

# **Amiloid-béta oligomerek fiziko-kémiai karakterizálása és biológiai folyamatokban betöltött szerepük tanulmányozása**

**Ph.D. tézis összefoglaló**

***Simon Dóra***

**Témavezetők:**

**Fülöp Livia Ph.D.**

**Penke Botond D.Sc.**

**Orvosi Vegytani Intézet  
Szegedi Tudományegyetem**



**Szeged  
2011.**

## BEVEZETÉS

Az Alzheimer-kór (AK) napjaink egyik leggyakoribb neurodegeneratív betegsége, amely legfőképp az idősebb generációt érinti. A legfontosabb patológiai elváltozások között tartjuk számon az extracelluláris térben kialakuló amiloid plakkokat és az intracellulárisan megjelenő neurofibrilláris kötegeket, amelyeket hiperfoszforilált tau fehérje hoz létre.

A plakkok fő alkotó eleme az A $\beta$  peptid, amely egy, a 21-es kromoszómán kódolt transzmembrán proteinből, nevezetesen az APP-ből (amiloid prekursor protein) képződik enzimatis hasítás ( $\beta$ - és  $\gamma$ -szekretáz) révén. Az amiloid kaszkád hipotézis az A $\beta$  peptidnek (különösen az A $\beta$  1-42-nek) központi szerepet tulajdonít az AK patogenezisében.

A neurofibrilláris kötegeket alkotó tau fehérjék nem patológiás körülmények között a mikrotubuláris hálózat kialakításában játszanak fontos szerepet.

### *1) Az A $\beta$ 1-42 aggregációja*

Az enzimatis hasítással keletkező 39-42 aminosav hosszúságú peptid feloldáskor kezdetben  $\alpha$ -hélix/ rendezetlen, majd  $\beta$ -redő szerkezetet vesz fel. Ez az átalakulás aggregációs folyamatokat indukál, amely során oligomerek, protofibrillumok, fibrillumok keletkeznek. Korábban a kutatók a fibrillumokat tekintették az elsődleges célpontnak. Ma már bebizonyosodott, hogy a plakkok és fibrillumok képződése a betegség késői szakaszára jellemző, ezáltal a figyelem központjába az A $\beta$  oligomerek kerültek. Ezen oligomerek aggregációjának és toxicitásának vizsgálata központi fontosságú az AK kialakulásának megértése szempontjából. Ezen folyamatok tanulmányozása számos akadályba ütközik, hiszen a szekvenciában található nagyszámú hidrofób aminosav miatt az aggregáció igen nagymértékű és gyors. A biológiai kísérletekhez jól jellemzett, jól oldódó anyagra van szükség. A probléma kiküszöbölésére a laboratóriumunkban elkészült az A $\beta$  1-42 prekursora az „izo A $\beta$ ”, amely egy észterkötést tartalmaz. Ez a kötés savas pH tartományban stabil, fiziológias pH-n pedig megtörténik az O $\rightarrow$ N acil-vándorlás, amellyel létrejön a natív A $\beta$  1-42 peptid. Ez az átalakulás igen rövid idő alatt megy végbe. Vizsgálataink azt mutatják, hogy a prekursor peptid jobban oldódik, és az aggregációja kontrollálhatóbb az eredeti szekvenciához képest.

Az A $\beta$  1-42 aggregációjának követésére különféle biokémiai vizsgáló módszereket alkalmaztunk: gyors protein folyadékromatográfia (Fast Protein Liquid Chromatography-Size Exclusion Chromatography, FPLC-SEC); Western blot (WB); fényszórás mérés (Dinamic Light Scattering, DLS); Transzmissziós Elektron Mikroszkópia (TEM).

## 2) *Faktorok, amelyek befolyásolják az A $\beta$ 1-42 aggregációját: fémek az AK-ban*

Számos kutató gondolja azt, hogy az A $\beta$  aggregációjához más neurokémiai tényező is hozzájárul *in vivo*, mint pl. a fémionok (Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>). Ezek az ionok fehérjékhez kapcsolódva fontos szerepet játszanak a neurodegeneratív betegségeket érintő aggregációs folyamatokban. A dolgozatban a Zn<sup>2+</sup> hatásával foglalkozunk részletesebben. Az AK-ban a nagy mennyiségben expresszáladott Zn<sup>2+</sup>-transzporter fehérjék (ZnT) magas Zn<sup>2+</sup> koncentrációt alakítanak ki, ezzel megteremtve a lehetőségét a nem fiziológiás Zn<sup>2+</sup>-protein/peptid kölcsönhatások, aggregátumok kialakulásának. Számos tanulmány leírta, hogy a Zn<sup>2+</sup> az A $\beta$ -hoz kötődve felgyorsítja az aggregációt, toxikus komplexek jönnek létre, amelyek kialakulása fém kelátorokkal megakadályozható. Ezáltal ezek a kelátor molekulák potenciális gyógyszerjelölt vegyületek lehetnek.

Egyik ilyen általunk tesztelt molekula az ENDIP (N1, N2-bis (pyridine-2-yl-methyl) ethane-1,2-diamine).

## 3) *A $\beta$ 1-42 oligomerek interakciói*

A fehérje-fehérje interakciók fontos szerepet játszanak a sejtek működésében. Valószínűsíthető, hogy az A $\beta$  oligomerek is hasonló interakciók útján fejtik ki toxikus hatásukat. Az A $\beta$  oligomerek képződhetnek extra- és intracellulárisan is, potenciálisan bárhol, ahol az APP, a  $\beta$ - és  $\gamma$ -szekretáz együttesen jelen van. Ez idáig nem tisztázott, hogyan fejtik ki az A $\beta$  a toxikus hatását a sejtekre. Számos szignalizációs útvonalat feltérképeztek már, amelyben szerepe van az A $\beta$ -nak. Ezen eredményekből adódik, hogy nem egyetlen molekulán keresztül érvényesül a toxikus hatás.

E kérdés tanulmányozásához interakciós kísérletet végeztünk humán protein chip alkalmazásával. Ez egy gyors és gazdaságos módja a kötődő fehérjék feltérképezésének. A chippek tisztított rekombináns fehérjéket tartalmaznak a felszínre immobilizálva. Ezen chippek az adott fehérjékkel, molekulákkal inkubálva számos kísérletben alkalmazhatók interakciós partnerek keresése céljából.

## CÉLKITŰZÉSEK

Számos megválaszolatlan kérdés van az A $\beta$  oligomerek központi idegrendszerben betöltött szerepét illetően, hiszen az AK egy komplex betegség: mely aggregációs formák, konformációk toxikusak, melyek azok a faktorok, amelyek befolyásolják az aggregációt, mely receptorok, fehérjék vesznek részt ezekben a folyamatokban.

A dolgozatom fő célja ezen felvetések tanulmányozása.

1, A $\beta$  1-42 oligomerek fiziko-kémiai jellemzése.

A kísérletek reprodukálhatósága szempontjából nagyon fontos, hogy a biológiában jól karakterizált anyaggal, aggregátummal dolgozzunk. Emiatt feltétlenül szükséges az alkalmazott A $\beta$  sokoldalú jellemzése. Ennek érdekében a laborunkban elkészült az A $\beta$  1-42 prekuzora az „izo A $\beta$ ”, amely lehetővé teszi, hogy a kísérleteink kontrollálhatóak legyenek. Az A $\beta$  karakterizálására olyan módszereket alkalmaztunk, amelyek alkalmasak az A $\beta$  aggregátumok minőségi jellemzésére: FPLC-SEC, WB, DLS és TEM.

2, Egy kelátor molekula, az ENDIP hatásának vizsgálata a Zn<sup>2+</sup> által indukált A $\beta$  1-42 aggregációra.

3, Szükség van az A $\beta$  oligomerek kölcsönható partnereinek feltérképezésére azért, hogy az AK patomechanizmusát molekuláris szinten megértsük. Ehhez *in vitro* protein chip kísérletet végeztünk.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1) *A $\beta$  1-42 peptidek szintézise:*

A peptidek az Alzheimer-csoport laboratóriumában készültek.

2) *Az A $\beta$  1-42 oligomerek előállítása izo A $\beta$  1-42-ből kiindulva*

Az izo A $\beta$  1-42-t feloldottuk HFIP-ben, majd 24 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd a HFIP-t vákumcentrifugában elpárologtattuk. A peptidet MilliQ vízben (pH 5.0) 500  $\mu$ M koncentrációban beoldottuk és ultrahangoztuk 5 percig. A kísérleteinkhez ezt a törzsoldatot az adott pufferben a szükséges végkoncentrációra hígítottuk, az oldás után igen rövid idő alatt kialakult a natív A $\beta$  1-42 szerkezet.

3) *Transzmissziós elektronmikroszkópia*

10  $\mu$ l A $\beta$  1-42 oligomert vagy tisztított riboszóma oldatot cseppentettünk TEM gridre, a mintákat Philips CM 10 transzmissziós elektron mikroszkóppal vizsgáltuk (FEI Company,

Hillsboro, OR). A képek analizálását a Megaview II Soft Imaging System és AnalySis 3.2 szoftver (Soft Imaging System, Munster, Germany) tette lehetővé.

#### 4) *Fényszórás mérés*

A fényszórás vizsgálatok során az oldatban lévő megvilágított részecskék által szórt fény analízise történik, amelyből a részecskék tulajdonságaira következtetünk. A dinamikus fényszórás mérés alapja a szórt fény időbeli változásának vizsgálata. A részecskék méreteloszlásának meghatározása során elsőként egy intenzitás szerinti méreteloszlás adódik, de rendelkezésre állnak tömeg és darabszám szerinti méreteloszlások is. A módszerrel számos fontos paramétert vizsgálhatunk, úgymint hidrodinamikai átmerőt, amelyet a diffúziós paramétereiből számolhatunk ki a Stokes-Einstein egyenlet segítségével.

#### 5) *FPLC-SEC mérések*

Az izo A $\beta$  peptidből a 2. pont szerint előállítottuk a natív A $\beta$  1-42-t és különböző hosszúságú ideig aggregáltattuk (0 min, 3h, egy éjszakán át, 3 nap). Ezeket a mintákat injektáltuk fel Superose 6 10 300-as FPLC oszlopra, majd 0.5 ml/min áramlási sebességgel, HCBS pufferben 25°C elválasztottuk az aggregátumokat. Ezen elválasztott aggregátumok méretét a kalibrációs standardok retenciós ideje alapján számoltuk ki.

#### 6) *SDS-PAGE, Western Blot*

A WB kísérlethez 50  $\mu$ M mintákat 15%-os SDS-poliakrilamid gélen megfuttattuk, majd a gélből a mintákat nitrocellulóz membránra transzfereltük.

A tisztított riboszómák Western blot analíziséhez meghatároztuk BCA teszttel a pontos oldatkoncentrációt, majd ezt követően egyenlő mennyiségű riboszómát vittünk fel a gélre. A riboszóma kimutatásához monoklonális RPL36A antitestet használtunk.

#### 7) *Monoklonális antitest jelölése Alexa fluor-647 szukcinimidil észterrel*

Monoklonális Bam-10 A $\beta$  1-42 antitest jelöléséhez a fluoreszcens festéket ötszörös feleslegben alkalmaztuk. A feleslegben lévő festéket hidroxilamin oldattal semlegesítettük. Az így megjelölt antitestet Microcon cső alkalmazásával választottuk el a nem kötődött festékmolekuláktól és ugyan olyan körülmények között tároltuk, mint az eredeti, nem jelölt antitestet.

8) *Humán protein chip kísérlet*

A csip blokkolását követően, az A $\beta$  1-42 oligomereket 10  $\mu$ M koncentrációban alkalmaztuk, majd Alexa-647-tel jelölt antitesttel inkubáltuk a felszínt. A szkennelést GenePix Personal 4100A szkennelővel végeztük.

9) *A protein chip kiértékelése*

A háttér intenzitás középértékét levontuk a jelintenzitások középértékéből, így kaptuk meg az egyes pontok jelintenzitását. Ezeket az intenzitásokat koncentrációra normalizáltuk, ezáltal válnak összehasonlíthatóvá az értékek.

10) *Aurora A kináz aktivitásának mérése*

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, hogy az általunk alkalmazott A $\beta$  oligomerek befolyásolják-e az Aurora A enzim aktivitását, Aurora A kináz aktivitását mérő tesztet alkalmaztunk. Friss és 24 órás aggregátumokat, vagy staurosporint inkubáltunk az enzimmel 5 percig és a biotinilált szubsztráttal 30 percig. Az elsődleges anti-foszfó-PLK antitest hozzáadása után HRP-jelölt másodlagos antitestet adtunk a rendszerhez. Tetra-metilbenzidin (TMB) oldat és stop oldat hozzáadását követően az abszorbanciát 450 nm-en olvastuk le FLUOstar OPTIMA Multidetecion Microplate Reader segítségével.

11) *Riboszóma tisztítása*

A korábban izolált, majd lefagyasztott patkány hippocampuszt homogenizáltuk és 8000 g-n centrifugáltuk 10 percig. A felülúszót szukróz grádiens (1M, 2M) tetejére rétegeztük, centrifugáltuk, és a csapadékot felszuszpendáltuk abban az oldatban, amelyben a későbbiekben tároltuk a riboszómát -80°C-on.

12) *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): oligomer A $\beta$  1-42 riboszómához való kötődésének tesztelésére*

0.1  $\mu$ g tisztított riboszómával borított 96 lyukú plate-et különböző mennyiségű A $\beta$  oligomerrel, majd elsődleges és HRP-vel konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk 1-1 órán át. Az abszorbanciát 370 nm-en követtük a jelintenzitások telítődéséig FLUOstar OPTIMA Multidetecion Microplate Reader segítségével.

### 13) *In vitro* transzláció tesztelése

Az A $\beta$  1-42-t különböző koncentrációkban adtunk retikulocita lizátumhoz. Az inkubációt követően luciferáz enzim RNS templátját adtuk a rendszerhez. Az így keletkező lumineszcenciát LumiStar Optima luminométerrel detektáltuk. Az expresszáldott luciferáz fehérje mennyiségét Western Blottal követtük nyomon.

## EREDMÉNYEK

### 1) *Az A $\beta$ oligomerek fiziko-kémiai jellemzése:*

A különböző ideig inkubált A $\beta$  aggregátumokat Superose 6 10 300 FPLC oszlopon választottuk el. A frissen feloldott minta egy intenzív csúcsot képez ~2300 és ~12000 Da között. Ez azt jelenti, hogy a frissen feloldott peptid monomereket, dimereket és trimereket képez. A 3 órán át inkubált mintában már a nagyobb aggregátumok is megjelennek a ~83000 és ~480000 Da közötti tartományban. Az egy éjszakán át inkubált mintában a kisebb méretű aggregátumok mennyisége lecsökkent a nagyobb méretűek javára. Ugyan ez a tendencia figyelhető meg a 3 napig aggregált mintában is, azzal a különbséggel, hogy fele annyi mennyiségű anyagot vittünk fel az oszlopra.

Ugyan azokat az A $\beta$  mintákat, amelyeket az FPLC-SEC oszlopon elválasztottunk, analizáltuk Western Blot technikával is. Két féle antitestet használtunk: egy szekvencia specifikus (Bam-10) és egy konformáció specifikus (OC) antitestet. Azon a membránon, amelyet Bam-10 antitesttel inkubáltunk, jól látható, hogy a frissen feloldott mintában többnyire kisebb, az idő múlásával pedig egyre több nagyméretű aggregátum jelenik meg. Az OC antitesttel inkubált membránon az aggregátumok igen széles spektruma látható, a sávok nem különülnek el olyan élesen, mint a Bam-10-zel inkubált membránon.

### 2) *ENDIP hatásának vizsgálata A $\beta$ aggregációjára, az aggregátumok méretére Zn<sup>2+</sup> hozzáadását követően*

Az A $\beta$  1-42 oligomerek hidrodinamikus átmérőjét vizsgáltuk 50  $\mu$ M koncentrációban fényszórás méréssel magában, Zn<sup>2+</sup> hozzáadását, illetve kelátor molekula, ENDIP alkalmazását követően. Alap esetben az A $\beta$  oligomerek a vizsgált időintervallumban meglehetősen stabilak. Zn<sup>2+</sup> hozzáadása után a hidrodinamikus átmérőben jelentős növekedést észleltünk. Az ENDIP-et ötszörös feleslegben alkalmazva azt tapasztaltuk, hogy az oligomerek mérete lecsökkent a kiindulási mérettartományba.

### 3) *A $\beta$ oligomerek kötőfehérjéinek feltérképezése humán protein chip alkalmazásával*

#### - *A $\beta$ 1-42 oligomerizációja*

Ahhoz, hogy tudjuk, hogy a protein chip kísérletekhez használt A $\beta$  1-42 oligomerek mennyire stabilak az inkubációs idő alatt (1.5 h), és milyen szerkezetet vesznek fel, fényszórás és TEM méréseket végeztünk. A DLS mérések körülményeit a chip kísérlethez igazítottuk. Azt tapasztaltuk, hogy ez idő alatt az oligomerek stabilak. A TEM vizsgálat gömbölyded formájú oligomereket mutatott.

#### - *A $\beta$ 1-42 oligomerek interakciós partnereinek keresése*

Párhuzamosan két chipet használtunk, amelyek 8163 humán fehérjét tartalmaztak. A kísérlet során keletkező szignálintenzitások elemzéséből kiderült, hogy az oligomerek számos fehérjéhez kapcsolódtak, úgymint a transzkripcióban, translációban, génexpressziós folyamatokban szerepet játszó fehérjékhez. Az analízist követően kiválasztottunk egy potenciális partner fehérjét, nevezetesen az Aurora A kinázt (AURKA). Annak kiderítésére, hogy a chip kísérletben észlelt kötődés hatással van-e az enzim működésére, HTScan Aurora A kináz enzimaktivitási tesztet végeztünk. Különböző ideig inkubált (0 min, 24h) és különböző koncentrációjú A $\beta$ -t (0 min: 1nM-1mM; 24h: 1-10-100  $\mu$ M)használtunk. A teszt eredménye azt mutatta, hogy ezek az aggregátumok nem voltak képesek gátolni az enzim szubsztrátjának foszforilálását.

Alkalmaztunk más kiértékelési módszert is, amely szerint a kötődő fehérjéket funkcionális csoportokba rendeztük bioinformatikai adatbázisok segítségével. Ez a módszer felfedte, hogy a leginkább érintett csoport a protein translációban részt vevő fehérjék csoportja, amely 24 proteint tartalmaz, köztük néhány mitokondriális és nem mitokondriális riboszóma komponens, illetve transláció iníciáló faktort.

Ahhoz, hogy validáljuk a chip kísérlet eredményét, bizonyítanunk kellett más módszerekkel is, hogy az A $\beta$  oligomerek kötődnek a riboszómákhoz és funkcionálisan gátolják annak működését *in vitro*. Erre két módszert alkalmaztunk: ELISA-t és egy *in vitro* translációs tesztet.

Az ELISA mérés során azt tapasztaltuk, hogy az A $\beta$  1-42 oligomerek koncentráció-függő módon kötődtek az immobilizált riboszómákhoz. Ezt a kísérletet teljes hippokampusz homogenizátummal is elvégeztük, ami azt mutatta, hogy az oligomerek a riboszómális fehérjéken kívül számos más fehérjéhez is képesek kötődni, de a tisztított riboszóma preparátumokoz való kötődés erősebb volt.



Az in vitro fehérje transzlációs teszt alapján azt láttuk, hogy az A $\beta$  szintén koncentrációfüggő módon gátolta a luciferáz enzim lumineszcencia aktivitását. Ahhoz, hogy kizárjuk annak lehetőségét, hogy az oligomerek csupán a lumineszcens szignál intenzitását csökkentették, a gátlást WB kísérlettel is bizonyítottuk, ami megmutatta, hogy A $\beta$  hatására a luciferáz fehérje expressziója lecsökkent szintén koncentrációfüggő módon.

## DISZKUSSZIÓ

### *1) A $\beta$ 1-42 oligomerek fiziko-kémiai jellemzése, és az aggregáció tanulmányozása*

A TEM 5-10 nm átmérőjű gömbölyded formájú oligomereket mutat. A kisebb aggregátumok mennyisége az idő előrehaladtával lecsökken és egyre több, nagyobb méretű jelenik meg, ahogyan azt a WB és FPLC-SEC kísérletek is mutatják. Ezen kísérleteinkhez a laboratóriumunkban szintetizált peptidet, az A $\beta$  1-42 prekursor peptidjét használtuk, amely egy észter kötést tartalmaz. Ez a kötés savas pH tartományban stabil, fiziológiás pH-n átalakul, létrehozva a natív A $\beta$  1-42-t. A kiindulási anyag ezen tulajdonsága jobb oldékonyt eredményez, és lehetővé teszi számunkra, hogy kontrollált módon létrehozassuk az oligomer oldatot. Az aggregáció követésére a kísérleteinket standardizáltuk: azonos koncentrációjú A $\beta$  1-42-vel és azonos inkubálási idővel dolgoztunk a WB és az FPLC-SEC mérések során is. Azt kaptuk, hogy az oldatainkban lévő oligomerek széles mérettartományúak. Az idő előrehaladtával (0 min, 3h, egy éjszakán át inkubálva, 3 nap) egyre több nagyméretű aggregátum jelenik meg, míg a kisebbek mennyisége csökken. A WB analízise során OC antitest segítségével sikerült kimutatnunk, hogy az oldataink oligomereket tartalmaznak a kisebbektől egészen a nagyobb méretűekig, amelyek már röviddel a beoldást követően jelen vannak és három nap elteltével is detektálhatók. Ezeknek az eredményeknek nagy jelentősége van, hiszen az amiloidogén fehérjék/ peptidek különféle aggregációs formákban lehetnek jelen, ebből adódóan igazán fontos kérdés az, hogy ezek közül melyik hozható összefüggésbe az adott betegség kialakulásával.

### *2) A $\beta$ 1-42 aggregációjának vizsgálata Zn<sup>2+</sup> és ENDIP hozzáadását követően*

Napjainkban számos tanulmány foglalkozik a fémionok neurodegeneratív betegségekben betöltött szerepével. Ezek az ionok fehérjékhez ( $\alpha$ -szinuklein, prion protein, A $\beta$ ) kötődve hatással lehetnek azok aggregációjára, illetve megváltoztathatják azok funkcióját, konformációját is. Jelen esetben a Zn<sup>2+</sup> hatásával foglalkoztunk. Új kelátor molekulák tervezése terápiás szempontból nagy jelentőséggel bír, hiszen az A $\beta$  1-42-Zn<sup>2+</sup>-komplex toxikus. Kísérleteink során egy TPEN (N,N,N',N'-tetrakis (2-pyridylmethyl)ethylenediamine)

származékot, az ENDIP molekulát teszteltük az A $\beta$  Zn<sup>2+</sup> által módosított aggregációjára fényszórás méréssel. Azt találtuk, hogy a Zn<sup>2+</sup> hozzáadása után az A $\beta$  1-42 aggregációja felgyorsult, az aggregátumok mérete jelentősen megnövekedett. Az ENDIP hozzáadása után a hidrodinamikusan átmérő visszacsökkent a kiindulási mérettartományba. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy az ENDIP molekula hatékonyan vonta el a Zn-ionokat az A $\beta$  1-42-től, ezáltal képes volt a fém ion-indukálta aggregációt visszafordítani és újra oldatba vinni a peptidet.

### 3) A $\beta$ 1-42 oligomerek interaktómjának feltérképezése

Az Alzheimer-kór egy igen komplex patomechanizmusú betegség. Ahhoz, hogy megértsük az A $\beta$  oligomerek szerepét a kórfolyamat kialakulásában, szükség van arra, hogy kiderítsük, hogy a peptid milyen fehérjéken, fehérjehálózatokon keresztül fejti ki toxikus hatását. Az interakciós partnerek keresésére protein chip technológiát alkalmaztunk. Az eredmények azt mutatták, hogy az oligomerek nagyszámú fehérjéhez kötődtek nagy intenzitással, tehát ezek az interakciók nem specifikusak.

A kiértékelés során kétféle módszert alkalmaztunk:

Az első analízis esetében a kötődő fehérjéket csupán a jelintenzitások alapján állítottuk sorba. Ezek közül a választásunk az AURKA fehérjére esett, amely egy szerin/treonin protein kináz, a betegséggel összefüggésbe hozható. Annak tesztelésére, hogy az A $\beta$  1-42 kötődése az enzim működését befolyásolja-e, egy, az enzim aktivitását mérő tesztet végeztünk. Eredményül azt kaptuk, hogy az A $\beta$  preparátumaink nem gátolták az AURKA működését a kontrollként alkalmazott protein kináz inhibitor (staurosporin) aktivitásához képest. Ezt azzal magyarázhatjuk, hogy bár az A $\beta$  kötődik az AURKA enzimhez *in vitro*, a kötődés helye nem az aktív centrumban található, ezáltal nem befolyásolja annak működését.

Az analízis másik módszere alapján az A $\beta$ -hoz kötődött fehérjéket funkcionális csoportokba rendeztük. E szerint a legérintettebb csoport a transzlációs folyamatokban részt vevő fehérjék csoportja volt. Ezek az *in vitro* létrejövő kötődések természetesen nem jelentik feltétlenül azt, hogy ezek a kapcsolatok *in vivo* is léteznek, illetve funkcionálisan valamilyen változást okoznak. Ennek számos oka lehet, pl. az A $\beta$  és az adott fehérje nem egy időben és nem egy helyen található, vagy esetleg a kötőhely nem hozzáférhető az adott pillanatban az A $\beta$  oligomerek számára. Mindezen okokból kifolyólag a chip kísérletből származó eredményeket más módszerrel és funkcionálisan is bizonyítani akartuk:

Riboszómát izoláltunk patkány agyból, majd ELISA tesztelést végeztünk, hogy a tisztított riboszómákhoz való kötődés erősebb a teljes homogenizátumhoz való kötődéshez képest. Az

eredményből nem következik az, hogy a translációt is befolyásolja az interakció, ezért a transláció gátlást *in vitro* translációs teszttel igazoltuk, ahol azt kaptuk, hogy a gátlás koncentrációfüggő módon történt. Természetesen ezek a tesztek nem szolgálnak bizonyítékként arra, hogy ez a folyamat *in vivo* is megtörténik. Ennek bizonyítása akadályokba ütközik, hiszen a fehérje mennyiség csökkenése számos más okból, más folyamatok eredményeképp is bekövetkezhet az AK-ban.

## A TÉZIS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

### I.

#### **Two pyridine derivatives as potential Cu(II) and Zn(II) chelators in therapy for Alzheimer's disease.**

Lakatos A, Zsigó E, Hollender D, Nagy NV, Fülöp L, Simon D, Bozsó Z, Kiss T.  
Dalton Trans. 2010. Feb. 7; 39 (5):1302-15. **IF: 3.647**

### II.

#### **Controlled in situ preparation of A beta(1-42) oligomers from the isopeptide "iso-A beta(1-42)", physicochemical and biological characterization.**

Bozso Z, Penke B, Simon D, Laczkó I, Juhász G, Szegedi V, Kasza A, Soós K, Hetényi A, Wéber E, Tóháti H, Csete M, Zarándi M, Fülöp L.  
Peptides. 2010. Feb; 31 (2):248-56. **IF: 2.654**

### III.

#### **Protein array based interactome analysis of amyloid- $\beta$ indicates an inhibition of protein translation.**

Virok DP<sup>#</sup>, Simon D<sup>#</sup>, Bozsó Z, Rajkó R, Datki Z, Bálint É, Szegedi V, Janáky T, Penke B, Fülöp L.  
J. Proteome Res. 2011. Apr. 1;10 (4):1538-47. **IF: 5.46**

### IV.

#### **Interactions of pathological hallmark proteins: Tubulin polymerization promoting protein/p25, {beta}-amyloid and {alpha}-synuclein.**

Olah J, Vincze O, Virok D, Simon D, Bozso Z, Tokesi N, Horvath I, Hlavanda E, Kovacs J, Magyar A, Szucs M, Orosz F, Penke B, Ovadi J.  
J. Biol. Chem. 2011. Aug. 8. **IF: 5.328**

## NEMZETKÖZI KONFERENCIA-RÉSZVÉTEL

### *Poszterek:*

1. AD/PD 2009 – Prague: **Protective effect of putative drug candidates on the amyloid-beta oligomer-induced astrocyte activation in rat entorhinal cortex**
2. "Chemistry towards Biology" 2010 – Primosten: **Protein chip based interactome analysis of A $\beta$  indicates an inhibition of the cellular translation machinery**

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőimnek, Dr. Fülöp Líviának és Prof. Penke Botondnak, amiért csatlakozhattam a csoportjukhoz és lehetőséget biztosítottak munkám sikeres elvégzéséhez és dolgozatom megírásához.

Hálás vagyok Dr. Virók Dezsőnek, aki szakmai tanácsaival, önzetlen támogatásával alapvetően hozzájárult szakmai fejlődésemhez és sikeres munkámhoz.

Köszönetet mondok kollégáimnak segítőkészségükért és a jó hangulatban eltöltött munkanapokért.

Köszönetem fejezem ki Pataki Szilviának a kísérleti munkák során nyújtott segítségével.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a szüleimnek, bátyámnak, Krisztiánnak és a férjemnek, Zsoltnak, hogy mindvégig mellettem álltak és szerető háttérrel biztosítottak a munkám során.