

**UBIQUITIN-PROTEASZÓMA RENDSZER KOMPONENSEK ÉS A  
HSP72 LOKALIZÁCIÓJA KONTROLL ÉS NEURODEGENERATÍV  
AGYSZÖVETBEN**

Doktori értekezés

Készítette: Ádori Csaba

Témavezető: Dr. László Lajos egyetemi docens

ELTE TTK Biológia Doktori Iskola  
Molekuláris Sejt- és Neurobiológiai Program

Doktori iskola programvezető: Prof. Dr. Sass Miklós

Készült az ELTE TTK Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai  
Tanszékén

2007

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>TARTALOMJEGYZÉK</b>	<b>2</b>
<b>A DOLGOZATBAN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b>	<b>6</b>
<b>1. BEVEZETÉS</b>	<b>7</b>
<b>2. IRODALMI BEVEZETÉS</b>	<b>9</b>
<b>2.1. A neurodegeneratív betegségek</b>	<b>9</b>
<i>2.1.1. Prionbetegségek</i>	9
2.1.1.1. Bevezetés és csoportosítás	9
2.1.1.2. A humán prionbetegségek klinikai tünetei	10
2.1.1.3. A humán prionbetegségek neuropathológiája	10
2.1.1.4. A humán prionbetegségek diagnózisa	11
2.1.1.5. A prionbetegségek molekuláris pathogenezise	11
2.1.1.5.1. Hipotézisek a kórokozóról	11
2.1.1.5.2. A prionfehérje és lehetséges funkciói	12
2.1.1.6. Exogén fertőzés: perifériától az agyig	19
2.1.1.7. A fajspecifikus barrier kérdése	20
2.1.1.7.1. Az átvitel lehetőségei és korlátai	20
2.1.1.7.2. A nvCJB és a BSE	21
<i>2.1.2. Az Alzheimer-kór</i>	22
2.1.2.1. Bevezetés	22
2.1.2.2. Klinikai tünetek, kórlefordulás	22
2.1.2.3. A betegség neuropathológiája	23
2.1.2.3.1. Szöveti eltérések	23
2.1.2.3.2. Neurokémiai pathológia	26
2.1.2.4. Diagnózis és terápiás lehetőségek	26
2.1.2.5. A betegség etiopathogenezise	27
2.1.2.5.1. Kóros fehérjegyök képződése	27
2.1.2.5.2. A betegség genetikai háttere – ismert mutációk, és az ApoE szerepe az etiopathogenezisben	30
2.1.2.5.3. Neurotoxikus komponensek	32
2.1.2.5.4. Immunológiai komponensek	33
2.1.2.5.5. Vaszkuláris komponensek	33
2.1.2.5.6. Lehetséges integratív modell – illetve annak hiánya	34

2.1.3. <i>Közös pontok a neurodegenerációban –             konformációs neurodegeneratív betegségek</i>	36
<b>2.2. A molekuláris chaperonok</b>	<b>37</b>
2.2.1. <i>A molekuláris chaperonok általános jellemzése             (csoportjai, alapvető felépítésük és funkcióik)</i>	37
2.2.2. <i>A 70 kDa-os molekuláris chaperonok</i>	37
2.2.3. <i>A Hsp72 és 73 lehetséges szerepe a Alzheimer-kórban és prionbetegségekben</i>	39
<b>2.3. Az ubiquitin-proteaszóma rendszer</b>	<b>40</b>
2.3.1. <i>Bevezetés</i>	40
2.3.2. <i>Az ubiquitin</i>	42
2.3.3. <i>Az ubiquitiniláció és regulációja</i>	42
2.3.4. <i>A proteaszóma</i>	45
2.3.4.1. <i>A 20S proteaszóma</i>	46
2.3.4.2. <i>A 19S regulátor komplex</i>	47
2.3.5. <i>Az UPR szubcelluláris lokalizációja</i>	49
2.3.6. <i>Az UPR szerepe a neurodegenerációban</i>	51
<b>3. CÉLKITŰZÉSEK</b>	<b>53</b>
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	<b>54</b>
<b>4.1. Humán esetek leírása</b>	<b>54</b>
<b>4.2. A felhasznált patkányok (Dark Agouti)</b>	<b>55</b>
<b>4.3. Western-blotting analízis</b>	<b>55</b>
4.3.1. <i>Humán agyminták preparálása</i>	55
4.3.2. <i>Western-blotting protokoll</i>	55
<b>4.4. Fénymikroszkópos immunhisztokémia</b>	<b>56</b>
4.4.1. <i>Humán agyak immerziós fixálása és beágyazása</i>	56
4.4.2. <i>Patkány agyak perfúziós fixálása és beágyazása</i>	56
4.4.3. <i>Epitópfeltárási módszerek</i>	57
4.4.4. <i>Az antitestek karakterizálása és specifitásuk</i>	57
4.4.5. <i>Fénymikroszkópos immunhisztokémiai protokoll</i>	59
<b>4.5. Fluoreszcens kettős jelölések és konfokális mikroszkópia</b>	<b>60</b>
<b>4.6. TUNEL-módszer (sejtpusztulás-detektálás)</b>	<b>61</b>
<b>4.7. Posztembedding immun-elektronmikroszkópia</b>	<b>62</b>
<b>4.8. Morfometriai és statisztikai eljárások</b>	<b>64</b>
4.8.1. <i>Western-blotting csíkok denzitás-mérése</i>	64

4.8.2. Arany szemcsék számolása elektronmikroszkópos felvételeken	64
4.8.3. Szemikvantitatív értékelés fénymikroszkópos metszeteken	64
<b>5. EREDMÉNYEK</b>	<b>65</b>
<b>5.1. A felhasznált antitestek és az immunreakciók specificitása</b>	<b>65</b>
5.1.1. Antitest-specificitás (Western-blotting)	65
5.1.2. Immunreakció-specificitás (kontrollok: „no first”, preimmun)	66
<b>5.2. Az ubiquitin-proteaszóma rendszer komponenseinek celluláris és szubcelluláris lokalizációja egészséges emberi agyon és patkány agyon</b>	<b>66</b>
5.2.1. Az ubiquitin és a 19S RC ATPázok lokalizációja	66
5.2.2. 20S proteaszóma lokalizációja	69
5.2.3. Magi testek {nuclear bodies} immunpozitivitása	70
<b>5.3. A Hsp72 molekuláris chaperon és az ubiquitin-proteaszóma rendszer komponenseinek lokalizációja humán neurodegeneratív agyszöveten</b>	<b>71</b>
5.3.1. A vizsgált CJB és Alzheimer-kóros esetek neuropathológiai diagnózisa, és a sejtpusztulás detektálása (TUNEL-reakciók)	71
5.3.2. A Hsp72 lokalizációja	71
5.3.3. Az ubiquitin-proteaszóma rendszer komponenseinek lokalizációja	73
5.3.3.1. Az ubiquitin és a 19S RC ATPázok szelektív regionális eloszlása	73
5.3.3.2. Vulnerábilis sejtek magpozitivitása	77
5.3.3.3. Pathológiás inklúziók immunpozitivitása	81
<b>6. FONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK</b>	<b>83</b>
<b>7. MEGVITATÁS</b>	<b>84</b>
<b>7.1. Az UPR celluláris és szubcelluláris immunlokalizációja egészséges humán és patkány agyban</b>	<b>84</b>
7.1.1. Az ubiquitin immunlokalizációja	84
7.1.2. A 20S proteaszóma immunlokalizációja	84
7.1.3. A 19S RC alegységeinek immunlokalizációja	85
7.1.4. A magi testek immunpozitívok az UPR különböző komponenseire – klasztoszómák	87
<b>7.2. Molekuláris chaperonok és az UPR lokalizációja humán neurodegeneratív agyszöveten</b>	<b>88</b>
7.2.1. A szelektív vulnerabilitás kérdése a neurodegeneratív betegségekben	88
7.2.2. A Hsp72 molekuláris chaperon és az UPR	88

<i>komponenseinek szelektív regionális eloszlása – neuroprotektív szerep</i>	
<i>7.2.3. Az UPR komponenseinek magi redisztribúciója</i>	<i>91</i>
<i>7.2.4. Patológias inklúziók immunpozitivitása UPR-komponensekre és Hsp72-re</i>	<i>93</i>
<b>8. KÖVETKEZTETÉSEK</b>	<b>95</b>
<b>9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	<b>96</b>
<b>10. IRODALOMJEGYZÉK</b>	<b>97</b>
<b>11. ÖSSZEFOGLALÁS</b>	<b>118</b>
<b>12. SUMMARY</b>	<b>119</b>

## A DOLGOZATBAN HASZNÁLT GYAKORIBB RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>19S RC ATPáz</b>	<i>A proteaszóma 19S regulátor komplexének ATPáz aktivitású alegysége</i>
<b>AK</b>	<i>Alzheimer-kór (Alzheimer's disease)</i>
<b>ApoE</b>	<i>Apolipoprotein-E</i>
<b>APP</b>	<i>Amyloid Prekursor Protein</i>
<b>A<math>\beta</math><sub>39/40</sub> és A<math>\beta</math><sub>42/43</sub></b>	<i>A <math>\beta</math>-amyloid 39/40, illetve 42/43 aminosavnyi változata</i>
<b>BSE</b>	<i>Szarvasmarha szivacsos agysorvadás (Bovine Spongiform Encephalopathy)</i>
<b>CA(1-4)</b>	<i>Hippocampus Ammon-szarv (Cornu Ammonis 1-4 régió)</i>
<b>CJB, CJ betegség</b>	<i>Creutzfeldt-Jakob betegség</i>
<b>KO</b>	<i>Kontroll (eset)</i>
<b>DUB</b>	<i>Deubiquitiniláló enzim</i>
<b>E1</b>	<i>Ubiquitin aktiváló enzim</i>
<b>E2</b>	<i>Ubiquitin-konjugáló enzim</i>
<b>E3</b>	<i>Ubiquitin-ligáz</i>
<b>ERAD-mechanizmus</b>	<i>Endoplazmatikus retikulum asszociált (protein)degradációs mechanizmus</i>
<b>HRP</b>	<i>Tormaperoxidáz (Horse Radish Peroxidase)</i>
<b>HSP</b>	<i>Hősokk-fehérje (Heat Shock Protein)</i>
<b>NFT</b>	<i>Neurofibrilláris köteg (Neurofibrillary Tangle)</i>
<b>nvCJB</b>	<i>Új-variáns Creutzfeldt-Jakob betegség</i>
<b>PA700</b>	<i>700 kDa-os Proteaszóma-aktivátor (19S)</i>
<b>PHF</b>	<i>Páros helikális filament</i>
<b>PrP</b>	<i>Prionfehérje</i>
<b>PrP<sup>27-30</sup></b>	<i>A kóros prionfehérje proteázemésztett formája</i>
<b>PrP<sup>c</sup></b>	<i>Normál prionfehérje (c = celluláris)</i>
<b>PrP<sup>res</sup> PrP<sup>CJB</sup>, PrP<sup>sc</sup></b>	<i>Kóros prionfehérje (res = proteázrezisztens; CJB = Creutzfeldt-Jakob betegség; sc = scrapie)</i>
<b>PrP<sup>sc</sup>(33-35)</b>	<i>Kóros prionfehérje proteázemésztés nélküli formája</i>
<b>PS</b>	<i>Proteaszóma</i>
<b>ROS</b>	<i>Reaktív Oxidatív Gyök (Reactive Oxidative Species)</i>
<b>SEM</b>	<i>Standard hiba (Standard error of mean)</i>
<b>sCJB</b>	<i>Sporadikus Creutzfeldt-Jakob betegség</i>
<b>TE-(feltárás)</b>	<i>Tris-EDTA hőindukálta epitópfeltárási módszer</i>
<b>TUNEL</b>	<i>TdT dUTP nick endlabelling</i>
<b>UPR</b>	<i>Ubiquitin-proteaszóma rendszer</i>

## 1. BEVEZETÉS

A fejlett országokban az átlagos életkor kitolódásával, a társadalom fokozatos elöregedésével párhuzamosan egyre nagyobb egészségügyi, szociális, sőt gazdasági problémát jelent a központi idegrendszer súlyos károsodásával járó neurodegenerációs megbetegedések (például az Alzheimer- illetve Parkinson-kór) növekvő száma. Az intenzív és nagyfokú szelektivitást mutató neuronpusztulás mellett, e betegségek többségére a fehérje-anyagcsere jellegzetes zavara: egy, vagy több kóros konformációjú, aggregációra hajlamos fehérjeforma kialakulása, és intra- vagy extracelluláris fehérje-zárványok formájában történő felhalmozódása a jellemző. Nem véletlen tehát, hogy e kórképeket egyre gyakrabban illetik a konformációs betegségek (*conformational diseases / folding diseases / foldopathies*), vagy újabban az ubiquitin lebontási rendellenességek (*ubiquitin catabolic disorders*) gyűjtőnévvel, melyek pathogenezisében mind a molekuláris chaperonok, mind az ubiquitin-proteaszóma rendszer (UPR) fontos szerepet játszhatnak (Barral és mtsai., 2004; Carrell és Lomas, 1997; de Pril és mtsai., 2006; Layfield és mtsai., 2001; Lindsten és Dantuma, 2003).

A molekuláris chaperonok alapvetően olyan fehérjék, amelyek más fehérjékhez kötődve stabilizálják azok konformációját, segítik a natív konformáció ki- vagy visszaalakulását. A proteaszóma egy multikatalitikus proteáz-komplex, amely a kis molekulásúlyú ubiquitin nevű fehérjével kovalensen megjelölt, rosszul feltekeredett, sérült, vagy életidejét betöltött fehérjéket oligopeptidekké bontja. Mind a molekuláris chaperonok, mind az UPR a sejtek protein-homeosztázisának alapvető örei, bár a működésük ellentétes irányú: míg a molekuláris chaperonok a fehérjék funkcióképességének megőrzését segítik, addig az UPR lebontja a végzetesen sérült, vagy aktuálisan szükségtelen proteineket. A két rendszer működése azonban egy célt szolgál: fenntartani a sejt protein-homeosztázisát. Jól jelzi ezt a két rendszer közti szoros együttműködés is: amennyiben a molekuláris chaperonok nem tudják egy sérült fehérje natív térszerkezetét visszaállítani, "átadják" a sérült fehérjét a proteaszómának.

Érdekes módon - annak ellenére, hogy mind a molekuláris chaperonok, mind az UPR ma a molekuláris sejtbiológiai kutatások érdeklődésének középpontjában állnak - sem az UPR egyes komponenseinek, sem a Hsp72 molekuláris chaperonnak *in vivo* sejtszintű és regionális eloszlásáról átfogó tanulmány eddig sem egészséges kontroll, sem neurodegeneratív agyszövet esetén nem készült. A doktori értekezésem alapjául szolgáló kutatómunka során ezért arra törekedtünk, hogy az UPR számos komponensének és a Hsp72-nek a fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémiai lokalizációjával hozzájáruljunk e

hiány részbeni pótlásához. Vizsgálati objektumként perfúziósan fixált patkány agyszövetet, valamint egészséges és a konformációs neurodegeneratív betegségek két tipikus formájából (Alzheimer-kór és Creutzfeldt-Jakob betegség) származó *post mortem* humán agyszövetmintát használtunk. Az Alzheimer-kór a leggyakoribb neurodegeneratív kórkép, míg a Creutzfeldt-Jakob betegség a prionbetegségek körébe tartozik, amelyek egyediek az átolthatóság miatt, etiológiájuk és molekuláris pathomechanizmusuk pedig alapvetési szempontból is rendkívül érdekes.



## 2. IRODALMI BEVEZETÉS

### 2.1. A neurodegeneratív betegségek

#### 2.1.1. *Prionbetegségek*

##### 2.1.1.1. *Bevezetés és csoportosítás*

A prionbetegségek hosszú lappangási idejű, szelektív neuronpusztulással járó neurodegeneratív kórképek, melyeknek emberi és állati formáik egyaránt ismertek. Bár a prionbetegségek - legalábbis a humán változatok - nagyon ritkák, kivétel nélkül fatálisak. A betegségcsoport mai elnevezése (prionbetegségek) csak a nyolcvanas évek elején terjedt el Prusiner nyomán, azonban az ide tartozó állati vagy emberi betegségekről szóló híradások már a XVIII. század elején megjelentek (Prusiner, 1998). A különböző prionbetegségeket, ezek nevének e dolgozatban is szereplő angol rövidítéseit, és a gazdaszervezeteket az 1. táblázat foglalja össze (Kovács és László, 1998).

<i>Prionbetegség és rövidítése</i>	<i>Gazdaszervezet</i>
Kuru	Ember (pápua-új-guineai bennszülött fore törzs)
Sporadikus Creutzfeldt-Jakob betegség (sCJB)	Ember
Új-variáns Creutzfeldt-Jakob betegség (nvCJB)	Ember
Öröklődő Creutzfeldt-Jakob betegség	Ember
Iatrogén Creutzfeldt-Jakob betegség	Ember
Gerstmann-Straussler-Scheinker-betegség (GSS)	Ember
Öröklődő halálos álmatlanság (FFI)	Ember
Súrlókór (Scrapie)	Birka
Szarvasmarhák szivacsos agysorvadása (BSE)	Szarvasmarha
Nyércek átoltható szivacsos agysorvadása (MSE)	Nyérc
Macskák szivacsos agysorvadása (FSE)	Házimacska
Krónikus sorvasztó betegség (CWD)	Jávorszarvas, őszvér
Egzotikus patások szivacsos agysorvadása	Kuduantilop, nyala, oryx

**1. táblázat** *A humán és állati prionbetegségek, és gazdaszervezeteik*

### 2.1.1.2. *A humán prionbetegségek klinikai tünetei*

A leggyakoribb emberi prionbetegség, a sCJB „klasszikus” lefolyása mentális tünetekkel (viselkedésváltozás, motiváció-hiány, emocionális változások, kognitív zavarok) kezdődik, majd gyorsan előrehaladó (progrediáló) demenciában folytatódik. A motoros zavarok kiterjedt myoclonusokkal kezdődnek, majd ataxia, végül akinetikus mutismus alakul ki. Bizonyos változatokban szenzoros tünetek (pl.: látórendszer zavara) is megfigyelhető. A betegség klinikai lefolyási ideje az első tünetek észlelésétől kb. 3-9 hónap, de ritkán jóval tovább is húzódhat. Ekkor a beteg teljes vegetatív szintre süllyed. Az öröklődő CJB lefolyása lassabb, de tüneteiben hasonló a sporadikus változathoz. A iatrogén CJB tünetei az inokuláció típusától függnnek. Perifériális inokuláció esetén inkább cerebelláris motoros tünetek, centrális inokuláció esetén demencia a domináns (Kovács és László, 1998). A nvCJB általában tragikusan fiatal korban (16-20 év) jelentkezik, elsősorban szenzoros és pszichés tünetekkel. A motoros tünetek és a demencia később jelentkeznek (Ironsides, 1996).

A GSS-re a myoclonusok nem jellemzők, domináns tünetei az ataxia és a demencia (Bell, 1999).

Az FFI-re jellemző a rendkívül súlyos alvászavar, amely teljes alvásképtelenségig fokozódik (Bell, 1999). Ehhez súlyos vegetatív tünetek (légzés, vérnyomásproblémák, hormonális zavarok) járnak.

Mivel a fenti tünetek közül külön-külön nincs olyan, amely csak a prionbetegségekre lenne jellemző, a betegség gyanúját több, progresszíven előforduló tünet alapján lehet felvetni. Önmagában a klinikai tünetek azonban még így sem képezhetik a prionbetegség egyértelmű (definitív) diagnosztizálásának alapját (Kovács és László, 1998).

### 2.1.1.3. *A humán prionbetegségek neuropathológiája*

Minden prionbetegségekre jellemzőek az alábbiak:

- Szelektív, különböző mértékű neuronpusztulás a központi idegrendszerben, amely bizonyos esetekben az agyvelő fokális helyeinek elszivacsosodását, spongiform léziók tömegének kialakulását eredményezi.
- Az érintett agyterületeken nagyfokú reaktív asztroglíózis (Eng és Ghirnikar, 1994).
- Szintén az érintett agyterületeken egy jellegzetes fehérje, az úgynevezett prionfehérje kóros izoformájának különböző mintázatú felhalmozódása. Megkülönböztetünk plakkszerű lerakódást (morfológiája alapján kuru-plakk, florid-plakk, multicentrikus-plakk,

lineáris-plakk), diffúz-szinaptikus, perineuronális, perivacuoláris, és intraneuronális mintázatokat (Kovács és László, 1998; Kovacs és mtsai., 2002).

- A fenti „klasszikus” neuropathológiai kép mellett leírtak immunhisztológiailag jellemezhető mikroglia-aktivációt is (Giese és mtsai., 1998a).

Mindezen jellemzők mennyiségi és minőségi varianciája nagyon nagy. Függ a betegség típusától, adott betegségen belül a prionfehérje génjének mutációitól, illetve polimorfizmusaitól, a kialakult betegség etiológiájától, és valószínűleg még más tényezőktől is.

#### 2.1.1.4. *A humán prionbetegségek diagnózisa*

A biokémiai laborvizsgálatok során a liquorból a CJ betegek jelentős részénél kimutatható néhány, az idegszövetre jellemző fehérje, mint például a fehérjefoszforilációban részt vevő 14-3-3 protein (Beaudry és mtsai., 1999; Kovács és László, 1998; Satoh és mtsai., 1999), a neuronspecifikus enoláz (Kovács és László, 1998; Kropp és mtsai., 1999), illetve egy, az asztrocitákban előforduló  $Ca^{++}$ -kötő fehérje, az S-100 (Beaudry és mtsai., 1999). Bár a fenti fehérjék egyike sem tekinthető a prionbetegségek specifikus markerének, a liquorból történő kimutatásuk és koncentrációjuk meghatározása, a neurológiai és pszichiátriai tünetekkel együtt, nagymértékben segíti a megfelelő klinikai diagnózis felállítását.

Ma a prionbetegségek egyértelmű diagnózisát csak biopsziás vagy *post mortem* anyagon végzett prionfehérje-immunhisztokémia illetve Western-blotting erősítheti meg, amely kimutatja a prionfehérje kóros változatának felhalmozódását a központi idegrendszerben. Bizonyos esetekben leírták a tonsilla, ill. a lép germinális centrumának pozitívitasát is a fenti fehérjére (Aguzzi, 2000).

#### 2.1.1.5. *A prionbetegségek molekuláris pathogenezise*

##### 2.1.1.5.1. *Hipotézisek a kórokozóról*

Mint már a bevezetőben említettük (2.1.1.1. fejezet), a ma prionbetegségnek nevezett állati és emberi kórképek régóta ismertek. Etiológiájukra talán az első magyarázat Bjorn Sigurdssontól 1957-ből származik, aki szerint a sűrűlókórt valamiféle „lassú vírus” okozza (Sigurdsson és mtsai., 1957). Ezek után hamarosan felismerték a hasonlóságot a kuru és a sűrűlókór, majd a többi, ma prionbetegségnek nevezett kórkép között is. Gajdusek és mtsai.

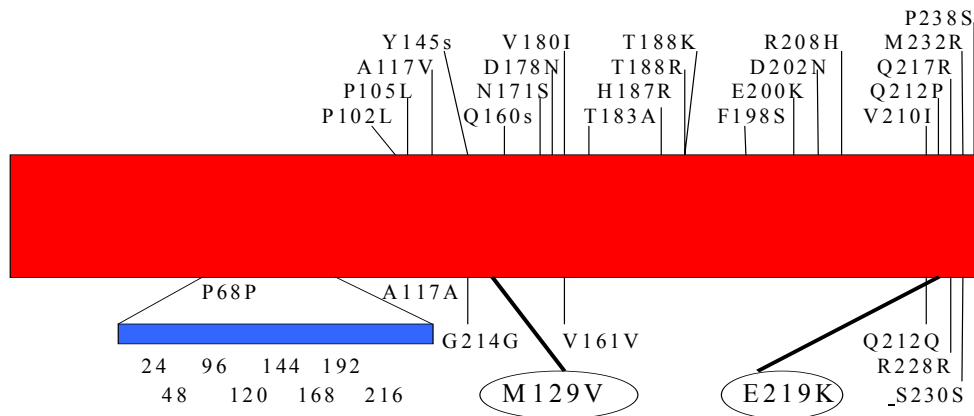
kuruban meghalt emberek agykivonatával hosszú inkubációs idővel ugyan, de betegséget váltottak ki intracerebrálisan inokulált csimpánzokban (Asher és mtsai., 1993). Hamarosan ez a CJB-vel is lehetségessé vált. (Prusiner, 1998). A lehetséges vírus után a kutatás intenzíven folyt, de már korán nyilvánvalóvá vált a kórokozó szokatlan természete. Stamp és mtsai. 1959-ben kimutatták, hogy a „fertőző esszencia” hő és egyéb durva kémiai beavatkozásoknak ellenáll, ezért a kórokozó fehérje-nukleinsav komplex voltát megkérdőjelezték (Stamp és mtsai., 1959). Alper és mtsai. vizsgálatai szerint a feldúsított extraktum nagy dózisu UV-sugárzás hatására is megőrzi fertőzőképességét (Alper és mtsai., 1967). A kórokozó természetére többféle elképzelés is született: replikálódó poliszacharid, virino, egysejtű parazita (összefoglalva lásd: (DeArmond és Prusiner, 1995)).

Prusiner 1982-ben leírta, hogy a sűrűlőkór ágense {scrapie-agent} valószínűleg nem tartalmaz jelentős mennyiségű nukleinsavat, viszont minden esetben tartalmaz egy 50 kDa-nál kisebb molekulatömegű fehérjét. A sűrűlőkór kórokozójának elnevezésére ezért javasolta a *PRION* mozaikszót, amelyet a *fehérjetermészetű fertőző részecske* (*proteinaceous infectious particle*) kifejezésből alkotott (Prusiner, 1982).

Prusiner és munkacsoportja hamarosan azonosította a prionban legnagyobb mennyiségben megtalálható komponenst, az úgynevezett prion-fehérjét (Bolton és mtsai., 1982), és azonosították a fehérje génjét is, amelyről rövidesen az is kiderült, hogy bár egyetlen kromoszómális gén kódolja, két konformációs állapotban is előfordulhat (Basler és mtsai., 1986; Meyer és mtsai., 1986). Az úgynevezett normál konformációs állapotú fehérje minden sejtben jelen van, a kóros forma viszont csak a betegek agyszövetében. (Azóta bizonyos limforetikuláris szövetekben és perifériális idegi elemekben is kimutatták (Aguzzi, 2000)). Prusiner szerint, ha a kóros prionfehérje kontaktusba kerül a normál formával, „saját képére formálva” azt, kóros izoformájává alakítja (Cohen és mtsai., 1994; Prusiner, 1998). Ez az úgynevezett prion-hipotézis lényege, amelyet a következő fejezetben részletesen tárgyalunk.

#### 2.1.1.5.2. *A prionfehérje és lehetséges funkciói*

A prionfehérjét először sűrűlőkóros birka-agykivonattal fertőzött hörcsögök agyszövetéből izolálták. A fehérje SDS PAGE-n 33-35 kDa molekulatömegű formák elegyét mutatta (Bolton és mtsai., 1982). Ha a fehérjét radioaktív izotóppal jelölték, a fertőzőképesség egyenes arányban állt a fehérje mennyiségére utaló jel erősségével, és proteázzal való emésztés nem csökkentette az infektivitást. (Bessen, 1996; McKinley és mtsai., 1983; Meyer és mtsai.,



### 1. ábra A prionfehérje génjének szerkezete, és a gén ismert mutációi, polimorfizmusai

Az ábrán a leggyakoribb pontmutációkat, polimorfizmusokat (bekeretezve: M129V és E219K), és inzerciókat (kékkel; 24, 48, 96, 120, 144, 168, 192 vagy 216 bázispáryi inzerció lehetséges, ez 1-8 plusz oktapeptid inzertálódását jelenti) láthatjuk. Forrás: Dr. Kovács Gábor saját ábrája (a Szerző engedélyével).

1986). (A fertőzőképesség mértékére az inkubációs idő hosszából következtettek.) Kiderült azonban, hogy a proteináz-K emésztés hatására a fehérje limitált proteolízisen megy keresztül, és így a denaturáló gélen molekulatömege 27-30 kDa közöttinek mutatkozott. (Meyer és mtsai., 1986). A fehérje egészséges hörcsögagyból is izolálható volt, ahol szintén 33-35 kDa molekulatömeget mutatott, de ebben az esetben a proteináz-K a fehérjét teljesen lebontotta. Leírták, hogy a proteint legnagyobb mennyiségben a membránfrakció tartalmazza, és hogy detergensenel történő oldás után a fehérje egy része a kóros agyból származó frakcióban amiloid-rudakká {prion-rods} polimerizálódik, jelezvén a fehérje amfipatikus voltát (Prusiner és mtsai., 1983). Ugyanez egészséges agy esetén nem figyelhető meg. Megállapítható volt tehát, hogy a prionfehérje (PrP) két állapotban létezik, egy, a kóros állapotban jelen lévő, részben proteázrezisztens és nemionos detergensek hatására oldhatatlan, aggregációra hajlamos (PrP<sup>res</sup>, PrP<sup>27-30</sup>, PrP<sup>CJB</sup>, PrP<sup>sc</sup>) és egy, mind a kóros, mind az egészséges agyban jelen levő proteázszenzitív és szolubilis változatban (PrP<sup>sen</sup>, PrP<sup>c</sup>, ahol a c cellulárist jelent). Megjegyzendő, hogy proteázkezelés nélkül a kóros forma is 33-35 kDa, ezt PrP<sup>sc</sup>(33-35)-nek nevezzük. 1985-86-ban publikálták in situ hibridizációs vizsgálatok alapján, hogy a teljes PrP szekvenciájának megfelelő mRNS jelen van mind a kóros, mind az egészséges szövetben (Basler és mtsai., 1986; Chesebro és mtsai., 1985), és hogy a fehérje génje - amelyről mind a kóros, mind a normál változat esetén az mRNS átíródik – ember esetében a 20. kromoszóma kis karján található (20 p12→pter) (Sparkes és mtsai., 1986). A fehérjét egyetlen exon kódolja, így a két fehérjeforma (PrP<sup>c</sup>-PrP<sup>sc</sup>) közötti különbség magyarázatára - kizárva az

alternatív splicing lehetőségét - csak a poszttranszlációs módosítás tűnt ésszerűnek. (DeArmond és Prusiner, 1995; Prusiner, 1998).

A prionfehérje egészséges formája immuncitokémiai vizsgálatok alapján minden eddig vizsgált emlős sejtben jelen van, bár in situ hibridizációs vizsgálatok szerint, legnagyobb mennyiségben a neuronok expresszálják, különösen nagy mennyiségben fordul elő a szinapszisokban (Prusiner, 1998). A prionfehérjének a kórfolyamatokban betöltött kulcsszerepére utal, hogy prion protein deficiens knock-out egerekben ( $\text{PrP}^{0/0}$ ) semmi módon nem váltható ki fertőzés. A prionfehérje overexpressziója viszont lerövidíti a prion inokulációja, és a betegség klinikai tünetek formájában történő megjelenése között eltelt inkubációs időt (Prusiner, 1998). Knock-out egér agyába ültetett fertőzött agyszövetdarab esetén (graft) a betegségre jellemző hisztopathológia csak a graft területére korlátozódik (Aguzzi és mtsai., 1997).

A humán prionfehérje génjének - 1986-ban történt azonosítása óta - számos mutációját, és több polimorfizmusát írtak le, amelyeket az 1. ábra szemléltet. A prionfehérje génjének mutációi, illetve polimorfizmusai és egy adott eset fenotípusa (klinikai tünetek, pathológiai kép) között többnyire jól jellemezhető, konzekvens összefüggések mutathatók ki (Kovács és László, 1998; Prusiner, 1998; Wadsworth és mtsai., 1999).

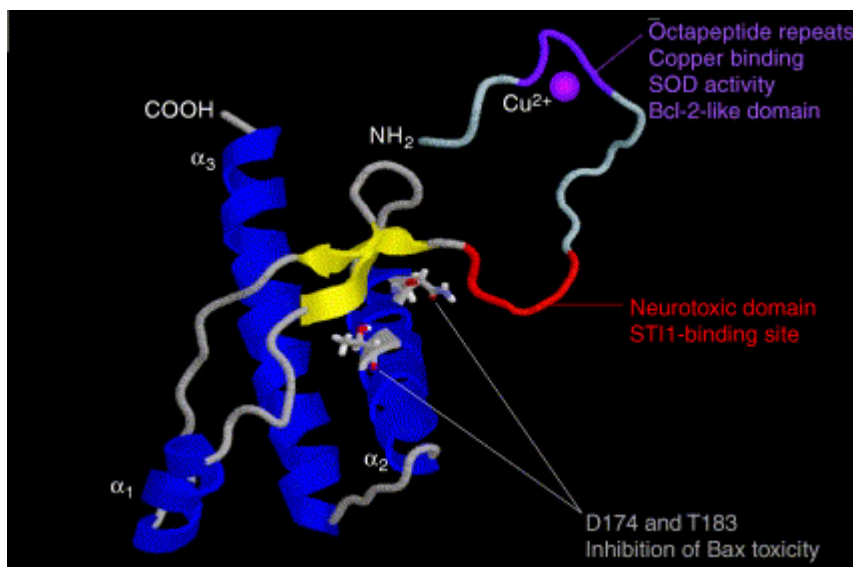
A humán prionfehérje primer transzkriptuma 254 aminosavból áll, melyből poszttranszlációs módosítások során az N-terminálison található 22, és a C-terminálison lévő 23 aminosavnyi szignál-szekvenciák lehasadnak, így az érett fehérje 209 aminosav hosszúságú. Raft-asszociált sejt felszíni membránfehérje, a membránhoz GPI-horgonnyal rögzül, amely a 231. szerinhez kapcsolódik (GPI = glikozil-foszfatidil-inozitol). A 181. és a 197. aszparaginhoz szíalsavat tartalmazó cukoroldallancok kapcsolódhatnak, így megkülönböztetünk di-, mono-, és aglikozilált változatot. A 179. és a 214. cisztein között diszulfidhíd található (2. ábra). A  $\text{PrP}^c(33-35)$  és a  $\text{PrP}^{sc}(33-35)$  között a primer szerkezetben semmiféle ismert különbség nincsen. A  $\text{PrP}^{sc}(33-35)$  a proteináz-K hatására limitált proteolízisen esik át az N terminális 73-90. aminosavai között (változó, hogy hol), melynek hatására a fehérjéről 50-63 aminosavnyi peptid lehasad, így keletkezik a  $\text{PrP}^{27-30}$  (Edenhofer és mtsai., 1997).

Szerkezetvizsgálati módszerek alapján a celluláris prionfehérje ( $\text{PrP}^c$ ) 42%-ban tartalmaz  $\alpha$ -hélixeket (3 ilyen régió van, H1-3 a megnevezésük), és csak 3%-ban  $\beta$ -redőket. A kóros forma viszont 30%  $\alpha$ -hélixet, és 45%  $\beta$ -redőt tartalmaz. A kóros forma másodlagos szerkezetére vonatkozóan több valószínűsített modell létezik (Edenhofer és mtsai., 1997;

Lysek és mtsai., 2005). A két izoforma között tehát a másodlagos szerkezetben van különbség. A 2. ábra a celluláris prionfehérje valószínűsített modelljét mutatja be.

Korábbi vizsgálatok során kimutatták, hogy a kóros prionfehérje, vagy annak kis darabja (PrP{106-126}) *in vitro* toxikus (Forloni és mtsai., 1993). Salmona és mtsai. kimérték, hogy az említett PrP(106-126) fragmens mesterséges membránkonstrukciókban (liposzómákban) és tenyészeteken is növeli a sejtmembrán mikroviszkozitását (Salmona és mtsai., 1997). Más vizsgálatok szerint szintén az *in vitro* adagolt PrP(106-126) ismeretlen módon fokozza a mikroglia oxidatív-szabadgyök-kibocsátását, és ez lehet a tenyészetben tapasztalható neuronpusztulás oka, bár figyelemreméltó, hogy PrP<sup>0/0</sup> típusú sejteket tartalmazó kultúrákban nem mutathatók ki ilyen kórfolyamatok (Brown és mtsai., 1994; Estibeiro, 1996).

A funkció utáni kutatások fontos fordulópontja volt a knock-out egérmodellek kidolgozása. Az ezekkel kapott eredményeket Estibeiro összefoglalója alapján mutatom be (Estibeiro, 1996). Az első közlemények szerint a priongén kiütése nem jár semmiféle



## 2. ábra A celluláris prionfehérje NMR-vizsgálatok alapján rekonstruált szerkezete

Különböző domének felelnek a réz-kötésért, az ST11 fehérje kötéséért (mellyel a prionfehérje részt vesz a PKA-szignalizáció szabályozásában), valamint a Bax-okozta toxicitás gátlásáért (utóbbi funkciókkal a prionfehérje részt vesz az apoptózis szabályozásában). A részleteket lásd a szövegben. (Lysek D, 2005) nyomán.

detektálható funkciózavarral, vagy hisztopathológiai elváltozással. Később azonban több, különböző egértörzsön más-más stratégiával kidolgozott knock-out modelleken több élettani és morfológiai elváltozást is tapasztaltak. Egy vizsgálatban napszakos ritmuszavart, alvászavarokat mutattak ki, amelyek hasonlóak voltak az FFI esetében már korábban megfigyeltekhez. Collinge és mtsai. hippocampusban a GABA<sub>A</sub>-receptor mediálta gyors

inhibíció csökkenését tapasztalták. A circadián ritmusok kialakításáért felelősnek tartott hypothalamicus suprachiasmaticus mag sejtjeiben a GABA-receptorok expressziója korábban leírt módon magas. Elképzelhető tehát, hogy az immunlokalizációs vizsgálatok szerint a szinapszisok membránjában nagy mennyiségben előforduló normál prionfehérje (egyik) funkciója e fenti receptor valamelyenszintű regulációja.

Újabb komplex vizsgálatok feltárták, hogy a prionfehérje elsősorban az 51-81. aminosavak közötti oktarepeat-szakaszon, de nem kizárólagosan ott,  $\text{Cu}^{++}$ -t képes kötni. Fertőzött állatokból preparált membrán-extraktumok  $\text{Cu}^{++}$ -koncentrációja csökken, míg a  $\text{Fe}^{++}$ -, vagy  $\text{Zn}^{++}$ -koncentrációja változatlan marad. Szintén PrP-hiányos egerekben a Zn-Cu-szuperoxid-dizmutáz-enzim aktivitását alacsonyabbnak találták a kontrollénál. Egy csoport szerint pedig  $\text{Cu}^{++}$ -kelátor (cuprozin) adagolása spongiform-neurodegenerációt idéz elő egészséges egerekben (Wadsworth és mtsai., 1999). Tekintve ezen eredményeket, valószínű, hogy a normál prionfehérje a  $\text{Cu}^{++}$ -homeosztázis kialakításában (is) részt vesz (Prusiner, 1998; Varela-Nallar és mtsai., 2006; Wadsworth és mtsai., 1999).

A PrP<sup>0/0</sup> genotípusú tenyészetek szérummegvonásra apoptózissal reagálnak, míg a celluláris prionfehérjét normál szinten expresszáló neurontenyészet szérummegvonással szembeni toleranciája magasabb (Kuwahara és mtsai., 1999). Az anizomicin-indukálta apoptózisra a PrP<sup>0/0</sup> genotípusú egerekből származó neuronok *in vitro* sokkal érzékenyebbek. Ennek oka az lehet, hogy a celluláris prionfehérje egy STI1 nevű fehérjével kölcsönhatásba lépve befolyásolja a cAMP-függő protein-kináz A és az extracelluláris szignál-regulált kináz (ERK) jelátviteli útvonalak működését, melyek közül az előbbi serkenti, utóbbi gátolja az anizomicin-indukálta apoptózist. A szerzők feltételezik, hogy a celluláris prionfehérje szabályozó tényezője lehet egyes pro- és antiapoptotikus szignalizációs útvonalaknak, így funkciójának kiesése a neuronokat érzékenyebbé teszi különböző stresszhatásokkal szemben (Lopes és mtsai., 2005; Sakudo és mtsai., 2005; Zanata és mtsai., 2002). Szintén ismerünk adatokat arra nézve, hogy a prionfehérje gátolja a Bax-mediálta pro-apoptotikus mechanizmusokat (Hetz és mtsai., 2003; Zanata és mtsai., 2002)

Az UPR szerepe a prionbetegségek pathogenezisében, sok más egyéb mellett, pontosan nem tisztázott. PrP<sup>0/0</sup> genotípusú egerekben, érdekes módon, fokozódik a proteaszóma (PS) aktivitása, és mintegy háromszorosára nő az ubiquitiniláció mértéke (Hetz és mtsai., 2003). Mindezt a PrP<sup>0/0</sup> egerekben megfigyelhető fokozódó lipid- és protein-oxidációval hozták összefüggésbe, amely a PrP<sup>c</sup> antioxidáns szerepére utal. A szintézis után hibásan tekeredett prionfehérjéket, hasonlóan más fehérjékhez, az UPR bontja le az ERAD-mechanizmus során (ERAD = endoplazmatikus retikulum asszociált proteindegradáció, részletesen lásd: 6.1.2.



fejezet). Egyes vizsgálatok szerint, ha a celluláris prionfehérje proteaszóma-mediálta lebontása zavart szenved, a citoplazmában felhalmozódó túlzott mennyiségű PrP<sup>c</sup> is neurotoxikus, ennek mechanizmusa azonban nem ismert. Ezek a szerzők hangsúlyozzák az UPR-mediálta degradáció defektusának szerepét a kórfolyamatban (Fornai és mtsai., 2006; Grenier és mtsai., 2006; Hetz és mtsai., 2003; Yedidia és mtsai., 2001).

Mindent összevetve, mindezek után is nyitott a kérdés, hogy:

- a kóros prionfehérje önmagában toxikus-e a sejtnek (*gain of function*-hipotézis),
- a kóros forma által előidézett konverzió a celluláris prionfehérje-szint csökkenését idézi elő, és a celluláris forma (funkció)kiesése okozza-e a betegséget (*loss of function*-hipotézis),
- vagy a celluláris forma túlzott mértékű felhalmozódása okoz-e toxicitást.

A prionfehérje kóros konformációjú változattá történő alakulása során, mint már láttuk, a döntően  $\alpha$ -helikális PrP<sup>c</sup> döntően  $\beta$ -redőzött másodlagos szerkezetet vesz fel (PrP<sup>res</sup>, PrP<sup>sc</sup>). Újabb eredmények szerint a savas pH és a redukáló közeg kedvez az átalakulásnak, ez a konverzió kompartmentalizációjára is következtetni enged (lásd később) (Ng és Doing, 1997). A mai általánosan elfogadott vélemény szerint a prionfehérje szerkezete alapvetően a normál konformáció, de bizonyos statisztikus valószínűséggel felvehet más konformációs állapotokat is, szélsőséges esetben igen kis valószínűséggel a kóros szerkezetet is. Ha ez bekövetkezik, spontán módon egy rezisztens, aggregálódó fehérjégóc alakul ki, amely immár a környező celluláris formákat, mint szubsztrátot felhasználva autokatalitikusan növekszik, majd kisebb góckra szétesve újabb „átalakulási centrumokat” generál (polimerizációs modell). Más elképzelés szerint egy kialakult és stabilizálódott kóros izoforma átalakítva egy normál molekulát két külön kóros alakká esik szét, majd az autokatalitikus folyamatok során képződött sok kóros fehérje aggregálódik (heterodimer modell). A kóros változat energiatartalma kisebb, a fehérje, vagy fehérjégóc így stabilisabb, ám a konverzió széles körű kialakulását a folyamat nagy aktiválási energia-szintje korlátozhatja (DeArmond és Prusiner, 1995; Edenhofer és mtsai., 1997; Gajdusek, 1986; Kovács és László, 1998; László, 1998; Ng és Doing, 1997; Prusiner, 1998; Wadsworth és mtsai., 1999).

A PrP<sup>c</sup>→PrP<sup>Sc</sup> spontán konverzió valószínűsége a fehérje génjében történt változás (mutáció, vagy bizonyos polimorfizmus-variációk) következtében nagyban nő (Prusiner, 1998). Ez az oka a genetikai alapú megbetegedéseknek. A lényegesen gyakoribb sporadikus CJ betegség kialakulása körül azonban még számtalan kérdés tisztázatlan. E betegségek

háttérben, a még bizonyítatlan és igen csekély valószínűségű spontán konverzió mellett, eddig még fel nem tárt genetikai változások is állhatnak. A külső kóros-prionterhelés szintén fontos tényező lehet, amely következményei adott genotipikus predispozíció után nagyobb valószínűséggel jelentkeznek előbb szubklinikai elváltozásokkal, majd klinikai tünetekkel, kialakult betegséggel (Gajdusek, 1986; Prusiner, 1998). Néhány éve (2005. április) a Cell c. folyóiratban publikálták, hogy szíriai aranyhőrcsög celluláris prionfehérjéből *in vitro* előállított és PMCA-technikával sokszorozott kóros prionfehérjével intracerebrálisan inokulálva egészséges hőrcsögöket, sikerült fertőzést kiváltani (bár ez nem zárja ki azt, hogy az eredeti PrP<sup>c</sup> preparátum tartalmazott más, nem azonosított ágenst is) (Castilla és mtsai., 2005a). Ezt a vizsgálatot sokan a prionhipotézis eddigi legjelentősebb bizonyítékának tekintik, a Cell a „The final proof of the prion hypothesis” címmel közöl recenziót Castilla eredeti közleményéről (Zou és Gambetti, 2005).

Az, hogy pontosan hol történik a PrP<sup>c</sup>→PrP<sup>sc</sup> átalakulás a sejten belül, még nem tisztázott. Ultrastrukturális vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy a kóros prionfehérjék endocitózissal az endoszóma-lizoszóma rendszerbe kerülnek (Laszlo és mtsai., 1992). Prionnal infektált egerek agyszövetében jellegzetesen megsokasodnak az úgynevezett multivezikuláris és tubulovezikuláris testek, amelyek egyaránt mutatnak immunjelölést kóros prionfehérjére valamint endoszómális/lizoszómális fehérjemarkerekre is (Arnold és mtsai., 1995; Laszlo és mtsai., 1992). Ezen morfológiai képletek megjelenése az endoszóma-lizoszóma rendszer túltelítettségére utalnak, jelezvén, hogy a kóros prionfehérjék megjelenésére a neuronok fokozott endocitózissal reagálnak. Ez azonban a kóros fehérjék proteáz-rezisztenciája miatt valószínűleg csak a sejt pusztulásához visz közelebb. Újabb vizsgálatok szerint a prionok a multivezikuláris testekből exocitózissal ürülő úgynevezett exoszómák révén juthatnak az extracelluláris térbe, és ezen kompartmentumok szolgálhatnak a konverzió színhelyéül is (Fevrier és mtsai., 2005).

Prusiner és munkacsoportja rekombináns prionfehérjét hordozó egereken végzett kísérletek alapján arra következtet, hogy a hatékony konverzióhoz szükséges egy eddig még nem azonosított endogén komponens, az úgynevezett X-faktor {protein-X} is (Prusiner, 1998; Telling és mtsai., 1995). Számos kísérleti adat alapján elképzelhető, hogy a hipotetikus X-faktor molekuláris chaperon, de erre direkt bizonyítékot nem ismerünk (DeBurman és mtsai., 1997; Prusiner, 1998).

#### 2.1.1.6. *Exogén fertőzés: perifériától az agyig*

Olyan PrP<sup>sc</sup>-hiányos egerekben, amelyek agyszövetébe a fehérjét túlexpresszáló szövetdarabot ültettek, nem lehetett perifériális inokulációval betegséget kiváltani még a grafitban sem. Ez arra utal, hogy a fehérje központi idegrendszerbe való eljutásához szükség van a normál prionfehérje expressziójára extracerebrálisan is (Aguzzi, 2000; Aguzzi és mtsai., 1997).

Kísérletes körülmények között fertőzött állatokon végzett kísérletek szerint a perifériális (leggyakrabban intraperitoneális) inokuláció után a lappangási időszak első fázisában a kóros prionfehérjék először perifériális immunszervekben jelennek meg, lépben, nyirokcsomók germinális centrumában, tonsillákban, appendixben. A kóros fehérjét jelző immunpozitivitás emberen ezen szervekben csak nvCJB esetében mutatható ki, sCJB-ben nem. Mivel az egész testet ért, a proliferáló sejteket elpusztító  $\gamma$ -sugárzás nem befolyásolja a betegség kialakulását, nem proliferáló immunsejtekre, mint kóros prionfehérje raktárakra {pools} terelődött a gyanú. Ezen sejtek közül a follikuláris dendritikus sejtekben (FDC) jelentős a PrP<sup>sc</sup> immunpozitivitás. B-limfocita-deficiens állatokban nem lehetett ip. inokulációval fertőzést kiváltani, tehát valamilyen módon ezen sejteknek is szerepe van a fertőzésben. Feltételezhető, hogy ezek a sejtek juttatják el a kóros fehérjét a perifériális idegi elemekhez. Azt azonban, hogy a B-limfociták ténylegesen részt vesznek-e ebben a folyamatban, vagy limfotoksinok termelésével csak az FDC stimulálásában játszanak szerepet, nem tudjuk (Aguzzi, 2000).

Bár 2005. augusztusában a Nature Medicine-ben publikálták, hogy az úgynevezett PMCA {protein misfolding cyclic amplification} technikával sikerült PrP<sup>sc</sup>-t kimutatni scrapie-vel fertőzött szíriai aranyhörcsög véréből (Castilla és mtsai., 2005b), ennek ellenére, vértranszfúzióval történő fertőzésről ezidáig még nem számoltak be. Ezért továbbra is helytálló az a feltevés, hogy a prionbetegségeket a „fertőző” jelző helyett helyesebb az „átvihető” jelzővel illetni (hasonlóan, mint Semmelweis a gyermekágyi lázat), ugyanis bár bizonyos módokon átoltható a betegség, nem a „hagyományos” fertőző betegségek módján terjed (Aguzzi, 2000).

Intraokulárisan inokulált egerekben az inokuláció után nem sokkal atipikus T-limfocita, és mikroglia-aktivációt is leírtak. (Giese és mtsai., 1998a; Giese és mtsai., 1998b; Russelakis-Carneiro és mtsai., 1999). Mint már korábban említettük, az aktivált mikroglia a humán *post mortem* anyagokban is megfigyelhető, szerepe azonban nem tisztázott (Giese és mtsai., 1998a).

Az előbb említett eredmények arra utalnak, hogy - bár hosszú ideig semmiféle immunválasz nyomát nem találták a prionfertőzés során - valamiféle „atipikus” reakció mégis megindul, amely később azonban megakad (Prusiner, 1998). Az immunrendszer tehát nem tud megfelelő választ adni e sajátos fertőzésre, viszont feltételezhetően immunsejtek juttatják el a fertőző ágenszt a perifériális idegi elemekhez. Így az immunrendszer szerepe a védekezés helyett inkább a „trójai falóhoz” hasonlítható (Aucouturier és mtsai., 1999).

Feltételezhető, hogy a nyiroksejtektől a központi idegrendszerig a perifériális idegrendszer közvetíti a fertőzést. Különböző állatkísérletekben orális vagy intraperitoneális exogén prionterhelés esetén találtak PrP<sup>Sc</sup> immunpozitivitást a Meissner és az Auerbach-féle plexusokban (enterális idegrendszer) (van Keulen és mtsai., 1999), a vagus egyes axonjai mentén (McBride és Beekes, 1999), és különböző vegetatív dúcokban (pl. a gl. coeliaca, mesenterica), és a ganglion spinalékban (McBride és Beekes, 1999). Kísérleti állatokban és humán *post mortem* mintákon PrP<sup>Sc</sup> pozitivitást mutattak ki továbbá a gerinvelő szürkeállományában, a dorsális szarvban (különösen a subst. gelatinosa Rolandi-ban), valamint a Clark-féle oszlopban (Goodbrand és mtsai., 1995). Elképzelhető tehát, hogy a gerincvelői idegeken keresztül a gerincvelő hátsó szarvába jut a fertőzés. A kóros prionfehérje axonikus transzportja még nem tisztázott (Aguzzi, 2000).

#### 2.1.1.7. *A fajspecifikus barrier kérdése*

##### 2.1.1.7.1. *Az átvitel lehetőségei és korlátai*

Két különböző faj egyedei közötti átoltásos kísérletek vegyes sikerűek: valahol nem lehetséges, valahol viszont rövidebb-hosszabb inkubációs idővel kiváltható a fertőzés más fajtól származó prion-inokulátummal. Ennek okai valószínűleg a különböző fajokban található prionfehérje szekvenciájában lévő különbségeknek és más faktoroknak (pl. protein-X) tulajdoníthatók (Prusiner, 1998). Az, hogy a prionfehérjék közti szekvencia-különbség és az inkubációs idő hossza korrelál-e, még nem bizonyított (Edenhofer és mtsai., 1997).

A prionfertőzések végső eredete kérdéses. Valószínű, hogy a priongén mutációi, illetve a ritka spontán konverzió következtében kialakulnak betegségek, melyek aztán különböző módon terjedhetnek:

- A kuru Pápua-Új Guineában kannibalizmussal.

- Az állatok között talán a placenta felfalásával, elhalt állat tetemének elfogyasztásával, vagy valamilyen eddig még nem azonosított horizontális terjedést lehetővé tevő vektor (gyaníthatóan atkák) segítségével (Wisniewski és mtsai., 1996).
- A BSE járvány esetében és a humán iatrogén CJB esetekben – ahogy Gajdusek mondja- „modern technikai kannibalizmussal” (Gajdusek, 1986). Az első esetben ugyanis az elhullott marhákból készült táppal etették a többi állatot, a második esetben pedig pl. elhunyt emberek hipofíziséből készült hormonkivonatot adtak hormonhiányos betegeknek. (iatrogén átvitelt ezen túl még cornea-transzplantáció, dura-átültetés és beültetett mély elektródák esetén írtak le (Kovács és László, 1998))

Az átolthatóság miatt a prionbetegségeket szokás összefoglaló néven angolul TSE, „transmissible spongiform encephalopathies” néven is említeni.

#### 2.1.1.7.2. *A nvCJB és a BSE*

Az „új variáns” CJB-t (nvCJB) 1996-ban írták le először Nagy-Britanniában. A sporadikustól különböző klinikai és pathológiai jellemzőiről már szóltunk. 1997 októberében publikálta Collinge és csoportja annak a hosszú kísérletsorozatnak az eredményét, mely alapján valószínűsítik, hogy az új variáns CJB és a BSE között ok-okozati összefüggés van (Hill és mtsai., 1997). Ezt bizonyítja, hogy:

1. BSE inokulátummal és nvCJB humán agykoncentrátummal fertőzött egerek hasonló inkubációs idő után betegednek meg, hasonló klinikai és pathológiai képet mutatnak.
2. Humán priongént tartalmazó transzgénikus egerek BSE prionnal fertőzve szintén a fentihez hasonló jellemzőket mutatnak.
3. Western-blottingon a BSE és a nvCJB prionfehérje-mintázata igen hasonló, és eltér minden más humán prionbetegségtől, mind a három glikoforma arányát, mind a limitált proteolízis utáni elektroforetikus mobilitást tekintve.

A nvCJB tehát valószínűleg a BSE humán formájának tekinthető, és a fertőzés a táplálkozás révén jutott át az emberre. A fenti kísérletek indirekt bizonyítékát adják annak, hogy a fajspecifikus barrier ember esetén sem abszolútizálható.

## 2.1.2. Az Alzheimer-kór (AK)

### 2.1.2.1. Bevezetés

Az Alzheimer-kór a központi idegrendszer olyan progresszív mentális hanyatlással járó betegségformája, amelyet a kórszövettanilag kóros amyloidot tartalmazó extracelluláris plakkoknak és az idegsejtnyúlványok sajátos összecsapódásának (neurofibrilláris degeneráció) együttes előfordulása jellemez (Tariska, 2000). A frontotemporális demencia mellett az úgynevezett primer kortikális degeneratív demenciák fő típusa. Öt fajtája ismert:

- 1./ Késői kialakulású (65 év felett) sporadikus változat (a leggyakoribb).
- 2./ Késői kialakulású családi halmozódású változat.
- 3./ Korai kialakulású családi halmozódású változat.
- 4./ Down-szindrómával társult Alzheimer-kór.
- 5./ Más neurodegeneratív betegségekkel kevert Alzheimer-kór (Love, 2000).

A 2-3. csoportba az összes AK eset mindegy 10%-a tartozik.

Az Alzheimer-kórt Alois Alzheimer ideggyógyász írta le először 1907-ben (Alzheimer, 1907). A betegséget sokáig ritka kórképnek tartották, a legtöbb demencia mögött vaszkuláris hátteret sejtettek. A jóléti társadalmakban azonban az átlagéletkor gyors növekedése a demens betegek számának megsokszorozódásával járt együtt, amely a demenciák differenciál-diagnosztikájának és kutatásának gyors fejlődését eredményezte. A 65 évesek között a demencia gyakorisága 1%, és ez az arány a kor előrehaladtával 5 évente nagyjából duplázódik, a 90 évesek kb. 40%-a demens (Love, 2000). Európai és amerikai epidemiológiai vizsgálatok szerint az összes demencia kb. 60-70%-a Alzheimer-kór, vagyis a betegség sokmillió embert érint a fejlett országokban (Tariska, 2000).

### 2.1.2.2. Klinikai tünetek, kórlefordulás

A betegségnek – attól kezdődően, hogy észlelhető tüneteket okoz – *négy fázisát különítik el:*

1. Presymptomatikus demencia. A környezet által is észlelhető emlékezetkihagyások jelentkeznek, a térbeli és időbeli orientáció zavara figyelhető meg. Megváltozik a szociális viselkedés: visszahúzódás, érdektelenség jelentkezik, ami a kreativitás nagyfokú csökkenésével párosul.

2. Incipiens demencia. Állandósulnak az emlékezetzavarok, jellemző a koncentráció és a térbeli orientáció zavara különösen idegen helyen, beszédben gyakori a szókeresés. Az öltözködés elhanyagolt, fáradékonyság, depresszív tünetek jelentkezhettek. Jellemző az empátia csökkenése, ami sokszor tapintatlan, antiszociális viselkedéssel párosul. Már ebben a fázisban előfordulhatnak deliráns-konfúzus állapotok és személycsere-téveszmék.

3. Középsúlyos demencia. Súlyos feledékenység jellemző, a beteg már az ismerősöket is nehezen ismeri fel. Zavar támad a mindennapi teendők ellátásában, beszédértési és szótévesztési zavarok állandósulnak, gyakoriak a gondolatismétlések. A számolási, logikai és absztrakciós képesség minimálisra csökken. Gyakran jelentkezik szorongás, félelem az egyre ismeretlenebb és bonyolultabb világtól, valamint extrapiramidális tünetek, parkinsonizmus és myoclonusok.

4. Súlyos demencia. A beteg a múlt kódében él. Nem tud tájékozódni sem térben, sem időben. Senkit nem ismer fel, 1-2 szót tud, vegetatív működéseit nem kontrollálja. Mindenben jelentős külső segítségre szorul, ágyhoz kötött. Gyakori a jelentős testsúlycsökkenés (Tariska, 2000).

A tüneti dominanciáktól függően az AK-nak több klinikai altípusát különítik el, pl. van, ahol a kognitív hanyatlás mellett domináns tünet a járászavar, van ahol a paranoia (Adams, 1997).

*A betegség kórlefordása* progresszív, de nem szükségszerűen lineáris. Időtartama a betegség felismerésétől a halálig átlag 7-10 év, de a gondos ápolás ezt jelentősen elnyújthatja. A kórlefordás gyakori jellemzője, hogy platószerű stagnálások után igen gyors, 1-2 hónap alatt lezajló erős romlások következnek be (Tariska, 2000).

### 2.1.2.3. *A betegség neuropathológiája*

#### 2.1.2.3.1. *Szöveti eltérések*

A betegség során számos hisztológiai eltérés mutatható ki, azonban egyikük sem kizárólagos markere az Alzheimer-kórnak. Sok közülük a fiziológiás öregedés során is előfordul, ám sokkal kisebb gyakorisággal.

1./ Szenilis plakkok nagyszámú jelenléte. Szférikus, 4-200  $\mu\text{m}$  átmérőjű komplex extracelluláris fehérjezárványok, fő összetevőjük az amyloid prekursor protein (APP) kóros processzingje során képződő  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) (Graham és Lantos, 2002). Több típusuk figyelhető meg. Az úgynevezett neuritikus plakk esetén az amyloid-mag körül többnyire orsószzerű disztrófiás neuritek csoportosulnak, amelyek immunoreaktívak pl. PHF-taura

(Joachim és mtsai., 1987; Wood és mtsai., 1986), APP-re (Cole és mtsai., 1991; Cras és mtsai., 1991) és ubiquitinre (Perry és mtsai., 1987). A szenilis plakkok mennyisége és eloszlása nem korrelál egyértelműen a klinikai kép súlyosságával (Graham és Lantos, 2002). Bár a szenilis plakk extracelluláris,  $\beta$ -amyloidot gyakran lehet kimutatni a neuronok felszínén (Roher és mtsai., 1988), és az endoszóma-lizoszóma rendszer különböző vezikulumaiban (Mirra és Austin, 1985; Nixon, 2004).

2./ Neurofibrilláris kötegek {neurofibrillary tangles, NFTs}. Sejtípustól függően globózus vagy lág alakú intracelluláris fehérjezárványok, melyek fő összetevője a mikrotubulus-asszociált tau protein hiperfoszforilált formája (pl. az Ammon-szarvban a lág alakú, a Meynert-magban vagy a locus coeruleusban inkább a globózus változat figyelhető meg) (Graham és Lantos, 2002). Az érett NFT a taun kívül immunoreaktív egyes proteaszóma-komponensekre, Hsp70 hő-sokk fehérjére (lásd: Megvitatás, 6.2.4 fejezet) és ubiquitinre is (Perry és mtsai., 1987). A hiperfoszforilált tau ultrastrukturálisan jellegzetes páros helikális filamenteket (PHF-tau) képez. A kettős hélixet képező dupla filament átmérője kb. 20 nm, amely 80 nm-enként, ahol a két filament csavart képez, 10 nm-re szűkül. Egy filament négy darab kb. 3 nm átmérőjű protofilamentumból épül fel (Terry, 1963; Wisniewski és mtsai., 1984; Wisniewski és mtsai., 1976). Az NFT-k száma szoros korrelációt mutat a demencia progressziójával, számuk és eloszlásuk igen fontos diagnosztikai marker (Anonymus, 1997).

3./ Neuropil fonalak {neuropil threds}. Rövid, gyakran csavart alakú argentophil rostok a neuropilben (McKee és mtsai., 1991; Perry és mtsai., 1991a). Többnyire dendritek, de előfordul köztük axon is (Schmidt és mtsai., 1993). Ultrastrukturálisan PHF-tau-t tartalmaznak, PHF-taura, neurofilamentre, ubiquitinre és acetilkolinészterázra immunoreaktívak (del Ser és mtsai., 1990; Gomez-Ramos és mtsai., 1992; Yamaguchi és mtsai., 1990). Gyakoriságuk korrelál a demencia súlyosságával és a neurofibrilláris kötegek számával (McKee és mtsai., 1991). Vita tárgya, hogy a degeneratív folyamatok, vagy aberráns neuritnövekedés következményei-e.

4./ Cerebrális amyloid angiopátia.  $\beta$ -amyloid felhalmozódás az artériák és arteriolák falában a szubarachnoideális térben, valamint az agyszövetben. A bazális membránon és a kapillárisfalakon át történhet  $\beta$ -amyloid infiltráció az agyszövetbe. Gyakorisága nem korrelál a szenilis plakkokkal és a neurofibrilláris degenerációval (Graham és Lantos, 2002).

5./ Hirano-testek. Elsősorban a hippocampus CA1 régiója piramissejtjeinek citoplazmájában előforduló pálcika vagy gömb alakú proteinkristályok (Graham és Lantos, 2002). Immunoreaktívak aktinra (Goldman, 1983), aktinkötő fehérjékre (Maciver és Harrington,



1995), taura (Perry és mtsai., 1991b), neurofilamentre (Schmidt és mtsai., 1989), az APP C-terminális fragmentálására (Munoz és mtsai., 1993) és indukálható NOS-ra (Lee és mtsai., 1999). Jelenlétük az intracelluláris fehérjedegradáció zavarára utalhat (Rossiter és mtsai., 2000).

6./ Granulovakuoláris degeneráció. Elsősorban a hippocampus CA1 régió piramisneuronjainak citoplazmájában előforduló 3-4 µm-es vakuólumok együttese (Simchowicz, 1911). Ultrastrukturálisan membránhatároltak, a vakuóla belsejében az elektron-denz mag körül elektronlucens „mátrix” helyezkedik el (Hirano és mtsai., 1968). Immunoreaktív foszforilált neurofilamentre (Kahn és mtsai., 1985), tubulinra (Price és mtsai., 1986), taura (Bondareff és mtsai., 1991) és ubiquitinre (Lowe és mtsai., 1988). Hipotézisek szerint autofág vakuólumok, amelyek a fokozott mértékben károsodott citoskeletális elemeket degradálják (Graham és Lantos, 2002).

7./ Corpora amilacea (ubiquitin-pozitív, a fiziológias öregedés során is megfigyelhető szférikus, extracelluláris fehérjegyökök) nagyobb számú jelenléte (Love, 2000).

8./ Lipofuscin felhalmozódás fokozódása (Love, 2000).

9./ Reaktív mikro- és asztrogliózis, különösen nagyfokú sejtvesztés, status spongiosus esetén, és végstádiumú amyloid plakkok körül (Graham és Lantos, 2002).

10./ Szinapszisok számának nagyfokú csökkenése, és később neuronpusztulás. A szinapszisok denzitásának csökkenése különösen jelentős a prefrontális kéregben. Mértéke erősen korrelál a kognitív hanyatlással (DeKosky és Scheff, 1990; Samuel és mtsai., 1994a; Samuel és mtsai., 1994b). Számos szinaptikus protein (pl. szinaptophysin, szinaptotagmin, rab3a, GAP43, neurogranin, stb.) mennyiségének csökkenése mutatható ki morfológiai és biokémiai módszerekkel, amely a prefrontális kéregben pl. általánosan 27-42%-os szinapsziszám-csökkenést feltételez (Davidsson és Blennow, 1998). A betegség késői fázisában különösen a hippocampus CA1 régióban, a transztorhinális- és entorhinális kéregben, a subiculumban és számos izokortikális régióban jelentős mértékű a neuronvesztés. Ennek mechanizmusa aktív sejthalál, biopsziás mintákon végzett ultrastrukturális vizsgálatok szerint jellemző morfológiai kép a kondenzált kromatin, az elektron-denz, zsugorodott citoplazma és a sérült mitokondriumok. Ez a sejtpusztulás azonban különbözik a tenyészetekben megfigyelhető „klasszikus” apoptózistól, időtartama hosszabb, a mechanizmus elnyújtott, és a molekuláris részletek sem tisztázottak még (Cotman, 1998; Jellinger és Stadelmann, 2000).

11./ Az agykéreg vertikális mikrokolumnáris szerkezetének felbomlása, amely Nissl-festéssel jól látható (Graham és Lantos, 2002).

12./ Olykor status spongiosus kialakulása. A gyors és nagyfokú sejtvesztés eredményeképpen kialakuló szivacsos léziók megjelenése sokkal kevésbé gyakori, mint a prionbetegségekben,

és elsősorban a temporális, entorhinális, inzuláris kérgeket és az amygdalát érinti (Graham és Lantos, 2002).

#### 2.1.2.3.2. Neurokémiai pathológia

Alzheimer-kóros betegek agyát vizsgálva számos neurotranszmitter-rendszer defektusát mutatták ki, amelyek gyakran kapcsolódnak össze az adott neurotranszmittert termelő sejtpopulációk különböző mértékű pusztulásával.

1./ A nucleus basalis Meynerti-ben, amely a kéreg legfőbb kolinerg bemenetét szolgáltatja, a kolinerg sejtek nagyarányú pusztulása mutatható ki. Ennek következtében az agyi acetilkolin mérhető mennyisége is jelentősen csökken (Whitehouse és mtsai., 1982). Mindezen túl kimutatták az agyi kolin-acetiltranszferáz enzim aktivitásának csökkenését is (Bowen és mtsai., 1976; Davies és Maloney, 1976), a szenilis plakkokban pedig jelentős mennyiségű kolinészteráz figyelhető meg (Friede, 1965).

2./ Szintén csökken az agykéreg szerotonerg bemeneteinek mennyisége, és az agyi szerotonin, valamint a szerotonin–metabolit 5-hidroxiindolecetsav szintje (Graham és Lantos, 2002). A dorzális raphe magban gyakoriak az NFT-k és a sejtvesztés (German és mtsai., 1987; Halliday és mtsai., 1992).

3./ Csökken az agyi noradrenalinnak, és szintetizáló enzimének, a dopamin- $\beta$ -hidroxiláznak a mennyisége is, amely a locus coeruleus noradrenerg sejtjeinek változó mértékű pusztulásával hozható összefüggésbe (Hoogendijk és mtsai., 1999; Raskind és mtsai., 1999).

4./ Egyes tanulmányok szerint jelentősen csökken az agyi NGF {nerve growth factor} és dopamin (Graham és Lantos, 2002), a szomatosztatin (Roberts és mtsai., 1985), a kortikotropin (Bissette és mtsai., 1985) és a GABA szintje is az életkori kontroll esetekhez viszonyítva. A gátlás alól felszabaduló glutamáterg principális sejtek túlműködése pedig, egyéb tényezők mellett, excitotoxicitáshoz vezethet (Graham és Lantos, 2002).

#### 2.1.2.4. Diagnózis és terápiás lehetőségek

Az Alzheimer-kórnak, a jelenlegi szakmai protokoll szerint, három diagnosztikai formája ismert (McKhann és mtsai., 1984):

1./ Biztos diagnózis, amelynek megbízhatósága 100%. Ma ezt csak biopsziás mintán vagy *post mortem* anyagon elvégzett neuropathológiai vizsgálat tudja biztosítani. A

legelfogadottabb neuropathológiai kritériumrendszer ma az úgynevezett CERAD {Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) által ajánlott. Ebben a szenilis plakkok és a neurofibrilláris kötegek gyakoriságát szemikvantitatív módszerrel (négyfokozatú skálán) határozzák meg több neocortikális területen, a hippocampusban, az entorhinális kéregben, és az amygdalában. Az így kapott értékeket a beteg életkorával és számos klinikai adattal súlyozzák (Anonymus, 1997). Mindezen túl, népszerű Braak és Braak beosztása, akik felismerték, hogy a neurofibrilláris degeneráció progressziója egy előre megjósolható mintázatot követ. A neurofibrilláris kötegek elhelyezkedése és gyakorisága alapján az AK-t hat stádiumra osztották. Braak&Braak I-II: az aszimptomatikus klinikai stádiumra jellemző, Braak&Braak III-IV: a kezdeti klinikai stádiumra jellemző, Braak&Braak V-VI: a szimptomatikus (kifejezett) klinikai stádiumra jellemző (Braak és Braak, 1991).

2./ Valószínű diagnózis, amelynek megbízhatósága 85-90%. Ennek elemei (1.) az úgynevezett progresszív demencia szindróma megállapítása pszichológiai és pszichiátriai módszerekkel, (2.) CT vagy MRI vizsgálatokkal a gócos agybántalmak (agyvérzés) kiszűrése, valamint (3.) egyéb releváns betegségek kizárása.

3./ Lehetséges diagnózis, amelynek megbízhatósága 70-75%. Ennek során a progresszív demencia szindróma megállapításra kerül, de fennáll olyan extracerebrális vagy agyi betegség, amely potenciálisan okozhat demenciát.

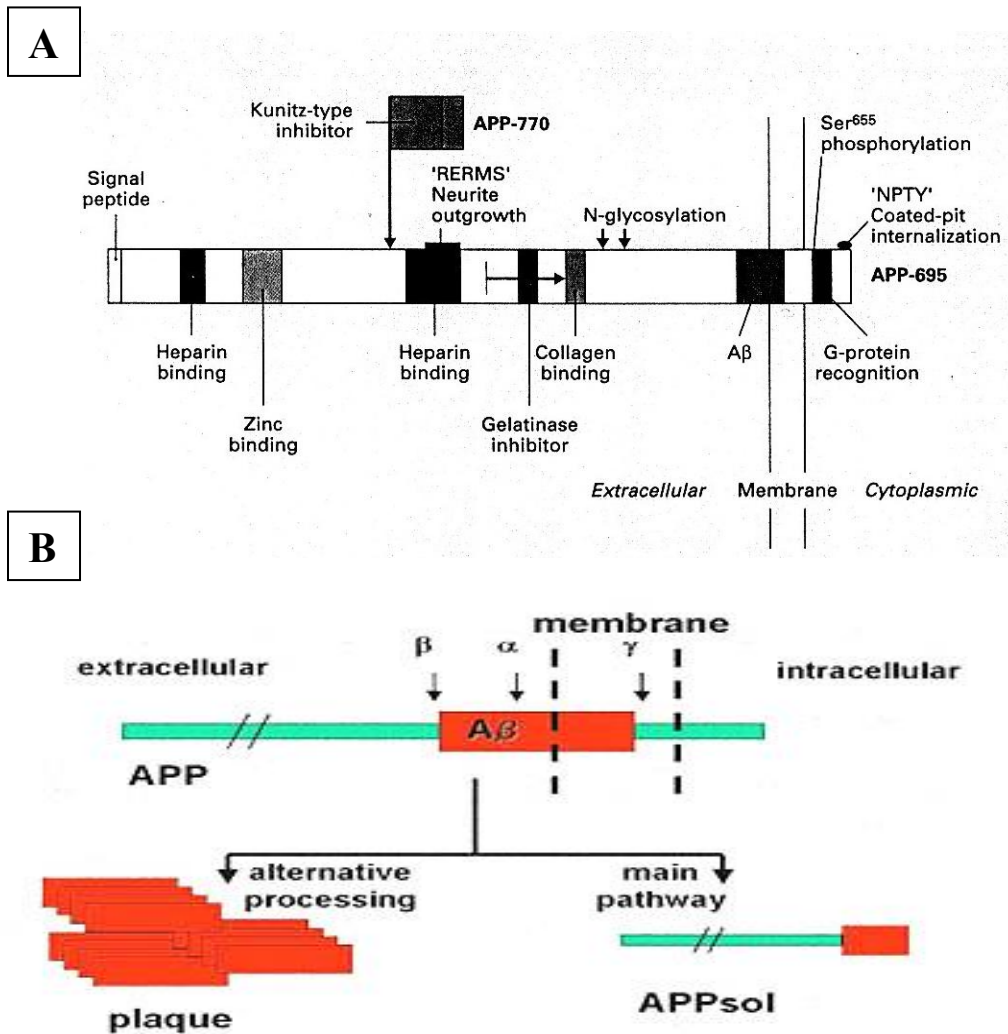
#### 2.1.2.5. *A betegség etiopathogenezise*

##### 2.1.2.5.1. *Kóros fehérjégócok képződése*

Évtizedes vita, hogy melyik elváltozás játszik nagyobb szerepet a betegség molekuláris etiológiájában: a „baptisták” szerint a  $\beta$ -amyloid, a „tauisták” szerint a neurofibrilláris degeneráció (Heese és Akatsu, 2006; Selkoe, 2001). A legújabban megjelenő összefoglalók az úgynevezett amyloid-kaszád elsődleges szerepét hangsúlyozzák, és mindezen túl, egyre többen vannak a „protisták”, akik szerint az UPR defektusa kulcsszerepet játszik a neurodegeneratív betegségek, így az AK pathogenezisében is (de Pril és mtsai., 2006; Layfield és mtsai., 2001).

A  $\beta$ -amyloid az amyloid prekursor protein (APP) kóros processzingje során képződik. Az APP egy transzmembrán glikoprotein egy kis intracelluláris és egy óriási extracelluláris doménnel (3A ábra). Funkciója ismeretlen, de feltételezhetően a sejt-sejt és sejt-mátrix kölcsönhatásban lehet szerepe (Selkoe, 2001). Génje a 21. kromoszómán található, három,

egyenként 695, 751, és 770 aminosavnyi alternatív splicevariánsa ismert. Fiziológiás esetben az APP processzingsinglének első lépése (3B ábra) az úgynevezett  $\alpha$ -szekretáz enzimek útján történik, amelyek a fehérje extracelluláris szegmensét hasítják le (Selkoe, 2001).  $\alpha$ -szekretáz valószínűleg az ADAM metalloproteáz családba tartozó TACE-proteáz és az ADAM-10, (Buxbaum és mtsai., 1998; Lammich és mtsai., 1999; Skovronsky és mtsai., 2000), bár más jelölteket is leírtak (Koike és mtsai., 1999) (ADAM: a disintegrin and metalloprotease domain; TACE: TNF $\alpha$ -converting enzyme). A  $\beta$ -amyloid két típusa az  $A\beta_{39/40}$  és az  $A\beta_{42/43}$ . Az előbbi egy szolubilisabb változat, egészséges emberek liquorában is jelen van, és az artériák és arteriolák falában felhalmozódó  $\beta$ -amyloid fő alkotója (Cerebrális amyloid angiopáthia) (Graham és Lantos, 2002). Az  $A\beta_{42/43}$  a  $\gamma$ -szekretáz és az úgynevezett  $\beta$ -szekretáz segítségével keletkezik az APP-ből úgy, hogy 15 aminosavnyi rész a fehérje TM-doménjéből, 28 aminosavnyi pedig az extracelluláris (N-terminális) részéből hasítódik ki. A  $\beta$ -szekretáz, vagy más néven BACE { $\beta$ -site APP-cleaving enzyme} egy úgynevezett transzmembrán aszpartil-proteáz, amelyet a neuronok nagy mennyiségben expresszálnak (Hussain és mtsai., 1999; Sinha és mtsai., 1999; Vassar és mtsai., 1999). A BACE hiányos egerek sokkal kisebb mennyiségű  $A\beta$ -t termelnek (Cash és mtsai., 1987; Luo és mtsai., 2001). A részleteiben még nem pontosan azonosított  $\gamma$ -szekretáz-komplexnek pedig valószínűleg része a preszenilin-1 nevű fehérje oldható formája (Wolfe és mtsai., 1999). A képződött  $A\beta$ -t más, nem specifikus proteázok (pl. inzulin-degradáló enzim, neutrális endopeptidáz) tovább metabolizálhatják (Iwata és mtsai., 2000; McDermott és Gibson, 1997; Qiu és mtsai., 1998). Az  $A\beta_{42/43}$  erősen hidrofób, aggregációra hajlamos szerkezetű proteinflagment (Graham és Lantos, 2002). A  $\gamma$ -szekretáz általi hasítás, mivel az APP transzmembrán doménjének közepén történik, feltételezhetően az endoszóma-lizoszóma rendszerben következik be. Így a  $\beta$ -amyloid mindkét változata feltételezhetőleg itt képződik, és újabb adatok szerint, a kóros prionfehérjéhez hasonlóan, a multivezikuláris testekből exocitózissal ürülő exoszómák révén juthatnak az extracelluláris térbe (Nixon, 2004; Pasternak és mtsai., 2004; Rajendran és mtsai., 2006). A  $\beta$ -amyloid hidrofóbbabb változata ( $A\beta_{42/43}$ ) így extracellulárisan aggregálódik szenilis plakkokká (Love, 2000).



**3. ábra** Az amyloid precursor protein doménszerkezete (A), és processzójének típusai vázlatosan (B)

Forrás: (Love, 2000) (A); (Chirag, 2003) (B). A magyarázatot lásd a szövegben.

A neurofibrilláris kötegek fő alkotója a hiperfoszforilált tau. A tau egy mikrotubulus asszociált protein (MAP), génje a 17. kromoszómán található (Love, 2000). Hat, 352-441 aminosavból felépülő izoformája létezik, amelyek alternatív splicevariánsok. A fehérje jellegzetessége a C-terminálison található 3, illetve 4 darab (izoformánként változik) pozitív töltésű kötődomén, amelyekkel a negatív töltésű mikrotubulusokhoz csatlakozik, és ezzel (sok más MAP fehérje mellett) stabilizálja a mikrotubulusok szerkezetét. A tau elsősorban a neuronok axonjaiban fordul elő. A mikrotubulushoz való affinitását a fehérje foszforiláltsági foka határozza meg, amelyet elsősorban szerin-treonin-kinázok és foszfatázok egyensúlya szabályoz. A hiperfoszforilált, így negatívabb töltésű tau leválik a mikrotubulusról, és aggregációra fokozottan hajlamos (Selkoe, 2001).

A kóros fehérjegyök képződésében központi szerepe van az intracelluláris protein degradációért felelős UPR-nek, erről részletesen a 2.3.6. fejezetben szólnunk.

#### *2.1.2.5.2. A betegség genetikai háttere – ismert mutációk, és az ApoE polimorfizmus szerepe az etiopathogenezisben*

Az Alzheimer-kóros esetek kb. 90%-a sporadikus, kevesebb, mint 10%-a viszont családi halmozódást mutat (familiáris AK) (Graham és Lantos, 2002; Tariska, 2000). A familiáris esetek java része korai kezdetű (65 év alatt jelentkeznek az első tünetek), míg a korai kezdetű esetek közel fele családi halmozódású. A familiáris esetek hátterében több autoszómális domináns génmutációt írtak le, 100%-os penetranciával:

- APP mutációk. Nagyon ritkák, az összes AK-esetnek mintegy 0.1%-át teszik ki, többségük pontmutáció (összefoglalva lásd: (Love, 2000)).
- Preszenilin-1 (PS1) mutációk. Az összes AK eset kb. 2%-át teszik ki, a leggyakoribb AK-mutációk. Eddig kb. negyvenet írtak le (Love, 2000; Scheuner és mtsai., 1996). A PS1 génje a 14. kromoszómán található. A PS1 (és homológja a PS2 is) a Golgi-készülék és az ER membránjában lokalizálódik, 6-9 TM domént tartalmazó fehérjék, amelyek közelebbről még nem azonosított „preszenilázok” által hasítódnak, és keletkező fragmenseik oldhatóak. A PS1 szolubilis formáját a  $\gamma$ -szekretáz proteázkomplex részeként azonosították (Lee és mtsai., 1999; Wolfe és mtsai., 1999). A PS1 mutációk megváltoztatják az APP processzingsjét, és fokozzák az  $A\beta_{42/43}$  képződését. A PS1 k.o. egerek nem termelnek  $\beta$ -amyloidot (De Strooper és mtsai., 1998).
- Preszenilin-2 (PS2) mutációk. A nagyon ritka, késői kialakulású familiáris esetekben jellemző. A PS2 génje az 1. kromoszómán található, a protein 448 aminosavnyi, mutációi fokozott  $A\beta_{42/43}$  produkciót eredményeznek (Levy-Lahad és mtsai., 1995; Rogaev és mtsai., 1995). Egyes tanulmányok szerint a PS2 mutáció serkenti az apoptózist (Graham és Lantos, 2002).

A mutációkon túl, a betegség molekuláris pathogenezisében egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak az apolipoprotein-E (ApoE) polimorfizmusának, amelyet korábban inkább hajlamosító genetikai tényezőnek tekintettek (Graham és Lantos, 2002; Mahley és mtsai., 2006; Offe és mtsai., 2006). Az ApoE a központi idegrendszerben az egyik legnagyobb mennyiségben expresszálandó lipoprotein. Fontos szerepet játszik a lipidmetabolizmusban,

szerepe van a velőshüvelyek helyes képződésében és a szinapto-dendritikus kapcsolatok folytonos újjáépülésében, a neuronális plaszticitásban. Hatásait az úgynevezett LDL-receptorokon keresztül fejti ki (low-density lipoprotein receptor). Feltételezhetőleg a neuronok membránjainak foszfolipid- és koleszterin-tartalmát szabályozó, az LDL-receptorokon keresztül ezen lipidek membránban történő szortírozását segítő faktor (Love, 2000; Tariska, 2000). Az ApoE  $\epsilon 4$  allél jelenléte erőteljesen fokozza az AK-ra való hajlamot, (Corder és mtsai., 1993), az  $\epsilon 4/\epsilon 4$  homozigóták körében 19-szer gyakoribb az AK, mint az  $\epsilon 3/\epsilon 3$  homozigóták esetén. A kockázat  $\epsilon 2 < \epsilon 3 < \epsilon 4$  sor szerint nő, ám pl. az  $\epsilon 2/\epsilon 4$  heterozigóták körében alig kevesebb az AK, mint az  $\epsilon 4/\epsilon 4$  homozigóták körében, tehát az  $\epsilon 4$  allél szerepe kitüntetett; az Alzheimer betegek 40-80%-a legalább egy  $\epsilon 4$  allélt hordoz (Gearing és mtsai., 1996; Ishii és mtsai., 1997; Tariska, 2000). Az ApoE protein megtalálható a szenilis plakkokban és a vaszkuláris amyloidban. *In vitro* adatok alapján az ApoE erősen kötődik az A $\beta$ -hoz és fokozza a polimerizációt, különösen az  $\epsilon 4$  izoforma (Rebeck és mtsai., 1993; Schmechel és mtsai., 1993).

Az ApoE fehérje két strukturális domént tartalmaz: egy 22 kDa-os N-terminális domént, amely az LDL-receptorokat köti, és egy 10 kDa-os C-terminális domént, amely a legfőbb lipiddkötő hely a molekulában. Az ApoE  $\epsilon 4$  allél génterméke (ApoE4) azonban strukturálisan eltér a többi izoformától: a 61. pozíciójű, N-terminális doménban elhelyezkedő arginin az alfa-helikális szerkezetből kilóg, és ionos keresztkötést létesít a molekula C-terminális doménjében található, 255. pozíciójű glutamáttal. Ennek következtében ez az izoforma szerkezetileg csak részlegesen feltekeredett, instabil, úgynevezett olvadt gombóc {molten globe} állapotban van. Ennek tulajdonítják, hogy az ApoE4 a többi ApoE izoformához képest sokkal erőteljesebben kötődik a membránokhoz, és ezzel károsítja is azokat. Hajlamos továbbá a membrán-transzlokációra és a fokozott degradációra is. Újabb eredmények szerint az ApoE4 az A $\beta$ -val együtt és attól függetlenül is az AK fontos etiopathogenetikus tényezője. Egyrészt, *in vitro* adatok szerint, a savas pH-jú késői endoszómák/lizoszómák belsejében a torzult térszerkezetű ApoE fokozza az A $\beta$ -produkción és destabilizálja a membránokat, melyek következtében a késői endoszómák/lizoszómák beltartalma szivárogni kezd {lysosomal leakage}, amely apoptózishoz vezethet. Másrészt, az ApoE4-ből proteolitikus hasítással képződő neurotoxikus C-terminális fragmens károsítja a mitokondriális membránokat is, amely szabadgyök-képzéséhez, energiahányhoz, illetve citokróm-C kiáramlásán keresztül szintén apoptózishoz vezethet. Károsodnak a sejtvezeték komponensei, melynek következtében a mitokondriumok sejten belüli eloszlása megváltozik,

amely lokális intracelluláris energiahányt és  $Ca^{++}$ -homeosztázis zavart okozhat. Utóbbi következtében pedig a tau hiperfoszforilációján keresztül NFT-képződés indulhat el. (Megjegyzendő, hogy az ApoE4 C-terminális fragmense önmagában is tau hiperfoszforilációt idéz elő *in vitro*.) Érdekes adatok, hogy ApoE  $\epsilon 4/\epsilon 4$  homozigótákban már fiatal korban is glukóz-utilizáció csökkenést mutattak ki. ApoE  $\epsilon 4/\epsilon 4$  transzgén egerekben pedig korán NFT-szerű fehérjeaggregátumok képződnek. Ez figyelemreméltó azért is, mert az APP-mutáns „V717F APP” konstrukciójú egértörzs egyedeinek agykérgében koruk előrehaladtával erős  $\beta$ -amyloid lerakódásokat és gliózist is ki tudtak kimutatni, ám neurofibrilláris degenerációt csak nagyon kis mértékben (Games és mtsai., 1995; Mahley és mtsai., 2006; Offe és mtsai., 2006). Az ApoE4-nek az AK etiopathogenetisében betöltött lehetséges szerepét a 4B ábra foglalja össze.

Megemlíjtük, hogy a Down-kórosok jó része életkoruk előrehaladtával nagyon korán Alzheimer-jellegű neuropathológiai elváltozásokat mutat, amely feltételezhetően azzal van összefüggésben, hogy az APP génje a 21. kromozómán található (A Down-kór a 21. kromoszóma triszómiája). Egyes Down-kóros betegek agyában már 30 éves korukban neuritikus plakkokat, NFT-eket, reaktív mikro- és asztrogliózist és neuronpusztulást mutattak ki (Graham és Lantos, 2002).

#### 2.1.2.5.3. Neurotoxikus komponensek

Az Alzheimer-kórban a betegség által érintett területeken fokozott a neurotoxikus reaktív oxidatív szabadgyökök (ROS) jelenléte (Nunomura és mtsai., 2006). Ennek oka lehet a  $\beta$ -amyloid extracelluláris akkumulációja, ApoE-okozta mitokondriális membrán-károsodás, mikroglia-túlműködés, glutamát okozta excitotoxicitás, esetleg fémionok fokozott jelenléte (Markesbery és Carney, 1999; Nunomura és mtsai., 2001; Perry és mtsai., 2000; Smith és mtsai., 2000). Megjegyzendő, hogy a ROS okozta toxicitás az agyszövetben a kor előrehaladtával, fiziológiás öregedés során is fokozódik az agy magas oxigénigénye és lipidkoncentrációja, valamint az ehhez képest relatíve alacsony endogén antioxidáns-tartalma miatt (Tariska, 2000). Ehhez járul még az a tényező, hogy a neuronok terminálisan differenciált sejtek, és a kor előrehaladtával elpusztult neuronok helyét pedig nem (vagy nem számottevő mértékben) pótolják erre a célra szolgáló őssejtpopulációk. A fentieket figyelembe véve egyes szerzők az Alzheimer-kórt (és általában a neurodegeneratív betegségeket) kórosan felgyorsult öregedésnek tekintik. (Tariska, 2000).



Alzheimer-kórban leírták számos nyomelem egyensúlyzavarát is (alumínium, kadmium, réz, vas, stb.)(Tariska, 2000). Ezek közül az érdeklődés középpontjában az alumínium áll (Klatzo és mtsai., 1965). A mai álláspont szerint azonban az Alzheimer-kór kialakulásában az alumíniumnak nincs elsődleges jelentősége, fokozott jelenléte azonban gyorsíthatja a degeneratív folyamatot (Markesbery és Ehmann, 1994).

#### *2.1.2.5.4. Immunológiai komponensek*

Számos adat bizonyítja, hogy az Alzheimer-kórban szenvedők agyában krónikus gyulladás van jelen (Graham és Lantos, 2002; McGeer és Rogers, 1992; McGreer, 1984).

- Felszaporodnak az aktivált mikroglia-sejtek, különösen a szenilis plakkok körül.
- Számos akut fázis-válaszfehérje mennyisége emelkedik meg az agyban ( $\alpha$ 1-kimotripszin,  $\alpha$ 2-makroglobulin, stb.), amelyek alkotórészei a szenilis plakkoknak is.
- Leírták a klasszikus úton történő komplement-kaszád aktiválódását is. Az aktiváció valamennyi terméke megtalálható a szenilis plakkok körül, beleértve a membrán-károsító komplexet is.

A mikroglia-túlműködés közismerten Janus-arcú, szerepét számos neurodegeneratív betegség kórokának egyik komponenseként tartják számon (pl. a prionbetegségeknel is). A sejttörmelékek fagocitózisa közben a reaktív mikroglia-sejtek ugyanis oxidatív szabadgyököket termelnek, amelyek túlzott jelenléte toxikus a környező sejtekre (Schubert és mtsai., 1998).

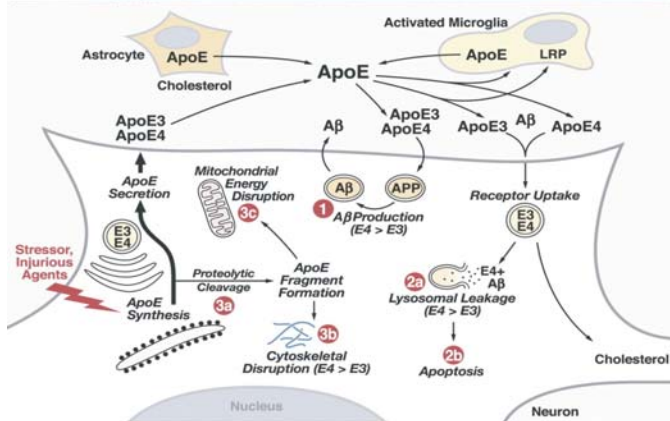
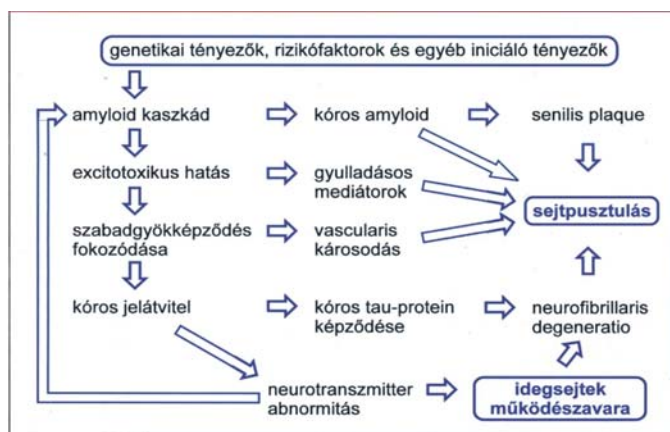
Mindezeken túl, az Alzheimer-betegségben (és kisebb mértékben a fiziológiás öregedés során is) a hypothalamus-hypophysis-rendszer működése csökken, aminek következtében csökken a szervezet alkalmazkodóképessége a gyulladáshoz, autoimmunitáshoz, tumorokhoz, és többek között ez is oka lehet a demenciákhoz társuló affektív zavaroknak (Tariska, 2000).

#### *2.1.2.5.5. Vaszkuláris komponensek*

Az agyi vérkeringés strukturális és funkcionális zavarai nagyban hozzájárulhatnak az Alzheimer-kór pathogeneziséhez. A sclerotizált erekből eleve kevesebb glukóz és oxigén

juthat el az agyi parenchimába. Mindezen túl, Alzheimer-kórban az agyi erek falában kóros amyloid rakódik le, kóros eltérések figyelhetők meg az endothélben, a membrana basalisban, a vér-agy gát szerkezetében, és az agyi glukóanyagcserében alapvetően fontos inzulin/inzulin-receptor jelátvitel is zavart szenved. Mindezek eredményeképpen csökken az agyi regionális glukó-anyagcsere, glucopaenia alakul ki. Az oxigénellátás csökkenése hypoxiás kondíciót eredményezhet, amely fokozza az oxidatív szabadgyökök képződését. A glucopaenia és a hypoxia demielinizációt, később sejtkárosodást és -pusztulást eredményezhet, az érfalak károsodás miatt pedig kóros fehérje-extravazáció indul meg, amely fokozhatja az amyloid-kaszkádot (Graham és Lantos, 2002; Tariska, 2000).

#### 2.1.2.5.6. Lehetséges integratív modell – illetve annak hiánya



**4. ábra** Az Alzheimer-kór etiopathogenezisének lehetséges integratív modellje (A), az ApoE4 szerepe az etiopathogenezisben (B).

A magyarázatot lásd a szövegben. Forrás: (Tariska, 2000) (A); (Mahley, 2006) (B).

Az egyes etiopathogenetikai komponensek áttekintése után belátható, hogy ha valaki felteszi azt a „végső” kérdést, mi dönti el, hogy egy idős ember Alzheimer-kóros lesz-e vagy sem, kissé fennköltén fogalmazva szembetalálja magát „a Biológiával”. A előbbiekben tárgyalt egyes komponensek valószínűleg mindegyike szerepet játszhat a komplex pathogenezisben, de egyéntől függő mértékben. A 4. ábrán egy lehetséges integratív modellt mutatunk be, hangsúlyozva, rengeteg kérdés vár még megválaszolásra. A modell szerint, a betegség kialakulásának végső iniciátorai rendkívül komplex genetikai tényezők (mutációk, polimorfizmusok) és rizikófaktorok (fiziológiás öregedéssel járó degeneratív folyamatok, folyamatos stressz, szellemi inaktivitás, táplálkozási tényezők, stb.) (Graham és Lantos, 2002; Tariska, 2000). Mindezek az úgynevezett amyloid kaszkádon, az ApoE4 okozta membrán-

károsodásokon és az elégtelen agyi vérellátáson keresztül lassan progrediáló folyamat során vezetnek el a végkifejletig. A tapasztalt neuronpusztulás végső okai pedig a reaktív szabadgyökök, a mitokondriumokból kiszabaduló citokróm-C, a gyulladáshoz vezető mediátorok, és az erősen lecsökkenő proteaszómális aktivitásból adódó anyagcserezavar. Hangsúlyozandó, hogy mindezen mechanizmusok csak a legvégén válnak gyorsá, az első lépések évtizedekig tartanak, a folyamat a „lassú víz partot mos” elvén teljesedik ki. Részletesebben:

- A fent említett iniciátorok eredményeképpen a  $\gamma$ -szekretáz aktivitás fokozódik, és az endoszóma-lizoszóma rendszerben folyamatosan nagyobb mennyiségű  $\beta$ -amyloid képződik, amely az extracelluláris térbe ürülve oldhatatlan proteinaggregátumokat képez, amelybe számos fehérje belekristályosodik. Később ezen aggregátumok szenilis plakkokká alakulnak (Graham és Lantos, 2002; Love, 2000).
- Az extracelluláris amyloid gyulladáshoz vezető folyamatokat indít el (mikroglia, mediátorok, komplement), a reaktív mikroglia további ROS-t termel (McGreer, 1984).
- ApoE4 az endoszóma lizoszóma rendszerben fokozza az  $A\beta$ -képződést, továbbá lizoszómális és mitokondriális membránkárosodást okoz (Mahley és mtsai., 2006; Offe és mtsai., 2006).
- A neuronok felszínén lerakódó amyloid megzavarja a normál jelátvitelt, excitotoxicitást eredményez, amely ROS-képződéshez vezet. Számos neurotranszmitter termelődése csökken, a szinaptikus jelátvitel megzavarodik (Graham és Lantos, 2002; Selkoe, 2001).
- Zavart szenved a jelátviteli-rendszer, nő az intracelluláris  $Ca^{++}$ -koncentráció, a kináz-proteáz egyensúly megbomlása miatt PHF-tau, és később NFT képződés indul be (Graham és Lantos, 2002).
- Az érlelmeszesedés okozta hypoxia és glucopaenia súlyosbítja a fentieket, a ROS fokozott jelenléte tovább roncsolja az ereket (Graham és Lantos, 2002; Tariska, 2000).
- Az intracelluláris neurofibrilláris degeneráció és a ROS jelenléte blokkolja az UPR működését, amelyet UPR-mutációk is súlyosbíthatnak ( $UBB^{+1}$ ). Mindez az intracelluláris protein-homeosztázis generális zavarához vezet (Layfield és mtsai., 2001; Song és Jung, 2004).

- Mindezen folyamatok végkifejletként a neuronok elpusztulnak. A neuronpusztulás azonban szelektív, függ például az adott sejt neurotranszmitterének típusától, kapcsolatrendszerétől, és a rendelkezésre álló celluláris biokémiai protektív mechanizmusok kapacitásától (Cotman, 1998).

### 2.1.3. Közös pontok a neurodegenerációban – konformációs neurodegeneratív betegségek

A prionbetegségek és az Alzheimer-kór mind biokémiájukat, mind pathológiájukat tekintve sok hasonlóságot mutatnak más, a humán populációban előforduló neurodegeneratív kórképekkel.

a./ Más neurodegeneratív betegségekben is megfigyelhetők az idegszövetben felhalmozódó fehérjeaggregátumok. A 2. táblázat ezeket foglalja össze néhány közismert példán keresztül.

b./ A pathológiás kép is mutat közös vonásokat, pl. a szelektív neuronpusztulást vagy a reaktív asztrocitózist. A neuronpusztulás szelektivitása az adott kórképre jellemző mintázatú (pl.: Parkinson-kór esetén a substantia nigra sejteit és a nigrostriátális pályát érinti).

c./ A sejtpusztulás mechanizmusa is mutat hasonlóságokat, pl. a  $Ca^{++}$ -homeosztázis zavarát, vagy az aktív sejthalál szerepét több esetben is felvetik (Schulz és Dichgans, 1999).

d./ Szintén közös sajátosság az ubiquitin-proteaszóma rendszer diszfunkciója, amelyről a

2.3.6. fejezetben részletesen szólnunk.

<b>Betegségcsoport neve</b>	<b>Az aggregálódó fehérje</b>	<b>Betegségek</b>
<b>Prionbetegségek</b>	Prionfehérje	Lásd: 1. Táblázat
<b>Tauopátiák</b>	$\tau$ nevű mikortubulus asszociált protein	Alzheimer-kór (itt az ún amiloid precursor proteinből {APP} kóros processzing során kihaladó $\beta$ -amyloid akkumuláció is jellemző), Down-kór, Motoneuron betegség (amyotrophic lateral sclerosis {ALS})
<b><math>\alpha</math>-synucleinopátiák</b>	$\alpha$ -synuclein	Parkinson-kór, Diffúz Lewy-test betegség (DLBD), Multiszisztémás atrófia (MSA)
<b>Poliglutamin-betegségek</b>	Poliglutamin tartalmú fehérje (az aggregációra való hajlam a poliglutamin-repeat hosszával arányos)	Hungtinton-kór (hungtinton nevű fehérje aggregál), Spinocerebelláris ataxia (SCA).

**2. Táblázat Kóros fehérjeaggregátumok néhány jellegzetes neurodegeneratív kórképben (Schulz és Dichgans, 1999) nyomán.**

## **2.2. A molekuláris chaperonok**

### *2.2.1. A molekuláris chaperonok általános jellemzése*

A molekuláris chaperonok - eredeti definíció szerint - olyan fehérjék, amelyek segítik más polipeptidek helyes feltekeredését, fehérjék összerakódását úgy, hogy önmaguk nem alkotják részét az így kialakult komplexeknek; elősegítik továbbá bizonyos fehérjék transzportját adott szubcelluláris kompartmentekbe, és indokolt esetben közreműködnek sérült fehérjék degradációjában is (Hartl, 1996). A molekuláris chaperonok szinonímájaként gyakran használják a stresszfehérje, illetve a hő-sokk fehérje (heat stress protein, HSP) fogalmakat, ám a három elnevezés nem teljesen azonos (Csermely, 2001). A stresszfehérjék különböző stresszhatásokra, a hő-sokk fehérjék kiemelten hő-stresszre reagálnak fokozott expresszióval. A három csoportot helyesen három, nagy közös metszetű halmaznak tekinthetjük, amelyeknek azonban saját részük is van (pl. az ubiquitint stresszfehérjének tekintik, de nem molekuláris chaperon, ugyanakkor a 19S RC ATPázokat sokan speciális molekuláris chaperonoknak {unfoldase-oknak, reverz chaperonoknak} tekintik (Muller és mtsai., 2006), ám stresszhatásokra nem indukálhatóak). A molekuláris chaperonok a szervezet minden sejtjében előforduló, erősen konzervált ősi fehérjék, amelyek az egész élet során nélkülözhetetlenek (Csermely, 2001). Családjaikat a molekulatömegük alapján különítik el. A főbb eukarióta chaperon-családok a következők: kis molekulatömegű hő-sokk fehérjék (Ohtsuka és Hata, 2000). Az idegrendszerben a két fő indukálható molekuláris chaperon a Hsp27 és a Hsp72 (Akbar és mtsai., 2001).

### *2.2.2. A 70 kDa-os molekuláris chaperonok*

A Hsp70 (70 kDa molekulatömeg körüliek) molekuláris chaperon-család homológjai baktériumokban (DnaK), élesztőben (pl.: SSA1-4, SSB1-2, SSC1, Kar2) és magasabbrendű eukariótákban is megtalálhatók. Utóbbi csoportban a Hsp72 és a Hsp73 a citoplazmatikus mátrixban, a mHsp70 a mitokondriumban, a Bip nevű homológ pedig az endoplazmatikus retikulum lumenében található. A Hsp73 (Hsc70, konstitutív forma) a citoplazmában állandóan jelen van, míg a Hsp72 (indukálható forma) expressziója különböző stresszhatásokra indukálódik. A Hsp70 család tagjai erősen konzervált, ATPáz aktivitással rendelkező fehérjék, amelyek általánosan különböző fehérjék hidrofób régióihoz kötnek, bár a

különböző kompartmentek homológjai más és más aminosav-mintázatot ismernek fel. Felépítésüket tekintve az N-terminálison egy 45kDa-os ATPáz-domén található, ezután egy kb. 18kDa-os peptidkötő régió, majd a C-terminálison egy 10kDa-os úgynevezett variábilis domén következik. Funkciójukat általában kochaperonok (pl.: DnaJ) segítségével töltik be (Hartl, 1996).

A különböző változatok (különösen a két citoszólikus forma) funkciói között sok átfedés van, sok az ellentmondásos eredmény is. Általánosságban a Hsc70 (konstitutív forma) a következő sejtbiológiai folyamatokban játszik fontos szerepet:

- az újonnan szintetizált peptidekhez kapcsolódva védi azokat a proteolitikus enzimektől (Hartl, 1996),
- a rosszul feltekeredett {misfolded} peptideket prezentálja a proteolitikus degradációs rendszernek (Hartl, 1996),
- részt vesz a klatrin-burkolt endocitotikus vezikulák klatrinburkának eltávolításában (Hartl, 1996),
- elősegíti különböző fehérjekomplexek disszociációját, általában véd a fehérje-aggregációtól (Koroshetz és Bonventre, 1994),
- speciális szignállal (KFERQ) rendelkező citoszólikus fehérjék lizoszómákba történő transzportját segíti (Dice, 1990; Massey és mtsai., 2006),
- részt vesz a nucleocitoplazmatikus transzportban (Kurucz és mtsai., 1999),
- erősen konzervált kalmodulin-kötő domént tartalmaz, ezért felvetik szerepét Ca-kalmodulin-függő enzimek inaktiválásában (Koroshetz és Bonventre, 1994).

A mitokondriális homológ (mHsp70) segíti a magban kódolt mitokondriális fehérjék transzportját az organelumba, és részt vesz ezen proteineknek a mitokondriális mátrixban történő feltekerésében (Koroshetz és Bonventre, 1994).

A Hsp72 (indukálható forma) expressziója stresszhatásokra (szubletális hő-sokk,  $Ca^{++}$ -koncentráció-emelkedés, különböző drogok adagolása, pH-változás, csökkenő glukóz-koncentráció, hypoxia, oxidatív-szabadgyök-terhelés) fokozódik, és védi a fehérjék natív konformációját, vagy denaturáció estén segít a renaturációban vagy a degradációban (Koroshetz és Bonventre, 1994).

Kérgi neurontenyészetben hő-sokk után a totál fehérjeszintézis csökken, de a Hsp72 mRNS-mennyisége megnövekedik (Koroshetz és Bonventre, 1994). Hippocampus-szeleten vizsgálva szubletális hő-sokk mind gliában, mind a neuronokban növeli a termotoleranciát. 24

órával a stressz után a Hsp72 magi lokalizációt mutat, majd további 48 óra múlva a stressz-válasz kiterjed az egész citoplazmára (Stacchiotti és mtsai., 1997).

Nyúl kisagyat vizsgálva Manzerra és mtsai. azt tapasztalták, hogy a kontroll csoportokban a Hsc70 mRNS mennyisége magas a Purkinje-sejtekben és a mély kisagyi magvak sejteiben. Hő-sokk után a hasonlóan magas Hsc70 mRNS-szint mellett a Hsp72 mRNS szintje is megemelkedik, ez a hatás azonban 24 óra alatt megszűnik. A beavatkozás utáni első Hsp72 mRNS-választ gliasejtek produkálják, majd ezek válasza gyorsan lecseng (Manzerra és mtsai., 1993).

Ultrastrukturális vizsgálatok során a hő-sokknak alávetett (nem idegi eredetű) sejtvonalakon a Hsp72-t a mag heterochromatikus régióiban, a citoplazmában a durvafelszínű endoplazmatikus retikulum ciszternái körül, a nukleáris membrán póruskomplexei körül, az endoszómális-lizoszómális rendszer vezikulumaiban, és a sejt felszínén is kimutatták (Kurucz és mtsai., 1999).

### 2.2.3. A Hsp72 és 73 lehetséges szerepe a Alzheimer-kórban és prionbetegségekben

Humán *post mortem* anyagon történt vizsgálatok a Hsp72 NFT-ben történő lokalizációját már korán kimutatták (Hamos és mtsai., 1991). *In vitro* kísérletek szerint, a Hsp70 és Hsp90 overexpresszió növeli a tau szolubilitását és a mikrotubulusokhoz való affinitását (Dou és mtsai., 2003). A CHIP-Hsp70 komplex elősegíti a foszforilált tau ubiquitinilációját, és ez növeli a sejtek túlélési esélyét (Shimura és mtsai., 2004). Ugyanakkor, szintén *in vitro* adatok szerint, az A $\beta$ -overexpresszió a Hsp70 gyors indukciójához vezet, a Hsp70 overexpresszió pedig megnöveli az A $\beta$ -t overexpresszáló sejtek túlélési esélyét (Magrane és mtsai., 2004). A Hsp70, Hsp40 és Hsp90 pedig szintén *in vitro* gátolja a  $\beta$ -amyloid aggregációt (Evans és mtsai., 2006).

Különböző prion-törzsekkel fertőzött egerek agyát Northern-blottal vizsgálva azt tapasztalták, hogy a fertőzés elején a Hsp70 mRNS mennyisége kissé emelkedik, a terminális szakaszban viszont erősen nő a génexpresszió. László és mtsai. ultrastrukturális vizsgálatai szerint a prionnal fertőzött egerek agyszövetében a Hsp70 endoszóma-lizoszóma eredetű struktúrákban, lizoszómákban kolokalizál a  $\beta$ -glukoronidáz nevű lizoszómális markerrel, a poliubiquitinnel és a kóros prionfehérjével (Laszlo és mtsai., 1992). A fentiek alapján elmondható, hogy a Hsp70 expressziója és sejten belüli eloszlása mutat változásokat a

prionfertőzés során, de a folyamatok pontos leírása, és különösen a folyamatok okai még nem tisztázottak.

### **2.3. Az ubiquitin-proteaszóma rendszer**

#### *2.3.1. Bevezetés*

Kulcsfontosságú, hogy a különböző funkciójú fehérjék (struktúrproteinek, enzimek, jelátviteli molekulák, stb.) a sejten belül a megfelelő helyen, megfelelő időben és módon tudják betölteni funkciójukat. Nem kevésbé fontos azonban, hogy ugyanezen fehérjék feladatuk végeztével inaktiválódjanak, vagy szabályozott körülmények között degradálódjanak. A fehérjék pillanatnyi mennyiségét a folytonosan zajló szintézis és a degradáció üteme, egymáshoz viszonyított aránya határozza meg. A sejten belül megkülönböztetjük az endoszómális-lizoszómális proteolitikus rendszert, valamint a nem-lizoszómális proteolitikus rendszereket. Az utóbbiak alatt elsősorban az ubiquitin-proteaszóma rendszert, valamint a kalcium-függő citoszólikus proteázokat (kalpainokat) értjük (Pillay és mtsai., 2002; Suzuki és mtsai., 2004; Wolf, 2004). Az endoszómális-lizoszómális rendszer bontja le a sejt környezetéből endocitózissal felvett anyagokat, köztük fehérjéket is, ugyanakkor makro- vagy mikroautofágiával, vagy chaperon-mediált autofágiával számos intracelluláris protein finoman szabályozott lebontása is lizoszómális úton történik (Cuervo, 2004).

Az UPR működésének lényege, hogy a lebontandó fehérjéhez ATP-függő módon egy ubiquitin nevű kis molekulatömegű fehérjéből felépülő, úgynevezett poliubiquitin-lánc kapcsolódik. Ezt a proteaszóma nevű multikatalitikus proteázkomplex regulációs alegysége felismeri, majd a katalitikus alegysége a lebontandó fehérjét rövid oligopeptidekre hasogatja. A szubsztrát ubiquitinilációja, az ubiquitinilált fehérjék felismerése és végül degradációja rendkívül bonyolult módon szabályozott (Glickman és Ciechanover, 2002).

Az UPR célfehérjéi rendkívül heterogén csoportot alkotnak; az UPR mintegy „virtuális polipként” millió karjával gyakorlatilag az egész intracelluláris proteinhomoeosztázist képes finoman regulálni. Általában UPR-mediálta úton bomlanak le a hő- vagy oxidatív stressz hatására rosszul felgombolyodott, és a molekuláris chaperonok által már menthetetlennek ítélt fehérjék, valamint a defektív riboszómális produktum selejtes fehérjéi éppúgy, mint számtalan szabályozó fehérje (sejtciklus-szabályozó, jelátviteli molekula, transzkripciós faktor, tumor-szupresszor, protoonkogén stb.)(Glickman és Ciechanover,

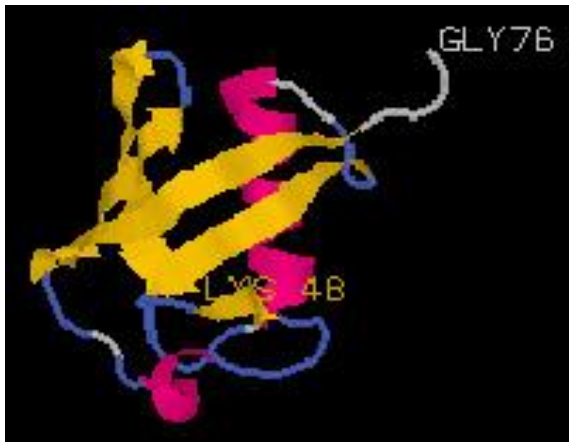


2002). Az UPR részt vesz az egyedfejlődés során szükségtelenné váló fehérjék lebontásában, az apoptózisban, egyes sejtfelszíni receptorok downregulációjában, illetve a szinapszisok molekuláris szintű átszervezésében {remodeling} is (Glickman és Ciechanover, 2002; Wojcik, 2002). Az UPR számos komponense azonban nem-proteolitikus folyamatokban is szerepet játszhat, például a proteaszóma szabályozó alegység egyes fehérjéi transzkripció regulátorok (Gonzalez és mtsai., 2002; Muratani és Tansey, 2003). Az úgynevezett monoubiquitiniláció, mint poszttranszlációs módosítás pedig fehérjéket aktiválhat, illetve inaktiválhat (Conaway és mtsai., 2002). Az úgynevezett ubiquitin-szerű fehérjéknek pedig egész családjai ismertek ma már, amelyek általában heterogén funkciójú szabályozó fehérjék (Kroetz, 2005).

A UPR és az endoszómális-lizoszómális rendszer között több struktúrális- illetve funkcionális kapcsolat is ismert. A monoubiquitiniláció számos sejtfelszíni molekula esetében endoszómális-lizoszómális lebontási szignál (Wolf, 2004), a proteaszóma katalitikus alegységének fehérjéi pedig chaperon-mediálta autofágiával bomlanak le (Cuervo, 2004). Ugyanakkor, az endoszómális-lizoszómális rendszer és az UPR szerveződése között elvi párhuzam is vonható. A fehérjedegradáció egyik alapvető elve a kompartmentalizáció, azaz a lebontandó fehérjéknek, és az azokat bontó enzimeknek a citoplazmatikus mátrixtól, illetve egyéb organelumoktól való fizikai elkülönítése. Ez az endoszóma-lizoszóma rendszer esetén speciálisan magas cukortartalmú fehérjéket tartalmazó membránnal történik (késői endoszómák, lizoszómák). Az UPR esetén a proteolízis a proteaszóma csőalakú katalitikus alegységének belső üregében, a citoplazmatikus mátrixtól teljesen izoláltan valósul meg már a prokariótákban is (auto-kompartmentalizáció) (Groll és Clausen, 2003).

Az ubiquitinnek a fehérjedegradációban játszott szerepét retikulocitákból származó sejtmentes rendszeren írták le Avram Hershko és munkatársai 1978-ban, miután korábban Goldberg és Etlinger kimutatta, hogy a retikulocita-lizátumban az ATP serkenti a fehérjebontást (Ciechanover és mtsai., 1978; Etlinger és Goldberg, 1977). Az „ubiquitin-mediálta protein degradáció mechanizmusának felderítéséért” a magyarországi születésű Avram Hershko, és munkatársai, Aaron Ciechanover és Irwin Rose 2004-ben megosztott kémiai Nobel-díjat kaptak. A proteaszóma bonyolult struktúrájának és működésének részletes felfedezése az ubiquitiniláció leírásához képest jóval később, az 1990-es években kezdődött, bár már évekkel korábban több kutatócsoport leírta a „citoplazmatikus multikatalitikus proteázt”, amelyet sokáig MCP-nek (multycatalytic protease), vagy „ingenzin”-nek neveztek. (Dahlmann és mtsai., 1985; Ishiura és mtsai., 1985).

### 2.3.2. Az ubiquitin és az ubiquitin-szerű fehérjék



#### **5. ábra Az ubiquitin NMR-vizsgálatok alapján valószínűsített szerkezeti rekonstrukciója**

(Forrás: [www.biochem.ucl.ac.uk/pictures/ubq](http://www.biochem.ucl.ac.uk/pictures/ubq))

A globuláris molekulán belüli kiterjedt H-híd rendszer jól magyarázza az ubiquitin jelentős hőstabilitását és széles pH-toleranciáját. Az ubiquitin-protein konjugációban az ubiquitin-molekula globuláris magjából kilógó C-terminális glicin vesz részt úgy, hogy a módosítandó fehérje egy lizin oldalláncának  $\epsilon$ -helyzetű aminocsoportjával izopeptid kötést létesít (Glickman és Ciechanover, 2002; Löw, 1999; Vijay-Kumar és mtsai., 1987).

Az ubiquitin 76 aminosavból álló, 8565 Da molekulatömegű kis fehérje, amely minden sejttypusban nagy mennyiségben előfordul (ubique latinul a.m.: mindenütt) (5. ábra). Konzervatív fehérje: az emberi ubiquitin aminosav-szekvenciája az élesztőtől három helyen tér el, a *C. elegans*-étől pedig mindössze egy helyen. Az ubiquitin tömör, gombolyag alakú térszerkezete egy kisebb és egy nagyobb  $\alpha$ -helixet, és 4  $\beta$ -redőt tartalmaz. Az ubiquitin térszerkezetének három eltérő sajátosságú oldala van: egy savas, egy bázikus, és egy hidrofób.

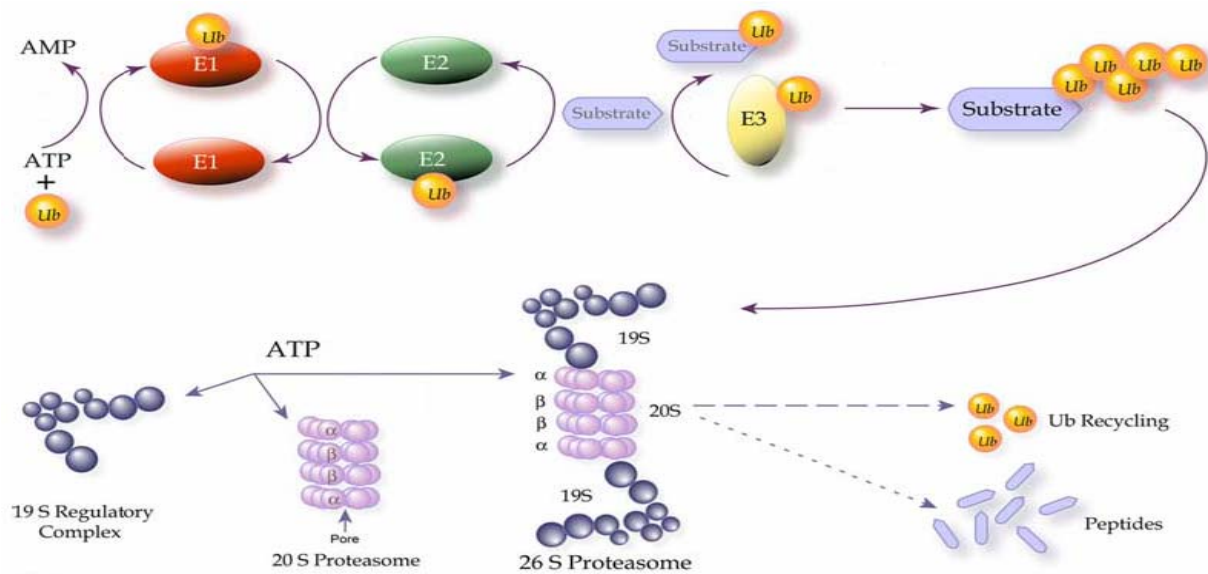
### 2.3.3. Az ubiquitiniláció és regulációja

Az ubiquitin konjugáció többlépcsős folyamat (Glickman és Ciechanover, 2002; Löw, 1999; Löw, 2000) (6. ábra).

1./ A kezdeti lépésben ATP felhasználásával tioészter kötés alakul ki az ubiquitin C-terminális glicinjének karboxilcsoportja és az úgynevezett ubiquitin-aktiváló enzim (E1) láncközi ciszteinjének szulfhidrilcsoportja között. A reakció során először ubiquitin adenilát köztestermék alakul ki inorganikus pirofoszfát felszabadulásával, majd az ubiquitin az E1 cisztein oldalláncához kötődik, és AMP szabadul fel.

2./ Az aktiválódott ubiquitin ezután az úgynevezett ubiquitin-konjugáló enzim (E2, ubiquitin hordozó fehérje / ubiquitin carrier protein) specifikus ciszteinjére kerül át.

3./ A következő lépésben két lehetőség van: előfordul, hogy az ubiquitin az E2 enzimről leválva újabb transzferálció során átkerül egy ubiquitin ligáz (E3) enzim aktív



**6. ábra Az ubiquitiniláció leegyszerűsített sémája és a 26S proteaszóma alapvető szerkezete.**

A magyarázatot lásd a szövegben. Forrás: (Burger és Seth, 2004)

cisztein oldalláncára, és ez az E3-ubiquitin a donor a célfehérjével történő amidkötés kialakításában. A másik lehetőség, hogy az ubiquitin az E2 enzimről kerül a célfehérjére, de ehhez szükség van arra, hogy az E2-höz kötött ubiquitin adapter fehérjén keresztül egy ubiquitin ligázhoz is átmenetileg hozzákapcsolódjon.

Az E1 enzim kb. 1000 aminosavból áll és 115-125 kDa molekulatömegű. Fajonként csak egy típusa ismert (VanDemark és Hill, 2005). Az E2 enzimekből többféle létezik egy fajon belül is, jellemző motívumuk az úgynevezett UBC domén. Az E2 enzimeknek 4 családját ismerjük: az egyik csak az UBC domént, a második ezen kívül egy savas karakterű C-terminális hosszabbítást, a harmadik egy N-terminális kiegészítést tartalmaz, míg a negyedikben mind a kettő megtalálható (összefoglalva lásd: (Löw, 1999)). Az E3 enzimeknek rendkívül sok fajtája ismert, egy sejten belül akár többszáz E3 működik. Javarást ezek a fehérjék felelősek az ubiquitin-célfehérje kapcsolódás, végsősoron az UPR-mediálta fehérjedegradáció specifikusságáért. Két alapvető típusuk a HECT-doménnel rendelkező E3 enzimek, ahol az ubiquitin és az E3 között tioészter kötés alakul ki, illetve a Ring-finger-típusú E3, amely csak adapter fehérjéken keresztül kapcsolódik az E2-höz kovalensen kötődő ubiquitinhez (Ardley és Robinson, 2005). Az utóbbi években újabb és újabb E3 fehérjéket írnak le, és számos már ismert fehérje E3 aktivitására derül fény. Az E1-E2-E3 enzimek, valószínűleg az ubiquitiniláció hatékonyságának fokozása érdekében, tranziens multiprotein komplexeket képezhetnek az ubiquitiniláció során (Ardley és Robinson, 2005).

Az ubiquitinilációnak két alapvető típusa a mono- és a poliubiquitiniláció. Utóbbi esetben egy, a célfehérjére már kovalensen kapcsolódó ubiquitin molekula 6-os, 11-es, 48-as,

vagy 63-as pozícióban lévő lizinjének  $\epsilon$ -aminocsoportjához egy újabb ubiquitin kapcsolódhat izopeptid kötéssel a C-terminális glicinjén keresztül. Ez az ubiquitin is ubiquitinilálódhat, és így minimum 5, de jellemzően 10-47 tagú poliubiquitin lánc alakul ki. A 48-as pozíciójú lizin oldalláncokon kiépülő poliubiquitiniláció jellemzően proteolitikus degradációs szignál (Glickman és Ciechanover, 2002). A 63-as pozíciójú lizin oldalláncokon kiépülő poliubiquitiniláció, valamint a monoubiquitiniláció azonban általában a célfehérje funkcióját megváltoztató poszttranszlációs módosítás, amely számos funkciót tölthet be.

1./ A magasabbrendű eukarióták sejtmagjában a nukleoszómális hisztonok (H2A, H2B) nagy része monoubiquitinilált formában fordul elő (uH2A, uH2B) (itt kötődik az intracelluláris ubiquitin 10%-a); ez szerepet játszik a kromatin szerkezetének a stabilizálásában. Az ubiquitiniláció ezen túl nem proteolitikus módon is szabályozhatja a transzkripciót (Conaway és mtsai., 2002; Gonzalez és mtsai., 2002; Kaiser és mtsai., 2000; Muratani és Tansey, 2003).

2./ Az ubiquitin riboszómális fehérjékhez való kötődése elősegíti a riboszómák összeszerelődését, valószínűleg a szubsztrátfehérjék átmeneti stabilizálása által (Finley és mtsai., 1989).

3./ Az ubiquitin kötődik egyes sejtfelszíni receptorokhoz (pl. limfocita homing receptor), és kísérletek arra utalnak, hogy részt vesz a sejt-sejt kölcsönhatások, a sejtadhézió szabályozásában (Rechsteiner, 1987).

4./ A sejtmembrán fehérjéinek monoubiquitinilációja ugyanakkor egyes esetekben szignál lehet az így megjelölt fehérje endoszómális-lizoszómális útvonalon történő degradációjában is (Haglund és mtsai., 2003).

5./ *Drosophila*-ban az ubiquitin kötődhet az aktinhoz és különböző integráns membránfehérjékhez. A repülőizomzat vékony filamentumaiban az ubiquitiniláció periódikus, minden hetedik aktin molekulához kapcsolódik egy ubiquitin. Ez az ubiquitin strukturális és/vagy az izomműködést befolyásoló szerepére utalhat (Löw, 1999).

Az ubiquitin-konjugáció reverzibilis: deubiquitiniláló enzimek (DUB-ok) eltávolíthatják a monoubiquitint, vagy lebontják a már felépült poliubiquitin láncokat a célfehérjéről. A deubiquitiniláció mind az UPR-mediálta proteolízis, mind metabolikusan stabil ubiquitin-konjugátumok esetén fontos szabályozó tényező. A DUB-oknak két családját ismerjük: az ubiquitin C-terminális hidrolázokat (UCH-k), és az UBP fehérjéket (ubiquitin specific processing enzymes) (Amerik és Hochstrasser, 2004).

Egy fehérje UPR-mediálta degradációjához szükséges, hogy az adott fehérje tartalmazzon olyan N-terminális aminosavavat, amelyet az E3 enzimek felismernek, illetve

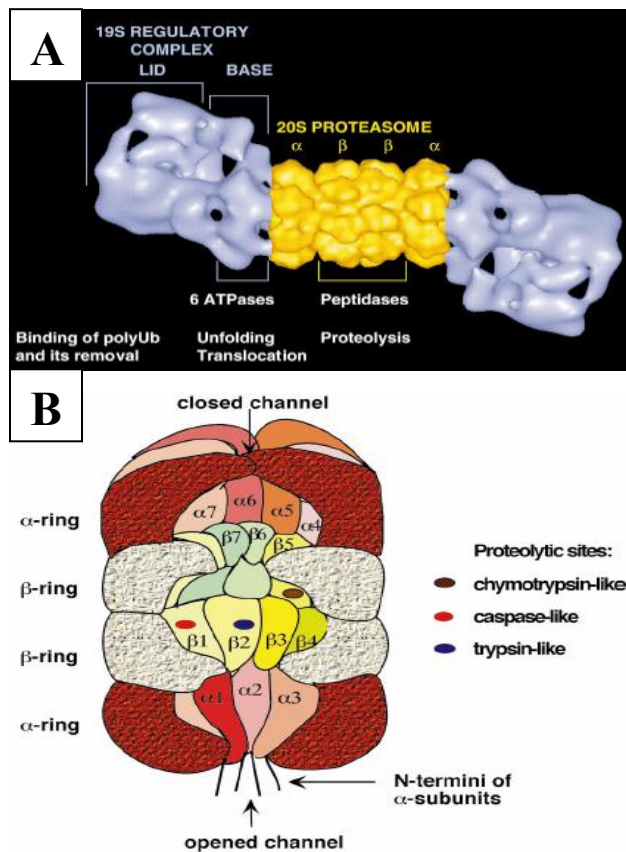
rendelkezzen könnyen hozzáférhető lizin oldallánccal. Egy citoszólikus fehérje életidejét nagymértékben az N-terminális aminosava határozza meg („N-end rule”). Ismerünk stabilizáló aminosavakat, melyek esetén az adott fehérje féléletideje akár 20 óra is lehet (metionin, szerin), míg N-terminális aszparaginsav vagy arginin esetén csak 2 perc (utóbbiakat hívjuk destabilizáló aminosavaknak). A stabilizáló és destabilizáló aminosavak az élesztőtől az emberig hasonlóak, utalván a mechanizmus ősi és evolúciósan konzervált voltára (Varshavsky, 1992). Mindezen túl leírták, hogy a “PEST”-szekvenciát tartalmazó fehérjék rövid féléletidejűek, mert ez az aminosav motívum UPR-mediálta gyors degradációra hajlamosít (Dice, 1987). A sérült térszerkezetű, vagy eleve rosszul tekeredett fehérjéket a molekuláris chaperonok, ha nem tudják a hibákat kijavítani, E3 enzimek felé, tehát az UPR-mediálta lebontás felé irányítják (Luders és mtsai., 2000).

#### 2.3.4. *A proteaszóma*

Az emlős proteaszóma (26S PS) egy 2 MDa molekulatömegű, átlagosan mintegy 70 fehérjéből felépülő, multikatalitikus proteázaktivitással rendelkező szupramolekuláris komplex ( 8. ábra), (Glickman és Ciechanover, 2002; Löw, 2000). Az emlőssejt összfehérje-tartalmának mintegy 1%-át proteaszómális proteinek teszik ki (Löw, 2000). Alapvetően két típusú alegységből áll, a szedimentációja alapján elnevezett 20S katalitikus alegységből, és általában két 19S regulátor alegységből. (Elektronmikroszkópos felvételeken láthatók regulátor alegység nélküli 20S proteaszómák, valamint csak egyik, vagy mindkét végükön 19S „sapkát” viselő proteaszómák is.) Proteaszómák az élesztőtől az emberig minden eukariótában előfordulnak, és a proteaszóma-gének sérülése általában letális (Glickman és Ciechanover, 2002). Ugyanakkor, felépítésében egyszerűbb, de szerkezetében hasonló fehérjebontó komplexek megtalálhatók az Arche- és Eubaktériumokban is (Akopian és mtsai., 1997; Bogyo és mtsai., 1997).

### 2.3.4.1. A 20S proteaszóma

Az emlős 20S proteaszóma egy összesen 28 alegységből felépülő, 15 nm magas és 12 nm széles henger alakú üreges testecske, melynek közepén egy csatorna húzódik végig (7. ábra) (Baumeister és mtsai., 1998; Glickman és Ciechanover, 2002; Lów, 2000). A csatorna alsó-felső nyílása 1.3 nm, a 20S proteaszóma belsejében négy szűkület három tágulatot választ el. Megkülönböztetünk két, egyenként kb. 59 nm<sup>3</sup> térfogatú előkamrát, és egy kb. 84 nm<sup>3</sup> térfogatú központi kamrát. A 20S proteaszóma falát  $\alpha$ - és  $\beta$ -típusú alegységek alkotják. Az alegységek négy, egyenként héttagú gyűrűbe rendeződnek úgy, hogy a két külső gyűrűt



**7. ábra** A 26S proteaszóma térbeli rekonstrukciója (A), és a 20S proteaszóma katalitikus helyeinek lokalizációja (B).

A magyarázatot lásd a szövegben. Forrás: (Baumeister és mtsai., 1998)

elzárt nyílását (nyílásait) a 19S RC ATPázok és az  $\alpha$ -alegységek ATP-dependens interakciója nyitja meg az érkező legombolyodott fehérjék számára (Baumeister és mtsai., 1998). A

csak  $\alpha$ -alegységek ( $\alpha_{1-7}$ ), a két egymás melletti belső gyűrűt csak  $\beta$ -alegységek ( $\beta_{1-7}$ ) alkotják. A központi üreget a két egymás melletti  $\beta$ -gyűrű, míg a két előkamrát egy  $\alpha$ - és egy  $\beta$ -gyűrű közösen alkotja. Az  $\alpha$ - és a  $\beta$ -gyűrűk közti határon kis ablakocskák vannak, amelyeken feltételezhetően a központi kamrában lebontott fehérjékből származó oligopeptidek távoznak (összefoglalva lásd: (Lów, 2000)). Az  $\alpha$ -típusú alegységeknek egy erősen konzervált N-terminális kiterjesztése van, melynek egy része  $\alpha$ -hélixet alkot a központi  $\beta$ -réteg tetején. A konzervált N-terminális kiterjesztés a szubsztrátoknak a 20S proteaszóma belseje felé történő továbbításában, vagy a 20S és a 19S alegységek közötti kapcsolat kialakításában játszhat szerepet. A 20S PS-nak az  $\alpha$ -alegységek N-terminális kiterjesztései által

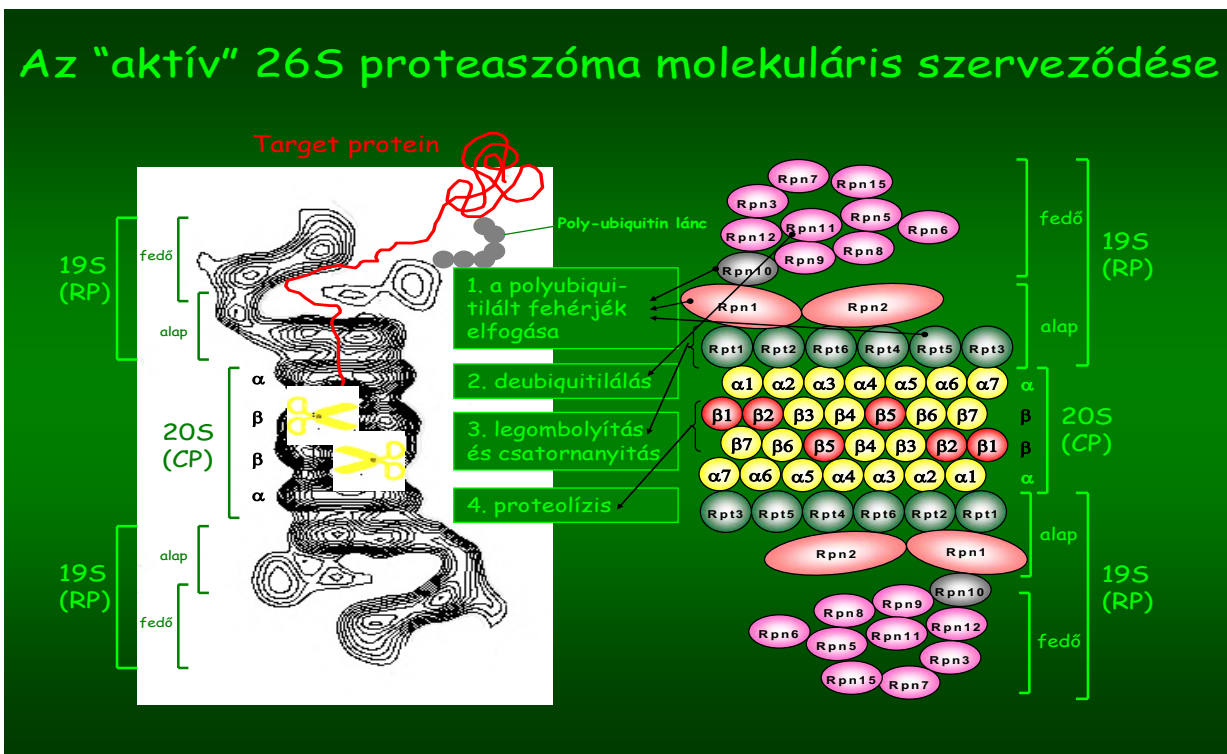
fehérjék lebontása a központi kamrában történik, a szűk előkamrák, és a közbülső szűkületek feladata valószínűleg a fehérjék visszacsavarodásának megakadályozása. A központi kamrában egyszerre egy fehérje lebontása történik, és amíg ez teljesen be nem fejeződik, új fehérje bontása nem kezdődik meg (Baumeister és mtsai., 1998). A katalitikus centrumok a központi üreg falát alkotó egyes  $\beta$ -alegységek N-terminális treonin-oldalláncai. Összesen hat (3x2) katalitikus helyet különítettünk el (7B ábra). A két  $\beta_1$  alegység a kimotripszin-szerű, hidrofób aminosavak mellett hasító aktivitásért, a két  $\beta_2$ -alegység a tripszin-szerű, bázikus oldalláncok mellett hasító aktivitásért, a két  $\beta_5$  alegység pedig a savas oldalláncok mellett hasító peptidil-glutamil-peptid (kaspáz-szerű) aktivitásért felelős. A katalitikus  $\beta$ -alegységek aktív centruma egy proszekvencia autokatalitikus hasításával válik szabaddá. A katalitikus  $\beta$ -alegységek N-terminális treonin-oldalláncai katalitikus (aktív) nukleofilok és protonakceptorok is egyben, így a régen szerin-proteázok közé sorolt 20S PS-t biokémiai szempontból ma az „N-terminális nukleofil hidrolázok” prototípusaként tartják számon. Az emlős 20S proteaszóma esetén elkülöníthető még egy elágazó oldalláncok mellett, és egy kis semleges aminosavak mellett hasító enzimaktivitás is (összefoglalva lásd: (Lőw, 2000)). A 20S PS működésének végtermékei átlagosan 7-9 aminosavnyi oligopeptidek, amelyek az  $\alpha$ - és a  $\beta$ -gyűrűk közti határon elhelyezkedő, már korábban említett kis ablakocskákon távozhatnak. A végtermékek hosszát korábban a katalitikus helyek egymástól való távolságával magyarázták, de mivel a végtermék oligopeptidek hossza erősen változó (átlagosan csak 7-9 aminosavnyi!) ez a pusztán szterikus okokra hivatkozó magyarázat feltételezhetőleg nem elégséges (Baumeister és mtsai., 1998). A 20S PS-ből kijutott oligopeptideket a citoplazmatikus mátrixban elhelyezkedő exopeptidázok bontják tovább aminosavakig (Lőw, 2000).

#### 2.3.4.2. A 19S RC

Az eukarióta 20S PS-hoz kapcsolódó 19S regulátor alegység egy 700 kDa-os, kb. 20-féle fehérjéből felépülő bonyolult komplex (700 kDa-os proteaszóma-aktivátor, PA700, a *Drosophilában*  $\mu$ -részecskének nevezik) (Glickman és mtsai., 1999). Egy 20S alegységhez egy vagy két 19S RC kapcsolódik, de a 20S szabadon is előfordul. A 19S RC prokariótákban nem található meg, bár Goldberg és munkatársai leírtak egy Archebakteriális proteaszóma regulátort is, amely azonban jelentősen különbözik az eukarióta 19S-től (Benaroudj és Goldberg, 2000).

A 19S RC két fő részből áll: egy alapkomból (base) és egy fedőkomból (lid). Az alapkomból hat, ATPáz aktivitású fehérjét (Rpt1-6), és két nem ATPáz aktivitású fehérjét (Rpn1-2) tartalmaz. A fedőkomból 13 nem ATPáz aktivitású fehérjéből épül fel (Rpn3-13) (Glickman és mtsai., 1998; Glickman és mtsai., 1999).

A regulációs ATPázokat sok esetben eredetileg nem a proteaszóma részeként írták le, ezért többféle elnevezéssel is illetik őket. Élesztőmodellel leginkább a már említett „Regulation protein ATPase” {Rpt}, illetve a „Regulation protein non-ATPase” {Rpn} elnevezések használatosak (Glickman és mtsai., 1998). Magasabbrendű eukariótákban azonban ma már elsősorban a leírója után elnevezett Dubiel-féle nomenklatúrát használják, amely a szedimentáció alapján sorolja be a 19S komplex fehérjéit, így a hat regulációs ATPáz S4, S6a, S6b, S7, S8 és S10b néven nevezi (Dubiel és mtsai., 1995; Gorbea és mtsai.,



**8. ábra A 26S proteaszóma részletes alegység szerkezete, és az egyes alegységek funkciói.**

A részletes magyarázatot lásd a szövegben. Forrás: [www.rinshoken.or.jp/MO/fw/pa700.gif](http://www.rinshoken.or.jp/MO/fw/pa700.gif) (Prof. Dr. Keiji Tanaka ábrája, módosította: Dr. Lőw Péter).



1999); a továbbiakban mi is ezeket az elnevezéseket használjuk.

A 19S RC ATPázok az úgynevezett AAA-ATPáz családba sorolhatók (ATPases associated with various cellular activity). Ezen fehérjék strukturálisan közös sajátossága, hogy egy rendkívül konzervatív ATPáz doménnel rendelkeznek, valamint tartalmaznak egy előrejelezhető, kb. 200 aminosavból álló, kétszeresen feltekeredett, a családon belül nagy homológiát mutató szekvenciaszakaszt az N-terminális közelében. Az AAA-ATPázok funkcionálisan azonban rendkívül heterogének; eddigi ismereteink szerint: proteaszómális ATPázok, részt vesznek egyes vezikulák fúziójában, a peroxiszóma biogenezisben, a fehérjék mitokondriumokba történő irányításában, és a transzkripció szabályozásában. Közös sajátosságuk még, hogy rendszerint gyűrű alakú oligomereket képeznek, és gyakran katalizálják protein-komplexek szétesését. Utóbbi alapján „reverz chaperonoknak”, vagy „unfoldase”-oknak is nevezik őket (Ogura és Wilkinson, 2001).

A 19S RC alapvető feladatai: a szubsztrát-ubiquitin konjugátum felismerése, megkötése, az ubiquitin leválasztása – deubiquitiniláló enzimek megkötése (a megkötött szubsztrátról felszabadított ubiquitin-molekulák újabb lebontandó fehérjékhez kapcsolódhatnak), a szubsztrát legombolyítása, a 20S PS alsó-felső nyílásának megnyitása, illetve zárása, és a legombolyított szubsztrát transzlokációja a 20S PS katalitikus kamrájába (Liu és mtsai., 2002). Mindezekért elsősorban az alapkomplex ATPázai felelősek, az evolúciósan fiatalabb nem ATPáz molekulák feladata valószínűleg az alapkomplex szerkezetének stabilizálása. Néhányuk (S1-2) köti a deubiquitiniláló enzimeket és a poliubiquitin láncot, illetve maga is rendelkezik deubiquitiniláló aktivitással (S13-14) (Ferrell és mtsai., 2000; Gorbea és mtsai., 1999; Liu és mtsai., 2002). A legújabb eredmények szerint, a 19S RC- poliubiquitinilált fehérje kapcsolat létrejöttéhez, a 20S PS kapunyitáshoz, és a szubsztrát transzlokációjához elegendő a 19S RC ATPázok ATP kötése, míg az ATP hidrolízise csak a szubsztrát kihajtogatásához szükséges (Liu és mtsai., 2002). Így, bár az amidkötések hidrolízise exoterm folyamat, az UPR-mediálta fehérjedegradáció mégis energiaigényes, egyrészt a kapcsolódó ubiquitin aktivációja (E1+ubiquitin), másrészt az imént említett szubsztrát-unfolding energiaigénye miatt.

#### *2.3.5. Az UPR szubcelluláris lokalizációja*

Az UPR különböző komponenseinek intracelluláris lokalizációját elsősorban sejtenyészeteken és élesztőmodellen vizsgálták részletesen. A proteaszóma a sejtben

mindenütt előfordul, mind a citoplazmában, mind a magban, szubcelluláris eloszlása viszont nem egyenletes (Gordon, 2002; Rivett, 1998; Wojcik és DeMartino, 2003).

Az UPR komponensei mitotikus sejtekben gyakran mutatnak prominens magi lokalizációt, amely profázisban perikromoszómális, anafázisban pedig elsősorban a magorsófonalakkal asszociálódik (Amsterdam és mtsai., 1993), utalván arra, hogy az UPR intenzíven részt vesz a sejtciklus kivitelezésében, szabályozásában (Brooks és mtsai., 2000). A proteaszóma egyes  $\alpha$ -alegységei magi lokalizációs szignált tartalmaznak, és megfigyelték, hogy a proteaszóma képes gyors mozgásra a magi és citoplazmatikus kompartment között (Reits és mtsai., 1997). Újabban sejttenyészeteken leírtak olyan magi testeket, úgynevezett klasztoszómákat, amelyek immunpozitívak az UPR számos komponensére (E1, 20S, 19S, ubiquitin), továbbá hő-sokk fehérjékre (Hsp70), és egyes transzkripciót szabályozó proteinekre (c-fos, c-jun). Hasonló magi testeket találtak *in vivo* patkány agy hipotalamikus neuroszekréciós sejtjeiben is, és megfigyelték, hogy hipertóniás NaCl injekció hatására számuk fokozódik, míg proteaszóma-gátlás hatására eltűnnek (Lafarga és mtsai., 2002).

A citoplazmában a proteaszóma asszociálódhat intermedier filamentumokkal, illetve nagy mennyiségben található meg az ER-membránja mentén sejttenyészetekben (Enekel és mtsai., 1998; Gordon, 2002). Élesztőben GFP-fúzionált 20S és 19S alegységek szintén a perinukleáris endoplazmatikus retikulum mentén lokalizáltak nagy mennyiségben. Ennek oka feltételezhetően a riboszómákon képződő hibás fehérjék lebontása, az UPR intenzív szerepe a fehérje minőségi kontrollban {protein quality control}(Enekel és mtsai., 1998).

Szintén élesztőkön és egyéb sejtvonalakon figyelték meg, hogy a proteaszóma gyakori a sejt pericentroszómális régiójában, a mikrotubulus organizátor régióban (MTOR) (Wojcik és DeMartino, 2003). A MTOR-t ezért gyakran nevezik citoplazmatikus proteolitikus centrumnak is. Ennek feltételezhető oka az, hogy itt bomlanak le a mikrotubulusok által szállított defektív fehérjék. Elméleti, és nem eldöntött kérdés, hogy azért szállítják oda a mikrotubulusok a hibás fehérjéket, mert ott lokalizálódnak nagyobb számban proteaszómák, vagy azért gyűlnek a MTOR köré a proteaszómák, mert oda szállítódnak a defektív fehérjék a mikrotubuláris retrográd transzport segítségével; többen az utóbbi verziót tartják valószínűnek (Bence és mtsai., 2001). Proteaszóma-inhibítorok (pl. laktacisztin) adagolása esetén a MTOR-proteolitikus centrumban átmeneti fehérjeaggregátumok alakulnak ki (aggreszómák), ugyanakkor mikrotubulus depolimerizációt segítő mérgek (pl. kolhicin) hatása csökkenti az aggreszómák képződését (McNaught és mtsai., 2002). Az aggreszómák nagyszámú képződése fokozza a makroautofágiát, és egyes vélemények szerint az aggreszómák az egyes

neurodegeneratív betegségekben megfigyelhető Lewy-testek előalakjai lehetnek (McNaught és mtsai., 2002).

Patkány hepatocitákban kvantitatív immunogold elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint a 20S PS-t reprezentáló arany szemcsék 16%-a magban lokalizált, 14%-a az ER-membránjával asszociálódott, és 70%-a diffúzan helyezkedett el a citoplazmatikus mátrixban (Rivett és mtsai., 1992). Emberi máj szöveten a hepatociták 60-70%-ban elsősorban magi, míg a fennmaradó részben elsősorban citoplazmatikus immunlokalizációt mutattak (Tanaka és mtsai., 1989). Patkány agyban korai vizsgálatok diffúz magi és citoplazmatikus 20S PS festést találtak mind a neuronokban, mind a gliasejtekben (Kamakura és mtsai., 1988; Mengual és mtsai., 1996).

Emberi agyban jól ismert számos neurodegeneratív betegségben megtalálható fehérjezárvány ubiquitin-immunreaktivitása, amely diagnosztikus marker is egyben (Alves-Rodrigues és mtsai., 1998). Néhány tanulmány szerint egyes pathológiás fehérjezárványok 20S PS-ra is immunpozitívak Alzheimer-kórban, illetve diffúz Lewy-test betegségben (neurofibrilláris göcök {NFTs}, Lewy-testek, kortikális Lewy-testek) (Ii és mtsai., 1997; Kwak és mtsai., 1991). Ezekben a betegségekben az S6a 19S RC ATPáz-ra szintén immunpozitívnak bizonyultak a NFT-k és a Lewy-testek (Fergusson és mtsai., 1996). A spinocerebelláris ataxiában (SCA-3) megfigyelhető intranukleáris aggregátumok pozitívak 20S PS-ra, és számos 19S RC komponensre (Schmidt és mtsai., 2002). E helyen említjük meg, hogy a NFT-k Alzheimer-kórban, a Lewy-testek Parkinson-betegségben, illetve a kortikális Lewy-testek diffúz Lewy-test betegségben szintén immunpozitívnak bizonyultak a Hsp70 molekuláris chaperonra (Hamos és mtsai., 1991; McNaught és mtsai., 2002).

### *2.3.6. Az UPR szerepe a neurodegenerációban*

A UPR neurodegenerációs betegségekben betöltött szerepe igen sokrétű lehet. Számos neurodegeneratív betegségben egyre több mutációt ismerünk, amelyek az UPR egyes komponenseit érintik, és ezek eredményeképpen csökken a proteaszómális protein-degradáció határfoka (pl. mutáns ubiquitin {UBB<sup>+1</sup>} az Alzheimer-kórban, mutáns parkin {E3 aktivitású enzim}, vagy mutáns PGP9.5/UCH-L1 {deubiquitiniláló enzim} a Parkinson-betegség egyes ritkább variációiban) (Layfield és mtsai., 2001). Az UBB<sup>+1</sup> mutáns esetén az ubiquitin C-terminális 75. aminosavban egy dinukleotid deléció következtében a lánccsúzó 76. aminosav (glicin) egy 20 aminosavból álló, lánchosszabbító nonszensz szekvenciával helyettesítődik. Az UBB<sup>+1</sup>-ből felépülő poliubiquitin láncot a deubiquitiniláló enzimek nehezen bontják, így

az egész proteolízis megakad; az UBB<sup>+1</sup> a 26S PS kompetitív inhibitorának tekinthető. Az UBB<sup>+1</sup> *in vitro* fokozza a Hsp expressziót és az apoptózist. Az UBB<sup>+1</sup> nem csak az Alzheimer-kórban van jelen, bár ebben az esetben igen nagy mennyiségben fordul elő. Mennyisége az öregedéssel fokozatosan növekszik nem-neurodegeneratív agyszövetben is, sőt, előfordulása nem korlátozódik az agyra, a máj Mallory-testjeiben is kimutatták (Ross és Poirier, 2004; Song és Jung, 2004).

Kimérték, hogy a PS aktivitása a Parkinson és Alzheimer betegségek érintett területein erősen lecsökken (Keller és mtsai., 2000a; McNaught és mtsai., 2003). Ennek több, egymástól sem független oka lehetséges. Egyrészt a mutációk következtében kialakuló elégtelen ubiquitiniláció (lásd fent). Másrészt a mutáns, és/vagy az oxidatív stressz következtében megnövekedett hidrofób felszínnel rendelkező, aggregálódó sérült fehérjék fizikailag gátolhatják a PS működését (pl. hiperfoszforilált tau, vagy  $\beta$ -amyloid Alzheimer-kórban, PrP<sup>Sc</sup> különböző eredetű és típusú prionbetegségekben, stb. (Bence és mtsai., 2001; Song és Jung, 2004), lásd még: 2. táblázat. A  $\beta$ -amyloid *in vitro* komplexet képez a 20S proteaszómával, és gátolja annak kimotripszin-szerű aktivitását (Christie és mtsai., 1999). Primer kortikális neurontenyészetben az A $\beta$ <sub>42/43</sub>-kezelés hatására az ubiquitin-konjugátumok mennyisége és az E1 enzim expressziója nő, míg a 26S PS aktivitása csökken (Gregori és mtsai., 1995). Az oxidatív stressz ugyanakkor a proteaszóma alegységeit is károsíthatja. Mindezek alapján a konformációs neurodegeneratív betegségeket újabban szokás R.J. Mayer terminológiája után „ubiquitin-lebontási betegségeknél” {ubiquitin catabolic disorders} is nevezni (Layfield és mtsai., 2001).

Mindezekon túl, a neurodegeneratív betegségeknél megfigyelhető aktív sejtpusztulásban szintén fontos szerepe lehet az UPR-nek. Mint már korábban említettük, számos pro- és antiapoptotikus faktor az UPR közreműködése révén degradálódik (pl. p53, I-NF $\kappa$ B, a kaszpáz-inhibitor IAP-család tagjai). Így logikus, hogy a PS gátlása *in vitro* pro- vagy éppen antiapoptotikus hatású, függően a vizsgált sejt típusától, a sejtciklus pillanatnyi állapotától, a PS inhibíció időbeli kinetikájától és mértékétől, valamint az inhibitor minőségétől (Ding és Keller, 2001; Wojcik, 2002). Az *in vitro* eredmények humán neurodegeneratív betegségekre való adaptációját azonban óvatosan kell kezelni (Ding és Keller, 2001).

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Ahogy azt már a bevezetésben is említettük, bár mind a molekuláris chaperonok, mind az ubiquitin-proteaszóma rendszer ma a molekuláris biológiai kutatások érdeklődésének középpontjában állnak, sem a molekuláris chaperonok sem az UPR egyes komponenseinek *in vivo* sejtszintű és regionális eloszlásáról nem ismerünk átfogó munkát sem humán egészséges kontroll és neurodegeneratív agymintákon, sem patkány agyban. PhD munkám alapvető céljával a következőket tűztük ki:

- Az antitestek specificitásának tesztelését, és olyan epitópfeltárási módszerek kidolgozását, amelyek segítségével az UPR számos komponensét lokalizálhatjuk patkány agyban, valamint kontroll és neurodegeneratív humán agymintákon.
- Az ubiquitin, az UPR komponensei közé tartozó 19S RC APTázok és a 20S proteaszóma immunlokalizációját egészséges humán és kontroll patkány agyon.
- A Hsp72 és Hsp73 molekuláris chaperonok, az ubiquitin, a 19S RC APTázok és a 20S proteaszóma immunlokalizációját Alzheimer-kóros és CJ beteg humán *post mortem* agymintákon; a szubcelluláris és regionális festési mintázatok összevetését a vulnerábilis sejtek és a betegség által érintett neuronpopulációk eloszlásával.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Humán esetek leírása

A humán *post mortem* anyagon végzett vizsgálatainkhoz hét neuropathológiailag igazolt Creutzfeldt-Jakob beteg, öt neuropathológiailag igazolt (CERAD-definitív) Alzheimer-kóros és tíz, nem neurodegeneratív életkori kontroll esetet használtunk. A szelektált kontroll esetekben előző vizsgálatok semmilyen neuropathológiai elváltozást nem mutattak ki. A betegek adatait az 3. táblázat tartalmazza.

Eset	Életkor (év)	Nem	PMI (óra)	Közvetlen halálok	Megjegyzés
sCJB1	73	F	<24	Tüdőgyulladás	129MM
sCJB2	61	F	<24	Tüdőembólia	129MM
sCJB3	69	M	23	Arrhythmia	129MM
sCJB4	56	F	6	Tüdőgyulladás	129MM
sCJB5	72	F	14	Tüdőgyulladás	129MM
sCJB6	61	F	6	Cachexia	129MM
sCJB7	71	F	15	Tüdőgyulladás	129MM
AK1	65	F	<6	Tüdőgyulladás	Braak V.
AK2	70	M	15	Myocardiális inf.	Braak VI.
AK3	79	F	6	Tüdőgyulladás	Braak V-VI.
AK4	86	F	12	Tüdőgyulladás	Braak V-VI.
AK5	62	M	<24	Tüdőgyulladás	Braak V.
KO1	35	M	21	Pitvarfibrilláció	-
KO2	69	M	12	Szívelégtelenség	-
KO3	76	F	45	Izomgyulladás	-
KO4	77	F	11	Légzési elégtelenség	-
KO5	71	F	16	Agyödéma	-
KO6	65	M	11	Keringési-légzési elégtelenség	-
KO7	69	M	11	Légzési elégtelenség	-
KO8	67	M	11	Tüdőgyulladás	-
KO9	74	M	11	Tüdőgyulladás	-
KO10	48	F	11	Légzési elégtelenség	-

### 3. **Táblázat A vizsgált humán esetek adatai**

sCJB: sporadikus Creutzfeldt-Jakob betegség; AK: Alzheimer-kór (Braak és Braak által megállapított stádiumban); KO: kontroll eset ismert neurodegeneratív betegség nélkül; PMI: *post mortem* idő; 129MM: metionin-metionin homozigóta a priongén 129 kodonján

#### **4.2. A felhasznált patkányok (Dark Agouti)**

Vizsgálatainkat 43-47 napos hím Dark Agouti patkányokon végeztük (Az állatokat a Charles Rivers Magyarország Kft. gödöllői laboratóriumában tenyésztették, 5 hetes korban kerültek át az Országos Pszichiátriai és Neurológiai Intézet (OPNI) állatházába. A Dark Agouti törzs származása és tenyésztési licensze: Harlan, Olac Ltd, Shaw's Farm, Blackthorn, Bicester, Oxon, UK.). A állatokat folyamatosan ellenőrzött körülmények között tartottuk ( $21\pm 1$  °C hőmérsékleten, 12 órás, reggel hat órakor kezdődő fény-sötétség ciklus szerint). Egy ketrecben négy állatot tartottunk. Standard táp és ivóvíz folyamatosan az állatok rendelkezésére állt.

#### **4.3. Western-blotting analízis**

##### *4.3.1. Humán agyminták preparálása*

A vizsgálatokat négy kontroll (nem neurodegeneratív betegségben elhunytakból származó) és három Alzheimer-kórban elhunytból származó temporális kérgi mintán végeztük. Az agyszövetből előzőleg citoszól-preparátumot készítettünk a következő módon. Kb. 1 gramm natív agyszövetet homogenizáltunk húsz ütemmel Potter-Elvehjem homogenizátorral 2 ml jéghideg, 0.3 M-os, proteáz-inhibitor tartalmú szukrózoldatban. A homogenátumot háromszoros térfogatúra hígítottuk a homogenizáló oldattal, majd centrifugáltuk ( $600 g_{\max}$ , 10 perc). A felülúszót ismét centrifugáltuk ( $5500 g_{\max}$ , 10 perc), ezzel megkaptuk a poszt-mitokondriális felülúszót (PMS). A PMS újabb centrifugálásával ( $140.000 g_{\max}$ , 10 perc) kapott felülúszót használtuk citoszólként. A citoszól-preparátumot proteáz-inhibitor tartalmú lízispufferrel kevertük (pH = 7.4) (Roche Diagnostics GmbH) 1:1 arányban, fehérjetartalmát Bredford módszerével meghatároztuk, majd a mintákat  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

##### *4.3.2. Western-blotting protokoll*

###### 1./ Mintaelőkészítés

- A géltre való felvitel előtt denaturálás (forralás 5 percig).

###### 2./ Gélelektroforézis

- Az SDS tartalmú, 7.5, 12, illetve 15%-os poliacrilamid gélen minden zsebbe 15 µg Laemmli-pufferben oldott fehérje került, megfelelő molekulásúly-marker mellé (SIGMA). Az elektroforézis 10, majd 20 mA konstans áramerősség mellett kb. 100 perc volt.

### 3./ Blottolás

- Az elektroforézis után a géleket PVDF-membránra blottoltuk (Hybond-P, Amersham Biosciences) 100 V konstans feszültség mellett 1 órán át Mini-PROTEAN II-típusú készülék (Biorad) segítségével.

### 4./ Immunreakció

- Blokkolás (3% tejpor tartalmú PBS {SIGMA} oldatban) 1 óráig.
- Első ellenanyag mosópufferben egy éjszaka. (Mosópuffer: 1,5% tejpor és 0,1% Tween20 tartalmú PBS-oldat. Az első ellenanyagok listáját, azok specifikációját és titereit a 5-6. táblázatok tartalmazzák.)
- Mosás mosópufferben 3X10 percig.
- Második ellenanyag (HRP-konjugált anti-nyúl IgG, 1:200 {EnVision™, DAKO, Glostrup, Dánia} a nyúl poliklonális antitesteknél, HRP-konjugált anti-egér IgG, 1:2000 {SIGMA} az anti-tubulin antitestnél) 60 percig.
- Mosás mosópufferben 3X20 percig.

### 5./ Előhívás

- A blottpapírt ECL (Amersham-Pharmacia) oldatban áztattuk 1 percig, majd KODAK röntgenfilmre hívtuk elő.

## 4.4. Fénymikroszkópos immunhisztokémia

### 4.4.1. *Humán agyak immerziós fixálása és beágyazása*

A humán agyakat 10%-os pufferolt (PBS-ben felvett) formalinban fixálták 3-4 hétig, majd a kimetszett blokkokat csapvizes mosás és dehidratálás után paraffinba ágyazták. Vizsgálatainkhoz hippocampus-temporális kéreg, neocerebellum és nyúltvelő blokkokból 5 µm vastag metszeteket készítettünk szilanizált tárgylemezre.

### 4.4.2. *Patkány agyak perfúziós fixálása és beágyazása*

A patkányokat 35 mg/kg i.p. nembutállal elaltattuk, thorakotomizáltuk, majd transzkardiálisan perfundáltuk Zambóni-fixálóval (4% paraformaldehid (w/v%), 15% telített



pikrinsav (v/v%, 0.1 M-os PB-ben, pH = 7.4). A perfundált állatok agyát kiboncoltuk, az agyakat egy éjszakán át utófixáltuk Zambóni-fixálóban 4<sup>0</sup>C-on, dehidratáltuk, majd paraffinba ágyasztuk. A blokkokból 5 µm vastag metszeteket készítettünk szilanizált tárgylemezre a caudoputamen, a hippocampus, a dorsal-medial raphe és a cerebellum-nyúltvelő szintjén, Paxinos és Watson atlasza alapján (Paxinos G, 1986).

#### 4.4.3. Epitópfeltárási módszerek

Mind a humán, mind a patkány agyakon az immunhisztokémiai festések előtt döntően hőindukáta epitópfeltárási módszereket (HIER) alkalmaztunk. Neurodegeneratív humán agyakon, a fehérjezárványokban található epitópok feltárásához több, komplex feltárási protokollt próbáltunk ki és hasonlítottunk össze. A dolgozatban bemutatott festések előtti epitópfeltárási protokollokat a 4. táblázat részletezi és foglalja össze.

Kód	A feltárási módszer leírása
A	Mikrohullámú kezelés (600 W) 0.01 M citrátpufferben (pH = 6.00) 15 percig.
B	Mikrohullámú kezelés (600 W) 0.05 M TBS-ben (pH = 8.00) 7 percig.
C	Mikrohullámú kezelés (600 W) TE-pufferben (Tris/EDTA: 10 mM / 1 mM, pH = 9.00) 15 percig.
D	Telített pikrinsav 15 percig, autoklávozás 121 °C-on 10 percig, 96%-os hangyasav 10 percig, 4 M guanídium izotiocianát 4 °C-on 120 percig.
E	96%-os hangyasav 5 percig, mikrohullámú kezelés 0.01 M citrátpufferben (pH = 6.0) 10 percig.
F	96%-os hangyasav 1 percig, mikrohullámú kezelés 0.01 M PBS-ben (pH = 7.4) 10 percig.
G	80%-os hangyasav 1 percig, mikrohullámú kezelés 0.01 M PBS-ben (pH = 7.4) 10 percig.
H	80%-os hangyasav 1 percig, mikrohullámú kezelés 0.01 M citrátpufferben (pH = 6.0) 10 percig.
I	Proteináz-K emésztés 5 percig.
J	85%-os hangyasav 1 percig, autoklávozás 100 °C-on 10 percig 0.01 M citrátpufferben (pH = 6.00).
K	Autoklávozás 100 °C-on 10 percig 0.01 M citrátpufferben (pH = 6.00).

#### 4. Táblázat A dolgozatban bemutatott fénymikroszkópos immunhisztokémiai reakciókhoz használt epitópfeltárási módszerek leírása.

Azt, hogy az egyes antitestek esetén melyik epitópfeltárási módszert (módszereket) alkalmaztuk, az 5-6. táblázatok mutatják be.

#### 4.4.4. Az antitestek karakterizálása és specificitásuk

Munkánkhoz számos kereskedelmi, és kereskedelmi forgalomban nem kapható, de referált antitestet használtunk. Mindezen antitestek technikai adatait, referenciáit, az immunfestéshez alkalmazott epitópfeltárási módszereket, valamint az alkalmazott titereket a

5-6. táblázatok foglalják össze. A kereskedelmi forgalomban nem kapható antitesteket Western-bloton teszteltük (9, és 13F ábrák).

<i>Antitest</i>	<i>Származás</i>	<i>Típus</i>	<i>Hígítás humán agyon</i>	<i>Hígítás patkány agyon</i>	<i>Hígítás kettős fluoresz- cens jelöléshez patkány agyon</i>	<i>Epitóp- feltárás humán agyon</i>	<i>Epitóp- feltárás patkány- agyon</i>
<b>20S proteasóma, katalitikus mag (<math>\alpha/\beta</math>)</b>	Affinity, U.K.	pAb	1:100; 1:1000 <sup>A</sup>	1:2.000	-	A/C	A/C
<b>20S proteasóma, <math>\alpha 3</math> alegység</b>	Affinity, U.K.	mAb, IgG2b, clone MCP257	1:50	1:500	1:10	A/C	A/C
<b>20S proteasóma, <math>\beta 3</math> alegység</b>	Affinity, U.K.	mAb, IgG1, clone MCP102	1:50	1:500	-	A/C	A/C
<b>19S RC S8</b>	Affinity, U.K.	mAb, IgG2b, clone P45- 110	1:20	1:100	-	A/C	A/C
<b>Ubiquitin</b>	DAKO, Dánia	pAb	1:1.000; 1:50 <sup>C</sup>	1:2.000	1:200	A/C + E/F/G/H/I <sup>D</sup>	A/C
<b>Calmodulin</b>	SIGMA-Aldrich, Magyarország	mAb, IgG1, clone 2D1+6D4+ 1F11	-	1:50	-		A
<b>SH-PTP2</b>	Santa Cruz Biotechnology, USA	pAb	1:50	-	-	A	-
<b>Citokróm-C</b>	SIGMA-Aldrich, Magyarország	pAb <sup>E</sup>	1:100	-	-	A	-
<b>Prion-protein (PrP<sup>Sc</sup>)</b>	Senetek, USA	mAb, clone 3F4	1:300	-	-	D	-
<b>(Hiperfosz-forilált) tau</b>	Pierce Biotechnology, USA	mAb, IgG1 clone AT8	1:200	-	-	K	-
<b><math>\beta</math>-amyloid</b>	NovoCastr Laboratories, U.K.	mAb, IgG1, clone 6F/3D	1:100	-	-	J	-
<b>GFAP</b>	DAKO, Dánia	pAb	1:5.000	-	-	A	-

### 5. táblázat A felhasznált kereskedelmi antitestek specifikációinak összefoglaló táblázata

A betűkódokkal jelölt epitópfeltárások leírásai a 4. táblázatban találhatóak. pAb: nyúl poliklonális antitest (kivével a citokróm-C antitest, lásd: <sup>E</sup>); mAb: egér monoklonális antitest; <sup>A</sup>: Western-blotting titer humán eritrocita-eredetű 20S PD preparátumon; <sup>C</sup>: Immunogold elektronmikroszkópia titer humán mintákon; <sup>D</sup>: Az E/F/G/H/I epitópfeltárásokat az adott antigén betegség-specifikus fehérjezárványban való esetleges előfordulásának kimutatására használtuk; <sup>E</sup>: a citokróm-C antitest kecskében termeltetett szérum. (A felső indexszel nem jelölt titerek a fénymikroszkópos immunhisztokémiában használt hígításokat jelentik.)

<i>Antitest</i>	<i>Származás</i>	<i>Referencia</i>	<i>Típus</i>	<i>Hígítás humán agyon</i>	<i>Hígítás patkány agyon</i>	<i>Epitópfeltárás humán agyon</i>	<i>Epitóp- feltárás patkány agyon</i>
<b>20S proteaszóma – “A” antitest</b>	C. Gorbea	-	pAb	1:100	1:500	A	-
<b>20S proteaszóma – “B” antitest</b>	C. Gorbea	-	pAb	1:100; 1:1.000 <sup>A</sup> ; 1:25 <sup>C</sup>	1:500	A/C + E/F/G/H/I <sup>E</sup>	A/C
<b>19S RC S7</b>	RJ. Mayer	(Low és mtsai., 2000)	pAb	1:500; 1:5.000 <sup>A</sup>	1:10.000	A/C + E/F/G/H/I <sup>E</sup>	A/C
<b>19S RC S4</b>	C. Gorbea	(Matilla és mtsai., 2001)	pAb	1:1.000; 1:10.000 <sup>A</sup> ; 1:50 <sup>C</sup>	1:7.000; 1:100 <sup>D</sup>	A/C + E/F/G/H/I <sup>E</sup>	A/C
<b>19S RC S6a</b>	RJ. Mayer	(Low és mtsai., 2000)	pAb	1:500; 1:5.000 <sup>A</sup>	1:3.000	A/C + E/F/G/H/I <sup>E</sup>	A/C
<b>19S RC S6b</b>	RJ. Mayer	(Fergusson és mtsai., 1996; Low és mtsai., 2000)	pAb	1:500; 1:5.000 <sup>A</sup> ; 1:25 <sup>C</sup>	1:3.000	A/C + E/F/G/H/I <sup>E</sup>	A/C
<b>19S RC S10b</b>	RJ. Mayer	(Low és mtsai., 2000)	pAb	1:50; 1:500 <sup>A</sup>	1.500	A/C	A/C
<b>Hsp72</b>	Kurucz I.	(Kovacs és mtsai., 2001)	pAb	1:500; 1:5.000 <sup>A</sup>	1:10.000 ;	B + E/F/G/H/I <sup>E</sup>	B

## **6. táblázat A felhasznált, kereskedelmi forgalomban nem kapható antitestek specifikációinak összefoglaló táblázata**

A betűkódokkal jelölt epitópfeltárások leírásai a 4. táblázatban találhatóak. pAb: nyúl poliklonális antitest; <sup>A</sup>: Western-blotting titer humán agyhomogenátumon; <sup>C</sup>: Immunogold elektronmikroszkópia titer humán mintán; <sup>D</sup>: immunogold elektronmikroszkópia titer patkány agy mintán; <sup>E</sup>: A G/H/I/J/K epitóp-feltárásokat az adott antigén betegség-specifikus fehérjezárványban való esetleges előfordulásának kimutatására használtuk. (A felső indexszel nem jelölt titerek a fénymikroszkópos immunhisztokémiában használt hígításokat jelentik.)

### **4.4.5. Fénymikroszkópos immunhisztokémiai protokoll**

Fénymikroszkópos immunhisztokémiai festéseink során a következő protokollt követtük:

- Deparaffinálás xylolban és leszálló alkoholsorban (2X20 perc xylol, abszolút, 96-90-70-50%-os etanol 10-10- percig, majd 5 perc desztillált víz).
- Epitópfeltárási lépések (lásd: 4.4.3. fejezet).
- Az endogén peroxidáz aktivitás blokkolása 0.03%-os hidrogén-peroxiddal (DAKO) 10 percig, majd 2X5 perc mosás PBS-ben.
- Nem specifikus fehérje-kötőhelyek blokkolása 3%-os tejporban (SIGMA) 30 percig nedves kamrában szobahőmérsékleten.
- Primer antitest 1.5% tejport tartalmazó PBS-ben hígítva 2 óráig, nedves kamrában, szobahőn (a használt antitesteket lásd: 4.4.4. fejezet), majd 3X5 perc mosás PBS-ben.

- Másodlagos antitest (HRP-enzimekkel kovalensen kapcsolt polidextránszálhoz konjugált anti-egér/anti-nyúl IgG keverékkel 30 percig, nedves kamrában, szobahőmérsékleten (EnVision™, DAKO), majd 3X5 perc mosás PBS-ben.
- Előhívás HRP-szubsztráttal (DAB) (DAKO) 2-15 percig, fénymikroszkópos kontroll alatt, majd mosás desztillált vízben.
- Kontrasztfestés hematoxilinnal 3 percig .
- Kékítés 10 percig csapvízben, majd desztillált vizes öblítés.
- Szárítás, majd lefedés VectaMount™ száraz lefedővel (Vector Laboratories).

Festéseink specificitását a következő kontrollokkal ellenőriztük:

- “No first antibody kontroll”: a primer antitest helyett 1.5% tejpört tartalmazó PBS-ben inkubáltuk a metszeteket.
- Pre-immun szérum kontrollok: a primer antitestek helyett az anti-20S-B, az anti-S6a, és az anti-S6b preimmun szérumával, valamint még egy indifferens, normalizált nyúl-preimmunnal (DAKO) inkubáltuk a kontroll metszeteket a felhasznált nyúl poliklonális antitestekkel megegyező koncentrációban (a nyúl poliklonális szérumok specificitásának teszteléséhez).
- Az egér monoklonális antitestek specificitásának teszteléséhez IgG1 és IgG2b izotípusú, anti-*Aspergillus niger* glukóz-oxidáz antitesteket használtunk a felhasznált anti-egér monoklonális antitestekkel megegyező IgG-koncentrációban. (Az *Aspergillus niger* glukóz-oxidáz nincs jelen az emlős szövetben, és nem is indukálható).

#### **4.5. Fluoreszcens kettős jelölések és konfokális mikroszkópia**

A dolgozatban bemutatott ubiquitin/20S PS  $\alpha 3$  kettős jelöléseket 5  $\mu\text{m}$  vastag, szilanizált tárgylemezre húzott patkány agy metszeteken végeztük. A festési protokoll a nem specifikus fehérje-kötőhelyek blokkolásáig bezárólag hasonló volt a 4.4.5. fejezetben leírtakkal. A metszeteket a primer antitest oldatában egy éjszakát inkubáltuk 4 °C-on, nedves kamrában. A kettős jelölésekhez használt antitest-titereket lásd az 5. táblázatban. A másodlagos antitest az anti-ubiquitin esetén Alexa Fluor 488 fluoreszcens csoporttal jelölt kecske anti-nyúl IgG (1:200, Molecular Probes), az anti-20S $\alpha 3$  esetén Alexa Fluor 546 kecske anti-egér IgG (1:200, Molecular Probes) voltak. A metszeteket 488 nm-es argon, és

543 nm-es hélium/neon lézerrel világítottuk meg. A vizsgálatokhoz Zeiss LSM 510 lézer konfokális mikroszkópot használtunk.

#### **4.6. TUNEL-módszer (sejtpusztulás-detektálás)**

Ahhoz, hogy egyes fehérjék citoprotektív szerepét vizsgálhassuk, szükség van a pusztuló sejtek detektálására. Erre a TUNEL (TdT dUTP nick endlabelling) módszert alkalmaztuk, amelynek során a fragmentálódó DNS-végeket észleljük a pusztuló sejtek magjában. Az internukleoszómális DNS fragmentáció az apoptotikus sejtpusztulás jellemző biokémiai markere, de a TUNEL-pozitivitást ennek ellenére óvatosan kell értékelni (részletesen lásd.: Megvitatás, 6.2.3. alfejezet). A reakció során a FITC-cel jelölt szabad DNS-végeket AP-konjugált anti-FITC-cel kapcsoltuk, ez jelentős jelerősítő. A reakciókat 5 µm vastag, szilanizált tárgylemezre húzott metszeteken végeztük a következő protokoll szerint:

- Deparaffinálás (lásd.: immunhisztokémiai protokoll).
- Mosás Tris-EDTA pufferben (TE-puffer készítése: 500 µl Tris HCl törzsoldat {2 M, pH = 8.0}+ 400 µl EDTA törzsoldat {0.25 M, pH = 8.0} összeöntve, és 100 ml-re kiegészítve desztillált vízzel) 2X10 percig.
- Enyhe proteináz-K emésztés a fixálás okozta keresztkötések fellazítása érdekében (2 µg/ml, 20 percig szobahőmérsékleten), majd mosás TE-pufferben 2X10 percig.
- Inkubálás TUNEL-pufferben ( „A” és „B” oldatok egyenlő térfogatarányú összeöntéséből) 10 percig; „A”-oldat: 50 mM Tris HCl, és 0.4 M kálium-kakodilát, { pH = 6.6}; „B”-oldat: 5 mM CoCl<sub>2</sub>.
- Inkubálás TUNEL-reakcióelegyben 2 óráig 37 °C-os termosztátban, nedves kamrában. A reakcióelegy összeállítása az In situ Cell Death Detection Kit, AP {Cat. No. 1 684 809}, Boehringer-Mannheim protokoll alapján: 1 térfogat „Enzim-oldat”, (TdT {terminális dezoxiribonucleotidil-transzferáz enzim} oldata), 9 térfogat „Jelölő oldat”, (FITC-cel konjugált dUTP). A módszer beállításakor alkalmazott kontrollokra a reakciókeverék helyett csak TUNEL-puffer került a háttérjelölés megállapítása céljából.
- Mosás 2x SSC-pufferben (20x törzsoldat: 3 M NaCl, 0.3 M Na-citrát, pH = 7.0, ezt 10x-re kell hígítani desztillált vízzel) 2X15 percig.
- Mosás TBS-ben (pH = 8.8, SIGMA) 15 percig.

- Blokkolás TTBS+ 3%-os BSA oldatban 30 percig szobahőn (TTBS: 1000 ml TBS + 0.5 ml Tween20 detergens).
- Inkubálás AP-konverter + TTBS 1:4 térfogatarányú elegyében 4<sup>0</sup>C-on nedves kamrában egy éjszakán át (AP-konverter: alkalikus foszfatáz-konjugált anti-FITC, a Boehringer kit része). A módszer beállításakor alkalmazott kontrollokra csak TTBS oldatot tettünk.
- Mosás TTBS-ben 2X10 percig, majd TBS-ben 5 percig.
- Előhívás Fast Red TR/Naphtol AS-MX Kittel (SIGMA) jelintenzitástól függően 15-45 percig, majd reakció-leállítás, kontrasztfestés hematoxilinnal, fedés, lásd: immunhisztokémiai protokoll.

#### **4.7. Posztembedding immun-elektronmikroszkópia**

Vizsgálatainkat Alzheimer-kórban szenvedő betegből származó biopsziás mintákon (temporális kortex), és Dark Agouti patkány agyakon végeztük. A biopsziás mintákat immerziósan fixáltuk egy éjszaka, a patkány agyakat perfúziósan fixáltuk. Mindkét esetben a következő összetételű fixálót használtuk: 3% paraformaldehid, 0.2% (v/v) glutáraldehid, 1% (v/v) szukróz, 3 mM CaCl<sub>2</sub> 0.1 M-os nátrium-kakodilátban felvéve. A perfundált patkány agykból hippocampus gyurus dentatus régiót vágunk ki. A biopsziás humán mintákat, valamint a kivágott patkány agy régiókat (gyurus dentatus) egy éjszaka 0.1 M-os nátrium-kakodilátban mostuk 4<sup>0</sup>C-on, majd 0.5% (w/v)-os OsO<sub>4</sub>-dal utófixáltuk, majd 2.5% (w/v) uranil-acetáttal blokkban kontrasztosítottuk. A mintákat ezután aralditba ágyasztuk a következő protokoll szerint:

- Dehidratálás felszálló alkoholsorban (50, 70%-os etanol 15 percig 1X, majd 96%-os és absz. etanol 15-15 percig 2X).
- Inkubálás propilén-oxidban (epoxi-propán) 15 percig.
- Inkubálás propilén-oxid-araldit 3:1, majd 1:3 arányú elegyében, majd tiszta aralditban.
- Kiöntés blokkba, majd polimerizáltatás 2 napig 60<sup>0</sup>C-os termosztátban.

A blokkok kifaragása után a metszés Reichert-Jung típusú ultramikrotómmal történt. A kb. 70 nm vastag metszeteket nikkel gridre gyűjtöttük. Az immunreakciót 50 µl-es cseppek tetején, három lépéses, “biotin-antibiotin-gold konjugátum” módszerrel végeztük a következő protokoll szerint:

- Maratás 5%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldatában 5 percig szobahőmérsékleten, majd 3X5 perc mosás nanotisztaságú vízben.

- Mosás PBS-ben 5 percig.
- Mosás 1% BSA tartalmú PBS-ben 5 percig.
- Blokkolás 3% tejpor-tartalmú PBS oldatában 30 percig, szobahőmérsékleten.
- Elsődleges antitest 1.5% tejpor-tartalmú PBS oldatában hígítva, egy éjszaka, nedves kamrában, 4<sup>0</sup>C-on. (Az elsődleges ellenanyagok listáját, azok specifikációját és titerait az 5-6. táblázatok tartalmazzák.)
- Mosás 1% BSA tartalmú PBS-ben 3X5 percig.
- Másodlagos antitest (biotinilált anti-nyúl, 1:100; Vector Laboratories) 1 óráig, nedves kamrában, szobahőmérsékleten.
- Mosás 1% BSA tartalmú PBS-ben 2X5 percig.
- Mosás 1% BSA tartalmú TBS-ben 2X5 percig.
- Mosás 1% BSA tartalmú TTBS-ben (0.1% Tween20) 5 percig.
- Harmadlagos antitest (anti-biotin-gold konjugátum 10, illetve 20 nm-es aranykolloiddal) 1% BSA tartalmú TTBS-ben (0.05% Tween20) 5 óráig, nedves kamrában, szobahőmérsékleten.
- Mosás TBS-ben, 3X5 percig.
- Mosás nanotisztaságú vízben 3X5 percig.

Festéseink specificitását a következő kontrollokkal ellenőriztük:

- “No first antibody kontroll”: a primer antitest helyett 1.5% tejpor-tartalmú PBS oldatában inkubáltuk a metszeteket.
- Pre-immun szérum kontrollok: a primer antitestek helyett az anti-20S-B preimmun szérumával, valamint még egy, normalizált nyúl-preimmunnal (DAKO) inkubáltuk a kontroll metszeteket a felhasznált nyúl poliklonális antitestekkel megegyező koncentrációban (a nyúl poliklonális szérumok specificitásának teszteléséhez).

Az elkészült immunfestett metszeteket enyhe ólom-citrátos utókontrasztosítás után Jeol 100 CX és Hitachi 7100 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

## **4.8. Morfometriai és statisztikai eljárások**

### *4.8.1. Western-blotting csíkok denzitás-mérése*

A 20S-B, S4 és S6b Western-blottokat digitalizáltuk, és Quantity One szoftver segítségével meghatároztuk a specifikus csíkok relatív optikai denzitását. A kapott adatokat Student's T próbával értékeltük ( $N = 5$ ,  $P < 0.05$ ). A statisztikai elemzésekhez itt is, és a továbbiakban is a Statistica®6 szoftvert használtuk.

### *4.8.2. Aranyszemcsék számolása elektronmikroszkópos felvételeken*

Vizsgálatainkhoz a humán mintákból morfológiailag ép és sérült temporális kérgi neuronokat, a patkány agy mintákból gyrus dentatus szemcsesejteket fotóztunk 4000x nagyítással. A fotónagyítással együtt 12.000x nagyítású felvételeken 1500 pontú négyzetháló segítségével határoztuk meg az egyes sejtekhez tartozó, a felvételen látható citoplazma és mag területét, valamint a citoplazma és a mag területén található aranyszemcsék számát. A humán mintákon kb. 400, a patkány agy mintákon kb. 550  $\mu\text{m}^2$ -nyi területet számoltunk végig. A számolás után meghatároztuk az 1  $\mu\text{m}^2$ -nyi magra, illetve citoplazmára jutó átlagos aranyszemcse számot. A kapott adatokat Student's T próbával értékeltük ( $P < 0.05$ ).

### *4.8.3. Szemikvantitatív értékelés fénymikroszkópos metszeteken*

Humán agy metszetein az ubiquitin, a Hsp72, a 20S-B, valamint az S4, S7, S6a, S6b és S10b 19S RC alegységek immunfestéseinek intenzitását szemikvantitatív értékelés (score) segítségével kvantifikáltuk négyfokozatú skálán: - (0): nincs reakció, + (1): gyenge festésintenzitás, ++ (2): közép-erős festésintenzitás, +++ (3): erős festésintenzitás. A CJB esetekben, a kisagyban vizsgáltuk a Purkinje-sejtek Hsp72-immunreaktivitásának intenzitását a kontroll esetekhez képest (CJB vs. kontroll). Ennél a vizsgálatnál ötfokozatú skálát használtunk (17.ábra). Az adatokat Student's T próbával értékeltük ( $N = 5$ ,  $P < 0.05$ ).

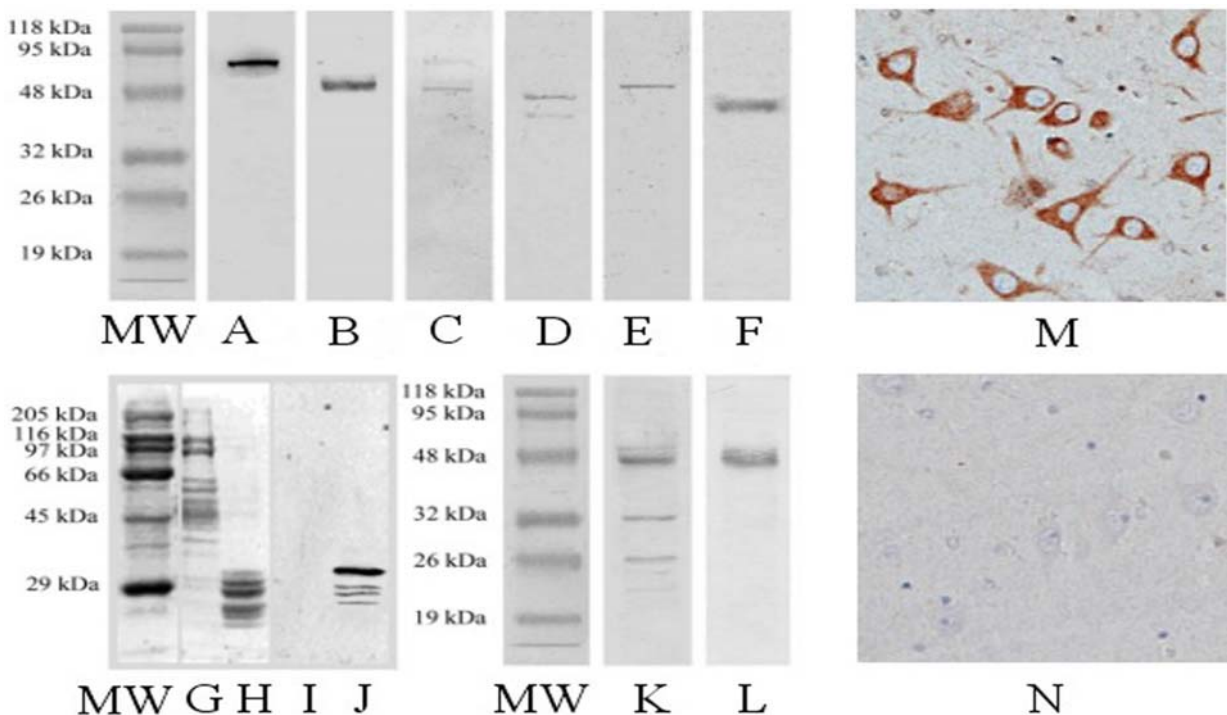


## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. A felhasznált antitestek és az immunreakciók specificitása

#### 5.1.1. Antitest-specificitás (Western-blotting)

A felhasznált nem kereskedelmi antitestek (20S-A, 20S-B, S4, S7, S6a, S6b, S10b, Hsp72) specificitását kontroll humán temporális kérgi mintákból készített citoszól preparátumon immunoblott módszerrel teszteltük (9. ábra). A „20S-A”, „20S-B” és „20S  $\alpha/\beta$ ” 20S PS antiszérumokat tisztított 20S PS preparátumon is teszteltük (13F ábra). A vizsgált antitestek specifikus voltát bizonyítja, hogy csak a nekik megfelelő antigének molekulatömegénél adtak csíkot a blottmembránon (kivételet a 20S-B antitest, melyről részletesen lásd a 9. ábra aláírását).



#### 9. ábra Az UPR komponensei és a Hsp72 kimutatására szolgáló antitestek specificitásának ellenőrzése

Western blotting kontroll humán agyból származó citoszól preparátumon: anti-Hsp72 (A), anti-S4 19S RC ATPáz (B), anti-S7 19S RC ATPáz (C), anti-S6b 19S RC ATPáz (D), anti-S6a 19S RC ATPáz (E), anti-S10b 19S RC ATPáz (F), anti-20S PS „B” antitest (K), a 20S „B” antitest preimmun széruma (L). Ponceau-festés humán eritrocita-eredetű 19S PS preparátumon (G), és 20S PS preparátumon (H). Western-blotting 19S PS (I) és 20S PS (J) preparátumon anti-20S PS antitesttel („B”-antitest). Immunhisztokémia kontroll hippocampus CA4 régióból anti-20S PS antitesttel („B”-antitest) (M), és ezen antitest preimmun szérumával (N).

Figyeljük meg, hogy az anti-20S PS antitest erősen jelöli a humán eritrocita-eredetű 20S PS preparátumot (J), de nem keresztreakál a 19S PS preparátummal (I). Humán citoszól preparátumon, a specifikus 22-32 kDa-os csíkokon túl, az anti-20S PS antitest „B”-változata felismer egy kb. 50 kDa-os fehérjét, amit az antitest preimmun széruma szintén jelöl (L). Ugyanakkor, ellentétben a 20S-B antitesttel (M), a preimmun szérum nem mutat immunhisztokémiai festést (N) párhuzamos metszeteken. MW: molekulásúly-marker.

### 5.1.2. Immunhisztokémiai reakciók specificitása

Sem a humán, sem a patkány agyból készült metszeteinken nem kaptunk immunfestést akkor, ha az elsődleges ellenanyagok helyett 1.5%-os tejpor oldatot, illetve preimmun szérumokat használtunk (9N, 13B, 25F ábrák). A 20S proteaszóma kimutatására használt különböző poliklonális (20S-A, 20S-B, 20S $\alpha/\beta$ ) és monoklonális (20S $\alpha$ 3, 20S $\beta$ 3) antitestek hasonló, döntően citoplazmatikus festést mutattak (13. ábra). A 3F4 (kóros prionfehérje), a  $\beta$ -amyloid, a hiperfoszforilált tau, és a GFAP antitestek festési mintázatai - összevetve azokat az irodalomban fellelhető eredményekkel - megerősítik az antitestek specificitását.

## 5.2. Az ubiquitin-proteaszóma rendszer komponenseinek celluláris és szubcelluláris lokalizációja egészséges emberi agyon és patkány agyon

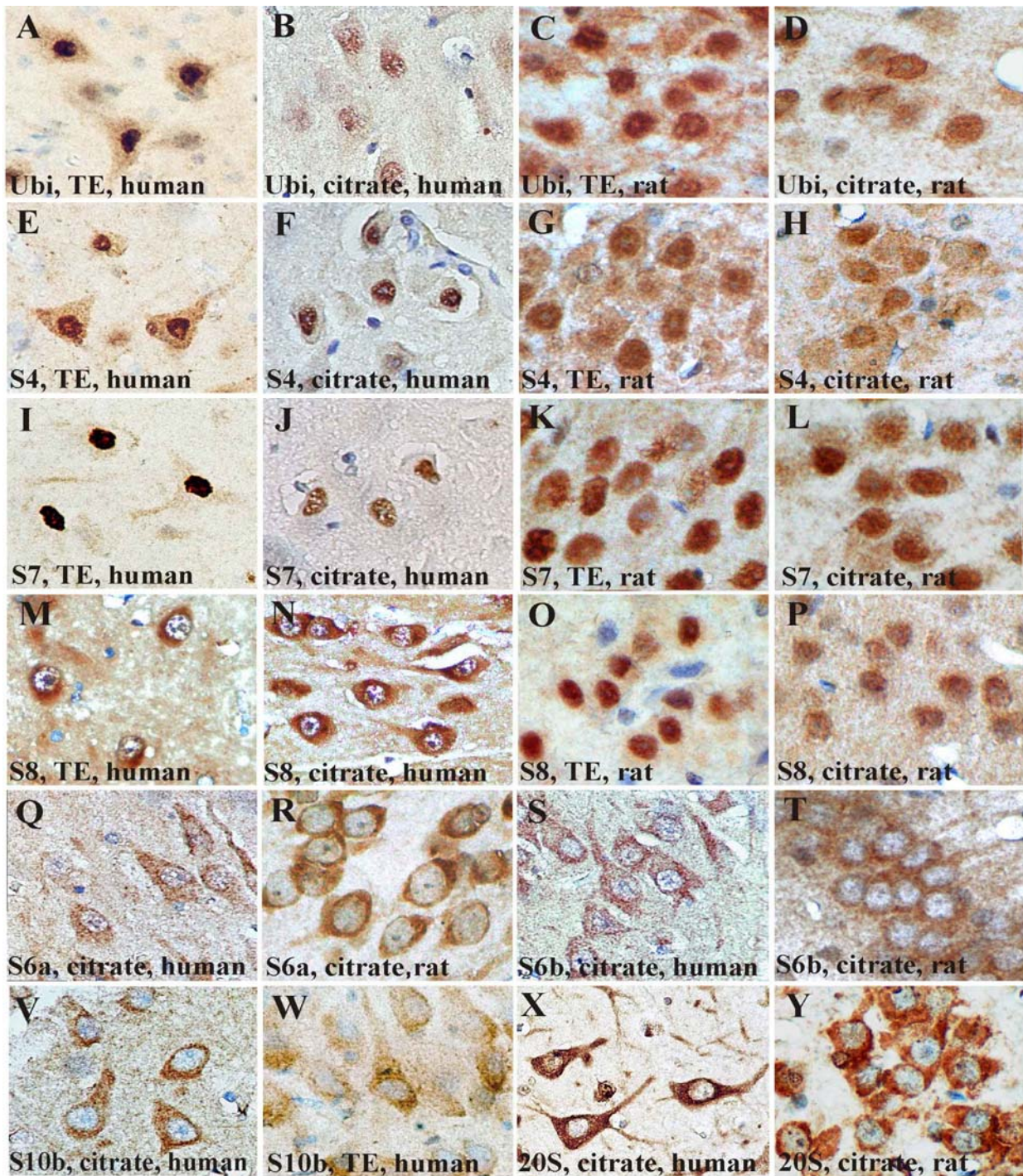
### 5.2.1. Az ubiquitin és a 19S RC ATPázok lokalizációja

A vizsgált humán agyi régiókban (hippocampus-temporális kéreg, neocerebellum, nyúltvelő-keresztmetszet) az ubiquitin, valamint az S4 és S7 19S RC ATPázok elsősorban magi lokalizációt mutattak, de gyengébb citoplazmatikus immunreakciót is megfigyeltünk (10A-B, 10E-F, 10I-J, és 11. ábrák). A sejtmagvaeszkák negatívak voltak. Az S6a, S6b, S8 és S10b 19S RC ATPázok elsősorban diffúz citoplazmatikus lokalizációt mutattak, kifestve az idegsejtek proximális neuritjeit is (10M-N, 10Q, 10S, 10V-W ábrák). Ezeket a szubcelluláris mintázatokat mindhárom vizsgált agyi régió minden idegsejttípusában egyöntetűen megfigyeltük.

Patkány agyon az ubiquitin, valamint az S4 és S7 19S RC ATPázok döntően magi lokalizációja, valamint az S6a, S6b és S10b döntően citoplazmatikus immunreaktivitása megegyezett a humán agyon kapott eredményekkel (10C-D, 10G-H, 10K-L, 10T és 11. ábrák). Patkány agyon azonban az S8 19S RC ATPáz, hasonlóan az S4 és S7 alegységekhez, magi lokalizációt mutatott, ellentétben a humán agyon tapasztalt, elsősorban citoplazmatikus immunreaktivitással (10O-P, és 11. ábrák).

A Tris-EDTA (TE) (pH = 9.00) epitópfeltárási módszer a patkány és a humán mintákon egyaránt erősebb festést adott, mint a citrát-pufferben történő feltárási, azonban ez sehol nem változtatta meg a szubcelluláris lokalizáció jellegét (pl.: 10A vs. 10B, illetve 10I vs. 10J ábrák).

Az elektronmikroszkópos morfológiai vizsgálatok mind hippocampális patkány, mind temporális kérgi humán mintákon megerősítették az S4 19S RC ATPáz szignifikáns magi lokalizációját (12A-B ábrák).



**10. ábra A 19S RC ATPázok és a 20S PS immunlokalizációja egészséges humán és patkány agyon**

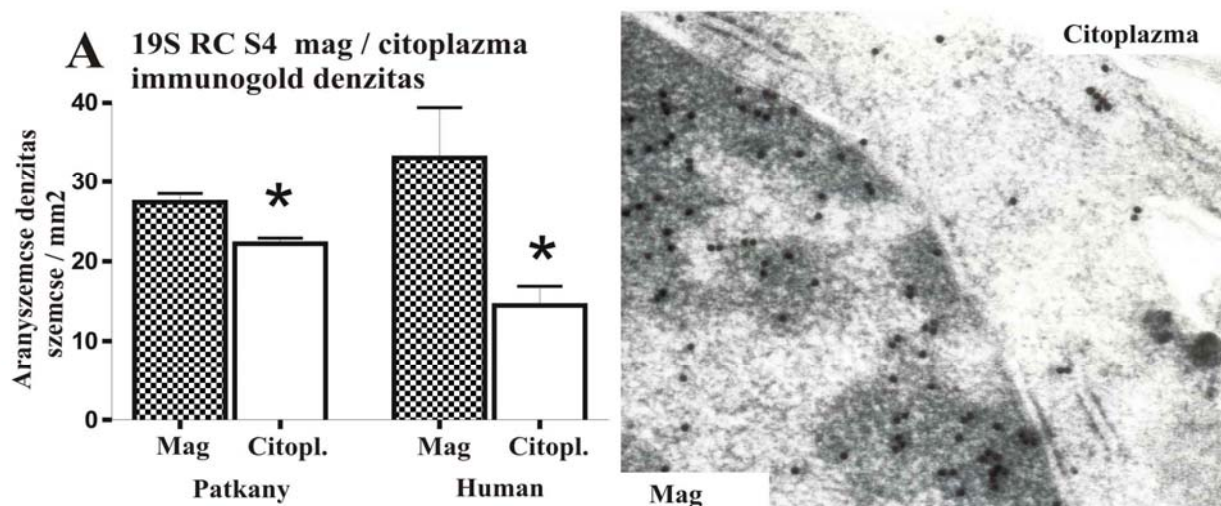
Ubiquitin (A-D), 19S RC ATPáz (S4: E-H, S7: I-L, S8: M-P, S6a: Q-R, S6b: S-T, S10b: V-W) és 20S PS (X-Y) immunfestés egészséges kontroll humán (A-B, E-F, I-J, M-N, Q, S, V-W, X) és kontroll patkány (C-D, G-H, K-L, O-P, R, T, Y) agyon citrát-pufferes epitópfeltárást (citrate) (B, F, J, N, D, H, L, P, Q-R, S-T, V, X-Y), illetve Tris-EDTA epitópfeltárást (TE) használva (A, E, I, M, C, G, K, O, W).

Az ubiquitin, az S4 és S7 19S RC ATPázok előszörban magi lokalizációt mutatnak (A-D, E-H, I-L), míg az S6a, S6b, S10b 19S RC ATPázok és a 20S PS előszörban citoplazmatikus eloszlásúak (Q-R, S-T, V-W, X-Y) mind humán (A-B, E-F, I-J, Q, S, V, W, X), mind patkány agyon (C-D, G-H, K-L, O-P, R, T, Y). Az S8 19S RC ATPáz patkány agyon előszörban magi lokalizációt mutat (O-P), ellentétben a humán agyon tapasztalt citoplazmatikus eloszlással (M-N). A TE epitópfeltárási módszer az ubiquitin és a 19S RC ATPázok esetében gyakran felerősíti az immunreakció intenzitását a citrát-pufferes feltáráshoz képest, de annak mintázatát nem változtatja meg (pl.: A vs. B, E vs. F, I vs. J). (Hippocampus CA3, eredeti nagyítások: 400x; DAB-festés, hematoxinil-magfestés.).

Minták eredete		Humán		Patkány	
Antitestek/ Alegységek	Epitóp-feltárások	TE feltárás	Citrát feltárás	TE feltárás	Citrát feltárás
20S PS (a20SA-B, a20S $\alpha$ / $\beta$ , a $\alpha$ 3, a $\beta$ 3)		*	*		
Ubiquitin					
19S RC S4 ATPáz					
19S RC S7 ATPáz					
19S RC S8 ATPáz					
19S RC S6a ATPáz					
19S RC S6b ATPáz					
19S RC S10b ATPáz					

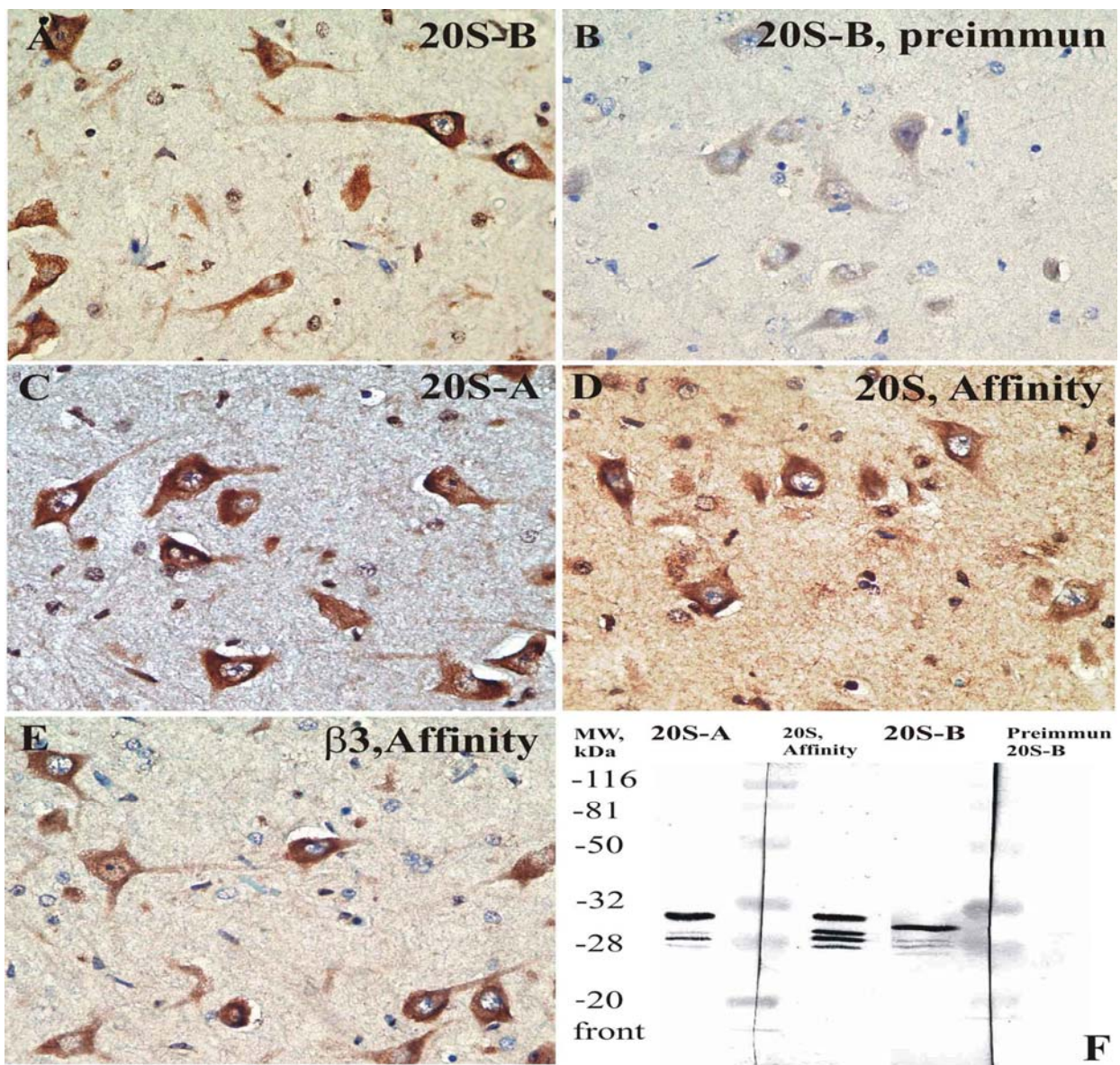
### 11. ábra Összefoglaló ábra az UPR vizsgált komponenseinek szubcelluláris eloszlásáról

Fehér téglalap: elsősorban citoplazmatikus immunfestés. Fekete téglalap: elsősorban magi immunfestés. Szürke téglalap: magi és citoplazmatikus immunfestés körülbelül azonos intenzitással. \*: mindkét jelölt mintázat előfordul. Figyeljük meg, hogy az ubiquitin, az S4, S7 és – patkány agy esetén - az S8 19S RC ATPázok magi lokalizációt mutatnak. A tapasztalt szubcelluláris lokalizációs mintázatok minden vizsgált agyterületen minden sejtpopulációban hasonlóak voltak (hippocampus-temporális kéreg, neocerebellum, nyúltvelő a humán agyon; frontális agykeresztmetszetek a striatum, hippocampus, dorsal-medial raphe és a kisagy-nyúltvelő szintjén patkány agyon).



### 12. ábra Az S4 19S RC ATPáz immun-elektronmikroszkópos lokalizációja és az arany szemcsék eloszlásának mennyiségi analízise

Az arany szemcsék denzitása szignifikánsan magasabb a magban, mint a citoplazmában, mind a patkány, mind a humán mintákban (A). (Student's T-teszt,  $P < 0.05$ . A diagrammokon (A) a standard hibát (+SEM) tüntették fel). A B ábra az S4 alegységet reprezentáló arany szemcsék döntően magi eloszlását mutatja egy patkány hippocampális neuronból (B: 72.000x).



**13. ábra A 20S proteaszóma immunlokalizációjának vizsgálata különböző antitestekkel és ezen antitestek specificitásának tesztelése 20S proteaszóma preparátumon.**

Eredeti nagyítások: 400x (A-E); DAB-festés, hematoxinil-magfestés. Figyeljük meg, hogy a 20S proteaszóma mind a négy bemutatott antitesttel festve (20S-B, poliklonális (A), 20S-A, poliklonális (C), 20S, poliklonális, Affinity (20S $\alpha$ / $\beta$ ) (D), 20S  $\beta$ 3, monoklonális (E)) citoplazmatikus immunreaktivitást mutat. A 20S-B antitest preimmun szérumát használva primer antitest helyett, csak halvány háttérfestést tudunk kimutatni (B). Ha 20S proteaszóma preparátumon vizsgáljuk az antitestek specificitását, láthatjuk, hogy a 20S-A, 20S-B és 20S (Affinity) antitestek specifikusan felismerik a 20S proteaszóma alegységeit a megfelelő, 28-32 kDa molekulatömeg között (F). Ugyanakkor, a 20S-B antitest preimmun széruma nem ismeri fel a 20S proteaszóma egy alegységét sem (F).

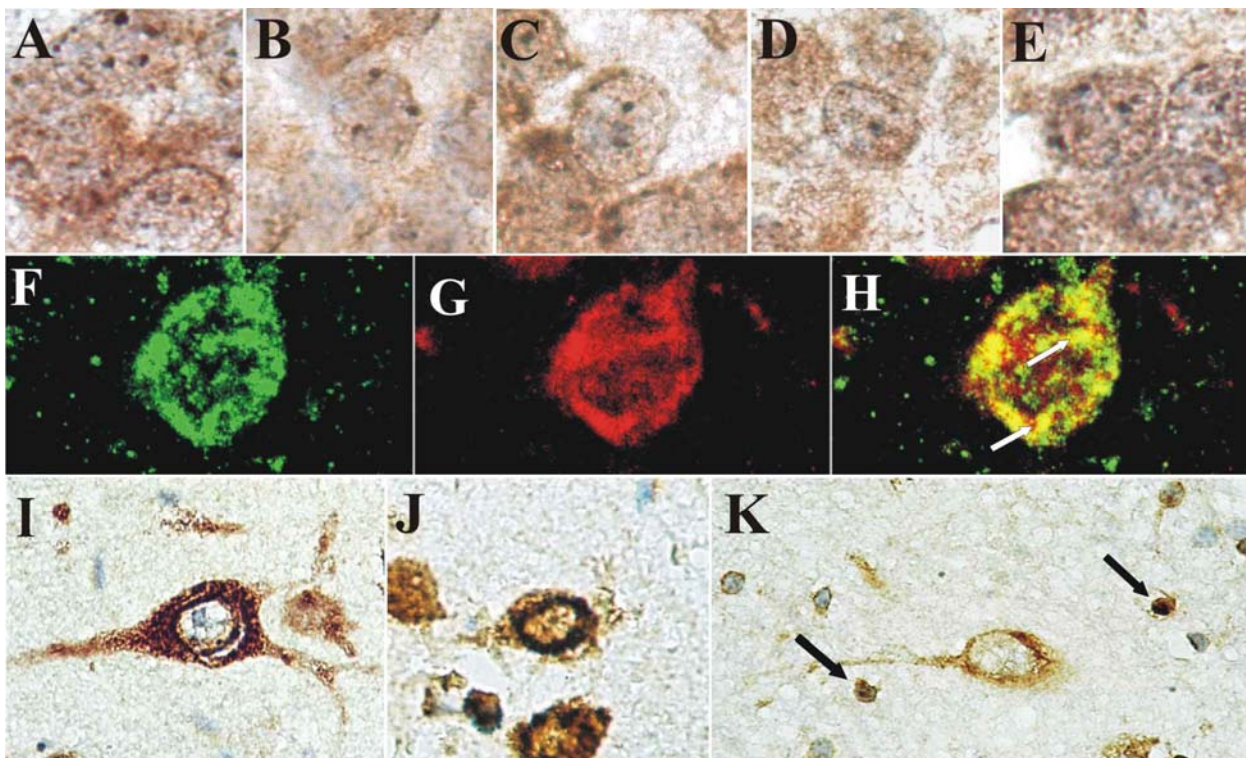
**5.2.2. 20S proteaszóma lokalizációja**

A 20S proteaszóma immunhisztokémiai lokalizációját több poliklonális és monoklonális antitesttel is elvégeztük (13A-E ábrák). Minden antitesttel hasonló immunlokalizációs mintázatot kaptunk a humán és a patkány mintákon egyaránt, mindkét epitópfeltárási módszerrel (TE, illetve citrát-puffer). A 20S proteaszóma elsősorban

citoplazmatikus lokalizációjú, beleértve a neuronok nyúlványait is (10X-Y, 11., és 14I-K ábrák). A mag körül gyakran tapasztaltunk intenzív, gyűrűszerű perinukleáris festést (14I-J, 22B ábrák). A neuronok magjában elsősorban az 5.2.3. fejezetben ismertetett magi testek bizonyultak immunpozitívnak. A neuronok festésén túl, számos gliasejt magja mutatott erős diffúz festést 20S proteaszómára (14K ábra).

### 5.2.3. Magi testek (nuclear bodies) immunpozitivitása

Patkány agyon a sejtmagban található struktúrák, a magi testek közül számos erősen immunreaktív volt mind az öt 20S proteaszóma antitestre, az S6a 19S RC ATPázra, és az ubiquitinre (14A-E). Fluoreszcens kettős festések az ubiquitin és a 20S proteaszóma kolokalizációját mutatták ezekben a struktúrákban, amelyek mind a neuronokban, mind a gliasejtekben előfordultak, különösen nagy számban a hippocampális gyrus dentatus szemcsesejtjeiben (14F-H).



### 14. ábra Az UPR komponenseinek szubcelluláris immunlokalizációja

Patkány agyban egyes magi testek erősen immunoreaktívak az UPR komponenseire (anti-20S $\alpha$ / $\beta$ : A; anti-20S $\alpha$ 3: B, anti-19S RC S6a: C; anti-ubiquitin: D-E); A-E és I-K: DAB-festés, hematoxilin-magfestés.

20S proteaszóma és ubiquitin kolokalizációja magi testekben (fluoreszcens kettős jelölés: 20S $\alpha$ 3: F; ubiquitin: G; egyesített kép: H, nyilak: kettősen jelölt magi testek). (A-H: patkány agy, hippocampus gyrus dentatus, granuláris sejtek.). Intenzív gyűrűszerű perinukleáris festés (I-J) és gliális magi festés (K, nyilak) 20S PS-ra (humán agy, temporális kéreg). (Eredeti nagyítások: 1000x).

### **5.3. A Hsp72 molekuláris chaperon és az ubiquitin-proteaszóma rendszer komponenseinek lokalizációja humán neurodegeneratív agyszövetben**

#### *5.3.1. A CJB és Alzheimer-kóros esetek neuropathológiai diagnózisa, és a sejtpusztulás detektálása TUNEL-reakcióval*

A vizsgált Alzheimer és CJ beteg esetekben a betegségek összes neuropathológiai jellegzetességét bizonyítottuk (szelektív neuronvesztés, reaktív asztrogliózis, a betegségre specifikus fehérjezárványok) (15. ábra).

A humán mintákon történő részletes vizsgálatainkat hippocampus-temporális kéreg, neocerebellum és nyúltvelő nyílt részének metszetein végeztük.

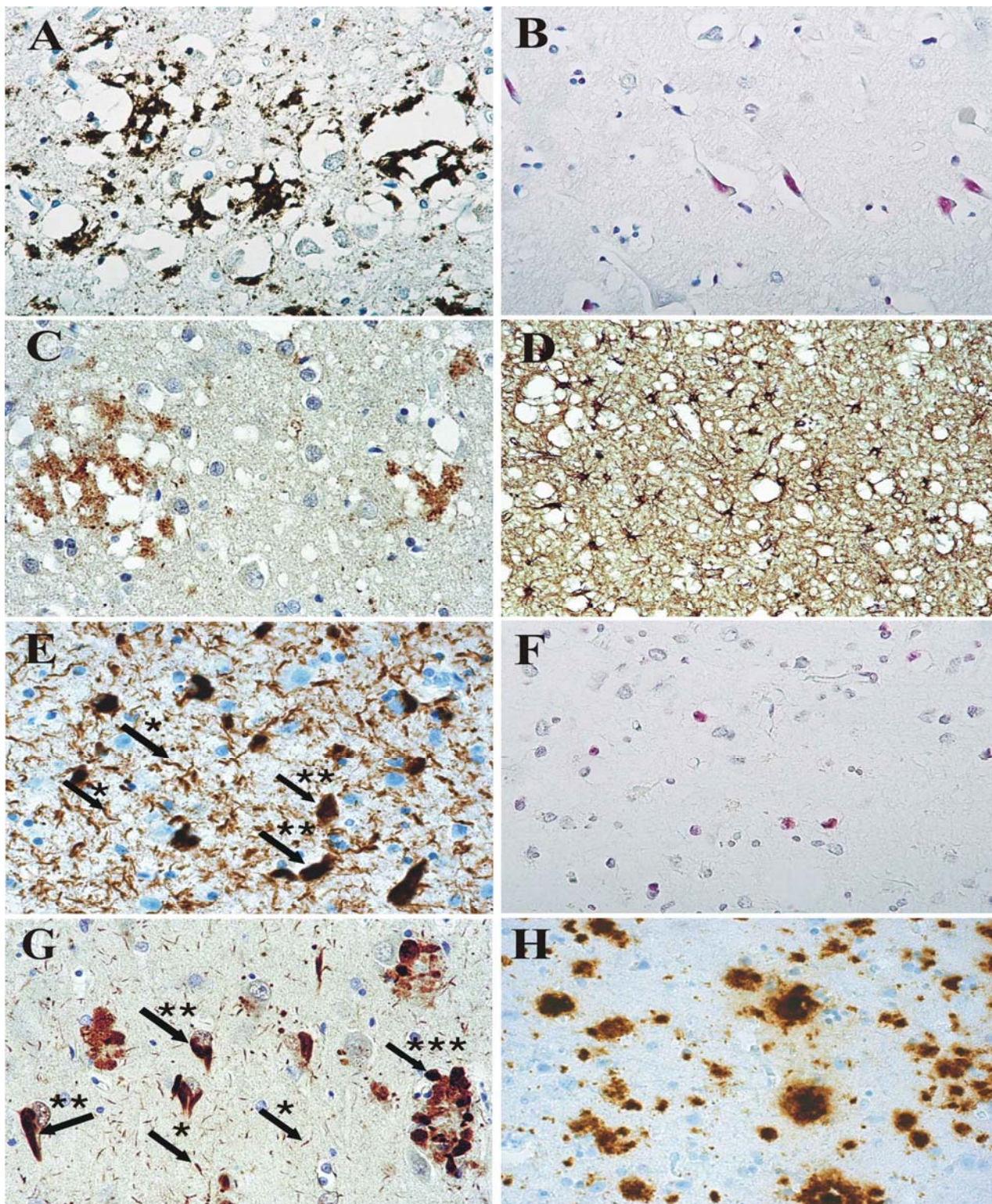
A kontroll esetekben TUNEL-pozitív neuronokat nem tudtunk kimutatni (18X ábra). A CJB esetekben azonban a subiculum, az entorhinális és temporális kéreg mélyebb rétegeiben számos TUNEL-pozitív neuront figyeltünk meg (15B és 18Y ábrák). A kóros prionfehérje lerakódások és a sejtvesztés eredményeképpen kialakuló szöveti vakuolizáció korrelált a TUNEL-pozitivitás eloszlásával (18T vs. 18Y ábrák). A kisagyi Purkinje-sejtek között nem volt TUNEL-pozitivitás, de a granuláris réteg számos pozitív sejtmagot tartalmazott (19F ábra). A molekuláris réteg sejtmagjai között elvétve találtunk TUNEL-pozitívakat. A dorzális vagus mag neuronjai negatívak voltak, ellentétben az oliva inferior sejtselével (nem mutatjuk). Alzheimer-kóros esetekben a nyúltvelő és a kisagyi sejtpopulációi nem mutattak TUNEL-pozitivitást. Ugyanakkor, a hippocampus CA1, a subiculum, az entorhinális és a temporális kéreg neuronjai közül számosnak a sejtmagva TUNEL-pozitívnek bizonyult a kérgi régiók teljes szélességében, nem mutatva réteg-specifikusságot (15F ábra).

#### *5.3.2. A Hsp72 lokalizációja*

A Hsp72 immunreaktivitás minden vizsgált területen, kontrollban és neurodegeneratív mintákon is citoplazmatikus volt, és elsősorban a perikarionra korlátozódott. A neuritek ritkán festődtek. A sejtmagok mindig teljesen negatívnak mutatkoztak (16C-D ábrák).

Mind a kontroll, mind a neurodegeneratív esetekben a hippocampális CA4-3-2 piramis sejtek, a kisagyi Purkinje-sejtek, és a dorzális vagus mag neuronjai szignifikánsan erősebb festést mutattak, mint az entorhinális kortex, a cerebelláris granuláris sejtek, vagy az oliva inferior neuronjai (16C-D, 17A-B, és 20. ábrák).

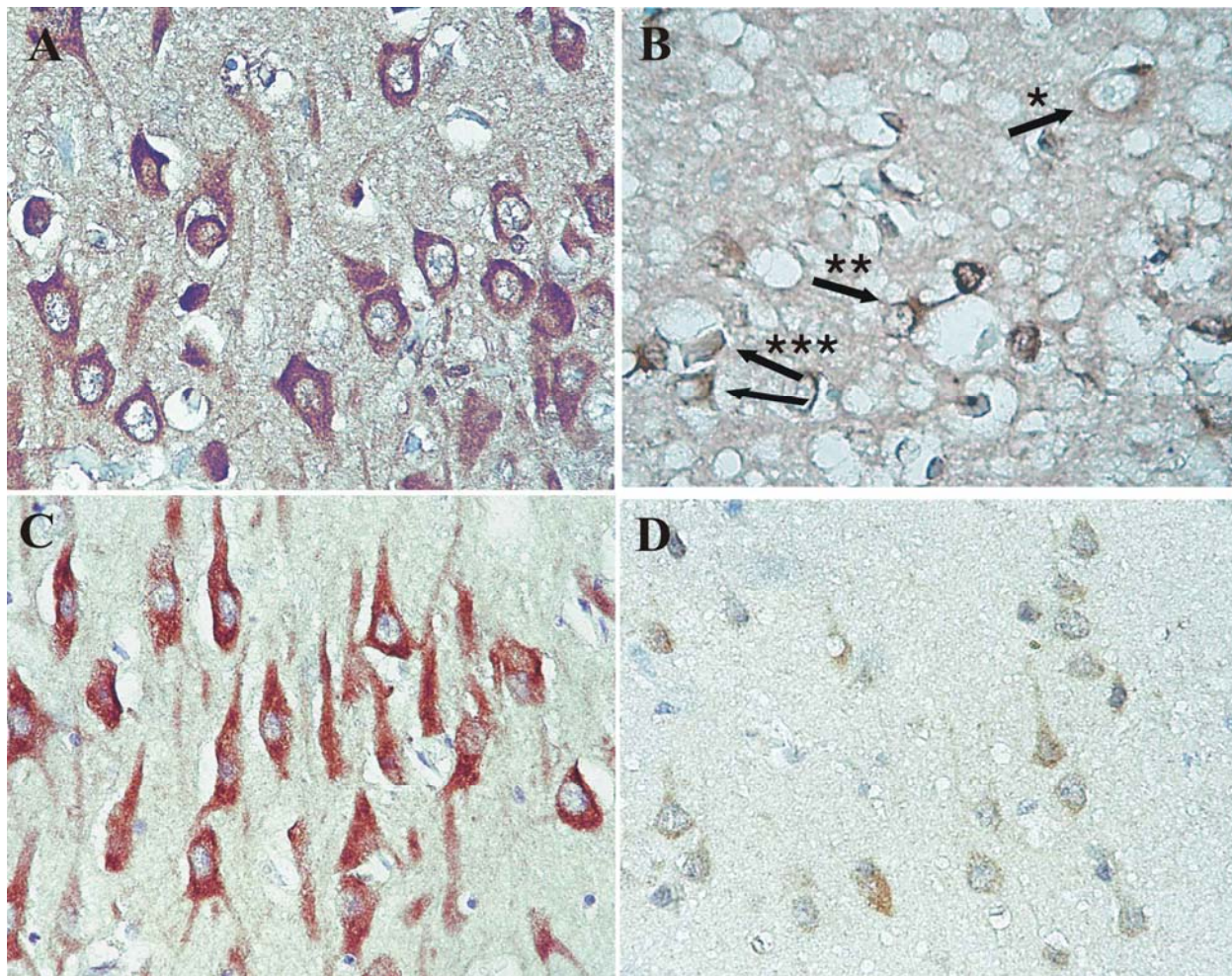
A vizsgált régiók betegség által érintett területein a morfológiailag sérült, vulnerábilis neuronokban csak gyenge Hsp72 immunfestést tudtunk kimutatni. Ugyanezen érintett



**15. ábra** Reprezentatív diagnosztikai immunfestések és TUNEL-reakciók CJB és Alzheimer-kóros (AK) mintán entorhinális kéregben.

Kóros-prionfehérje immunhisztokémia (3F4) (A), ubiquitin (C, G) GFAP (D), tau (E),  $\beta$ -amyloid (H) immunfestések és TUNEL-reakció (B, F) CJB (A-D) és AK (E-H) esetén. Eredeti nagyítások: 400x. A szöveti léziók körüli „foltszerű-perivakuoláris” (patchy-perivacuolar) típusú kóros-prion lerakódások (A) ubiquitin-immunreaktivással asszociálódnak (C). Az entorhinális kéregben reaktív asztroglóziózis (D), és sok TUNEL-pozitív vulnerábilis neuron (B) figyelhető meg. Tau és ubiquitin-immunoreaktív „neuropil szálak” (neuropil threads) (\*) és neurofibrillaris kötegek (neurofibrillary tangles – NFTs) (\*\*)(E, G, tau, illetve ubiquitin). A tau antitest {AT8} csak a tau hiperfoszforilált formájára specifikus. Amyloid-plakkok körüli ubiquitin-immunoreaktív disztrófiás neuritek (\*\*\*) (G).  $\beta$ -amyloid immunoreaktív amyloid-plakkok (H). TUNEL-pozitív neuronok az Alzheimer-kóros esetben (F).





**16. ábra Hsp72 immunfestés CJB és életkori kontroll esetén hippocampus CA3 régióban és entorhinális kéregben.**

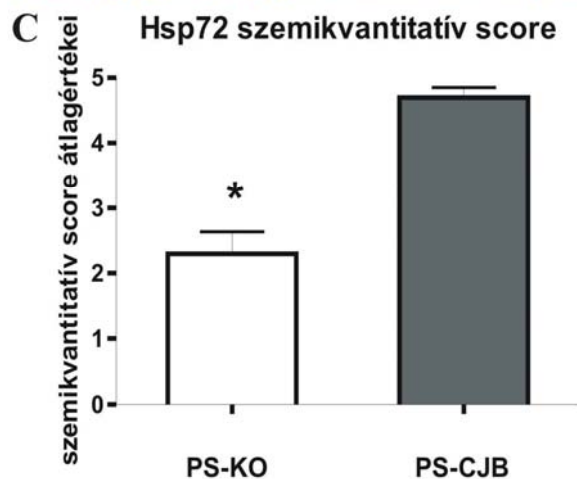
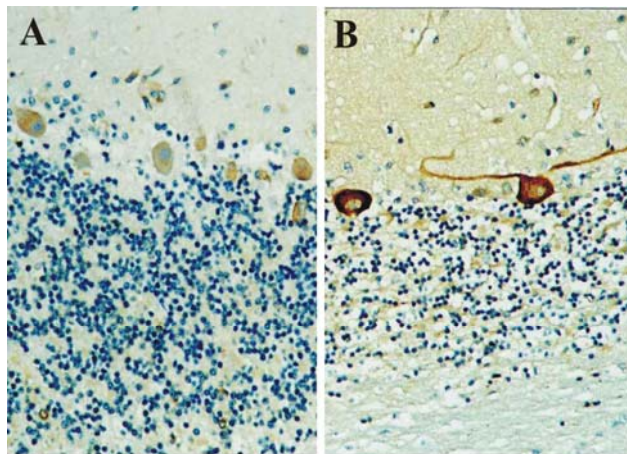
Hippocampus CA3 (A, C) és entorhinális kéreg (B, D) CJB (A-B) és életkori kontroll (C-D) esetben. Eredeti nagyítások: 400x. Figyeljük meg, hogy a Hsp72 immunreaktivitás erősebb a hippocampus CA3 piramissejtjeiben, mint az entorhinális kéreg neuronjaiban, mind a kontroll (C vs. D), mind a beteg esetekben (A vs. B). Figyeljük meg továbbá azt, hogy a CJB eset entorhinális kéregében, a morfológiailag sérült, vulnérabilis neuronok sem mutatnak erősebb immunreaktivitást. Ugyanitt, számos Hsp72-immunoreaktív asztrocitát láthatunk (B-panel; \*: ép sejt, \*\*: Hsp72 immunoreaktív asztrocita, \*\*\*: morfológiailag sérült, vulnérabilis sejtek). DAB-festés, hematoxin-háttérfestés.

régiókban ugyanakkor számos Hsp72-immunopozitív reaktív asztrocitát figyeltünk meg mind Alzheimer-kórban, mind CJ betegségben (16B ábra).

A CJB esetekben a kisagyban vizsgáltuk a Purkinje-sejtek Hsp72-immunreaktivitásának intenzitását a kontroll esetekhez képest (CJB vs. kontroll). A CJB esetekben a Purkinje-sejtekben a kontrollokhöz képest szignifikánsan erősebb immunreaktivitás figyelhető meg a szemikvantitatív értékelés (score) alapján (17C ábra).

### 5.3.3. Az ubiquitin-proteaszóma rendszer komponenseinek lokalizációja

#### 5.3.3.1. Az ubiquitin és a 19S RC ATPázok szelektív regionális eloszlása



**17. ábra A Hsp72 immunfestés intenzitásának összehasonlítása kontroll és CJB esetekben.**

Hsp72 immunfestés kisagyon életkori kontroll esetből (A), CJB esetből (B), valamint a Hsp72 immunfestés-intenzitás szemikvantitatív értékelésének (score) eredményei kisagyi Purkinje-sejteken kontroll és CJ beteg esetekben (C).

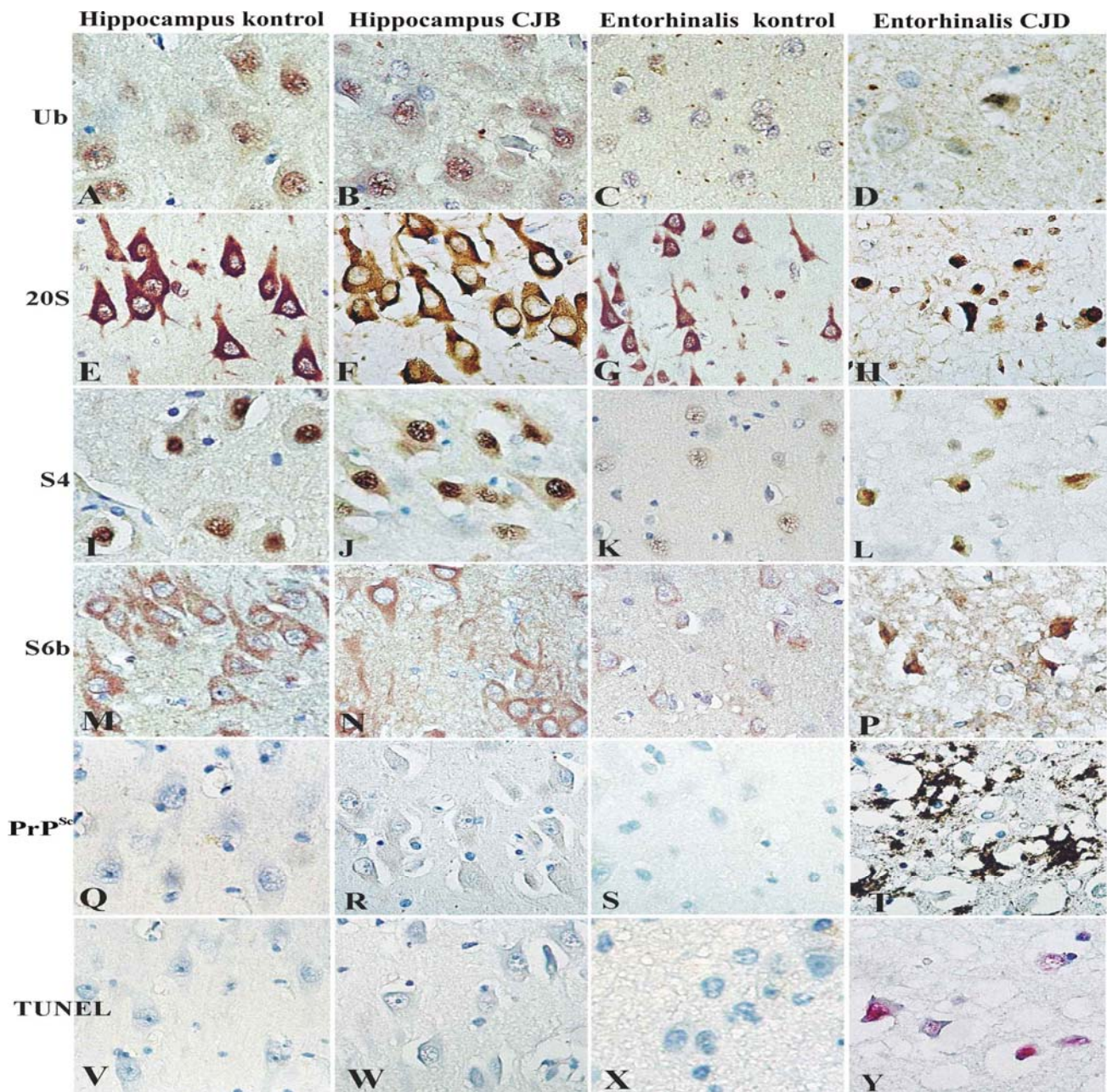
A CJB esetben jól látható a granuláris réteg elvékonyodása (A vs. B). Figyeljük meg, hogy a kisagyan mind a kontroll, mind a beteg esetben csak a Purkinje-sejtek mutatnak Hsp72 immunreaktivitást (A, B). Ugyanakkor, a beteg esetben ez az immunreaktivitás szignifikánsan erősebb (B vs. A, és C ( $N = 5, P < 0.05$ )). A diagrammokon (C) a standard hibát ( $\pm$  SEM) tüntettük fel.

Az S4 és S7 19S RC ATPázok mind a kontroll, mind a neurodegeneratív agyszövetben elsősorban magi immunlokalizációt mutattak (11., 10E-F,

10I-J, és 18I-L ábrák). Az S4 és S7 immunreaktivitás intenzitása erősebb volt a hippocampális CA4-3-2 régióban és a cerebelláris Purkinje-sejteken, mint az entorhinális kéregben, vagy a kisagyi granuláris sejteken, mind a kontroll, mind a két neurodegeneratív csoportban (a neurodegeneratív csoportokban található egyes vulnerábilis neuronok kivételével, lásd: 5.3.3.2. fejezet). A CJB esetekben az oliva inferior neuronjainak immunreaktivitása gyengébb volt, mint a dorzális vagus-mag neuronjaié (20. ábra).

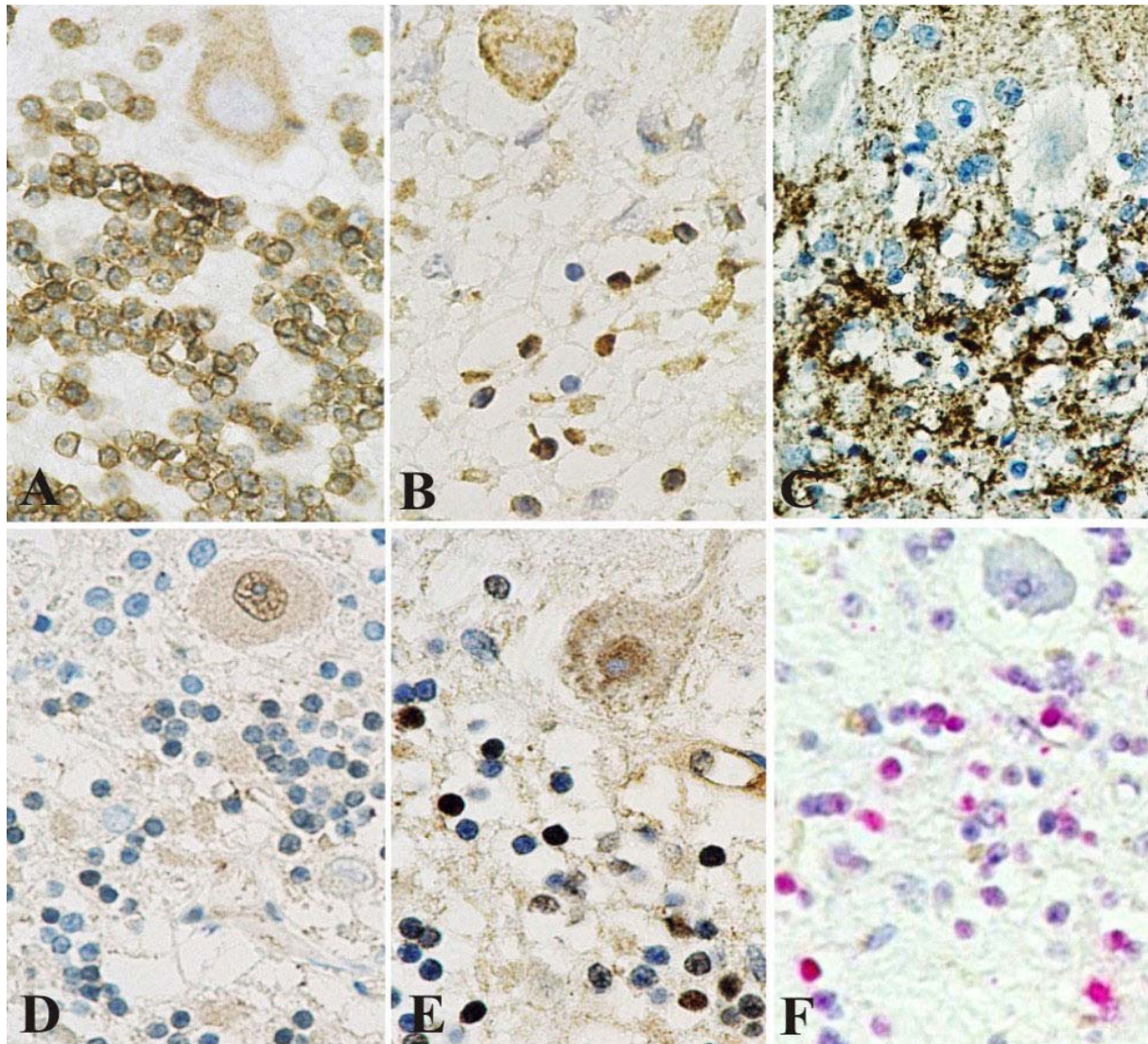
Az S6a, S6b és S10b 19S RC ATPázok elsősorban diffúz citoplazmatikus és neurit immunlokalizációt mutattak. Ez a szubcelluláris mintázat hasonló volt a kontroll esetek minden vizsgált régiójában és a neurodegeneratív esetek betegség által nem érintett régióiban (18M-O ábrák). CJB esetekben az S6a és S10b immunreaktivitás erősebb volt a dorzális vagus magban, mint az oliva inferior neuronjaiban. A kontroll esetekben pedig a cerebelláris Purkinje-sejtek S6b és S10b immunreaktivitása erősebb, mint a granuláris sejteké (20. ábra).

Az ubiquitin immunreaktivitás elsősorban magi eloszlású minden vizsgált neuronpopulációban (11., 18A-D, és 19D-E ábrák). A festés intenzitásának regionális eloszlása nagy hasonlóságot mutatott számos 19S RC ATPázéhoz mind a kontroll, mind a neurodegeneratív esetekben: a hippocampális CA4-3-2 piramis sejtek, a kisagyi Purkinje-



**18. ábra Az ubiquitin, 19S RC ATPázok és a 20S PS immunlokalizációja életkori kontroll és CJB-ben elhunyt betegből származó mintákon**

Ubiquitin (A-D), 20S proteaszóma ("B" antitest) (E-H), S4, illetve S6b 19S RC ATPáz (I-L, illetve M-P), és PrP<sup>Sc</sup> (Q-T) immunlokalizáció, valamint TUNEL-reakció (V-Y) kontroll hippocampus CA2-3 agyterületen (A, E, I, M, Q, V), beteg (CJB) hippocampus CA2-3 régióból (B, F, J, N, R, W), kontroll entorhinális kéregben (C, G, K, O, S, X), és beteg (CJB) entorhinális kéregben (D, H, L, P, T, Y). Erdeti nagyítások: 400x. Az ubiquitin és az S4 19S RC ATPáz döntően magi immunlokalizációt mutat mind a kontroll (A, C, illetve I, K), mind a beteg (B, D, illetve J, L) esetekben. A 20S proteaszóma és az S6b 19S RC ATPáz döntően citoplazmatikus immunlokalizációt mutat mind a kontroll (E, G, illetve M, O), mind a beteg esetek nem érintett régióiban (pl. hippocampus CA2-3) (F, N). Az ubiquitin és a vizsgált 19S RC ATPázok immunfestésének intenzitása regionális eloszlást mutat mind a kontroll, mind a beteg esetekben: az immunreaktivitás erősebb a hippocampális CA2-3 régióban (ubiquitin: A, B; S4: I, J; S6b: M, N) és gyengébb a kontroll esetek entorhinális kéregében (C, K, O) és a beteg esetek entorhinális kérgi morfológiailag nem sérült neuronjaiban (D). A beteg esetek érintett régióiban található vulnerábilis sejtek erős magi immunreaktivitást mutatnak ubiquitinre (D), 20S proteaszómára (H), és a vizsgált 19S RC ATPázokra (L, P). Azok a sejtpopulációk, amelyek az UPR vizsgált komponenseire erősebb immunreaktivitást mutatnak mind a kontroll, mind a beteg esetekben, TUNEL-negatívak (A/B vs. W; I/J vs. W; M/N vs. W). A TUNEL-pozitív vulnerábilis sejtek eloszlása korrelál a PrP<sup>Sc</sup> fehérjezárnyok, valamint az UPR különböző vizsgált komponenseire erős magpozitivitást mutató sejtek eloszlásával a beteg esetekben (D/Y, H/Y, L/Y, P/Y, T/Y).



**19. ábra 20S proteaszóma („B” antitest) és ubiquitin immunhisztokémia kontroll és prionbeteg (CJB) kisagyon.**

20S proteaszóma (A-B), ubiquitin (D-E) és kóros-prionfehérje immunhisztokémia (C), valamint TUNEL-reakció (F) CJB esetekből (B, C, E, F) és életkori kontroll (A, D) kisagykérgi metszeteken. A CJB esetben az érintett granulás sejtek rétege számos 20S proteaszómára (B) és ubiquitinre (E) erősen magpozitív neuront tartalmaz szemben a kontroll esetekkel (A illetve D). A beteg esetekben ezen magpozitív sejtek elhelyezkedése korrelál a szintén a granulás rétegben nagy számban található diffúz-szinaptikus PrP<sup>Sc</sup> lerakódásokkal (C) és a TUNEL-pozitív sejtek előfordulásával (F).

sejtek, és a dorzális vagus mag neuronjai szignifikánsan erősebb festést mutattak, mint az entorhinális cortex, a cerebelláris granulás sejtek, vagy az oliva inferior neuronjai (20. ábra).

Összehasonlítottuk a kontroll és a neurodegeneratív minták immunfestéseinek jelintenzitását is (kontroll vs. AK, kontroll vs. CJB), azonban sem az ubiquitinnél, sem a 19S RC ATPázoknál nem találtunk szignifikáns különbségeket (nem mutatjuk). Ezt az eredményt

Alzheimer-kóros és kontroll temporális kérgi mintákat vizsgálva Western-blotton is megerősítettük 19S RC S4, S6b és 20S PS esetén (21. ábra).

Összehasonlított területek ▶		CA2-3 vs. EK			N. dors. n. X. vs. OIF			PS vs. GR		
Antitestek ▼	Esetcsoportok ▶	KO	CJB	KO	KO	CJB	AK	KO	CJB	AK
20S ("B" antitest)					■					
19S RC S4 ATPáz		■				■		■	■	■
19S RC S7 ATPáz		■	■	■		■		■	■	■
19S RC S6a ATPáz						■				
19S RC S6b ATPáz								■		
19S RC S10b ATPáz					■	■		■		
Ubiquitin		■	■	■	■					■
Hsp72		■	■	■	■	■	■	■	■	■

**20. ábra Az UPR immunfestések intenzitásának analízise szemikvantitatív értékelés (score) alapján humán agyon.**

Fekete négyzet: szignifikáns jelintenzitás-különbség szemikvantitatív értékelés (score) alapján a vizsgált agyterületen/sejtpopulációban (az adott alegység kimutatására szolgáló antitesttel festve) ( $P < 0.05$ )

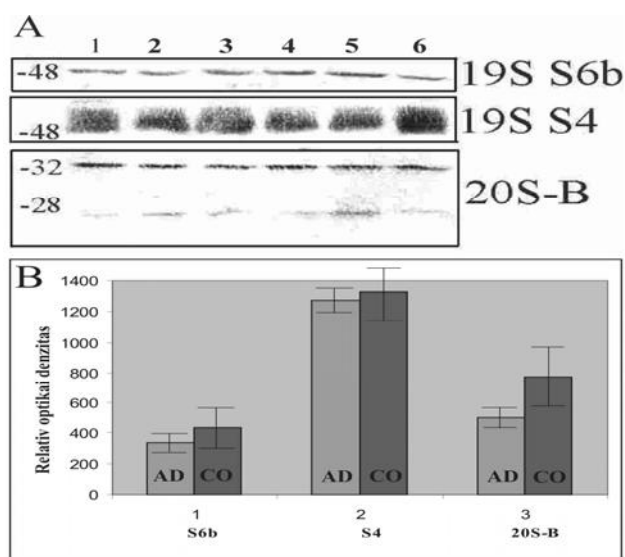
Szürke négyzet: erős trend a jelintenzitás-különbségben a vizsgált agyterületen/sejtpopulációban (az adott alegység kimutatására szolgáló antitesttel festve) ( $P < 0.1$ ).

Fehér négyzet: nincs szignifikáns különbség, sem trend.

EK: entorhinális kérgi interneuronok; N. dors. n. X.: nucleus dorsalis nervi vagi; OIF: oliva inferior; PS: Purkinje-sejt; GR: kisagyi granuláris réteg sejtjei; KO: normál kontrol; CJB: sporadikus Creutzfeldt-Jakob betegség; AK: Alzheimer-kór.

**5.3.3.2. Vulnerábilis sejtek magpozitivitása**

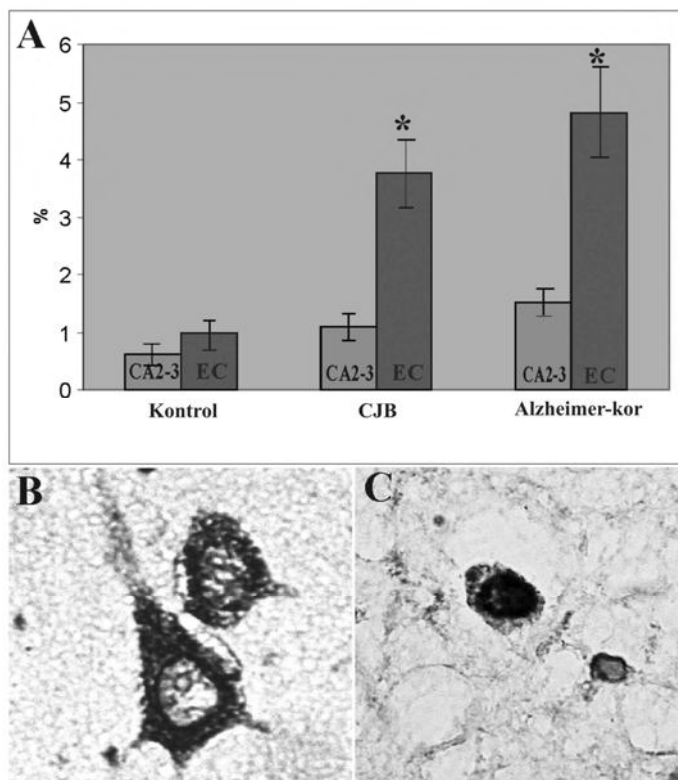
A kontrollokban és a neurodegeneratív esetek nem érintett régióiban a 20S proteaszóma elsősorban citoplazmatikus immunreaktivitást mutatott. A neurodegeneratív esetek érintett területeinek vulnerábilis, morfológiailag sérült neuronjaiban azonban jellegzetes, erős magi 20S immunreaktivitást találtunk (18H, 19B és 23B ábrák). Ezek a sérült sejtek hasonlóan erős magpozitivitást mutatnak ubiquitinre, valamint S4, S7 és S6b 19S RC ATPázokra is (5. táblázat; 18D, 18L, és 18P, 19E ábrák). Ugyanakkor, a mitokondriális



**21. ábra Az UPR néhány komponensének Western-blot analízise humán Alzheimer-kóros és kontroll temporális kérgi mintákon**

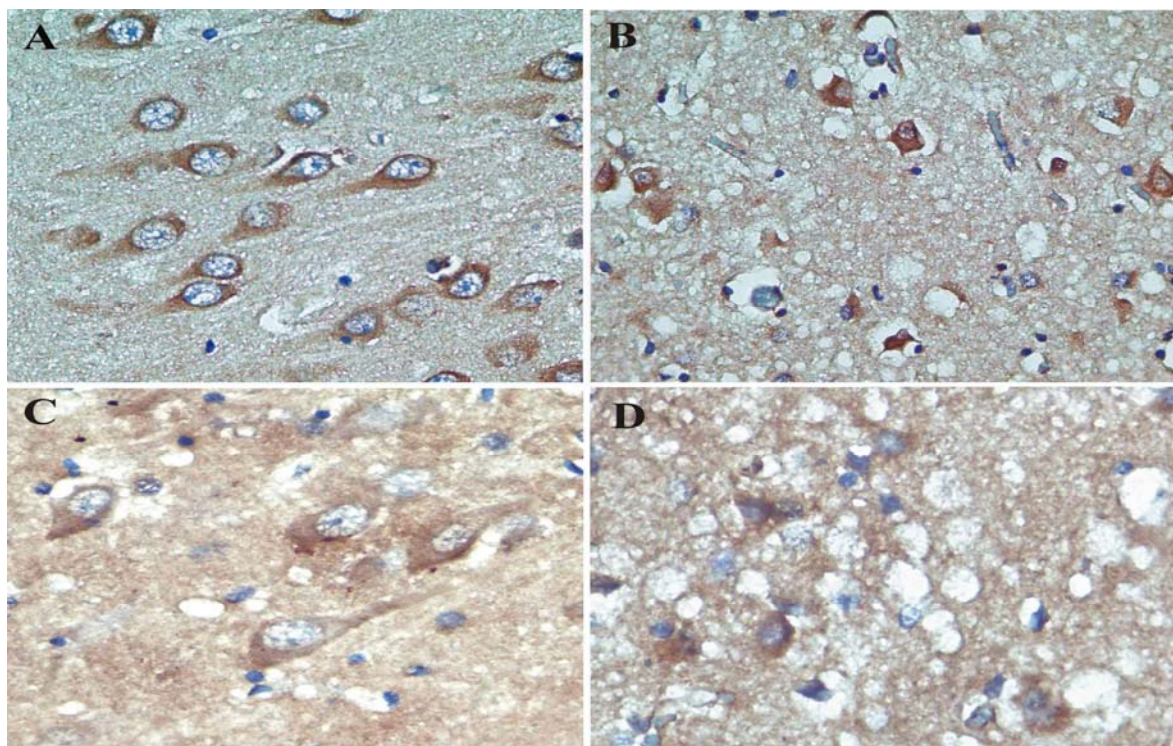
A: Alzheimer-kóros (1., 2., 3. csíkok) és kontroll (4., 5., 6. csíkok) temporális kérgi minták. MW: molekulásúly-marker. B: A Western-blotting csíkok relatív optikai denzitásainak grafikus ábrázolása. Az UPR egyik vizsgált komponense esetén sincs szignifikáns különbség a kontroll és az Alzheimer-kóros minták fehérjemennyiségében. (AD: Alzheimer-kóros minta; CO: kontroll minta; N = 3; statisztikai értékelés: Student's T-teszt,  $P < 0.05$ ).

citokróm-C, valamint a citoplazmatikus mátrixban diffúzan lokalizáló protein-tirozin-kináz-2 (SH-PTP2) enzim immunreaktivitása ezekben a sejtekben hasonló intenzitású, mint a betegség által nem érintett agyi régiók ép sejteiben, és immunfestésük a vulnerábilis sejtekben is citoplazmatikus (23A-D ábrák). A fent említett vulnerábilis sejtek sem a “no first antibody”, sem a preimmun szérum kontrollokban nem mutattak festést (nem mutatjuk). Elektronmikroszkópos morfometriai vizsgálataink szerint az S4 19 RC ATPáz reprezentáló arany szemcsék száma szignifikánsan magasabb a degenerálódó sejtek magjaiban, mint a morfológiailag ép sejtekében (24A-D).



**22. ábra A 20S proteaszómára erősen magpozitív neuronok számának mennyiségi meghatározása**

Az Y tengelyen az erősen 20S magpozitív neuronok százalékos arányát tüntetjük fel az összes számolt sejt (100%) arányában. A: a CA2-3 és az entorhinális kéreg (EC) összehasonlítása kontroll esetekben (N = 5), CJB esetekben (N = 5) és Alzheimer-kóros esetekben (N = 5); ANOVA-teszt, Tukey poszt-hoc teszt,  $P < 0.05$ ). B: 20-S immunfestés („B” antitest) életkori kontroll eset entorhinális kérgéből. C: 20-S immunfestés („B” antitest) CJB eset entorhinális kérgéből. Eredeti nagyítások: 1000x (B, C).



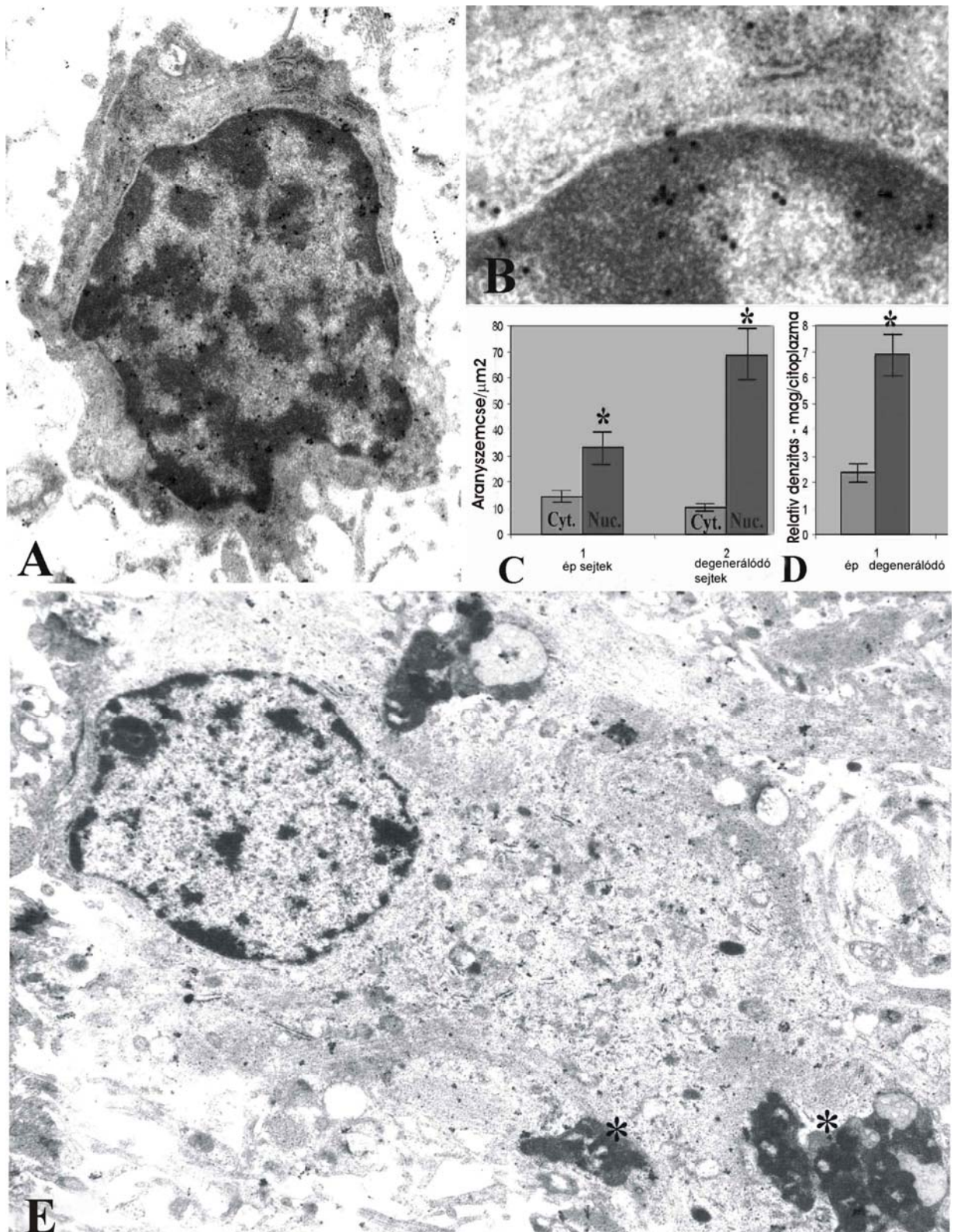
**23. ábra Citokróm-C és protein-tirozin-kináz-2 (SH-PTK2) immunfestés CJB-eseten hippocampus CA3 régióban és entorhinális kéregben.**

Citokróm-C (A-B) és SH-PTK2 (C-D) immunfestés CA3 régióban (A, C) és entorhinális kéregben (B, D). Eredeti nagyítások: 400x. Figyeljük meg, hogy a mitokondriális citokróm-C, valamint a citoplazmatikus mátrixban diffúzan lokalizálódó protein-tirozin-kináz-2 (SH-PTK2) enzim immunreaktivitása az entorhinális kérgi, morfológiailag sérült, vulnérábilis sejtekben is hasonló intenzitású, mint a betegség által nem érintett hippocampus CA3 ép piramissejtjeiben (B vs. A, és D vs. C). Mindkét immunfestés a vulnérábilis sejtekben is citoplazmatikus (B és D).

Antitest	Az immunfestés jellege a vizsgált agyterületeken/sejtpopulációkban életkori kontroll esetekben*	Az immunfestés jellege a beteg esetek pathológiailag érintett területeinek vulnérábilis sejtjeiben*
20S proteaszóma	Elsősorban citoplazmatikus	Fokozott magi
S6b, S10b 19S RC ATPázok	Elsősorban citoplazmatikus	Fokozott magi
S4, S7 19S RC ATPázok	Elsősorban magi	Fokozott magi
Ubiquitin	Elsősorban magi	Fokozott magi
Hsp72	Elsősorban citoplazmatikus	Gyenge citoplazmatikus

**5. táblázat Az UPR vizsgált komponenseinek redisztribúciója a beteg esetek pathológiailag érintett területeinek vulnérábilis sejtjeiben**

\*: entorhinális kéreg neuronjai, n. oliva inferior neuronjai, kisagyi granuláris sejtek CJB esetén; CA1-subiculum-entorhinális kéreg neuronjai AK esetén.



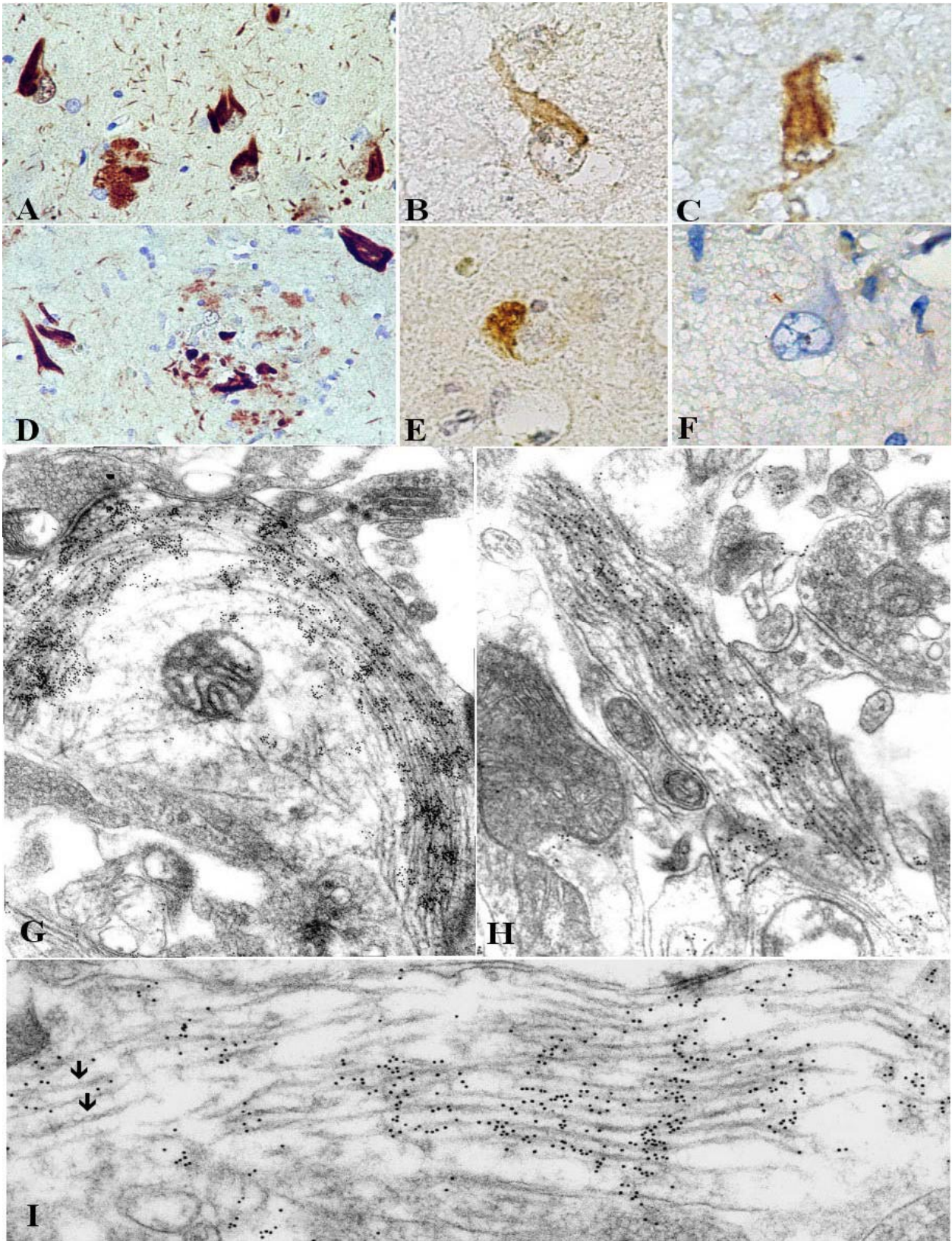
**24. ábra** Az S4 19S RC ATPáz immun-elektronmikroszkópos lokalizációja és a jelölés kvantifikálása

A degenerálódó sejtek magja erősen heterokromatikus. A mag körül vékony, elektrondenz citoplazma található (A, 10.000x). A degenerálódó sejtkben az S4 19S RC ATPáz markáns magi lokalizációt mutat (B, 72.000x). Az S4 19S RC ATPáz-t reprezentáló aranyszemcsék száma szignifikánsan magasabb a magban, mint a citoplazmában mind a morfológiailag ép, mind a degenerálódó sejtekben (C). Ugyanakkor, az aranyszemcsék mag/citoplazma aránya szignifikánsan nagyobb a morfológiailag degenerációt mutató sejtekben (D) (Student's T-teszt,  $P < 0.05$ ). Az ábra E paneljában egy morfológiailag ép sejtet láthatunk (E, 6000x, csillag: lipofuscin).



### 5.3.3.3. Pathológias inklúziók immunpozitivitása

A kóros fehérjezárványok immunreaktivitásának vizsgálatokor számos epitópfeltárási módszert kipróbáltunk (lásd 4. táblázat). A leghatékonyabbnak a táblázatban "H" kóddal jelölt protokoll bizonyult (80%-os hangyasav 1 percig, mikrohullámú kezelés 0.01 M citrátpufferben (pH = 6.0) 10 percig), ezért a továbbiakban ezt alkalmaztuk. Alzheimer-kóros mintákban a neurofibrilláris kötegek (NFT) és a disztrófiás neuritek erős immunfestést mutattak ubiquitinre és S6b alegységre, azonban nem mutattak festést az S7 és S4 alegységekre. A neurofibrilláris kötegek szintén immunpozitívnak bizonyultak 20S proteaszómára, S6a alegységre és Hsp72-re. A neurofibrilláris kötegek páros helikális filamentjeinek 20S és S6b immunfestését immunogold elektronmikroszkópiával is megerősítettük Alzheimer-kóros temporális kérgi biopsziás mintában. A CJB esetekben, az ubiquitin kivételével, egyik antitest sem immunreaktív a kóros prionfehérje lerakódásokban (25. ábra).



**25. ábra UPR és Hsp72 immunoreaktív fehérjezárványok Alzheimer-kórban**

Ubiquitin immunoreaktív neurofibrilláris kötegek (NFT) és disztrófiás neuritek (A); 20S proteasóma („B” antitest) immunoreaktív neurofibrilláris köteg (B); Hsp72 immunoreaktív neurofibrilláris köteg (C); S6b immunoreaktív neurofibrilláris kötegek és disztrófiás neuritek (D); S6a immunoreaktív neurofibrilláris köteg (E); a neurofibrilláris kötegek negatívak S6a preimmun szérumra (F). A neurofibrilláris kötegek páros helikális filamentumai (I, nyilak) erősen pozitívak ubiquitinre (G, 24.000x), S6b 19S RC ATPázra (H, 32.000x), és 20S proteasómára (I, 60.000x) - immunogold-elektronmikroszkópia. A fénymikroszkópos képek eredeti nagytításai: 400x (A, D), 1000x (B, C, E, F).

## 6. FONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK

- Munkánk során olyan epitópfeltárási módszereket dolgoztunk ki, amelyek segítségével az UPR számos komponensét lokalizáltuk patkány agyon, valamint kontroll és neurodegeneratív humán agymintákon.
- Részletes immunhisztokémiai vizsgálataink egyértelműen bizonyítják, hogy az UPR 19S RC ATPázai közül az S4 és az S7 elsősorban a sejtmagban, míg az S6a, S6b és az S10b döntően a citoplazmában lokalizálódik a humán és patkány agymintákban egyaránt (az S6a alegységet ezen túl még egyes magi testekben is kimutattuk, lásd 3. pont). Egyedül az S8 alegység intracelluláris eloszlása tér el a kétféle mintában, nevezetesen: a patkány agyban döntően sejtmagi, az emberi agyban viszont főként citoplazmatikus.
- Patkány agyban mind a neuronok, mind a gliasejtek egyes magi testjeiben széles körű immunreaktivitást tapasztaltunk ubiquitinre, 20S proteaszómára és az S6a 19S RC ATPázra.
- Az ubiquitin, a vizsgált proteaszóma alegységek, valamint a Hsp72 immunreaktivitásának intenzitása humán agyban anatómiai régióként változik mind a kontroll, mind a beteg esetekben. Azok a régiók, amelyek mind a kontroll, mind a beteg esetekben a gyengébb immunreaktivitást mutatják, a Creutzfeld-Jakob betegségben és az Alzheimer-kórban a betegségekben neuropathológiailag érintett területek, míg az erősebb immunreaktivitásúak megkíméltek.
- A kisagy érintettségű CJB esetekben, a védett Purkinje-sejtekben a kontrollokhoz képest szignifikánsan erősebb Hsp72 immunreaktivitás figyelhető meg a szemikvantitatív értékelés (score) alapján, míg a vizsgált proteaszóma alegységek esetén ezt nem tapasztaltuk egy anatómiai régió, illetve sejttípus esetén sem.
- A neurodegeneratív mintákban az ubiquitin, a 20S proteaszóma, valamint az S4, S7 és az S6b 19S RC alegységek erős magi immunreaktivitást mutatnak a pathológiailag érintett területek morfológiailag sérült és/vagy TUNEL-pozitív vulnerábilis neuronjaiban.

## 7. MEGVITATÁS

### 7.1. Az UPR celluláris és szubcelluláris immunlokalizációja egészséges humán és patkány agyban

#### 7.1.1. *Az ubiquitin immunlokalizációja*

Pathológiai anyagon az ubiquitin lokalizációját vizsgáló tanulmányok elsősorban a kóros fehérjezárványok ubiquitin-immunreaktivására koncentrálnak, az ubiquitin celluláris lokalizációját többnyire csak mellékesen említik (Kovacs és mtsai., 2003; Lowe és mtsai., 1993; Stephens és mtsai., 2001). Munkánk során a citrátpufferes és a Tris-EDTA hőindukálta epitópfeltárásoknak olyan új változatait dolgoztuk ki, amelyek lehetővé tették az ubiquitin (és egyéb UPR-komponensek) celluláris immunreaktivitásának alaposabb tanulmányozását. Eredményeink szerint az ubiquitin immunreaktivitás döntően magi, de kevésbé a citoplazma is pozitív. Ez a szubcelluláris mintázat széleskörű és konzekvens az összes vizsgált neuronpopulációban, mind a patkány, mind a humán szöveten.

Az általunk tapasztalt prominens magi ubiquitin lokalizáció - azon túl, hogy az UPR a sejtmagban is intenzíven bontja a sérült, vagy már szükségtelen proteineket (Glickman és Ciechanover, 2002) - utalhat az ubiquitin fontos magi szerepére a hisztonok stabilizálásában és számos, proteaszómától függő vagy attól független transzkripció folyamatban (Muratani és Tansey, 2003) (részletesen lásd: 7.1.3.).

#### 7.1.2. *A 20S proteaszóma immunlokalizációja*

Eredményünk, miszerint a 20S PS agyszöveten döntően citoplazmatikus lokalizációjú, megerősíti Kamakura korai megfigyeléseit (Kamakura és mtsai., 1988). A biokémiai vizsgálatok, melyek szerint normál agyhomogenátumban a 20S PS-aktivitás döntően (85-90%-ban) a citoplazmához köthető (Keller és mtsai., 2000a), szintén jó összhangban állnak saját megfigyeléseinkkel.

A vizsgálataink során gyakran észlelt intenzív, gyűrűszerű perinukleáris 20S PS festés morfológiai adatokkal támasztja alá azokat a korábban élesztőn leírt eredményeket, miszerint a proteaszómának fontos szerepe van a perinukleáris ER mentén a hibásan szintetizálódott fehérjék eltávolításában (Enenkel és mtsai., 1998). Ugyanakkor, a gliasejtekben talált gyakori magi 20S PS immunlokalizáció ezen sejtek mitotikus aktivitására utalhat, ugyanis a mitotikus

sejtekben az UPR-nek kritikus szerepe van a sejtciklus szabályozásában (ellentétben a posztmitotikus neuronokkal) (Ding és Keller, 2001).

### 7.1.3. A 19S RC alegységeinek immunlokalizációja

Részletes immunhisztokémiai vizsgálataink bizonyítják, hogy az UPR 19S RC ATPázai közül az S4 és az S7 elsősorban a sejtmagban, míg az S6a, S6b és az S10b döntően a citoplazmában lokalizálódik a humán és patkány agymintákban egyaránt (az S6a alegységet ezen túl még egyes magi testekben is kimutattuk, lásd: 7.1.4. fejezet). Egyedül az S8 alegység intracelluláris eloszlása tér el a kétféle mintában, nevezetesen: a patkány agyban döntően sejtmagi, az emberi agyban viszont főként citoplazmatikus.

Élesztőkön végzett genetikai tanulmányok szerint a hat 19S RC ATPáz funkcionálisan nem redundáns (Glickman és mtsai., 1998). Ugyanakkor, Rivett kutatócsoportja patkány agy frakciókat vizsgálva azt találta, hogy a magi és a citoplazma frakció között szignifikáns különbségek vannak különböző 19S RC ATPázok és nem ATPázok mennyiségében, pl. az S8 mennyisége szignifikánsan nagyobb a magi frakcióban, mint a citoplazmában (Brooks és mtsai., 2000). Mindeztől, az egyetlen általunk ismert, a 19S RC ATPázok komparatív immunlokalizációját vizsgáló munka a dohányyszender (*Manduca sexta*) interszegmentális izmain készült. Lőw és munkatársai szerint az S6a és S10b alegységek elsősorban magi, az S6b elsősorban citoplazmatikus immunlokalizációt mutattak, míg az S7 alegység mindkét kompartmentben hasonló intenzitással fordult elő. Mindezek alapján a szerzők felvetik annak a lehetőségét, hogy a 26S PS képes megváltoztatni pontos alegységösszetételét (Low és mtsai., 2000). Hasonló jelenséget a 20S proteaszóma esetén már leírtak: a *Drosophila* 20S PS alegységösszetétele az egyedfejlődés során jelentősen változik (Haass és Kloetzel, 1989). IFN- $\gamma$  indukció hatására az emlős 20S PS összetétele szintén megváltozik, három alternatív alegység épülhet be a  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  és  $\beta_5$  alegységek helyett: a  $\beta_{1i}$  (LMP2), a  $\beta_{2i}$  (MECL1), és a  $\beta_{5i}$  (LMP7). Ezek a módosult alegységösszetételű proteaszómák az úgynevezett immunproteaszómák, amelyek feladata az intracelluláris pathogénekből antigén prezentációra alkalmas peptidek készítése (Rivett, 1998).

Az egyik lehetséges magyarázat a 19S RC ATPázok általunk tapasztalt különböző lokalizációs mintázataira az, hogy a 19S alkomplesz a magi és a citoplazmatikus kompartmentekben különböző, de az adott kompartmentben relatíve állandó alegységösszetételű változatokban van jelen. Másrészt, az S4, S7 és patkányban az S8 alegységek magi lokalizációja egybevág azokkal a korábbi, több modellen is leírt kísérleti

tapasztalatokkal, hogy a 19S RC ATPázok (asszociálva a 20S PS-val, vagy attól függetlenül is) transzkripció regulátorok, vagy részt vesznek a DNS javító-mechanizmusokban (Muratani és Tansey, 2003).

Az UPR és különösen egyes komponensei (ubiquitin, 19S RC ATPázok), valamint a transzkripció és annak regulációja között szoros és sokrétű strukturális és funkcionális kapcsolat van. Az UPR a következő elvi módokon játszhat szerepet a transzkripció szabályozásában (Conaway és mtsai., 2002; Muratani és Tansey, 2003):

1./ Számos transzkripciót kivitelező és azt reguláló fehérje UPR-mediálta módon bomlik le. Ezen folyamatok időbeli és térbeli koordinálása a transzkripció-reguláció egyik kulcsmomentuma.

2./ Transzkripciót kivitelező és azt reguláló fehérjék (mono)ubiquitinilációja, mint poszttranszlációs módosítás megváltoztatja ezen fehérjék aktivitását, és más fehérjékhez való affinitását.

Régóta ismert, hogy az ubiquitinilált H2A és H2B (uH2A, uH2B) a transzkripcionálisan aktív kromatin markere. A monoubiquitinilált hisztonok elősegítik a transzkripciót, feltételezhetően lazítják a kromatin szerkezetét, illetve növelik a hiszton-deacetiláz kapcsolódásának valószínűségét (Muratani és Tansey, 2003). Élesztőben, számos transzkripció faktor (TF) transzkripció aktivátor domén (TAD)-függő ubiquitinilációja szükséges a transzkripció aktiválásához (Conaway és mtsai., 2002). Ugyanakkor, a Met4 nevű TF az ubiquitiniláció által inaktiválódik anélkül, hogy UPR-mediált módon lebomlana (Kaiser és mtsai., 2000). Ismert, hogy a proteaszómális ATPázok gátlása *in vitro* csökkenti a DNS-reparáció (nucelotide excision repair – NER) hatékonyságát, ugyanakkor a proteaszómális fehérje degradáció gátlása nincs hatással a NER-re (Russell és mtsai., 1999). Nemrégiben Johntson és munkatársai leírtak egy APIS-nak elnevezett molekuláris komplexet {APIS: AAA proteins independent of 20S}, amely a 19S RC ATPázaiból épül fel, és számos általános transzkripció faktorral (GTF) asszociálódik. Véleményük szerint az APIS-komplex élesztőben a transzkripció elongációjához szükséges, a 26S proteasóma közreműködése nélkül. Ugyanakkor, az APIS működési mechanizmusa még nem tisztázott, és az sem világos, hogy a mechanizmus jelen van-e magasabbrendű eukariótákban (Ferdous és mtsai., 2001; Gonzalez és mtsai., 2002; Sun és mtsai., 2002).

3./ A 19S RC ATPázok együtt, vagy külön-külön transzkripciót kivitelező és azt reguláló fehérjék konformációjának módosulását energetizálják, ezáltal befolyásolják ezen fehérjék funkcióját.

Az UPR erőteljesen befolyásolja az RNS polimeráz II (Pol-II) működését. Ennek hipotetikus modellje a következő: a transzkripció aktivátorok E3 enzimeket rekrutálnak a promóter-komplexbe, amelyek segítik az őket felismert aktivátorok, a Pol-II, egyes hisztonok, és egyéb TF-ok poliubiquitinilációját. Ennek hatására a 26S PS lebontja az aktivátorokat, elkerülendő a transzkripció reiniciációját. A már fent említett APIS komplex segíti a Pol-II-t „elongáció-kompetens formába” hozni, vagyis a Pol-II működéséhez, a transzkripció elongációjához a Pol-II konformációjának előzetes, ATP-függő módosítása szükséges. A rekrutált 26S proteaszóma együtt mozog a transzkripciós komplexszel, majd a folyamat végén segíti a Pol-II felszabadulását, illetve hiba esetén leállítja az elongációt a transzkripciós komplex egyes tagjainak lebontása által. Ez utóbbi folyamatokat feltételezhetőleg a transzkripciós komplex komponenseinek konformáció-változás miatt bekövetkező ubiquitinilációja, illetve foszforilációja-defoszforilációja indukálja (Conaway és mtsai., 2002; Muratani és Tansey, 2003).

#### 7.1.4. *A magi testek immunpozitívak az UPR különböző komponenseire – klasztoszómák*

Eredményeink szerint egyes magi testek (2-5db/magi) erősen immunoreaktívak ubiquitinre, 20S PS-ra és az S6 19S RC ATPázra. Ezek a magi testek mind a neuronokban, mind a gliasejtekben megtalálhatóak, minden vizsgált agyterületen, de csak patkány agyban. Egy nemrégiben megjelent közleményben, Lafarga és munkatársai leírták az úgynevezett klasztoszómákat. A klasztoszómák magi testek, amelyek erősen immunreaktívnak bizonyultak 19S és 20S PS-ra, ubiquitinre és néhány proteaszóma szubsztrátra számos sejttípusban (neuronban és gliasejtekben, fibroblasztokban és HeLa sejtvonalakon) *in vitro*, és patkány agyban a magnocelluláris neuroszekréciós sejtekben *in vivo*. A klasztoszómákat dinamikus struktúráknak találták: intraperitoneálisan adott hipertóniás NaCl injekció hatására a fent említett hipotalamikusan neuroszekréciós neuronokban erősen megnőtt a számuk. A tanulmány szerzői szerint a klasztoszómák magi proteolitikus centrumok, amelyek lebontandó szubsztrátokat összegyűjtve növelik a magi proteolízis hatékonyságát (Lafarga és mtsai., 2002). Az általunk leírt magi testek erősen emlékeztetnek a klasztoszómákra. A mi eredményeink szerint azonban ezek a magi testek széleskörűen előfordulnak a gliasejtekben és számos neurontípusban patkány agyban mindennemű előkezelés nélküli kontroll állatokban is. Humán agyban nem találtunk ilyen testeket, amely felveti annak a lehetőségét, hogy érzékenyek a fixálásra (immerziós fixálás a humán agyakon vs. perfúzió a patkány agyakon) és a *post mortem* hatásokra.

## **7.2. Molekuláris chaperonok és az UPR lokalizációja humán neurodegeneratív agyszöveten**

### *7.2.1. A szelektív vulnerabilitás kérdése a neurodegeneratív betegségekben*

A prionbetegségekben és az Alzheimer-kórban szelektív neuronpusztulás figyelhető meg. A Creutzfeldt-Jakob betegségben, míg a hippocampus általában védett régió, a temporális izokortex erősen vulnérabilis, különösen annak parvalbumin-pozitív GABAerg interneuronjai a IV. rétegben (Guentchev és mtsai., 1997). Szintén CJB eseteket vizsgálva azt találták, hogy az oxidatív stresszmarker 8-hidroxi-guanozin elsősorban a temporális kérgi neuronokban lokalizált, a hippocampus neuronjaiban nem (Guentchev és mtsai., 2002). Amennyiben a CJB-ben agytörzsi és/vagy kisagyi pathológia is megfigyelhető, a kisagyi Purkinje-sejtek és a nyúltvelő dorzális magcsoportjai védettebbek, mint a kisagyi granuláris sejtek populációja és az oliva inferior neuronjai (Kovacs és mtsai., 2001; Kretschmar és mtsai., 1997). Az Alzheimer-kór esetén, a temporális izo- és allokokortex különösen érintett, bár a hippocampus egyes CA régiói nem azonos mértékben. A neurofibrilláris pathológia, a granulovakuoláris degeneráció, valamint a neuronvesztés sokkal súlyosabb a CA1 régióban, mint a viszonylag rezisztens CA4-3 régiókban (Bobinski és mtsai., 1997; Xu és mtsai., 1992). Ha különböző stádiumú Alzheimer-kóros eseteket hasonlítunk össze, a Braak I-II-III-esetcsoportban a neuronvesztés az Ammonszarvon belül a CA1 régióra korlátozódik. A Braak IV-V-VI.-csoportban az egész Ammonszarv érintett, de a neuronvesztés szignifikánsan kisebb a hilusban (CA4), mint a CA1 régióban (Bobinski és mtsai., 1997).

### *7.2.2. A Hsp72 molekuláris chaperon és az UPR-komponenseinek szelektív regionális eloszlása – neuroprotektív szerep*

Immunhisztokémiai vizsgálataink szerint az ubiquitin, számos 19S RC ATPáz és az indukálható Hsp72 immunfestésének intenzitásában markáns regionális különbségek tapasztalhatók az egészséges kontroll és a neurodegeneratív agymintákon egyaránt. Ezeket a megfigyeléseket összevetve a morfológiai vizsgálatok és a TUNEL-reakciók eredményeivel, megállapítható, hogy éppen azok a sejtpopulációk védettebbek a neurodegenerációs betegségekre jellemző fokozott neuronpusztulással szemben, amelyekben az immunfestés intenzitása a fenti fehérjékre nézve a legnagyobb mind a kontroll mind a beteg esetekben (hippocampus CA4-3-2, kisagyi Purkinje-sejtek, dorzális agytörzsi magok). Ezzel ellentétben,



azon neuronpopulációk (pl. temporális kérgi interneuronok, cerebelláris granuláris sejtek, az oliva inferior neuronjai), amelyekben a jelintenzitás általánosan alacsonyabb mind a kontroll, mind AK és CJB esetekben (kivéve néhány erősen UPR-magpozitív vulnerábilis sejtet a beteg esetekben, lásd később), a betegségek által erősen érintett sejtpopulációk, amelyekben gyakori a TUNEL-pozitivitás. Saját eredményeink és az irodalmi adatok alapján tehát jogosan vehető fel az a lehetőség, hogy az indukálható Hsp72 molekuláris chaperon mellett az UPR (vagy egyes komponensei) is fontos szerepet játszhatnak a neuroprotekción az AK és a CJB esetén egyaránt. Ugyanakkor, az immunhisztokémiai megközelítés mellett további biokémiai vizsgálatok szükségesek a kérdéses neuronpopulációk mRNS és proteintartalmának elemzésére (pl. lézer-mikrodisszekció után PCR, illetve Western-blotting módszerekkel).

Több vizsgálat ismert, amelyek a Hsp72 anti-apoptotikus szerepére utalnak. Hsp72 deficiens sejtvonalon 30 perces 42<sup>0</sup>C-os hő-stressz morfológiailag és biokémiailag megerősíthető aktív sejthalált vált ki (Guzik és mtsai., 1999). Monocitáknál a *Staphilococcus aureus* baktérium fagocitálása apoptózist vált ki a sejtekben. 24 óráig tartó 41.5<sup>0</sup>C-os hő-stressz, amely indukálta a Hsp72 szintézist, szignifikánsan emelte az apoptózis-rezisztenciát. Anti-sense oligonucleotiddal blokkolt Hsp72 expresszió ez utóbbi esetben viszont ismét beindította az apoptotikus folyamatokat (Buzzard és mtsai., 1998). A Hsp72 és az apoptózis kapcsolata molekuláris szinten rendkívül összetett: a Fas-ligand nevű proapoptotikus faktor gátolja a HSF-1 hiperfoszforilációját. A HSF-1 a Hsp72 transzkripciós faktora, amely hiperfoszforilációval aktiválódik. A Fas-ligand ezirányú hatását a kaspáz-1 (ICE) inhibitor gátolta (Schett és mtsai., 1999). Mindemellett, a Hsp72 gátolhatja a komplett apoptozóma-komplex kialakulását úgy, hogy egyrészt gátolja a citokróm-C kiáramlását a sérült mitokondriumokból, másrészt az Apaf-1-hez kötődve megakadályozza a prokaspáz-9 kötődését és aktiválódását (Beere és mtsai., 2000; Steel és mtsai., 2004). A Hsp72 általános citoprotektív hatása ugyanakkor a chaperon-funkcióval is magyarázható. A Hsp72, mint chaperon, stressz hatására fehérjékhez kapcsolódik, és védi azok natív konformációját (Hartl, 1996).

Az UPR, a Hsp70 és a Hsp90 molekuláris chaperonok között szoros az együttműködés, pl. az UPR gátlása esetén hő-sokk faktorok (HSF-1 és HSF-2) átíródása indukálódik. A molekuláris chaperonok a hibásan feltekeredett fehérjékkel asszociálódnak, és a fehérjék refoldingját katalizálják. Ha ez sikertelen, a rosszul feltekeredett fehérjék poliubiquitinilálódnak, és UPR-mediált úton lebomlanak. Ezt a folyamatot a Hsp70 és Hsp90 adapter fehérjékkel történő asszociációja segíti. A BAG-1 nevű adapter például egyszerre képes kötödni a molekuláris chaperonokhoz és a 19S RC-hez, egy tranziens komplexbe hozva

a molekuláris chaperonokat és a 26S PS-t. A CHIP pedig egy E3 aktivitással rendelkező adapter ligáz, úgynevezett minőségi kontroll ubiquitin-ligáz {quality control E3}, amely képes ehhez a komplexhez kötődni. Amennyiben a Hsp fehérjék sikertelenek a rosszul tekeredett fehérjék natív konformációjának visszaállításában, a BAG-1 és CHIP adapterek közreműködésével a molekuláris chaperonok a menthetetlen fehérjéket „átadják” az UPR-nek. Ez a nemrégiben leírt folyamat, a fehérje minőség kontroll {protein quality control} rendkívül intenzíven kutatott, és számos részlet vár még tisztázásra (Demand és mtsai., 2001; Luders és mtsai., 2000; Murata és mtsai., 2001).

Az UPR-komponensek és a molekuláris chaperonok fokozottabb jelenléte egyes sejtekben nagyobb kapacitású protein minőség kontrollra utalhat. Ez egyrészt jelezheti azt, hogy az adott sejtpopulációban intenzívebb az általános fehérje-turnover. Ugyanakkor, a magasabb immunfestés-intenzitású sejtpopulációk a vizsgált neurodegeneratív betegségekből egytől-egyig védettek, nem érintettek. Így felvetődik annak lehetősége, hogy azon sejtpopulációkban, amelyekben a Hsp72 és az UPR komponenseinek immunreaktivitása alapvetően magasabb, a feltételezhetően nagyobb aktivitású fehérje minőség kontroll a neuroprotekciónak egyik fontos tényezője lehet. Másrészt, az általános nukleáris lokalizációt mutató ubiquitin, valamint S4 és S7 19S RC ATPázok, mint ezt már korábban említettük, részt vesznek a transzkripció regulációjában és a DNS-javító mechanizmusokban {DNA repair}, akár a 20S vagy 26S proteaszómától függetlenül is. Mivel ezen fehérjék immunfestésének intenzitása különösen erősen mutatja a fent leírt regionális különbségeket, felvethető, hogy a fent említett transzkripció-regulációs és DNS-javító mechanizmusok szintén részt vesznek a neuroprotekciónak.

Ismert, hogy biokémiai, etiológiailag különböző eredetű neurodegeneratív betegségekből sokszor ugyanazon sejtpopulációk sebezhetőek, érintettek (pl.: hippocampus CA1) (Graham és Lantos, 2002; Love, 2000). Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a Hsp72 molekuláris chaperont és egyes UPR-komponenseket eleve kisebb mennyiségben tartalmazó sejtpopulációk az emberi agyban - mintegy „leggyengébb láncszemként” - hajlamosabbak a vulnabilitásra egyes neurodegeneratív megbetegedésekben (pl. AK, CJB). Ugyanakkor, a neuronális vulnabilitásnak sok egyéb biokémiai oka lehet, pl. az adott sejtpopuláció calcium-kötő fehérjéinek mennyisége, típusai, vagy egyéb molekuláris chaperonok (Damier és mtsai., 1999). Azon túl azonban, hogy egyes sejt típusok milyen molekuláris védelmi mechanizmusokkal vannak felvértezve, a vulnabilitásban más tényezők is szerepet játszhatnak, pl. az adott neuronpopuláció neurotranszmittere és projekciós kapcsolatai, a

neuronok körüli perineuronális extracelluláris mátrix {perineuronal net} biokémiai összetétele, stb (Belichenko és mtsai., 1999; Love, 2000).

A 20S PS és a vizsgált 19S RC ATPázok immunfestésének intenzitása alapvetően nem mutat szignifikáns különbségeket a kontroll és a beteg csoportok között. Ezt Western-blottinggal is megerősítettük kontroll és Alzheimer-kóros agyak temporális kérgi mintáin. Ezek az eredmények alátámasztják korábbi vizsgálatok eredményeit, melyek szerint - bár a 26S PS aktivitása csökkent az Alzheimer-kóros agyvelő érintett területein - a 20S PS egyes  $\alpha$  és  $\beta$  alegységeinek expressziójában nincs különbség. A kisebb PS aktivitás az UPR csökkent, elégtelen működésére utalhat (Keller és mtsai., 2000b). Ding és munkatársai felhívják a figyelmet arra, hogy ezeken a sérült agyrészekben tapasztalható nagyfokú sejtpusztulás önmagában is okozhatja a szövetben mért redukálódott PS-aktivitást. Ugyanakkor tény, hogy a PS-aktivitás csökkenését oxidatív stressz hatásának kitett *in vitro* rendszerekben is kimérték (Ding és Keller, 2001). A vizsgált UPR-komponensekkel ellentétben, a Hsp72 molekuláris chaperon immunfestésének intenzitása a CJB esetekben a védett Purkinje-sejtekben szignifikánsan erősebb, a vulnerábilis oliva inferior sejteiben viszont gyengébb, mint a kontroll esetekben. A védett Purkinje-sejtek tehát a kóros prionfehérje okozta kórfolyamatokra erős stresszfehérje-indukcióval válaszolnak. A Hsp72 szintje a betegség terminális fázisáig magas marad, és a pozitív sejtek megkíméltek a sejtpusztulástól (TUNEL-negatívak). Mindez a Hsp72 citoprotektív szerepét méginkább hangsúlyozza.

### 7.2.3. Az UPR-komponenseinek magi redisztribúciója

Az Alzheimer-kóros és CJB esetekben a betegség által érintett neuronpopulációkban gyakran találtunk olyan diszkrét neuronokat, amelyek igen erős magpozitivitást mutatnak ubiquitinre, 20S PS-ra, valamint az S4, S6b, S7 és S10b 19S RC ATPázokra. Megjegyzendő, hogy a kontroll esetekben, ezekben a neuronpopulációkban a 20S PS, valamint az S6b és S10b 19S RC ATPázok immunreaktivitása döntően citoplazmatikus, míg az ubiquitin, valamint az S4 és S7 19S RC ATPázoké döntően magi, de ez utóbbi magi immunfestésnek minden sejtben nagyon alacsony az intenzitása. Mivel a „no first antibody kontroll” és a megfelelő preimmun szérum kontrollok (pl. 20S-B preimmun) párhuzamos metszeteken nem mutattak semmilyen festést, a kondenzált magok téves pozitivitása kizárható. Az asztrocitamarker GFAP kimutatására használt poliklonális antitest csak az asztrocitákat festette, a kondenzált magokat nem. Mindezen túl, a mitokondriális citokróm-C, valamint a citoplazmatikus mátrixban diffúzan lokalizáló protein-tirozin-kináz-2 (SH-PTP2) enzim

immunreaktivitása ezekben a sejtekben is hasonló intenzitású, mint a betegség által nem érintett agyi régiók ép sejteiben, és immunfestésük a vulnerábilis sejtekben is citoplazmatikus.

A CJB és Alzheimer-kóros esetek érintett területein talált, az UPR vizsgált komponenseire erősen magpozitív neuronokban az erős magpozitivitást feltételezhetően az UPR komponenseinek redisztribúciója és/vagy csökkent turnover okozhatja. Az UPR vizsgált komponenseinek együttes nagy intenzitású előfordulása felveti annak lehetőségét, hogy működő 26S proteaszómák találhatók ezekben a magokban. Ezen erősen magpozitív sejtek kizárólag olyan sejtpopulációkban fordulnak elő, ahol a Hsp72, az ubiquitin és a 19S RC ATPázok immunfestésének intenzitása a kontrollokban is alapvetően alacsony, és előfordulásuk korrelál a TUNEL-pozitív vulnerábilis sejtek eloszlásával is.

Ubiquitin-protein konjugátumok és a 20S PS magi akkumulációját/redisztribúcióját több kísérletes stressz-modellen is leírták már *in vitro*. Akut ischémiás-hipoxiás patkányból származó hippocampus-eredetű tenyészetben a magi ubiquitin immunreaktivitás fokozódását fény- és elektronmikroszkópos szinten is megerősítették (Risuleo és mtsai., 2003). Mind a glukóz-éhség, mind a hipoxia a 20S PS magi akkumulációját indukálja humán HT-29 vastagbél-tumor, és A2780 petefészek-tumor eredetű sejtvonalakon (Ogiso és mtsai., 1999). Szérum-megvonással, valamint alacsonyabb dózisu  $\gamma$ -sugárzással indukált apoptózis során humán 3T6 sejteken, illetve humán interfázisos limfocitákon szintén magi ubiquitin akkumulációt írtak le (Bresin és mtsai., 2001; Delic és mtsai., 1993).

A TUNEL-reakció, amely *in situ* detektálja a fragmentálódott DNS-t, hasznos markere a DNS-károsodásnak. Korábbi tanulmányok a TUNEL-reakciót „apoptózis detektálásnak” nevezték. Ugyanakkor, a nagyobb mennyiségű fragmentálódott DNS-t tartalmazó sejtmag önmagában még nem feltétlenül utal apoptózisra. Sokkal inkább vulnerábilis sejteket jelöl, amelyekben az aktív sejthalál kezdeti lépései mellett kellően nem hatékony DNS-javító mechanizmus {repair} is jelen lehet (Ferrer, 1999; Jellinger és Stadelmann, 2000; Stadelmann és mtsai., 1998). Egyes tanulmányok szerint, ha a TUNEL-pozitív sejtek a krónikus neurodegeneratív mintákban egytől-egyig apoptotikus sejteket jelölnének, a sejtpusztulásnak sokkal nagyobb mértékűnek kellene lenni a tapasztaltnál (Sikorska, 2004). Cotman és munkatársai szerint az Alzheimer-kór által érintett neuronpopulációkban a vulnerábilis sejtek a tenyészetekben megfigyelhető, néhány óra alatt lejátszódó „klasszikus” apoptózis helyett, a halál és a védekezés közötti egyfajta dinamikus és erősen elnyújtott „döntési kaszkád”-folyamaton mennek keresztül (Cotman, 1998).

Összefoglalva, az UPR-komponenseire erős magi immunreaktivitást mutató neuronok feltételezhetően vulnérabilis sejtek, amelyekben az UPR komponenseinek erős magi lokalizációja az UPR-nek az aktív sejthalálban, és/vagy a magi (DNS) reparációs mechanizmusokban való részvételére utalhat.

#### 7.2.4. *Pathológiás inklúziók immunpozitivitása UPR-komponensekre és Hsp72-re*

A különböző protein-összetételű extra- vagy intracelluláris protein inklúziók a legkülönbözőbb neurodegeneratív betegségek fontos jellemzői. Számos szerző egybehangzó eredményei szerint az intracelluláris protein inklúziók gátolják a proteaszómák működését. Ugyanakkor az, hogy a protein aggregátumok okai vagy következményei-e a proteaszómagátlásnak, nem eldöntött kérdés. Valószínű, hogy az aggregátumok a gátolt proteaszómaműködés következtében fokozott mennyiségben képződnek, és maguk is egyre nagyobb mértékben gátolják a PS működését, tehát egy önerősítő folyamatról lehet szó (Bence és mtsai., 2001).

Az UPR egyes komponenseinek celluláris lokalizációs mintázatai mellett vizsgáltuk az Alzheimer-kórban és CJB-ben előforduló protein aggregátumok immunpozitivitását is, számos epitópfeltárási módszert felhasználva. A 20S-B, az anti-S6a és az anti-S6b antitestek preimmun szérumai egy epitópfeltárási esetén sem mutattak semmilyen immunreaktivitást a vizsgált fehérje inklúziókra.

Számos inklúzió jól ismert, és diagnosztikus markerként is használt ubiquitin-immunreaktivitásán túl (Alves-Rodrigues és mtsai., 1998) kimutattuk a neurofibrilláris kötegek immunreaktivitását 20S PS-ra és Hsp72 hő-sokk fehérjére, valamint a szenilis plakkok körüli disztrófiás neuritek immunreaktivitását S6b 19S RC alegységre. Mindezen eredmények kiegészítik és megerősítik a korábban, más kutatócsoportok által leírtakat (Hamos és mtsai., 1991; Ii és mtsai., 1997; Kwak és mtsai., 1991).

Neurodegeneratív betegségekben az agyban található protein inklúziókban az UPR más komponenseinek, így a karboxi-terminális hidroláznak (deubiquitiniláló enzim, lásd Irodalmi bevezető, 2.3.3 fejezet) és az ubiquitin-aktiváló enzimnek (E1) jelenlétét is leírták (Kwak és mtsai., 1991; McNaught és mtsai., 2002). Mindezen eredményeket, beleértve a saját eredményeinket is, úgy interpretálhatjuk, hogy az oxidált, sérült és aggregációra hajlamos fehérjék feldolgozása során az UPR különböző komponensei beépülnek a képződő fehérje aggregátumokba. Ezen inklúziók azonban nem minden UPR-komponensre immunpozitívak, és egy adott típusú aggregátum immunreaktivitása is változik az epitópfeltárási függvényében.

Mindez arra utal, hogy a különböző érési stádiumban lévő, alapvetően kristályszerkezetű protein aggregátumokban a beépült UPR-komponensek epitópjai korlátozottan elérhetőek, és kimutathatóságuk fokozott mértékben függvénye a használt antitestnek és az epitópfeltárási módszernek.

## **8. KÖVETKEZTETÉSEK**

Az ubiquitin, valamint az S4, S7 és S8 19S RC ATPázok domináns magi lokalizációját kimutató immuncitokémiai vizsgálataink morfológiai adatokkal támasztják alá azt az - eddig jórészt biokémiai eredmények alapján felvetett – elképzelést, miszerint az ubiquitin-proteaszóma rendszer számos komponense minden bizonnyal részt vesz a transzkripció szabályozásában és a DNS- reparációs mechanizmusokban is.

Kontroll patkány agyon végzett megfigyeléseink megerősítik a magi testek (klasztoszómák) létezését, sőt tapasztalataink szerint előfordulásuk az eddigi leírásokhoz képest lényegesen kiterjedtebb a glia- és az idegsejtekben egyaránt. Miután a klasztoszómák, a mi mintáinkban is, fokozottan immunpozitívak az UPR számos elemére, jogos a feltételezés, hogy ezek a struktúrák a sejtmagi fehérjék lebontásának koncentrált színterei. Ennek bizonyítása természetesen további molekuláris sejtbiológiai vizsgálatokat igényel.

Az ubiquitin, a számos proteaszóma alegység és a Hsp72 immunfestésének intenzitása - a kontroll és a neurodegeneratív humán agymintákban egyaránt – konzekvens regionális és szelektív eloszlást mutat. Az immunfestési mintázat és a TUNEL-pozitív sejtek eloszlása egyértelműen a fenti fehérjék neuroprotektív szerepére utal. A leggyengébb jelintenzitást ugyanis éppen azokban az anatómiai régiókban észleltük, amelyek az Alzheimer és a Creutzfeldt-Jakob betegségben a neuronpusztulás szempontjából a legérintettebbek. Ugyanakkor a CJB esetében a kisagy Purkinje-sejtekben intenzív, az egészséges kontrollnál is szignifikánsan erősebb Hsp72-pozitivitás figyelhető meg, ami egyik magyarázata e sejtek fokozott védettségének. Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az UPR egyes komponenseit és a Hsp72-t eleve alacsonyabb szinten expresszáló neuron populációk az agyban – „leggyengébb láncszemként” – a legsebezhetőbbek.

A neurodegeneratív mintákban a patológiailag leginkább érintett régiók egyes morfológiailag sérült neuronjaiban az ubiquitin és számos proteaszóma alegység (20S, S4, S7, S6b) intenzív magi koncentrációját tapasztaltuk, ami arra utal, hogy az UPR-nek a neurodegeneráció végső stádiumában, az aktív sejthalálban is fontos szerepe lehet.

## 9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Munkám során nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért hálás köszönetemet fejezem ki:

*Dr. László Lajos témavezetőmnek és Dr. Kovács G. Gábornak,*

valamint

*Dr. Lőw Péternek,*

*Dr. Herbert Budkának,*

*Dr. R. John Mayernek,*

*Dr. Carlos Gorbeának,*

*Dr. Kurucz Istvánnak,*

*Dr. Moszkovkin Georgijnak,*

*Dr. Fellingner Erzsébetnek,*

*Dr. Müller Ferencnek*

*Dr. Bagdy Györgynek,*

*Dr. Vannay Ádámnak,*

*Botond Gergőnek,*

*Andó Rómeónak,*

*Kirilly Eszternek,*

Továbbá:

*Bíró Eszternek,*

*Helga Flickernek,*

*Druskó Miklósnénak és*

*Pálfia Zsoltnénak.*

Köszönöm *Dr. Sass Miklós egyetemi tanárnak*, hogy a Disszertáció alapját képező munka többségét az általa vezetett Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszéken készíthettem el. Köszönettel tartozom továbbá az ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszéke, valamint az OPNI Neurokémiai és Neuropszichofarmakológiai laboratóriuma összes, külön meg nem nevezett munkatársának is.



## **10. IRODALOMJEGYZÉK**

- Adams R. Principles of Neurology. New York 1046: McGraw-Hill, 1997.
- Aguzzi A. Prion diseases, blood and the immune system: concerns and reality. *Haematologica* 2000; 85: 3-10.
- Aguzzi A, Blattler T, Klein MA, Raber AJ, Hegyi I, Frigg R, Brandner S, Weissmann C. Tracking prions: the neurografting approach. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53: 485-95.
- Akbar MT, Wells DJ, Latchman DS, de Belleruche J. Heat shock protein 27 shows a distinctive widespread spatial and temporal pattern of induction in CNS glial and neuronal cells compared to heat shock protein 70 and caspase 3 following kainate administration. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 93: 148-63.
- Akopian TN, Kisselev AF, Goldberg AL. Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *J Biol Chem* 1997; 272: 1791-8.
- Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 1967; 214: 764-6.
- Alves-Rodrigues A, Gregori L, Figueiredo-Pereira ME. Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. *Trends Neurosci* 1998; 21: 516-20.
- Alzheimer A. A unique illness involving the cerebral cortex. A case report from the mental institution in Frankfurt am Main *Allg Psychiatr Psych-Gerich Med* 1907; 64: 146-148.
- Amerik AY, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1695: 189-207.
- Amsterdam A, Pitzer F, Baumeister W. Changes in intracellular localization of proteasomes in immortalized ovarian granulosa cells during mitosis associated with a role in cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 99-103.
- Anonymus. Consensus recommendations for the post-mortem diagnosis of Alzheimer's disease. The National Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assesment of Alzheimer's Disease *Neurobiol Aging* 1997; 18: S1-2.
- Ardley HC, Robinson PA. E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem* 2005; 41: 15-30.
- Arnold JE, Tipler C, Laszlo L, Hope J, Landon M, Mayer RJ. The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J Pathol* 1995; 176: 403-11.

- Asher DM, Gibbs CJ, Jr., Sulima MP, Bacote A, Amyx H, Gajdusek DC. Transmission of human spongiform encephalopathies to experimental animals: comparison of the chimpanzee and squirrel monkey. *Dev Biol Stand* 1993; 80: 9-13.
- Aucouturier P, Frangione B, Wisniewski T. Prion diseases and the immune system. *Ann Med Interne (Paris)* 1999; 150: 75-8.
- Barral JM, Broadley SA, Schaffar G, Hartl FU. Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2004; 15: 17-29.
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 1986; 46: 417-28.
- Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 1998; 92: 367-80.
- Beaudry P, Cohen P, Brandel JP, Delasnerie-Laupretre N, Richard S, Launay JM, Laplanche JL. 14-3-3 protein, neuron-specific enolase, and S-100 protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1999; 10: 40-6.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 469-75.
- Belichenko PV, Miklossy J, Belser B, Budka H, Celio MR. Early destruction of the extracellular matrix around parvalbumin-immunoreactive interneurons in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Dis* 1999; 6: 269-79.
- Bell J. *Neuropathological Diagnosis of Human Prion Diseases - PrP Immunocytochemical Techniques*. Totowa NJ: Humana Press Inc., 1999.
- Benaroudj N, Goldberg AL. PAN, the proteasome-activating nucleotidase from archaeobacteria, is a protein-unfolding molecular chaperone. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 833-9.
- Bence NF, Sampat RM, Kopito RR. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 2001; 292: 1552-5.
- Bessen R. Neurodegenerative prion diseases. *Science and Medicine* 1996; Sept-Oct.: 12-21.
- Bissette G, Reynolds GP, Kilts CD, Widerlov E, Nemeroff CB. Corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in senile dementia of the Alzheimer type. Reduced cortical and striatal concentrations. *Jama* 1985; 254: 3067-9.
- Bobinski M, Wegiel J, Tarnawski M, Reisberg B, de Leon MJ, Miller DC, Wisniewski HM. Relationships between regional neuronal loss and neurofibrillary changes in the

- hippocampal formation and duration and severity of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 414-20.
- Bogyo M, McMaster JS, Gaczynska M, Tortorella D, Goldberg AL, Ploegh H. Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the *Escherichia coli* homolog HslV by a new class of inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 6629-34.
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 1982; 218: 1309-11.
- Bondareff W, Wischik CM, Novak M, Roth M. Sequestration of tau by granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1991; 139: 641-7.
- Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* 1976; 99: 459-96.
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 1991; 82: 239-59.
- Bresin A, Iacoangeli A, Risuleo G, Scarsella G. Ubiquitin dependent proteolysis is activated in apoptotic fibroblasts in culture. *Mol Cell Biochem* 2001; 220: 57-60.
- Brooks P, Fuertes G, Murray RZ, Bose S, Knecht E, Rechsteiner MC, Hendil KB, Tanaka K, Dyson J, Rivett J. Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem J* 2000; 346 Pt 1: 155-61.
- Brown DR, Herms J, Kretschmar HA. Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment. *Neuroreport* 1994; 5: 2057-60.
- Burger AM, Seth AK. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications. *Eur J Cancer* 2004; 40: 2217-29.
- Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black RA. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 1998; 273: 27765-7.
- Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M, Anderson RL. Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273: 17147-53.
- Carrell RW, Lomas DA. Conformational disease. *Lancet* 1997; 350: 134-8.
- Cash R, Dennis T, L'Heureux R, Raisman R, Javoy-Agid F, Scatton B. Parkinson's disease and dementia: norepinephrine and dopamine in locus ceruleus. *Neurology* 1987; 37: 42-6.

- Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 2005a; 121: 195-206.
- Castilla J, Saa P, Soto C. Detection of prions in blood. *Nat Med* 2005b; 11: 982-5.
- Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM, et al. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 1985; 315: 331-3.
- Chirag P. The Effect of Lipid Fluidity Modulating Agents on the Activity of Secretases. *Journal of Undergraduate Research, University of Florida* 2003; 4.
- Christie G, Markwell RE, Gray CW, Smith L, Godfrey F, Mansfield F, Wadsworth H, King R, McLaughlin M, Cooper DG, Ward RV, Howlett DR, Hartmann T, Lichtenthaler SF, Beyreuther K, Underwood J, Gribble SK, Cappai R, Masters CL, Tamaoka A, Gardner RL, Rivett AJ, Karran EH, Allsop D. Alzheimer's disease: correlation of the suppression of beta-amyloid peptide secretion from cultured cells with inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *J Neurochem* 1999; 73: 195-204.
- Ciehanover A, Hod Y, Hershko A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 81: 1100-5.
- Cohen FE, Pan KM, Huang Z, Baldwin M, Fletterick RJ, Prusiner SB. Structural clues to prion replication. *Science* 1994; 264: 530-1.
- Cole GM, Masliah E, Shelton ER, Chan HW, Terry RD, Saitoh T. Accumulation of amyloid precursor fragment in Alzheimer plaques. *Neurobiol Aging* 1991; 12: 85-91.
- Conaway RC, Brower CS, Conaway JW. Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* 2002; 296: 1254-8.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; 261: 921-3.
- Cotman CW. Apoptosis decision cascades and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1998; 19: S29-32.
- Cras P, Kawai M, Lowery D, Gonzalez-DeWhitt P, Greenberg B, Perry G. Senile plaque neurites in Alzheimer disease accumulate amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7552-6.
- Cuervo AM. Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 2004; 263: 55-72.
- Csermely P. *Stresszféhérjék: Vince Kiadó*, 2001.

- Dahlmann B, Kuehn L, Rutschmann M, Reinauer H. Purification and characterization of a multicatalytic high-molecular-mass proteinase from rat skeletal muscle. *Biochem J* 1985; 228: 161-70.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D(28K) immunohistochemistry. *Brain* 1999; 122 ( Pt 8): 1421-36.
- Davidsson P, Blennow K. Neurochemical dissection of synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr* 1998; 10: 11-23.
- Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 1976; 2: 1403.
- de Pril R, Fischer DF, van Leeuwen FW. Conformational diseases: an umbrella for various neurological disorders with an impaired ubiquitin-proteasome system. *Neurobiol Aging* 2006; 27: 515-23.
- De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 1998; 391: 387-90.
- DeArmond SJ, Prusiner SB. Etiology and pathogenesis of prion diseases. *Am J Pathol* 1995; 146: 785-811.
- DeBurman SK, Raymond GJ, Caughey B, Lindquist S. Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 13938-43.
- DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 1990; 27: 457-64.
- del Ser T, Bermejo F, Portera A, Arredondo JM, Bouras C, Constantinidis J. Vascular dementia. A clinicopathological study. *J Neurol Sci* 1990; 96: 1-17.
- Delic J, Morange M, Magdelenat H. Ubiquitin pathway involvement in human lymphocyte gamma-irradiation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 4875-83.
- Demand J, Alberti S, Patterson C, Hohfeld J. Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr Biol* 2001; 11: 1569-77.
- Dice JF. Molecular determinants of protein half-lives in eukaryotic cells. *Faseb J* 1987; 1: 349-57.
- Dice JF. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci* 1990; 15: 305-9.

- Ding Q, Keller JN. Proteasomes and proteasome inhibition in the central nervous system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 574-84.
- Dou F, Netzer WJ, Tanemura K, Li F, Hartl FU, Takashima A, Gouras GK, Greengard P, Xu H. Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 721-6.
- Dubiel W, Ferrell K, Rechsteiner M. Subunits of the regulatory complex of the 26S protease. *Mol Biol Rep* 1995; 21: 27-34.
- Edenhofer F, Weis S, Wimacker E-L, Famulok M. Chemistry and Molecular Biology of Transmissible Spongiform Encephalopathies. *Angew Chem Int Ed Engl* 1997; 36: 1674-1694.
- Enenkel C, Lehmann A, Kloetzel PM. Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *Embo J* 1998; 17: 6144-54.
- Eng LF, Ghirnikar RS. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 1994; 4: 229-37.
- Estibeiro JP. Multiple roles for PrP in the prion diseases. *Trends Neurosci* 1996; 19: 257-8.
- Etlinger JD, Goldberg AL. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 54-8.
- Evans CG, Wisen S, Gestwicki JE. Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid beta-(1-42) aggregation in vitro. *J Biol Chem* 2006; 281: 33182-91.
- Ferdous A, Gonzalez F, Sun L, Kodadek T, Johnston SA. The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* 2001; 7: 981-91.
- Fergusson J, Landon M, Lowe J, Dawson SP, Layfield R, Hanger DP, Mayer RJ. Pathological lesions of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies brains exhibit immunoreactivity to an ATPase that is a regulatory subunit of the 26S proteasome. *Neurosci Lett* 1996; 219: 167-70.
- Ferrell K, Wilkinson CR, Dubiel W, Gordon C. Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 83-8.
- Ferrer I. Nuclear DNA fragmentation in Creutzfeldt-Jakob disease: does a mere positive in situ nuclear end-labeling indicate apoptosis? *Acta Neuropathol (Berl)* 1999; 97: 5-12.
- Fevrier B, Vilette D, Laude H, Raposo G. Exosomes: a bubble ride for prions? *Traffic* 2005; 6: 10-7.

- Finley D, Bartel B, Varshavsky A. The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* 1989; 338: 394-401.
- Forloni G, Angeretti N, Chiesa R, Monzani E, Salmona M, Bugiani O, Tagliavini F. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 1993; 362: 543-6.
- Fornai F, Ferrucci M, Gesi M, Bandettini di Poggio A, Giorgi FS, Biagioni F, Paparelli A. A hypothesis on prion disorders: are infectious, inherited, and sporadic causes so distinct? *Brain Res Bull* 2006; 69: 95-100.
- Friede R. Enzyme histochemistry studies of senile plaques *J Neuropath Exp Neurol* 1965; 24: 477-491.
- Gajdusek D. Infectious Amyloids: Subacute Spongiform Encephalopathies as Transmissible Cerebral Amyloidoses. Philadelphia: Lippincott-Raven Publisher, 1986.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 1995; 373: 523-7.
- Gearing M, Mori H, Mirra SS. Abeta-peptide length and apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1996; 39: 395-9.
- German DC, White CL, Sparkman DR. Alzheimer's disease: neurofibrillary tangles in nuclei that project to the cerebral cortex. *Neuroscience* 1987; 21: 305-12.
- Giese A, Brown DR, Groschup MH, Feldmann C, Haist I, Kretschmar HA. Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol* 1998a; 8: 449-57.
- Giese A, Laube B, Zapf S, Mangold U, Westphal M. Glioma cell adhesion and migration on human brain sections. *Anticancer Res* 1998b; 18: 2435-47.
- Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002; 82: 373-428.
- Glickman MH, Rubin DM, Fried VA, Finley D. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 3149-62.
- Glickman MH, Rubin DM, Fu H, Larsen CN, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Vierstra R, Baumeister W, Fried V, Finley D. Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol Biol Rep* 1999; 26: 21-8.
- Goldman JE. The association of actin with Hirano bodies. *J Neuropathol Exp Neurol* 1983; 42: 146-52.
- Gomez-Ramos P, Mufson EJ, Moran MA. Ultrastructural localization of acetylcholinesterase in neurofibrillary tangles, neuropil threads and senile plaques in aged and Alzheimer's brain. *Brain Res* 1992; 569: 229-37.

- Gonzalez F, Delahodde A, Kodadek T, Johnston SA. Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter. *Science* 2002; 296: 548-50.
- Goodbrand IA, Ironside JW, Nicolson D, Bell JE. Prion protein accumulation in the spinal cords of patients with sporadic and growth hormone associated Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 1995; 183: 127-30.
- Gorbea C, Taillandier D, Rechsteiner M. Assembly of the regulatory complex of the 26S proteasome. *Mol Biol Rep* 1999; 26: 15-9.
- Gordon C. The intracellular localization of the proteasome. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 268: 175-84.
- Graham D, Lantos P. *Greenfield's Neuropathology*. London: Arnold Publisher, 2002.
- Gregori L, Fuchs C, Figueiredo-Pereira ME, Van Nostrand WE, Goldgaber D. Amyloid beta-protein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation in vitro. *J Biol Chem* 1995; 270: 19702-8.
- Grenier C, Bissonnette C, Volkov L, Roucou X. Molecular morphology and toxicity of cytoplasmic prion protein aggregates in neuronal and non-neuronal cells. *J Neurochem* 2006; 97: 1456-66.
- Groll M, Clausen T. Molecular shredders: how proteasomes fulfill their role. *Curr Opin Struct Biol* 2003; 13: 665-73.
- Guentchev M, Hainfellner JA, Trabattoni GR, Budka H. Distribution of parvalbumin-immunoreactive neurons in brain correlates with hippocampal and temporal cortical pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 1119-24.
- Guentchev M, Siedlak SL, Jarius C, Tagliavini F, Castellani RJ, Perry G, Smith MA, Budka H. Oxidative damage to nucleic acids in human prion disease. *Neurobiol Dis* 2002; 9: 275-81.
- Guzik K, Bzowska M, Dobrucki J, Pryjma J. Heat-shocked monocytes are resistant to *Staphylococcus aureus*-induced apoptotic DNA fragmentation due to expression of HSP72. *Infect Immun* 1999; 67: 4216-22.
- Haass C, Kloetzel PM. The *Drosophila* proteasome undergoes changes in its subunit pattern during development. *Exp Cell Res* 1989; 180: 243-52.
- Haglund K, Di Fiore PP, Dikic I. Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 598-603.
- Halliday GM, McCann HL, Pamphlett R, Brooks WS, Creasey H, McCusker E, Cotton RG, Broe GA, Harper CG. Brain stem serotonin-synthesizing neurons in Alzheimer's disease: a clinicopathological correlation. *Acta Neuropathol (Berl)* 1992; 84: 638-50.



- Hamos JE, Oblas B, Pulaski-Salo D, Welch WJ, Bole DG, Drachman DA. Expression of heat shock proteins in Alzheimer's disease. *Neurology* 1991; 41: 345-50.
- Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996; 381: 571-9.
- Heese K, Akatsu H. Alzheimer's disease--an interactive perspective. *Curr Alzheimer Res* 2006; 3: 109-21.
- Hetz C, Maundrell K, Soto C. Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? *Trends Mol Med* 2003; 9: 237-43.
- Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, Doey LJ, Lantos P. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 1997; 389: 448-50.
- Hirano A, Dembitzer HM, Kurland LT, Zimmerman HM. The fine structure of some intraganglionic alterations. Neurofibrillary tangles, granulovacuolar bodies and "rod-like" structures as seen in Guam amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex. *J Neuropathol Exp Neurol* 1968; 27: 167-82.
- Hoogendijk WJ, Feenstra MG, Botterblom MH, Gilhuis J, Sommer IE, Kamphorst W, Eikelenboom P, Swaab DF. Increased activity of surviving locus ceruleus neurons in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999; 45: 82-91.
- Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* 1999; 14: 419-27.
- Ii K, Ito H, Tanaka K, Hirano A. Immunocytochemical co-localization of the proteasome in ubiquitinated structures in neurodegenerative diseases and the elderly. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 125-31.
- Ironside JW. Review: Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Pathol* 1996; 6: 379-88.
- Ishii K, Tamaoka A, Mizusawa H, Shoji S, Ohtake T, Fraser PE, Takahashi H, Tsuji S, Gearing M, Mizutani T, Yamada S, Kato M, St George-Hyslop PH, Mirra SS, Mori H. Abeta1-40 but not Abeta1-42 levels in cortex correlate with apolipoprotein E epsilon4 allele dosage in sporadic Alzheimer's disease. *Brain Res* 1997; 748: 250-2.
- Ishiura S, Sano M, Kamakura K, Sugita H. Isolation of two forms of the high-molecular-mass serine protease, ingensin, from porcine skeletal muscle. *FEBS Lett* 1985; 189: 119-23.
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, Kawashima-Morishima M, Lee HJ, Hama E, Sekine-Aizawa Y, Saido TC. Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* 2000; 6: 143-50.

- Jellinger KA, Stadelmann CH. The enigma of cell death in neurodegenerative disorders. *J Neural Transm Suppl* 2000; 21-36.
- Joachim CL, Morris JH, Selkoe DJ, Kosik KS. Tau epitopes are incorporated into a range of lesions in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1987; 46: 611-22.
- Kahn J, Anderton BH, Probst A, Ulrich J, Esiri MM. Immunohistological study of granulovacuolar degeneration using monoclonal antibodies to neurofilaments. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1985; 48: 924-6.
- Kaiser P, Flick K, Wittenberg C, Reed SI. Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell* 2000; 102: 303-14.
- Kamakura K, Ishiura S, Nonaka I, Sugita H. Localization of ingensin in rat central nervous system and skeletal muscle. *J Neurosci Res* 1988; 20: 473-8.
- Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR. Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2000a; 75: 436-9.
- Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR. Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress. *Mech Ageing Dev* 2000b; 113: 61-70.
- Klatzo I, Wisniewski H, Streicher E. Experimental Production of Neurofibrillary Degeneration. I. Light Microscopic Observations. *J Neuropathol Exp Neurol* 1965; 24: 187-99.
- Koike H, Tomioka S, Sorimachi H, Saido TC, Maruyama K, Okuyama A, Fujisawa-Sehara A, Ohno S, Suzuki K, Ishiura S. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J* 1999; 343: 371-5.
- Koroshetz WJ, Bonventre JV. Heat shock response in the central nervous system. *Experientia* 1994; 50: 1085-91.
- Kovács G, László L. Az emberi prionbetegségek. *Lege Artis Medicinae* 1998; 8: 476-484.
- Kovacs GG, Flicker H, Budka H. Immunostaining for ubiquitin: efficient pretreatment. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2003; 29: 174-7.
- Kovacs GG, Head MW, Hegyi I, Bunn TJ, Flicker H, Hainfellner JA, McCardle L, Laszlo L, Jarius C, Ironside JW, Budka H. Immunohistochemistry for the prion protein: comparison of different monoclonal antibodies in human prion disease subtypes. *Brain Pathol* 2002; 12: 1-11.

- Kovacs GG, Kurucz I, Budka H, Adori C, Muller F, Acs P, Kloppel S, Schatzl HM, Mayer RJ, Laszlo L. Prominent stress response of Purkinje cells in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Dis* 2001; 8: 881-9.
- Kretzschmar HA, Giese A, Brown DR, Herms J, Keller B, Schmidt B, Groschup M. Cell death in prion disease. *J Neural Transm Suppl* 1997; 50: 191-210.
- Kroetz MB. SUMO: a ubiquitin-like protein modifier. *Yale J Biol Med* 2005; 78: 197-201.
- Kropp S, Zerr I, Schulz-Schaeffer WJ, Riedemann C, Bodemer M, Laske C, Kretzschmar HA, Poser S. Increase of neuron-specific enolase in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 1999; 261: 124-6.
- Kurucz I, Tombor B, Prechl J, Erdo F, Hegedus E, Nagy Z, Vitai M, Koranyi L, Laszlo L. Ultrastructural localization of Hsp-72 examined with a new polyclonal antibody raised against the truncated variable domain of the heat shock protein. *Cell Stress Chaperones* 1999; 4: 139-52.
- Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T. Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 1999; 400: 225-6.
- Kwak S, Masaki T, Ishiura S, Sugita H. Multicatalytic proteinase is present in Lewy bodies and neurofibrillary tangles in diffuse Lewy body disease brains. *Neurosci Lett* 1991; 128: 21-4.
- Lafarga M, Berciano MT, Pena E, Mayo I, Castano JG, Bohmann D, Rodrigues JP, Tavanetz JP, Carmo-Fonseca M. Clastosome: a subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 2771-82.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 3922-7.
- László L. A prion. *Természet Világa* 1998; 1: 2-5.
- Laszlo L, Lowe J, Self T, Kenward N, Landon M, McBride T, Farquhar C, McConnell I, Brown J, Hope J, et al. Lysosomes as key organelles in the pathogenesis of prion encephalopathies. *J Pathol* 1992; 166: 333-41.
- Layfield R, Alban A, Mayer RJ, Lowe J. The ubiquitin protein catabolic disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001; 27: 171-9.

- Lee SC, Zhao ML, Hirano A, Dickson DW. Inducible nitric oxide synthase immunoreactivity in the Alzheimer disease hippocampus: association with Hirano bodies, neurofibrillary tangles, and senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 1163-9.
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995; 269: 973-7.
- Lindsten K, Dantuma NP. Monitoring the ubiquitin/proteasome system in conformational diseases. *Ageing Res Rev* 2003; 2: 433-49.
- Liu CW, Millen L, Roman TB, Xiong H, Gilbert HF, Noiva R, DeMartino GN, Thomas PJ. Conformational remodeling of proteasomal substrates by PA700, the 19 S regulatory complex of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 2002; 277: 26815-20.
- Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, Mancini GL, Castro RM, Ribeiro KC, Brentani RR, Linden R, Martins VR. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci* 2005; 25: 11330-9.
- Love S. *Neuropathology - A reference text of CNS pathology*. London: Harcourt Publisher Limited, 2000.
- Low P, Hastings RA, Dawson SP, Sass M, Billett MA, Mayer RJ, Reynolds SE. Localisation of 26S proteasomes with different subunit composition in insect muscles undergoing programmed cell death. *Cell Death Differ* 2000; 7: 1210-7.
- Lowe J, Blanchard A, Morrell K, Lennox G, Reynolds L, Billett M, Landon M, Mayer RJ. Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle, and Mallory bodies in alcoholic liver disease. *J Pathol* 1988; 155: 9-15.
- Lowe J, Mayer RJ, Landon M. Ubiquitin in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol* 1993; 3: 55-65.
- Lőw P. Minden lében két kanál fehérje: az ubiquitin. *Természet Világa* 1999; December.
- Lőw P. A sejt fehérjebontógépezete: a proteaszóma. *Természet Világa* 2000; November.
- Luders J, Demand J, Hohfeld J. The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J Biol Chem* 2000; 275: 4613-7.
- Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R. Mice deficient in

- BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* 2001; 4: 231-2.
- Lysek DA, Schorn C, Nivon LG, Esteve-Moya V, Christen B, Calzolari L, von Schroetter C, Fiorito F, Herrmann T, Guntert P, Wuthrich K. Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 640-5.
- Maciver SK, Harrington CR. Two actin binding proteins, actin depolymerizing factor and cofilin, are associated with Hirano bodies. *Neuroreport* 1995; 6: 1985-8.
- Magrane J, Smith RC, Walsh K, Querfurth HW. Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. *J Neurosci* 2004; 24: 1700-6.
- Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 5644-51.
- Manzerra P, Rush SJ, Brown IR. Temporal and spatial distribution of heat shock mRNA and protein (hsp70) in the rabbit cerebellum in response to hyperthermia. *J Neurosci Res* 1993; 36: 480-90.
- Markesbery W, Ehmman W. *Brain trace elements in Alzheimer's Disease*. New York, 353: Raven Press, 1994.
- Markesbery WR, Carney JM. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 1999; 9: 133-46.
- Massey AC, Zhang C, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol* 2006; 73: 205-35.
- Matilla A, Gorbea C, Einum DD, Townsend J, Michalik A, van Broeckhoven C, Jensen CC, Murphy KJ, Ptacek LJ, Fu YH. Association of ataxin-7 with the proteasome subunit S4 of the 19S regulatory complex. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2821-31.
- McBride PA, Beekes M. Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie. *Neurosci Lett* 1999; 265: 135-8.
- McDermott JR, Gibson AM. Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human and rat brain peptidases: involvement of insulin-degrading enzyme. *Neurochem Res* 1997; 22: 49-56.
- McGeer PL, Rogers J. Anti-inflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Neurology* 1992; 42: 447-9.

- McGreer P. Neuro-inflammatory mechanisms in Alzheimer's Disease: report of the NINCDS-ADRDA Work group under the auspices of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease *Neurology* 1984; 34.
- McKee AC, Kosik KS, Kowall NW. Neuritic pathology and dementia in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1991; 30: 156-65.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984; 34: 939-44.
- McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 1983; 35: 57-62.
- McNaught KS, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW. Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2003; 179: 38-46.
- McNaught KS, Shashidharan P, Perl DP, Jenner P, Olanow CW. Aggresome-related biogenesis of Lewy bodies. *Eur J Neurosci* 2002; 16: 2136-48.
- Mengual E, Arizti P, Rodrigo J, Gimenez-Amaya JM, Castano JG. Immunohistochemical distribution and electron microscopic subcellular localization of the proteasome in the rat CNS. *J Neurosci* 1996; 16: 6331-41.
- Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 2310-4.
- Mirra S, Austin G. Neuritic plaque amyloid is ingested by receptor-mediated endocytosis (abstract). *J Neuropath Exp Neurol* 1985; 44: 365.
- Muller D, Nagel AC, Maier D, Preiss A. A molecular link A molecular link between Hairless and Pros26.4, a member of the AAA-ATPase subunits of the proteasome 19S regulatory particle in *Drosophila*. *J Cell Sci* 2006; 119: 250-8.
- Munoz DG, Wang D, Greenberg BD. Hirano bodies accumulate C-terminal sequences of beta-amyloid precursor protein (beta-APP) epitopes. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993; 52: 14-21.
- Murata S, Minami Y, Minami M, Chiba T, Tanaka K. CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep* 2001; 2: 1133-8.
- Muratani M, Tansey WP. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 192-201.

- Ng S, Doing A. Molecular and chemical basis of prion related diseases. *Chem Soc Rev* 1997; 26: 425-432.
- Nixon RA. Niemann-Pick Type C disease and Alzheimer's disease: the APP-endosome connection fattens up. *Am J Pathol* 2004; 164: 757-61.
- Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65: 631-41.
- Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 759-67.
- Offe K, Dodson SE, Shoemaker JT, Fritz JJ, Gearing M, Levey AI, Lah JJ. The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments. *J Neurosci* 2006; 26: 1596-603.
- Ogiso Y, Tomida A, Kim HD, Tsuruo T. Glucose starvation and hypoxia induce nuclear accumulation of proteasome in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 258: 448-52.
- Ogura T, Wilkinson AJ. AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells* 2001; 6: 575-97.
- Ohtsuka K, Hata M. Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40--a review. *Int J Hyperthermia* 2000; 16: 231-45.
- Pasternak SH, Callahan JW, Mahuran DJ. The role of the endosomal/lysosomal system in amyloid-beta production and the pathophysiology of Alzheimer's disease: reexamining the spatial paradox from a lysosomal perspective. *J Alzheimers Dis* 2004; 6: 53-65.
- Paxinos G WC. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, California: Academic Press Inc., 1986.
- Perry G, Friedman R, Shaw G, Chau V. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 3033-6.
- Perry G, Kawai M, Tabaton M, Onorato M, Mulvihill P, Richey P, Morandi A, Connolly JA, Gambetti P. Neuropil threads of Alzheimer's disease show a marked alteration of the normal cytoskeleton. *J Neurosci* 1991a; 11: 1748-55.
- Perry G, Nunomura A, Hirai K, Takeda A, Aliev G, Smith MA. Oxidative damage in Alzheimer's disease: the metabolic dimension. *Int J Dev Neurosci* 2000; 18: 417-21.

- Perry G, Siedlak SL, Richey P, Kawai M, Cras P, Kalaria RN, Galloway PG, Scardina JM, Cordell B, Greenberg BD, et al. Association of heparan sulfate proteoglycan with the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1991b; 11: 3679-83.
- Pillay CS, Elliott E, Dennison C. Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J* 2002; 363: 417-29.
- Price DL, Altschuler RJ, Struble RG, Casanova MF, Cork LC, Murphy DB. Sequestration of tubulin in neurons in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1986; 385: 305-10.
- Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982; 216: 136-44.
- Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 13363-83.
- Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, Glenner GG. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 1983; 35: 349-58.
- Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem* 1998; 273: 32730-8.
- Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, Simons K. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 11172-7.
- Raskind MA, Peskind ER, Holmes C, Goldstein DS. Patterns of cerebrospinal fluid catechols support increased central noradrenergic responsiveness in aging and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 1999; 46: 756-65.
- Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 1993; 11: 575-80.
- Rechsteiner M. Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis. *Annu Rev Cell Biol* 1987; 3: 1-30.
- Reits EA, Benham AM, Plougastel B, Neefjes J, Trowsdale J. Dynamics of proteasome distribution in living cells. *Embo J* 1997; 16: 6087-94.
- Risuleo G, Cristofanilli M, Scarsella G. Acute ischemia/hypoxia in rat hippocampal neurons activates nuclear ubiquitin and alters both chromatin and DNA. *Mol Cell Biochem* 2003; 250: 73-80.
- Rivett AJ. Intracellular distribution of proteasomes. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 110-4.



- Rivett AJ, Palmer A, Knecht E. Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 1165-72.
- Roberts GW, Crow TJ, Polak JM. Location of neuronal tangles in somatostatin neurones in Alzheimer's disease. *Nature* 1985; 314: 92-4.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 1995; 376: 775-8.
- Roher A, Gray EG, Paula-Barbosa M. Alzheimer's disease: coated vesicles, coated pits and the amyloid-related cell. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1988; 232: 367-73.
- Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 2004; 10 Suppl: S10-7.
- Rossiter JP, Anderson LL, Yang F, Cole GM. Caspase-cleaved actin (fractin) immunolabelling of Hirano bodies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2000; 26: 342-6.
- Russelakis-Carneiro M, Betmouni S, Perry VH. Inflammatory response and retinal ganglion cell degeneration following intraocular injection of ME7. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1999; 25: 196-206.
- Russell SJ, Reed SH, Huang W, Friedberg EC, Johnston SA. The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair. *Mol Cell* 1999; 3: 687-95.
- Sakudo A, Lee DC, Li S, Nakamura T, Matsumoto Y, Saeki K, Itohara S, Ikuta K, Onodera T. PrP cooperates with STI1 to regulate SOD activity in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 14-9.
- Salmona M, Forloni G, Diomedea L, Algeri M, De Gioia L, Angeretti N, Giaccone G, Tagliavini F, Bugiani O. A neurotoxic and gliotrophic fragment of the prion protein increases plasma membrane microviscosity. *Neurobiol Dis* 1997; 4: 47-57.
- Samuel W, Masliah E, Hill LR, Butters N, Terry R. Hippocampal connectivity and Alzheimer's dementia: effects of synapse loss and tangle frequency in a two-component model. *Neurology* 1994a; 44: 2081-8.
- Samuel W, Terry RD, DeTeresa R, Butters N, Masliah E. Clinical correlates of cortical and nucleus basalis pathology in Alzheimer dementia. *Arch Neurol* 1994b; 51: 772-8.

- Satoh J, Kurohara K, Yukitake M, Kuroda Y. The 14-3-3 protein detectable in the cerebrospinal fluid of patients with prion-unrelated neurological diseases is expressed constitutively in neurons and glial cells in culture. *Eur Neurol* 1999; 41: 216-25.
- Schett G, Steiner CW, Groger M, Winkler S, Graninger W, Smolen J, Xu Q, Steiner G. Activation of Fas inhibits heat-induced activation of HSF1 and up-regulation of hsp70. *Faseb J* 1999; 13: 833-42.
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 1996; 2: 864-70.
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 9649-53.
- Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ. Analysis of epitopes shared by Hirano bodies and neurofilament proteins in normal and Alzheimer's disease hippocampus. *Lab Invest* 1989; 60: 513-22.
- Schmidt ML, Murray JM, Trojanowski JQ. Continuity of neuropil threads with tangle-bearing and tangle-free neurons in Alzheimer disease cortex. A confocal laser scanning microscopy study. *Mol Chem Neuropathol* 1993; 18: 299-312.
- Schmidt T, Lindenberg KS, Krebs A, Schols L, Laccone F, Herms J, Rechsteiner M, Riess O, Landwehrmeyer GB. Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions. *Ann Neurol* 2002; 51: 302-10.
- Schubert P, Ogata T, Miyazaki H, Marchini C, Ferroni S, Rudolphi K. Pathological immunoreactions of glial cells in Alzheimer's disease and possible sites of interference. *J Neural Transm Suppl* 1998; 54: 167-74.
- Schulz JB, Dichgans J. Molecular pathogenesis of movement disorders: are protein aggregates a common link in neuronal degeneration? *Curr Opin Neurol* 1999; 12: 433-9.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001; 81: 741-66.
- Shimura H, Schwartz D, Gygi SP, Kosik KS. CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *J Biol Chem* 2004; 279: 4869-76.

- Sigurdsson B, Palsson P, Grimsson H. Visna, a demyelinating transmissible disease of sheep. *J Neuropathol Exp Neurol* 1957; 16: 389-403.
- Sikorska B. Mechanisms of neuronal death in transmissible spongiform encephalopathies. *Folia Neuropathol* 2004; 42 Suppl B: 89-95.
- Simchowicz T. Histologische Studien über die senile demenz *Histol Histopathol Arbeit Grosshirn* 1911; 4: 267-444.
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaaari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 1999; 402: 537-40.
- Skovronsky DM, Moore DB, Milla ME, Doms RW, Lee VM. Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J Biol Chem* 2000; 275: 2568-75.
- Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1502: 139-44.
- Song S, Jung YK. Alzheimer's disease meets the ubiquitin-proteasome system. *Trends Mol Med* 2004; 10: 565-70.
- Sparkes RS, Simon M, Cohn VH, Fournier RE, Lem J, Klisak I, Heinzmann C, Blatt C, Lucero M, Mohandas T, et al. Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 7358-62.
- Stacchiotti A, Schiaffonati L, Tiberio L, Rodella L, Bianchi R. Constitutive expression of heat shock proteins 70 and 90 in rat cerebellum. *Eur J Histochem* 1997; 41: 127-32.
- Stadelmann C, Bruck W, Bancher C, Jellinger K, Lassmann H. Alzheimer disease: DNA fragmentation indicates increased neuronal vulnerability, but not apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 456-64.
- Stamp JT, Brotherston JG, Zlotnik I, Mackay JM, Smith W. Further studies on scrapie. *J Comp Pathol* 1959; 69: 268-80.
- Steel R, Doherty JP, Buzzard K, Clemons N, Hawkins CJ, Anderson RL. Hsp72 inhibits apoptosis upstream of the mitochondria and not through interactions with Apaf-1. *J Biol Chem* 2004; 279: 51490-9.
- Stephens B, Navarrete R, Guiloff RJ. Ubiquitin immunoreactivity in presumed spinal interneurons in motor neurone disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001; 27: 352-61.

- Sun L, Johnston SA, Kodadek T. Physical association of the APIS complex and general transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 991-9.
- Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes* 2004; 53 Suppl 1: S12-8.
- Tanaka K, Kumatori A, Ii K, Ichihara A. Direct evidence for nuclear and cytoplasmic colocalization of proteasomes (multiprotease complexes) in liver. *J Cell Physiol* 1989; 139: 34-41.
- Tariska P. Alzheimer-kór. Budapest: Golden Book kiadó, 2000.
- Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R, Torchia M, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 1995; 83: 79-90.
- Terry RD. The Fine Structure of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1963; 22: 629-42.
- van Keulen LJ, Schreuder BE, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA. Scrapie-associated prion protein in the gastrointestinal tract of sheep with natural scrapie. *J Comp Pathol* 1999; 121: 55-63.
- VanDemark AP, Hill CP. E1 on the move. *Mol Cell* 2005; 17: 474-5.
- Varela-Nallar L, Gonzalez A, Inestrosa NC. Role of copper in prion diseases: deleterious or beneficial? *Curr Pharm Des* 2006; 12: 2587-95.
- Varshavsky A. The N-end rule. *Cell* 1992; 69: 725-35.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999; 286: 735-41.
- Vijay-Kumar S, Bugg CE, Cook WJ. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 1987; 194: 531-44.
- Wadsworth JD, Jackson GS, Hill AF, Collinge J. Molecular biology of prion propagation. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 338-45.
- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 1982; 215: 1237-9.
- Wisniewski HM, Merz PA, Iqbal K. Ultrastructure of paired helical filaments of Alzheimer's neurofibrillary tangle. *J Neuropathol Exp Neurol* 1984; 43: 643-56.

- Wisniewski HM, Narang HK, Terry RD. Neurofibrillary tangles of paired helical filaments. *J Neurol Sci* 1976; 27: 173-81.
- Wisniewski HM, Sigurdarson S, Rubenstein R, Kascsak RJ, Carp RI. Mites as vectors for scrapie. *Lancet* 1996; 347: 1114.
- Wojcik C. Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway. *J Cell Mol Med* 2002; 6: 25-48.
- Wojcik C, DeMartino GN. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 579-89.
- Wolf DH. From lysosome to proteasome: the power of yeast in the dissection of proteinase function in cellular regulation and waste disposal. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 1601-14.
- Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 1999; 398: 513-7.
- Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 4040-3.
- Xu M, Shibayama H, Kobayashi H, Yamada K, Ishihara R, Zhao P, Takeuchi T, Yoshida K, Inagaki T, Nokura K. Granulovacuolar degeneration in the hippocampal cortex of aging and demented patients--a quantitative study. *Acta Neuropathol (Berl)* 1992; 85: 1-9.
- Yamaguchi H, Nakazato Y, Shoji M, Ihara Y, Hirai S. Ultrastructure of the neuropil threads in the Alzheimer brain: their dendritic origin and accumulation in the senile plaques. *Acta Neuropathol (Berl)* 1990; 80: 368-74.
- Yedidia Y, Horonchik L, Tzaban S, Yanai A, Taraboulos A. Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *Embo J* 2001; 20: 5383-91.
- Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas AR, Cabral AL, Lee KS, Juliano MA, de Oliveira E, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Linden R, Brentani RR, Martins VR. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *Embo J* 2002; 21: 3307-16.
- Zou WQ, Gambetti P. From microbes to prions the final proof of the prion hypothesis. *Cell* 2005; 121: 155-7.

## 11. ÖSSZEFOGLALÁS

A konformációs neurodegeneratív betegségek pathogenezisének hátterében a fehérje anyagcsere jellegzetes zavara - egy, vagy több kóros konformációjú fehérje izoforma kialakulása és intra- vagy extracelluláris felhalmozódása - áll. Nem véletlen tehát, hogy az utóbbi időben egyre több tanulmány veti fel az intracelluláris fehérje homeosztázis két fontos szabályozó elemének, az ubiquitin-proteaszóma rendszernek (UPR) és a molekuláris chaperonoknak a neurodegenerációban és a neuroprotekciónak betöltött szerepét. Ugyanakkor az UPR egyes komponenseinek és a Hsp72-nek sejtszintű és regionális eloszlását feltáró átfogó vizsgálat eddig nem készült sem egészséges kontroll, sem neurodegeneratív agyszöveten. Kutatómunkánk elsődleges célja ezért az volt, hogy az UPR komponenseinek és a Hsp72-nek a fény- és elektronmikroszkópos immunlokalizációjával morfológiai adatokat szolgáltatassunk a konformációs neurodegeneratív betegségekre jellemző regionális és szelektív neuronpusztulás okainak felderítéséhez. Vizsgálati objektumként perfúziósan fixált patkány agyszövetet, valamint egészséges és neurodegeneratív (Alzheimer és Creutzfeldt-Jakob kór) *post mortem* humán agyszövetmintát használtunk.

A 19S RC ATP-ázok közül az S6a, S6b és az S10 döntően citoplazmatikus, míg az ubiquitin, valamint az S4 és az S7 dominánsan sejtmagi lokalizációjú a kontroll humán és patkány agymintákban egyaránt. Eredményeink morfológiai adatokkal támasztják alá, hogy az UPR bizonyos komponensei – a citoplazmatikus és a sejtmagi fehérjék degradációja mellett – részt vehetnek a transzkripció szabályozásában és a DNS-reparációban is (Ádori és mtsai, 2006. *J Histochem Cytochem.* **54**: 263-267).

A kontroll és neurodegenerációs szövetmintákon végzett összehasonlító vizsgálataink azt bizonyítják, hogy azok az anatómiai régiók és sejtpopulációk a legsebezhetőbbek, amelyekben az UPR komponenseinek és a Hsp72-nek az immunfestése - úgy a kontroll, mint a neurodegeneratív mintákban – a leggyengébb. Ugyanakkor feltűnő, hogy - éppen ezekben, a betegség során patológiailag leginkább érintett régiókban - a morfológiailag sérült, többnyire TUNEL-pozitív neuronok sejtmagjában az UPR számos komponensének rendkívül intenzív immunlokalizációja figyelhető meg. Megalapozott tehát az a következtetés, hogy: **1./** az UPR és a Hsp72 jelentős citoprotektív szerepet játszhat bizonyos idegsejt populációk esetében, másrészt **2./** az UPR aktív résztvevője lehet a neuronpusztulás molekuláris mechanizmusának is (Ádori és mtsai, 2005. *Neurobiol Dis.* **19**: 427-435; Kovács és mtsai, 2001. *Neurobiol Dis.* **8**: 881-889).

## 12. SUMMARY

A common hallmark of the conformational neurodegenerative diseases (CND) is a special disturbance of protein metabolism resulting the production and intra- or extracellular accumulation of pathologic conformational isoforms of one or more proteins. Therefore, it is not a surprise, that more and more studies have been raised the potential role of the ubiquitin-proteasome system (UPS) and the molecular chaperones, the two important regulating members of the intracellular protein homeostasis, in the neurodegeneration and neuroprotection. However, a comprehensive study on the cellular and regional distribution of the UPS components and the Hsp72, in either healthy control or neurodegenerative brain tissue, has not been published yet. This is the reason why the main aim of our investigations was to find out causative factors of the regional and selective neuronal death by immunolocalization of the UPS components and Hsp72. Perfusion fixed rat brain and *post mortem* control and neurodegenerative (Alzheimer's and Creutzfeldt-Jakob disease) human brain samples were used in our studies.

The 19S ATP-ases, S6a, S6b and S10b show mainly cytoplasmic, whereas ubiquitin and the ATP-ase subunits S4 and S7 exhibit prominent nuclear immunolocalization in both control human and rat brain samples. Our results support the notion by morphological evidences, that certain components of the UPS may take part in the transcription regulation and DNA-repair, beside the degradation of the cytoplasmic and nuclear proteins (Ádori et al, 2006. *J Histochem Cytochem.* **54**: 263-267).

Our comparative studies on control and neurodegenerative human brain samples prove that those anatomical regions and cell populations are most vulnerable, where the immunostaining for the UPS components and the Hsp72 is the weakest in both the control and the diseased brain. However, in neurodegenerative cases, a remarkable and intense immunolocalization of almost all the UPR components can be observed in the TUNEL-positive nuclei of morphologically damaged neurons within the affected brain areas. These findings provide further evidences supporting the idea on the prominent cytoprotective function of the UPS and the Hsp72 in certain neuronal populations. On the other hand, the ubiquitin-proteasome system may finally play an active role in the molecular mechanism of neuronal cell death (Ádori et al, 2005. *Neurobiol Dis.* **19**: 427-435; Kovács et al, 2001. *Neurobiol Dis.* **8**: 881-889).