

Magdalena Kuszczuk

**Próby modulowania wywołanej przez A β patologii
synaps glutaminianergicznych**

Autoreferat rozprawy doktorskiej

**Promotorzy: prof. dr hab. n. med. Jerzy W. Łazarewicz
dr hab n. med. Marcin J. Sadowski**

**Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego
Polska Akademia Nauk
Zakład Neurochemii – Pracownia Farmakoneurochemii**

Warszawa 2011

Choroba Alzheimera (AD) należy do grupy chorób neurodegeneracyjnych cechujących się ubytkiem komórek nerwowych i zakończeń synaptycznych w korze mózgu, prowadzącym m. in. do zaburzeń pamięci i innych funkcji poznawczych. W obrazie neuropatologicznym AD dominuje odkładanie się w strukturach istoty szarej mózgu oraz w naczyniach mózgowia i opon mózgowych nierozpuszczalnych, włóknkowych złogów białka amyloidowego (A β) w postaci płytek starczych, a także występowanie wewnątrz neuronów splotów neurofibrilarnych w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau. Chociaż główną rolę w patogenezie AD przypisuje się powszechnie A β , to jednak mechanizmy jego neurotoksyczności nie są jasne. Obok dobrze znanej konwencjonalnej hipotezy zakładającej toksyczne działanie zewnątrzkomórkowego A β o strukturze włókien, nowe wyniki wskazują na fakt, iż neurotoksyczne działanie A β wynika także z odkładania się oligomerów tego peptydu w wysokich stężeniach na powierzchni i wewnątrz neuronów. W efekcie dochodzi do postępującej degeneracji synaps, która ma miejsce na długo przed pojawieniem się pozakomórkowych złogów amyloidowych. Wiadomo, że apolipoproteina E (apo E) tworzy kompleksy z A β przyczyniając się do zwiększonego wychwytu i odkładania się A β w neuronach, a tym samym nasilenia jego toksyczności. Można więc założyć, iż związki zapobiegające interakcji pomiędzy A β i apo E mogłyby hamować neurotoksyczność A β , dając podstawę dla nowej strategii terapeutycznej w AD. Za jeden z mechanizmów odpowiedzialnych za cytotoksyczne działanie form oligomerycznych A β uznaje się wiązanie peptydów w obrębie synaps glutaminianergicznych i złożone interakcje z receptorami NMDA. Pobudzenie receptorów NMDA prowadzące do znacznego wzrostu napływu wapnia do neuronów, czyli mechanizm zbliżony do toksyczności pobudzeniowej (ekscytotoksyczności), mogący doprowadzić do śmierci neuronów wydaje się być mniej istotną konsekwencją toksyczności A β . Istnieją natomiast poglądy, że niespecyficzna aktywacja receptorów NMDA wywołana przez A β zaburza funkcję tych receptorów, co może być jedną z przyczyn deficytów poznawczych. Ta kwestia jest jednak bardziej złożona, ponieważ jak wykazały ostatnie badania, patologiczny wpływ A β na synapsy glutaminianergiczne obejmuje spadek ekspresji białek synaptycznych, w tym podjednostek receptora NMDA, co pogłębia zaburzenia pamięci, a te efekty są hamowane przez antagonistów receptorów NMDA. Z uwagi na postulowany przez licznych autorów kluczowy udział stresu oksydacyjnego w mechanizmie zaburzeń obserwowanych w AD sugeruje się, iż efektywność terapii

antagonistami receptorów NMDA może być zwiększona przez jej skojarzenie z działaniami przeciwdrobnikowymi. To nasuwa celowość zbadania działania ochronnego przed toksycznością A β związku, który łączyłby cechy antagonisty receptorów NMDA oraz substancji o właściwościach przeciwdrobnikowych.

Podjęte zagadnienie badawcze miało na celu określenie możliwości modulowania wywołanej przez A β patologii synaps glutaminianergicznych z wykorzystaniem peptydu A β 12-28P, związku hamującego wiązanie A β i apo E, oraz 1MeTIQ, przypuszczalnego antagonisty receptorów NMDA o sugerowanych właściwościach przeciwdrobnikowych.

Dla realizacji tego zagadnienia zostały wyznaczone następujące cele cząstkowe:

- a. Określenie wpływu mysiej apo E na wychwyt oraz nagromadzenie się syntetycznego A β w neuronach i ocena wpływu antagonisty wiązania A β /apo E, A β 12-28P, na ten proces.
- b. Sprawdzenie czy wewnątrzkomórkowemu odkładaniu się A β towarzyszą zmiany ekspresji białek postsynaptycznych oraz zbadanie działania A β 12-28P na indukowaną A β , postępującą utratę markerów synaps glutaminianergicznych.
- c. Weryfikacja powinowactwa 1MeTIQ do wybranych kluczowych miejsc wiązania dla ligandów w kompleksie receptora NMDA oraz określenie wpływu 1MeTIQ na aktywność tego receptora.
- d. Potwierdzenie właściwości antagonistycznych 1MeTIQ wobec receptorów NMDA poprzez zbadanie jego zdolności do zapobiegania ekscytotoksyczności *in vitro* i *in vivo*.
- e. Wykazanie w warunkach doświadczenia biologicznego *in vitro* działania przeciwdrobnikowego 1MeTIQ.
- f. Zbadanie, czy 1MeTIQ może przeciwdziałać wywołanym przez A β zmianom w poziomie wybranych białek synaps glutaminianergicznych.

W badaniach *in vitro* wykorzystano hodowle pierwotne neuronów piramidalnych hipokampa oraz współ-hodowle neuronalno-astrocytarne. Oceny pobierania A β przez neurony dokonywano stosując m. in. metody immunodetekcji Western blot oraz Dot blot, których dopełnieniem było zobrazowanie komórkowej lokalizacji A β techniką mikroskopii fluorescencyjnej oraz konfokalnej. Wzór ekspresji powierzchniowych markerów synaps glutaminianergicznych badano metodami immunocytochemicznymi. Działanie antagonistyczne 1MeTIQ na receptory NMDA

oznaczano badając wypieranie znakowanych ligandów tych receptorów z błon oraz na podstawie pomiaru stopnia pobierania ^{45}Ca i poziomu wapnia wewnątrzkomórkowego mierzonego metodą fluorescencyjną. Odpowiedni znacznik fluorescencyjny został także wykorzystany dla oceny stresu oksydacyjnego. Neuroprotekcyjne działanie 1MeTIQ w modelu ostrej ekscytotoksyczności glutaminianu badano stosując hodowle pierwotne neuronów ziarnistych mózdku, a także *in vivo* z wykorzystaniem modeli zwierzęcych asfiksji okołoporodowej i globalnej ischemii mózgu.

W początkowej fazie badań oceniano wpływ apo E na wychwyt z przestrzeni zewnątrzkomórkowej i odkładanie się A β w neuronach oraz możliwość zapobiegania tym patologicznym procesom poprzez zastosowanie A β 12-28P, peptydu hamującego tworzenie kompleksów A β /apo E. Uzyskane obserwacje wskazują na zdolność neuronów hipokampa do wychwytu zarówno A β 40 jak i A β 42, który jest w znacznym stopniu usprawniony w obecności apo E. Wykazano, iż zależne od apo E zwiększone pobieranie A β przez neurony stwarza warunki sprzyjające wewnątrzkomórkowej agregacji A β w formy oligomeryczne. Nową obserwacją było wykazanie możliwości zapobiegania nagromadzaniu się A β w neuronach oraz jego oligomeryzacji poprzez osłabienie wychwytu A β z przestrzeni zewnątrzkomórkowej w wyniku zahamowania wiązania A β /apo E przez A β 12-28P. Dalsze badania pokazały, iż odkładanie się A β w neuronach w postaci form oligomerycznych zachodzi w wyniku upośledzenia metabolizmu A β w komórkach, co prowadzi do zalegania tego peptydu w strukturach ścieżki endosomalno/lizosomalnej.

W kolejnym etapie pracy powołano się na istniejące przesłanki, iż jednym z pierwszych skutków patologicznego odkładania się A β w neuronach oraz jego wewnątrzkomórkowej oligomeryzacji może być obniżenie poziomu ekspresji białek synaptycznych oraz degeneracja synaps. Zbadano więc wywołane przez A β zmiany patologiczne w synapsach glutaminianergicznych oraz wpływ na ten proces A β 12-28P. Zaobserwowano, iż odkładanie się A β w neuronach powoduje istotny spadek ekspresji markerów synaptycznych, tj. NR1/NMDA, PSD-95 oraz synaptofizyny. W obecności apo E dochodzi do nasilenia utraty białek synaptycznych, czemu towarzyszy nagromadzanie A β wewnątrz komórek. Zastosowanie A β 12-28P skutkuje obniżeniem wewnątrzkomórkowej puli A β oraz przywróceniem ekspresji markerów synaptycznych.

W następnej części badań testowano właściwości farmakologiczne i neuroprotektoryjne 1MeTIQ, substancji o wymagających potwierdzenia i scharakteryzowania cechach antagonisty receptora NMDA, niezależnie obniżającego produkcję wolnych rodników tlenowych. Wykazano po raz pierwszy, iż 1MeTIQ hamuje wiązanie znakowanej D-seryny do błon synaptycznych. Ten wynik, łącznie z potwierdzonym hamowaniem przez 1MeTIQ wiązania znakowanego MK-801, wskazuje na blokowanie miejsca glicynowego_b receptora NMDA, co obniża aktywację kanału jonowego tego receptora. Ponadto 1MeTIQ obniża wywołany przez glutaminian (Glu) i NMDA napływ wapnia do neuronów, jak również wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia tych jonów, co jest odbiciem hamowania aktywności receptorów NMDA. Nowo opisanymi właściwościami 1MeTIQ, potwierdzającymi jego antagonizm wobec receptorów NMDA, było wykazanie zdolności tej substancji do indukcji tolerancji neuronów na ekscytotoksyczność. Do cech typowych dla antagonisty receptora NMDA, które obserwowano w przypadku 1MeTIQ, należy również neuroprotekcja w wybranych modelach zwierzęcych niedokrwienia mózgu.

Opisane poprzednio w warunkach eksperymentu chemicznego działanie przeciworodnikowe 1MeTIQ znalazło potwierdzenie w doświadczeniach *in vitro* na hodowlach pierwotnych neuronów, przy czym wykazano że jest to właściwość niezależna od hamowania aktywności receptora NMDA.

Scharakteryzowanie 1MeTIQ jako antagonisty receptora NMDA jednocześnie działającego przeciworodnikowo umożliwiło realizację jednego z głównych celów tej rozprawy, to jest zbadanie możliwości ochrony przez 1MeTIQ synaps glutaminianergicznych przed toksycznym działaniem A β . Badanie to wykazało ochronne działanie zarówno 1MeTIQ jak i MK-801, na wywołane przez A β obniżenie ekspresji powierzchniowych markerów synaps glutaminianergicznych, w tym białka podjednostki NR1 receptora NMDA.

Uzyskane wyniki pozwalają na wysunięcie następujących wniosków:

- Apo E odgrywa kluczową rolę w wychwycie oraz patologicznym nagromadzeniu A β w komórkach, czego potwierdzeniem jest hamowanie tego procesu przez antagonistę wiązania A β /apo E, A β 12-28P.
- Odkładanie się A β w strukturach ścieżki endosomalno/lizosomalnej powoduje stopniową agregację peptydu w formy oligomeryczne o silnym działaniu cytotoksycznym. Tworzenie oligomerów A β , wyraźnie upośledzających jego

wewnątrzkomórkową degradację, prowadzi do rozległej utraty markerów synaps glutaminianergicznych na powierzchni komórek.

- A β 12-28P efektywnie hamuje proces oligomeryzacji A β w neuronach oraz przywraca ekspresję białek synaptycznych, co świadczy o jego działaniu ochronnym w indukowanej przez A β degeneracji synaps glutaminianergicznych.
- 1MeTIQ blokuje miejsce wiążące glicynę w kompleksie receptora NMDA i hamuje indukcję sygnału wapniowego w tym receptorze, ma więc właściwości antagonisty receptora NMDA. Dalszym potwierdzeniem tych właściwości 1MeTIQ jest jego potencjał neuroprotekcyjny w warunkach ekscytotoksyczności *in vitro* i w modelach zwierzęcych niedokrwienia mózgu.
- Niezależnie od hamowania aktywności receptorów NMDA, 1MeTIQ wykazuje w warunkach doświadczenia biologicznego działanie przeciwrodnikowe.
- 1MeTIQ, podobnie jak uznany antagonist receptorów NMDA - MK-801, znosi cytotoksyczne działanie A β , przejawiające się obniżeniem ekspresji białek synaptycznych, co sugeruje możliwość zastosowania antagonistów receptora NMDA w hamowaniu obserwowanych w AD, wywołanych przez A β zmian patologicznych w synapsach glutaminianergicznych.