

Humán biomarkerek és az oxidatív stressz kapcsolata Alzheimer- kórban, újszerű *in vivo* modellezési lehetőségek

A Ph.D. értekezés tézisei

Oláh Zita



Szeged

2018

**Humán biomarkerek és az oxidatív stressz kapcsolata Alzheimer-
kórban, újszerű *in vivo* modellezési lehetőségek**

A Ph.D. értekezés tézisei

Oláh Zita

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem

Témavezető:

Dr. Pákáski Magdolna Ph.D.

Szegedi Tudományegyetem
Pszichiátriai Klinika

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapját képező közlemények

- I. **Olah Z**, Pakaski M, Janka Z, Kalman J. Marking the markers of Alzheimer's: too good to diagnose, too bad to use? *Neuropsychopharmacol Hung* 2012 Sep;14(3):165-76. Review. PMID: 22987730 **IF: 0**
- II. **Oláh Z**, Kálmán J, Tóth ME, Zvara Á, Sántha M, Ivitz E, Janka Z, Pákáski M. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease: wanted dead or alive. *J Alzheimers Dis* 2015;44(4):1303-12. doi: 10.3233/JAD-140141. PMID: 25428253 **IF: 3,92**
- III. **Olah Z**, Bush AI, Aleksza D, Galik B, Ivitz E, Macsai L, Janka Z, Karman Z, Kalman J, Datki Z. Novel *in vivo* experimental viability assays with high sensitivity and throughput capacity using a bdelloid rotifer. *Ecotoxicol Environ Saf* 2017 Oct;144:115-122. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.06.005. Epub 2017 Jun 9. PMID: 28605645 **IF: 3,743**
- IV. Datki Zs, **Olah Z**, Hortobagyi T, Macsai L, Zsuga K, Fulop L, Bozso Zs, Galik B, Acs, E, Foldi A, Szarvas A, Kalman J. Exceptional *in vivo* catabolism of neurodegeneration-related aggregates. *Acta Neuropathol* 2018 6:6 doi: 10.1186/s40478-018-0507-3; várható első **IF: 3,8** (a főszerkesztő nyilatkozata alapján).

A tézis alapját képező tudományos közlemények összesített impakt faktora: 11,463

Egyéb közlemények

- I. Sántha P, Veszelka S, Hoyk Z, Mészáros M, Walter FR, Tóth AE, Kiss L, Kincses A, **Oláh Z**, Seprényi G, Rákhely G, Dér A, Pákáski M, Kálmán J, Kittel Á, Deli MA. Restraint stress-induced morphological changes at the blood-brain barrier in adult rats. *Front Mol Neurosci* 2016 Jan 14;8:88. doi: 10.3389/fnmol.2015.00088. eCollection 2015. PMID: 26834555
- II. Várhelyi ZP, Kálmán J, **Oláh Z**, Ivitz EV, Fodor EK, Sántha M, Datki ZL, Pákáski M. Adiponectin receptors are less sensitive to stress in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Front Neurosci* 2017 Apr 11;11:199. doi: 10.3389/fnins.2017.00199. eCollection 2017.
- III. Money KM, **Olah Z**, Korade Z, Garbett KA, Shelton RC, Mirnics K. An altered peripheral IL6 response in major depressive disorder. *Neurobiol Dis* 2016 May;89:46-54. doi: 10.1016/j.nbd.2016.01.015. Epub 2016 Jan 22. PMID: 26804030

1. Bevezetés

1.1. Alzheimer-kór: epidemiológia és patomechanizmus

Világszerte mintegy 44 millióra becsülhető az Alzheimer-kórban (AK) szenvedő betegek száma, de a betegség prevalenciája előrejelzések alapján kb. 2050-re megduplázódik. Habár a betegség pontos ok-okozatai máig nem ismertek, az AK kialakulásának hátterében genetikai és környezeti tényezők egyaránt állhatnak. Ezek együttes hatása elősegíti és kiváltja a neuroinflammációt, az oxidatív stresszt és a neuronális sejthalált, súlyosbítva a betegséghez köthető progresszív demenciát, retrográd epizodikus memória károsodását, végrehajtó és nyelvi funkciók hanyatlását. A betegség szövettani hátterét az extra- és intracelluláris, aggregációra hajlamos amiloid-béta ($A\beta_{1-42}$) felhalmozódása és az intracelluláris tau hiperfoszforiláció okozta neurofibrilláris kötegek kialakulása képezi. Az amiloid prekursor proteint (APP) a szervezet fiziológiásan két eltérő módon képes hasítani: a nem-amiloidogén útvonal a protektív végtermékek termelődéséhez vezet, míg az amiloidogén útvonal során a toxikus forma keletkezik. Az AK során a toxikus irányba tolódik el az APP-katabolizmus egyensúlya, elősegítve az $A\beta_{1-42}$ túltermelődést és ennek következtében kialakuló toxikus extracelluláris plakkok felhalmozódását. A különböző típusú plakkok direkt és indirekt módon is képesek elősegíteni a progressziót, befolyásolva az ionikus és redox egyensúlyokat, valamint a kinázok és foszfatázok funkcionális egyensúlyának felborulását.

1.2. Alzheimer-kór gerinctelen állatmodelljei

A gerinctelen állatmodellek az utóbbi években egyre nagyobb jelentőséggel bírnak a toxikológiai vizsgálatokban, valamint az öregedés és az ezzel kapcsolatban hozható neurodegeneratív kórképek kutatásában is. Széles körben használt gerinctelen modellorganizmusok közé tartoznak az ecetmuslicák, a fonálférgek, de a kerekesszék (rotiferek) is egyre hangsúlyosabb szerepet kapnak. A rotiferek kiválóan alkalmasak ősi, konzervált anyagcsere útvonalak vizsgálatára, melyek kapcsolatba hozhatók a genom stabilitás szabályzásával, proliferáció regulációjával, differenciációval, apoptózissal, a sejtszintű energia-homeosztázis megőrzésével, továbbá a makromolekulák károsodásával és javítási mechanizmusaiakkal. Ezen folyamatok kiemelkedő szereppel bírnak az AK patomechanizmusában is. A vizsgálatunk során alkalmazott bdelloid rotifer faj (*Philodina acuticornis odiosa*; PA) különleges előnyökkel bír a többi gerinctelen állatmodellhez

képest. Ezen állatok evolúciósan később váltak el az emberrel való közös őstől, így e fajban az ecetmuslicára és fonálféregre jellemző intenzív génvesztés csupán részben ment végbe. Ennek köszönhetően 10%-ban találhatóak meg náluk olyan humán analóg gének, melyek kisselektálódtak a genomból a többi modell esetében. A fent említett pozitívumok ellenére mindeközéig nem vizsgálták még, hogy a bdelloid rotiferek hordozzák-e az amiloid termelődéséhez szükséges fehérjéket, valamint ellentmondásos szakirodalmi adatok állnak rendelkezésünkre az A β 1-42 rotifereket érintő toxicitását illetően. A rotiferek a világ legkisebb állatai (nagyjából 250-300 μ m hosszúak), az összetett szervezetük megközelítőleg 900-1000 sejtből áll. Dúcidegrendszerük, emésztő szervrendszerük, vesécskéjük, petefészkeik, izmaik, szekretoros rendszerük önálló és elkülönült. Fényérzékenységüket primitív szem biztosítja, idegrendszerükben pedig megtalálható az összes fontos neurotranszmitter. A környezeti hatásokra extrém módon rezisztens bdelloidok szűznemzéssel szaporodnak, így degenerált tetraploid genomjuk homogén hátteret biztosít a kísérletekhez, továbbá rövid az élettartamuk és generációs idejük, így könnyen kezelhetőek jól kontrollálható körülmények között. Tenyésztésüknek és molekuláris manipulációjuknak egyszerű volta szintén vonzó modellté teszi őket. Objektíven és kvantitatívan leírható fiziológiás és viselkedési jellemzőik ideális alapját képezik viabilitási vizsgálatainknak. Ökotoxicitási tesztekben a vízi környezet szennyeződések akut és krónikus hatásának felmérésére széleskörben használnak rotifereket. Ennek ellenére máig nem dolgoztak ki standardizált viselkedési teszteket, továbbá nincs olyan elérhető módszer, mely segítségével önálló egyedeken lehetne nyomon követni a hatásokat. Természetes élőhelyükön a rotifereknek gyakran szembesülnek a környezet adta extrém körülményekkel, melyek legtöbbször oxidatív stresszhez vezethetnek. Az antioxidáns rendszerük bizonyos mértékig képes kivédeni a reaktív oxigén gyökök (ROS) által okozott molekuláris károsodásokat. Kísérletes eredmények alapján az exogén antioxidánsok képesek a mitokondriális funkció megőrzésének segítségével megnövelni az élettartamukat. Az reaktív hatóanyagok a kulcsfontosságú molekulacsoportok elektronjainak elvonása révén képesek oxidálni a molekulákat. A közismerten alkalmazott hidrogén-peroxid (H₂O₂) és nátrium-azid (NaN₃) molekuláris hatásmechanizmusa jól definiálható, fiziológiásan káros hatásuk jól értelmezhető. Ezek a hatóanyagok képesek a mitokondriális elektron transzportlánc IV. komplex működésének károsítása révén elősegíteni a ROS termelődést. A mechanizmus párhuzamot mutat az AK kóros folyamataival, így a rotiferek meghatározott kereteken

belül megfelelő *in vivo* modellként szolgálhatnak az AK kutatásokhoz és a hozzá kapcsolódó toxicitási mérésekhez.

1.3. Az Alzheimer-kór biomarkerei és rizikótényezői

Az AK-t nagyon nehéz prodromális fázisban azonosítani, mivel a kognitív tünetek legtöbbször aszpecifikusak. A biomarker kutatás célja olyan nagy érzékenységgű és specificitással bíró molekulák azonosítása, melyek jó indikátorai lehetnek a betegséghez kapcsolódó biológiai és patológiai folyamatoknak. A agy-gerincvelői folyadék (*liquor cerebrospinalis*; CSF) ideális forrás lehet új markerek azonosítása során, mivel ez direkt környezetet biztosít az agynak, valamint molekuláris összetétele szoros összefüggést mutat az intratekális folyamatokkal. A legújabb Dubois-féle diagnosztikai kritériumok tartalmazzák a CSF-ben található neurokémiai markerek analízisét a klinikai gyógyszervizsgálatok során. Az A β 1-42 szint csökkenése, totál tau (t-tau) és foszfo-tau (p-tau) szintjének növekedése 85%-os szenzitivitást és 95%-nál magasabb specificitást mutatott a közép- és súlyos AK esetén. Ezzel szemben enyhe kognitív zavar esetén a markerek prediktív értéke 50% alatt van. A fent említett rutin markerek további limitációja, hogy AK specifikus mintázatot mutattak ki az egészséges populáció 34%-ában. Differenciáldiagnosztikai értékét pedig csökkentik az a tény, hogy a nem-AK demenciában szenvedő páciensek 33%-ánál AK specifikus eltérést találtak.

Az AK esetében több rizikótényezőt is azonosítottak, melyek közül az egyik legfontosabb genetikai faktor az apolipoprotein E (ApoE). Az ApoE4 allél elősegíti a betegség kialakulását, heterozigóták esetében 4-szeresére, homozigóták esetében 12-szeresére növeli az AK rizikóját. Habár a pontos molekuláris mechanizmus nem ismert, de azt már bizonyították, hogy az ApoE hozzájárul mind az A β 1-42 felhalmozódásához (növekedett aggregáció és csökkent kiürülés), valamint a tau hiperfoszforilációhoz. Az ApoE kulcsszereppel bír a lipid homeosztázis szabályzásban is, így az AK-hoz köthető lipidomikai abnormalitások kialakulását is elősegítheti. Epidemiológiai adatok alapján az AK rizikófaktorként azonosították a humán *Herpes simplex* vírus 1 (HSV1) és 2 (HSV2) fertőzést és reaktivációt. A reaktiváció során a replikálódott vírus belép a központi idegrendszer területére, ahol a vér-agy-gátat (BBB) károsítva képes fokozni az AK-hoz kötődő molekuláris folyamatokat és a neurodegenerációt.

1.4. Oxidatív stressz

Az oxidatív stressz az AK egyik legkorábban megfigyelhető patológiás molekuláris folyamata. Az érintett neuronokban a mitokondriális homeosztázis zavar emelkedett ROS

termelődéshez vezet, mely elősegíti a patomechanizmus alapjául szolgáló apoptotikus jelenségeket. A ROS másodlagos szignalizációs molekulaként képes befolyásolni a neuroinflammációt, szinaptikus plaszticitást és a memóriához köthető folyamatokat. Érdekesség, hogy a patogén asszociált molekuláris mintázat nagy hasonlóságot mutat a mitokondriális károsodás asszociált mintázattal, melyek hasonló gyulladási kaszkád folyamatokat aktiválnak. A mintázat nem csupán neuroinflammációt indukál, hanem képes befolyásolni az A β 1-42 termelődést az amiloidogén útvonal serkentése révén. Az A β 1-42 maga is jelentős szereppel bír a specifikus molekuláris mintázatok kialakításában, mint szignalizációs molekula. A lipidek fokozottan érzékenyek az AK egyik patomechanizmusaként ismert oxidatív stresszre, így érzékeny markerei lehetnek a patológiai folyamatoknak.

2. Célkitűzés

Jelen munkámban célkitűzésünk volt:

- I. egy új, komplex, nagy áteresztő képességű *in vivo* toxicitási tesztrendszer kidolgozása, gerinctelen rotifereket használva modell organizmusként;
- II. a PA modell jellemzése a túlélése, fiziológia és a viselkedés tekintetében, az alábbi viabilitási markerek segítségével: *toxicitási és túlélési élettartam* (TSL), *élesfény elkerülési teszt* (BLD), *mastax összehúzóási frekvencia* (MCF) és *sejtszintű redukciós képesség* (CRC);
- III. a teszt rendszert reaktív hatóanyagokkal (H₂O₂ és NaN₃) validálása;
- IV. a bdelloid rotiferek A β toxicitás dózis-függését vizsgálata;
- V. az AK-s betegek CSF mintáiban oxidatív stresszhez köthető fehérjemarkerek azonosítása peptid microarray módszert használva;
- VI. a HSV fertőzés reaktivációjának hatásának vizsgálata a lipid homeosztázisra AK-s betegek CSF mintáiban;
- VII. az ApoE4 jelenlétének befolyása a potenciális HSV reaktiváció specifikus folyamataira.

3. Módszerek

3.1. *In vivo* experimentális viabilitási teszt

Új modell rendszerünk kifejlesztése során a laboratóriumunkban használt bdelloid kerekférgek közül a *P. acuticornis* (PA) bizonyult a legmegfelelőbbnek. A PA-t és a *Cladophora aegagrophila* gömbmohát, mely a tenyésztési mátrix alapját képezte, magyar akvarisztikai boltból szereztük be. A tenyésztés során az *in vitro* sejtenyésztésben

használatos módszereket optimalizáltuk *in vivo* a rotiferekre. Az állatokat flaskákban tenyésztettük standard médiumban. A tenyésztést alga-vatta 3D-mátrixban végeztük, félsteril környezetben, mert ezzel a módszerrel tízszer annyi állatot sikerült fenntartanunk, mint 2D petri-csészében. A alkotó elemeket alkohollal fertőtlenítettük a kidolgozott protokoll alapján. Az állatokat pasztörözött élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) homogenizátummal etettük kétnaponta a médiumcserét követően.

A vizsgálatokhoz szükséges izolálás során a rotifereket -75 °C-ra helyeztük rövid időre, hogy elengedjék az aljzatot, majd steril petri-csészébe öntöttük a felülúszót, ami az összehúzódt állatokat tartalmazta. Fél órát szobahőn hagytuk, hogy az egészséges túlélők kitapadjanak, majd a petri-csészét standard médiummal lemostuk. A kitapadt állatok a felületen maradtak a mosás ideje alatt is. A genetikai vizsgálatokhoz ezt követően használtuk fel őket, az egyedi viabilitási mérésekhez további 24 órát hagytuk szobahőn, hogy tápcsatornájuk kiürüljön.

3.1.1. Modellállat fenotipikus és filogenetikai karakterizációja

A rotifer kultúrákat egy állatból indítottuk, hogy a genetikai homogenitást megőrizzük. Az alkoholos fixálást követően specifikus markereiket felhasználva fajspecifikus, fenotipikus jellemzőket kerestünk. Meghatároztuk az egyed méretét és sajátos alaktani jellemzőit, mint a láb, korona, szemek és antenna morfológiája. A különböző mozgási mintázatukat is karakterizáltuk, mint pl.: kerekedés, úszás, korona-használat, mastax pulzálása és a test kontrakciói.

A filogenetikai elemzéshez genomi DNS-t izoláltunk, majd bdelloid specifikus primerekkel felamplifikáltuk 18S rDNS adott szakaszát. Ezt követően gélen elválasztottuk a terméket és fragmenteket elküldtük Sanger-szekvenáltatni. A kapott kontigokat bioinformatikai analízisnek vetettük alá, ahol a referencia adatbázisban található rotifer 18S rDNS szekvenciákhoz hasonlítottuk őket. Majd a kapott szekvenciák alapján feltérképeztük a faj evolúciós kapcsolatait és ezeket kladogramok formájában prezentáltuk.

3.1.2. Adaptált olajjal fedett mikro-csepp módszer

Elsődleges célunk volt, hogy a rotifereket önállóan is vizsgálni tudjuk, így a humán *in vitro* fertilizációban alkalmazott légáteresztő olajjal fedett mikro-csepp technikát adaptáltuk. A módszer során kis térfogatú (50 µL) médium cseppet helyeztünk ki szövettenyésztő plate aljára, melyet ásványi olaj és SAGE szövettenyésztési olaj 1:1 arányú keverékével fedtünk le. Ebbe a környezetbe helyeztük bele a korábban kor és

méret alapján előszelektált egyedeket. Az olaj keverék lehetővé tette a normális gázdifúziót a csepp és a környezete között, továbbá meggátolta az evaporációt és hypoxia kialakulását.

3.1.3. Újonnan fejlesztett viabilitási tesztek

Az új életképességi méréseinket jól ismert hatásmechanizmussal bíró oxidatív ágensekkel validáltuk. A H_2O_2 -t és NaN_3 -t több koncentrációban alkalmaztuk a kifejlesztett viabilitási tesztek érzékenységének megfelelően, az alkalmazott koncentrációk átfedtek, így igazolva a tesztek komplementer voltát. Az amiloid toxicitási tesztekben $A\beta_{1-42}$ és $A\beta_{25-35}$ fragmenseket adtunk kezelésként olajjal fedett mikro-cseppekben izolált rotiferekhez, ahol az adott amiloid kizárólagos jelenléte lehetővé tette az élettartamra gyakorolt hatásának pontos meghatározását. A kezelés során a dózis-függés meghatározása céljából azonos koncentrációban nem toxikus szarvasmarha szérum fehérjét (BSA) alkalmaztunk.

A *toxicitási és túlélési élettartam* (TSL) a kezelésnek az élethosszra gyakorolt hatását mutatta meg éheztetett rotifereken. A teszt során jól definiálható experimentális markerek alapján döntöttük el, hogy az adott egyed életben van, vagy nincs, amelyek a következők voltak: a test anatómiája és aktív mozgása; testen belüli mozgások; a szem természetes piros színe. Amikor az állat elpusztul, a pipetta mechanikus érintésére nem reagál, továbbá a szeme pigmentációja elveszíti a piros színét.

Az *élesfény elkerülés teszt* (BLD) kifejlesztése során a PA speciális viselkedési jellemzőit használtuk fel, melyek érzékenyen változnak a kezelésekre hatására. A rotiferek kerülnek az erős fényforrást, ennek megfelelően a megvilágított területről történő menekülés összetett információt ad az állat szenzoros-motoros rendszerének működéséről, már szubletális dózis alkalmazása esetén is. A módszer során egy előre meghatározott területű látótér közepére pozicionáltuk az állatot, mely nyugalmi kerekező (táplálkozási) viselkedést mutatott. Amennyiben 30 másodperccel később még mindig aktív volt, akkor a megvilágítást megemeltük 20-ról 40 000 Lux-ra. Két reakció-paramétert mértünk: (1) az *élesfény irritációt* (BLI), mely azt az időtartamot jelentette, míg az állat érzékelte a fényt és abbahagyta a kerekezést vagy visszahúzta kerékszervét (mikor nem volt változás a viselkedésében, az állat képtelen volt érzékelni az ingert); (2) másik paraméter az *élesfény elkerülés* (BLA) volt, ami azt a teljes időtartamot jelentette, míg az állat kiűszott a megvilágított területről. A BLD-t a BLI és a BLA százalékos

aránya képezi, mely egészséges állatoknál közelítette a 100%-ot. A kezelt állatokat 5 percig figyeltük, ha ez idő alatt nem történt reakció, a BLD indexet 0-val jelöltük.

A *mastax összehúzóási frekvencia* (MCF) az emésztő rendszer felső részét képező izmos falú szervnek az egy másodperc alatti összehúzóását mutatta meg. A mastax fő szerepe a táplálék továbbítása a benne található apró fogképletekkel a periodikus nyitódás és záródás segítségével. Ez a viabilitási marker az állat jóllétéről, táplálkozási vágyáról és a szerv megfelelő működéséről ad információt, mely érzékenyen reagált a kezelésekre.

A *sejtszintű redukciós képességet* (CRC) mérő teszt során a szövettenyésztésben széleskörben alkalmazott EZ4U (MTT analóg) viabilitási tesztet optimalizáltuk a rotiferekre. A teszt során hígított XTT oldatot adtunk a kezelt és kontroll populációkhoz, majd 24 óráig sötétben tartottuk őket (a komponensek fényérzékenysége miatt). A felülúszó színváltozását spektrometriásan mértük. A változás arányos volt a populáció össz redukciós képességével (NADH mennyiségével), amit a mért populáció kiindulási egyedszámára normalizáltunk.

3.2. Humán oxidatív stressz markerek vizsgálata cerebrospinális folyadékban

3.2.1. Betegek bevonása és cerebrospinális folyadék mintavétele

A vizsgálatainkba bevont AK-s betegek diagnózisát a DSM-IV és DSM-5 kritériumai alapján állították fel, melyet a kórtörténet pontos rögzítése, valamint neurológiai és pszichiátriai kivizsgálás előzött meg. A betegnél CT, MRI vagy SPECT vizsgálatokat végeztek. A CSF mintavétel invazív voltából adódóan kontroll személyek olyan páciensek voltak, akiknél a CSF mintavétel a diagnózis felállításához szükséges volt, de a kognitív hanyatlást kizárták. A betegek a mintavételt megelőzően beleegyező nyilatkozatot írtak alá. A vizsgálatot a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottsága jóváhagyta (engedélyszám: 184/2012 és 54/2015). A CSF mintavétel a L4-L5 csigolyaközti térből történt, a mintákat a rutin feldolgozás (centrifugálás és szétmérés) után -75 °C-on tároltuk a felhasználásig.

3.2.2. Rutin markerek (ApoE és fehérje) meghatározása

Az ApoE allél változatok genotípusát perifériás vérből tisztított genomi DNS felhasználásával mutattuk ki. A fehérje szűrés során a korábban leírt allél specifikus restriktív fragment analízis módszerét alkalmaztuk. A lipidomikai vizsgálatba bevont páciensek esetében a meghatározás során allél specifikus Taqman-próbákkal mutattuk ki az ApoE2, ApoE3 vagy ApoE4 allél jelenlétét.

Az A β 1-42, t-tau és p-tau szintek meghatározása fehérje specifikus szendvics ELISA módszer segítségével történt. A nemzetközi standard határértékeket használtuk referenciaként. A preparált rotifer fehérje homogenizátumot különböző hígításokban alkalmazva, a humán CSF értékeivel összevetve vizsgáltuk az A β 1-42 tartalmat illetően.

3.2.3. Peptid chip

Master Antibody Microarray peptid chipet használtunk proteomikai szűrésünk során. A chipen 656 különböző fehérjére specifikus antitestet kötöttek ki. A vizsgálat során 5 pár chipen 25 AK-s és 25 kontroll személy CSF mintáit hasonlítottuk össze fehérjemintázat szerint. Egy chip páron 5 AK-s és 5 kontroll összevont CSF mintáit vizsgáltuk. A fehérje izolálás során acetonnal kicsaptuk a fehérjéket, majd a centrifugálás és mosás után megjelöltük az izolált fehérjéket (2,7 mg) Cy3-streptavidinnel. A mért intenzitás értékeket a lokális háttérre normalizáltuk. A technikai replikátumokat összehasonlítottuk és ahol a két ismétlés szignifikánsan eltért, kihagytuk a későbbi analízisből. Kiszámítottuk az AK és kontroll értékek arányát, a csökkenést 0,6-os érték alatt, a növekedést 1,8-as érték felett definiáltuk.

3.2.4. Western blot validáció

A peptid chipen kimutatott fehérjeváltozások (metilált DNS protein cisztein metiltranszferáz/MGMT; protein kináz C apoptózis WT1 regulátor protein/PAR-4; és granzim B/GRB) validációjának céljából szemi-kvantitatív western blot analízist végeztünk. A chipen vizsgált összevont CSF mintákat használtunk az analízishez, a géltre 20 és 40 μ g fehérjét vittünk fel. A validáció során különböző beállításokat próbáltunk ki, majd az optimális beállításokkal végeztük el a vizsgálatot. A jeleket kemilumineszcencia segítségével tettük láthatóvá.

3.2.5. HSV reaktiváció meghatározása

Az AK-s páciensek natúr CSF mintáit felhasználva szendvics ELISA módszerrel meghatároztuk a HSV1 és HSV2 specifikus immunglobulin G (IgG) titer értékeket. Referenciaként a kitben foglalt határértékeket használtuk.

3.2.6. Lipidomikai analízis

A lipidomikai analízist kooperációban végeztük a SZBK Biokémiai Intézet, Stresszbiológiai Egység, Molekuláris Stresszbiológia Csoportjával. A natív CSF-ből optimalizált Folch módszerrel izoláltak lipideket. A lipideket pozitív ion módban elektronsray ionizációs tandem tömegspektrometriás eljárással (ESI-MS/MS) mértük. A

méréseket korábban standardizált hozzáadott belső standard lipidek koncentráció értékeire normalizáltuk. Vizsgálatunkba szfingomielin (SM), szulfatid (SZULF), ceramid (CER), hexóz-ceramid (hCER) és foszfatidil-szerin (FS) főcsoportokat vontunk be, majd az adott főcsoportokon belül species szinten is elvégeztük az összehasonlítást.

4. Eredmények

4.1. Az *in vivo* modell validációja

A 18S rDNS szekvencia analízis megerősítette, hogy a modell állatunk a *P. acuticornis* fajhoz tartozik. Filogenetikai analízisünk arra utalt, hogy a modell fajnál már megfigyelhető a divergencia folyamata, ami feltehetően a tenyésztett populáció izolációjának következménye.

Az újonnan fejlesztett toxicitási tesztek sikeresen validáltak a H₂O₂ és NaN₃ kezelések dózis-hatás vizsgálatával. A kísérletek során a teszt érzékenységének megfelelő nagyságrendben adagoltuk a kezelőanyagokat. A két hatóanyag dózis-függően csökkentette a TSL-t. A három napos kezelést követően végeztük el a BLD vizsgálatot. Eredményeink azt mutatták, hogy a toxinok dózis-függően gátolták a fényérzékelést és ezáltal a menekülési reflexet. A vizsgált anyagok csökkentették a MCF-t, habár itt megfigyeltünk egy kiugró jelenséget is. Az 1 μM H₂O₂ növelte a frekvenciát, viszont a CRC vizsgálatunk során azonos dózisu kezelés után oxidatív stresszt figyeltünk meg a populációban. Az irodalom alapján tudjuk, hogy a molekula szignalizációs szereppel is bír. Feltételezésünk szerint MCF-ben megfigyelt serkentés kompenzatórikus mechanizmus lehetett, mely a fokozott tápanyag felvétel segítségével kívánja semlegesíteni a potenciális oxidatív károsodást. Három napos kezelést követően mértük meg a CRC-t, ami kvantitatívan mérhető dózis-függő oxidatív stresszt mutatott a kezelt populációkban. A BLD és a CRC megbízhatóan előre jelezte a TSL-t, míg a BLD szignifikánsan korrelált az MCF-vel és a CRC-vel. Az Aβ1-42 nem bizonyult toxikusnak, sőt izolált közegben kizárólagos tápanyag forrásként növelte a rotiferek élettartalmát éheztetett kontrollhoz viszonyítva, mely hatás a BSA kezelések hatásának dózis-függésével megegyező kinetikát mutatott. Az Aβ25-35 mesterséges fragment toxikusnak bizonyult, a feltehetően extrém aggregációs tulajdonságból adódóan. A bdelloid rotiferek ELISA méréseink alapján nem termelnek endogén módon kimutatható mennyiségben Aβ1-42-t.

4.2. Humán proteomikai szűrés

A fehérjeszűrés során a vizsgálatba bevont páciensek ApoE allél hordozását és rutin fehérje markereinek meghatározását végeztük el első lépésként, hogy megerősítsük neurokémiai módszerekkel a klinikai AK diagnózist. A rutin markerek a szakirodalomban leírtaknak megfelelően változtak AK-s betegek CSF-ében, vagyis az A β 1-42 csökkent, míg a t- és p-tau értékek szignifikánsan növekedtek a kontrollokhoz hasonlítva. A fehérjeszűrés során 7 fehérje csökkenését mutattuk ki, melyek a következők voltak: mitokondriális DNS polimeráz gamma (POLG), MGMT, parkin (PARK), apolipoprotein D (ApoD), PAR-4, GRB és ciklin-függő kináz 5 (CDK5). A kimutatott csökkenést western blot-tal nem tudtuk megerősíteni, feltehetően az alkalmazott fehérjemennyiségek és a módszerek különböző szenzitivitásának következtében.

4.3. HSV reaktiváció okozta lipidomikai változások

Az AK-s páciensek CSF mintáiban meghatároztuk a HSV1 és a HSV2 reaktiváció specifikus IgG titereket. A vizsgált páciensek 14%-ánál HSV1, 25%-ánál HSV2 és 5%-ánál kettős reaktivációt találtunk, míg 56%-nál nem volt detektálható pozitívitas. A kettős reaktivációt mutató pácienseket kihagytuk az alacsony elemszámukból adódóan a későbbi analízisből.

A reaktiváció pozitívitasának megfelelően csoportokba rendeztük a vizsgált AK-s betegeket és főosztály szinten vizsgáltuk meg először a lipid eltéréseket. Azt találtuk, hogy a HSV1 reaktiváció következtében nőtt az FS szint, míg a HSV2 reaktiváció szignifikáns növekedést mutatott a SZULF főosztály koncentrációjában; a többi vizsgált csoportban (SM, CER, hCER) nem találtunk szignifikáns eltérést. A species szintű analízis során HSV1 és HSV2 reaktiváció specifikus lipid mintázatot kaptunk. Az összes vizsgált főcsoportban találtunk szignifikáns eltérést mutató speciést. Az elváltozások jól karakterizálják a HSV1 reaktiváció okozta apoptózist és a HSV2 által facilitált kompenzatorikus folyamatokat. Az ApoE4 allél hatásának vizsgálata során szintén reaktiváció specifikus lipid mintázatot kaptunk az SM és SZULF főcsoportokba tartozó speciések szintjén.

5. Diskusszió

5.1. *In vivo* modell és oxidatív stressz

Az elmúlt 30 évben a gerinctelen rotiferek egyre nagyobb jelentőséggel bírnak az öregedés kutatás területén. Ehhez jelentősen hozzájárulnak a modell előnyei, melyek a következők: kis méretük, viszonylagos rövid élettartamuk, nagy populációs sűrűségük,

gyors populációnövekedésük, szűznemzéssel történő szaporodásuk és nagy érzékenyséjük a toxinokra. Ennek ellenére máig nincs a rotiferekre optimalizált standardizált viselkedési teszt. Habár korábban is alkalmazták a rotifereket toxikológiai vizsgálatokra, ezen kísérletekben populáció szinten követték nyomon a potenciális hatást. Az újonnan fejlesztett olajjal fedett mikro-csepp módszer lehetővé teszi az állatok egyedi, de hosszú távú megfigyelését. A 18S rDNS vizsgálatunk megerősítette, hogy modellünk a PA fajhoz tartozik, a vizsgált szekvencia homológia alapján. A négy, újonnan kifejlesztett, különböző szenzitivitással rendelkező, egymásra épülő experimentális viabilitási markert, két jól ismert hatásmechanizmussal bíró molekulával (H_2O_2 és NaN_3) validáltuk. A TSL, BLD, MCF és CRC dózis-függően reagáltak a toxinokra, ezzel bizonyítva a tesztek megbízhatóságát és érzékenységét, továbbá kimutatva az állatok oxidatív stresszre való érzékenységét. A markerek a viabilitás különböző paramétereit mérik, az élettartamot, a fényérzékenységgel összefüggő viselkedési mintázatot, az állat jólétét, táplálkozási igényét, populáció szinten való redukciós kapacitását. A markerek önállóan és párhuzamosan mérve is szignifikáns prediktív értékkel bírnak az élettartam hosszát illetően is. Az A β 1-42 kezelés esetében tapasztalt élettartam növekedés hátterében feltehetően a fragment *in vivo* katabolizmusa áll, ami újszerű jelenség az irodalomban. A lebontás hátterében feltehetően a rotiferek azon adaptív tulajdonsága állhat, mely segítségével alkalmazkodnak szélsőséges körülményekhez, amelyekkel természetes közegükben gyakran találkoznak. Céljuk a tápanyagforrások (sokszor aggregált törmelékek) leghatékonyabb lebontása és glükoneogenezisben való felhasználása. A jelenség feltárása további vizsgálatokat igényel, de megismerése potenciálisan új megközelítést adhat az AK-amiloid lebontást célzó farmakológiai kutatásoknak.

5.2. Fehérje markerek azonosítása

A proteomikai szűrés során neurokémiaileg validált AK-s betegek CSF-ében kerestünk potenciális fehérje markereket peptid mikrochip segítségével. A szűrés során hét fehérjét mutattunk ki, melyek szignifikánsan csökkentek.

A POLG a mitokondriális DNS szintéziséért felelős, melynek jelenlétét és csökkenését először mutattuk ki. Korábbi tanulmányok AK páciensek CSF mintáiban a mitokondriális DNS csökkenéséről számoltak be, mely megfigyelést megerősítettük eredményeinkkel. A mitokondriális DNS replikáció csökkent mértékű mitokondrium szintézishez vezet. Ennek következtében mitokondriális zavar és oxidatív stressz alakulhat ki, melyek az AK korai patomechanizmusában is kiemelkedő szereppel bírnak.

A GRB hasítja a PAR-4-t, mely központi szereppel bír az apoptózis szabályzásában. A GRB-t először mutattuk ki a CSF-ben, ezt a molekulát korábban csupán a neuroinflammációval hozták kapcsolatba. A PAR-4-et illetően már kimutatták, hogy csökkent az mRNS expressziója AK-s páciensek agyában. Az MGMT a káros alkil csoportokat távolítja el a DNS-ről, ezzel megőrizve a megfelelő expressziót. Az AK-ban való csökkenését először mutattuk ki, mely hozzájárulhat az oxidatív stressz DNS károsító hatásainak súlyosbításához. A PARK központi szereppel bír az ubiquitin függő protein degradációban, továbbá az A β 1-42 megfelelő kiürülésében. Habár CSF-ben eddig nem tesztelték, AK modell transzgen egereken már megerősítették, hogy a PARK túlermelletése képes megőrizni a megfelelő memória és viselkedési funkciókat. A CDK5 enzim több anyagcsere folyamatban is központi szabályzó szereppel rendelkezik, melyek összefüggésbe hozhatók az oxidatív stressz-szel, sejtciklus szabályzással, szenilis plakkok és neurofibrilláris kötegek kialakulásával, valamint a tau hiperfoszforilációval. A neuronokban szigorúan szabályozott a CDK5 aktivitása. Az oxidatív stressz következtében megemelkedik az intracelluláris Ca²⁺ szint, ami aktiválja a kalpain. Így ez a p35 fehérjét p25 fehérjévé képes hasítani, amely stabil komplexet képez a CDK5-tel. Az ApoD központi szereppel bír a lipid homeosztázisban, ennek megfelelően már korábban is kapcsolatba hozták az AK patomechanizmusával. Az ApoD expressziója megemelkedik az AK páciensek hippokampuszában és prefrontális kéregében. Más tanulmányok a páciensek CSF-ben is a molekula emelkedett szintjéről számoltak be. A nálunk tapasztalt csökkenés további validációt igényel, de az eredmények közti ellentmondás feltehetően a vizsgált populációk ApoE4 allél hordozóságának különbözőségében rejlik. Az ApoE4 allél bizonyítottan növeli az ApoD expresszióját, viszont az általunk vizsgált populációban kisebb arányban fordult elő az ApoE4 allél, mint az idézett tanulmányban.

5.3. HSV reaktiváció specifikus lipid eltérések

Az AK korai fázisában megjelenő oxidatív stressz és gyulladás következtében károsodik a BBB integritása, elősegítve a humán HSV1 és HSV2 bejutását a központi idegrendszer területére. A patogén hipotézis szerint a sorozatos külső stressz hatások indukálta reaktiváció következtében fokozódik a neurotoxikus A β termelődés, mely hozzájárul az AK progressziójához. Epidemiológiai tanulmányok kimutatták, hogy a HSV jelenléte az agyban jelentősen növeli az AK kialakulásának rizikóját. Egyes elméletek szerint ezzel szemben a HSV-indukált humorális immunválasz protektív lehet

a betegség korai fázisában, mivel kedvez a toxikus aggregátumok degradációjának és kiürülésének. A HSV fertőzés a reaktiváció során a mikrogliaikat aktiválja és proinflammatorikus citokinek expressziójával gyulladáshoz vezet, ami oxidatív stresszhez és neurodegenerációhoz vezethet. Az ApoE4 allél hordozása az AK rizikóját jelentősen növeli. A defektív fehérje csökkent hatékonysággal vesz részt az A β kiürülésében, de egyúttal súlyosbítja a HSV reaktivációhoz köthető patológiás folyamatokat is. A vizsgált populáció 14%-a HSV1, 25%-a HSV2 reaktivációt mutatott ki, ami megegyezik a szakirodalomban leírt prevalenciával.

A lipidek kulcsfontosságú elemei az agyműködésnek, ezt reprezentálja az abnormális lipid homeosztázis összefüggése a neurodegeneratív kórképekkel (pl. AK). Növünként kiemelhetjük, hogy a HSV1 reaktivációja elősegíti a demencia progresszióját, míg a HSV2 facilitálja a protektív folyamatokat, melyek a lipid panel változásaival jól jellemezhetők. A HSV1 reaktivációt mutató csoportban a SZULF speciestek homeosztázisának felborulására utaló eredményeket kaptunk. A változások a csökkenés irányába mutattak, ezzel párhuzamosan csökkent a vizsgált SM speciestek koncentrációja is. A patológiás folyamatok apoptózishoz vezethetnek, amit az apoptotikus szignalizációs jelként ismert FS (d18:1/22:6) emelkedett szintje is megerősített. A HSV2 reaktiváció során kompenzatorikus emelkedést tapasztaltunk a SZULF és a SM speciestekben a nem reaktivált kontroll AK-s páciensekhez viszonyítva. Párhuzamosan viszont a káros degradációs CER és hCER speciestek mennyisége is nőtt, de ez nem társult az apoptotikus lipid marker FS (d18:1/22:6) emelkedésével. A 4-es allélt hordozó, HSV1 reaktivációt mutató páciensek esetében a patológikus SM és SZULF csökkenés kifejezettebb volt, mint 4-es allélt nem hordozó betegnél. A HSV2 reaktivált 4-es allélt hordozó betegeknél a SZULF szintben emelkedést tapasztaltunk a vizsgált speciestek szintjén. Ez az ApoE4 allél komplex kettős szerepére utalhat. Biztató előkísérletes eredményeink kis elemszámú populáción végzett kísérletekből származnak, így további validációt igényelnek.

6. Összefoglalás

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy gerinctelen állatmodellünkkel új megközelítésbe helyeztük az öregedéssel és AK-val kapcsolatos toxikológiai kutatásokat. A modell alkalmas nagy áteresztő képességű, érzékeny és reprodukálható eredményeket biztosítani az oxidatív stressz és az öregedés toxikológiai szabályzását illetően. Ezen állatok nem termelnek endogén módon A β 1-42-t. A rotifereken az A β 1-42 kezelés nem bizonyult toxikusnak ellentétben az A β 25-35-el. Az A β 1-42 dózis-függő módon növelte

az élettartamot, mely a kezelőanyag kizárólagos energiaforrásként való felhasználásra utal, egy új *in vivo* degradációs mechanizmust feltételezve. A humán vizsgálataink során újabb oxidatív stresszhez és neuroinflammációhoz köthető AK specifikus fehérje markerek azonosítottunk. A HSV1 és HSV2 reaktivációhoz kapcsolódó vizsgálataink megerősíthetik az AK “infekciós/inflammatórikus” hipotézisét. Rámutatnak arra, hogy a patológiás változások nem csupán proteomikai szinten specifikusak, hanem lipidomikai szinten is jól nyomon követhetőek. Molekuláris eredményeink alapján tervezzük a jövőben vizsgálatainkat kiegészíteni nem-invazív módszerekkel (bélmotilitás elektrofiziológiás mérése, könnymintavétel).

7. Köszönetnyilvánítás

Először is hálás vagyok témavezetőmnek Dr. Pákáski Magdolnának, aki témavezetőmként tanácsaival segítette a szükséges humán kísérletek elvégzését, valamint hozzájárult az értekezés elkészítéséhez. Szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Datki Zsoltnak az értekezéshez szükséges vizsgálatok kivitelezésében nyújtott elméleti és gyakorlati segítségéért és támogatásáért.

Hálásan köszönöm Prof. Dr. Kálmán Jánosnak, hogy lehetővé tette az értekezés alapjául szolgáló munka elvégzését a Pszichiátriai Klinika Kutató Laboratóriumában, valamint Prof. Dr. Janka Zoltán korábbi intézetvezetőnek, hogy értékes kritikájával segítette a dolgozat megszületését.

Köszönet illeti munkatársaimat, különösen Ivitz Esztert, akik nélkül ezek a munkák nem születhettek volna meg.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a családom támogatását és különösképpen barátom, Gálik Bence segítségét, aki nemcsak biztatott az évek során, hanem szakmailag is hozzájárult a vizsgálatok elvégzéséhez.

Jelen munka az Európai Unió és Magyarország kormánya által támogatott és az Európai Szociális Alap által társfinanszírozott és TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 „Nemzeti Kiválóság Program” keretében, az alábbiakban felsorolt támogatások révén valósulhatott meg: TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0052; OTKA (83667) és Nemzeti Agykutató Program (KTIA_13_NAP-A-II/16); EFOP (EFOP-3.6.1-16-2016-00008).

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott **Dr. Datki Zsolt László** (felelős társszerző) kijelentem, hogy **Oláh Zita** (pályázó) PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott - közösen publikált - tudományos eredmények elérésében a pályázónak meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a téziseket más a PhD fokozat megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

2018.02.01.

.....

szerző

A pályázó tézispontjaiban érintett, közösen publikált közlemények:

Datki Z, Olah Z, Hortobagyi T, Macsai L, Zsuga K, Fulop L, Bozso Z, Galik B, Acs E, Foldi A, Szarvas A, Kalman J. (2018)

Exceptional in vivo catabolism of neurodegeneration-related aggregates.

Acta Neuropathol Commun. 2018 Jan 29;6(1):6.

doi: 10.1186/s40478-018-0507-3. PMID: 29378654

Érintett részek:

Amyloid ELISA vizsgálat eredményei

3. ábra a. része: Amyloid és BSA dózis függése az élettartalom tekintetében

3. ábra c. részéből (Mesterséges Amyloid típusok) A β 25-35 érintő eredmények