



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

**Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem**  
Vegyésmérnöki és Biomérnöki Kar

# **Tau aggregációt gátló kismolekulájú vegyületek tesztelése *Drosophila* melanogaster neurodegeneratív betegség modelleken**

Készítette: Rubics András

Témavezető: Dr. Kárpáti Manuéla, PhD egyetemi tanársegéd

ELTE, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék

MTA-TTK, Neurodegeneratív Betegségek Gyógyszerkutató  
Csoport

Budapest, 2015

Rövidítések jegyzéke.....	3
<b>1. Bevezetés.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. A Tau.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.1. A Tau szerepe a neurodegenerációban.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.2. A Tau mint terápiás célpont.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2. A <i>Drosophila melanogaster</i>.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.1. A <i>Drosophila</i> és a neurodegeneratív betegségek.....</b>	<b>12</b>
<b>2. Célkitűzések.....</b>	<b>13</b>
<b>3. Anyagok és módszerek.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Alkalmazott <i>Drosophila</i> törzsek és fenntartásuk.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Alkalmazott vegyületek.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3. Élethossz vizsgálat.....</b>	<b>15</b>
<b>3.4. Lárva mászótesztek.....</b>	<b>15</b>
<b>3.5. Szem fenotípus vizsgálat.....</b>	<b>16</b>
<b>4. Eredmények.....</b>	<b>17</b>
<b>4.1. Élethosszvizsgálat.....</b>	<b>17</b>
<b>4.2. A motoneuronjaikban Tau fehérjét kifejező lárvák vizsgálata.....</b>	<b>19</b>
<b>4.2.1. A vegyületekkel való kezelés hatásai a motoros funkciókra.....</b>	<b>20</b>
<b>4.3. Szem fenotípus vizsgálat.....</b>	<b>21</b>
<b>4.3.1. A kezelések hatásai a szem fenotípusra.....</b>	<b>21</b>
<b>5. Diskusszió.....</b>	<b>24</b>
<b>6. Összefoglalás.....</b>	<b>25</b>
<b>7. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>26</b>
Irodalomjegyzék.....	27

# Rövidítések jegyzéke

AD – Alzheimer's disease, Alzheimer-kór

APP –  $\beta$ -amyloid precursor protein,  $\beta$ -amiloid prekursor fehérje

A $\beta$  – Amiloid  $\beta$  protein

A $\beta$ 42 – Amiloid  $\beta$  protein 42 aminosav hosszúságú fragmense

cdk5 – Cyclin-dependent kinase 5, Ciklin-függő kináz 5

dTau – Drosophila Tau

FTDP-17 – Frontotemporal demetia with parkinsonism linked to chromosome 17, 17. kromoszómához kötött, parkinson-szerű frontotemporális demenciák

Gal4 – Galactose-responsive transcription factor, Galaktóz-reszponzív transzkripció faktor

GMR – Glass multiple reporter, Glass többszörös riporter

GSK-3 $\beta$  – Glycogen syntase kinase 3, Glikogén-szintáz-kináz-3

hTau – Humán Tau

IR – Inverted repeat, fordított ismétlődés

MAP – Microtubule associated protein, mikrotubulus-asszociált fehérje

MAP1B – Microtubule associated protein 1B, mikrotubulus-asszociált fehérje 1B

MAPT – Microtubule associated protein Tau, mikrotubulus-asszociált Tau fehérje

NFT – Neurofibrillary tangle, neurofibrilláris köteg

PP2A – Protein phosphatase 2A Protein foszfatáz 2A

pTau – Hiperfoszforilált Tau

TH – Tirozin-hidroxiláz

UAS – Upstream Activation Sequence, upstream aktiváló szekvencia

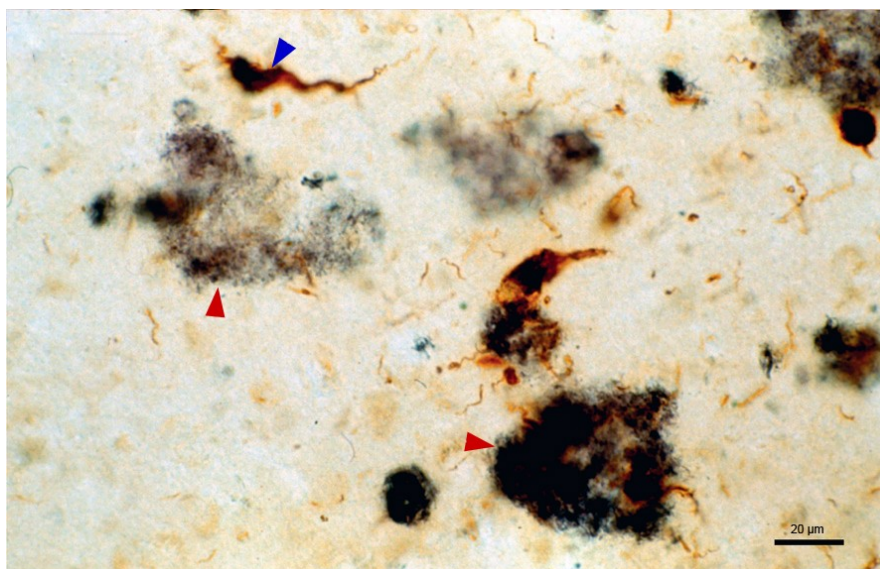
# 1. Bevezetés

A különböző neurodegeneratív betegségek jelentős anyagi és szociális terhet jelentenek a világ számára. Az ilyen, idegsejtek károsodásával és pusztulásával járó betegségek leggyakoribb formája az Alzheimer-kór (AD). A betegség során – többek között – a neuronok elvesztése miatt kognitív funkciók zavarok és emlékezetvesztés figyelhető meg. A tünetek az idő előre haladtával egyre súlyosbodnak, végül a beteg halálát eredményezik.

2015-ben 46,8 millió főre becsülték a demenciákban szenvedőket, és a jövőre nézve a megbetegedések számának növekedését jósolják. Az ezzel összefüggő globális kiadások csak ebben az évben körülbelül 818 milliárd dollárt tettek ki [ CITATION htt \l 1038 ], amely 35,4 %-os emelkedést jelent a 2010-es 604 milliárd dollárhoz képest [ CITATION Wim13 \l 1038 ]. Ennek az összegnek a túlnyomó részét informális és szociális ellátás teszi ki a fejlett gazdasággal rendelkező országokban, az egészségügyi kiadások elmaradnak ezek mellett. Szegényebb országokban az informális gondozás dominál, tehát a beteg gondozását a rokonok végzik, külső, intézményesített támogatás nélkül. Az informális gondozás tehát nem csak a beteg, hanem egy teljes család, életvitelbeli változását vonja maga után. A

Az Alzheimer-kór jellemző tünetei az idővel egyre súlyosbodó viselkedési és memóriazavarok, amelyek kihatnak olyan alapvető emberi tevékenységekre, mint a döntéshozás vagy a beszéd. Patológiás ismertetőjegyei az extracelluláris amiloid plakkok és a sejteken belüli neurofibrilláris kötegek (NFT) megjelenése, amelyek Tau fehérjeaggregátumokból állnak [ CITATION Irv08 \l 1038 ] (1. ábra). Az amiloid plakkok a  $\beta$ -amiloid prekursor fehérje (amyloid  $\beta$  precursor protein, APP) hasítási termékei. A fehérjét háromféle enzim képes hasítani, a kóros, 42 aminosav hosszúságú amiloid- $\beta$  peptid a  $\gamma$ -szekretáz terméke [ CITATION Ele15 \l 1038 ]. A röviden csak A $\beta$ 42 néven emlegetett peptid, illetve az ebből kialakuló aggregátumok az Alzheimer-kór okozóinak egyike [ CITATION Gut03 \l 1038 ].

Számos megközelítést alkalmaznak hatékony gyógyszerek kifejlesztésére az Alzheimer-kór ellen [ CITATION Kum15 \l 1038 ]. Az eddigi kutatások főleg az amiloid- $\beta$  proteint célozták [ CITATION Mon11 \l 1038 ], azonban egy újabb szemlélet a mikrotubulusokat stabilizáló Tau fehérjét tartja a fő célmolekulának [ CITATION Med14 \l 1038 \m Tau09]. A fehérje aggregációját gátló molekulákkal lehetségessé válhat új terápiás szerek kifejlesztése. Több vegyületet azonosítottak, melyek képesek voltak gátolni a tau aggregációt *in vitro*, azonban *in vivo* hatékonyságuk még nem bizonyított [ CITATION Med14 \l 1038 ].



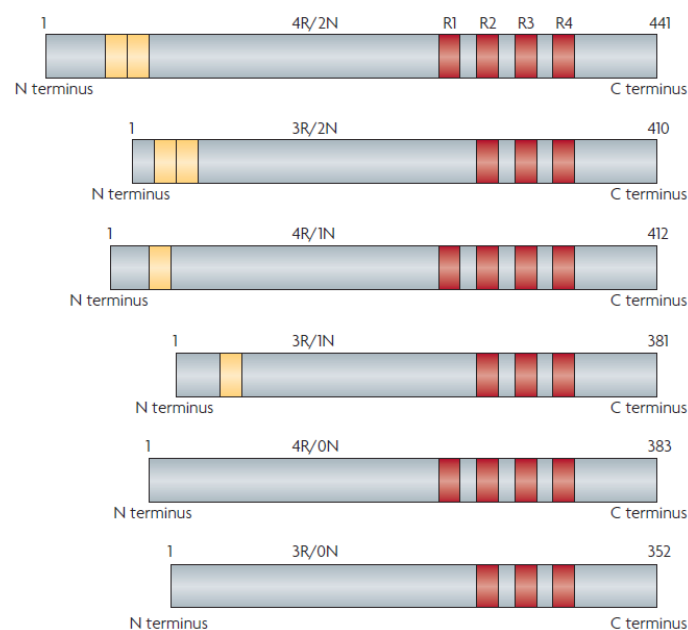
**1. ábra** Az Alzheimer kór ismertetőjegyei, az amiloid plakkok (piros nyíl) és a neurofibrilláris kötegek (kék nyíl). Az Alzheimer-kór patológiája során az amiloid- $\beta$  és a Tau fehérjék oldhatatlan aggregátumokat képeznek, és extra- vagy intracelluláris lerakódásokat alakítanak ki az agyban. Az kép immunhisztokémiai módszerrel készült anti-Tau és anti-amiloid- $\beta$  antitestekkel. (Spillantini és Goedert nyomán) [ CITATION Spi13 \l 1038 ]

## 1.1. A Tau

A Tau egy mikrotubulus-asszociált fehérje (MAPT – microtubule associated protein Tau), melynek emberben hat izoformája ismert (2. ábra). Ezek ugyanazon, a 17. kromoszómán található MAPT gén termékeként alternatív splicinggal keletkeznek [ CITATION Spi13 \l 1038 \m And05 \m Goe04]. Az izoformák között különbségek lehetnek a tubulin-kötő helyek mennyiségében, melyeket R betűvel jelölünk. Ennek megfelelően a fehérjén található három, vagy négy ilyen kötőhelynek megfelelően az izoformák a 3R és 4R jelöléssel különböztethetők meg. Egy egészséges felnőtt emberi agyban ezek 1:1 arányban fordulnak elő, viszont az egyes taupátiákban (tehát Tau fehérjeaggregációval összefüggő betegségekben) megváltozik ez az arányszám [ CITATION Nob13 \l 1038 ].

A mikrotubulus-kötő régió kivül a fehérje izoformái között különbséget az N-terminális közeli, 29 aminosav hosszú szakasz megléte vagy hiánya okozza. Ezeket a változatokat a 0N, 1N vagy 2N jelöléssel látják el. Ezek a szakaszok erősen savas karakterűek és a plazmamembránnal, valamint citoszolikus elemekkel kölcsönhatva jelátviteli folyamatokban vesznek részt [ CITATION Bué00 \l 1038 ].

A Tau legnagyobb mennyiségben az idegsejtek axonjaiban fordul elő, ahol a mikrotubulusok összeszerelésében és később stabilizálásukban játszik szerepet. Ezzel összefüggésben részt vesz a neuronok morfológiájának kialakításában, fenntartásában és az axonális átvitelben [ CITATION Her07 \l 1038 ]. Működését foszforilációs állapota határozza meg [ CITATION Nob13 \l 1038 ], defoszforilált állapotban kötődik a mikrotubulusokhoz, foszforiláció hatására leválik róluk. A két állapot közötti dinamikus egyensúly áll fenn, amelyet foszfatázok és kinázok szabályoznak [ CITATION Bal07 \l 1038 ]. Neurodegeneratív betegségekből ez az egyensúly felbomlik, és nagy mennyiségű hiperfoszforilált Tau (pTau) keletkezik.



**2. ábra** A hat Tau izoforma. A MAPT gén RNS termékének alternatív splicingjával fiziológiásan hat izoformában fordul elő a Tau. Ezek között a mikrotubulus-kötő régiók (piros) mennyiségében (3R vagy 4R), és 29 aminosav hosszú N-terminális közeli szakaszokban (sárga) van különbség (0N, 1N és 2N jelöléssel) (Ballatore és mtsai) [ CITATION Bal07 \l 1038 ].

### 1.1.1. A Tau szerepe a neurodegenerációban

A hiperfoszforilált Tau aggregátumok képződése szerepet játszik több neurodegeneratív betegség kialakulásában, melyeket összefoglalóan tauopátiáknak neveznek. A tauopátiák közé olyan betegségek sorolhatók, mint az Alzheimer-kór, a Pick-betegség, a progresszív szupranukleáris bénulás és a Parkinson-kór [ CITATION Her07 \l 1038 ]. A tauopátiák jellemző ismertetőjegye az idegsejtekben felhalmozódott Tau aggregátumok jelenléte. A fehérje

rendellenes változatai elvesztik mikrotubulus-kötő képességüket, jelentősen megnő a szabad Tau mennyisége. A kötetlen fehérjékből dimerek, trimerek és más szolubilis vagy oldhatatlan oligomerek képeződnek. Ezek később páros helikális filamentumokat és egyenes filamentumokat alkotnak, végül neurofibrillális kötegek keletkeznek belőlük. A folyamat végül az axonális transzport és az idegsejtek szerkezetének károsodását eredményezi.

A patológiás folyamat során a fehérje nemcsak elveszti normális rendeltetését, hanem további toxikus funkciót nyerhet és károsodást okoz a mikrotubulusokban, valamint a normális Tau proteint és feltehetően más mikrotubulus-kötő fehérjéket képes bevonni az aggregációba [ CITATION Med14 \l 1038 ]. Manapság is vita tárgya, hogy a toxikus hatásért melyik forma felelős. Korábban a késői oldhatatlan aggregátumokat tartották felelősnek a toxikus funkcióért, azonban egy újabb szemlélet főképp a köztes termékeknek, az oligomereknek tulajdonítja ezt a szerepet. Egyes elméletek még az neurofibrillaris kötegek neurodegenerációval szembeni védő szerepét is feltételezik [ CITATION Cow13 \l 1038 ], ugyanis beszámoltak több esetről, amikor nem volt észlelhető nagymértékű filamentumképződés, de megjelentek a neurodegenerációra jellemző tünetek [ CITATION Wil00 \l 1038 \m Wit01].

Az hogy milyen hatások váltják ki az aggregációt még nem teljesen tisztázott. A filamentumok képződését általában megelőzi a Tau hiperfoszforilációja [ CITATION Nob13 \l 1038 ], amiből arra lehet következtetni, hogy a foszforiláció hajlamosítja a fehérjét az aggregációra. Ezt az elképzelést támasztja alá, hogy több, Tau foszforilálásban szerepet játszó kináz overexpressziója, például a glikogén-szintáz-kináz-3 (GSK-3) vagy a ciklin-függő kináz 5 (CDK5), elősegíti a pTau képződését és felhalmozódását [ CITATION Jac02 \l 1038 \m Nob03]. Továbbá foszfatázok gátlása, például a protein foszfatáz 2A (PP2A) inhibíció is előidéz neurodegenerációt [ CITATION Wan15 \l 1038 ]. Ugyanakkor beszámoltak a Tau foszforiláció aggregációt gátló hatásáról is [ CITATION Sch99 \l 1038 ]. Az ellentmondás feloldható, ugyanis a Tau fehérjén 85 foszforilációs hely található, így lehetséges, hogy bizonyos kötőhelyek elősegítik, mások gátolják az aggregációt [ CITATION Nob13 \l 1038 ].

A foszforiláció mellett más fehérjeszerkezeti módosításokról is beszámoltak, melyek közrejátszhatnak a neurodegeneratív folyamat létrehozásában, vagy lassításában [ CITATION Mar11 \l 1038 ]. A Tau glikozilációja során oligoszacharidok kötődnek a fehérje oldalláncjaihoz. A kötődésnek megfelelően N- és O-glikozilációt különböztetnek meg. Előbbi esetben a fehérje aszparagin oldalláncainak nitrogénjéhez, utóbbi esetben szerin vagy threonin oldalláncok hidroxil csoportjához kötődik a cukor. Az abnormális glikoziláció fokozhatja a Tau foszforilációt, és így a neurodegenerációt [ CITATION Liu02 \l 1038 ], de rávilágítottak

már a folyamat fehérjeaggregációt lassító szerepére is [ CITATION Yuz14 \l 1038 ]. Összefüggés lehet a Tau oxidáció és a páros helikális filamentumok létrejötte között [ CITATION Zha13 \l 1038 ]. Oxidatív stresszben a fehérjén belüli diszulfidhidak jöhetnek létre és ez filamentum képződést okoz [ CITATION Sch95 \l 1038 ]. Ugyanakkor humán Tau P301L mutáns egerekben (ahol olyan fehérjét fejeztettek ki, melyen a 301-es pozícióban lévő prolin leucinra cserélték) károsodást fedeztek fel a mitokondriális elektron-transzportláncban és emelkedett superoxid-anion és peroxid koncentrációt tapasztaltak, így valószínűsíthető, hogy a patológiás Tau károsítja a mitokondriumokat és ez vezet oxidatív stresszhez. [ CITATION Dav05 \l 1038 ]. További poszt-transzlációs módosítások, mint calpain és a kaszpáz-3 enzimek hasítása [ CITATION Fer11 \l 1038 ], a nitráció [ CITATION Zha05 \l 1038 ] vagy glikáció [ CITATION LiX12 \l 1038 ] serkentő hatással vannak a filamentumok képzésére. Vélhetően ezek a folyamatok együttesen, és egymásra hatva járulnak hozzá a patológiás állapot kialakulásához, viszont ezek az interakciók még mindig elég rosszul feltérképezettek.

Mutációk a MAPT génben szintén kedvezhetnek a neurodegenerációs folyamatoknak [ CITATION Alo04 \l 1038 ]. Ezeket a mutációkat összefoglalva 17. kromoszómához kötött, parkinson-szerű frontotempoláris demenciáknak (Frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17, FTDP-17) nevezik. Két típusba sorolhatók az FTDP-17-et okozó mutációk attól függően, hogy pre-mRNS vagy fehérje szintjén fejtik ki hatásukat. A pre-mRNS alternatív splicingjának megváltoztatása hatással van a fiziológiás 3R-4R izoformák arányára, aminek felborulása okozhatja a neurodegeneráció kialakulását [ CITATION Goe05 \l 1038 ]. Egyes mutációk elősegíthetik, jelentősen felgyorsíthatják az aggregálódási folyamatot. Ilyen a már említett Tau(P301L) jelű aminosavcserés mutáció.

Mindezek alapján látható, hogy a Tau-indukált neurodegeneráció igen összetett folyamat. Számos hozzájáruló eseményről számoltak be és bár nagy mennyiségű tudás áll rendelkezésünkre, mégis sok kérdés nyitva maradt a Tau aggregációjának tekintetében.

## **1.1.2. A Tau mint terápiás célpont**

Az egyre növekvő ismereteink a Tau fehérje neurodegeneratív betegségekben való szerepéről egy új lehetőséget kínálnak a gyógyszerkutatás terén. A toxikus és funkcióvesztéses Tau változatok képződését gátló, és a fehérje normál funkcióját megőrző hatékony terápiás szerek kifejlesztésével kezelhetővé, vagy akár gyógyíthatóvá válhatnak a taupátiák, köztük az



Alzheimer-kór is. Az Alzheimer-kórral kapcsolatos vizsgálatok az elmúlt két évtizedben az amiloid- $\beta$  elméleten alapulva folytak. A tervezett vegyületek kitűzött céljai az APP termelés befolyásolása, amiloid- $\beta$  aggregáció gátlása illetve annak eltávolítása voltak. Azonban ezek a kutatások nem hoztak áttörő sikert a gyógyászat terén [ CITATION Wis14 \l 1038 ].

A Tau befolyásolására több lehetőség áll rendelkezésre. Mivel a fehérje hiperfoszforilációja valószínűsíthetően közrejátszik a kórképek kialakulásával, praktikusnak tűnhet a foszforiláció gátlása. Ez Tau kinázok gátlásával vagy foszfatázok aktiválásával is megvalósítható. Ámde ezen enzimeknek a Taun kívül más szubsztrátjai is lehetnek, így hatékony, specifikus és biztonságos gyógyszerek felfedezése nehéz feladat [ CITATION Spi13 \l 1038 ], habár lítium sókkal való GSK3B gátló kezelés esetében számoltak be pozitív eredményekről [ CITATION For11 \l 1038 ].

A gyógyhatású vegyületek ezen kívül célozhatják közvetlenül magát a Taut is. Kötődve a fehérjéhez, stabilizálják annak szerkezetét, gátolva ezáltal azaggregációt.

## ***1.2. A *Drosophila melanogaster****

Az ecetmuslicát (*Drosophila melanogaster*) már több mint egy évszázada alkalmazzák biológiai kutatásokban. Kis helyigényének köszönhetően egy laborban több száz vonal eltartható, valamint fenntartása olcsó, és nem igényel különleges bánásmódot. Fontos előnye, jól feltérképezett genetikája, anatómiája és egyedfejlődése. A muslica négy kromoszómán körülbelül 13600 gént hordoz. Ezen gének nagy része homológ emberi génekkel, így humán vonatkozású kísérletek végezhetőek a muslicákon. Génjeik manipulációja a rendelkezésünkre álló technikákkal könnyen végezhető és jól látható markerek segítségével a vizsgált transz gének egyszerűen nyomon követhetőek a leszármazott vonalakon [ CITATION Hir10 \l 1038 ].

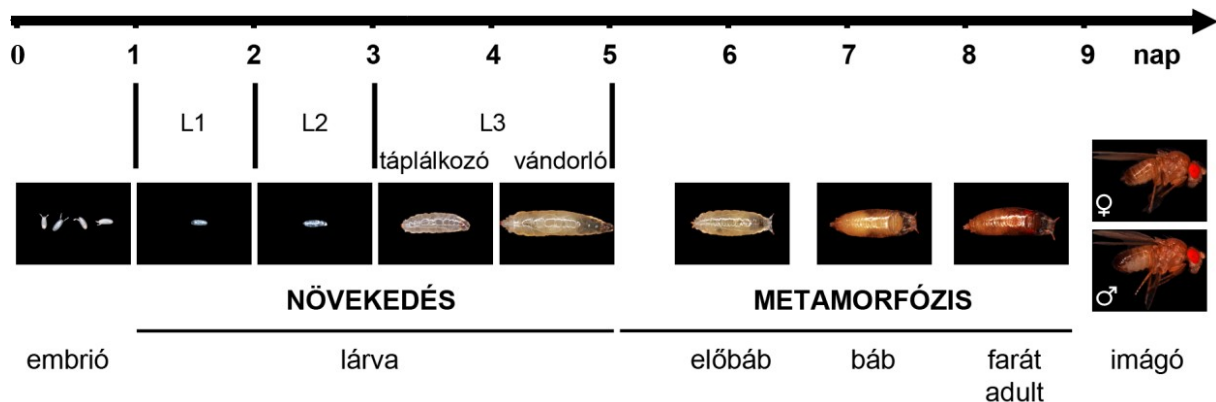
A *Drosophila* három pár autoszomális és egy pár ivari kromoszómával rendelkezik. Az ivari kromoszómák közül az X mindkét nemből, az Y csak hímelekben fordul elő, azonban ivaruk csak az X kromoszóma mennyiségétől függ. Ennek megfelelően a nőstények XX, a hímelek XY kromoszómákkal rendelkeznek, de X0 genotípusú egyedek is hímelek lesznek, ezek azonban nem fertilisek.

A muslicákban található úgynevezett balanszer-kromoszómák. Ezek a kromoszómákon inverziók és transzlokációk találhatóak, melyek jelenősége, hogy csökkentik a crossing over gyakoriságát. Ha mégis megtörténne az átkereszteződés, a létrejött egyedek életképtelenek

lesznek. Így tiszta genetikai vonalak tarthatók fenn és – mivel az életműködésükhöz szükséges géneket megtaláljuk ezeken a balanszereken – a letális mutációk is fenntarthatóak velük heterozigóta formában. Fontos ismerterőjegye a balanszereknek, hogy könnyen azonosítható domináns markerek is találhatóak rajtuk, amelyek a genotípus meghatározásban jelentős szerepet játszanak.

A markerek makroszkópikus elváltozást okoznak a muslicákban, amelyekkel a muslicákban lévő mutációk jelenlétét vagy hiányát ellenőrzik. A legyek több szerveének mutációja felhasználható erre a célra, köztük a szem alakja és színe, a test alakja és színe, a szárny alakja vagy testen lévő szőrök hossza és száma.

A *Drosophila melanogaster* teljes átalakulással fejlődik. A petékből egy nap elteltével kikel a lárva, mely állapot négy napig tart, és három stádiumra osztható a lárva vedléseinek megfelelően, (jelölésük L1, L2 és L3). Az L3 stádium végén az állat bebábozódik és négy nap elteltével kikel az imágó (3. ábra).

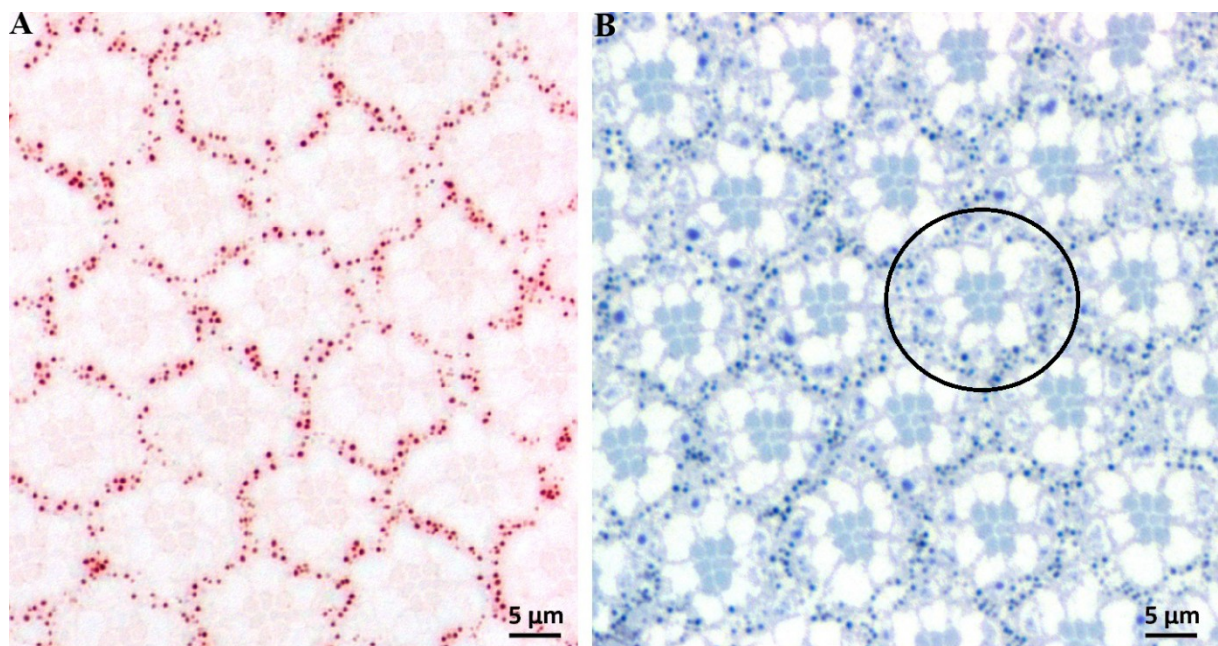


**3. ábra** A *Drosophila* egyedfejlődése. Az ecetmuslica a petéből való kikelés követően négy napig lárva állapotban van. Lárva állapotban három stádiumot különböztetünk meg (L1, L2, L3). Az L3 stádium végén az állat bebábozódik, és négy nap után kel ki az imágó. (Nagy Péter ábrája nyomán)

Kísérleteink egy részét a *Drosophila* összetett szemén végeztük, mely mai ismereteink szerint egy kép- és alaklátásra is képes szerv. Felépítő egységei az ommatidiumok. Az ommatidiumokban – többek között – található nyolc fotoreceptor sejt, azonban keresztmetszeti képen mindig csak hét látható, mert a hetedik és nyolcadik sejtek kisebbek, egymás alatt helyezkednek el. A hat nagyobb fotoreceptor sejt a fényérzékenységet biztosítja, az maradék kettő az színlátásban és látásélességben játszik szerepet. A fotoreceptor sejtekben található a rodopszin tartalmú rhabdomerek, melyeknek az ingerület átvitele a feladatuk (4. ábra) [ CITATION Lör15 \l 1038 ]. Egy ommatidiumot szigetelő pigmentsejtek vesznek körül,

melyek megakadályozzák, hogy a nem megfelelő szögben érkező fény eljusson a fényérzékeny receptorsejtekig. Ezek a pigmentek vad-típusú állatokban piros színűek, ezek adják a szem színét.

A *Drosophila*val való kísérletezéshez sok géntechnológiai eszköz áll a kutatók rendelkezésére. Transzgenikus állatok létrehozására használják például a P-elemnek nevezett transzpozon (5. ábra). Ez egy mobilis genetikai elem, melyen két fordított ismétlődés, úgynevezett inverted repeat (IR) közrefogja a transzpozáz enzim génjét. Az enzim felelős az elem mobilitásáért, az IR szekvenciákat felismerve képes beépülni a genomba, vagy kivágni abból. A transzpozáz más génre kicserélésével lehetőség nyílik transzgenek bevitele a muslicákba. A módosított P-elem transzpozáz hiányában nem képes beépülni a genomba. Ha ez a P-elem egy másik mozgásra képtelen, ám transzpozáz kifejező elemmel egyszerre van jelen, akkor be tud épülni a transzgen a genomba.

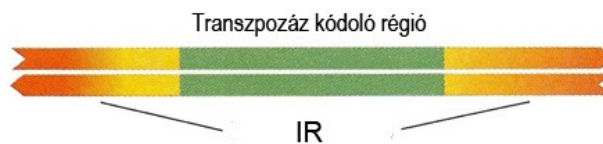


**4. ábra** A vad-típusú *Drosophila* szem félvékony metszetei festetlenül (A) és toluidinkékkel festve (B). Az ommatidiumok jól elkülöníthetően, rendezett mintázatban helyezkednek el egymás mellett (kör jelzi egy ommatidium határát). A külső részükön piros színű pigmentek találhatóak, melyek, kékre festődnek toluidinkék hatására. Beljebb a fotoreceptor sejtek találhatóak, melyekben toluidinkék festéssel jobban láthatóvá válnak a rhabdomerek (Lőrincz és mtsai nyomán) [ CITATION Lőr15 \l 1038 ].

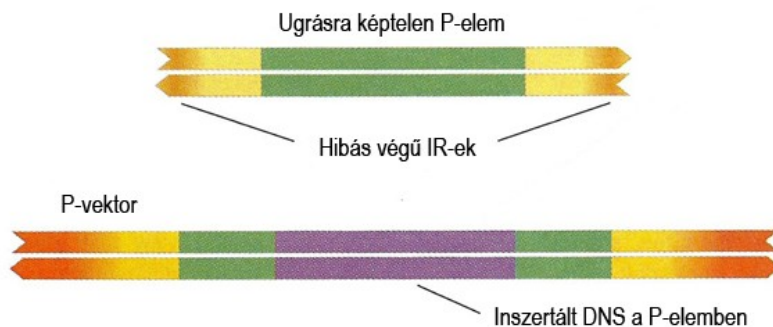
Egy másik gyakran használt genetikai eszköz az élesztő eredetű UAS-Gal4 rendszer (6. ábra). A Gal4 (galaktóz-reszponzív transzkripciós faktor GAL4) fehérje az UAS (upstream aktiváló szekvencia) szekvenciához kötve elindítja a mögötte lévő gén átírását. A Gal4 gén elé

tetszőleges promóter helyezhető, amellyel elérhető a Gal4 fehérje szövetspecifikus kifejezése [ CITATION Gis12 \l 1038 ]. Az UAS mögé pedig tetszőleges gént illeszthetünk. Az UAS szekvenciáról azonban Gal4 jelenléte nélkül nem készül termék. A rendszer nagy előnye, hogy – mivel élesztő specifikus – a muslicában nem zavar meg semmilyen folyamatot. Másik fontos tulajdonsága, hogy a kétlépcsős expresszió révén számtalan kombinációs lehetőség áll rendelkezésünkre (bármilyen UAS vonalat kombinálhatunk bármilyen Gal4 promóterrel). A Gal4 és az UAS szekvencia külön törzsekben is fenntartható, ekkor mivel – a rendszernek csak egyik résztvevője van jelen a genomban – nem termelődik transzgén. Ennek köszönhetően akár olyan gének is klónozhatók az UAS szekvencia mögé, amelyek kifejeződve jelentős károsodásokat okoznak a Drosophilákban. A két törzs keresztezésével azonban létrehozható a transzgént kifejező vonal. Mi vizsgálatainkban dopaminerg neuronokra (TH-Gal4, tirozin-hidroxiláz-Gal4), és motoneuronokra specifikus (OK6-Gal4) promótert alkalmaztunk.

#### Teljes P-elem



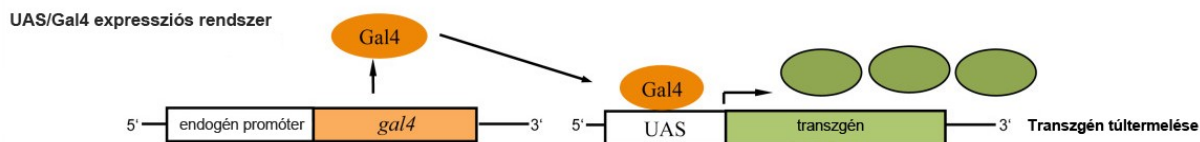
#### Génbevitel a P-elemmel



**5. ábra** A P-elem szerkezete. A transzpozáz gént közrefogja két fordított ismétlődés (IR), amelyeket a gén terméke képes felismerni, és kivágódni vagy beilleszkedi az IR-ek közé.

Génbevitelkor a transzpozáz helyére transzgént helyezve, és mobilitásra képtelen, de transzpozázot tartalmazó P-elemmel való együttes bejuttatással létrehozhatók transzgénikus állatok. [Az ábrát, internetes forrása alapján (<http://www.discoveryandinnovation.com/>)

Kárpáti Manuéla készítette)



**6. ábra** A UAS-Gal4 rendszer működése. Egy tetszőleges endogén promóter mögé helyezett Gal4 gén fehérjeterméke az UAS szekvenciához kötődve képes beindítani az attól downstream lévő gén transzkripcióját (Prüßing és mtsai nyomán) [ CITATION Prü13 \l 1038 ]

## 1.2.1. A Drosophila és a neurodegeneratív betegségek

Humán neurodegeneratív betegségek modellezése az ecetmuslicában első hallásra merész elképzelésnek tűnhet. A muslicában több, a demenciákkal összefüggésbe hozható gén homológja megtalálható, köztük a Tau-nak megfelelő is (dTau). A dTau a humán Tauval ellentétben öt mikrotubulus-kötőhellyel rendelkezik, és hiányzik belőle a 29 aminosav hosszú N-terminális szakasz. A két Tau azonos helyre köt a mikrotubulusokon, bár a hTau kötődése elég gyenge és leginkább a citoplazmában szabad szolubilis foszforilált formában van jelen [ CITATION Feu10 \l 1038 ]. A homozigóta dTau null-mutáns muslicák életképesek és nem mutatnak morfológiai vagy viselkedésbeli elváltozást [ CITATION Doe03 \l 1038 ]. Ennek oka valószínűleg más mikrotubulus-kötő fehérjékkel való redundancia, mint a Futsch, amely a humán MAP1B (Mikrotubulus-asszociált fehérje 1B) Drosophila homológja [ CITATION Gis12 \l 1038 ]. Habár dTauval is folynak vizsgálatok, gyakoribb, hogy a kutatások során a humán Tau fehérjét kifejező transzgenikus muslicákat használnak. Érdekes módon az így kifejeztetett humán fehérje képes az aggregációra és a taupátiákhoz nagyon hasonló tünetegyüttest alakít ki a muslicákban [ CITATION Che07 \l 1038 ].

A Drosophila idegrendszere elég fejlett ahhoz, hogy kognitív és motoros funkciókat, tanulási képességeket, illetve viselkedési mintázatokat vizsgálhassunk rajtuk [ CITATION Hir10 \l 1038 \m Prü13]. A Tau túltermelésével, hasonlóan a humán tünetekhez, ezekben a jellemzőkben romlás észlelhető. Mudher és mtsai kísérletében a 0N3R hTau izoformát motoneuronokban expresszáló lárvák jelentősen hosszabb idő alatt tették meg ugyanazt a távolságot a kontroll állatokhoz képest [ CITATION Mud04 \l 1038 ]. Mershin és mtsai gombatest neuronokban fejeztették ki a hTau-t és az állatok tanulási képessége és a memóriája jelentősen romlott [ CITATION Mer15 \l 1038 ].

Legalább 37 Tau transzgén létezik [ CITATION Gis12 \l 1038 ]. Ezek között található humán, Drosophila és szarvasmarha eredetű [ CITATION Ito97 \l 1038 ], melyekkel

létrehoztak vad-típusú és mutáns *Drosophila* Tau modelleket. Leggyakrabban UAS promóter mögé illesztik a Tau gént, de van példa más promóterek, például szemspecifikus GMR driver mögé klónozásra is.

## 2. Célkitűzések

Első lépésben könnyen vizsgálható, egyszerű és szemléletes *Drosophila* neurodegeneratív-betegség modell rendszert szerettünk volna létrehozni. Ehhez különböző sejttípusokban humán Tau fehérjét fejeztettünk ki az állatokban. A modellek felállítása és tesztelése után szerettük volna a csoportunk által létrehozott kismolekulájú vegyületekkel (582140, 582451) kezelni az állatokat és bemutatni, hogy az alkalmazott kezelések javítanak-e a muslicák életminőségén.

## 3. Anyagok és módszerek

### 3.1. Alkalmazott *Drosophila* törzsek és fenntartásuk

A törzseket 25 °C-on, 60%-os páratartalom mellett vattadugóval lezárt csövekben, élesztőt, agart és kukoricalisztet tartalmazó táptalajon tartottuk 12-12 órás világos és sötét periódusok váltakozásával.

A táptalaj elkészítése: mérlegen kimértünk 16 g agar port és 150 g szárazkeveréket, ami 480 g kukoricalisztet, 234 g glükózt és 4 g CaCl<sub>2</sub>-ot tartalmazott. Erre ráöntöttünk 3 dl vizet, csomómentesre kevertük és állni hagytuk fél órát. Az idő letelte után 39 g élesztőt adtunk a keverékhez és ismét csomómentesre kevertük. Ezután kiegészítettük 1,5 l-re forrásban lévő víz hozzáöntésével, közben keverve, ügyelve arra, hogy csomómentes legyen. Ezután ismét felforraltuk a keveréket, majd hagytuk 60 °C-ra lehűlni, időnként megkeverve. Utána 15 ml nipagint és 2,55 ml fenil-fenolt adtunk hozzá, majd alaposan elkevertük és üvegcsövekbe öntöttük. Az mászóteszthez és szem fenotípus vizsgálatához szükséges táptalajokhoz az öntéssel egyidejűleg hozzáadtuk az alkoholt és a vegyületeket.

Alkalmazott törzsek: A vonalak a Bloomington *Drosophila* Stock Centerből (BDRC) származnak, kivéve az OK6-Gal4 törzst, amelyet Stephan Sirgist, a Berlieni Szabadegyetem

munkatársa bocsátott rendelkezésünkre. *Canton S*-t (BDRC Azonosító: 1) vad-típusú kontrollként alkalmaztuk, *UAS-hTau62* (továbbiakban Tau62, BDRC azonosító: 51362)-t és *UAS-hTau63* (továbbiakban Tau63, BDRC azonosító: 51363)-t Tau overexpresszióra használtuk az élethossz és mászóteszt kísérletekben. Az *UAS-hTau62* a második, az *UAS-hTau63* törzs a harmadik kromoszómán hordozza a humán 2N4R Tau izoformát teljes hosszúságában. *GMR-hTau<sup>P301L</sup>* (továbbiakban Tau<sup>P301L</sup>, BDRC azonosító: 51377) a mutáns P301L Tau gén hordozza, szem specifikus GMR (glass multiple reporter) driverrel meghajtva. Ezt a törzset szem fenotípus vizsgálatokhoz használtuk. *TH-Gal4* (BDRC azonosító: 8848) dopaminerg neuron specifikus drivert alkalmaztunk az élethossz vizsgálatokhoz, *OK6-Gal4* motoneuron specifikus drivert a mászótesztekhez.

## **3.2. Alkalmazott vegyületek**

A mászótesztekben és a szem fenotípus kísérletben a kutatócsoportunk által kifejlesztett, kismolekulájú Tau aggregációt gátló vegyületeket alkalmaztunk, melyek kódjai 582140 és 582451. A molekulák a Tau fehérjéhez kötődnek és stabilizálják annak szerkezetét. A vegyületekből először 9 mM töménységű etanosos törzsoldatot készítettünk, melyeket a kísérleteknél megadott koncentrációban hígítottuk. A kísérletekben a kontroll csoportokhoz azonos térfogatú alkohol oldatot mértünk.

## **3.3. Élethossz vizsgálat**

Parkinson-kórban a dopaminerg neuronok pusztulása figyelhető meg, így a dopaminerg idegsejtekre specifikus TH-Gal4 drivert hordozó törzzsel kereszteztünk Canton S, Tau62 és Tau63 muslicákat. A keresztezések: TH-Gal4 hím x Canton S nőstény, Canton S hím x Tau62 nőstény, TH-Gal4 hím x Tau62 nőstény, Canton S hím x Tau63 nőstény, TH-Gal4 hím x Tau63 nőstény. A keresztezésből származó hímeket normál táptalajon tartottuk és kétnaponta megszámloltuk az élő muslicák számát. Az adatok elemzéséhez Kaplan-Meier-féle túlélési analízist alkalmaztunk.

## **3.4. Lárva mászótesztek**

A mászótesztekhez motoneuron specifikus OK6-Gal4 drivert hordozó hímeket kereszteztünk Canton S, Tau62 és Tau63 nőstényekkel. A keresztezéseket fél napig petéztettük vegyületet tartalmazó táptalajra. Ezeket a csöveket az alábbi módon készítettük: 2 ml táphoz azonos térfogatban kevertünk alkoholt, 582140-et vagy 582451-et. A vegyületeket a törzsoldatból százszorosukra hígítottuk, így a végkoncentrációja a csövekben 90  $\mu$ M volt.. Fél nap eltelte után a szülőket eltávolítottuk a csövekből. Három nap múlva L3 stádiumú lárvákat egy brómfenolkékkel festett, 3% agart tartalmazó lemezre helyeztük, amelyet egy 5x5 mm-es négyzetrácsos lapra tettünk, hogy mérhető legyen a megtett távolság (7. ábra). Ötös csoportokban 3x1 percig másztattuk a lárvákat, genotípusonként összesen tizenötöt. A mászást Samsung ST500 digitális kamerával rögzítettük.



Az adatokat SPSS Statistics programmal dolgoztuk fel. Az adatok normalitását vizsgáltuk Kolmogorov-Smirnov és Shapiro-Wilk teszttel, valamint normális eloszlás esetén Student-féle t-próbával hasonlítottuk össze a csoportokat, nem normális eloszlás esetén Mann-Whitney u-próbát alkalmaztunk. Szignifikancia szint:  $p < 0,05$ .



**7. ábra** A lárva mászoteszt kivitelezésére alkalmazott eszköz. Egy Petri csészébe brómfenolkékkel festett 3%-os agar oldatot öntöttünk és hagytuk megszilárdulni. A lárvékat ötös csoportokban a lemez közepére helyeztük és egy percig mászattuk őket.

### **3.5. Szem fenotípus vizsgálat**

A szem specifikus GMR driver mögött lévő P301L mutáns Tau transzgén úgynevezett rough eye fenotípust eredményez a muslicákban. Ezt kihasználva szem fenotípus vizsgálatot végeztünk Tau<sup>P301L</sup> állatokon. A muslicák táptalajához azonos térfogatban alkoholt, 582140 vagy 582451 vegyületet adtunk. A táptalajokban a vegyületek koncentrációja 90  $\mu\text{M}$  volt. Az adult legyek bábból való kikelése után megvizsgáltuk, hogy a vegyületes kezelés hatására visszanyerték-e a muslicák legalább részben a vad-típusú szem fenotípust. A legyek fejét beágyaztuk és félvékony metszeteket készítettünk belőlük, amelyeket toluidinkékkel festettünk, majd fénymikroszkópos módszerrel elemeztük az ommatidiumokban található rhabdomereket.

A beágyazás mente: A szem szerkezetének vizsgálata céljából a legyek fejét beágyasztuk. A fixálást 80% etanolt, 4% formaldehidet, 5% ecetsavat és 1% glutáraldehidet tartalmazó oldatot használtunk. Ezt egy felszálló alkoholsorral végzett víztelenítő lépés követte, amely abszolút etanollal végződött. Ezt követően az oldatot alkohol és xylol 1:1 arányú keverékére cseréltük. Az alkohol-xylol keveréket eltávolítottuk, és xylol és paraplaszt 1:1 arányú keverékét adtuk hozzá, majd egy éjszakán át 42°C-on inkubáltuk kevertetéssel, majd tiszta paraplasztba helyeztük a mintákat és 56°C-on tartottuk őket. A paraplasztot egyszer lecseréltük a nap folyamán. Másnap jeges fürdőben lehűtöttük a mintákat. A következő lépésben félvékony metszeteket készítettünk Reichert-Jung Ultracut E típusú ultramikrotómmal. A mintákat AxioCam ICc1 kamerával felszerelt Zeiss Axio Imager Z1 típusú mikroszkóppal vizsgáltuk.

A vegyületek hatásosságának vizsgálatára összehasonlítottuk az ommatidiumokban a rhabdomerek mennyiségét a kezelt és kezeletlen legyek között. Az adatok kiértékelésére Mann-Whitney u-próbát alkalmaztunk, szignifikancia szint:  $p < 0,05$ .

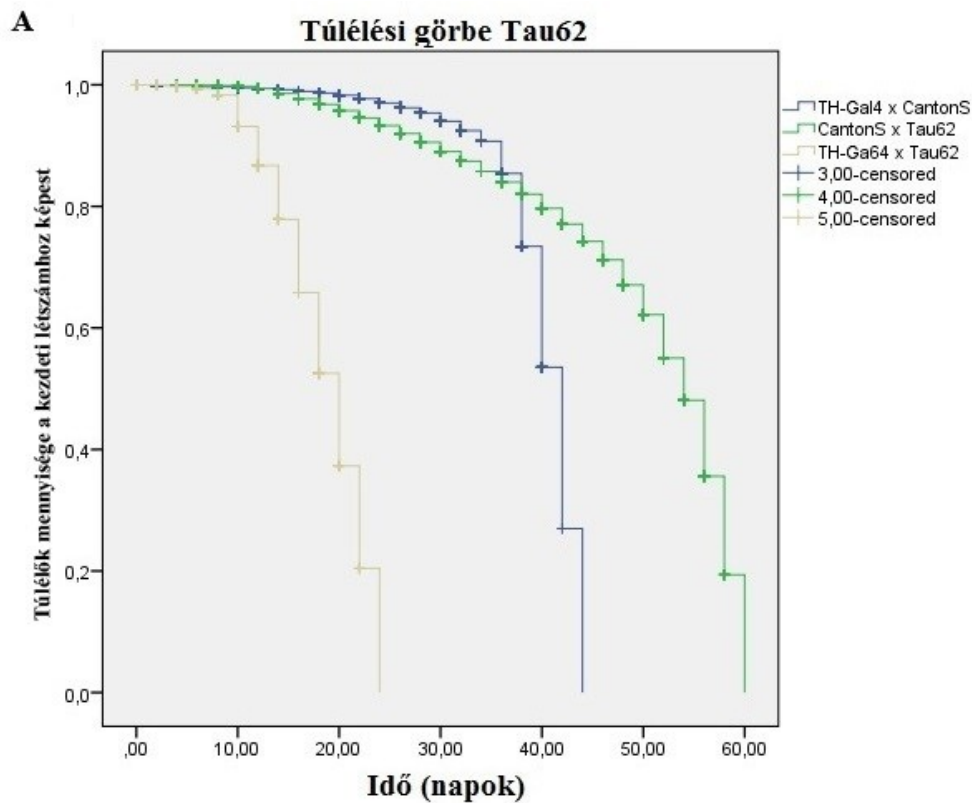
## 4. Eredmények

Vizsgálataink célja egy megbízható *Drosophila* neurodegeneratív modell rendszer létrehozása volt, amelyeket élethossz vizsgálattal, lárva mászóteszttel és szem fenotípus vizsgálattal teszteltük.

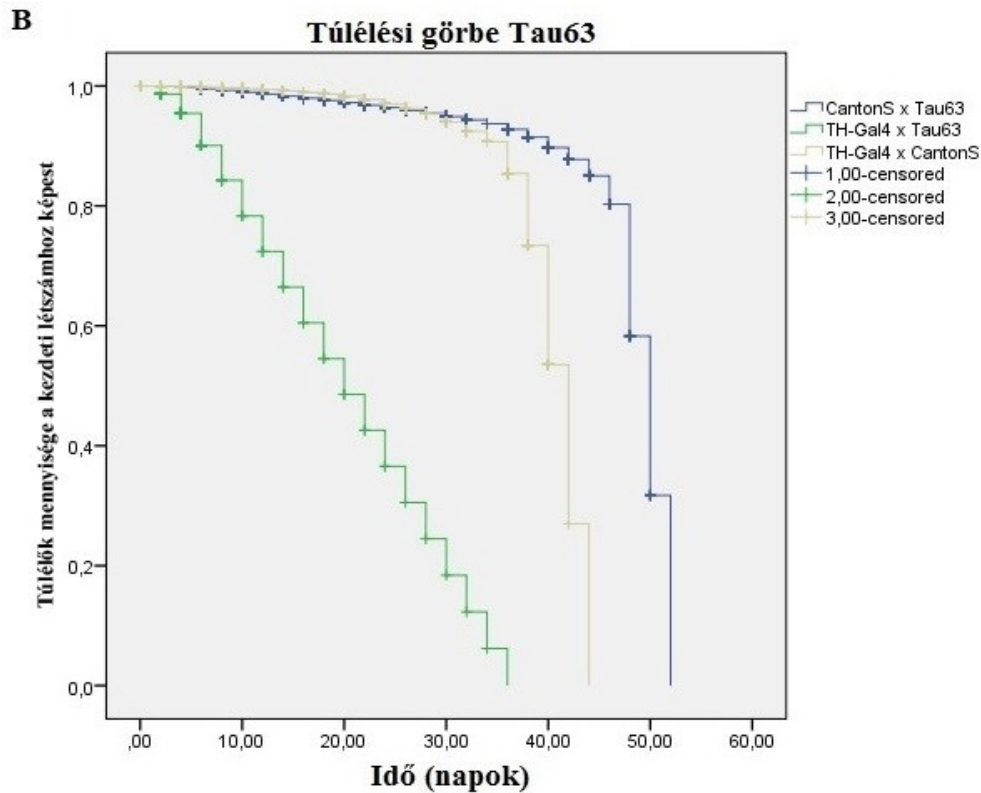
### 4.1. Élethosszvizsgálat

Mivel a Parkinson-kór velejárója a dopaminerg neuronok pusztulása, a TH-Gal4 driver segítségével a *Drosophilák* dopaminerg neuronjaiban kifejeztettük a teljes hosszúságú humán 2N4R Tau izoformát. Az Anyagok és Módszerek című fejezetben leírt módon a dopaminerg driver mellé kétféle UAS-Tau transzgént kereszteztünk, a Tau62 és Tau63 jelűt. Több mint 60 napig vizsgáltuk az állatok életképességeit. (8-9. ábra) Eredményeink alapján megállapítható, hogy a TH-Gal4xTau62 és a TH-Gal4xTau63 genotípusú egyedek élethossza szignifikánsan ( $p < 0,00000$ ) lerövidült a két kontrollhoz képest. A TH-Gal4 drivert kifejező kontroll nagyobb halandóságot mutatott, így elmondhatjuk, hogy a TH-Gal4 önmagában is valamennyire negatív befolyással van az élethosszra. A túlélési adatok felhasználásával Kaplan-Meier élethosszgörbéket készítettük, ezt a 8. és 9. ábrán ábrázoltuk. A Tau fehérjét kifejező törzsek

élethosszcsökkenését vélhetően a Tau aggregálódás okozta idegsejtkárosodás vagy pusztulás okozta. Érdekes, hogy a Tau62-t kifejező állatok esetén az idő előrehaladtával nőtt a halálozási események száma, ami esetleg a neurodegeneratív folyamat progressziójával magyarázható, azonban a Tau63-t kifejező muslicákban ez nem figyelhető meg. A különbség továbbá a különböző kromoszómákon való elhelyezkedésnek is tulajdonítható.



**8. ábra** A Canton S, TH-Gal4 és Tau62 keresztezések élethosszgörbéi. A vízszintes tengelyen a vizsgálat kezdőpontjától számított napok láthatók, a függőleges tengely a muslicák kezdeti mennyiségéhez viszonyított aktuális életben lévő legyek arányát mutatja. A Tau transzgént kifejező állatok esetében szignifikáns csökkenés volt tapasztalható az életidőben. ( $p < 0,00000$ )



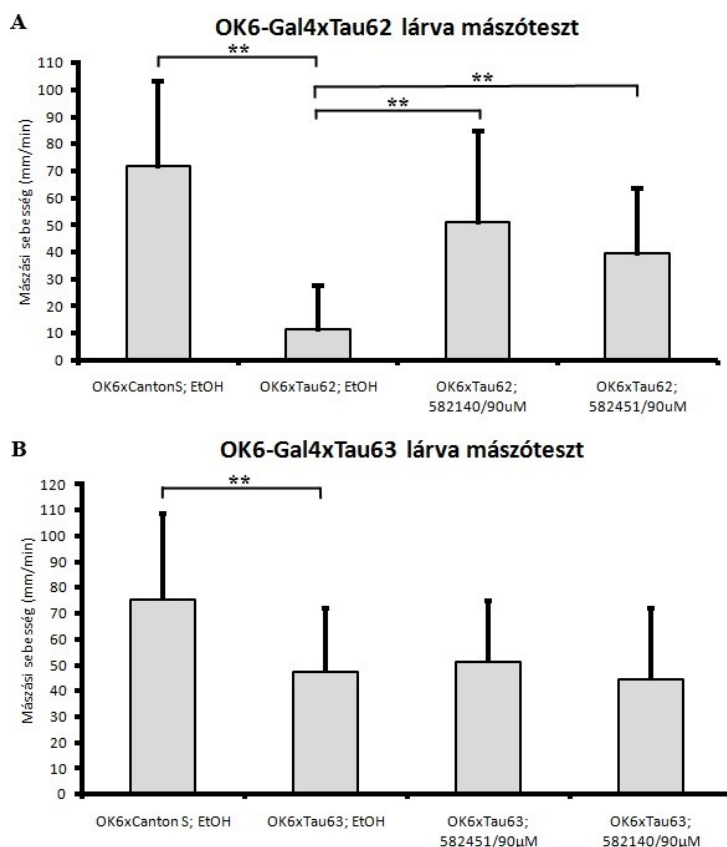
**9. ábra** A Canton S, TH-Gal4 és Tau63 keresztezések élethosszgörbéi.. A vízszintes tengelyen a vizsgálat kezdőpontjától számított napok láthatók, a függőleges tengely a muslicák kezdeti mennyiségéhez viszonyított aktuális életben lévő legyek arányát mutatja. A Tau63 transzgén kifejező állatok szintén szignifikáns csökkenést mutattak a kontrollhoz képest ( $p < 0,00000$ )

## 4.2. A motoneuronjaikban Tau fehérjét kifejező lárvák vizsgálata

A Tau fehérje motoneuronokban való túltermelésével a motoros funkciók romlását modelleztük, mivel a neurodegeneratív betegségek másik jellemző tünete a finommechanikus mozgások romlása, kézremegés, súlyosabb esetben akár akaratlan mozgások vagy teljes mozgásképtelenség megjelenése. Ezért a rendelkezésünkre álló Tau62 és Tau63 transz géneket a motoneuronokban kifejező OK6-Gal4 törzssel kereszteztük. Az Anyagok és módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően az L3 stádiumú lárvákon mászótesztet végeztünk. A lárvákat egy brómfenolkékkel festett agarlemezre helyeztünk és mértük mekkora távolságot tesznek meg egy perc alatt. Szignifikáns különbséget tapasztaltunk mind az OK6-Gal4xTau62 ( $p < 0,00007$ ) és az OK6-Gal4xTau63 ( $p < 0,00002$ ) állatok esetén a lárvák mászási sebességében a kontrollhoz képest (10. ábra)

## 4.2.1. A vegyületekkel való kezelés hatásai a motoros funkciókra

Az előző bekezdésben leírt lárvákat 90  $\mu\text{M}$  582140 vagy 90  $\mu\text{M}$  582451 koncentrációjú vegyületet tartalmazó táptalajon tartottuk. Az OK6-Gal4xTau62 muslicák esetében mindkét vegyülettel való kezelés hatására szignifikáns javulás volt tapasztalható (582140:  $p < 0,006$ , 582451:  $p < 0,003$ ), a kísérlet többszöri megismétlésére is. Ebben az esetben az állatok motoros képességei javultak, az egy perces időtartam alatt sok esetben a vad-típusú kontrollokéval megegyező motilitást tapasztaltunk. Ezt a javulást az OK6-Gal4xTau63 legyek esetében nem tapasztaltuk, de ennek oka lehet az is, hogy ezt a kísérletet eddig egyetlen alkalommal végeztük el. A két Tau törzssel végzett lárvák mászótesztjeinek eredményei az 10. ábrán és ábrán láthatóak.

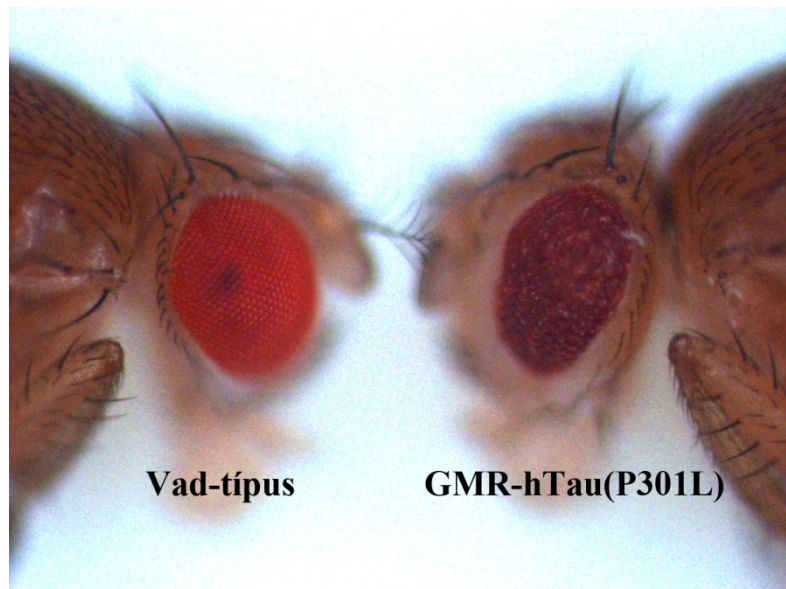


**10. ábra** Az OK6-Gal4-gyel keresztezett Tau62/Tau63 lárvák mászótesztjeinek eredményei. Az OK6-Gal4xTau62 lárvák szignifikáns eltérést mutattak a kontroll állatokhoz képest ( $p < 0,00007$ ). A vegyületes kezelések hatására szignifikáns javulás volt tapasztalható a motoros funkciókban (582140:  $p < 0,006$ , 582451:  $p < 0,003$ ) (A). OK6-Gal4xTau63 lárvák szignifikáns romlást mutattak a kontroll állatokhoz képest a motoros funkciókban ( $p < 0,00002$ ). Ez esetben a vegyületes kezelések hatására nem volt tapasztalható javulás (B).

### 4.3. Szem fenotípus vizsgálat

A humán Tau fehérje P301L formáját kifejeztettük a muslicákban szemspecifikus GMR driver segítségével.

A GMR-Tau<sup>P301L</sup> állatokban megjelent a durva felszínű szem, azaz a rough eye fenotípus, ami a Tau aggregáció miatt károsító hatásokkal magyarázható. Ezt irodalmi adatok is alátámasztják: a muslica szeme gyakori modellje a fehérjeaggregációk vizsgálatának. A rough eye fenotípus a gyakorlatban azt jelenti, hogy a vad-típusú muslicákkal összehasonlítva a szemük sötétebb lett, durva felszínű a facetták szabályos elrendeződése megszűnt (11. ábra).

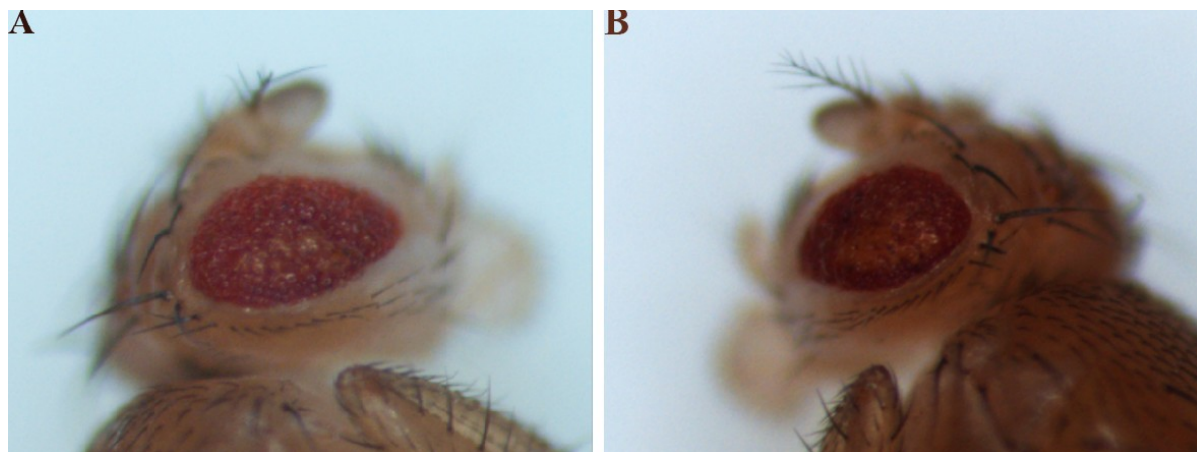


**11. ábra** Vad-típusú és mutáns szem fenotípusok. A vad-típusú Canton S törzs szemén a facetták egy rendezett mintázatot mutatnak, az állatoknak úgynevezett vadpiros szemszínük van (bal oldal). A hTau<sup>P301L</sup> kifejeződés a szemben rendezetlenséget vált ki, sötétebb színű, durva felszínű rough eye fenotípust eredményezve (jobb oldal)

#### 4.3.1. A kezelések hatásai a szem fenotípusra

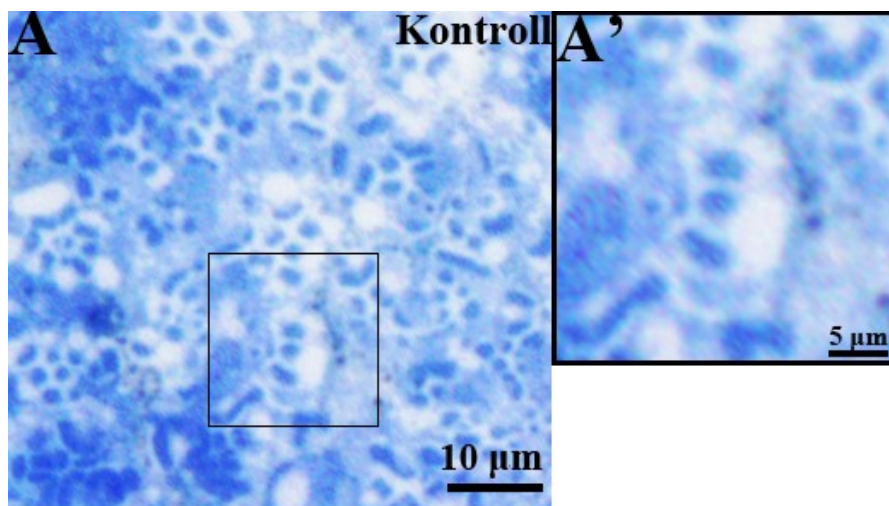
A vegyületes kezelés a szem fenotípusban nem okozott makroszkópikus változást (12. ábra). Ennek oka valószínűleg a túl agresszív behatás, hiszen a Tau P301L mutáns formája különösen hajlamosítja a fehérjét az aggregációra. Ennek következtében a vegyületek valószínűleg nem tudták a teljes aggregációt megszüntetni, így a rough eye fenotípus kialakult.





**12. ábra** A Tau<sup>P301L</sup>-et szemben kifejező muslicák nem mutattak makroszkópiusan észlelhető változást a fenotípusban sem 90 µM 582140-nel (A), sem 90 µM 582451-gyel (B) való kezelés hatására.

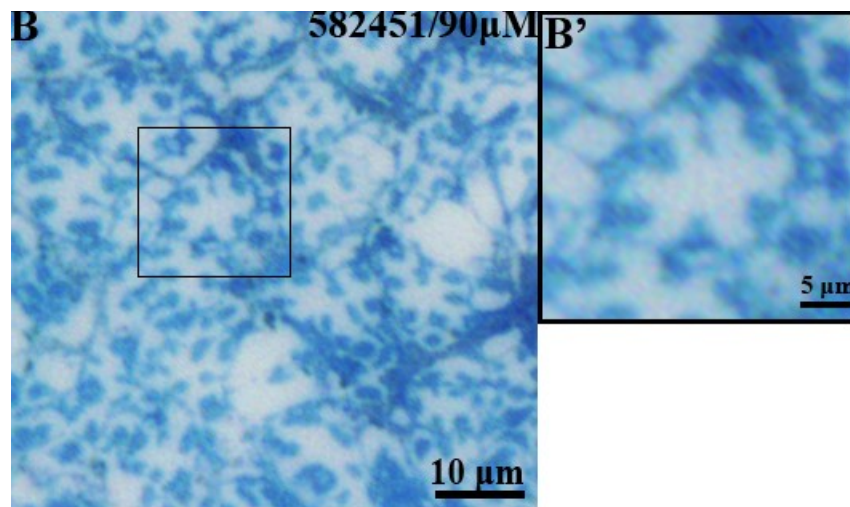
Kíváncsiak voltunk azonban, hogy a szem belső, mikroszkopikus szerkezetére milyen hatással voltak a vegyületek. Félvékony metszeteket készítettünk a szemekről, hogy meggyőződjünk, arról, hogy az ommatidiumokban tapasztalható-e javulás. A metszeteket megfestettük toluidinkékkel és fénymikroszkóppal vizsgáltuk meg a mintákat. Először a kontroll mutáns állatokat vizsgáltuk. Szemükben az ommatidiumokban nagymértékű károsodás volt észlelhető. Alakjuk és eloszlásuk szabálytalan volt és sok esetben összenőttek (13. ábra).



**13. ábra** Toulidinkékkel festett félvékony metszet Tau<sup>P301L</sup> expresszáló muslicák szeméből. A mutáns szemben nincs meg az ommatidiumok szabályos elrendeződése, a retinula sejtek összenőttek és a rhabdomerek is véletlenszerűen helyezkednek el az ommatidiumon belül, sokszor hétnél kevesebb látható.

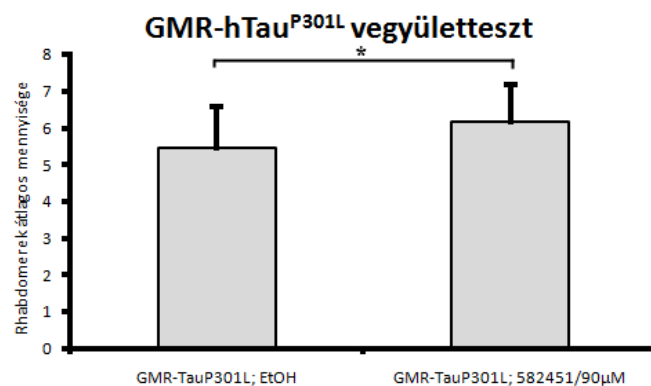
Az ommatidiumokon belül a rhabdomerek elhelyezkedése sem követte a vad-típusnál megszokott mintázatot, számuk 3 és 7 között váltakozott, szemben a vad-típusban megfigyelhető héttel (lásd 1.2. fejezet 4. ábra).

A vegyületekkel való kezelés hatásának vizsgálatához a rhabdomerek számát vettük alapul. Az 582140-es vegyülettel kezelt állatokról készült metszetekben nem tapasztaltunk változást a kontrollhoz képest, viszont a 582451-el kezelt legyek szeméiről készült metszetekben jobban elkülöníthető ommatidiumok voltak láthatók, a rhabdomerek is rendezettebben helyezkedtek el az ommatidiumokon belül (14. ábra).



**14. ábra** 582451 kezelt állatok szemének félvékony metszete. Az ommatidiumok jobban elkülöníthetőek és többükben mind a hét rhabdomer megfigyelhető.

Megszámoltuk a rhabdomereket az ommatidiumokon belül mindegyik kezelés esetében, és Mann-Whitney u-próbával szignifikáns javulást tapasztaltunk a rhabdomerek mennyiségében az 582451 vegyülettel kezelt csoport esetében a kontrollcsoportéhoz képest. ( $p < 0,03$ ) (15. ábra)



**15. ábra** Az etanollal kezelt és 90 µM 582451-gyel kezelt muslicák átlagos rhabdomer számában szignifikáns különbséget találtunk ( $p < 0,03$ ). A vegyületes kezelés vélhetően csökkentette a mutáns Tau degeneratív hatását.



## 5. Diszkusszió

A Tau fehérje aggregációja révén közrejátszik súlyos neurodegeneratív kórképek kialakításában. Így a fehérje és az aggregációs folyamat feltérképezése nélkülözhetetlen a betegségek jobb megismeréséhez és lehetséges terápiás szerek kidolgozásához. Bár nem lehet pontosan tudni, milyen hatások indítják el a Tau filamentumok képződését, több hozzájáruló folyamatról beszámoltak és ezzel lehetséges terápiás célpontokat jelöltek meg [ CITATION Med14 \l 1038 ].

Munkánk során célunk először egy jól karakterizálható *Drosophila* betegségmodell felállítása volt, mely több szempontból járja körbe a neurodegeneratív betegségeket, illetve a humán megbetegedésekhez hasonló tünetekkel vagy tünetegyüttessel rendelkezik. Választásunk azért esett az ecetmuslicára, mert – bár gerinctelen rovar – elég fejlett és főképpen *in vivo* szervezet, melyen kognitív és élethosszteszteket is végezhetünk és nem utolsósorban igen gyorsan lefuttathatóak ezek a vizsgálatok. Célunk mindezzel a kutatócsoportunk által létrehozott és *in silico* valamint *in vitro* módszerekkel vizsgált kismolekulájú vegyületeinek tesztelése. Ezen vegyületek olyan gyógyszerjelölt molekulák, melyek a humán Tau fehérjét kötik és ezzel remélhetőleg stabilizálják, ezáltal gátolják az aggregációját.

Első lépésként a teljes hosszúságú humán Tau 2N4R izoformáját dopaminerg neuronokban termeltettük túl a muslicák agyában, hasonlóan a humán Parkinson-kórban megfelelő kórképnek. Azt tapasztaltuk, hogy ennek hatására a muslicák életideje jelentősen lecsökkent. Vélhetően az idegsejtekben megindult az aggregáció, ami a sejtek tömeges pusztulását vonta maga után. Ezt a továbbiakban bizonyítani szeretnénk a sejtpusztulást (apoptózist) mutató markerekkel. Mivel ezek a neuronok létfontosságúak a *Drosophila* életképességéhez, nagymértékű károsodásuk vagy veszteségük negatív hatással volt a muslicák élettartamára. További terveink között szerepel, hogy megvizsgáljuk, milyen hatással vannak az általunk vizsgált vegyületek a megfigyelt élethosszcsökkenésre, menekítik-e a fenotípust.

Szintén a humán Tau (2N4R) fehérjét fejeztettük ki a motoros idegsejtekben. A lárvákban túltermelt humán Tau nagymértékben károsította az állatok mozgását, vélhetően – az élethossz tesztekkel összhangban – a fehérje aggregáció károsodást okozott az idegsejtekben, aminek következtében romlott a mászóképeség. Mind a 582140, mind pedig a 582451 jelű vegyülettel való kezelés javított az OK6-Gal4xTau62 genotípusú állatok teljesítőképességén. Így valószínűsíthető, hogy a vegyületek aggregációt gátló hatása révén a folyamat lelassult és kevesebb toxikus forma képződött. További terveink között szerepel, hogy a motoros

funkciókat vizsgáló tesztek, illetve a vegyületek tesztelését felnőtt állatokon is elvégezzük. Ezen kívül szeretnénk a Tau63 lárvákon végzett kísérletet megismételni.

Végül *Tau<sup>P301L</sup>* mutáns fehérjét fejeztettünk ki a muslicák szemében. Erről a mutációról ismert, hogy nagymértékben felerősíti az aggregációs folyamatot. A *Drosophilák* szeme ennek hatására sötétvörös, rendezetlen és durva felszínű lett. A kezelés hatására a szem külső morfológiája nem változott, valószínűleg a mutáció agresszív volta miatt. Fénymikroszkópos metszeteken azonban az 582451 vegyülettel kezelt muslicák szemének szerkezetében javulást tapasztaltunk. Az 582140 számú vegyülettel nem kaptunk szignifikáns javulást, valószínűleg a kis elemszámú minta miatt. A jövőben tervezzük a kísérlet megismétlését és a vizsgált állatok számának növelését.

A fenti eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy sikeresen felállítottunk egy, Tau-aggregációt gátló vegyületek tesztelésére szolgáló modellrendszer. Ebben sikerült az ecetmuslicában több neurodegeneratív betegség tüneteit kiváltanunk a humán fehérje túltermelésével. Végül a kutatócsoportunk által tervezett gyógyszerjelölt vegyületekből kettőt sikerült a motoneuron és a szemfenotípus modelljeinken tesztelni. Ezen eredményeink igen biztatóak, a vegyületek szignifikáns javulást okoztak. További terveink között szerepel a humán Tau idegsejteken belüli lokalizációjának vizsgálata, hogy milyen mértékben aggregálódik az emberi fehérje a muslica idegsejtjeiben, valamint – a csoport többi részével párhuzamosan – a vegyületek pontos hatásmechanizmusának felderítése.

## 6. Összefoglalás

Az emberi 17. kromoszómán található MAPT gén által termelt mikrotubulus-kötő Tau fehérje esszenciális az idegsejtek megfelelő morfológiájának kialakulásához és feladatuk ellátásához. A Tau mikrotubulusokhoz való kötődését foszforilációs állapota révén szabályozza. A Tau-val kapcsolatba hozható neurodegeneratív betegségeket összefoglaló néven taupátiáknak nevezzük. Ezekben nagy mennyiségű hiperfoszforilált Tau keletkezik, ami leválik a mikrotubulusokról és egyéb poszt-transzlációs módosításokkal karöltve hozzájárul a fehérje aggregációjához. A normál funkcióvesztés és toxikus Tau formák hatásai morfológiai károsodáshoz és az axonális transzport sérüléséhez, végül az idegsejtek pusztulásához vezet.

A taupátiák vizsgálatára különböző modellorganizmusokat használnak, köztük a *Drosophilát*, amely jól ismert genetikája, kellőképp összetett idegrendszere és egyéb előnyös tulajdonságai miatt egy kiváló eszköz a kutatók kezében a neurodegeneratív betegségekkel kapcsolatos kutatásokhoz.

Hatékony gyógyszerek a mai napig nem érhetők el a betegségek kezelésére, azonban több lehetséges terápiás célpont ismert. A Tau aggregációban szerepet játszó folyamatok megismerésével befolyásolásával lehetségessé válhat effektív kezelések kidolgozása.

Munkánk során a taupátiák Drosophilán való modellezésére és Tau aggregációt gátló vegyületek *in vivo* hatékonyságának megállapítására tettünk kísérletet. Vizsgálatainkban dopaminerg neuronokban, motoneuronokban és a szem sejtjeiben fejeztettük ki a humán Tau vad-típusú vagy mutáns izoformáját. A dopaminerg neuronokban való Tau expressziót TH-Gal4 driver segítségével végeztük. Ezen muslicák élethosszában szignifikáns eltérést tapasztaltunk a kontrollcsoportokhoz képest. A motoneuronokba túltermeltetett Tau fehérje jelentős csökkenést eredményezett a lárvák mászókéességében. A vegyületek hatására azonban a lárvák egy csoportjának motoros funkciói szignifikáns javulást mutattak. Végül Tau túltermelés hatására kialakuló durva felszínű, rough eye fenotípust vizsgáltuk. A kezelések hatására makroszkópikus változást nem észleltünk a szemben, azonban fénymikroszkópos vizsgálataink javulást mutattak a 582451 vegyülettel kezelt állatok szemének szerkezetében. Eredményeink alapján megállapítható a modellek alkalmassága, hasonlósága a humán betegségekhez, valamint valószínűsíthető a vegyületek hatékonysága a Tau aggregáció gátlásában.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Kárpáti Manuélának, hogy megtanította a kutatásban alkalmazott módszereket, átadta a kísérletek megértéséhez szükséges tudását, türelemmel végigkísérte munkámat és nagymértékben hozzájárult annak elvégzéséhez.

Szeretném megköszönni Dr. Tóth Gergelynek, Dr. Juhász Gábornak, és Dr. Löw Péternek, hogy lehetővé tették, hogy az MTA-TTK Neurodegeneratív Betegségek Gyógyszerkutató Csoportjának és a Juhász Lab csapatával együttműködve részt vehessek a kutatásban.

Köszönöm a Juhász Lab asszisztensének, Pálfia Saroltának a szem fenotípus vizsgálatokban használt minták beágyazását, metszését, egyéb technikai segítségét és tanácsait, valamint Varga Katának a muslicák boncolásának megtanítását.

Továbbá szeretném hálámat kifejezni a Juhász Lab dolgozóinak, Dr. Kovács Attilának, Dr. Varga Ágnesnek, Dr. Lippai Mónikának, Dr. Hegedűs Krisztinának, Dr. Nagy Péternek, Dr. Takáts Szabolcsnak és Dr. Lőrincz Péternek, hogy hozzáértő tanácsaikkal hozzájárultak a munkám megfelelő elvégzéséhez.

Köszönöm a Neurodegeneratív Betegségek Gyógyszerkutató Csoport munkatársainak, Dr. Ioja Enikőnek, Dr. Kiss Róbertnek, Dr. Czajlik Andrásnak, Dr. Keresztes Attilának, Fórizs Baláznak és Tóth Lillának, hogy rendelkezésünkre bocsátották a vegyületeket és figyelemmel kísérték a munkám és megjegyzéseikkel igyekeztek megfelelő irányba terelni azt.

Köszönöm a Juhász Lab hallgatóinak, Tóth Saroltának, Sándor Gyöngyvérnek, Kovács Laurának, Csizmadia Tamásnak, Jipa Andrásnak és Boda Attilának, hogy segítettek a munkában és barátságos hangulatot teremtettek a laborban.

Köszönettel tartozom Dr. Stephan Sirgist kutatónak, hogy rendelkezésünkre bocsátotta az OK6-Gal4 törzset.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm családomnak és barátaimnak aggódásukat, támogatásukat és biztatásukat.

## Irodalomjegyzék

1. Alzheimer's Disease International.  
<http://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015-sheet.pdf>. [Online]
2. **Wimo A, Jönsson L, Bond J, Prince M, Winblad B.** The worldwide economic impact of dementia 2010. *Alzheimer's and dementia*. 9, 2013., 1-11.
3. **Irvine GB, El-Agnaf OM, Shankar GM, Walsh DM.** Protein Aggregation in the Brain: The Molecular Basis for Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Mol Med*. 14, 2008., 451-464.
4. **Eleuteri S, Di Giovanni S, Rockenstein E, Mante M, Adame A, Trejo M és mtsai.** Novel therapeutic strategy for neurodegeneration by blocking A $\beta$  seeding mediated aggregation in models of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*. 74, 2015., 144-157.
5. **Guttmacher AE, Collins FS.** Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *The New England Journal of Medicine*. 348, 2003., 1356-1364.
6. **Kumar A, Nisha CM, Silakari C, Sharma I, Anusha K, Gupta N, Nair P, Tripathi T, Kumar A.** Current and novel therapeutic molecules and targets in Alzheimer's disease. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2015., 1-8.
7. **Mondragón-Rodríguez S, Perry G, Zhu X, Boehm J.** Amyloid Beta and Tau Proteins as Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease Treatment: Rethinking the Current Strategy . *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2012, 2011., 7.
8. **Medina M, Avila J.** New perspectives on the role of tau in Alzheimer's disease. Implications for therapy. *Biochemical Pharmacology*. 88, 2014., 540-547.

9. **Hanger DP, Brian H, Noble A, Noble W.** Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends in Molecular Medicine.* 15, 2009., 112-119.
10. **Spillantini MG, Goedert M.** Tau pathology and neurodegeneration. *The Lancet Neurology.* 12, 2013., 609-22.
11. **A, Andreadis.** Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1739, 2005., 91-103.
12. **M, Goedert.** Tau protein and neurodegeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 15, 2004., 45-49.
13. **Noble W, Hanger DP, Miller CCJ, Lovestone S.** The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neurology.* 4, 2013., 83.
14. **Buée L, Bussiére T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR.** Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews.* 33, 2000., 95-130.
15. **Hernández F, Avila J.** Tauopathies. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 64, 2007., 2219 – 2233.
16. **Ballatore C, Lee VMY, Trojanowski JQ.** Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews.* 8, 2007., 663-672.
17. **Cowan CM, Mudher A.** Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies? *Frontiers in Neurology.* 4, 2013., 114.
18. **Williams DW, Tyrer M, Shepherd D.** Tau and tau reporters disrupt central projections of sensory neurons in Drosophila. *Journal of Comparative Neurology.* 428, 2000., 630-640.
19. **Wittman CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, Hutton M és mtsai.** Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science.* 293, 2001., 711-714.
20. **Jackson GR, Wiedau-Pazos M, Sang T, Wagle N, Brown CA, Massachi S, Geschwind H.** Human Wild-Type Tau Interacts with wingless Pathway Components and Produces Neurofibrillary Pathology in Drosophila. *Neuron.* 34, 2002., 509-519.
21. **Noble W, Olm V, Takata K, Casey E, Mary O és mtsai.** Cdk5 is a key factor in Tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron.* 38, 2003., 555-565.
22. **Wang X, Blanchard J, Tung YC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** Inhibition of protein phosphatase-2A (PP2A) by I1PP2A leads to hyperphosphorylation of Tau,

neurodegeneration, and cognitive impairment in rats. *Journal of Alzheimer's Disease*. 45, 2015., 423-435.

23. **Schneider A, Biernat J, von Bergen M, Mandelkow E, Mandelkov E-M.** Phosphorylation that detaches Tau protein from mikrotubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer's paired helical filaments. *Biochemistry*. 38, 1999., 3549-3558.

24. **Martin L, Latypova X, Terro F.** Post-translational modifications of Tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*. 58, 2011., 458-471.

25. Involvement of aberrant glycosylation in phosphorylation of tau by cdk5 and GSK-3L. *FEBS Letters*. 530, 2002., 209-214.

26. **Yuzwa SA, Cheung AH, Okon M, McIntosh LP, Vocadlo DJ.** O-GlcNAc Modification of tau Directly Inhibits Its Aggregation without Perturbing the Conformational Properties of tau Monomers. *Journal of Molecular Biology*. 426, 2014., 1736-1752.

27. **Zhao Y, Zhao B.** Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013., 10.

28. **Schweers O, Mandelkov E, Biernat J, Mandelkow E.** Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein  $\tau$  controls the in vitro assembly of paired helical filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92, 1995., 8463-8467.

29. **David DC, Hauptmann S, Scherping I, Schuessel K és mtsai.** Proteomic and Functional Analyses Reveal a Mitochondrial Dysfunction in P301L Tau Transgenic Mice. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 280, 2005., 23802-23814.

30. **Ferreira A, Bigio EH.** Calpain-Mediated Tau Cleavage: A Mechanism Leading to Neurodegeneration Shared by Multiple Tauopathies. *Molecular Medicine*. 17, 2011., 676-685.

31. **Zhang YJ, Xu YF, Chen XQ, Wang XC, Wang JZ.** Nitration and oligomerization of tau induced by peroxyxynitrite inhibit its microtubule-binding activity. *FEBS Letters*. 579, 2005., 2421-2427.

32. **Li XH, Lv BL, Xie JZ, Liu J, Zhou XW, Wang JZ.** AGEs induce Alzheimer-like tau pathology and memory deficit via RAGE-mediated GSK-3 activation. *Neurobiology of Aging*. 33, 2012., 1400-1410.

33. **Alonso A del C, Mederlyova A, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *The Journal of Biological Chemistry*. 279, 2004., 34873-34881.

34. **Goedert M, Jakes R.** Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1739, 2005., 240-250.

35. **Wischik CM, Harrington CR, Storey JMD.** Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*. 88, 2014., 529-539.
36. **Forlenza OB, Diniz BS, Radanovic M, Santos FS, Talib LL, Gattaz WF.** Disease-modifying properties of long-term lithium treatment for amnesic mild cognitive impairment: randomised controlled trial. *The British Journal of Psychiatry*. 198, 2011., 351-356.
37. **F, Hirth.** Drosophila melanogaster in the Study of Human Neurodegeneration. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. 9, 2010., 504-523.
38. **Lőrincz P, Takáts Sz, Kárpáti M, Juhász G.** iFly: The eye of the fruit fly as a model to study autophagy and related trafficking pathways. *Experimental Eye Research*. xxx, 2015., 1-9.
39. **Gistelinc M, Lambert JC, Callaerts P, Dermaut B, Dourlen P.** Drosophila Models of Tauopathies: What Have We Learned? *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2012., 14.
40. **Prüßing K, Voigt A, Schultz JB.** Drosophila melanogaster as a model organism for Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*. 8, 2013., 35.
41. **Feuillette S, Miguel L, Frébourg T, Campion D, Lecourtois M.** Drosophila models of human tauopathies indicate that Tau protein toxicity in vivo is mediated by soluble cytosolic phosphorylated forms of the protein. *Journal of Neurochemistry*. 113, 2010., 895-903.
42. **Doerflinger H, Benton R, Shulman JM, Johnston D St.** The role of PAR-1 in regulating the polarised microtubule cytoskeleton in the Drosophila follicular epithelium. *Development*. 130, 2003., 3965-3975.
43. **Chen X, Li Y, Huang és mtsai.** Study of tauopathies by comparing Drosophila and human tau in Drosophila. *Cell and Tissue Research*. 2007., 329. kötet, 169-178.
44. **Mudher A, Shepherd D, Newman TA, Mildren P és mtsai.** GSK-3b inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in Drosophila. *Molecular Psychiatry*. 9, 2004., 522-530.
45. **Mershin A, Pavlopous E, Fitch O, Braden BC és mtsai.** Learning and Memory Deficits Upon TAU Accumulation in Drosophila Mushroom Body Neurons. *Learning & Memory*. 11, 2015., 277-287.
46. **Ito K, Sass H, Urban J, Hofbauer A, Schneuwly S.** GAL4-responsive UAS-tau as a tool for studying the anatomy and development of the Drosophila central nervous system. *Cell Tissue Research*. 290, 1997., 1-10.