

**Egy újonnan leírt rotifer-specifikus biopolimer
tulajdonságainak feltárása, különösen a
neurotoxikus aggregátumok vonatkozásában**

Dobóczy-Balázs Evelin

PhD

Pszichiátriai Klinika

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Datki Zsolt László, PhD

Szeged

2023

Publikációk

I. **Balazs E**, Galik-Olah Z, Galik B, Bozso Z, Kalman J, Datki Z, Neurodegeneration-related beta-amyloid as autocatabolism-attenuator in a micro-in vivo system, *IBRO Reports*, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.ibror.2020.10.002>, MTMT: 31639846, IF: 0.5

II. Datki Z, Acs E, **Balazs E**, Sovany T, Csoka I, Zsuga K, Kalman J, Galik-Olah Z. Exogenic production of bioactive filamentous biopolymer by monogonant rotifers, *Ecotoxicol Environ Saf* 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111666>, MTMT: 31776926, IF: 7.129

III. **Balazs E**, Galik-Olah Z, Galik B, Somogyvari F, Kalman J, Datki Z, External modulation of Rotimer exudate secretion in monogonant rotifers, *Ecotoxicol Environ Saf* 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112399>, MTMT: 32059771, IF: 7.129

IV. Datki Zs, **Balazs E**, Galik B, Sinka R, Zeitler L, Bozso Zs, Kalman J, Hortobagyi T, Galik-Olah Z, The interacting rotifer-biopolymers are anti- and disaggregating agents for human-type beta-amyloid in vitro, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.184>,

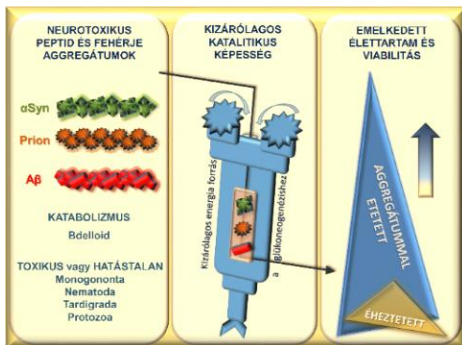
MTMT: 32591465, IF: 8.025

Rövidítések jegyzéke

Béta-amiloid (beta-amyloid; **A β**); beta-amiloid 1-42 (beta-amyloid 1-42; **A β 42**); 4,4'-dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-disulfonic acid dipotassium salt (**BisANS**); szarvasmarhaszérum-albumin (bovine serum albumin; **BSA**); Concanamycin A (**ConA**); 0. nap (Day 0; **D0**); 20. nap (Day 20; **D20**); 25. nap (Day 25; **D25**); distilled water (**DW**); *Euchlanis dilatata* (**ED**); *Euchlanis dilatata* Rotimer-Inductor Conglomerate (**ED-RIC**); etilén-diamin-tetraecetsav (ethylenediaminetetraacetic acid; **EDTA**); funkcionálisan reverzibilis szervzsugorodás (functionally reversible organ shrinkage; **FROS**); funkcionálisan reverzibilis szervzsugorodás index (functionally reversible organ shrinkage index; **FROSi**); Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (Fourier Transform Infrared Spectroscopy; **FTIR**); humán béta-amiloid (human-beta-amyloid; **H-A β**); *Lecane bulla* (**LB**); *Lecane bulla* Rotimer-Inductor Conglomerate (**LB-RIC**); nátrium-hidroxid (sodium hydroxide; **NaOH**); propidium jodid (**PI**); Rotimer-Induktor Konglomerátum (Rotimer-Inductor Conglomerate; **RIC**); RIC-termelő kapacitás (RIC-producing capacity; **RPC**); standard error of the mean (**S.E.M.**); scrambled isoform of A β (**S-A β 42**); pásztázó elektronmikroszkóp (scanning electron microscope; **SEM**); Thioflavin T (**ThT**).

1. Bevezetés

A neurodegeneratív betegségek, mint például az Alzheimer-kór (AK), másodlagos fenotípusnak tekinthető a proteom progresszív funkcionális károsodása miatt. Az agy öregedésének molekuláris alapja a toxikus fehérjék felgyorsult felhalmozódása, amelyet a hibásan feltekeredett fehérjék csökkent kiürülése és lebomlása kísér. Közvetlen összefüggés van a fehérje aggregáció és az életkorral összefüggő patológiák között. A β -lemez konformációban elrendezett intramolekuláris domének nagymértékben ellenállnak az enzimatis hatásnak. A különféle neurotoxikus aggregátumok közös vonásokkal rendelkeznek, felhalmozódásuk és aggregációjuk elősegíti a neurodegenerációt, ahol az aggregációt a rokon molekulák abnormális konformációs változása okozza. Ezek a diszfunkciók extra- vagy intracellulárisan jelentkeznek. A hibásan hajtogatott peptid- és fehérje-aggregátumokat számos endogén enzim emésztheti, a béta-amiloidok, mint például az $A\beta$ -k, az öregedéssel összefüggő betegségek központi molekulái, amelyek a demenciák kialakulásának kezdeti pontját jelentik. A rotifer az egyik leggyakrabban használt mikrogerinctelen állatmodell; ezek az állatok az ökotoxikológiai, öregedési, gyógyszerészeti vagy a hosszú élettartammal kapcsolatos kutatások kiváló modelljei. A rotiferek a környezeti paraméterekkel és vegyi anyagokkal kapcsolatos toxicitás szűrés validált modelljei. Bár testük körülbelül 950-1000 sejtből áll, összetett szervrendszerük van, beleértve gyomor-bélrendszert, szaporodási szerkezet, idegrendszert és kiválasztó mirigyeket. Optimális tenyésztési követelményeik, rövid élettartamuk, valamint specifikus mérhető fenotípus jellemzőik és életképességi markereik miatt ígéretes tudományos modellek. Ennek releváns példája az a jelenség, hogy egyes rotiferek képesek metabolizálni (katabolizálni) a rendkívül ellenálló peptid- vagy fehérje-aggregátumokat (jól ismert neurotoxintokat), mint például



alfa-synucleint, prionokat és béta-amiloidot ($A\beta$), éhezési körülmények között. Kivételes módon a humán típusú aggregátumok potenciális tápanyagforrások a bdelloid rotiferek számára. Ezek az állatok filogenetikailag megválasztott képességeik révén konglomerátumokat és aggregátumokat használhatnak energiaforrásként (1. ábra).

1. ábra: A neurodegenerációval kapcsolatos aggregátumok rendkívüli *in vivo* katabolizmusa rotiferek által

A bdelloidok adaptív fenotípusos plaszticitásuk miatt nagy toleranciával rendelkeznek a normál környezeti változásokkal szemben. E

mikrogerinctelenek alkalmazkodóképességének egyik kiváló bizonyítéka, hogy képesek biopolimer szekrécióra. A biopolimereket kizárólag élő szervezetek állítják elő, ezek a kémiai anyagok ismétlődő egységekből állnak, amelyek magasabb rendű molekulaszervezeteket hoznak létre. Kémiai szerkezetük alapján csoportosíthatók. A polimerek szerkezeti kialakításához mindig szükség van térhálósítókra, valamilyen fémionra, például kalcium. A biopolimerek sokszínűségét mutatja, hogy a különböző állatok életmódjuktól és környezetüktől függően más funkciójú változatokat is képesek kiválasztani. Ezen természetes anyagok kedvező tulajdonságainak köszönhetően, mint például antimikrobiális vagy hipoglikémiás hatás, számos területen alkalmazzák gyógyszerészeti, gyógyászati vagy ipari célokra. Ahogy az ipari fejlesztésekben a környezetbarát szemlélet dominánssá válik, a biopolimerek jelentősége egyre nagyobb jelentőséget kap biológiailag lebomló, megújuló és környezetbarát jellegük miatt. Ezeket a természetes anyagokat széles körben alkalmazzák, környezetvédelemben, mezőgazdaságban, élelmiszeriparban, gyógyszeriparban valamint energetikában. Mivel a biopolimerek biokompatibilisek, biológiailag lebonthatók és alacsony immunogenitásúak, ígéretes elméleti források a biomedicinában, még a neurobiológiában is. Számos természetes molekula (pl. kollagén, zselatin, heparin vagy kitozán) képezi a klinikai alkalmazásban elérhető mesterséges termékek alapját. Továbbá számos növényi alapú biopolimer (pl. cellulóz) kiváló fizikai és biokémiai tulajdonságaik miatt orvostechikai konstrukcióként is használható. Ezen anyagok alkalmasak terápiás molekulaként gyógyszer- és génszállításban.

Számos tanulmány foglalkozik biopolimerekkel, de az irodalomban nem találtunk releváns adatot monogonant vagy bdelloid rotiferek biopolimer szekréciójáról. Ugyanakkor kiemelkedő biológiai sokféleség jellemzi őket, számos új tulajdonság és jelenség felfedezésre vár még. Kutatócsoportunk célja, hogy minél többet megtudjunk ezen állatok természetes tulajdonságairól.

2. Célkitűzés

A neurodegeneratív betegségek kialakulása a toxikus aggregált molekulák felhalmozódásának következményei. Korábbi kutatásaink során csoportunk egy egyedülálló jelenséget fedezett fel, miszerint a rotiferek képesek a különböző neurotoxikus aggregátumokat, köztük a humán-specifikus beta-amiloidot (A β 42) metabolizálni, élelemként elfogyasztani. Ezen képesség hátterének széleskörű feltáró vizsgálata volt a legfőbb célunk.

Célkitűzéseink:

1. A rotiferek kivételes katabolitikus képességének további vizsgálata, az állatok és a neurotoxikus beta-amyloid interakciójának megértése;
2. A fent említett képesség háttérmechanizmusának teoretikus értelmezése, a lebontó enzimeket segítő, aggregációs szerkezetet módosító speciális molekula létezésének feltételezése;
3. A megközelítőleg 1000 sejtből álló, azonban komplex szervekkel rendelkező rotiferek által szekretált biomolekulák keresése, feltételezett exudátumok megtalálása;

4. Az úttörő interdiszciplináris kísérletek kivitelezéséhez szükséges metodikák és eszközök kifejlesztése, tesztelése, validálása és alkalmazása;
5. Az esetlegesen talált, relatíve nagy mennyiségben termelendő biomolekula széleskörű vizsgálata, úgy önmagában (pl. bioaktivitása, környezeti regulációja), mint a célzott humán típusú aggregátumokkal együtt (molekuláris interakciók).
6. Egy komplex elmélet felállítása a rotiferek egyedi képességének magyarázatára a toxikus aggregátumok katabolizmusának tekintetében.

3. Anyag és módszerek

3.1. Rotiferek

3.1.1. Eredetük

A méréseket a következő gerinctelen rotifereken végeztük: *Philodina acuticornis*, *Adineta vaga*, *Euchlanis dilatata* és *Lecane bulla*; ezért a hatályos nemzetközi szabályozás szerint külön etikai engedélyre nem volt szükség. A méréseket globálisan elfogadott normák szerint végeztük: Állatokról (Tudományos Eljárásokról) szóló törvény, 1986, kapcsolódó irányelvek, az EU állatkísérletekre vonatkozó 2010/63/EU irányelve, valamint az Országos Egészségügyi Intézet laboratóriumi állatok gondozására és felhasználására vonatkozó utasításai szerint (NIH Publ. No. 8023, 1978).

3.1.2. Különböző fajok azonosítása

További fajok a *Lepadella patella*, O. F. Muller, 1773; *Colurella adriatica*, Ehrenberg, 1831; *Itura aurita*, Ehrenberg, 1830; *Trichocerca iernis*, Gosse, 1887; *Brachionus leydigii rotundus*, Rousselet, 1907; *Brachionus calyciflorus*, Pallas, 1766; *Cephalodella intuta*, Myers, 1924; *Synchaeta pectinata*, Ehrenberg, 1832.

3.1.3. Tenyésztés

Valamennyi vizsgált rotifert lombikban tenyésztjük 23 °C-on, szórt fény mellett, standard tápoldatban.

3.1.4. Betakarítás

Az *E. dilatata* és *L. bulla* izolálásának első lépése a rotiferek lombikból történő kiszűrése (erőteljesebb rázás). A szűrést kettős szűrővel végezzük (1. szűrő: 500 µm Ø; 2. szűrő: 80 µm Ø (pórusátmérő)). A *P. acuticornis* és az *A. vaga* izolálása során először pipettával felvesszük a szubsztrátot, majd áthelyezzük a bdelloidokat well plate-be.

3.1.5. Anyagcserével kapcsolatos *in vivo* kísérletek

Az anyagcserével kapcsolatos mérések a germovittellaria méretének nyomon követése glükóz jelenlétében a 0. napon (D0) kezdődtek, referencia kontrollként. Hús nap éhezés (20 nap; D20) és öt nap (25 nap; D25) után szervregeneráció volt megfigyelhető. A 20. napon egyszeri etetést alkalmaztunk (600 µg/ml élesztő homogenizátum), majd öt napos gyógyulás következett. A funkcionális (petetermelés) regenerációs képességgel járó zsugorodási folyamat a 'functionally reversible organ shrinkage' (funkcionálisan reverzibilis szervzsugorodás; FROS) nevet kapta. Az állatok fehérje mennyiségének (n=5,

well) vizsgálatára a teljes nukleinsav mennyiségének kimutatásával párhuzamosan BisANS-t alkalmaztunk, ahol PI-t használtunk 10 perces inkubálás és mosás után.

3.2. Rotimerek

3.2.1. Biopolimerek és konglomerátumaik

3.2.1.1. Indukció

A szekréció csak akkor következik be, ha a rotifer csillóit mechanikusan irritáljuk különböző típusú és méretű inert részecskékkel. Az induktorok lehetnek a. élesztő: hővel inaktivált sejtváza; b. BSA: hődenaturált (den-BSA); c. epoxi: polimerekkel bevont fémgyöngyök; d. Kármin: mechanikusan porított kristályok (elektromos kávédarálóval); e. karbamid: ultraporos kristályok; f. cellulóz: porított mikrocellulóz. A részecskék által indukált biopolimer szekréció 'Rotimer-Inductor Conglomerate' (RIC; Rotimer-Induktor Konglomerátum) eredményezett nagy sűrűségű szövetek formájában 20 perces inkubációs idő után (**2K-M. ábra**; élesztőinduktorral). A well-oldat óvatos eltávolítása után a RIC-termékeket szobahőmérsékleten (25 °C) és 40% páratartalom mellett, sötétben 30 percig szárítottuk. A RIC analízist használtuk a legjobb RIC-termelő fajok kiválasztására élesztő induktort használva, a 'RIC-producing capacity' (RPC; RIC-termelő kapacitással) kapcsolatos; továbbá az RPC-t különböző Rotimer induktorok és rotifer-befolyásoló tényezők szűrésére is alkalmaztuk (epoxi induktorral). A Petri-csészékben tartott entitásokat a RIC előállítási kísérletek során populációkban kezeltük, majd standard tápoldattal kétszer öblítettük. A kezelt és tesztelt állatokat kiválasztottuk, és RIC-termelésüket nyomon követtük. Az ismételt indukciók során 10 perces szünetek voltak a kezelési körök között. Minden kör után ugyanazokat a rotifereket óvatosan egy mikropipettával átvittük egy új well-be, hogy elindítsuk a következő ciklust.

3.2.1.2. Reguláció

A Rotimer termelését különböző környezeti tényezők, például hőmérséklet, pH, fémionok és különböző szennyező anyagok hatására vizsgáltuk, kísérlet során a vizsgált két faj az *E. dilatata* és a *L. bulla* volt. Minden mérést standard környezetben (24 °C, pH = 7,5, 40% levegő páratartalom, standard közegben és 12:12 órás sötét fényben) végeztünk, kivéve a ténylegesen érdekes paramétert vagy az optimalizált kísérleteket (*E. dilatata* esetében): : 22 °C, pH = 7,8; *L. bulla* esetében 25 °C, pH = 7,2).

3.2.2. Konglomerátumok izolálása

A Rotimer termelését során használt Kármin induktor esetében először egy 5 ml-es pipetta segítségével, melyet 45 °C-os szögben a Petri-csésze falának aljára rögzítünk szívjuk ki a médiumot. A Petri-csésze aljára rögzített RIC-et ezután felszedjük és 4 ml DW-vel homogenizáljuk. Ezután az oldatban maradt rotifereket eltávolítjuk szűrővel tölcser segítségével. Ezután közvetlenül egy 2 ml-es eppendorfba szűrjük, majd centrifugáljuk (35000 g/12 perc; 4 °C), óvatosan eltávolítjuk a felülúszót, és maximalizáljuk a pellet térfogatát 150 µl DW-ben. Az epoxi gyöngyök használatakor az első lépések a rotiferek eltávolításáig ugyanazok, mint a fent említett Kármin induktor használatakor.

Ezután szobahőmérsékleten állatoktól mentes, de RIC-et tartalmazó oldatot készítettünk, és a biopolimerrel bevont gyöngyöket DynaMag-2 mágnes segítségével reverzibilisen rögzítettük.

3.2.3. Konglomerátumok tárolása

A RIC-et egy 500 µl-es eppendorfban tároljuk, 150 µl DW-vel kiegészítve -70 °C-on.

3.2.4. Rotimer biokémiai vizsgálata

3.2.4.1. A Rotimer analízise FTIR spektroszkópiával

A Rotimer biokémiai analíziséhez FTIR spektroszkópiai módszert alkalmaztunk, a mérések elvégzéséhez Rotimer tartalmú RIC mintákat készítettem.

3.2.4.2. Rotimer detektálása pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM)

A Rotimer képződmények (ragasztó és fonalas) fordított fénymikroszkóppal kimutathatatlanak tűntek; ezért az elemzést pásztázó elektronmikroszkóppal végeztük (**2. ábra**; SEM). Ehhez a kísérletsorozathoz a legjobb és legkisebb induktort, az epoxit használtuk (50 µg/ml) a Rotimer szekréció, a RIC képződés indukálása a legtermékenyebb fajban, az *E. dilatata*-ban került sor. A mintákat ionos arannyal vontuk be. A preferált területeket (minőségük alapján) SEM-nek vetettük alá. A mintahordozó fedőlemezt szénszalag segítségével egy csonkra rögzítettük. A fedőlemezeket arannyal vontuk be Quorum Q150R porlasztó bevonattal két percig.

3.2.4.3. Kémiai hatás a RIC háló integritására

Munkánk során megvizsgáltuk a különböző vegyi anyagok befolyásoló szerepét a Rotimer oldódására *in vitro*. Mielőtt megvizsgáltuk a Rotimer induktor-kohéziós stabilitását, a RIC szerkezete feltárása érdekében (Kármin induktor, kivéve a NaOH-t, ahol az epoxi volt az induktor), az állatokat óvatosan eltávolítottuk egy mikropipettával. Ezután well tartalmát 10x koncentrációjú kezelőszerekkel (enzimek, oldószerek, kelátképzők, alkoholok, pH-oldatok) egészítettük ki.

3.2.5. A Rotimer aktivitásának biológiai vizsgálata

3.2.5.1. *In vivo* bioaktivitás

A Rotimer bioaktivitásával kapcsolatos életképességi tesztek először *in vivo* végeztük el. Minden életképességgel kapcsolatos kísérletben a Calcein-AM (5 µM) alapján a jelölési intervallum 1 óra volt szobahőmérsékleten, sötétben. Az alga- és élesztősejtek életképességét (sejtfluoreszcenciáját) és motilitását (a sejtek mozgását) külön 24 well-platen mértük. Konfluens sejtpopulációt alkalmaztunk a citoplazmatikus kalcium kimutatásban, ahol az intracellulárisan befogott Calcein fluoreszcencia intenzitását (FI) detektáltuk.

3.2.5.2. *In vitro* molekuláris kölcsönhatások

A RIC és a H-Aβ molekuláris kölcsönhatásának további biológiai aktivitással kapcsolatos vizsgálatát *in vitro* körülmények között végeztük. A Dynabeads M-270 gyártójának termékleírása alapján ezekből a gyöngyökből 1 mg körülbelül 10 ± 2 µg ligandumot képes megkötni (ebben az esetben Rotimert); azonban egy indukcióból származó 6 mg gyöngy elméletileg körülbelül 50-60 µg Rotimert képes megkötni a felületükön, ha széles körben le vannak fedve. Az Aβ-k

munkakonzentrációját 50 µg/ml-nek határoztuk meg. A vizsgálat során először stagogram alapú optikai módszert alkalmaztunk. Ezután rövid idő (5 perc) inkubáció után megvizsgáltuk a vegyes monogonant-specifikus RIC (6 mg Rotimer bevonatú epoxi gyöngy per ml) és három óra (3 óra) vagy három nap (3d) Aβ aggregátumok közötti kölcsönhatást.

3.2.6. Rotimerrel kapcsolatos depléció

A Rotimer potenciális szerepét az Aβ42 aggregátumokkal szemben négy különböző fajban (*E. dilatata*; *L. bulla*; *C. intuta*; *S. pectinata*) vizsgáltuk. Az Aβ42 törzsoldat koncentrációja 1 mg/ml (DW) volt, 3 órás aggregációs periódussal. Ezt az oldatot NaOH-dal (1 N) semlegesítettük (pH 7,5-re). Standard tápközeggel 10x hígítás után a végső (munka) koncentráció 100 µg/ml volt. A betakarítás után 30 ± 2 kifejlett rotifer/well (n = 24 well/faj a 96 well plate) kezeltünk 0,2 ml térfogatban. A kezelési időszak standard körülmények között 5 nap volt. A kimerülési protokollt az Aβ42 beadása előtt hajtották végre, és ez a protokoll összhangban volt a Rotimer termelési tényezők kezelésében alkalmazott protokollal.

3.3. Statisztika

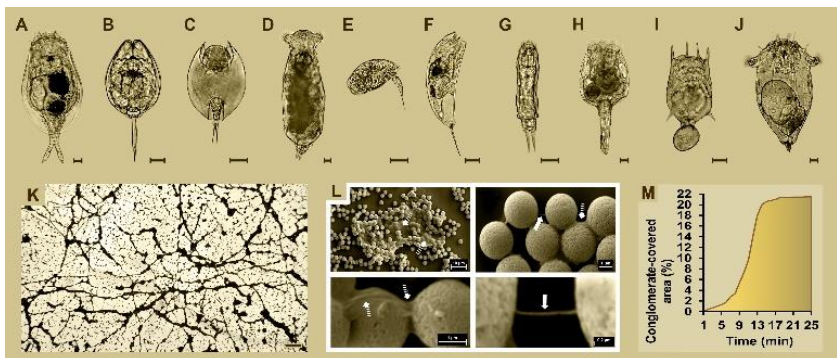
A hibásávok az átlag standard hibáját mutatják (S.E.M.). Ezt követően a statisztikai elemzéshez az egyutas ANOVA-t, majd a Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztuk. Az adatok homogenitását és normalitását ellenőriztük, és alkalmasnak találtuk az ANOVA-ra, majd Bonferroni post hoc tesztre. A különböző szignifikanciaszintek a következők: p*, # ≤ 0,05, p**, ∞∞ ≤ 0,01, p***, ####, ∞∞∞ ≤ 0,001 és p****≤0,0001 (mindegyik jelek az adott ábramagyarázatban vannak meghatározva).

4. Eredmények

4.1. A Rotimer-Induktor Konglomerátum

4.1.1. Termelés

A rotifer-specifikus biopolimert, Rotimert kutatócsoportunk írta le először a szakirodalomban. Ezt a váladékot hat különböző monogonantban figyeltük meg (**2A-F. ábra**): *E. dilatata*, *L. bulla*, *L. patella*, *I. aurita*, *C. adriatica* és *T. iernis*. A Rotimer egy speciális biomolekula komplex, amely létfontosságú az azt termelő állatok túléléséhez. Folyamatos laboratóriumi tenyésztést követően a hat vizsgált faj közül az *E. dilatata*- és a *L. bulla*-nak bizonyult a legintenzívebb



RPC-je. Reprezentatív fotó (**2K. ábra**) készült az *E. dilatata* által termelt RIC képződésről.

2. ábra A rotiferek és a rotifer-specifikus biopolimer (Rotimer) bemutatása. A monogonant rotifer fajok (A-F) reprezentatív fotói láthatók. A Rotimerrel rokon bioanyaggal kapcsolatos kísérletekben felhasznált fajok (skála: 20 μm): *E. dilatata*, A; *L. bulla*, B; *L. patella*, C; *I. aurita*, D; *C. adriatica*, E; *T. iernis*, F; *C. intuta*, G; *B. leydigii rotundus*, H; *B. calyciflorus*, I; *S. pectinata*, J. A reprezentatív ábrán az *E. dilatata*, K által alkotott 'Rotimer-Inductor Conglomerate' (RIC) hálózati struktúrája látható (skála: 200 μm). A SEM-fotók (L) a Rotimer különböző előfordulásait mutatják epoxi-indukció után (skála: 0,2 és 1 μm). A szabályos nyilak a fonalas formát, míg a szaggatott nyilak a ragasztószerű szerkezetet jelzik. A RIC termelés kinetikáját (M) a RIC által lefedett terület telítettségével (%) mértük az idő (perc) függvényében.

Az *E. dilatata* monogonantok által húzott filamentumok törékenyek (33 ± 3 nm keresztmetszet), és csak SEM-el figyelhetők meg. A Rotimer szekrécióját mechanikusan indukáljuk körülbelül 2,5-50 μm átmérőjű részecskékkel *E. dilatata*-ban. E tartomány felett vagy alatt nem figyeltek meg RIC-termelést. A biopolimerek nagyon gyorsan (4 $\mu\text{m}/\text{sec}$) szekretálódnak, és az induktorok felületéhez kötődnek. A kiválasztott exogén Rotimer (**2L. ábra**) lehet fonalas (nyíl) vagy ragasztószerű (szaggatott nyíl).

A Rotimert hat különböző rotifer szekretálta, és ezt a terméket vizsgáltuk, hogy felmérjük, melyik faj lehet a leghatékonyabb termelő az élesztő induktor során.

4.1.2. Analízis

A RIC szövetek nagyon összetett képződménynek tűnt, és néhány monogonantra jellemző, ezért szerettük volna tesztelni, hogy a különböző környezeti tényezők hogyan befolyásolják a keletkezését. Mivel az élesztő a rotiferek étrendjének része, induktorként is optimális volt. Az egymást követő indukciók után az endogén Rotimer kimerülését figyelték meg az *E. dilatata*-ban. A harmadik stimulációs kör után a konglomerátumok mérete nem változott jelentősen, de a konglomerátum által lefedett terület aránya csökkent. A két mért paraméter között eltérést találtunk az első-második körben és a harmadik-negyedik körben. Feltehetően az állatok kifogytak a termeléshez és szelekcióhoz szükséges forrásból, és nem volt elég idő a termelésre. A Rotimer aktív szintézise szükséges a RIC képződéshez, amely energetikailag aktív folyamat. Az éhezés után megfigyeltük a Rotimer szekréció kimerülésének második módját, tápanyaghiány miatt. A megfigyelt paraméterek változásait figyelték meg a RIC-termelés az éhezés első-második napja és a harmadik-negyedik nap között. Mivel az állatok tápláléka nem áll rendelkezésre, feltehetően az endogén Rotimer szubsztrátot használták energiaforrásként. Az éhezéstől kimerült *E. dilatata* entitásokban a RIC termelési kapacitás regenerációs ideje 30 ± 4 perc volt. Cellulóz, kármin, karbamid és epoxi gyöngyök jelenlétében a kimerült rotiferekben 6 óránál tovább nem volt RIC-termelés. A Rotimer termelés viszonylag gyors és erősen tápanyagfüggő.

Meglepő módon az alacsonyabb hőmérséklet (10 °C) nem csökkentette a monitorozott paramétereket a kontrollokhoz képest, míg a magasabb

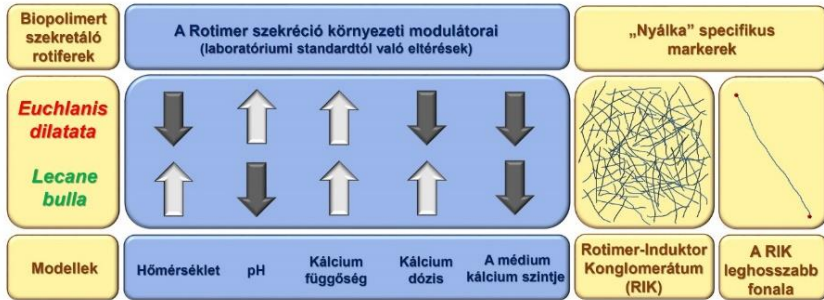
hőmérséklet (35 °C) képes volt serkenteni a termelést. Hasonlóan a RIC-gyártáshoz a magasabb hőmérséklet kedvezett a monogonantoknak. Közvetlenül az *E. dilatata* entitások izolálása után a növekvő (1 g/L) vagy csökkenő (DW) sókoncentrációnak nem volt azonnali hatása a RIC termelésre a standard tápoldathoz képest, amikor azonban ezeket az állatokat teljesen ionmentes közegben fél órán át pihentetjük (mossuk), az RPC eltűnt. A monogonantok sóérzékenységére vonatkozó átfogó adatokkal ellentétben azt találtuk, hogy az extrém ozmolaritásnak nincs káros hatása a monitorozott paraméterekre. A vizsgálat során az egyik mért paraméter a konglomerátum átlagos mérete volt. Egy másik kísérlet során mégis kiterjesztettük a paraméterek vizsgálatát nagyobb felbontással (fonalhosszúsággal), amit a regulációs részben ismertettünk. További vizsgálatok során láttuk, hogy a RIC hogyan tudja megőrizni integritását különböző vegyi anyagok jelenlétében. Feltételezzük, hogy hidratációra és fémionokra lehet szükség a Rotimer integritásának fenntartásához. Kihívást jelent a Rotimer komponenseinek és szerkezetének vizsgálata, mivel jelenleg nem tudjuk elválasztani a biopolimert az adott induktortól.

4.1.3. Reguláció

A Rotimer termeltetés érzékeny a környezeti tényezőkre, mint például a hőmérséklet, pH, fémionok és különféle szennyező anyagok. Ezek a befolyásoló tényezők ennek megfelelően eltérő hatást gyakorolnak a rotiferekre, azonban minden fajnak megvan a maga optimuma. A RIC termelés kalcium függésének pontos felmérése érdekében dózis-hatékonyságot mértünk. A nátrium nem befolyásolja a váladéktermelést, a különböző dózisu kalciummal egészítettük ki, a fémionok mennyiségével megegyezően, mint a standard médium. A dózisfüggőség elkerülése érdekében elengedhetetlen az állandó ozmolaritás biztosítása az adott mesterséges közegben. A nem membrán permeábilis kalcium-specifikus kelátképző (EDTA) RIC termelést gátló hatása azt bizonyítja, hogy ez a folyamat extracellulárisan, feltehetően a bélrendszer bemeneténél megy végbe. A biopolimer szekréció és képződés kalciumfüggősége nem ritka jelenség az állatvilágban, különösen a vízi gerincteleneknél.

Ha a váladékkiválasztást fajspecifikus optimális körülmények között indukáltuk módosított tápoldatban, akkor a filamentumok hossza és a RIC mennyisége azt mutatja, hogy az *E. dilatata* jobban teljesít, mint az *L. bulla*. A nem sejtpemeábilis Fluo-3 fluoreszcens festékkel kimutattuk, hogy az állatok szignifikánsan több kalciumot használtak fel a RIC termelés során, mint annak indukálása nélkül. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a rotiferek fémionokat kötnek meg, kivonva azokat környezetükből.

A két vizsgált faj az *E. dilatata* és a *L. bulla* a környezeti tényezőkre (hőmérséklet, pH) eltérő reakciókat mutatnak egymáshoz képest (**3. ábra**), kivéve a kalcium jelenlétét és a különböző gyógyszerek (Lucidril) moduláló hatását.



3. ábra: Rotimer szekréció külső modulátorai összefoglaló táblázat

4.1.4. Bioaktivitás

Az *E. dilatata* által termelt Rotimer élettani hatásait három különböző sejttípuson vizsgáltuk. Induktorként den-BSA-t használtunk, amely a klasszikus sejtenyészet standard tápközegében is megtalálható; ezért nem volt eltérő élettani hatása a rendszer sejtjeire. A sejtek átlagos mozgása jól mérhető volt a kezeltlen kontrollokban. Passzív (diffúzió alapú) és aktív (sejtmozgás) motilitás fordult elő élesztőgombákban és algákban, míg humán neuroblasztómában csak dinamikus lokalizáció volt kimutatható. A RIC csak kismértékben csökkentette a vizsgált sejtek életképességét, ahol a károsító hatás mértéke nem érte el az LD50-et, ugyanakkor gátolta minden sejttípus mozgékonyosságát.

4.1.5. Konglomerátum-aggregátum kölcsönhatások

A RIC és az aggregátumok közötti kölcsönhatás során megvizsgáltuk a biopolimer tartalmú konglomerátumok és a H-A β neurotoxikus aggregátumok közötti kölcsönhatást, hogy feltárjuk a RIC komplex H-A β aggregációra gyakorolt hatását. A H-A β és az *E. dilatata/L. bulla* RIC (ED/LB-RIC) kapcsolatát először stagogram elemzéssel vizsgáltuk, amely egy egyszerű, de széles körben elfogadott módszer pl. a különböző molekulaösszetételű minták aggregációs képessége optikai diverzitásuk alapján. Ebben az esetben a hatóanyag RIC (epoxi gyöngyök Rotimerrel) volt. A friss (0 perc) H-A β és S-A β (véletlen aminosavsorrendű) oldatok nem szerepeltek a stagogram ábrán, mert átlátszó kristályosodási mintákat mutattak, ezért a kiszáradt minták határvonalait nem lehetett azonosítani.

A csoportok kristályosodott cseppjei mind sűrűségben, mind szerkezeti fenotípusban különböztek. Ez egy zárt és pontosan meghatározott kémiai környezet, kevés komponenssel, azonban jól kontrollálható *in vitro* rendszer. Az több napig aggregáltatott H-A β (3d) sűrűbb mintázatot mutatott, mint a néhány órán át inkubáltatott (3h). A két vizsgált állatcsoport mindkét RIC csoportja kiemelkedő sűrűséget mutatott a stagogramok empirikus elemzése során, sőt maximális referenciát adtak a többi minta további elemzéséhez. Az ED-RIC-H-

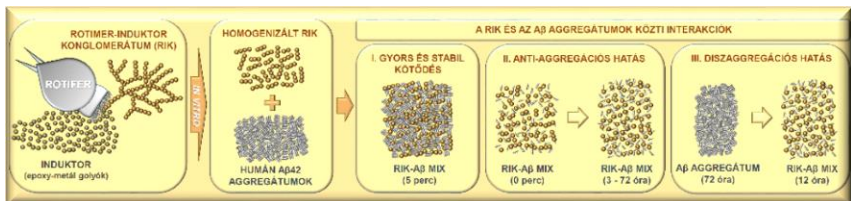
A β konglomerátum sűrűsége nagyobb, mint az LB-RIC-H-A β . Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a Rotimer és az A β -k között lehetséges molekuláris kölcsönhatás alakult ki, különösen a H-A β formával. Mindkét rotifer faj RIC és H-A β kapcsolata hasonló tendenciát mutatott, azonban azt is megfigyeltük, hogy a *L. bulla*-ból származó minták szignifikánsan világosabbak voltak. Az optikai analízis mellett a vizsgált molekulák közötti gyors kölcsönhatásokat fluoreszcens módszerekkel is elemeztük. A méréshez indikátor fluoreszcens festékeket alkalmaztunk, a Bis-ANS-t és a ThT-t. Az alacsonyabb szennyeződésű H-A β (3h) nagyobb arányban tartalmaz oligomereket, ezeket Bis-ANS-sel, míg a hosszabb inkubációs idejű (3d) fibrilláris H-A β ThT-vel mértük. Az anti- és dezaggregáló mérések során minden mintát mindkét fluorofórral detektáltuk.

Az interakciós vizsgálatok eredményei három egységbe sorolhatók: 1. H-A β -típusok egyedül; 2. induktor, különböző RIC-változatok és az induktor-A β kölcsönhatások, mint releváns kontroll; 3. a fajspecifikus RIC és a különböző H-A β -k közötti kölcsönhatások (aminosavszekvenciában és az aggregációs szintjében meghatározottak szerint). A követett aggregátumok alapján három csoport van: 1. egyedül A β ; 2. szabad A β -k a felülúszóban; 3. A β -k kötése a RIC-típusokhoz.

A H-A β kölcsönhatásba lép mindkét rotifer faj konglomerátumaival és viszonylag magas fluoreszcens jelet mutatott, míg az S-A β háttérkontrollhoz hasonlóan alacsonyabb értéket adott. A referencia amiloid típusból származó adatokból arra következtethetünk, hogy a H-A β biopolimerekhez való kötődése szekvencia-specifitást mutat. Az alacsonyabb (3h) vagy magasabb (3d) konformációs szennyeződésű H-A β minták szignifikánsan kötődnek a vizsgált Rotimer bevonatokhoz, de nagyobb affinitást mutattak az *E. dilatata* által kiválasztott biopolimerhez, mint az *L. bulla* biopolimerjéhez.

Az *E. dilatata*-ból származó váladék hatékonyabb volt az aggregációt gátló folyamatokban, mint az *L. bulla*-ból származó, azonos kísérleti időt használva. A 3d csoport kevésbé hatékony volt. Az LB-RIC és H-A β /3d kombinációban a ThT emelkedett jelet adott, így a többi mintától eltérően itt nem volt egyértelmű következtetés a H-A β aggregációs szintjéről.

A két fluorofór jellemzői alapján feltételezhetjük, hogy a Rotimer jelenléte a mintákban dezaggregációs hatást fejt ki H-A β ellen.



4. ábra: A rotifer-RIC és a humán típusú A β aggregátumok közötti kölcsönhatások

4.2. Rotiferek és béta-amiloid kapcsolat

4.2.1. Autokatabolizmus

Az A β 42 egy jól ismert neurotoxin, amely hajlamos nagyon ellenálló aggregátumok kialakítására vízi környezetben. A bdelloid rotiferek képesek katabolizálni ezeket az aggregátumokat fiziológiai károsodás nélkül. Célunk az volt, hogy feltárjuk az A β 42 speciális szerepét az autokatabolizmussal kapcsolatos folyamatokban. Ennek a patológiás molekulának a szekvencia-specifitásának azonosítására a kódolt változatát használtuk kontrollként. Az S-A β 42 molekulatömege megegyezett a vad típus formáéval, viszont eltérő az aminosav-szekvenciája.

Az autokatabolizmussal összefüggő folyamatok és az éhezés okozta szervzsugorodás összekapcsolására a kísérletek során ConA-t alkalmaztunk. Összegzésként elmondható, hogy a teljes fehérje mennyisége a 20. napon csökkent, ami azt jelzi, hogy az állatok katabolizálják azokat a túlélés érdekében. A nukleinsav mennyisége egyik fajnál sem mutatott változást. A megfelelő vizsgálatokkal összhangban az autokatabolizmussal összefüggő vezikuláris savasodás szignifikáns növekedését mutatott ki releváns fajoknál D20-on a kezeletlen D0 referenciaértékeihez képest.

A FROS-hoz kapcsolódó mérések során a ConA, A β 42 vagy S-A β 42 D0 napon került a kezelőoldathoz, ezért ezek az adatok referenciaként szolgáltak. Mindkét rotifer faj esetében a szervzsugorodás kevésbé volt kifejezett a 20. napon, mint a megfelelően kezeletlen kontrollokban. Az A β 42-vel kezelt csoportokban szignifikánsan nagyobb regenerációt figyeltek meg a D25-ön, mint a többi D25-ös csoportban. Ezek a mérések azt mutatják, hogy a természetes szerkezetű aggregátumnak sajátos moduláló hatása is van. Ezenkívül a szervzsugorodás kisebb volt az A β 42-vel kezelt csoportokban, mint az S-A β 42 megfelelőiben. Ugyanez a jelenség volt megfigyelhető a regeneráció végén is, amikor az állatok szignifikánsan felépültek A β 42 jelenlétében. Ezek az adatok azt mutatták, hogy a zsugorodás moduláció révén történő csillapítása valószínűleg szekvencia-specifikus, mivel az aminosavak sorrendje az egyetlen különbség a kéttípusú A β között. A 20. napon a ConA gátolta a FROS-t rotifer fajokban táplálékmentes, de glükóz tartalmú környezetben.

4.2.2. Depléción

Négy fajt kezeltünk A β 42 aggregátumokkal, de csak kettő szekretált Rotimert (*E. dilatata*; *L. bulla*). A Rotimer depléciót (kimerülés) valódi termelő állatoknál alkalmaztuk, ennek a biopolimernek az A β érzékenységben és toxicitásban játszott szerepének vizsgálatára. Megállapítottuk, hogy az *E. dilatata* és *L. bulla* egészséges állapotukban nem érzékenyek az A β 42 aggregátumokra, ahol az észteráz aktivitás és az élő rotiferek száma megegyezik a fajspecifikus kezeletlen kontrollokéval (100%). Az *in vivo* biopolimer kimerülése után az állatok elvesztették a neurotoxikus aggregátumokkal szembeni ellenállásukat, a mért paraméterek szignifikánsan csökkentek a kontrollokhoz képest. Hasonló jelenség (szignifikáns csökkenés) volt megfigyelhető azoknál az állatoknál (*S. pectinata*; *C. intuta*), amelyek nem szekretáltak exogén biopolimert.

5. Diskusszió

A rotiferek, mint mikrogerinctelenek, széles körben elfogadott ökológiai indikátorok és kísérleti állatmodellek az öregedés, élettartam, toxikológia, úrkutatás és farmakológiai kutatások terén. A bdelloid rotiferek (pl. *P. acuticornis*) *in vivo* képesek katabolizálni a neurotoxikus aggregátumokat.

Kutatócsoportunk nemrég fedezte fel és publikálta először azt a tényt, hogy a rotiferek speciális biopolimerek előállítására is képesek. A rotifer-specifikus biopolimerek, nevezetesen „Rotimerek”, újdonsága miatt tulajdonságai még nem ismertek részletesen. Termékük a 'Rotimer-Inductor Conglomerate' (RIK; Rotimer-Induktor Konglomerátum). Emellett jelentősen módosul a fiziológiai-, gyógyszer- és környezeti hatások szerint. Ezt a fonalas, film- és ragasztószerű viszkoelasztikus váladékot több monogonant és bdelloid fajnál is megfigyeltük, ezt a természetes anyagot ezek a kis lények táptalaj megtisztítására (fertőtlenítő és szűrési hatás) táplálék befogására illetve peték lerakására (tapadó tulajdonság) használják.

Továbbá az is érdekelt minket, hogy a RIC hogyan tudja megőrizni sértetlenségét különböző vegyszerek jelenlétében. Különböző környezeti tényezők (például hőmérséklet, pH, fémionok és vegyszerek) befolyásolják a Rotimer előállítását. Az a tény, hogy alanyaink megőrizték ezt a képességet, megerősíti azt az elképzelést, hogy ez a termék egy többfunkciós bioaktív anyag, amely bioindikátorként is jelentős szerepet tölt be. A Rotimer kiterjedt vizsgálata számos lehetőséget kínál a jövőbeni gyakorlati alkalmazásokhoz.

A bioaktivitási kísérletek során ez a váladék mozgékonyt gátló hatást fejt ki különböző sejttípusokban (pl. algákban és élesztőgombákban). A mérések kimutatták, hogy sokrétű és ígéretes bioaktivitás gátolta a rákos neuroblasztóma sejtproliferációt. A RIC és az aggregátumok közötti kölcsönhatás azt mutatja, hogy az *E. dilatata*- és *L. bulla*-RIC fehérjetartalmú váladék a felületükön specifikusan megkötö a H-A β -t, amely hatékonyan befolyásolja az aggregációs kinetikát, továbbá a fajspecifikus biopolimerek aktivitása eltérhet egymástól. Több magyarázat is lehetne a RIC eltérő viselkedésére a H-A β -kötő és aggregáló folyamatokban, amelyek a két különböző fajból származnak. Az egyik értelmezés az lehet, hogy a *L. bulla* eredetileg kevesebb biopolimert termelt és ragasztott az epoxigyöngyökhöz, mint az *E. dilatata*. Egy másik lehetőség az lehet, hogy a biopolimerek szerkezetükben, funkcionalitásukban és hatékonyságukban eltérőek lehetnek a különböző rotifer fajokban. Az LB-RIC aggregációgátló hatása nem nőtt, ha az állatok száma magasabb volt hosszabb Rotimer szekréciós idő mellett, vagy a RIC kétszeres dózist tesztelték standard H-A β mennyiségben. A Rotimer és a neurotoxikus peptid aggregátumok (például alfa-synuclein és prionok) közötti kölcsönhatás további vizsgálatokat igényel. Köztudott, hogy a Rotimer szekréció során a kalcium beépül, és extra ionos karakterisztikát adhat ennek a bioanyagoknak, ezért a biopolimer fémion tartalma erősítheti ezeket a molekuláris kölcsönhatásokat. Az anti- és dezaggregáló képesség mechanizmusa olyan lehet, mint a béta-laptörő molekulák hatása. Összefoglalva, fontos kiemelni, hogy a természetes polimerek közvetlen molekuláris hatásait a neurodegenerációval összefüggő amiloidokra alig vizsgálták, csak néhány esetről van szó. A kapott eredmények

alapján feltételezhető, hogy a Rotimernek van valamilyen megszakító aktivitása, amely képes disszociálni a H-A β aggregátumokat. Erre a célra először a rotifer-specifikus bioanyagot, a Rotimer-t alkalmaztuk. Indirekt *in vivo* méréseket végeztünk a Rotimer H-A β elleni védő szerepére vonatkozóan, de *in vitro* kötődési, anti- és dezaggregációs kísérleteket korábban soha nem végeztek. Ráadásul ez az interdiszciplináris megközelítés új távlatokat nyithat az Alzheimer-kór elleni farmakológiai kutatásban is.

Bár ennek a fehérjetartalmú biopolimernek a molekuláris szerkezete és holisztikus biotechnológiai, biokémiai jelentősége még nem ismert, további fizikai-kémiai elemzésekre lesz szükség. A Rotimer univerzális ragasztó tulajdonsága alapján hasznos eszköznek bizonyulhat a szennyvíztisztításban. Más biopolimerekhez hasonlóan potenciális ipari felhasználása is lehet.

Korábban senki sem vizsgálta az A β *in vivo* katabolizmusát, mint táplálékforrást vagy potenciális autokatabolizmus-szabályozót a többsejtű entitások számára. Az A β 42 által kiváltott autokatabolizmussal összefüggő változásokat glükózpótló éhezési modellben szervméret-alapú *in vivo* monitorozó rendszert alkalmaztunk. A kétoldali germovitellaria (reproduktív szerv) méretének empirikusan jól követett csökkenését éhezett rotiferekben az A β 42 gyengítette, amely tápanyagforrás- és peptidszekvencia-specifikus moderátorként szolgált a szervzsugorodási fázisban, és fokozta a regenerációs fázist, beleértve a reprodukciót is. A germovitellaria éhezés által kiváltott zsugorodása, regenerációs és szaporodási képessége ezekben az állatokban, megfelelő fiziológiai és tapasztalati markere az autokatabolizmusnak, FROSi összegzi. A természetes aggregátum FROSi-ja, ellentétben a mesterségesen kevert változatával szemben, azt mutatta, hogy az A β 42 nemcsak táplálékforrás a rotiferek számára, hanem potenciális szabályozója és moderátora a szisztémás anyagcseréjüknek. A *Philodina* és *Adineta* fajok hasonló típusú elváltozásokat mutattak, ezért kijelenthető, hogy az A β 42 ezen hatásai nem korlátozódnak egy adott fajra. Ezen mikroszkopikus gerinctelen állatok alkalmazásával az A β 42 eddig ismeretlen szerepét mutattuk be, további eszközöket biztosítva a neurotoxikus aggregátumok és az anyagcsere közötti összefüggések feltárásához. Egy másik kísérletben az *in vivo* biopolimer-depléción után az állatok elvesztették a neurotoxikus aggregátumokkal szembeni ellenállásukat. A fenti eredmények arra utalnak, hogy a Rotimer alapvető védő szerepet játszhat az A β aggregátum toxicitás ellen a rotiferekben.

A kozmopolita rotiferek édes vagy sós vízben, talajban és sarkvidéki/magas tengeri jégtakarókban fordulnak elő. Bioaktív váladékuk globálisan meghatározó ökológiai szabályozó és végrehajtó funkciót is betölthet. A rotiferek környezetre gyakorolt hatása meglepően széles körűnek tűnik. Ennek alapján törekedtünk a Rotimer-termelés mechanizmusának, anatómiai, fiziológiai, genomikai és proteomikai hátterének, valamint evolúciós biodiverzitásuknak, a természetben betöltött ökológiai szerepüknek és interdiszciplináris fordítási lehetőségeinek megértésére. Ahhoz, hogy további és hosszú távú terveink legyenek ezzel a természetes biotermékkel kapcsolatban, az átfogó kémiai és biológiai feltárás elkerülhetetlen és szükséges. A

biopolimerek természetvédelmi technológiáktól az ipari tápanyag-előállításán át, a gének és gyógyszerek szállításán, vagy nanorészecskék előállításán át a szövetek regenerációjáig minden tudományterületen alkalmazhatók. A Rotimerekkel végzett előzetes tanulmányaink messze nem merítették ki ennek az újonnan felfedezett és publikált molekulacsaládnak a sokoldalúságát, a bennük rejlő természetes és innovatív lehetőségeket.

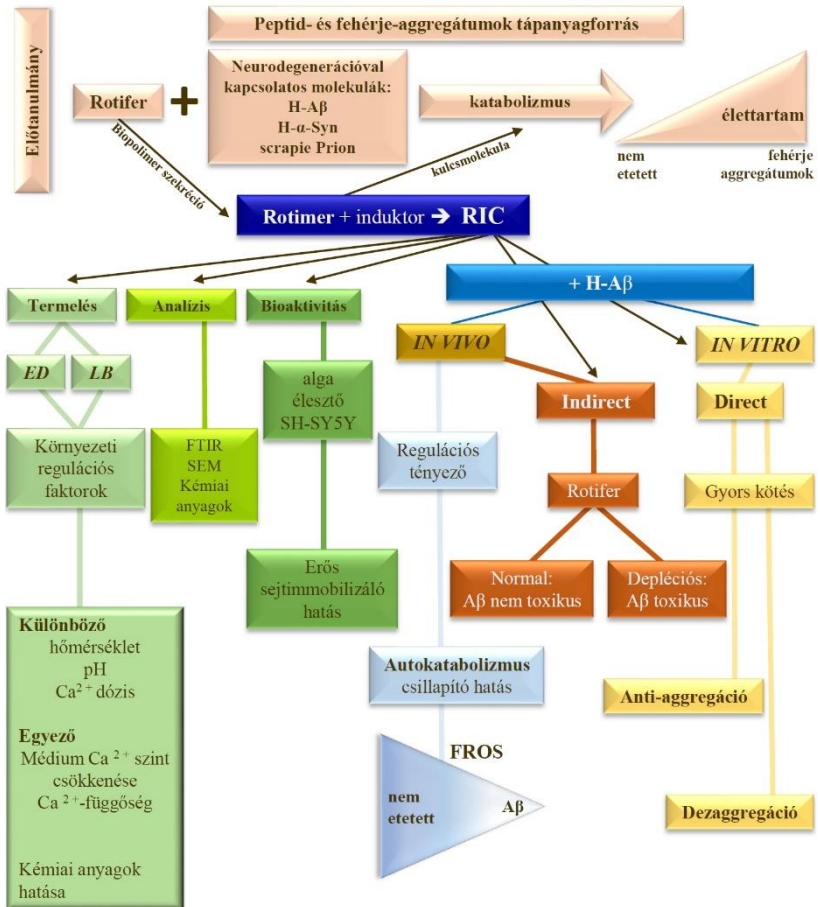
6. Következtetés

Munkánk eredménye egy újszerű és bioaktív rotifer-specifikus biopolimer, a Rotimer, amely bizonyos monogonantokból származik. Ennek a bioexudátumnak a mozgékonyág gátló hatását különböző sejtípusokban és a demencia-specifikus aggregátumokkal szembeni védőhatását rotiferekben megfigyeltük. A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a Rotimer termelése kötelezően kalciumfüggőnek bizonyult, ráadásul ez a különleges váladék a természetes vízi környezet ígéretes bioindikátora.

Kutatócsoportunk elsőként írta le a Rotimer és a H-A β közötti *in vitro* kölcsönhatását, a biopolimer az Alzheimer-kór típusú A β -k elleni anti- és dezaggregáló hatásának bemutatásával. A kapott eredmények tükrözik a RIC és a H-A β közötti kapcsolatot, emellett az így kialakult stabil kölcsönhatás A β szekvenciaspecifitást is mutat, mivel minimális volt a kötődés a RIC és az S-A β között. Mindkét monogonant rotifer faj (*E. dilatata* és *L. bulla*) konglomerátuma molekulárisan kölcsönhatásba lép a H-A β -val, amelyet oligomer vagy fibrill típusnak tekintünk, sőt az ED-RIC hatékonyabb volt kölcsönhatás és aggregációs folyamatokban. A fent említett tulajdonságai miatt ezt a természetes anyagot a jövőben tanulmányozni kell, továbbá ez a biopolimer releváns molekuláris minta lehet a neurodegenerációval kapcsolatos kutatások gyógyszerjelöltjei kifejlesztésében.

A főbb megállapítások összefoglalása a következő volt:

1. Kivételes kapcsolat alakulhat ki a rotiferek és a humán típusú béta-amiloid (A β) aggregátumok között, laboratóriumi körülmények között (pl. amiloid tápanyagforrásként történő felhasználása).
2. Váladékképződésként a rotifer-specifikus biopolimer (Rotimer) szekréciója kötelező kalciumfüggő folyamat, filogenetikailag ősi jelenség a rotiferekben.
3. A Rotimer egy fehérjetartalmú biomolekula, amely érzékeny a proteázokra.
4. A Rotimer nem toxikus anyag a különböző biológiai modellekben, de univerzálisan képes blokkolni a különböző sejtípusok mozgékonyágát.
5. Az endogén Rotimer *in vivo* védőhatással rendelkezik az A β aggregátumok toxicitása ellen.
6. Az A β aggregátumok nemcsak tápanyagforrások, hanem a rotifer anyagcseréjének szabályozói is.
7. A Rotimer *in vitro* specifikusan kötődik az A β aggregátumokhoz, és befolyásolja azok aggregációját (antiaggregáció és dezaggregáció).
8. A Rotimer ígéretes molekuláris információkat tartalmazhat az Alzheimer-kór gyógyszereinek felfedezéséhez



7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Datki Zsolt Lászlónak mentorálásáért, a PhD éveim során elért sikereimhez való hozzájárulásáért és a szakdolgozat elkészítéséhez nyújtott segítségéért. Köszönöm Kálmán János professzor úrnak, aki lehetőséget biztosított számomra, hogy csatlakozzam a Szegedi Tudományegyetem Pszichiátriai Klinika Kutatócsoportjához, valamint Molnárné Hatvani Ilonának a laboratóriumi segítségéért. Végezetül szeretném megköszönni szüleimnek és férjemnek az évek során nyújtott kitartó támogatásukat.