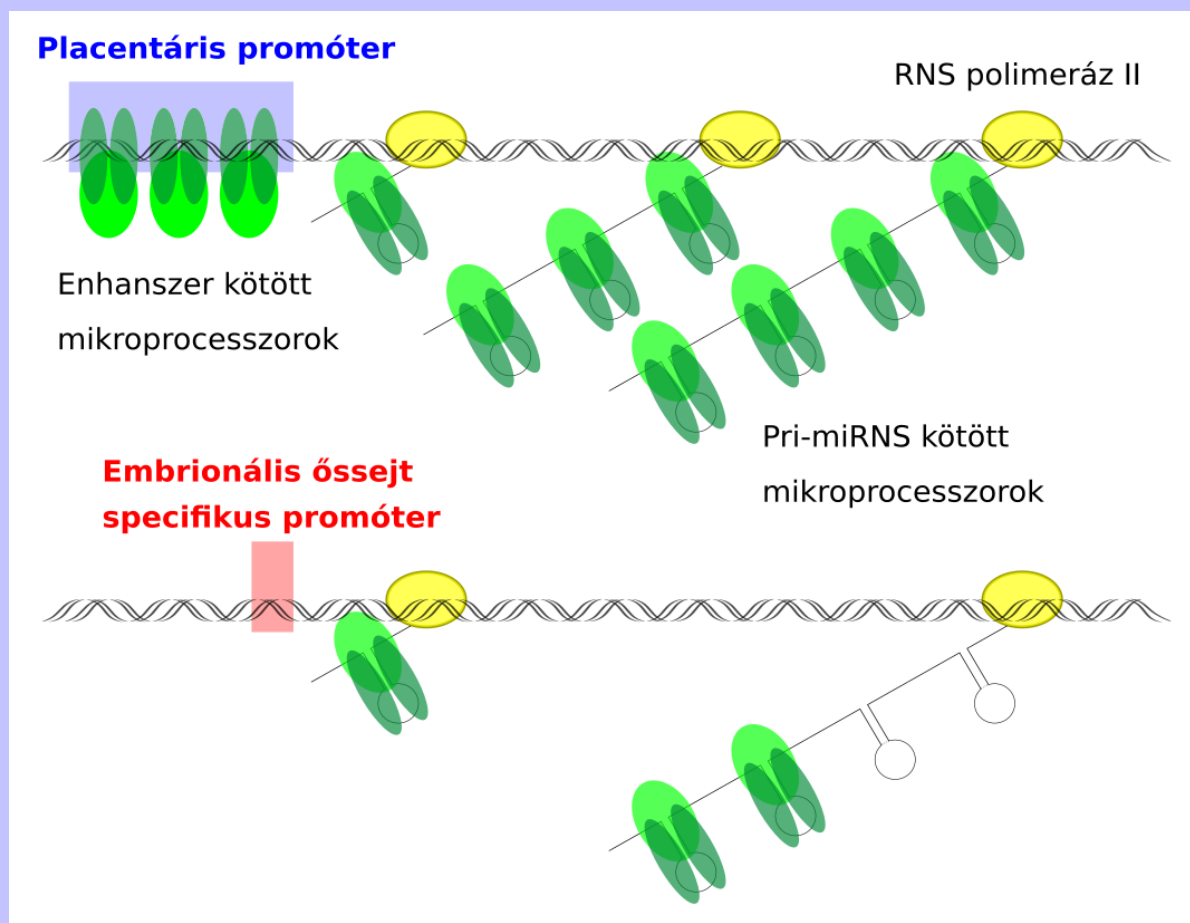


BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata

XLVII. évfolyam 2. szám

2023. június



BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület internetes folyóirata

Szerkesztőbizottság:

Alexa Anita, Bősze Szilvia, Erdődi Ferenc, Ifj. Gallyas Ferenc, Geiszt Miklós,
Kiricsi Mónika (titkár), Nyitray László, Sarkadi Balázs,
Székács András, Szondy Zsuzsa

Főszerkesztő:

Szűcs Mária
szucs.maria@brc.hu

Rovatvezetők:

Nyitray László (PhD disszertációk bemutatása) és
Sarkadi Balázs (Áttekintő közlemények)

Technikai szerkesztő:

Bérdi Péter
berdipeter@gmail.com

XLVII. ÉVFOLYAM 2. SZÁM

2023. június

TARTALOMJEGYZÉK

Címlapkép: A C19MC humán miRNS klaszter pozíciófüggő szabályozásának grafikus modellje. A placentáris (kékkel) és az embrionális összejt specifikus (pirossal) promóterek eltérő hatékonysággal kötik a mikroprocesszorokat, ezzel képesek a miRNS klaszter érését és a képződő érett miRNS-ek mennyiségét a miRNS-ek genomi sorrendjétől függő módon szabályozni (lásd Fóthi Ábel írását, 47. oldal).

AKIKRE BÜSZKÉK VAGYUNK

Kitüntetések, díjak	3.
Venetianer Pál: Visszatekintés	4.

REVIEW

Penke Botond, Szűcs Mária, Bogár Ferenc:	
Alzheimer-kór: le tudjuk-e lassítani a betegséget, lesz-e oki terápia?	10.

ÁTTEKINTŐ KÖZLEMÉNYEK AZ MBKE TAGJAINAK TOLLÁBÓL

Felhívás	30.
Lista	31.
Közlemények	32.

PHD DISSZERTÁCIÓK BEMUTATÁSA

Felhívás	36.
Erdős Gábor: Rendezetlen fehérjék bioinformatikai vizsgálata	37.
Fóthi Ábel: MikroRNS klaszterek érését befolyásoló új mechanizmus és lehetséges orvosi relevanciájának bemutatása	43.
Vadászi Henrietta: A C1q immunfehérje interakcióinak vizsgálata és fehérjealapú gátlása	51.

KONFERENCIA BESZÁMOLÓK

Beszámoló a Magyar Molekuláris Élettudományok tavaszi konferenciájáról ...	57.
Peptidkémiai Munkabizottság 2023. évi tudományos ülése, Balatonszemes ...	60.

Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület
1117 Budapest, Magyar tudósok körútja 2.

<http://www.mbkegy.hu>

Felelős kiadó Dr. Buday László

Az engedély száma III/SZI/397/1977

HU ISSN 2060 8152 (Online) | HU ISSN 0133-8455 (Nyomtatott)

AZ MBKE TAGJAINAK ELISMERÉSEI 2023. MÁRCIUS 15. ÉS 2023. JÚNIUS 15. KÖZÖTT

Megosztott Akadémiai Díjat kapott:

Juhász Gábor, az MTA doktora, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Genetikai Intézetének tudományos tanácsadója és

Vellai Tibor András, az MTA doktora, az Eötvös Loránd Tudományegyetem Genetikai Tanszékének tanszékvezető egyetemi tanára

az öregedés és autofágia kutatásának területein, egymástól függetlenül dolgozva elért, úttörő jelentőségű eredményeikért, az e folyamatokban szereplő új molekuláris mechanizmusok felfedezéséért, valamint az autofág önemésztés és a lizoszomális lebontás jelentőségének számos sejtleletani és kóros folyamatban való kimutatásáért.

Az MTA támogatásával tizenkilenc új **Lendület kutatócsoport** alakulhat és kezdheti meg kutatását hazai kutatóhelyeken. Az MBKE tagjai közül

- Induló kategóriában támogatást nyert:

Róna Gergely (Természettudományi Kutatóközpont), „D-típusú ciklinek által szabályozott DNS hibajavító folyamatok”

Turiák Lilla (Természettudományi Kutatóközpont): „A tumor eredetű extracelluláris vezikulák glikomjának feltérképezése”,

- Haladó kategóriában támogatást nyert:

Juhász Gábor (Szegedi Biológiai Kutatóközpont) „Miért rendkívül sokfélék a lizoszómák?”

című pályázattal.

Tretter László (Semmelweis Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) az 52. Membrán-Transzport Konferencián **Romhányi díjat** kapott.

Gratulálunk a kitüntetetteknek!

VISSZATEKINTÉS

Venetianer Pál
ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet

Venetianer Pál 1935-ben született Budapesten. 1957-ben végezte el az ELTE biológia-kémia szakát. Tudományos pályáját a Budapesti Orvostudományi Egyetemen, a Straub F. Brunó által vezetett Orvosi Vegytani Intézetben kezdte, majd annak alapításától (1971) az MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézetében folytatta, amelynek később igazgatója, majd a Központ főigazgatója lett, jelenleg ugyanott emeritus kutatóprofesszor. Kétízben dolgozott az USA Nemzeti Egészségügyi Intézetében (NIH), előbb a Nobel-díjas Anfinsen, majd a Lasker-díjas Leder laboratóriumában, később Japánban a Kyoto-i egyetemen a Nobel-díjas Tasuko Honjo-nál. 1981-ben Akadémiai-díjban, 1985-ben Állami-díjban részesült, 1998-ban kapta meg a „Szegedért Alapítvány” nagydíját, 2014-ben a Biokémiai Társaság Tankó Béla díját. 1987 óta az MTA levelező, majd 1996-tól rendes tagja. 1991-ben lett az EMBO, 1992-ben az Academia Europaea, 1995-ben a Leopoldina Német Tudományos Akadémia tagja. 2023-ban Pro Scientia életműdíjat kapott. A fehérje-diszulfid izomeráz enzim (PDI) és több restrikciós endonukleáz felfedezője, kutatócsoportja vezette be hazánkban a rekombináns DNS technológiát (génsebészet) és a DNS-szekvenálást. Hét tudománynépszerűsítő könyv szerzője, 2014-ben az „Év ismeretterjesztő tudósa” címet kapta és egy kisbolygót neveztek el róla.

Szűcs Mária főszerkesztő ezekkel a szavakkal kért meg e cikk megírására: „(a felkértek)...személyes hangvételen vallanak arról, mi befolyásolta a pályaválasztásukat, a karrierjük alakulását, miben látják a kutatás, oktatás örömét, milyen gondolatokat szeretnének átadni a fiataloknak.” A következő írásban megkísérlem szó szerint értelmezni kérését és egyenként válaszolok a feltett kérdésekre.

Mi befolyásolta a pályaválasztásomat?

Kamaszkoromban, mikor pályaválasztásról kezdtem gondolkozni, elsősorban a matematika és a fizika érdekelt, faltam az e tárgyakat népszerűsítő könyveket, de rá kellett jönnöm, hogy noha az osztály legjobb matematikusa voltam és versenyeken is többnyire jól szerepeltem (bár sohasem nyertem), nem vagyok különleges matematikai tehetség és e nélkül nem érdemes erre a pályára menni. Természetjáróként azonban kezdett nagyon érdekelni az állatvilág. Lepkegyűjtő lettem és kiolvastam a 18 kötetes magyar Brehm-et. Vagyis a biológiából a zoológia érdekelt és az, amit ma etológiának neveznek. Ezért jelentkeztem biológusnak, noha abban az évben nem indult az ELTE-n biológus szakképzés, csak biológia-kémia tanári szak. A kémiát nem igazán szerettem, felesleges tehernek tekintettem a biológia mellett. Az egyetemen azonban egyre jobban

untam a biológiai tárgyakat és egyre jobban kedveltem a kémiaiakat.

Visszamenőleg szomorúan állapítom meg, hogy egész egyetemi pályafutásom alatt egyetlen tanárom hatott rám, és imponált szellemi értelemben: Bíró Endre, aki a biokémiát oktatta. Végzőskor az egyetem nem kínált mást, mint vidéki általános iskolai tanári állásokat, de ebben az évben (1957) nagyon sok kutató disszidált, így voltak szabad kutatói állások. Engem azonban az egyetemen nem vonzott egyetlen tanszék sem. Állást keresve, családunk barátja Szalai Sándor szociológus akadémikus mutatott be Erdős Tamás biokémikusnak, Szent-Györgyi egykori munkatársának, aki ekkor egy kis klinikai biokémiai kutatócsoportot vezetett. Erdős alaposan kikérdezett, majd adott három ajánlólevelet: Szabolcsi Gertrudhoz az MTA Biokémiai Intézetébe, feleségéhez, Ullmann Ágneshez a budapesti Orvosi Vegytani Intézetbe és Kontra Györgyhöz a Szövet-tani Intézetbe. Mindhárom helyre el akartam menni, de elsőként (közlekedési, nem szakmai megfontolásból) a Puskin utcába mentem. Ullmann elolvasta a levelet és azt mondta: „éppen itt van a Prof, beszéljen vele.” A Prof, Straub F. Brunó lenyűgözött. Megjelenése is vonzó és imponáló volt, de az alig ötperces beszélgetés után úgy éreztem, hogy végre találkoztam a „nagy tudóssal”, aki ifjúkori olvasmányaim nyomán a kutatói pályára vonzott, és akit oly mértékben hiányoltam az egyetemen. Azonnal eldöntöttem, hogy ha felvesz, akkor itt akarok dolgozni. Szerencsére felvett.

François Jacob a Nobel-díj után egy újságírói kérdésre azt válaszolta: „*A siker titka: jókor kell lenni, jó helyen.*” Nekem a jó hely a Straub-intézet volt. A „jókor”-ra később visszatérek.

Hogyan alakult a karrierem?

Némi szégyenkezéssel vallom be, hogy a pályám, ha úgy tetszik a karrierem - már ami a külsőségeket illeti - nagyon egyenes és zökkenőmentes volt. A szégyenkezést az indokolja, hogy hazánk társadalma kudarcorientált, azaz gyanakvással és ellenszenvvel tekint a sikerre.

A múlt század hatvanas éveiben született meg a döntés a Szegedi Biológiai Központ létrehozásáról. Straub ekkor áthelyeztetett az egyetemről az MTA állományába és megbízott a létrejövő új intézet egy csoportjának vezetésével. Noha nehéz döntés volt a Szegedre költözés (amelyet azonban egy pillanatig sem bántam meg), kitüntetésnek tekintettem, hogy az alapító gárda tagja lehettem, és a továbbiakban ebben az intézetben jártam végig a számlálétra a

csoportvezetéstől egészen a főigazgatóságig, majd az emeritus kutató professzori státuszig, amelyben ma is vagyok, és máig minden nap bejárok a második otthonomnak tekintett intézménybe.

Pályám során abban a szerencsében és megtiszteltetésben volt részem, hogy három Nobel-díjassal és egy Lasker-díjassal dolgozhattam együtt (Christian B. Anfinsen, Richard Roberts, Tasuku Honjo és Philip Leder). Együttműködésünk idején már mind a négyen túl voltak díjazott felfedezésükön, de még nem kapták meg a díjat. Így nekem persze semmi részem nem volt a dicsőségükben, de azért nagy élmény volt az együttes munka.

Természetesen ugyancsak megtiszteltetés volt, hogy három akadémia is tagjává választott (a magyar, a német Leopoldina és a londoni székhelyű Academia Europaea), de a legnagyobb örömet számomra az EMBO tagság okozta, ennek a nagyszerű szervezetnek én voltam az első magyar tagja.

Tudományos munkásságom

Az eddigiekben pályám alakulásának külső körülményeiről írtam, a tartalomról, azaz konkrét tudományos eredményeimről (illetve azok hiányáról) ezen a helyen nem kívánok szólni, legfeljebb annyit, hogy itt bőven volt részem kudarcokban is (mint minden kísérletező kutatónak). Mindazonáltal tudományos munkásságomért számos kitüntetésben részesültem. Az MBKE 2014. évben Tankó Béla életmű díjjal tüntetett ki. A díj átvételekor az MBKE vándorgyűlésén Debrecenben 2014. augusztus 24-én elhangzott előadásom megtekinthető a Biokémia újságban: <https://www.mbkegy.hu/apps/mbkegy/pages/index.html#!/Biokem>Show/2014/12/0064006500630065006d006200650072>. Ugyancsak a Biokémia újságban, a „Visszatekintés az elmúlt 50 év kiemelkedő cikkeire” rovatban jelent meg Kiss Antal, Venetianer Pál: Hét rRNS gén '77-ben című írásunk, I. https://www.mbkegy.hu/apps/mbkegy/resources/biokem/2016/2016_06.pdf. A két cikkből képet kapunk munkásságom egy részére.

Jelen visszatekintés során azonban meg kell említenem két lényeges, általános irányváltoztatást. Első mesterem, Straub klasszikus biokémikus volt és az ő munkatársaként én is annak tartottam magam. Elméletileg azonban már akkor is nagyon érdekelt a kor trend-megszabó új iránya, a molekuláris genetika. Csányi Vilmos kollégám kezdeményezésére, két másik fiatal oktatóval együtt, szerveztünk középiskolás diákok számára egy molekuláris biológiai kurzust (ezt magunk között „molekuláris biliológiának” neveztük), amely sok kiváló fiatal

tehetséget indított el ebbe az irányba (például Falus Andrást és Kondorosi Évát, akik ma akadémikusok, vagy Hajdú Jánost, aki külföldön csinált nagy karriert). A gyakorlati kutatómunkámban első amerikai utam során (1965-ben) csatlakoztam Robert Goldberger molekuláris biológiai projectjéhez, és az akkori NIH nagyszerű molekuláris biológusaival (Bruce Ames, Gordon Tomkins, Gary Felsenfeld, Robert Martin) együttesen tartott heti munkamegbeszéléseken igyekeztem elsajátítani az újfajta szemléletet és módszereket. A SZBK-ban, a saját csoportomban elkezdett munkát már *molekuláris biológiának* neveztük.

Alig néhány évvel később jött a második irányváltás, ezt a populárisan „*génsebészet*”-nek nevezett tudományos forradalom hozta el számomra. Noha semmi részem nem volt az ezt a forradalmat meghozó új felfedezésekben, kétségtelen érdememnek tekinthetem, hogy hazai viszonylatban biztosan, de valószínűleg az egész ún. „*béketábor*”-ra vonatkozóan is csoportommal elsőként alkalmaztuk ezt a technológiát és a DNS szekvenálást is. Nos, számomra a Jacob által emlegetett „*jókor*”-t ez az 1972-73-ban született új irány jelentette. Egyrészt azért, mert a következő két évtized során ennek alkalmazásával volt viszonylag sikeres a csoportunk munkája és ennek köszönhetően váltunk Kelet-Európa-szerte vonzó továbbképző centrummá. Másodsorban azért, mert ekkor úgy éreztem, hogy szellemi értelemben hazataláltam. Ifjúkori vonzalmam a matematika és az exakt természettudomány iránt a biokémiában mindig némileg kielégületlen maradt. Az új irány viszont azt jelentette számomra, hogy immár nem effektusok, aktivitás-csökkenések vagy növekedések voltak a kísérleti eredmények, amelyeknek a szignifikanciája mindig vitatható. A DNS-en végrehajtott manipulációk ezzel szemben szinte mérnöki módon tervezhetők voltak, és noha a kísérlet lehetett sikertelen, a siker mindig pontosan és vitathatatlanul ellenőrizhető volt. Ezt nagyon szerettem.

Miben látom a kutatás örömét?

Hadd kezdjem a választ erre a kérdésre egy Sydney Brennertől származó mondattal: „*Mindig is úgy gondoltam, hogy a tudományos tevékenység a leghihetetlenebb, legcsodálatosabb élmény.*” Bár hiszem e tétel alapvető igazságát, mindenkit óva intenek attól a tévhitől, hogy a kutatói pálya tele van sikerélményekkel. Paul Valéry egy Einsteinnel folytatott interjúban megkérdezte a nagy fizikustól, hogy ha támad egy izgalmas, eredeti ötlete, azt felírja-e vagy csak fejben őrzi meg. Einstein válasza: „*Kedves uram, az embernek élete során 3-4 valóban eredeti ötlete születik. Azokat meg tudja jegyezni felírás nélkül is.*” Einstein persze túl szerény volt, neki jóval több eredeti gondolata támadt, de az

átlagos kutatóra (így rám is) valószínűleg igaz az állítás. Sőt, az eredeti ötlet nem is elég. Klein Györgynek van egy kiváló esszéje barátjáról, Sol Spiegelmanról (akit én is ismertem és csodáltam). Spiegelman valósággal ontotta az eredeti, szellemes ötleteket és végtelenül frusztrálta, hogy a kegyetlen természet ezek többségének helyességét nem igazolta vissza a kísérletek során.

Egyszóval, az eredeti ötleten alapuló új eredmény, a „felfedezés” bizony ritka esemény a kutatói pályán. Ki merem mondani, hogy egy jó orvos vagy tanár, sőt egy jó iparos munkája is több mindennapi sikerélményt nyújt, mint a kutatóé. Persze a kutatói pálya kínál azért a felfedezésnél kisebb örömöket is. Egy sikeres előadás, egy elfogadott cikk, sőt akár egyetlen sikerült kísérlet is okozhat pillanatnyi elégedettséget. A Nobel-díjas Alfred Hershey-t egyszer megkérdezték hogyan képzei el a mennyországot? Hershey válasza: *„Csinálni egy kísérletet, ami jól megy, és mindörökké azt ismételni.”* Életem során én egyszer éreztem magam a Hershey-mennyországban, valamikor a múlt század hatvanas éveiben, amikor néhány héten át minden kísérletem sikerült (persze – ellentétben Hershey *bon mot*-jával – nem ugyanaz a kísérlet volt), és mindegyik mondott valami újat, előbbre vitt a cél, a felfedezés felé. Gondolom, minden kutatótársam egyetért velem abban, hogy ez ritkán fordul elő a kísérletező kutató életében.

Miben látom az oktatás örömét?

Nekem csak a pályám első évtizedében, a mai SOTE-n (akkor még nem így hívták) volt munkaköri kötelességem az oktatás. Az orvostanhallgatók által meglehetősen utált kémia gyakorlatokat vezettem (ezt nem szerettem) és előadásokat is tartottam (ezt viszont szerettem). Szegeden, akadémiai kutatóként ilyen kötelezettségem nem volt, ennek ellenére, önkéntes vállalásként, szinte minden évben oktattam, olykor mint meghívott főkéllégiumi vendégelőadó biokémiát, genetikát, vagy biológiát, orvos, vagy biológushallgatóknak, olykor saját speciálkéllégiumot. Miért? Nem akarok azzal hízelegni magamnak, hogy önzetlen pedagógiai szenvedély motivált. Egyszerűen arról volt szó, hogy úgy éreztem, jó előadó vagyok, és mint a legtöbb ember, én is szívesen, élvezettel gyakoroltam azt a tevékenységet, amiről úgy véltem, hogy jól csinálom. Előadóként igen sokszor volt részem a Csikszentmihályi Mihály által leírt „flow” élményében. Erről a tevékenységemről sokszor kaptam megerősítő visszaigazolást, legutóbb például nagyon mehatott, hogy világhírűvé vált egykori hallgatóm, Karikó Katalin milyen kedves szavakkal nyugtázta az én

előadásaim szerepét pályája indulásában.

Milyen gondolatokat szeretnék átadni a fiataloknak?

Nagyon nem szeretem egyes kortársaim keserű dohogásait, a „bezzeg az én időmben” kezdetű mondatokat, de – anélkül, hogy minősíteném ezt a változást – nyilvánvalóan igaz, hogy a tudományos kutatás világa (mint annyi minden más az életünkben) hihetetlenül nagymértékben megváltozott az elmúlt fél évszázad során. Ezért kételkedem abban, hogy a mai fiatalok bármiben is igényelnék az én múlt századbeli gondolataimat.

Illetve, egyetlen intelmet azért megkockáztatnék. A tudományos kutatás szerintem nem foglalkozás, hanem hivatás. Egyik mesterem, Anfinsen mondta, hogy *„Fehérjét szekvenálni könnyebb munka, mint autót mosni.”* Nos, akit pusztán ez motiválna – de felsorolhatnék számos más lehetséges motivációt is: az impaktok és citátumok hajszolása, a sajtónépszerűség, a tudományos díjak, a vezetői hatalom, az akadémiai tagságok, a pénz, - azt inkább lebeszélném erről a pályáról. Az egyetlen méltó és igaz motiváció: a kíváncsiság, a vágy a természet titkainak a megismerésére. Csak az válassza ezt a hivatást és az tartson ki mellette, akiben ez megvan. Ráadásként persze a többi felsorolt ambíció bármelyike is jelen lehet.

Lehet, hogy ez az utolsó bekezdés kissé fellengzősre sikerült, nem szeretném így befejezni ezt az írást. Idéznék itt egy szkeptikusabb mondatot – saját magamtól. Egyszer egy újságíró megkérdezte tőlem, hogy mit tanultam Straubtól. A válaszom az volt, hogy: *„Semmit, mert a zsenialitás nem megtanulható.”* Ez egy nagy igazság, de igen szomorú igazság (© Rejtő Jenő). Mivel vigasztalódjunk akkor mi többiek, akik nem vagyunk zsenik? Az egyik lehetséges választ egy zseniális tudóstól, Louis Pasteurtól kaphatjuk. Egy – valószínűleg hiteles – anekdóta szerint az öreg Pasteur minden délután pontosan három és fél négy között gyors léptekkel fel és alá sétált a kertjében és közben magában beszélt. Munkatársai kíváncsiak voltak, hogy mit mormol magában az öregúr és egyikük elrejtőzött egy közeli bokorban, hogy kihallgassa. A manőver sikerült, megtudták, hogy egyetlen mondatot ismételtgetett: *„Il faut travailler”*. Azaz magyarul: *„Dolgozni kell.”*

ALZHEIMER-KÓR: LE TUDJUK-E LASSÍTANI A BETEGSÉGET, LESZ-E OKI TERÁPIA?

Penke Botond¹, Szűcs Mária¹ és Bogár Ferenc²
¹SZTE, SZAOK, Orvosi Vegytani Intézet, ²ELKH-SZTE,
Biomimetikus Rendszerek Kutatócsoport

1. Az Alzheimer-kór a mindennapokban

Az Alzheimer-kór (AK) és a demencia fogalma elválaszthatatlan egymástól. A demencia egy gyűjtőfogalom, ami a memória és a gondolkodási képességek hanyatlásával járó tünetek csoportját írja le. A demenciának számos különböző típusa létezik. Az AK esetében az öregedés a fő kockázati tényező, 65 éves kor felett a rizikója 5 évenként megkétszereződik. Egyik előző tanulmányunkban már részletesen tárgyaltuk az öregedés, a demencia és az AK összefüggéseit [1].

Az AK okozza a demenciák nagy részét (60-80 %), ami az újabb kutatások szerint nem is egyetlen betegség, hanem egy nagyon bonyolult betegség-csoport. A betegség során a sokszorosan összekapcsolódó degeneratív folyamatok meghatározott sorrendben kikapcsolják és elpusztítják az agy sejtjeit, a homeosztázis összeomlik.

A degeneratív agyi betegség 5-15 év alatt zajlik le. A betegek először elvesztik térbeli tájékozódási képességüket és időérzékelésüket. A régmúlt eseményeire jó ideig még tisztán emlékeznek, az új történésekre viszont nem vagy alig. Ahogyan a betegség előre halad, egyre kevésbé vannak tisztában a saját állapotukkal. A mindennapi feladatokat (pl. tisztálkodás, öltözködés, evés, ivás) egyre nehezebben tudják ellátni, végül képtelenek lesznek az önellátásra és 24 órás felügyeletet igényelnek. A magatartásuk, személyiségük is megváltozhat. Gyakoriak az alvászavarok, téveszmék és az érzelmi sivárság. Jellemzőek az éjszakai bolyongások, elkóborlások, eltévedések. A demencia általában nem okoz közvetlenül halált, a betegek legtöbbször más egészségi probléma miatt hunynak el.

Az AK tehát egy hosszan elhúzódó, jelenleg gyógyíthatatlan, krónikus betegség. Még nem ismert, hogy az öregedés miatti kognitív károsodások hasonlítanak-e a korai AD-deficitekhez. Jelen összefoglalónk elsősorban az AK gyógyszer-kutatási lehetőségeivel foglalkozik. Miért nem sikerült eddig áttörést elérni a kutatásokban? Milyen szerepet játszik az öregedés, illetve a genetikai háttér az

AK kialakulásában? Le tudjuk-e lassítani a betegség lefolyását, lesz-e a közeljövőben oki terápia? Milyen gyógyszer-célpontok a legígéretesebbek? Korai diagnózis esetén van-e esélyünk a betegség gyógykezelésére?

2. A betegség amiloid- és tau-hipotézise

A „preszenilis demencia” jeleit 1906-ban ismerte fel A. Alzheimer egy 51 éves nőbetegnél, a beteg agyának boncolás utáni patológiai vizsgálata anomáliákat mutatott ki a metszetekben: fehérje csomók, extracelluláris plakkok és intracelluláris neurofibrilláris fonatok jelenlétét [2]. E. Kraepelin javaslatára ezt a demenciát a felfedezőjéről Alzheimer-kórnak nevezték el. Kiderült, hogy ez egy ritka familiáris (autoszóm domináns) öröklődésű betegség, amelyet bizonyos génhibák, mutációk váltanak ki. A betegség viszonylag fiatal korban jelentkezik (40-50 évesen, de még a 65. életév előtt). Alzheimer tehát mai tudásunk szerint a fiatalabb korban jelentkező formát (Early Onset Alzheimer Disease, EOAD) ismerte fel.

A hasonló tünetekkel járó, de sokkal gyakoribb, sporadikusan jelentkező szenilis demencia viszont a 65 évesnél öregebbek betegsége (Late Onset Alzheimer Disease, LOAD). Csak 1970-ben ismerték fel, hogy a kétféle szenilis demencia, az EOAD és a LOAD azonos patológiát mutat, tehát azonos betegségről van szó [3]. Az AK betegek kivül a Down kóros egyéneknél is kimutathatók az agyban a kongóvörössel jól festődő amiloid plakkok. A kutatók ezekből a plakkokból 1984-ben egy 42 kDa móltömegű peptidet izoláltak, ezt β -amiloidnak ($A\beta$) nevezték el [4]. Mivel a Down kórt a 21. kromoszóma triszómiája váltja ki, logikusnak tűnt, hogy a 21. kromoszómában reprezentált amiloid prekursor protein (APP), illetve a belőle proteolízissel képződő 37-43 aminosavból álló peptidek túltermelése felelős az amiloid plakkok és a demencia kialakulásáért.

Közismert, hogy az öregedés többszáz fehérje aggregációjával és esetenként kicsapódásával jár együtt, de legtöbbször ezek a folyamatok nem váltanak ki betegséget [5]. Ennek ellenére általánosan elfogadott az a nézet, hogy a neurodegeneratív betegségek (Alzheimer-, Parkinson-, Huntington-kór, amiotrófiás laterális szklerózis) kialakulása együtt jár a fehérje feltekeredés (folding) és a proteosztázis zavarával. Az aggregációra való hajlam a fehérjék primer szerkezetének ismeretében megjósolható (pl. a Budapest Amiloid Prediktor) segítségével [6]). Az öregedés (ami az AK legfontosabb rizikó faktora) együtt jár a proteosztázis romlásával, toxikus fehérje aggregátumok képződésével, ezek egyike az $A\beta$ [7]. Az $A\beta$ alkotja az amiloid plakkok jelentős

részét és az eredeti amiloid-hipotézis szerint ez indítja el betegséget [8].

Az AK esetében az A β aggregáció és plakk-képződés mellett mindig megjelennek a hiperfoszforilezett tau fehérjék (pTau) aggregátumai, amelyek neurofibrilláris kötegekbe (NFT) rendeződnek. A tau a sejtek számára életfontosságú fehérje, fontos szerepe van a szinapszisok felépítésében és működésében, a mikrotubuláris rendszer (MT) kialakításában és az axonális transzportban. A tau reprezentáló MAPT gén hat izoforma szintézisét teszi lehetővé, ezek nagy móltömegű fehérjék, sokféle poszttranszlációs módosítási lehetőséggel. Ha a tau bizonyos helyeken foszforileződik (Thr-231, Ser-235, -262, -293, -324 és -356), akkor megváltozik a töltésmintázata, szerkezete, kialakul a hiperfoszforilezett tau (pTau), amely nem képes a mikrotubulusok fehérjeihez kötődni és fibrillumokat, majd amiloid szerkezetű NFT-ket képez. Az AK betegek felénél még egy harmadik fehérje, az α -szinuklein is aggregátumokat képez, ez is a proteosztázis rendszer, a fehérjék minőségellenőrzésének (QC) zavarát mutatja.

Az AK eredeti amiloid-hipotézise szerint az A β túltermelődés, majd aggregáció és a plakkok képződése indítja a betegséget, ez felelős a pTau képződéséért és az NFT-k kialakulásáért, majd a krónikus neuro-inflamációért [9]. Az A β két protein-kináz, a DYRK és a FYN kináz aktiválásával katalizálja a pTau kialakulást.

A tau-hipotézis szerint viszont a betegséget a sejtet ért stressz hatások elleni védekezésként képződő tau fehérje túltermelődése és hiperfoszforileződése indítja el [10]. A pTau és NFT képződés időben megelőzi az A β túltermelődést és az amiloid plakkokat. Az NFT-k az APP enzim hasítását az A β képződés irányába tolják el, így a tau indítja az A β patológiát is. A betegséget a prionoid tau viszi át sejtről-sejtre [10]. A tau patológia jó korrelációban van a betegek kognitív állapotával. A hipotézis szerint tehát a taunak a betegség kialakulásában primátusa van: az AK patogenezisében a tau játszik központi szerepet. Így a tau is potenciális célpontja az AK diagnosztikai és terápiás kutatásainak.

A sejtekben akkumulálódó és egy kritikus koncentráció felett spontán aggregálódó amiloidok kölcsönhatásba lépnek a sejtszervecskékkel. Az A β aggregátumok olyan kinázokat (pl. GSK-3 β) aktiválnak, amelyek elindítják a mikrotubulus-asszociált tau fehérje hiperfoszforileződését [16]. Az A β a mitokondriumokkal kölcsönhatásba lépve csökkenti azok aktivitását, az ATP képződést. Az A β megzavarja a sejtek Ca²⁺ és protein homeosztázisát is. A

lizoszómákhoz kapcsolódó A β csökkenti a proteosztázisban kulcsszerepet játszó autofágia aktivitást. Ezek a hatások összegződve a sejt halálához vezetnek.

Mivel mind az amiloid-, mind a tau-hipotézis alapján tervezett AK gyógyszer-jelöltek használhatatlannak bizonyultak, a betegség magyarázatára más hipotéziseket dolgoztak ki (ezeket összefoglaltuk előző cikkünkben [11]). Ezek a betegség kialakulásának egy-egy oldalát ragadják meg és nagy részük közös nevezőre hozható egymással. Az utóbbi években két újabb hipotézist is kidolgoztak, a celluláris, illetve a demielinizációs hipotézist, melyek részleteit a 6. fejezetben tárgyaljuk.

3. Az AK patológiája

A betegség patológiai leírása elsősorban a szürkeállomány vizsgálatára korlátozódott: az amiloid plakkok és NFT-k megjelenésére, eloszlására. A vizsgálatok sokszor ellentmondásokhoz vezettek: amiloid plakkokat találtak egészséges, nem demens egyéneknél is, akik semmilyen demencia tünetet nem mutattak [12, 13]. Emiatt sokan megkérdőjelezték az egész amiloid-hipotézist, és heves viták alakultak ki az egyes A β aggregátumok toxicitása körül is.

Az A β depozitoknak a valóságban legalább három különböző formája alakul ki a különböző agyi régiókban (diffúz, maggal rendelkező és neuritikus plakkok). A diffúz plakkok a betegség valamennyi stádiumában kimutathatók, de ezeket Thal és mtsai benignus formának tartják [14]. Ezzel szemben a tömör maggal rendelkező és a sejttörmelékekkel, neuritokkal körülvett neuritikus plakkok már az érett formát jelentik. Utóbbiak csak a betegség későbbi fázisaiban és olyan agyterületeken mutathatók ki, ahol már komoly léziókat találunk.

Mind az A β tartalmú amiloid plakkok, mind a neurofibrilláris kötegek megjelenése adott sémát követ és kialakulásuk helye előre megjósolható. Thal és mtsai öt különböző amiloid plakk-képződési fázist különböztetnek meg [13]. Más patológiai vizsgálatok (az NFT-k kialakulása, megjelenése) alapján hat szintet különítenek el, ezek a szintek jól korrelálnak a megfigyelt klinikai tünetekkel [15]. A két különböző patológiai rendszer (A β és pTau aggregátumok képződése, lokalizációja) az utolsó fázisokban jól korrelál egymással.

Az AK-ban az amiloid és tau aggregátumok mellett más patológiás fehérje aggregátumok is kimutathatók, ilyen pl. a Léwy testes patológia az amigdala-típusú AK-ban. Ez is a proteosztázis rendszerének zavarát mutatja.

Az AK-ban elhalt betegek agyának részletes patológiai vizsgálata sok más elváltozásra is rámutatott. Alzheimer már 1911-ben leírta, hogy a betegeknél az agy fehérállománya is komoly leépülést szenved, demielinizáció játszódik le. Ebben elsősorban az oligodendrociták (ODC) érintettek. Ez a felfedezés elkerülte a későbbi kutatók figyelmét, pedig a mielin patológia időben megelőzi az amiloid és tau depozitok jelentkezését, már a legkorábbi szimptomamentes stádiumban kimutatható elektronmikroszkópos és MRI vizsgálatokkal. A lipid anyagcsere zavarai miatt sérülnek az idegsejtek axonjait burkoló ODC-k. A mielin lassú leépülése az öregedéssel együtt jár, de az AK esetében ez a folyamat felgyorsul az ODC-k nagyfokú sérülékenysége következtében [16]. A betegek agyában jól kimutatható a mitokondriumok sérülése, működési zavara, ugyanez érvényes a lizoszómákra is, amely folyamatok a sejt energiatermelésének és az autofágiának zavarát okozzák. A betegek agyában krónikus neuroinflammáció alakul ki. A kór igazolhatóan sejtről-sejtre terjedhet az anatómiai utak mentén, ezért valószínűleg a prionoid karakterű pTau, az NFT-k a felelősek [17].

4. Az Alzheimer-kór genetikai háttere. Az amiloid-hipotézis bizonyítékai és ellentmondásai

Az amiloid-kaszád eredeti hipotézisét elsősorban a korai jelentkezésű, családi öröklődésű betegség (EOAD) lefolyása támogatja. Az APP-t az agy sejtjeinek membránjában különböző enzimek (α -, β és γ -szekretáz) hidrolizálják és alakítják át egy 37-43 aminosavból álló peptid keverékké. Számos APP mutáció (svéd, holland, londoni stb.) növeli az A β peptidek aggregációs készségét és indítja el a betegséget. Eddig kb. 60 ilyen mutációt ismertünk meg [18]. Nemcsak az APP, hanem a γ -szekretáz enzimkomplexet alkotó preszenilin-1 és -2 (PS-1, PS-2) fehérje mutációi is kiválthatják a korai AK demenciát. Eddig több mint 350 ilyen mutattak ki, ezek felelősek az EOAD esetek 80 %-áért. Ismerünk védő APP mutációkat is, ilyen az izlandi populációban található pontmutáció, amelynél az APP egyetlen aminosav cseréje (A673T) gyakorlatilag megszünteti az A β peptidek aggregációs készségét [19].

A kutatások bebizonyították, hogy az APP-nek és a β -amiloid peptideknek fontos élettani, neuroprotektív szerepe van, de túltermelődésük, illetve mutációik toxikus amiloidok kicsapódását eredményezik [20].

Az AK fontos rizikófaktor az ApoE fehérje epsilon-4 alléljének (ApoE4) megléte [21]. Az ApoE fehérje génjének 3 allélje van, ezek közül az ApoE2 neuroprotektív, az ApoE3 közömbös, az ApoE4 neurodegeneratív hatású. Az ApoE4

heterozigótáknál az átlagosnál 4-szer, a homozigótáknál 15-ször nagyobb az AK előfordulási valószínűsége. Az ApoE fehérje elsősorban a lipid transzportért, a koleszterin beépülésért felelős és kulcsszerepet játszik az axonokat védő, szigetelő mielin hüvely kialakításában (lásd 10. fejezet).

A kutatók genomszintű asszociációs vizsgálatokkal (genome-wide association study, GWAS) mintegy 100 olyan gént mutattak ki, amelyek mutációja hozzájárul az AK kialakulásához [15]. Várhatóan rövid időn belül sokkal jobban meg fogjuk ismerni azokat a génkombinációkat, amelyek a LOAD kialakulásáért felelősek.

5. Melyik A β forma toxikus?

Az APP enzim hasításával az A β peptidek heterogén keveréke képződik. A neuroprotektív hatású monomer A β 1-42 fiziológiás koncentrációja nanomólos nagyságrendű [22]. Mikromólos koncentrációnál spontán beindul az A β aggregáció, ezt a sejtek számos építőanyaga (pl. gangliozidok, koleszterin, kétértékű kationok, D-aminosavak stb.) katalizálja [23]. Az aggregáció során sokféle aggregátum képződik, amelyeket más és más nevekkkel különböztetünk meg egymástól (A β oligomer – protofibrillum – cross- β szerkezetű fibrillum).

Mindmáig kérdéses, hogy melyik aggregációs forma a toxikus, melyiket válasszuk gyógyszer-célpontnak? A 90-es években a nagyobb aggregátumokat és a plakkokat tekintették az igazi célpontoknak, így az APP hidrolizáló enzimek teljes gátlásával próbálták megakadályozni az A β bioszintézisét [24]. Ezek a kísérletek eredménytelenek voltak, sőt egy γ -szekretáz gátló gyógyszerjelölt még növelte is a demenciát.

Ezért módosították az amiloid-hipotézist, a 2000-es évek elején már az A β oligomereket tekintették célpontnak. (A szolubilis A β oligomerek mozgékonyabbak a fibrillumoknál és bárhova el tudnak jutni, kölcsönhatva különböző agyi fehérjékkel). Így számos AK kutatócsoport dolgozott különböző A β oligomerekkel. 2006-ban S. Lesné és K. Ashe a Nature-ben közölték, hogy sikerült egy viszonylag stabil A β oligomert izolálniuk, ez az A β dodekamer (A β *56, A β csillag 56). Ez egy 12 monomerből álló, 56 kDa móltömegű aggregátum, amit egy transzgenikus egértörzs agyából izoláltak [25]. Az egerekből izolált A β *56 fiatal patkányok agyába injektálva kognitív zavarokat és memóriaromlást idézett elő. A közleményt több mint 2300-szor idézték eddig, ez lett az Alzheimer-irodalom egyik legtöbbet idézett cikke. 2022-ben Schrag a

Science folyóiratban megkérdőjelezte Lesné cikkének helyességét [26]. Véleménye szerint a 2006-os Lesné cikk eredményei részben manipuláltak, és a cikk ábrái (különösen a Western blotok) hamisítottak, bizonyíthatóan „copy paste” technikával készültek. Érdekes, hogy a kutatók többsége szerint ez a hamisítás alapvetően nem befolyásolja az amiloid-hipotézis érvényességét, viszont nagy támadási felületet jelent. Mivel a kutatóknak nem sikerült reprodukálni Lesné eredményeit, az A β *56 létezése nem bizonyított. Komoly kutatócsoportok nem tudták kimutatni az A β *56 jelenlétét sem humán szövetekben, sem testfolyadékokban.

A gyógyszeripar nem foglalkozott az A β *56 iránnyal, mivel nem sikerült bizonyítani a dodekamer létezését. Mai tudásunk szerint csaknem kizárt, hogy az AK-t kiváltó faktor egyetlen, meghatározott szerkezetű és móltömegű peptid legyen. A kimutatási módszerek fejlődésével felismertük, hogy a humán szövetekben és testfolyadékokban nagyszámú különböző A β peptid található nanomólos koncentrációban. Az APP hidrolízisével kapott A β peptidek egymással bonyolult egyensúlyi elegyet alkotnak. A kutatók ezekkel a komplex egyensúlyi elegyekkel végzik kísérleteiket.

6. Az AK modern szemlélete, a celluláris-hipotézis. Az AK tölcser-modellje

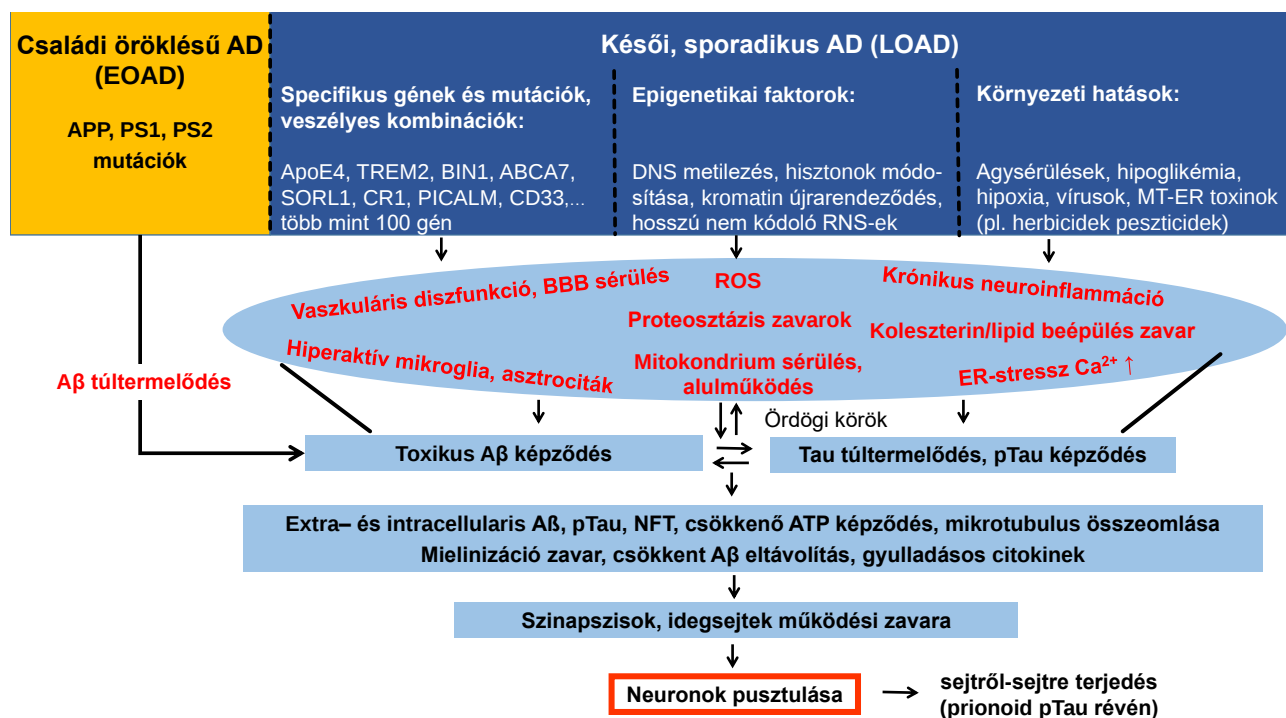
Az amiloid-kaszád (és a többi AK hipotézis) újragondolása a következő eredményekre vezetett. Kliniko-patológiai szempontból az AK egy heterogén betegségecsoport, amely különböző patobiológiai altípusokra osztható. Az AK inkább egy kontinuum, egy szindróma és nem egyetlen betegség. A betegség heterogén jellege miatt valószínűleg egy többcélpontú terápia lesz a sikeres kezelés alapja.

Az AK kialakulásának celluláris-hipotézise [27] szerint az agy szinte valamennyi sejtje érintett a betegség kialakulásában. Az AK patogenezisének három fázisa van: a biokémiai, celluláris és klinikai fázis. A biokémiai fázisban az amiloid eltávolítás (clearance) elégtelensége és a proteosztázis zavara miatt patológiás A β és tau képződés és akkumuláció játszódik le a sejtekben. Ennek a folyamatnak az indításában jónéhány gén játszik szerepet (pl. APOE4, LRP1, ABCA7, SORL1, PICALM és AQP4). A celluláris fázisban valamennyi sejtípus részt vesz a patológiás folyamatokban. Krónikus neuroinflammáció alakul ki, sérülnek a neuronhálózatok és elkezdődik a sejtek halála. A klinikai fázisban már

jól kimutatható a hippocampus zsugorodása, általános az agy térfogat csökkenése, a cerebrospinális folyadékban (CSF) kimutathatók az amiloid proteinek és elkezdődik a demencia. Az egész folyamat kb. három évtizedet vesz igénybe [27]. Ez a hipotézis szinte minden eddigi felismerést egyesít és jól használható modellt nyújt a gyógyszerkutatásokhoz.

Bizonyítható, hogy a koleszterin beépülés és transzport zavarai csökkentik az oligodendrociták mielinizációját és ez funkcionális kapcsolatban van a memória hanyatlással [28]. Szintén bizonyítható, hogy az AK kialakulásában fontos szerepet játszik a vaszkuláris patológia, illetve az amiloid-depozitok megjelenésére adott immunválasz [29].

Az eddig ismertetett sokféle hipotézis és a lezárt klinikai vizsgálatok eredményei alapján összeállítottunk egy modellt az AK kialakulásának és progressziójának magyarázatára (1. ábra).



1. ábra. Az Alzheimer-kór progressziójának tölcsermodellje.

Ezen modell alapján az Aβ és a tau fehérjén kívül számos új célpont (pl. biokémiai reakciók, szignalizációs utak, élettani-kórélettani folyamatok) jelölhető ki. A specifikus gének és mutációk ismeretében már nincs messze az az idő, amikor egy adott személy genomjának elemzésével, genetikai teszttel jelezni lehet a sporadikus AK megjelenésének valószínűségét és kiszűrhetők a

veszélyeztetett személyek.

7. Az Alzheimer-kór gyógyszerkutatásának nehézségei

Alapvető probléma, hogy az A β és a tau natív formájukban életfontosságú fehérjék, teljes kikapcsolásuk paradox hatásokat eredményez. Sok kutató szkeptikus a központi idegrendszer neurodegeneratív betegségeinek gyógyításával kapcsolatban. Ha az agy vagy a gerincvelő idegsejtjei elpusztulnak, az idegszövet nem regenerálódik, a neuronok jelenleg pótolhatatlanok. A központi idegrendszeri sérülések rehabilitációval javíthatók ugyan, de ezek a terápiák csak a nem sérült idegsejteket és agyszövetet kapcsolják be a kiesett funkciók helyettesítésére. A neuronok, illetve a hibás, mutált fehérjék pótlása és az összejt terápiák alkalmazása ezen a területen még a kezdeteknél tart.

Ha az AK-t későn diagnosztizálják, nem sok remény van a betegség kezelésére, a demencia folyamatának lelassítására. A jelenleg elérhető, engedélyezett gyógyszerekkel (memantine, kolinészteráz inhibitorok) csak időleges javulás érhető el. Az elmúlt időszakban engedélyezett monoklonális antitestekkel történő kezelések némi javulást hozhatnak ezen a területen (lásd 9. fejezet).

Az AK gyógyszerkutatás egyik legnagyobb akadálya a megfelelő állatmodell hiánya. Nagy problémát okoz a transzgenikus rágcslókkal kapott eredmények translációja. Magát a gyógyszerkutatási célpontot is nehéz meghatározni: az A β vagy a pTau valamelyik aggregációs formája legyen célpont, vagy magának az aggregációs folyamatnak a gátlása? S ha elfogadjuk, hogy az öregedés az AK legveszélyesebb rizikófaktora, akkor milyen állatmodellt használjunk, és hogyan lassítsuk le az öregedés folyamatát? A mai fejlett géntechnikák korában nem lehetetlen egy alkalmas állatmodell kidolgozása (a Cyagen biotechnikai vállalat több mint 4000 knockout (KO) és kondicionális KO egértörzset tart nyilván és szállít). A betegség heterogén jellege miatt valószínűleg több különböző modellre lesz szükségünk, alcsoportok szerint másra és másra. Külön gondot jelent a két- vagy többkomponensű gyógyszerkombinációk klinikai kipróbálása, mivel a külön-külön vizsgálandó csoportok miatt a kísérletekbe nagyszámú beteget kell bevonni.

8. Az eddigi gyógyszerkísérletek, klinikai alkalmazások sikertelensége

Eddig több mint 400 klinikai vizsgálat (ezek között több mint harminc fázis-3) kezdődött az AK gyógyszerjelöltekkel és ezek összesen két gyógyszer, az Aduhelm® és a Leqembi® engedélyezését eredményezték. Az AK egyike azoknak

a betegségeknek, amelyeknél a legmagasabb a sikertelen gyógyszerfejlesztések aránya. Néhány gyógyszergyár (pl. a Pfizer) és több kutatócsoport már fel is adta az AK gyógyszerkutatást.

Bár sok gyógyszerjelölt a preklinikai állatkísérletekben kivédte a kognitív hanyatlást, a klinikai vizsgálatokban (néhány monoklonális antitest kivételével) eddig minden jelölt hatástalannak bizonyult. Csak néhány példát sorolunk fel a klinikai kísérletek eddigi sikertelenségére és ezek valószínű okaira (részleteket több összefoglaló cikkben is találunk [23, 24]).

A β - és γ -szekretáz A β keletkezésében játszott fontos szerepe miatt várható volt, hogy inhibitoraik az AK potenciális gyógyszerei lesznek. Mindkét enzimnek számos gátlószerét állították elő és ezeknek egy része klinikai vizsgálatokba (fázis-2 és fázis-3) is került. Az eddig tanulmányozott BACE-1 (β -szekretáz) inhibitorok csökkentették ugyan az A β képződést, de nem akadályozták meg és nem is lassították le a kognitív hanyatlást. A γ -szekretáz inhibitorok vizsgálata még rosszabb eredményekre vezetett: a gyógyszerjelöltek (számos mellékhatás mellett) még növelték is a kognitív hanyatlás sebességét. Ezek a negatív eredmények valószínűleg azzal magyarázhatók, hogy az enzimgátlók alkalmazása túllőtt a célon: a gyógyszerjelöltek teljesen leállították az A β bioszintézist, pedig a neuronoknak nanomólos koncentrációban szükségük van a neuroprotektív hatású A β peptidre.

Mivel az A β toxikusnak tartott formái egy kritikus koncentráció felett, a monomer A β konformációváltozása után aggregációval alakulnak ki, az aggregációt gátló anyagok az AK potenciális gyógyszerei. A természetben sok ilyen vegyület fordul elő (polifenolok, tetraciklinek, antraciklinek, szterolok). Szintetikus vegyületek (peptidek és peptidmimetikumok) is gátolják az A β aggregációt. Sajnos az eddigi klinikai vizsgálatokban ezek a vegyületek hatástalannak bizonyultak [30].

A tau-hipotézis alapján tervezték a kutatók a tideglusib elnevezésű vegyületet, amely a GSK-3 β enzim szelektív inhibitora. (Ez az enzim felelős a tau hiperfoszforilációért és így közvetett módon a pTau aggregátumok, NFT-k képződéséért). A tideglusib és a hasonló vegyületek csökkentették ugyan a pTau aggregációt és a neuroinflammációt, de a klinikai vizsgálatokban a kognitív hanyatlást nem lassították, hatástalanok voltak [24]. A pTau aggregációjának gátlása jó célpontnak látszott, ezt kismolekulájú vegyületekkel, pl.

leukometilénkék származékokkal (LMTM)) is próbálták megoldani. A preklinikai vizsgálatok alapján kiválasztottak egy sokat ígérő vegyületet, de ez is hatástalannak bizonyult a nagyszámú AK -páciens bevonásával végzett fázis-3 vizsgálatokban. Más, hasonlóan pTau aggregációt gátló kismolekulájú vegyületek alkalmazása is sikertelen volt eddig [31].

A passzív immunterápia (monoklonális antitestek alkalmazása az A β neutralizálására) az AK korai fázisában részleges sikert hozott (lásd 9. fejezet). A tau fehérje akkumuláció lassítására és megállítására alkalmazott antitest-terápiák viszont teljesen sikertelennek bizonyultak, egyedül a Roche gyógyszergyár egyik monoklonális antitestje, a Semoniremab mutatott némi hatást.

9. Van-e már Alzheimer-kór gyógyszerünk? Monoklonális antitestek: aducanumab, lecanemab, donanemab

Már húsz évvel ezelőtt felmerült az aktív immunterápia alkalmazása az AK gyógyítására [32]. A klinikai vizsgálatok során AK betegeket immunizáltak az A β 1-42 peptidet tartalmazó vakcinával (AN-1792). A vakcinálás magas antitest titert eredményezett és eltávolította az amiloid plakkok nagy részét az agyból, de a demenciát nem állította meg és nagyon komoly mellékhatást (meningo-encephalitis, agyvelőgyulladás) okozott.

Sikeresebb volt a passzív immunterápia az A β különböző epitópjait felismerő, humanizált IgG1 monoklonális antitestek (mAB) segítségével. A mAB-ok alkalmazása arra a felismerésre épül, hogy az agyban lévő szolubilis A β (sA β) mennyisége jó korrelációban van a neurodegeneráció súlyosságával, tehát a kezelések során az sA β -t el kell távolítani. Jelenleg hat ilyen antitest jutott el a fázis-3 vizsgálatokig, ezek közül három (aducanumab, lecanemab és a donanemab) elég hatásosan távolítja el az amiloid plakkokat az agyból. Az aducanumab (Aduhelm®) alkalmazását 2021 júniusában az FDA engedélyezte az AK gyógykezelésére [33], az engedélyezés óriási szakmai vitát váltott ki. Az antitest komoly mellékhatásokat is okoz („amyloid related image abnormalities” (ARIA), vagyis vazogén ödéma és hemorrágia kialakulása).

Valamivel jobb hatást értek el a lecanemab elnevezésű mAB-bal, amelynek használatát 2023 januárjában engedélyezte az FDA Leqembi® névvel. Ez az antitest az A β N-terminálisának 1-16 közötti epitóp szakaszát ismeri fel és a toxikus protofibrillumok neutralizálására tervezték. A betegek egy részénél (13 %) itt is jelentkeztek a mellékhatások (ARIA , vazogén ödéma és vérzések), a

gyógyszer engedélyezése ebben az esetben is heves vitákhoz vezetett.

A donanemab nevű antitest az A β egy rövidebb, az N-terminálisán piroglutaminsavat tartalmazó változatát (A β p3-42) célozza meg, ez a peptid az amiloid plakkok egyik fő alkotórésze [34]. Ez az antitest tehát a plakkok anyagával, a már lerakódott amiloid-depozitokkal, a plakkok magjával lép reakcióba és távolítja el őket. A donanemab az intracelluláris A β -val is reagál. Sajnos ez a mAB is ARIA-t okoz [35].

Sokan azt gondolták, hogy ha nagyobb mennyiségű mAB-ot sikerülne bejuttatni a vér-agy gáton (BBB-n) keresztül az agyba, akkor megoldódna a korai fázisban lévő AK betegek kezelésének gondja. Sajnos az eddigi vizsgálatok azt mutatták, hogy az ARIA mellékhatás kialakulása is dóziszfüggő, így a nagyobb mennyiségben bejuttatott mAB a mellékhatást is növeli.

A monoklonális antitestek kutatása valószínűleg sikerre vezet, de most még nem mondhatjuk azt, hogy kezünkben van az AK gyógyszere. Semmiképpen nem ideális az a gyógyszer, amelyet 2-4 hetenként a beteg életének végéig ismételt infúzióval kell bejuttatni a szervezetbe. (Ilyen mennyiségnél az antitestek előállításának költsége sem elhanyagolható). A mAB-ok mellékhatását is jó lenne csökkenteni. Az eddigi vizsgálatok azt mutatták, hogy a monoklonális antitestek csak lassítani tudták a betegség progresszióját, de a korán felismert AK betegeken mAB-ok a demencia folyamatát nem állították meg. Egy igazi áttörés továbbra is hiányzik az AK terápiájában, így reménykedve várjuk a donanemab vizsgálatok végső eredményét.

10. Lesz-e valamikor hatékony AK gyógyszer? Új terápiás lehetőségek

Szinte hetente jelenik meg a médiában egy hír arról, hogy megoldották az AK gyógykezelését, vagy igen közel vannak a megoldáshoz. A valóság ezzel szemben az, hogy még igen hosszú út áll előttünk.

A sikeres gyógykezeléshez kulcsfontosságú az AK korai felismerése. A diagnosztikai módszerek fejlődésével rövid időn belül rutin tömegspektrometriás (MS) módszerekkel (pl. a szérumban pTau-217 szint mérésével) sikerül megoldani a kései jelentkezésű, sporadikus AK időben történő kiszűrését és a kezelések elkezdését [36]. Az MS módszer alkalmas lehet egy adott generáció teljeskörű szűrésére is.

Az eddigi kutatási eredményeknek az a végső konklúziója, hogy az AK kialakulásában nagyon fontos szerepet játszik mind az A β peptid, mind a tau protein. Így ezek továbbra is a gyógyszerkutatások célpontjai. Ezért érdemes kombinációs, az A β és a pTau szintet egyidejűleg csökkentő mAB terápiában gondolkoznunk. Jelenleg már 168 családi öröklésű, 40-50 éves EOAD pácienssel fut egy olyan klinikai vizsgálsorozatot, amelyben a betegek valamennyien kapnak lecanemabot és mellette egy tau-csökkentő antitestet (E2814) [37]. A tau antitest alkalmazása nehéz feladat: olyan mAB-ot kell előállítani, amelyik nem keresztreagál a natív tauval, csak a pTau fehérjével. Kevés példa van specifikus pTau kötő, jól működő mAB előállítására. A kutatók azt remélik, hogy a tau-fehérje neutralizálása felerősíti a lecanemab már igazolt, de viszonylag szerény protektív hatását.

Olyan kombinált kísérleteket is terveznek, amelynek első lépésében az antitesttel (pl. lecanemab) eltávolítják az agyból az amiloid plakkokat, majd egy β -szekretáz inhibitorral folyamatosan fenntartják az alacsony amiloid szintet, hogy ne alakuljanak ki újra a plakkok. A BACE-1 inhibitor toxikus mellékhatását alacsony dózisok alkalmazásával kerülik el [38].

Ha egy mAB eltávolítja a plakkok java részét, megnyílik az út egy másik alkalmazás felé is, és ez a krónikus neuroinflammáció gátlása [39]. A neuroinflammáció ugyan csak az AK második, celluláris fázisában indul be, de ez a demencia kifejlődésének fontos rizikófaktor. Az A β aggregátumok fokozzák a gyulladást serkentő faktorok (TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-18, NO stb.) felszabadulását és az NLPR3 inflammaszóma képződését. Az autofágia serkentésével el lehet távolítani az inflammaszómaikat, ezért az autofágiát indukáló anyagok az AK potenciális gyógyszerei. Komoly kutatások folynak a szigma-1 receptor ligandjaival is, mivel egy részük akadályozza a gyulladást serkentő citokinek hatását és ezáltal a sejtek pusztulását [40].

A mikroglia (MG) immunsejtjei központi szerepet játszanak az AK kialakulásában. Ezeknek az immunsejteknek az a feladata, hogy folyamatosan ellenőrizzék az agy sejtjeinek és a szinapszisoknak az állapotát és szükség esetén fagocitózissal eltávolítsák a sérült sejteket. Az MG sejteknek több formája van: nyugvó-kvieszcens, betegségkapcsolt pro-fagocitáló és disztópikus, aberrált állapot. A kutatások célja azoknak a megfelelő MG sejteknek az azonosítása és aktiválása, amelyek alkalmasak a betegség lelassítására, megállítására. A MG aktiválás mellett kísérleteznek az asztrociták

A β -lebontó aktivitásának növelésével is. A gyulladásgátló gyógyszerek és a MG aktiváló anyagok alkalmazásával már nagyszámú klinikai vizsgálat folyik (öt fázis-1, kilenc fázis-2 és egy fázis-3 kísérlet). Ezek közül emeljük ki a legfontosabb gyógyszer-célpontokat [23]:

- 1) A TNF α szignalizáció modulálása
- 2) A lép Tyr-kináz enzim (SYK) aktiválása a MG clearance funkciójának javítására
- 3) A CX3CR1 (C-X3-C Motive Chemokin Receptor) gén aktiválása, az MG fagocitáló funkciójának megerősítésére
- 4) A TREM2 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 2) mikroglia fehérje aktiválása a pTau akkumuláció lelassítása céljából
- 5) A PLC γ (phospholipase C γ 1) enzim aktiválása a MG védő szerepének javítására
- 6) Az INPP5 (Inositol Polyphosphate-5-phosphatase) enzim modulálása az MG scavenger aktivitásának javítása céljából.

Új gyógyszerkutatási irányt jelent az A β natív, helikális szerkezetének stabilizálása, az amiloid aggregáció megakadályozása. Erre több megoldással kísérleteznek: egyrészt az A β -val együtt aggregálódó hidrofób, szintetikus peptidekkel (NCAM-PrP; [41]), másrészt az A β aggregációt gátló medin, illetve a 14-3-3 fehérjék inhibitoraival próbálják leállítani a toxikus aggregátumok képződését [23].

A tau túltermelés megakadályozására, a toxikus NFT-k kialakulásának gátlására is több módszerrel kísérleteznek, Legígéretesebbnek a retromer komplex aktiválása, vagy a bassoon (szinaptikus protein) és a tau interakció gátlása tűnik [23].

Mivel a neurovaszkuláris egység (NVU) alulműködése döntő szerepet játszik az AK kialakulásában, olyan kutatások indultak meg, amelyek az NVU működés regenerációjának elősegítését, illetve az alulműködés kialakulásának megakadályozását célozzák [42]. Mind a BBB-n keresztül történő A β eltávolítással (az LRP1 és P-gp fehérjék expressziójának növelésével), mind a glimfatikus rendszer aktiválásával növelhető az A β clearance.

Az AK bizonyos alcsoportjában talán a génterápia is alkalmazható. Ismert, hogy az ApoE4 gén megsokszorozza az AK kialakulásának valószínűségét, ezzel

szemben az ApoE2 neuroprotektív hatású. A kutatók ApoE4 homozigóta, tehát igen veszélyeztetett személyekkel olyan vizsgálatokat terveztek, amelyben megfelelő vírusvektor segítségével, injekcióval viszik be a hiányzó, protektív ApoE2 gént a CSF-be. Az eddigi eredmények biztatóak: a bevitt ApoE2 gén még egy év múlva is kimutatható volt a CSF-ben és a páciensek tau-szintje csökkent.

Új gyógyszercélpontot jelenthet az oligodendrociták demielinizációja. Ez az elváltozás talán az AK legkorábbi patológiás jele [28]. Az AK betegek ApoE4 alléllal rendelkező alcsoportjánál a koleszterin transzport és a beépülés zavarai miatt patológiás koleszterin depozitok jelennek meg az ODC-ben és ez csökkenti a mielinizációt. Állatkísérletek igazolták, hogy a koleszterin transzport elősegítése (pl. ciklodextrines kezelés) javította a mielinizációt [43]. Mivel így bizonyított funkcionális kapcsolat van az ApoE4, a koleszterin, a mielinizáció és a memória hanyatlás között, egy új lehetőség nyílik meg az AK kezelésére.

A legújabb állatkísérletek azt bizonyítják [44], hogy ha a tauopátiás egerek idegsejtjeiből kikapcsoljuk az ApoE4 allélt, drasztikusan lecsökken az NFT-k mennyisége és nem jelentkeznek a tauopátiára jellemző tünetek sem. A kísérletek szerint a neuronális ApoE4 központi szerepet játszik az AK progressziójában, ide értve a tau akkumulációt, neurodegenerációt és a mielin leépülést. Mivel az ApoE4 hatással van az egymáshoz kapcsolódó neuronokban a prionoid pTau továbbterjedésére, ez a lánc az ApoE4 kikapcsolásával megszakítható.

Az immunterápia sokat ígérő új módszere az AK kezelésére a perifériás immunrendszer stimulálása mAB segítségével [45]. Az AK ugyanis nem kizárólag az agy betegsége, kialakulásában fontos szerepet játszanak a perifériás immunsejtek is, amelyek részt vesznek az agy homeosztatikus-helyreállító folyamataiban. Egy checkpoint-fehérje, a Programmed Cell Death Ligand (PD-L1/PD-1) gátlásával stimulálni lehet a perifériás immunrendszert, így az agyba T-sejtek és monociták lépnek be, javítva az A β eltávolítást. Sikeres állatkísérletek folytak több AK egérmodellen az IBC-Ab002 mAB alkalmazásával, amely gátolja a PD-1 checkpoint fehérjét és ezáltal stimulálja az immunrendszert. Az elmúlt évben fázis-1 klinikai vizsgálatok is elindultak ezzel az antitesttel, az első eredmények 2024-ben várhatók.

11. Optimista kitekintés és konklúzió

Ma még nem ígérhetünk könnyű álmot azoknak, akik az AK-t kutatják. Be kell

vallanunk, hogy még nem találtuk meg az AK csodagyógyszerét. Talán egy természetes folyamat, az öregedés ellen kell harcolnunk, ha meg akarjuk őrizni kognitív képességeinket. A korai diagnózis módszerek fejlődése, az AK komplexitásának új szemlélete és a nagyszámú, a 10. pontban felsorolt új közelítési mód és célpont reményt ad több sikeres kezelési megoldásra. Optimistaként bízunk abban, hogy az AK egy-két évtizeden belül egy gyógyszerekkel és más terápiás eszközökkel kezelhető krónikus betegséggé válik, amivel együtt lehet élni.

Irodalom

- [1] Penke, B., Hortobágyi, T., Fülöp, L. (2016) Az öregedés és az Alzheimer-kór. *Magyar Tudomány*, **177**: 573–583.
- [2] Alzheimer, A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin*, **64**: 146–148.
- [3] Tomlinson, B.E., Blessed, G., Roth, M. (1970) Observations on the brains of demented old people. *Journal of the Neurological Sciences*, **11**: 205–242.
- [4] Glenner, G.G., Wong, C.W. (1984) Alzheimer's disease and Down's syndrome: Sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **122**: 1131–1135.
- [5] Groh, N., Bühler, A., Huang, C., Li, K.W., van Nierop, P., Smit, A.B., Fändrich, M., Baumann, F., David, D.C. (2017) Age-Dependent Protein Aggregation Initiates Amyloid- β Aggregation. *Frontiers in Aging Neuroscience*, **9**: 138.
- [6] Keresztes, L., Szögi, E., Varga, B., Farkas, V., Perczel, A., Grolmusz, V. (2021) The Budapest Amyloid Predictor and Its Applications. *Biomolecules*, **11**: 500.
- [7] Lindner, A.B., Demarez, A. (2009) Protein aggregation as a paradigm of aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1790**: 980–996.
- [8] Hardy, J., Allsop, D. (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, **12**: 383–388.
- [9] Hardy, J. (2006) A Hundred Years of Alzheimer's Disease Research. *Neuron*, **52**: 3–13.
- [10] Frost, B., Jacks, R.L., Diamond, M.I. (2009) Propagation of Tau Misfolding from the Outside to the Inside of a Cell. *Journal of Biological Chemistry*, **284**: 12845–12852.

- [11] Penke, B., Fülöp, L. (2015) Életmód- és táplálkozási-faktorok szerepe az Alzheimer-kór prevenciójában. *Biokémia*, **39**: 39–52.
- [12] Snowdon, D. (2001) *Aging with grace: what the nun study teaches us about leading longer, healthier, and more meaningful lives.* , Bantam Books, New York
- [13] Thal, D.R., Rüb, U., Orantes, M., Braak, H. (2002) Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, **58**: 1791–1800.
- [14] Thal, D.R., Capetillo-Zarate, E., Del Tredici, K., Braak, H. (2006) The development of amyloid beta protein deposits in the aged brain. *Science of aging knowledge environment: SAGE KE*, **2006**: re1.
- [15] Braak, H., Braak, E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, **82**: 239–259.
- [16] Cai, Z., Xiao, M. (2016) Oligodendrocytes and Alzheimer's disease. *International Journal of Neuroscience*, **126**: 97–104.
- [17] Wells, C., Brennan, S.E., Keon, M., Saksena, N.K. (2019) Prionoid Proteins in the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **12**: 271.
- [18] Penke, B., Bogár, F., Paragi, G., Gera, J., Fülöp, L. (2019) Key Peptides and Proteins in Alzheimer's Disease. *Current Protein & Peptide Science*, **20**: 577–599.
- [19] Jonsson, T., Atwal, J.K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P.V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., Hoyte, K., Gustafson, A., Liu, Y., Lu, Y., Bhangale, T., Graham, R.R., Huttenlocher, J., Bjornsdottir, G., Andreassen, O.A., Jönsson, E.G., Palotie, A., Behrens, T.W., Magnusson, O.T., Kong, A., Thorsteinsdottir, U., Watts, R.J., Stefansson, K. (2012) A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*, **488**: 96–99.
- [20] Nichols, R.A., Gulisano, W., Puzzo, D. (2022) Editorial: Beta Amyloid: From Physiology to Pathogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **15**: 876224.
- [21] Serrano-Pozo, A., Das, S., Hyman, B.T. (2021) APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. *The Lancet Neurology*, **20**: 68–80.
- [22] Jeong, H., Shin, H., Hong, S., Kim, Y. (2022) Physiological Roles of Monomeric Amyloid- β and Implications for Alzheimer's Disease Therapeutics. *Experimental Neurobiology*, **31**: 65–88.

- [23] Penke, B., Szűcs, M., Bogár, F. (2023) New Pathways Identify Novel Drug Targets for the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**: 5383.
- [24] Tatulian, S.A. (2022) Challenges and hopes for Alzheimer's disease. *Drug Discovery Today*, **27**: 1027–1043.
- [25] Lesné, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., Ashe, K.H. (2006) A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, **440**: 352–357.
- [26] Pillar, C. (2022) Blots on a field? *Science*, **377**: 358–363.
- [27] De Strooper, B., Karran, E. (2016) The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell*, **164**: 603–615.
- [28] Maitre, M., Jeltsch-David, H., Okechukwu, N.G., Klein, C., Patte-Mensah, C., Mensah-Nyagan, A.-G. (2023) Myelin in Alzheimer's disease: culprit or bystander? *Acta Neuropathologica Communications*, **11**: 56.
- [29] Trejo-Lopez, J.A., Yachnis, A.T., Prokop, S. (2022) Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics*, **19**: 173–185.
- [30] Giorgetti, S., Greco, C., Tortora, P., Aprile, F. (2018) Targeting Amyloid Aggregation: An Overview of Strategies and Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**: 2677.
- [31] Ashrafi, H., Zadeh, E.H., Khan, R.H. (2021) Review on Alzheimer's disease: Inhibition of amyloid beta and tau tangle formation. *International Journal of Biological Macromolecules*, **167**: 382–394.
- [32] Nicoll, J.A.R., Buckland, G.R., Harrison, C.H., Page, A., Harris, S., Love, S., Neal, J.W., Holmes, C., Boche, D. (2019) Persistent neuropathological effects 14 years following amyloid- β immunization in Alzheimer's disease. *Brain*, **142**: 2113–2126.
- [33] Song, C., Shi, J., Zhang, P., Zhang, Y., Xu, J., Zhao, L., Zhang, R., Wang, H., Chen, H. (2022) Immunotherapy for Alzheimer's disease: targeting β -amyloid and beyond. *Translational Neurodegeneration*, **11**: 18.
- [34] Mintun, M.A., Lo, A.C., Duggan Evans, C., Wessels, A.M., Ardayfio, P.A., Andersen, S.W., Shcherbinin, S., Sparks, J., Sims, J.R., Brys, M., Apostolova, L.G., Salloway, S.P., Skovronsky, D.M. (2021) Donanemab in Early Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, **384**: 1691–1704.
- [35] Rashad, A., Rasool, A., Shaheryar, M., Sarfraz, A., Sarfraz, Z., Robles-Velasco, K., Cherrez-Ojeda, I. (2022) Donanemab for Alzheimer's Disease: A Systematic Review of Clinical Trials. *Healthcare*, **11**: 32.

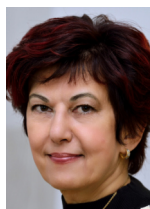
- [36] Ashton, N.J., Janelidze, S., Mattsson-Carlsson, N., Binette, A.P., Strandberg, O., Brum, W.S., Karikari, T.K., González-Ortiz, F., Di Molfetta, G., Meda, F.J., Jonaitis, E.M., Kosciuk, R.L., Cody, K., Betthausen, T.J., Li, Y., Vanmechelen, E., Palmqvist, S., Stomrud, E., Bateman, R.J., Zetterberg, H., Johnson, S.C., Blennow, K., Hansson, O. (2022) Differential roles of A β 42/40, p-tau231 and p-tau217 for Alzheimer's trial selection and disease monitoring. *Nature Medicine*, **28**: 2555–2562.
- [37] Abbott, A. (1907) Conquering Alzheimer's: a look at the therapies of the future. *Nature*, **616**: 26–28.
- [38] McDade, E., Voytyuk, I., Aisen, P., Bateman, R.J., Carrillo, M.C., De Strooper, B., Haass, C., Reiman, E.M., Sperling, R., Tariot, P.N., Yan, R., Masters, C.L., Vassar, R., Lichtenthaler, S.F. (2021) The case for low-level BACE1 inhibition for the prevention of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, **17**: 703–714.
- [39] Heneka, M.T., Carson, M.J., Khoury, J.E., Landreth, G.E., Brosseon, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., Herrup, K., Frautschy, S.A., Finsen, B., Brown, G.C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G.C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M.L., Perry, V.H., Holmes, C., Bazan, N.G., Brooks, D.J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C.A., Breitner, J.C., Cole, G.M., Golenbock, D.T., Kummer, M.P. (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, **14**: 388–405.
- [40] Jia, J., Cheng, J., Wang, C., Zhen, X. (2018) Sigma-1 Receptor-Modulated Neuroinflammation in Neurological Diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **12**: 314.
- [41] Król, S., Österlund, N., Vosough, F., Jarvet, J., Wärmländer, S., Barth, A., Ilag, L.L., Magzoub, M., Gräslund, A., Mörmann, C. (2021) The amyloid-inhibiting NCAM-PrP peptide targets A β peptide aggregation in membrane-mimetic environments. *iScience*, **24**: 102852.
- [42] Kametani, F., Hasegawa, M. (2018) Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, **12**: 25.
- [43] Blanchard, J.W., Akay, L.A., Davila-Velderrain, J., Von Maydell, D., Mathys, H., Davidson, S.M., Effenberger, A., Chen, C.-Y., Maner-Smith, K., Hajjar, I., Ortlund, E.A., Bula, M., Agbas, E., Ng, A., Jiang, X., Kahn, M., Blanco-Duque, C., Lavoie, N., Liu, L., Reyes, R., Lin, Y.-T., Ko, T., R'Bibo, L., Ralvenius, W.T., Bennett, D.A., Cam, H.P., Kellis, M., Tsai, L.-H. (2022)

APOE4 impairs myelination via cholesterol dysregulation in oligodendrocytes. *Nature*, **611**: 769–779.

- [44] Koutsodendris, N., Blumenfeld, J., Agrawal, A., Traglia, M., Grone, B., Zilberter, M., Yip, O., Rao, A., Nelson, M.R., Hao, Y., Thomas, R., Yoon, S.Y., Arriola, P., Huang, Y. (2023) Neuronal APOE4 removal protects against tau-mediated gliosis, neurodegeneration and myelin deficits. *Nature Aging*, **3**: 275–296.
- [45] Croese, T., Castellani, G., Schwartz, M. (2021) Immune cell compartmentalization for brain surveillance and protection. *Nature Immunology*, **22**: 1083–1092.



Penke Botond Beregszászon született 1942-ben. Az ELTE biológia-kémia tanár szakán szerzett diplomát 1965-ben. A Szegedi Egyetem (korábban JATE, ill. SZOTE) Szerves Kémiai, majd Orvosi Vegytani Intézetében dolgozott 1965-től nyugdíjazásáig (2012), azóta emeritus professzor. Több évet dolgozott ösztöndíjasként, majd vendégtanárként Németországban, Franciaországban és az USA-ban. Kutatási területe a peptidek szintézise, kémiai és biológiai, illetve 1995-től az Alzheimer kór. Több kitüntetés mellett Széchenyi díjat is kapott, az MTA rendes tagja.



Szűcs Mária okleveles vegyészként végzett a szegedi József Attila Tudományegyetemen. 1977-2013 között a Szegedi Biológiai Központ Biokémiai intézetében dolgozott, először Wollemann Mária kutatócsoportjában, majd önálló témavezetőként. Magyarországon elsőként tanulmányozta a hetvenes évek végén plazmamembrán (elsősorban opioid) receptorok kötési és funkcionális sajátosságait, valamint a nyolcvanas évek végén kutatócsoportjával meghonosította a heterotrimer G proteinek kvalitatív és kvantitatív mérésére alkalmas módszereket. Tanulmányozta az opioid tolerancia/dependencia molekuláris mechanizmusait. A biológiai tudomány doktora címet 1997-ben kapta meg. Közel 5 évet töltött amerikai kutatóhelyeken. 2017 óta nyugdíjas. 2010-től napjainkig Penke Botonddal dolgozik részdíjban az SZTE Orvosi Vegytani Intézetében, az Alzheimer-kór szakirodalmát dolgozza fel. Az „Agykutatás Hete” szegedi rendezvények egyik szervezője 2010-2014 között. Az MTA Peptidkémiai Munkabizottság titkára 20015-2021 között. Az MBKE internetes folyóiratának, a Biokémiának főszerkesztője 2009 óta.



Bogár Ferenc 1987-ben a József Attila Tudományegyetemen (JATE) szerzett fizikus diplomát. Végzés után a JATE Elméleti Fizikai Tanszékén, majd 2003-tól az SZTE Orvosi Vegytani Intézetében működő MTA-SZTE Fehérjekémiai Kutatócsoportban kapott munkát. Jelenleg is ugyanabban az intézetben az ELKH-SZTE Biomimetikus Rendszerek Kutatócsoportban dolgozik. Tágabb szakterülete a számítógépes molekula modellezés. Ezen belül jelenleg a számítógépes gyógyszertervezés, a peptid és fehérje szerkezet modellezés, a fehérjék hidratációja és a Hofmeister effektus a legfontosabb kutatási területei.

FELHÍVÁS

A Biokémia folyóiratban meg kívánjuk jelentetni a tagtársaink által írt, jelentős nemzetközi folyóiratokban megjelent angol nyelvű áttekintő (review) cikkeket. Biztosak vagyunk benne, hogy ez lehetővé tenné a hazai laboratóriumokban művelt témák jobb megismerését, anélkül, hogy a szerzőknek bármilyen külön munkát jelentene.

Az „Áttekintő közlemények az MBKE tagjainak tollából” című rovatban a megjelenés formája az első oldal pdf változata (amennyiben ezt a folyóirat engedi) és egy, a cikkhez vezető link.

A review-k gyűjtését, szerkesztését Sarkadi Balázs vállalta, az első oldal pdf-et és a linket számára (sarkadi@biomembrane.hu) kérjük elküldeni.

A beküldés folyamatos.

A Biokémia szerkesztőbizottsága

ÁTTEKINTŐ KÖZLEMÉNYEK AZ MBKE TAGJAINAK TOLLÁBÓL

(Szerkesztette: Sarkadi Balázs)

A szerzők által 2023. március – május között beküldött cikkek (a közlemények első oldala is mellékelve):

Békési, A., Holub, E., Pálinkás, H.L., Vértessy, B.G. (2021) Detection of Genomic Uracil Patterns. *Int. J. Mol. Sci.*, **22(8)**: 3902. <https://doi.org/10.3390/ijms22083902>

Özvegy-Laczka, C., Ungvári, O., Bakos, E. (2023) Fluorescence-based methods for studying activity and drug-drug interactions of hepatic solute carrier and ATP binding cassette proteins involved in ADME-Tox. *Biochemical Pharmacology*, **209**: 115448. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115448>

Penke, B., Szűcs, M., Bogár, F. (2023) New Pathways Identify Novel Drug Targets for the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**: 5383. <https://doi.org/10.3390/ijms24065383>

Tamasi, V., Németh, K., Csala, M. (2023) Role of Extracellular Vesicles in Liver Diseases. *Life*, **13**: 1117. <https://doi.org/10.3390/life13051117>



Review

Detection of Genomic Uracil Patterns

Angéla Békési ^{1,2,*}, Eszter Holub ^{1,2}, Hajnalka Laura Pálkás ^{1,2} and Beáta G. Vértessy ^{1,2,*}

¹ Department of Applied Biotechnology & Food Sciences, Budapest University of Technology and Economics, H-1111 Budapest, Hungary; holub.eszter@gmail.com (E.H.); palinkas.hajnalka@ttk.hu (H.L.P.)

² Genome Metabolism Research Group, Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Eötvös Lóránd Research Network, H-1117 Budapest, Hungary

* Correspondence: bekesi.angela@ttk.hu (A.B.); vertessy.beata@ttk.hu (B.G.V.)

Abstract: The appearance of uracil in the deoxyuridine moiety of DNA is among the most frequently occurring genomic modifications. Three different routes can result in genomic uracil, two of which do not require specific enzymes: spontaneous cytosine deamination due to the inherent chemical reactivity of living cells, and thymine-replacing incorporation upon nucleotide pool imbalances. There is also an enzymatic pathway of cytosine deamination with multiple DNA (cytosine) deaminases involved in this process. In order to describe potential roles of genomic uracil, it is of key importance to utilize efficient uracil-DNA detection methods. In this review, we provide a comprehensive and critical assessment of currently available uracil detection methods with special focus on genome-wide mapping solutions. Recent developments in PCR-based and in situ detection as well as the quantitation of genomic uracil are also discussed.

Keywords: uracil-DNA; dot blot; in situ detection; PCR-based U-DNA detection; genome-wide uracil mapping



Citation: Békési, A.; Holub, E.; Pálkás, H.L.; Vértessy, B.G. Detection of Genomic Uracil Patterns. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3902. <https://doi.org/10.3390/ijms22083902>

Academic Editor: Miroslav Chovanec

Received: 20 February 2021

Accepted: 5 April 2021

Published: 9 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The thymine analogue uracil base has long been considered as an error to be excluded from the DNA; however, key experimental evidence has emerged supporting a more fine-tuned view on the potential impact of genomic uracil (for a detailed review, see [1]). The uracil base (U) can appear in DNA from three sources (Figure 1). First, spontaneous hydrolytic cytosine deamination is one of the most frequent DNA base damage—in a mammalian size genome, several hundreds of such events occur daily, to be compared to the rate of spontaneous depurination (2000–10,000/day/genome) [2,3]. Secondly, DNA cytosine deaminases from the AID/APOBEC family can also catalyze the conversion of cytosine (C) to U in the genome [4–11]. Thirdly, in addition to these potentially mutagenic cytosine deamination events, replicative polymerases can efficiently incorporate 2'-deoxyuridine 5'-monophosphate (deoxyuridylate, dUMP) moieties instead of the naturally occurring 2'-deoxythymidine 5'-monophosphate (deoxythymidylate, dTMP), when 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (dUTP) precursor is abundant, e.g., upon perturbed nucleotide metabolism [12–15].

Cellular processing and physiological consequences of the genomic uracils are highly context-dependent (Figure 1). Cytosine deaminations result in uracil:guanine (U:G) mismatches that can be fixed as point mutations upon the next replication in one of the daughter cells unless repaired by base excision repair (BER) or mismatch repair (MMR) mechanisms. Thymine-replacing incorporation is less harmful because the DNA coding potential is not changed, however, the missing methyl label from the uracil base as compared to thymine (T) might result in the perturbation of certain DNA binding regulatory functions [16]. Recently, genomic uracil was suggested as a potential epigenetic marker [1,17].



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm



Review

Fluorescence-based methods for studying activity and drug-drug interactions of hepatic solute carrier and ATP binding cassette proteins involved in ADME-Tox

Csilla Özvegy-Laczka^{a,*}, Orsolya Ungvári^{a,b}, Éva Bakos^a

^a Institute of Enzymology, RCNS, Eötvös Loránd Research Network, H-1117 Budapest, Magyar tudósok krt. 2., Hungary

^b Doctoral School of Biology, Institute of Biology, ELTE Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary



ARTICLE INFO

Keywords:

Fluorescent or fluorogenic probe
In vitro transporter assay
In vivo imaging
Near infrared dyes
Theranostics
Transporter-drug interaction screening

ABSTRACT

In humans, approximately 70% of drugs are eliminated through the liver. This process is governed by the concerted action of membrane transporters and metabolic enzymes. Transporters mediating hepatocellular uptake of drugs belong to the SLC (Solute carrier) superfamily of transporters. Drug efflux either toward the portal vein or into the bile is mainly mediated by active transporters of the ABC (ATP Binding Cassette) family. Alteration in the function and/or expression of liver transporters due to mutations, disease conditions, or co-administration of drugs or food components can result in altered pharmacokinetics. On the other hand, drugs or food components interacting with liver transporters may also interfere with liver function (e.g., bile acid homeostasis) and may even cause liver toxicity. Accordingly, certain transporters of the liver should be investigated already at an early stage of drug development. Most frequently radioactive probes are applied in these drug-transporter interaction tests. However, fluorescent probes are cost-effective and sensitive alternatives to radioligands, and are gaining wider application in drug-transporter interaction tests. In our review, we summarize our current understanding about hepatocyte ABC and SLC transporters affected by drug interactions. We provide an update of the available fluorescent and fluorogenic/activable probes applicable in *in vitro* or *in vivo* testing of these ABC and SLC transporters, including near-infrared transporter probes especially suitable for *in vivo* imaging. Furthermore, our review gives a comprehensive overview of the available fluorescence-based methods, not directly relying on the transport of the probe, suitable for the investigation of hepatic ABC or SLC-type drug transporters.

Abbreviations: 4Di-10ASP, (4-(didecyl-amino)styryl)-N-methylpyridinium iodide; ABC, ATP Binding Cassette; ABCP, placenta-specific ABC protein; ADME-Tox, Absorption; Distribution, Metabolism, Elimination and Toxicity; APB, 2-aminoethyl diphenylborinate; ASBT, apical sodium-dependent bile acid transporter (NTCP2, SLC10A2); BCRP, breast cancer resistance protein; BiFC, bimolecular fluorescence complementation; BRIC 2, benign recurrent intrahepatic cholestasis 2; BSA, bovine serum albumin; BSEP, bile salt export pump (ABCB11); calcein-AM, calcein-acetoxy-methylester; CsA, cyclosporine A; CYP, cytochrome P450; DDI, drug-drug interaction; DHEAS, dehydroepiandrosterone sulfate; DILI, drug induced liver injury; DJS, Dubin-Johnson syndrome; E1S, estrone-3-sulfate; EMA, European Medicines Agency; ENT, equilibrative nucleoside transporter; FDA, U.S. Food and Drug Administration; FDI, food-drug interaction; FRET, fluorescence resonance energy transfer; FXR, farnesoid X receptor; FCS, fluorescence correlation spectroscopy; GFP, green fluorescent protein; GSH, glutathione; HBV/HDV, hepatitis B/D virus; HCC, hepatocellular carcinoma; HILI, herbal induced liver injury; HIV, human immunodeficiency virus; HPLC, high-pressure liquid chromatography; ICP, intrahepatic cholestasis of pregnancy; IOV, inside-out membrane vesicle; LC-MS, liquid chromatography-mass spectrometry; LTC4, leukotriene C4; LBD, ligand-binding domain; MATE, Multidrug and toxin extrusion protein; MDR1, multidrug resistance protein 1; MRI, magnetic resonance imaging; MRP2, multidrug resistance associated protein 2; MS, mass spectrometry; MXR, mitoxantrone resistance protein; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; NBD, nucleotide binding domain; NIR, near-infrared; NME, new molecular entity; NTCP, sodium/taurocholate cotransporting polypeptide; OAT, Organic anion transporter; OATP, Organic anion transporting polypeptide; OCT, Organic cation transporter; OST, Organic solute and steroid transporter; PDT, photodynamic therapy; PET, positron emission tomography; PFIC2, progressive intrahepatic cholestasis 2; PGE2, prostaglandin E2; P-gp, P-glycoprotein; PMDA, Pharmaceuticals and Medical Devices Agency; PREGS, pregnenolone sulfate; PROTAC, proteolysis-targeting chimera; PTT, photothermal therapy; ROS, reactive oxygen species; SLC, Solute carrier; SDS, sodium dodecyl sulfate; SNP, single nucleotide polymorphism; SPECT, single-photon emission computed tomography; TNP-ATP, 2,4,6-trinitrophenyl-adenosine-triphosphate; TMD, transmembrane domain; UGT, UDP-glucuronyltransferase.

* Corresponding author.

E-mail address: laczka.csilla@ttk.hu (C. Özvegy-Laczka).

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115448>

Received 4 January 2023; Received in revised form 31 January 2023; Accepted 1 February 2023

Available online 8 February 2023

0006-2952/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



Review

New Pathways Identify Novel Drug Targets for the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease

Botond Penke^{1,*}, Mária Szűcs¹ and Ferenc Bogár²

¹ Department of Medical Chemistry, University of Szeged, Dóm Square 8, H-6720 Szeged, Hungary

² ELKH-SZTE Biomimetic Systems Research Group, Eötvös Loránd Research Network (ELKH), Dóm Square 8, H-6720 Szeged, Hungary

* Correspondence: penke.botond@med.u-szeged.hu

Abstract: Alzheimer's disease (AD) is an incurable, progressive neurodegenerative disorder. AD is a complex and multifactorial disease that is responsible for 60–80% of dementia cases. Aging, genetic factors, and epigenetic changes are the main risk factors for AD. Two aggregation-prone proteins play a decisive role in AD pathogenesis: β -amyloid ($A\beta$) and hyperphosphorylated tau (pTau). Both of them form deposits and diffusible toxic aggregates in the brain. These proteins are the biomarkers of AD. Different hypotheses have tried to explain AD pathogenesis and served as platforms for AD drug research. Experiments demonstrated that both $A\beta$ and pTau might start neurodegenerative processes and are necessary for cognitive decline. The two pathologies act in synergy. Inhibition of the formation of toxic $A\beta$ and pTau aggregates has been an old drug target. Recently, successful $A\beta$ clearance by monoclonal antibodies has raised new hopes for AD treatments if the disease is detected at early stages. More recently, novel targets, e.g., improvements in amyloid clearance from the brain, application of small heat shock proteins (Hsps), modulation of chronic neuroinflammation by different receptor ligands, modulation of microglial phagocytosis, and increase in myelination have been revealed in AD research.

Keywords: Alzheimer's disease; toxic amyloids; $A\beta$; tau; genetics; amyloid clearance; vascular dysfunction; neuroinflammation; heat shock proteins; drug targets



Citation: Penke, B.; Szűcs, M.; Bogár, F. New Pathways Identify Novel Drug Targets for the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 5383. <https://doi.org/10.3390/ijms24065383>

Academic Editor: Claudia Ricci

Received: 31 January 2023

Revised: 6 March 2023

Accepted: 9 March 2023

Published: 11 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Neurodegenerative diseases (NDDs) represent a big part of neurological disorders. NDDs are characterized by the loss of synapses and neurons in the central nervous system (CNS). Neuronal loss often generates the decline of cognitive functions and dementia. Many NDDs have a common central neuropathological event: misfolded, toxic protein aggregates (amyloids) are accumulated in the CNS. NDDs can be regarded as protein homeostasis disorders: the level of several aggregation-prone proteins is increased, and subsequent small conformational changes result in the accumulation of pathogenic, β -structured amyloid proteins. Many amyloid protein structures are self-replicating, display prionoid character, and their aggregated form is propagated from cell to cell (transmissible pathology) [1]. The prionoid propagation of several amyloids (e.g., tau protein and α -synuclein) has been proven. The precise molecular mechanism of the conversion of a nontransmissible protein to the pathogenic prionoid form is not completely understood. Although the native, functionally-folded proteins possess important physiological functions, their misfolded amyloid aggregates are toxic to brain cells. The amyloid structure fundamentally differs from the globular state of these proteins and has remarkable similarities in the molecular and supramolecular organization [2]. Medical research has revealed common disease pathways among NDDs [3]; the most important of them is the accumulation of toxic, misfolded proteins.



Review

Role of Extracellular Vesicles in Liver Diseases

Viola Tamasi ^{1,*}, Krisztina Németh ^{2,3} and Miklós Csala ¹

¹ Department of Molecular Biology, Semmelweis University, 1094 Budapest, Hungary; csala.miklos@semmelweis.hu

² Department of Genetics, Cell- and Immunobiology, Semmelweis University, 1089 Budapest, Hungary; nemeth.krisztina1@med.semmelweis-univ.hu

³ ELKH-SE Translational Extracellular Vesicle Research Group, 1085 Budapest, Hungary

* Correspondence: tamasi.viola@semmelweis.hu

Abstract: Extracellular vesicles (EVs) are cell-derived membrane structures that are formed by budding from the plasma membrane or originate from the endosomal system. These microparticles (100 nm–100 µm) or nanoparticles (>100 nm) can transport complex cargos to other cells and, thus, provide communication and intercellular regulation. Various cells, such as hepatocytes, liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) or hepatic stellate cells (HSCs), secrete and take up EVs in the healthy liver, and the amount, size and content of these vesicles are markedly altered under pathophysiological conditions. A comprehensive knowledge of the modified EV-related processes is very important, as they are of great value as biomarkers or therapeutic targets. In this review, we summarize the latest knowledge on hepatic EVs and the role they play in the homeostatic processes in the healthy liver. In addition, we discuss the characteristic changes of EVs and their potential exacerbating or ameliorating effects in certain liver diseases, such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), alcoholic fatty liver disease (AFLD), drug induced liver injury (DILI), autoimmune hepatitis (AIH), hepatocarcinoma (HCC) and viral hepatitis.

Keywords: extracellular vesicles; NAFLD; AFLD; hepatocarcinoma; viral hepatitis; autoimmune hepatitis; drug-induced hepatitis; liver; hepatocytes



Citation: Tamasi, V.; Németh, K.; Csala, M. Role of Extracellular Vesicles in Liver Diseases. *Life* **2023**, *13*, 1117. <https://doi.org/10.3390/life13051117>

Academic Editor: Teruna Siahaan

Received: 4 April 2023

Revised: 24 April 2023

Accepted: 27 April 2023

Published: 30 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The prominent scientific investigation of extracellular vesicles (EVs) began in the 1980s when Harding and coworkers discovered transferrin-receptor-containing EVs formed during the maturation of reticulocytes [1]. In the same year, Pan and Johnstone provided the first images of EVs from the same type of cells, and Rose Johnstone named the spherical structures derived from multivesicular body (MVB) fusion “exosomes”. Later, more and more research groups studied these structures [2]. Crawford and coworkers observed small particles of various content in platelet-free plasma and called them microparticles. They also demonstrated that EVs contain proteins, lipids and ATP [3,4]. By now, scientific knowledge about EVs has become widespread and noticeable. The importance of these particles can be justified with many physiological functions. They play a role in intercellular communication (e.g., they transfer signal molecules such as cytokines, adhesion receptors, regulatory nucleic acids) and carry other biomolecules (e.g., metabolites, nutrients, cofactors) and, therefore, they are capable of changing the composition and function of recipient cells. They can serve as diagnostic markers since their amount and/or composition changes in many diseases. Moreover, EVs can be used as natural drug delivery systems with low cytotoxicity and immunogenicity [5].

Because of the size and heterogeneity of EVs, it is very hard to adapt different, conventional analytical tools to detect these vesicles. Proper investigation of EVs implies specific protocols and requires certain functional and physical analyses. These are summarized in a frequently updated guideline called Minimal Information for the Study of Extracellular

PHD DISSZERTÁCIÓK BEMUTATÁSA ROVAT FELHÍVÁSA

A Biokémia folyóirat szerkesztőbizottságában felmerült, hogy a bárki számára előben meghallgatható, de korlátozott nyilvánosságú doktori védések és a szintén nem túl széles körben olvasott doktori disszertációk mellett egy tavaly elindított rovat keretében teremtsünk lehetőséget a PhD fokozatukat a biokémia területén frissen megszerző fiatalok számára az eredményeik rövid formában történő bemutatására. Ugyan készül minden értekezés mellé egy téziszfüzet, de úgy gondoljuk, hogy egy pár oldalas, illusztrációkkal ellátott összefoglaló közlésével szélesebb nyilvánossághoz jutnak a tudomány jövőjét képviselő fiataljaink.

Bíztatunk minden, a Biokémia újságot olvasó doktori témavezetőt, hogy kérjék meg doktoranduszaikat, hogy éljenek ezzel a lehetőséggel, és kérjük minden PhD védéshez közeledő doktorandusz olvasónkat, hogy írjanak egy összefoglalót a disszertációjukban bemutatott eredményeikről.

A kéziratokat, a Biokémia újság honlapján (<https://www.mbkegy.hu/apps/mbkegy/pages/index.html#!/ContentById/900>) megtalálható formai követelmények betartásával, az újságban 2022-ben közölt korábbi összefoglalókat mintául véve kérjük elküldeni az alábbi címre:

Nyitray László
Rovatvezető
e-mail: nyitray@elte.hu

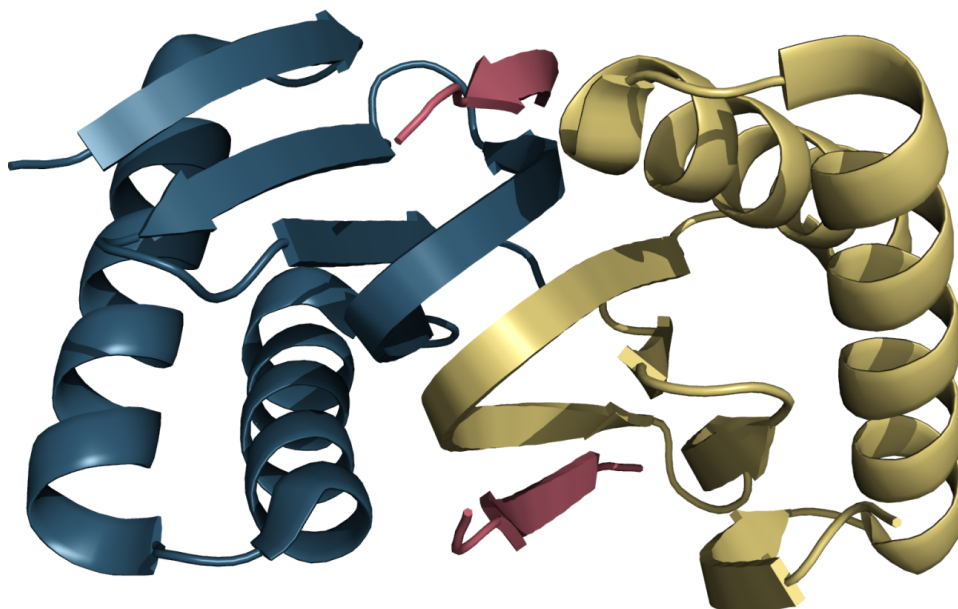
RENDEZETLEN FEHÉRJÉK BIOINFORMATIKAI VIZSGÁLATA**Erdős Gábor****MTA-ELTE Lendület Bioinformatikai Kutató Csoport,
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola,
Szerkezeti Biokémia Program
e-mail: gabor.erdos@ttk.elte.hu****Témavezető: Dr. Dosztányi Zsuzsanna**

A biokémia egyik legrégebbi, máig megoldatlan kérdése, hogy kiderítsük, hogyan függ össze a fehérjék szerkezete a funkciójukkal. A 2000-es évek elejéig általánosan elfogadott tényként kezelték, hogy ahhoz, hogy egy fehérje funkcionális legyen, egy jól meghatározott szerkezettel kell rendelkeznie. Ma már tudjuk, hogy ez az ún. szerkezet-funkció paradigma nem teljesen igaz, ugyanis léteznek olyan fehérjék, régiók, amelyek nem rendelkeznek jól definiált háromdimenziós szerkezettel, ugyanakkor funkcionálisak. Ezek az ún. rendezetlen fehérjék, illetve rendezetlen régiók (Intrinsically Disordered Proteins/Regions, röviden IDP-k/IDR-k) nagyon gyakoriak a természetben. Becslések szerint a humán proteóm fele tartalmaz hosszabb (nagyobb mint 30 aminosav) rendezetlen régiót, míg az eukarióta proteómok 15 %-a teljesen rendezetlen [1].

Gyakoriságuk ellenére még ma is nagyon keveset tudunk a rendezetlen fehérjékről, és még kevesebbet azok funkciójáról. Főként azért, mert kísérletes vizsgálatuk még a rendezett fehérjéknél is jóval bonyolultabb, időigényesebb és drágább. Ahhoz, hogy jobban megismerhessük ezt az újfajta fehérjeosztályt, nagy szükség van olyan bioinformatikai módszerekre, amelyek közvetlenül a fehérje szekvenciájából képesek rendezetlenséget vagy rendezetlen funkciós helyeket jósolni. A rendezetlen régiók gyakori funkcionális moduljai az ún. rövid lineáris motívumok (Short Linear Motifs, SLiM), amelyek a fehérje-fehérje interakciók egyik kulcsfontosságú résztvevői. A SLiM-ek általában gyenge, tranziens interakciót alakítanak ki partnerükkel, jellemzően csupán pár központi aminosavon keresztül, amelyek szekvenciálisan egymáshoz közel találhatók [2].

Egy jól ismert lineáris motívum kötő rendszer az LC8 nevű fehérje, amely egy kis eukarióta homodimer fehérje, amelyet elsőként a dynein motor komplex részeként írtak le [3]. Bár azóta több mint 60 dyneintől független kötőpartnerét

azonosították, azonban a fehérje pontos funkciója jelenleg is ismeretlen [4]. Az LC8 partnereit egy lineáris motívumon keresztül köti, amelyek a dimerizációs interface két oldalán kialakuló kötőárokba egy komplementer béta szálként illeszkednek be.

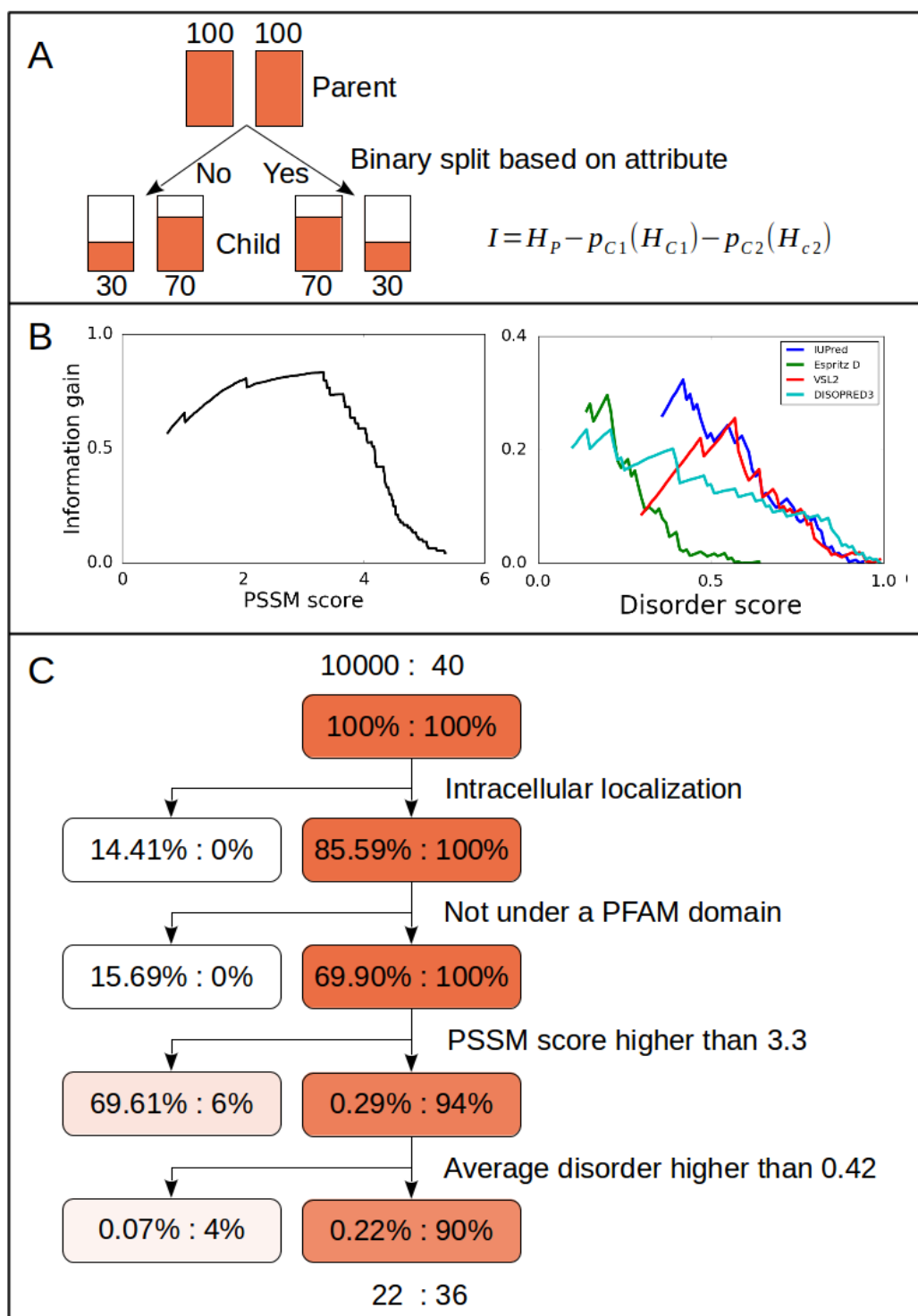


1. ábra. LC8 komplex térszerkezete a CHICA fehérje kötőmotívumával (bordó) (PDB: 5e0m), monomerek kék és sárga színekkel színezve.

Kutatómunkám során egyik fő célom egy olyan bioinformatikai módszer kifejlesztése volt, amely képes új kötőpartnereket azonosítani egy adott lineáris motívum kötő fehérjéhez. A módszert elsőként az LC8 fehérjére alkalmaztam, hogy ezáltal jobban megérthessük az LC8 funkcióját.

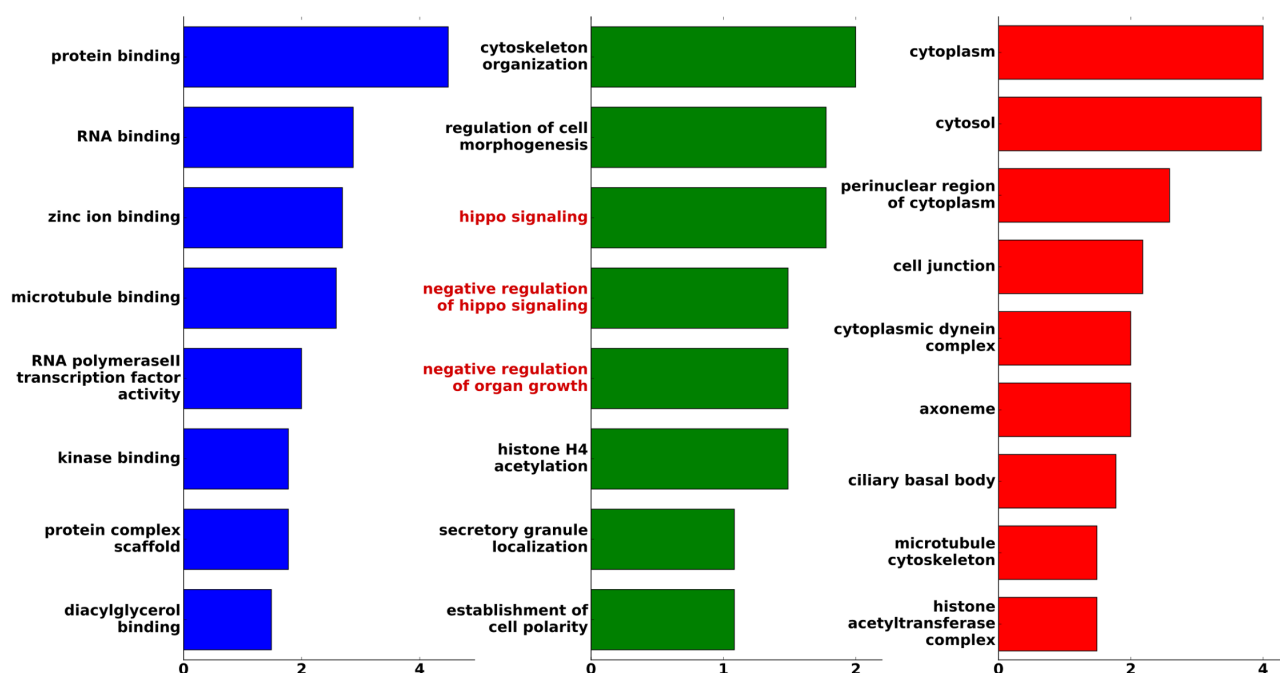
Első lépésként irodalmi adatok alapján összegyűjtöttem az ismert kötőpartnereket. Összesen 67 LC8 kötő motívumot találtam 53 fehérjében, melyből 40 motívum volt humán 33 fehérjéből. Az összegyűjtött motívumok szekvenciáit illesztettem, majd azokból egy úgynevezett pozíció specifikus pontozó mátrixot készítettem (Position Specific Scoring Matrix, PSSM). Az ilyen PSSM-ek megmutatják, hogy egy motívum esetén egy adott pozícióban egy adott aminosav mekkora valószínűséggel fordul elő. A pontozó mátrix felhasználható arra, hogy akár teljes proteómokban hasonló új partnereket azonosítsunk a motívumok hasonlósága alapján. Azonban a kötőmotívum rövidegsége miatt a valódi találatok mellett nagyszámban fordulnak elő pusztán véletlenül előforduló, fals pozitív találatok. Például az ismert LC8 partnerek alapján

készített PSSM-el a humán proteómot megszűrve százezres nagyságrendben találunk motívumokat. A fő kihívást tehát az jelentette, hogy ezek közül a találatok közül kiszűrjem a negatív találatokat.



2. ábra. Szűrési kritériumrendszer. A) Információs nyereség sematikus vázlata. **B)** Információs nyereség görbe különböző küszöbértékeken a PSSM pontszámra, valamint három rendezetlenség predikciós pontszámra. **C)** Szűrési kritériumrendszer döntési fa-ábrázolása.

Ennek érdekében megvizsgáltam, milyen tulajdonságok jellemzőek az ismert kötőmotívumokra, mint például jóslott átlagos rendezetlenség, illetve rendezetlen kötőhely predikciós értékek, domén annotációk, sejten belüli elhelyezkedés vagy másodlagos szerkezet tekintetében. Ezeket a tulajdonságokat felhasználva egy globálisan tanított döntési fa jellegű szűrési kritérium rendszert állítottam fel. A döntési fa tanításához az ismert humán kötőpartnereket és tulajdonságait használtam fel pozitív halmazként, negatív halmazként pedig 10.000 véletlenszerűen válogatott motívumot a humán proteómból, amelyek szekvenciálisan hasonlóak az LC8 kötő motívumokhoz.



3. ábra. GO annotáció feldúsulási vizsgálat. Pirossal kiemelve a Hippo szignalizációs útvonalhoz köthető funkciók.

A szűrési rendszer képes felismerni az ismert humán partnerek 90 %-át, míg kiszűrte a véletlen motívumok 99,78 %-át. A szűrési eljárást a humán proteómra alkalmazva már csupán 335 potenciális LC8 kötő motívumot találtunk. Kollégáim, Dr. Pajkos Mátyás és Hajdu-Soltész Borbála a kapott 335 motívumot tovább szűrte volúciós konzerváltság és fehérje-fehérje interakciós adatok alapján, míg végül 71 olyan motívumot azonosítottunk, amely nagyon valószínűen valóban LC8 kötő.

Annak érdekében, hogy jobban megismerjük az LC8 fehérje pontos funkcióját, az újonnan prediktált partnereket, valamint az ismert humán motívumokat GO

annotációs feldúsulási vizsgálatnak vetettük alá [5]. Ez megmutatja, hogy melyek azok a funkcionális annotációk, amelyek a vártnál gyakrabban fordulnak elő a kötőpartnerek esetében, rávilágítva az LC8 fehérje funkciójára.

A feldúsulási vizsgálat sok már ismert tulajdonság mellett több a Hippo szignalizációs útvonalhoz köthető funkciót is megtalált. Annak érdekében, hogy ezt igazolni tudjuk, Szaniszló Tamás munkatársam kísérletes módszerekkel igazolta, hogy az LC8 fehérje valóban kölcsönhat több olyan fehérjével is, amelyek kulcsfontosságú szerepet játszanak a Hippo szignalizációs útvonalban.

Doktori munkám során sikeresen elkészítettem egy predikciós módszert, amely képes új kötőpartnerek azonosítására egy adott lineáris motívum kötő domén esetében. A módszert sikeresen alkalmaztam az LC8 rendszerre, ahol 71 potenciális új humán kötőmotívumot azonosítottam, amelyek közül kilenc motívumot kísérletesen is igazoltak kollégáim. Az igazolt motívumok funkcionális analízise pedig rávilágított az LC8 eddig ismeretlen funkciójára a Hippo szignalizációs útvonalban [6].

A doktori dolgozat alapjául szolgáló publikációk

Erdős, G., Szaniszló, T., Pajkos, M., Hajdu-Soltész, B., Kiss, B., Pál, G., Nyitray, L., Dosztányi, Z. (2017) Novel linear motif filtering protocol reveals the role of the LC8 dynein light chain in the Hippo pathway. *PLoS Computational Biology*, **13(12)**: e1005885.

Erdős, G., Dosztányi, Z. (2020) Analyzing Protein Disorder with IUPred2A. *Current Protocols in Bioinformatics*, **70(1)**: e99.

Erdős, G., Pajkos, M. and Dosztányi, Z. (2021) IUPred3: prediction of protein disorder enhanced with unambiguous experimental annotation and visualization of evolutionary conservation. *Nucleic Acids Research*, **49(W1)**: W297–W303.

Mészáros, B., Erdős, G., Dosztányi, Z. (2018) IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. *Nucleic Acids Research*, **46(W1)**: W329–W337.

Irodalomjegyzék

- [1] Deiana, A., Forcelloni, S., Porrello, A., Giansanti, A. (2019) Intrinsically disordered proteins and structured proteins with intrinsically disordered regions have different functional roles in the cell. *PLoS One*, **14**: e0217889.
- [2] Davey, N. E. et al. (2012) Attributes of short linear motifs. *Mol Biosyst*, **8**:

268-281.

- [3] Rapali, P. *et al.* (2011) DYNLL/LC8: a light chain subunit of the dynein motor complex and beyond. *FEBS J*, **278**: 2980–2996.
- [4] Barbar, E. (2008) Dynein light chain LC8 is a dimerization hub essential in diverse protein networks. *Biochemistry*, **47**: 503–508.
- [5] Dennis, G., Jr *et al.* (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol*, **4**: P3.
- [6] Erdős, G. *et al.* (2017) Novel linear motif filtering protocol reveals the role of the LC8 dynein light chain in the Hippo pathway. *PLoS Comput Biol*, **13**: e1005885.

MIKRO-RNS KLASZTEREK ÉRÉSÉT BEFOLYÁSOLÓ ÚJ MECHANIZMUS ÉS LEHETSÉGES ORVOSI RELEVANCIÁJÁNAK BEMUTATÁSA

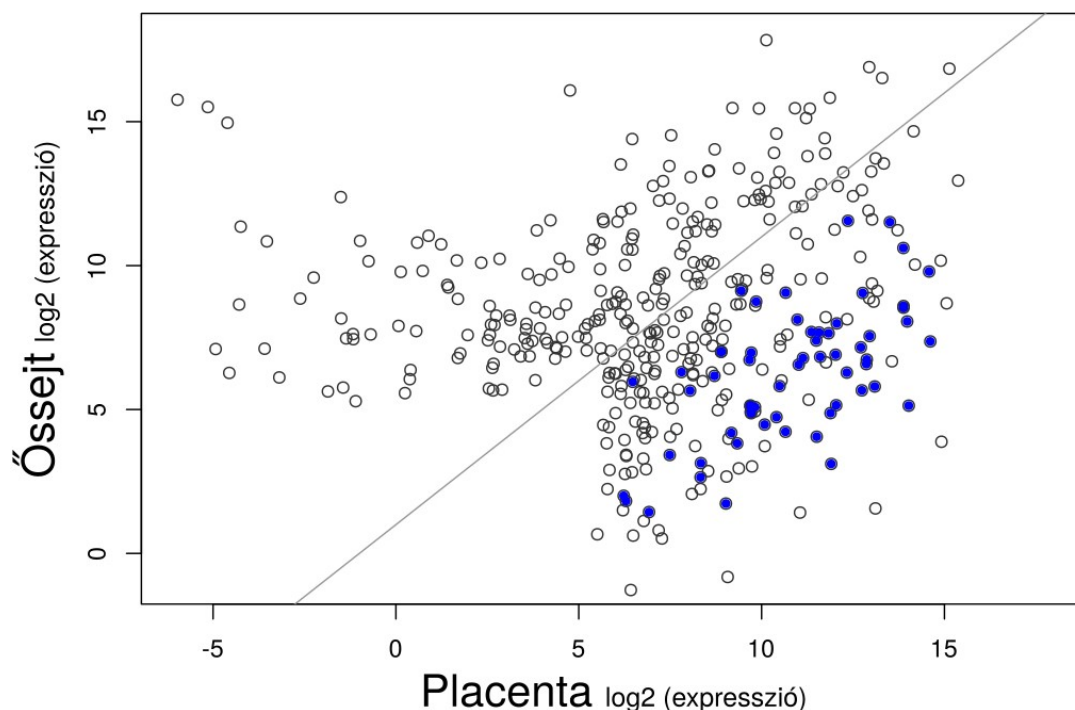
Fóthi Ábel

Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet,
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola,
Genetika Program

Email: fothi.abel@ttk.hu

Témavezető: Dr. Orbán Tamás

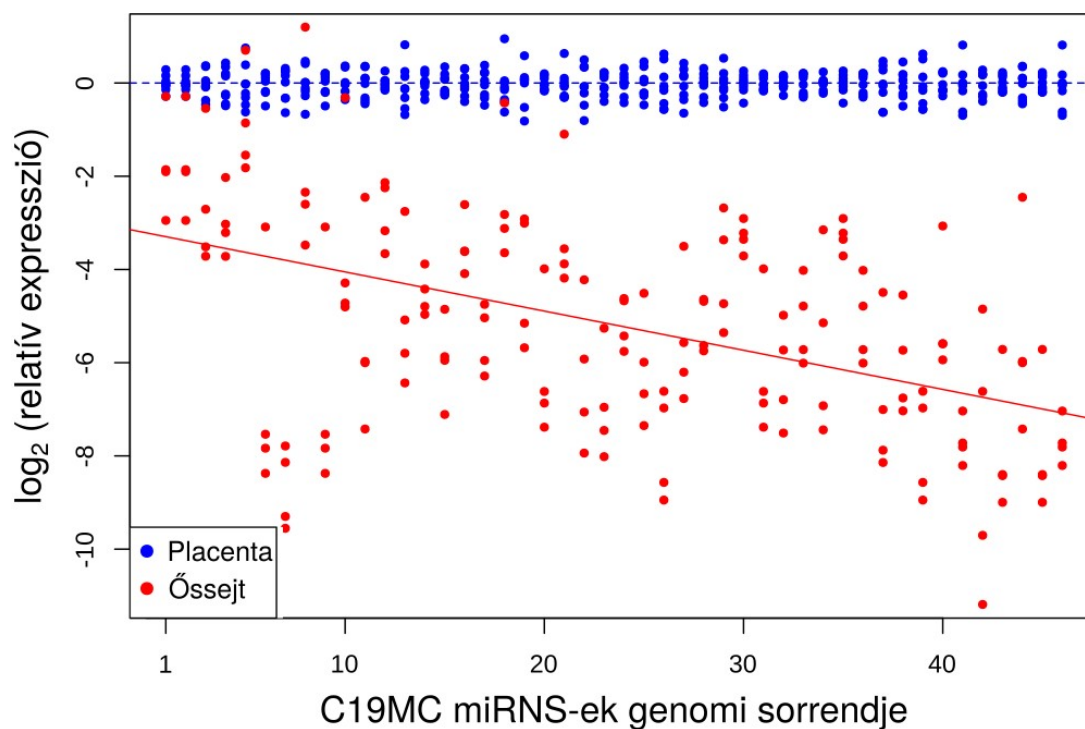
A mikro-RNS-ek (mi-RNS) már az 1993-as felfedezésüktől kezdődően felkeltették egyes kutatók érdeklődését [1], de igazán nagy lendületet a 2006-os Nobel-díj adott a területnek [2]. Kezdetben a mi-RNS-ek érését általánosan szabályozó folyamatokat és a mi-RNS-ek funkcióját kutatták. Ezek a vizsgálatok megmutatták, hogy a mi-RNS gént az RNS polimeráz II írja át, így létrehozva a pri-mi-RNS-et, amelyből a Drosha és a DGCR8 által alkotott mikroprocesszor komplex hasítja ki a prekursor mi-RNS-t (pre-mi-RNS-t).



1. ábra. A mi-RNS-ek átlagos expressziós értékei embrionális össejtekben és placentákban. Az expressziós értékeket log2 skálán ábrázoltuk; az X-tengelyen a placentában mért átlagos expressziós értékek (n=12), míg az Y-tengelyen az embrionális össejtek átlagos értékei (n=4) vannak feltüntetve. A C19MC tagjait kék színnel kiemeltük.

Ezt követően a citoplazmában a Dicer enzim hasítja le a hajtúszerkezetű pre-mi-RNS-ről a terminális hurkot, így létrehozva egy rövid duplaszálú RNS

molekulát. Ennek egyik, vagy akár mindkét karja egy Argonauta típusú fehérjébe töltődik, és további faktorokkal kiegészülve létrehozzák az RNS-indukálta csendesítő komplexet, amely a célgén mRNS-éhez kötődve képes annak expresszióját finomhangolni [3].

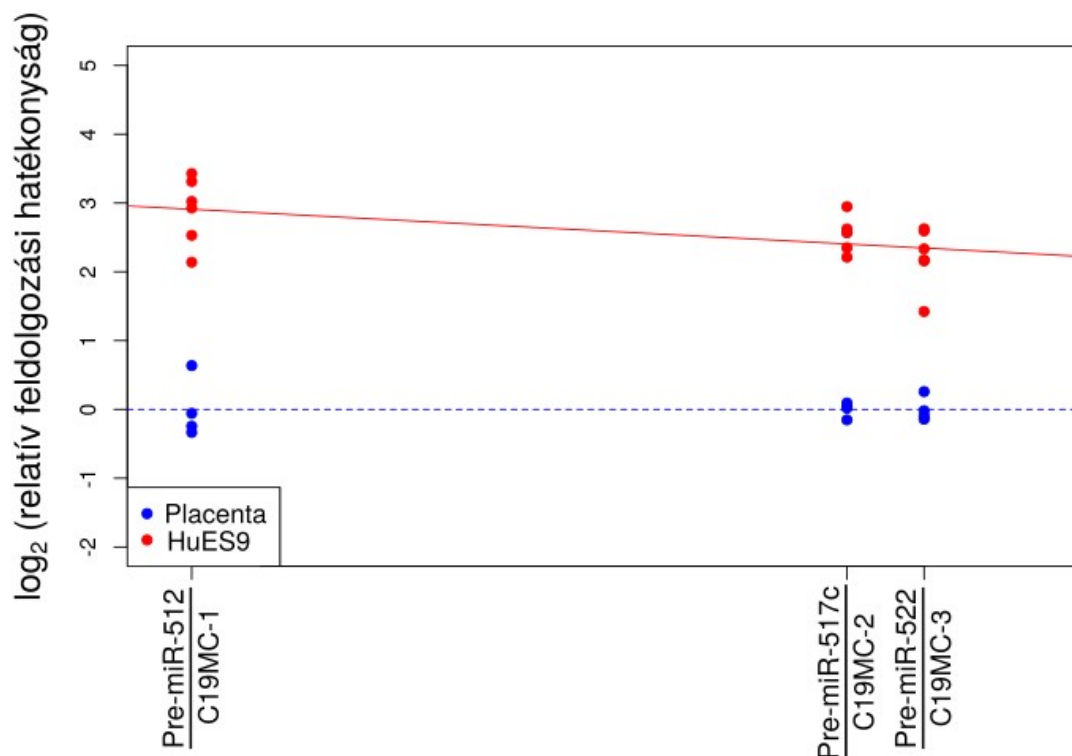


2. ábra. C19MC miRNS expressziós értékei genomi pozíciójuk függvényében ábrázolva. Az X-tengelyen a C19MC miRNS-ek genomi pozíciójuk szerinti sorrendje látható. Az Y-tengely a miRNS-ek relatív expressziós, egy a $\Delta\Delta CT$ módszerhez hasonló normalizáció utáni értékét $\log_2$ skálán mutatja. A placenta mintákon mért értékeket kék, az embrionális őssejteken mért értékeket piros pontok jelenítik meg. Az értékekre illesztett regressziós egyenest a placenta esetében kék szaggatott vonallal, míg az embrionális őssejtek esetében piros vonallal jelöltük.

Bár napjainkra a mechanizmusok legfontosabb elemei felfedezésre kerültek, továbbra is sok megválaszolatlan kérdést tartogat ez a terület. Egyre inkább előtérbe kerül a miRNS funkciók matematikai modellezhetősége, az orvosi és szintetikus biológiai felhasználhatósága, amikhez azonban ismernünk kell a miRNS-ek érését és funkcióját szabályozó mechanizmusok részleteit is. A folyamatok pontos leírásához tudnunk kell, hogy adott biológiai molekulák mennyiségi és minőségi szabályozása hogyan történik.

PhD munkám keretében az egyik legnagyobb méretű humán miRNS klaszter, a C19MC [4] szabályozását vizsgáltuk placentában és embrionális őssejtekben, továbbá ezen miRNS-ek, valamint az őket szabályozó biológiai mechanizmusok terhességi toxémiával kapcsolatos orvosi relevanciáját kutattuk. Munkám során különböző szekvenálási technológiák adatainak elemzését követően célzott

kísérleteket végeztünk, hogy a miRNS-ek érésében szerepet játszó új mechanizmus, a klaszteren belüli, pozíciófüggő pri-miRNS feldolgozási hatékonyság jelenségét minél pontosabban fel tudjuk tárni.

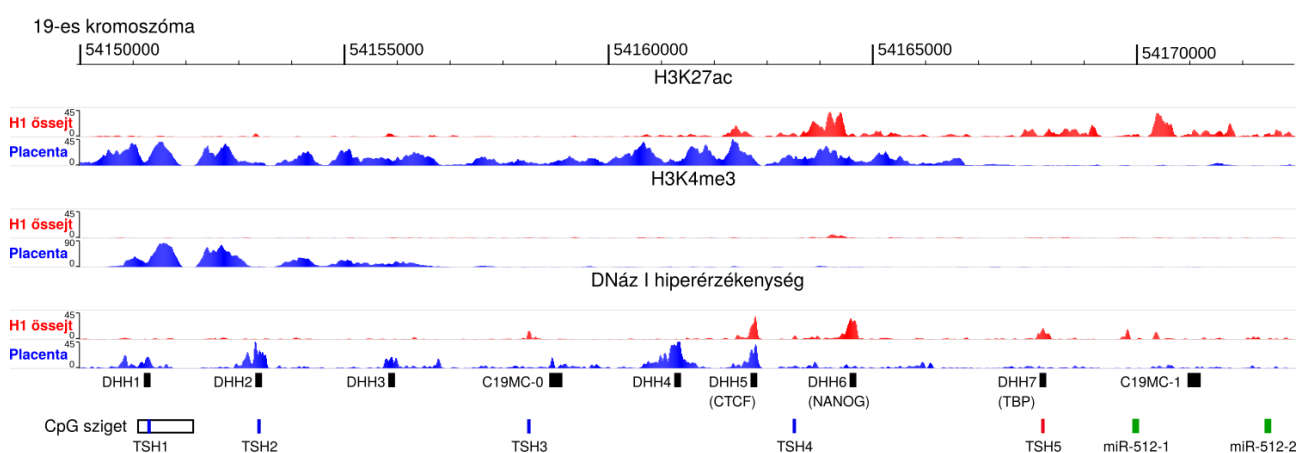


3. ábra. C19MC pri-miRNS vágási hatékonysága placenta és HuES9 sejtekben. Az X-tengelyen a pri-miRNS 3 vizsgált pozíciója látható, míg az Y-tengelyen a relatív vágási hatékonyság $\log_2$ értékét ábrázoltuk. A processzálas hatékonyságát egy a pri-miRNS-re eső és egy a pre-miRNS tövére eső primer párokkal mért expressziós értékek arányából számítottuk ki. A kék pontok a placenta minták, míg a piros pontok a HuES9 embrionális őssejt vonal értékeit mutatják. Az értékekre illesztett regressziós egyenest placenta minták esetében kék szaggatott vonallal, míg a HuES9 embrionális őssejt esetében piros vonallal jelöltük.

Publikusan elérhető kis RNS szekvenálási adatokat gyűjtöttünk, és a nyers adatfájlokból kiindulva egységes módon újraelemztük őket; 8 placenta és 4 embrionális őssejt mintával dolgoztunk. Az elemzésekkel az adott mintákban kifejeződő összes miRNS szintjét meg tudtuk határozni. A kifejeződő C19MC-eredetű miRNS-ek két szövet közötti expressziós eltéréseit vizsgáltuk, az expressziós értékek nagy terjedelme miatt az értékeket kettes alapú logaritmikus skálán ábrázoltuk (1. ábra). Az eredményekből jól látszik, hogy placentában mindegyik C19MC miRNS-nek az őssejtben mértnél magasabb a szintje, a klaszteren belül azonban az egyedi miRNS-ek expressziós szintjei nagyfokú heterogenitást mutatnak.

A klaszteren belüli mennyiségi heterogenitás vizsgálatához a C19MC miRNS-eket klaszteren belüli genomi sorrendjük szerint rendeztük, majd a klaszter

minden miRNS-ének expressziós értékét az adott miRNS placentában mért átlagos szintjére normáltuk (2. ábra). A miRNS-ek sorba rendezése után a mennyiségi értékekben látható variabilitás részben magyarázhatóvá vált, a klaszter elején lévő kisebb különbségek a klaszter 3' vége felé haladva egyre nagyobbá váltak. Míg placentában a klaszter összes miRNS-e magas szinten expresszálódik, embrionális őssejtekben az 5' végen lévő miRNS-ek szintje jelentősen magasabb, mint a tőlük 3' irányban elhelyezkedő miRNS-eké. Ezekre az adatokra lineáris regressziós modellt illesztettünk, ezzel számszerűsíteni tudtuk a szövetek között megfigyelt pozíciófüggő trend erősségét.

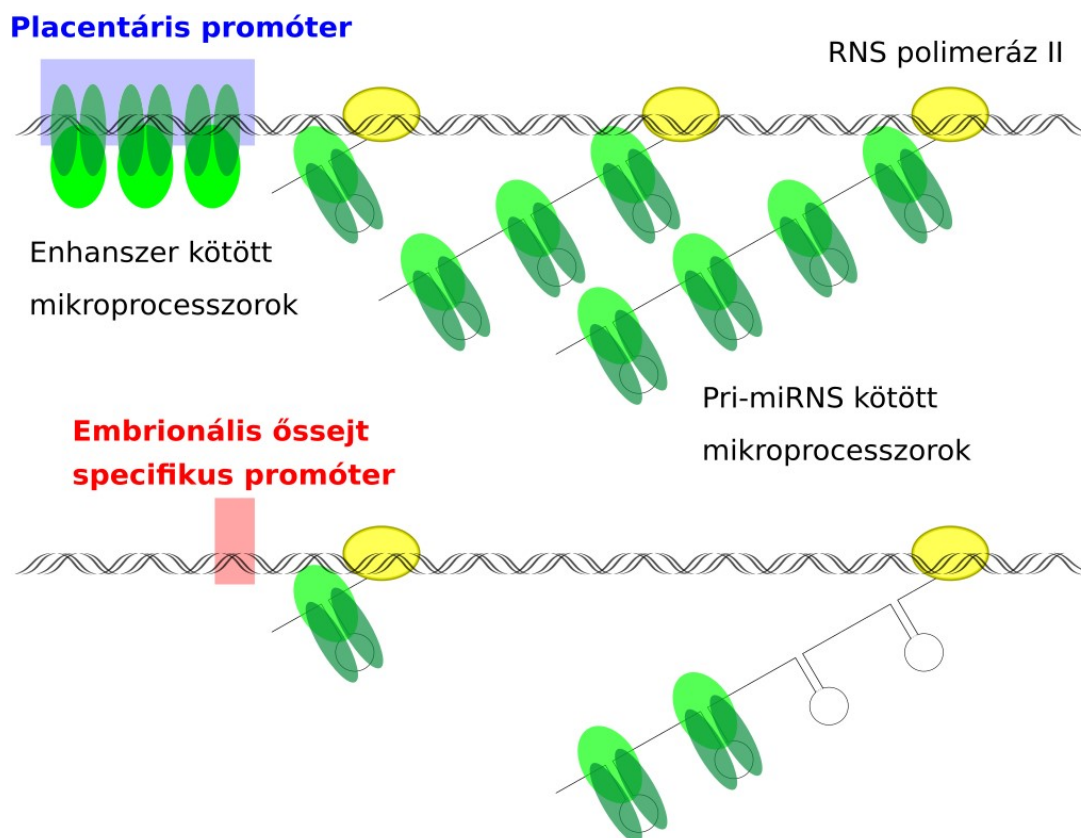


4. ábra. C19MC promóter régiójában található epigenetikai módosulások. H3K27ac, H3K4me3 és DNáz hiperérzékenység jelek embrionális őssejtekben pirossal, placentában kékkel jelölve. DNáz hiperérzékeny helyek (DHH1-DHH7) és a pri-miRNS specifikus primereket (C19MC-0 és C19MC-1) fekete négyzetekkel, a placenta specifikus transzkripciós starthelyeket kék vonalakkal, az őssejt transzkripciós start helyet piros vonallal, az első miRNS-ek (miR-512-1 és miR-512-2) elhelyezkedését zöld négyzetekkel jelöltük.

Ezt az értéket a pri-miRNS 3 részén mértük, majd ezek eredményeire lineáris modellt illesztettünk. Az érett miRNS-ekhez hasonlóan most is a két szövet közötti különbséget vizsgáltuk. Az őssejtekben mért relatív processzási hatékonyság csökken a klaszter vége felé haladva, azaz ebben az esetben is megjelenik a genomi pozíció hatása (3. ábra). Őssejtekben a Drosha szint csökkentése tovább fokozta, míg a növelése enyhítette a pozícióhatást.

A klaszter transzkripcióját vizsgálva egy új, szövetspecifikus különbséget fedeztünk fel. A klaszter kanonikus promótere kizárólag a placenta mintákban aktív, őssejtekben egy alternatív promóterről indul a transzkripció. A ChIP szekvenálási adatok alapján az eltérő promóter régiókban eltérő transzkripciós faktor kötőhelyek vannak (4. ábra).

A doktori munkámmal párhuzamosan megjelent egy tanulmány, amely szerint bizonyos miRNS-ek promóterei képesek lehetnek a pri-miRNS vágását végző mikroprocesszorok toborzására [5].

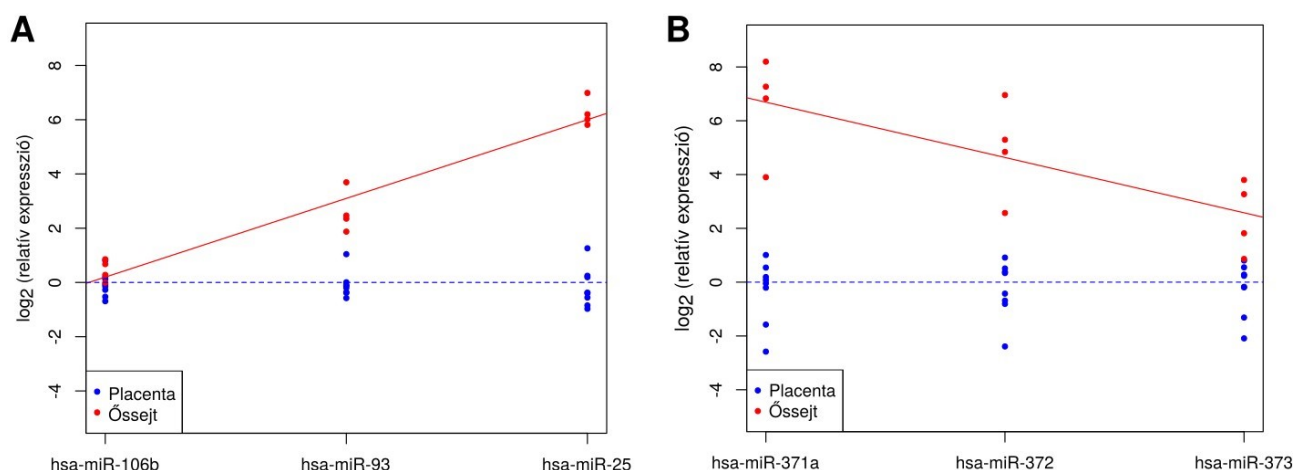


5. ábra. A C19MC pozíciófüggő szabályozásának grafikus modellje. A placentáris promóter hatékonyan toborozza a mikroprocesszorokat, ezzel segíti a teljes pri-miRNS feldolgozását. Ezzel szemben az embrionális promóter nem, vagy csak gyengén köti a mikroprocesszorokat, ezért azoknak alacsonyabb a lokális koncentrációjuk. Mivel az elsőként átíródó, a promóterhez közelebb elhelyezkedő miRNS géneket még nagyobb valószínűséggel vágják a szabad mikroprocesszorok, az érett miRNS-ek szintjén is kialakul a pozícióhatás.

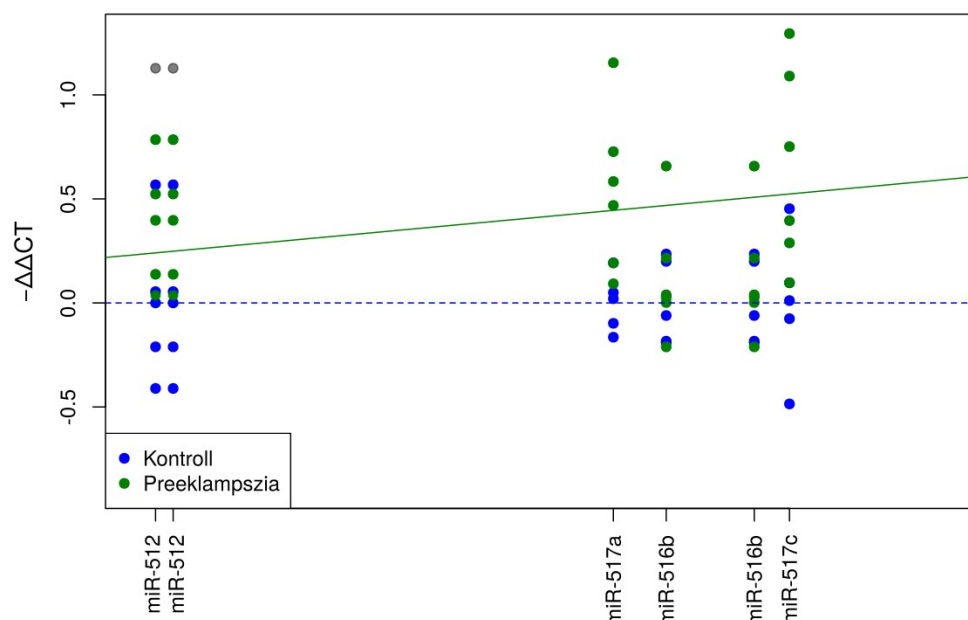
A C19MC epigenetikai markereit megvizsgálva felmerült, hogy placentában ennek a klaszternek a promótere is képes lehet mikroprocesszorokat kötni (4. ábra). Ezért Drosha antitesttel ChIP-qPCR méréseket végeztünk, amikkel ki tudtuk mutatni, hogy a Drosha csak a placentában kötődik a klaszter promóteréhez, őssejtekben nem. Ebből következik, hogy bár a két szövet között a globális Drosha szint nem különbözik, viszont a lokálisan elérhető Drosha fehérje mennyisége különbözhet.

Eredményeink alapján megalkottuk a pozícióhatásért felelős mechanizmus modelljét (5. ábra). A placentáris promóter hatékonyan toborozza a klaszterhez a mikroprocesszorokat, ezzel megnövelve azok lokális koncentrációját, így a transzkripcióval párhuzamosan az egész klaszter hatékonyan tud processzá-

lódni. Ezzel szemben őssejtekben az alternatív promóter nem tud elegendő mikroprocesszort toborozni a folyamatos kotranszkripció vágáshoz, így ez csak a klaszter elején tud megtörténni. Ennek következtében a klaszter elején meglévő miRNS expressziós különbség a klaszter 3' vége felé haladva folyamatosan növekszik, tehát kialakul a pozícióhatás.



6. ábra. A pozíciófüggő hatás további két kisebb klaszterben is kimutatható. Az X-tengelyen **A)** a miR-106b-25 és **B)** a miR-371-3 klaszter miRNS-i genomai pozíciójuk szerinti rendezve láthatóak, az Y-tengely a miRNS-ek relatív expressziós értékeit log₂ skálán mutatja. A placenta mintákon mért és normalizált értékeket kék, az embrionális őssejtvonalon mért értékeket piros pontok jelenítik meg. Az értékekre illesztett regressziós egyenest placenta esetében kék szaggatott vonallal, míg az embrionális őssejtek esetében piros vonallal jelöltük.



7. ábra. A klaszter pozíciófüggő expressziós mintázata normál és preeklampsziás minták összehasonlításában. Az X-tengelyen a kvantitatív PCR-rel mért C19MC miRNS-ek genomai pozíciójuk szerinti sorrendbe rendezve láthatóak, az Y-tengely pedig a miRNS-ek relatív expressziós értékeit (-ΔΔCT) mutatja. Normál placenta mintákon (n = 6) mért értékeket kék, a preeklampsziás mintákon (n = 5) mért értékeket zöld pontok jelenítik meg. Az értékekre illesztett regressziós egyenest normál placenta esetében szaggatott kék vonallal, míg a preeklampsziás minták esetében zöld vonallal jelöltük.

A feltárt mechanizmus meglétét más miRNS klaszterek esetében is megvizsgáltuk. Több klasztert is elemeztünk, ezek közül kettő, a miR-106b/25-ben és miR-371-3 esetében láttunk kapcsolatot a miRNS expressziós különbségek és a miRNS-ek genomi sorrendje között (6. ábra). Ezek a klaszterek a C19MC-től eltérő tendenciákat mutatnak, aminek magyarázata további vizsgálatok igényel.

Végezetül a C19MC expresszióját szabályozó mechanizmusok és a pre-eklampszia (terhességi toxémia) kapcsolatát vizsgáltuk. Egészséges placenták mellett preeklampsziás mintákban is lemértük a klaszter 4 tagjának expressziós értékét. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy preeklampsziás mintákban a klaszter végén elhelyezkedő miRNS-ek esetében nagyobb expressziós különbség van (7. ábra). Ez az összefüggés csak marginálisan szignifikáns, de felveti a lehetőségét, hogy a pozícióhatásnak a preeklampszia kialakulásában is szerepe lehet.

Eredményeink alapján a pozícióhatás a pri-miRNS-ek szintjén nem jelentkezik, valamint a hypoxia nincs hatással a klaszter expressziójára, de a promóter régióban azonosított DNS metilációs különbségek kapcsolatban állhatnak a C19MC miRNS-ek érésével és megváltozott expressziójukkal.

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények

Fóthi, Á., Biró, O., Erdei, Z., Apáti, Á., Orbán, T.I. (2021) Tissue-specific and transcription-dependent mechanisms regulate primary microRNA processing efficiency of the human chromosome 19 MicroRNA cluster. *RNA Biology*, **18(8)**: 1170–1180.

Biró, O., Fóthi, Á., Alasztics, B., Nagy, B., Orbán, T.I., Rigó Jr, J. (2019) Circulating exosomal and Argonaute-bound microRNAs in preeclampsia. *Gene*, **692**: 138–144.

Irodalomjegyzék

- [1] Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75(5)**: 843–854.
- [2] Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391(6669)**: 806–811.
- [3] Bartel, D.P. (2018) Metazoan microRNAs. *Cell*, **173(1)**: 20–51.

- [4] Bortolin-Cavaille, M.L., Dance, M., Weber, M., Cavaille, J. (2009) C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts. *Nucleic Acids Research*, **37(10)**: 3464–3473
- [5] Suzuki, H.I., Young, R.A., Sharp, P.A. (2017) Super-enhancer-mediated RNA processing revealed by integrative microRNA network analysis. *Cell*, **168(6)**: 1000-14.

A C1q IMMUNFEHÉRJE INTERAKCIÓINAK VIZSGÁLATA ÉS FEHÉRJEALAPÚ GÁTLASA

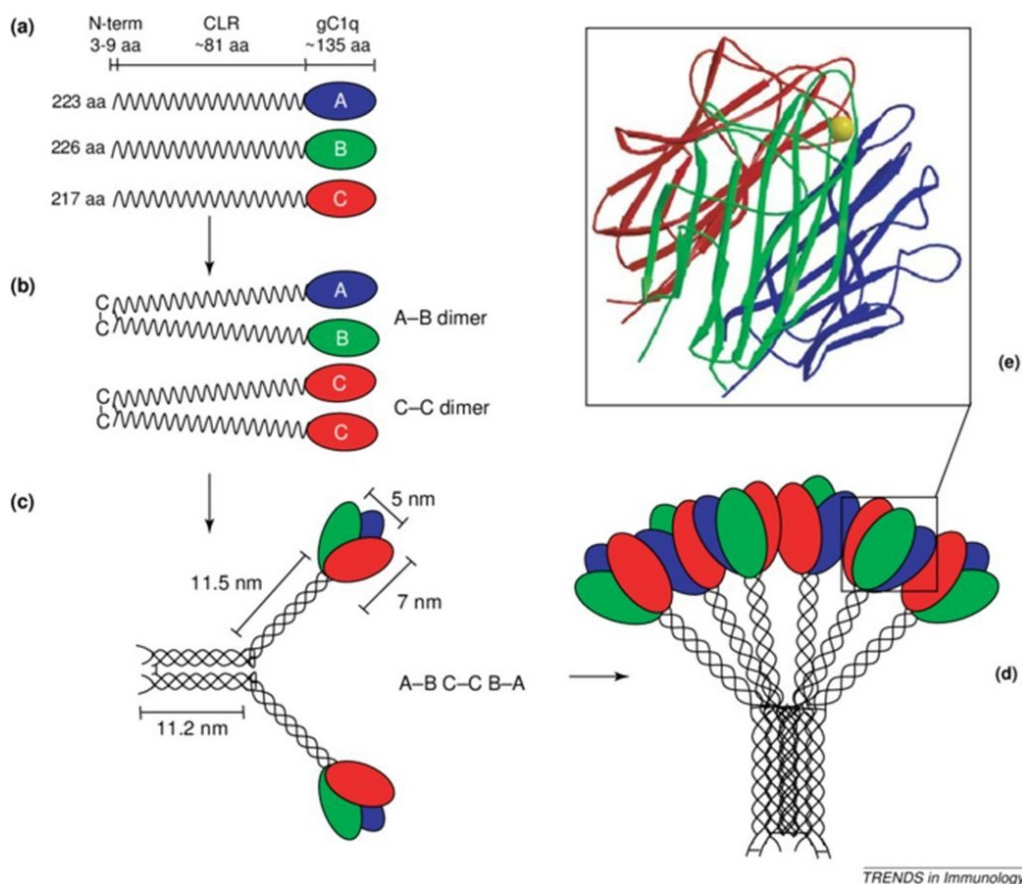
Vadászi Henrietta

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,
Biokémiai Tanszék

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,
Biológia Doktori Iskola, Szerkezeti Biokémia Program

Témavezető: Dr. Kardos József és Dr. Nyitray László

A C1q a klasszikus komplement útvonal (CP) felismerő molekulájaként ismert. A C1q a ligandjához való kötődés által aktiválja a komplement kaskád az immunrendszerben. A C1q 18 polipeptidláncból áll, amelyek mindegyike egy C-terminális globuláris fejdombból és egy kollagénszerű N-terminális farki régióból áll. A C1q hat heterotrimerből álló csokor, amelyet láncok közti és láncon belüli diszulfidhidak és a kollagénszerű farki régió stabilizálnak (1. ábra).



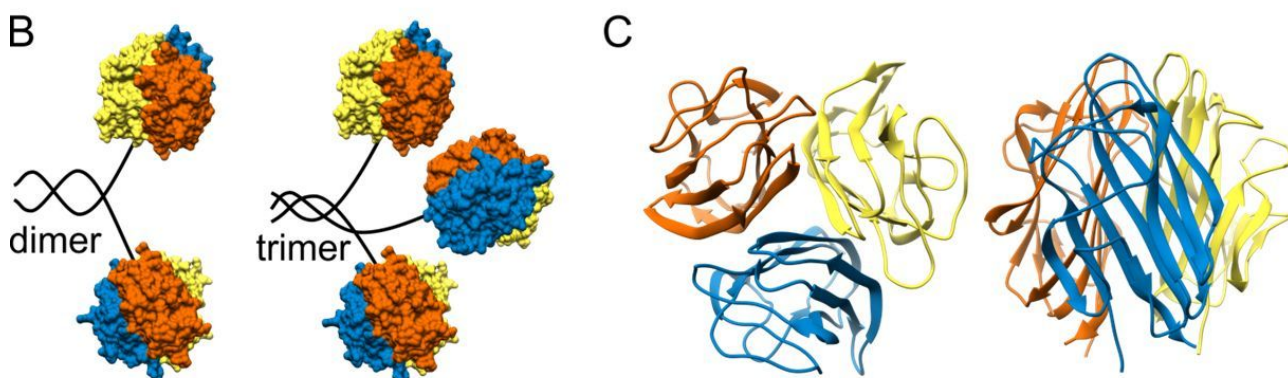
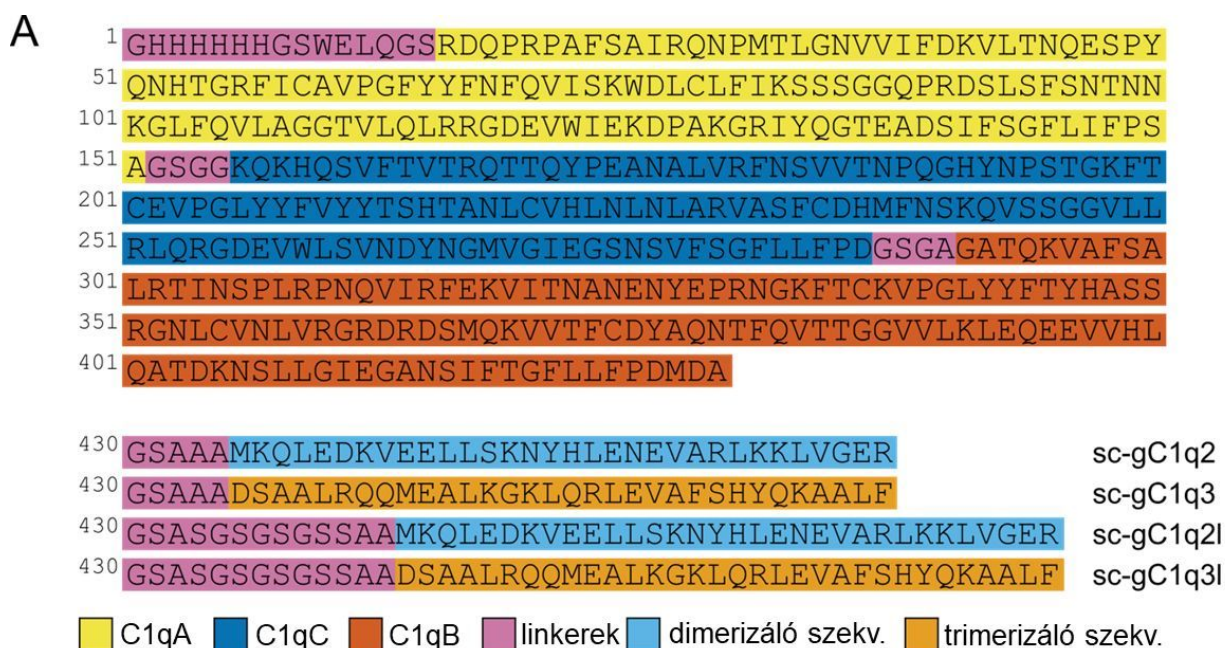
1. ábra. A C1q fehérje szerkezete. A) A C1qA, C1qB és C1qC láncok egy N-terminális kollagénszerű régióból (CLR) és egy C-terminális globuláris feji doménből (gC1q) állnak. **B)** A C1q láncok intermolekuláris diszulfid hidak által dimerizálnak, kialakítva 6 db A-B dimert és 3 db C-C dimert. **C)** Az A-B dimerekhez egy-egy C lánc kötődik. **D)** Az N-terminális CLR hozzá létre az ismert csokorszerű struktúrát. **E)** a gC1q kristályszerkezete jellegzetes antiparallel β -lemezes jelly roll topológiát mutat. Forrás: [2].

A C1q a kötőpartnerek széles skálájával lép kölcsönhatásba, túlnyomórészt a globuláris fején keresztül [1].

Nemrégiben a C1q új funkcióját tárták fel a központi idegrendszerben. A C1q molekuláris címkeként működik azokon a szinapszisokon, amelyeket a mikroglia sejteknek, az idegrendszerbeli makrofágoknak kell eltávolítaniuk [3]. Ez a funkció egészséges idegrendszerben is fellelhető, valamint kontroll alatt áll, azonban számos neurodegeneratív és pszichiátriai betegségben túlzott mértékben jelentkezik [4–7]. Egyelőre nem ismert, hogy a C1q egyszerűen csak „eat-me” jelként működik-e, vagy a komplement kaszkádot is aktiválja. Csoportunk kimutatta, hogy a neuronális pentraxinok és a C1q kölcsönhatása jelentős szereppel bír a szinapszis eltávolításban [8]. Azonban ezen kívül nem kizárható, hogy más idegrendszerbeli fehérjék is hozzájárulnak a C1q szinapszis eltávolításban betöltött szerepéhez. A kontrollálatlan immunfunkció gátlása kulcsfontosságú kérdés. A komplement kaszkád szabályozatlan működése súlyos károkat okozhat a szervezetben, emiatt szükséges komplement komponenseket célzó gátlószereket fejleszteni, amelyeket akár a periférián, akár a CNS-ben alkalmazhatunk. A terápián túl az inhibitorok segítségünkre lehetnek a molekuláris mechanizmusok felderítésében is. Ez a gondolat indította el a doktori munkám nagy részét kitevő kompetitív C1q inhibitorok tervezését, expresszióját és vizsgálatát, amelyben segítségemre volt Moreau és mtsai. által tervezett egyláncú humán C1q feji doménekből álló konstrukció [9].

A doktori munkám célja olyan fehérjék előállítása és karakterizálása volt, amelyek a C1q kompetitív inhibitorai lehetnek. Ennek megfelelően az interakciós partnerekhez való kötődést biztosító feji régiót a kollagénszerű szár nélkül kellett előállítani. A C1q kompetitív gátlásához olyan rekombináns fehérjét terveztem és hoztam létre, amely a három C1q lánc globuláris fejdóménjét tartalmazza egyetlen polipeptidláncként (sc-gC1q). A monomer konstrukció mellett előállítottam multimereket két különböző linker hosszal az sc-gC1q és a multimerizáló coiled coil régió között (2. ábra). Mindezt annak érdekében tettem, hogy az intakt, teljes hosszúságú C1q-hoz hasonló, aviditást mutató molekulákkal dolgozhassak, amelyek közül csak a leucin-cipzár általi dimerizáció bizonyult sikeresnek az analitikai géliszűrés és analitikai ultracentrifugával végzett kísérletek alapján. A trimerizáció esetén feltehetőleg a coiled-coil szerkezetet összetartó másodlagos kölcsönhatások nem voltak elegendően erősek ahhoz, hogy a három, kb. 50 kDa molekulatömegű alegységet összetartsák, ezért a jövőben érdemes lehet olyan multimerizáló szekvenciát

választani, ami már bizonyítottan alkalmas volt hasonló méretű fehérjék multimer képzésére.



2. ábra. A sc-gC1q fehérjék szekvenciája és felépítése. A) A monomer és a multimer konstrukciók szekvenciája. A dimerek sc-gC1q és hozzá fuzionált GCN4 leucin-cipzárból állnak, míg a trimerek multimerizáló régiója az SpD fehérje nyaki szekvenciája. A C1q feji domének közti linker szekvenciák 4-4 aminosav hosszúak (GTGG a gC1qA és gC1qC között, valamint GSGA a gC1qC és gC1qB között). Mind a dimerek, mind a trimerek egy rövidebb (5 aminosav hosszú) és egy hosszabb (13 aminosav hosszú) linker szekvenciával kapcsolódnak a multimerizáló coiled coil részhez. **B)** A multimerek sematikus felépítése, kettő és három C1q fejet multimerizáltam. **C)** A sc-gC1q két szemszögből bemutatott szerkezeti ábrázolása, a három domén különböző színekkel jelölve. Forrás: [1].

Habár csoportunk kimutatta a neuronális pentraxinok és a C1q közti kölcsönhatást, egyelőre tisztázatlan volt, hogy a C1q valóban a feji részével alakítja-e ki a kötődést [8]. Kísérleteimmal igazoltam, hogy a C1q feji doménjei kötődnek a neuronális pentraxinokhoz, akárcsak az immunkomplexekhez. A kötődési kísérletek alapján egyértelműnek látszott, hogy a dimerek (rövid linkeres dimer: sc-gC1q2, hosszú linkeres dimer: sc-gC1q2I) a monomernél

alacsonyabb disszociációs állandóval kötődnek az összes vizsgált kötőpartnerhez.

Sikeresen gátoltam a komplement aktivációt különböző azt indító molekulák esetén is, azonban az SPR kísérletekkel szemben itt a sc-gC1q2I bizonyult a monomernél hatékonyabb inhibitornak. Ennek hátterében az eltérő ligand immobilizálás állhat. Végül a szerkezetbeli immunkomplex borítottságot modellezendő, hemolízis kísérletet végeztem, ahol a fiziológiás állapothoz hasonló immunkomplex borítottság mellett dolgoztam. A sc-gC1q2I variáns bizonyult a leghatékonyabbnak az előző kísérletekhez hasonlóan. Egér neuronokhoz adott izolált C1q sejtfelszínhez kötődését szintén mindhárom vizsgált variánssal (sc-gC1q, sc-gC1q2 és sc-gC1q2I) sikerült gátolnom.

Léteznek a sc-gC1q fehérjékhez hasonló természetes inhibitorok, amelyek az effektor funkciókat ellátó régiókat nem tartalmazzák, ezáltal kompetitív gátlást valósítanak meg. Ezek a lektin útvonal felismerő molekulájához kötődő két szerin proteáz, a MASP1 és MASP2 fehérjét kódoló gének alternatív *splicing*jával létrejövő fehérjék, a MAp44 és MAp19 [10, 11]. A sc-gC1q variánsok a jövőben alkalmasak lehetnek a C1q eddig fel nem tárt idegrendszerbeli működését tisztázni *in vivo*. Ebben nagy segítség lehet, hogy a monomernek a gyógyszeriparban használt monoklonális antitestekhez képest igen kis mérete van, ami nem gátolja a diffúzióját akár a mélyebb szövetekbe is. A fehérjék gátló potenciálját *in vitro*, *ex vivo* és immortalizált egér hipokampusz sejtvonalon is vizsgáltam. A molekulák jó alapot jelentenek a kölcsönható felszínek mutálásának megtervezéséhez, amik a C1q kölcsönhatásainak jellemzését segíthetik elő. Továbbá ezek a fehérjék, amelyekből hiányoznak a kollagénszerű régiók, nem működnek effektorokként, így potenciális eszközök lehetnek a komplement aktiváció *in vivo* vizsgálatához az idegrendszerben.

A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények

Vadászi, H., Kiss, B., Micsonai, A., Schlosser, G., Szaniszló, T., Kovács, R.Á., Györffy, B.A., Kékesi, K.A., Goto, Y., Uzonyi, B., Liliom, K., Kardos, J. (2022) Competitive inhibition of the classical complement pathway using exogenous single-chain C1q recognition proteins. *J Biol Chem*, **298(7)**: 102113.

Kovács, R.Á., Vadászi, H., Bulyáki, É., Török, G., Tóth, V., Mátyás, D., Kun, J., Hunyadi-Gulyás, É., Fedor, F.Z., Csincsi, Á., Medzihradszky, K., Homolya, L., Juhász, G., Kékesi, K.A., Józsi, M., Györffy, B.A., Kardos, J. (2021)

Identification of Neuronal Pentraxins as Synaptic Binding Partners of C1q and the Involvement of NP1 in Synaptic Pruning in Adult Mice. *Front Immunol*, **11**: 599771.

Micsonai, A., Moussong, É., Wien, F., Boros, E., Vadászi, H., Murvai, N., Lee, Y.-H., Molnár, T., Réfrégiers, M., Goto, Y., Tantos, Á., Kardos, J. (2022) BeStSel: Webserver for Secondary Structure and Fold Prediction for Protein CD Spectroscopy. *Nucleic Acids Res*, **50(W1)**: W90-W98.

Irodalomjegyzék

- [1] Kishore, U., Reid, K.B.M. (2000) C1q: Structure, function, and receptors. *Immunopharmacology*, **49**: 159–170.
- [2] Kishore, U., Gaboriaud, C., Waters, P., Shrive, A., Greenhough, T., Reid, K., Sim, R., Arlaud, G. (2004) C1q and tumor necrosis factor superfamily: Modularity and versatility. *Trends in immunology*, **25**: 551–61.
- [3] Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., et al. (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*, **131**: 1164–1178.
- [4] Stephan, A.H., Madison, D.V., Mateos, J.M., et al. (2013) A Dramatic Increase of C1q Protein in the CNS during Normal Aging. *J Neurosci*, **3(33)**: 13460-74.
- [5] Butler, C.A., Popescu, A.S., Kitchener, E.J.A., Allendorf, D.H., Puigdel·l·vol, M., Brown, G.C. (2021) Microglial phagocytosis of neurons in neurodegeneration, and its regulation. *J Neurochem*, **158**: 621–639.
- [6] Wu, T., Dejanovic, B., Gandham, V.D., Gogineni, A., et al. (2019) Complement C3 Is Activated in Human AD Brain and Is Required for Neurodegeneration in Mouse Models of Amyloidosis and Tauopathy. *Cell Rep*, **28**: 2111-2123.e6.
- [7] Aronica, E., Boer, K., van Vliet, E.A., et al. (2007) Complement activation in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*, **26**: 497–511.
- [8] Kovács, R.Á., Vadászi, H., Bulyáki, É., et al. (2021) Identification of Neuronal Pentraxins as Synaptic Binding Partners of C1q and the Involvement of NP1 in Synaptic Pruning in Adult Mice. *Front Immunol*, **11**: 599771.
- [9] Moreau, C., Bally, I., Chouquet, A., Bottazzi, B., Ghebrehiwet, B., Gaboriaud, C., Thielens, N. (2016) Structural and Functional Characterization of a Single-Chain Form of the Recognition Domain of Complement Protein C1q. *Front Immunol*, **7**: 79.

- [10] Degn, S.E., Hansen, A. G., Steffensen, R., Jacobsen, C., Jensenius, J. C., Thiel, S. (2009) MAp44, a Human Protein Associated with Pattern Recognition Molecules of the Complement System and Regulating the Lectin Pathway of Complement Activation. *J Immunology*, **183**: 7371–7378.
- [11] Degn, S.E., Thiel, S., Nielsen, O., Hansen, A.G., Steffensen, R., Jensenius, J.C. (2011) MAp19, the alternative splice product of the MASP2 gene. *J Immunol Methods*, **373**: 89–101.

BESZÁMOLÓ A MAGYAR MOLEKULÁRIS ÉLETTUDOMÁNYOK TAVASZI KONFERENCIÁJÁRÓL

A Magyar Biokémiai Egyesület (MBKE) és a Magyar Genetikusok Egyesülete (MAGE) március 24 és 26 között rendezte meg a Molekuláris Élettudományi Konferencia 2023-at Egerben. A helyszín választása telitalálat volt, hisz Eger és környéke gyönyörű, a Hotel Eger & Park pedig tökéletesen alkalmas nagyobb rendezvények lebonyolítására. A szakmai program is igényes és sokrétű volt a konferencia főszervezőinek köszönhetően, akik nemzetközileg is elismert kutatók: Buday László (MBKE elnöke), Juhász Gábor (MAGE elnökségi tag), Lontay Beáta (MBKE főtitkára), Mihály József (MAGE elnöke), Sinka Rita (MAGE elnökségi tag) és Virág László (MBKE alelnöke). A rendezvény kiváló technikai lebonyolítása a Diamond Congress Kft-nek köszönhető.

Szakmai program

A konferencián 325-en vettek részt, ebből 43 % akadémiai szeniorkutató, csoportvezető vagy professzor; 42 % fiatal akadémiai kutató vagy PhD hallgató és 15 % kiállító, szponzor vagy cégképviselő. Négy plenáris előadást hallhattunk, az előadók Sascha Martens (University of Vienna, Vienna BioCenter, Austria), Székvölgyi Lóránt (DE, ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet), Csősz Éva (DE, ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) és Szakács Gergely (ELKH TTK Enzimológiai Intézet, Budapest) voltak. Ezen előadások segítségével betekinthettünk az autofágia, a kromoszómális RNS loop-ok, a multiomika és az ABC-transzporterek világába. Ezenkívül 60 darab 15 perces előadást hallhattunk, amelyek 4-5 előadást tartalmazó szekciókra voltak elosztva. A szekciók címei:

A betegségek molekuláris mechanizmusa, Fehérje szerkezet és Proteomika, Sejtdifferenciáció és jelátvitel, Bioinformatika, DNS-javítás és gyógyszer-fejlesztés, Genom manipuláció és archeogenetika, Epigenetika és gén-expresszió, valamint Szabályozó RNS-ek.

A szekciók témáihoz kapcsolódóan 145 poszter megtekintésére volt lehetőség két részletben. A poszterek legjobbjai díjazásban részesültek.

A Magyar Bioinformatikai Egyesület díjazottja:

Dörmő Ákos (SZTE-SZAOK, Orvosi Biológiai Intézet, Szeged)

A Magyar Biokémiai Egyesület díjazottja:

Szabó Kitti (SZTE-SZAOK, Biokémiai Intézet, Szeged)

A Magyar Genetikusok Egyesületének díjazottja:

Benyó Dániel (ELKH SZBK, Növénybiológiai Intézet, Szeged)

A fődíjazott, azaz a FEBS Open Bio poszter díj tulajdonosa:

Biczók Zsuzsanna (ELKH TTK, Enzimológiai Intézet, Budapest)

A szakmai megbeszélésekre, közös projektek elindítására a szünetekben és étkezések alatt bőven volt lehetőség. Emellett találkozhattunk a kutatásainkhoz szükséges szolgáltatásokat, anyagokat, reagenseket forgalmazó cégek képviselőivel, mivel 22 molekuláris biológiai és diagnosztikai termékeket kínáló cég képviseltette magát, és egyben szponzorálta a konferenciát.

Nem szakmai programok

Péntek kora délután az érkezőket finom szendvicsekkel fogadta a Hotel Eger & Park. A résztvevők nagy része itt is szállt meg. A hotel biztosította a reggelit, ebédet és a kávészünetekben felszolgált finom frissen sült sütit, pogácsákat és frissítőket. A szálloda széleskörű wellness szolgáltatásait is igénybe vehettük, és elsétálhattunk a közeli Szépasszony völgybe egy kis borkóstolásra. Sőt, a szálloda szomszédságában egy gyönyörű park található, ami alkalmas sétára, futásra.

Az első nap szakmai része után Welcome-vacsora következett pezsgőzéssel, sörözéssel, borozással, majd ezután a fiatalok és az örökké fiatalok meglátogatták Eger legjobb és legtovább nyitva tartó kocsmáit, bájait. A kávénak köszönhetően másnap újra harcra képesek voltunk, végig hallgattuk az előadásokat, az előadók prezentálták a sajátjaikat és élvezték a Bankett finom fogásait. Aztán jött a buli. A Madarak együttes legalább 7 tagú csapata fergeteges Retro-bulit rendezett, ahol együtt táncolt fiatal és kevésbé fiatal, egyetemi hallgató és oktató, csoportvezető és céges képviselő. Igaz a buli lassan indult, de a „debreceni lányok”, Csősz Éva és Lontay Beáta mindent megtettek a jó hangulatért, még a bicegőket is sikerült bevonni a táncba. Hajnali 1 órakor alig tudták a társaságot kidobni a Kongresszus Teremből.

Zárszó

Szakmailag értékes, jó hangulatú, a Covid-idők után szívet melengető konferencia volt. Megismerhettük a mai magyar molekuláris kutatásokat, köthettünk új szakmai és baráti ismeretségeket, találkozhattunk rég nem látott barátokkal, kollégákkal. És persze bulizhattunk.

Köszönjük a szakmai szervezőknek, a Magyar Biokémiai Egyesületnek, a Magyar Genetikusok Egyesületének, a szponzoroknak és nem utolsósorban a Diamond Congress Kft-nek a kiváló szervezést.

Alexa Anita
ELKH TTK Szerves Kémiai Intézet
alex.aanita@ttk.hu

BESZÁMOLÓ AZ MTA PEPTIDKÉMIAI MUNKABIZOTTSÁG (PKMB) 2023. ÉVI TUDOMÁNYOS ÜLÉSÉRŐL

2023. május 8. – május 10. között tartottuk a tudományos ülésünket, a szokásokhoz híven a Richter Gedeon Nyrt. üdülőjében, Balatonszemesen.

A konferencián 67 fő vett részt, köztük nagyszámú fiatal. A gazdag tudományos program 8 szekciójában 42 előadás hangzott el, amelyek bemutatták a hazai peptid- és fehérjekutatás legfrissebb eredményeit. A konferencia előadásai a meghívott előadók, illetve a külföldi PhD hallgatókra tekintettel többségében angolul zajlott. Az előadásokat aktív diszkussziókkal zártuk le. Az előadások mellett poszterszekciót is tartottunk, amelyre 8 előadást jelentettek be.

Első este a vacsora után került sor a PKMB nyilvános ülésére, ahol frissen sült pogácsa és remek borok kóstolása mellett kötetlen baráti beszélgetés folyt, többek esetében hajnalig.

A konferencia szekciók a következő témaköröket ölelték fel: peptid szintézis, a peptidek analitikája és szerkezetvizsgálata, peptid konjugátumok, biológiai hatások, a fehérjék szerkezete és funkciója, elméleti kémia.

A konferencia végén került sor a Medzihradszky Kálmán előadói díjak átadására, amelyet az öt tagú szakmai zsűri Hegedüs Zsófiának (SZTE, SZAOK, Orvosi Vegytani Intézet) és Szaniszló Szabasziánnak (Hevesy György Kémia Doktori Iskola, témavezető: Perczel András, az MTA rendes tagja) ítélte.

A rendezvényen 5 cég (ABL&E-JASCO Magyarország Kereskedelmi és Szolgáltató Kft., Unicam Magyarország Kft, Biocenter, Merck Life Science Kft., Gen-Lab Kft.) mutatta be a termékeit.

Köszönjük a cégek és az Alapítvány a Magyar Peptid- és Fehérjekutatásért által nyújtott anyagi támogatást!

Bízunk benne, hogy a 2024. évi MB ülés a szokott időben, a szokott helyen kerülhet megrendezésre!

Martinek Tamás
elnök

Hetényi Anasztázia
titkár