálison, ami piroglutaminsavvá alakul, és ez a fragmens megnövekedett aggregációs hajlammal rendelkezik. Tudomásom szerint az N-terminális szabad Glu ciklizációs képessége a Gln-nal és védett (pl. Bzl-védett) Glu-nal ellentétben viszonylag csekély. Mit lehet tudni ennek az átalakulásnak a kinetikájáról? Mi hasítja le az N-terminális dipeptidet az $A\beta_{1-42}$ -ről, és vannak-e olyan terápiás kutatások, amelyek ezt a hasadást és/vagy a piroglutamisav képződését gátolják?
2. Kérdések az $izoA\beta_{1-42}$ -vel kapcsolatban: A szintézis során (Boc-technika), a Ser észter beépítése után, hogy végezték a semlegesítési lépéseket (ez az Értekezésből nem derül ki? Kell-e *in situ* semlegesítést végezni vagy a külön lépéses semlegesítés során sem láttak O-N acilvándorlást? Mennyire válik el a HPLC-ben az $A\beta_{1-42}$ és az *izo*-származéka? Nyilván a két termék MS-ben nem különböztethető meg, tehát egy O-N acilvándorlást ezzel nem mutatható ki. A csúcs kicsit vállasnak tűnik 10.A ábrán. Az *in vitro* vizsgálatokban milyen gyorsan történik meg az acilvándorlás, és ez hogyan viszonyul az aggregáció sebességéhez? Ezt az acilvándorlást és az ezt követő aggregációs folyamatot Ca és Mg ionok segítik, ha jól értem. Ez hogy változtatja meg az átalakulás kinetikáját *in vivo* körülmények között? Bár ha jól következtetek, akkor talán ez az oka annak, hogy inkább a *in vitro* (pl. kötődési) vizsgálatokban alkalmazható ez a származék? Mennyire relevánsak az ezzel az anyaggal kapott eredmények a természetes folyamatokra, ha másféle aggregációs folyamat játszódik le az *izoA\beta_{1-42} és az $A\beta_{1-42}$ alkalmazásakor? A 62. oldalon ezzel kapcsolatban azt írja a Jelölt, hogy „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. Ezt esetleg kifejtené jobban, hogy ez alatt mit kell érteni?*
3. Az Fmoc-kémiával szintetizált peptid-amidokat Rink-Amid gyantán készítette. Egyes vélemények szerint ilyenkor C-terminális N-alkilezett peptid amidok képződhetnek. Nem tapasztaltak ilyeneket? Bár a Rink-Amid MBHA gyantáról nehezebb lehasítani a peptideket, ami gond lehet az $A\beta$ -peptidek esetén, de kevesebb mellékterméket eredményez. Van-e összehasonlításuk és tapasztalatuk a két gyanta típus alkalmazása esetén $A\beta$ -peptidek esetén?
4. Az egyik mintaelőkészítő protokollnál azt írja, hogy az $A\beta_{25-35}$ peptidet 5 percig ultrahangos kezelésnek veti alá. Nem tapasztalt aggregációt? Igaz, hogy az $A\beta_{1-42}$ esetében, de a mi tapasztalatunk az volt, hogy az ultrahangozás nem hogy segített volna a feloldásban, hanem kimondottan segítette az aggregálódást.

5. Az LPFFD-amid szintézise és alkalmazása során nem merült fel a szukcinimid gyűrűn keresztüli LPFFN képződés lehetősége? Általában kerülni szokták az Asp-amid C-terminálisú peptidok szintézisét.
6. A foldamer-dendrimerek hatásának vizsgálatakor felmerül a kérdés, hogy a β -rétege kimutatására használt ThT vagy ellenanyagok kötődése nem gátolt-e a dendrimerek kötődése által, és nem ez okozhatja-e a kisebb aggregálódás detektálását? Tudunk valamit az egyes komponensek kötődési helyéről? Esetleg van mód a dendrimer-kötött szerkezetek röntgen diffrakciós vizsgálatára? Van valamilyen tapasztalat az ilyen típusú aggregációt módosító vegyületek sejtbejutási illetve vér-agy gáton történő átjutási képességéről? Ha nem, akkor mit tudna a Jelölt elképzelni ezen molekulák olyan módosítására, amelyek ezt elősegíthetik? Azért is kérdezem ezt, mert a Jelölt az összefoglalóban azt írja, hogy „A kismolekulás AM-ek átjutása a vér-agy gáton könnyebben megvalósulhat, mint az antitesteké,..... a kismolekulás AM-ek esetében ezért törekedni kell a célhelyre történő hatékonyabb eljutás elősegítésére.”
7. A 31. ábrán összehasonlító vizsgálatot mutat be Dr. Fülöp Livia a multivalencia (különböző foldamer-dendrimer szerkezetek) és a biológiai hatásosság összefüggésére. A különböző anyagok viselkedése, hatás mechanizmusa (értve ezalatt a toxikus oligomer mennyiségének eltolása a kisebb oligomerek illetve a nagyobb aggregátumok irányába) mennyire egységes, és ha nem, akkor mennyire összehasonlíthatók ezek az adatok? Vagy ez annyira nem is releváns, mert csak a kialakult hatás (viabilitás érték) a fontos?
8. A 91. oldalon Dr. Fülöp Livia azt írja, hogy „Az A β oligomerek detektálására kifejlesztett ELISA eredményei is csak akkor megbízhatóak, ha az oligomerek és a foldamer között fellépő kölcsönhatás specifikus, az adott biológiai mátrixban jelen levő egyéb fehérjék a meghatározást nem zavarják.” Majd vizsgálva az A β oligomerek és a szérum fehérjék kölcsönhatását arra a következtetésre jut, hogy nagy mennyiségben jelen levő szérumfehérjék és detergens sem zavarja az oligomerek specifikus detektálását. A kérdésem az lenne, hogy vizsgálták-e, hogy a foldamer-dendrimerek hogyan hatnak kölcsön ezekkel a fehérjékkel, és ez befolyásolhatja-e az aggregáció módosító hatásukat (pl. koncentráció függést)?
9. A 44. ábrán mivel magyarázható, hogy kicsit random módon nőnek és csökkennek az értékek a hónapok előre haladtával. Van ennek valami biológiai magyarázata, vagy mérési hibából adódnak? Ha esetleg ez utóbbi, akkor a szignifikancia értékek mennyire tekinthetők pontosnak? Általában hány párhuzamos mérés alapján számolták ki a szórásokat?
10. A 94. oldalon azt olvashatjuk, hogy „Egy határkoncentráción túl a keletkező A β ₁₋₄₂ ezekben az állatokban plakkokat képezhet, melyeket 4G8 antitesttel detektáltunk (45.C ábra).” Ez az ellenanyag a 18-23-as szekvencia részt ismeri fel az irodalom alapján. Lehetséges, hogy akkor az esetlegesen keletkező A β ₃₋₄₂ peptidet és esetleg más fragmenteket is kimutatja? Tehát lehet, hogy ilyen szempontból nem szelektív az A β ₁₋₄₂ peptidre? Persze lehet, hogy ennek megint nincs igazán jelentősége a vizsgálat szempontjából.
11. A 94. oldalon bemutatott táblázat az életkorral összefüggő neurogenézist és A β -patológiát érintő változások felderítését mutatja be APPxPS1-es transzgen egérmodellben. A táblázat tartalmaz irodalmi adatokat is, amelyek többször eltérnek a saját mérésektől. Dr. Fülöp Livia ezt azzal magyarázza, hogy „Az ellentmondások oka nagy valószínűséggel a detektálási

metodikák különbözősége”. Ezekben az esetekben nem vetődött fel, hogy érdemes lenne ezeket a vizsgálatokat azonos módszerekkel összehasonlítani az irodalmi adatokkal, hogy ezt a következtetést igazolni lehessen?

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

Az eredmények alapján megállapítja a Jelölt, hogy igazolták ezzel a hipotézisüket, hogy az amiloid-patológia ellen lehetőleg minél korábbi időpontban elkezdett kezelés célszerű. Ez az emberre levetítve mit jelenthet? Hisz az egereknél a 3 hónapos kórnál történő kezelés még bőven nerogenezis mutatók jelentős csökkenése előtt van. Később az összefoglalásban ezzel kapcsolatban a következőket írja Dr. Fülöp Livia „A korai fázisra jellemző biomarkerek azonosításával és szűrővizsgálat-szerű bevezetésével, illetve az AK-hoz rendelhető genetikai mintázatok definiálásával el lehetne különíteni azokat a csoportokat, amelyeknek korai kezelése által szignifikánsan csökkenthető lenne a súlyos AK-ra jellemző tünetek kifejlődése.” Vannak erre irányuló kísérletek és tudunk már ilyen jól diagnosztizálható markerekről, amelyek nagy bizonyossággal előrevetítik a betegség várható kialakulását? Ha vannak is ilyenek, azok mennyire adnak információt az alkalmazandó terápiával kapcsolatban? Ezek mennyire befolyásolhatják a további kutatási irányokat?

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

Összességében Dr. Fülöp Livia MTA Doktori Értekezésében egy súlyos, sokakat érintő betegség gyógyítására irányuló kutatást mutatott be, annak minden nehézségével, ami az elért eredmények értékét még jobban kiemeli. A kutató munka és annak megjelenítése magas színvonalú. Az opponens kérdései inkább érdeklődést, esetleg ismereteinek hiányát mutatja és ezek semmit nem vonnak le az Értekezés értékéből. A várhatóan precíz és kielégítő válaszok pedig nem csak az opponens kíváncsiságát elégítik ki, hanem a Jelölt kiváló szakmai felkészültségét és hozzáértését is bizonyítja.

Mindezek alapján az Értekezés nyilvános vitára bocsátását és a védelem után Dr. Fülöp Livia számára az MTA Doktora cím odaítélését javaslom.

Budapest, 2025. január 22.



Dr. Mező Gábor
az MTA Doktora