

Szegedi Tudományegyetem

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

**A béta-amiloid toxicitását fokozó élettani faktorok  
vizsgálata**

Ph.D. értekezés tézisei

Hunya Ákos Gábor

Témavezető: Dr. Datki Zsolt László  
SZTE ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet

Szeged

2012

## 1. Bevezetés

Az Alzheimer-kór napjaink leggyakrabban előforduló és mindezidáig gyógyíthatatlan, időskori neurodegeneratív betegsége. A társadalomban előforduló betegségek körében a harmadik helyet foglalja el az érrendszeri és a daganatos megbetegedések után. Érthető tehát, hogy jelenleg igen intenzív kutatások folynak a betegség gyógyítását, illetve megelőzését tűzve ki célul.

Az Alzheimer-kór kiváltó okai lehetnek genetikus (kb. 5-10%), vagy környezeti (kb. 90%) tényezők. A betegség legjellemzőbb patofiziológiai markereinek a kortikális és hippokampális területeken megjelenő szenilis plakkokat és neurofibrilláris kötegeket tekintik. Az előbbieket kialakulásáért a béta-amiloid peptid ( $A\beta$ ) aggregátumai, míg az utóbbiakért a hiperfoszforilált tau fehérje lerakódásai a felelősek. A betegség megelőzése és gyógyítása szempontjából kulcsszerep juthat a  $A\beta$  peptid aggregáció gátlásának.

Az  $A\beta$  aggregációt számos faktor befolyásolhatja, többek között a hőmérséklet, a pH, az ionerősség, bizonyos fémionok pl.  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  illetve  $Zn^{2+}$ , egyes kaotróp ágensek, valamint kölcsönható fehérjék pl. az  $\alpha$ -szinuklein ( $\alpha$ SN). E tényezők közül mi a  $Zn^{2+}$  ionok (peptid-fémion kölcsönhatás), valamint az  $\alpha$ -szinuklein fehérje (peptid-fehérje szinergista kölcsönhatás)  $A\beta$  aggregáció fokozó hatását vizsgáltuk *in vitro* és *ex vivo* módszerekkel.

Az intracelluláris  $Zn^{2+}$  homeosztázis zavara megnövelheti az Alzheimer-kór kialakulási esélyét. Ezt támasztják alá azok a megfigyelések,

melyek szerint az A $\beta$  lerakódások a központi idegrendszerben kolokalizáltak a Zn<sup>2+</sup> ionokban gazdag glutamáterg szinapszisok pozíciójával, ilyenek pl. a hippokampusz, az amigdala, a kisagy illetve a nagyagykéreg bizonyos területei. A Zn<sup>2+</sup> ionok, glutaminsav neurotranszmitterrel együtt fordulnak elő a hippokampális neuronok preszinaptikus terminálsaiban, innen együtt ürülnek a szinaptikus résbe spontán aktivitás, vagy stimuláció révén. A szinaptikus résbe ürülő cink ionok képesek specifikusan kötődni az A $\beta$  hisztidinjeihez, felgyorsítva ezzel az A $\beta$  aggregációját és növelve toxicitását. Az A $\beta$  monomerek aggregációja során keletkező szolubilis oligomerek zavart okoznak a szinaptikus funkciókban, gátolják az LTP (hosszú távú potenciáció) kialakulását, a poszt-szinaptikus membránon pedig az NMDA receptorokhoz kötődve attenuálják, indukálják az NMDA receptorok internalizációját, ezáltal zavarják e receptorokhoz kötődő szignalizációs útvonalakat.

Az a felvetés, hogy az  $\alpha$ -szinukleinnek ( $\alpha$ SN) szerepe van az Alzheimer-kór kialakulásában, már nem új keletű. Az irodalomban azonban meglehetősen nagy az ellentmondás az  $\alpha$ SN és a béta-amiloid kölcsönhatását illetően. Először 1993-ban mutatták ki, hogy az  $\alpha$ SN 61-95-ös fragmentje, az ún. NAC (non-amyloid component of Alzheimers Disease amyloid) jelen van az Alzheimer-kórból jól ismert szenilis plakkokban. Más munkacsoportok kísérleti eredményei viszont azt támasztják alá, hogy a NAC fragment nem kötődik a béta-amiloid peptidekhez a szenilis plakkokban azonban nagy mennyiségben van jelen a szenilis plakkokat körülvevő disztrófizáló neuronokban. Azzal viszont a legtöbb kutatócsoport egyetért, hogy az aggregált béta-amiloid megjelenése jelentősen súlyosbíthatja a Lewy-teszt demenciák kimenetelét, ugyanígy, az

aggregálódó  $\alpha$ SN megjelenése is súlyosbíthatja, illetve felgyorsíthatja az Alzheimer-kór patogenezisét. Újabb kutatások bizonyos szinergista kölcsönhatásokat mutattak ki az  $\alpha$ SN és az A $\beta$  között, melyek hatására stimulálják és felgyorsítják egymás aggregációját. Ebből következően az egyes neurodegeneratív betegségek között bizonyos mértékű „áthallás” érzékelhető, és minél nagyobb ez az áthallás, annál súlyosabbá válhatnak a betegségek. Munkánk során  $\alpha$ SN túltermelő SH-SY5Y sejtvonal segítségével tanulmányoztuk az endogén túltermelt fehérje, exogén, szintetikus A $\beta$ (1-42) peptid aggregációjára gyakorolt hatását.

## 2. Célkitűzések

Az értekezésben összefoglalt kísérleteink fő céljai a következők voltak:

1. Olyan külső faktorok vizsgálata, amelyek képesek szinergista módon növelni az A $\beta$  aggregációját és toxicitását.
  - 1.1. Választ keresni arra a kérdésre, hogy vajon az endogén cink ionok képesek-e precipitálni az exogén A $\beta$ -ot és ezáltal növelni annak neurotoxikus hatását (szinergista peptid-fémion kölcsönhatás).
  - 1.2. Az A $\beta$  és  $\alpha$ SN szinergista kölcsönhatásának tanulmányozása (peptid-fehérje interakció)
2. A mérések gyors és hatékony kivitelezése érdekében elengedhetetlen volt két módszer kifejlesztése:
  - 2.1. Egy, kis munkatérfoggal működő, szöveti szeleteket inkubáló és kezelő kamra (ExViS) kialakítása.
  - 2.2. Új, fluoreszcens módszer kifejlesztése az A $\beta$  precipitáció nyomon követésére akut hippocampális szeleteken.

### **3. Alkalmazott módszerek**

*3.1. ExViS inkubációs kamra kifejlesztése, alkalmazása*

*3.2. Akut hippocampális szeletek preparálása*

*3.3. Fluoreszcens festési eljárások*

*3.4. Extracelluláris  $Zn^{2+}$  ürítés és visszavétel mérése fluoreszcens plate readerrel*

*3.5. MTT-alapú életképesség mérés hippocampális szeleteken*

*3.6. Western blot analízis*

*3.7. Analitikai ultracentrifugálás*

*3.8. Multi-electrode array (MEA) elektrofiziológia*

*3.9. Konfokális mikroszkópia*

*3.10. Sejttenyésztési eljárások*

*3.11. Sejtéletképesség meghatározás, proliferációs kinetika mérése*

## 4. Eredmények

### 4.1. *Az idősebb patkányokból származó aktivált hippokampális szeletek több cinket ürítenek*

Kísérleteink során idős (~65 hetes) és fiatal (~10 hetes) patkányokból preparált hippokampális szeletek cink ürítési képességét hasonlítottuk össze. A  $Zn^{2+}$  ürítést magas koncentrációjú (50 mM)  $K^+$  adagolásával idéztük elő. Idősebb patkányok maximális cink ürítése 50-70 %-kal magasabb értéket mutatott, mint a 10 hetes társaiké. Még érdekesebb, hogy a  $Zn^{2+}$  ürítési képességben nemcsak a korcsoportok, hanem nemek között is jelentős különbség mutatkozott. Míg a fiatal hímek és nőstények között alig volt mérhető különbség, az idős nőstények által ürített cink mennyisége nagyjából 20 %-kal volt magasabb az idős hímekéhez képest. Eredményeinket két különböző kémiai szerkezetű  $Zn^{2+}$  indikátor alkalmazásával is igazoltuk.

### 4.2. *Az extracelluláris $Zn^{2+}$ visszavételének zavara idős patkányokban*

Vizsgálataink eredményei szerint az idős patkányokból származó hippokampális szeletek  $Zn^{2+}$  visszavételi képessége jelentősen gyengébb, mint a fiatal patkányokból származóké, hímek és nőstények esetén egyaránt. Ezt a jelenséget a szeletek által, egységnyi idő alatt az extracelluláris médiumból „elfogyasztott”  $Zn^{2+}$  mérésével igazoltuk. A  $Zn^{2+}$  visszavétel zavarát az idős patkányokban korral járó mitokondriális alulműködés okozza, melyet a szeletek MTT-redukciós képességének csökkenése igazol.

#### 4.3. Az aktivált hippokampális szeletekből származó $Zn^{2+}$ indukálja az $A\beta(1-42)$ oligomerizációját

Az  $A\beta(1-42)$  oligomerek fluoreszcens jelöléséhez bis-ANS festéket használtunk, mely a nem fibrillaris szerkezetű, alacsony rendezettségi fokú oligomerek kimutatására alkalmas. Először *in vitro* körülmények között vizsgáltuk a cink ionok szintetikus  $A\beta(1-42)$  aggregáció moduláló hatását és kimutattuk, hogy  $50 \mu M Zn^{2+}$ -nek jelentős aggregáció gyorsító hatása van. Az oligomerek karakterizálását analitikai ultracentrifugálással végeztük. Ezt követően bizonyítottuk, hogy az endogén, vagyis szeletekből depolarizáció hatására ürülő cink is képes azonnal precipitálni az exogén szintetikus  $A\beta(1-42)$  monomereket, ezt igazolja a depolarizációt követő hirtelen bis-ANS fluoreszcencia emelkedés, mely cink kelátor (pl. CaEDTA) adagolással megszüntethető.

#### 4.4. Endogén $Zn^{2+}$ mediálta $A\beta(1-42)$ szinaptotoxicitás

A multi-electrode array (MEA) technika segítségével, hippokampális szeleteken kimutattuk, hogy az endogén  $Zn^{2+}$  által precipitált  $A\beta(1-42)$ , különösen az idős állatokból származó szeletek esetén, jelentősen gátolja az LTP kialakulását. Konfokális mikroszkópiás méréseink eredményei alapján pedig megállapítottuk, hogy a toxikus  $Zn^{2+}$ - $A\beta(1-42)$  oligomerek hozzákötődnek az idegsejtek felszínéhez, és képesek bejutni a neuronokba.

#### 4.5. Normál és $\alpha SN$ túltermelő SH-SY5Y sejtek összehasonlítása

Fénymikroszkópiás vizsgálataink során kiderült, hogy az  $\alpha SN$  túltermelő SH-SY5Y sejtek alakja, eloszlása és nyúlványarborizációja is



jelentősen különbözik a kontroll sejtekhez képest. E sejtek jóval lassabban osztódnak, sokkal több és hosszabb nyúlványt növesztenek, mint vad típusú társaik.

A sejtvonalak western blot analízise mellett, hogy igazolta, hogy a túltermelő sejtek valóban túltermelik az  $\alpha$ SN fehérjét, két további, kovalensen módosított monomer  $\alpha$ SN izoforma jelenlétét is kimutatta.

#### *4.6. Az $A\beta(1-42)$ , NAC és a klasszikus apoptotikus vegyületek sejtéletképességre gyakorolt hatása*

A normál és  $\alpha$ SN túltermelő sejtvonalak protofibrilláris és fibrilláris állapotú NAC fragmenttel és  $A\beta(1-42)$  peptiddel történő kezelés hatására a túltermelő sejtekben szignifikáns életképesség csökkenést tapasztaltunk. Ebből arra következtettünk, hogy az  $\alpha$ SN túltermelés szenzitívebbé teszi ezeket a sejteket az aggregálódó peptidekkel szemben. Meglepő módon a klasszikus apoptotikus faktorokra sokkal kevésbé érzékenyek az  $\alpha$ SN túltermelő sejtek, mint a vad típusú SH-SY5Y sejtvonal.

## 5. Összefoglalás

Az Alzheimer-kór patogenezisének egyik kulcsmomentuma az A $\beta$  aggregációja, melynek megelőzése, illetve megfékezése kiváló terápiás lehetőséggel kecsegtet. Doktorandusz hallgatóként munkám során két, különböző fiziológiai faktort vizsgáltam, a Zn<sup>2+</sup> fémionokat és az  $\alpha$ -szinuklein fehérjét, melyek béta-amiloid aggregáció gyorsító hatásának bizonyultak. Amellett, hogy e faktorok katalizálják az A $\beta$  összecsapódását, a jelenlétükben képzett aggregátumok minden esetben sokkal toxikusabbnak bizonyultak, mint hiányukban. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy az Alzheimer-kór egy multifaktoriális eredetű neurodegeneratív betegség, így megelőzéséhez, illetve gyógyításához célzott, kombinált terápiára van szükség.

Az értekezés fontosabb megállapításai a következők:

- Az endogén Zn<sup>2+</sup> képes precipitálni az exogén A $\beta$ -t
- A Zn<sup>2+</sup>-A $\beta$  komplex jelentősen neurotoxikus és gátolja a normális idegi funkciókat
- A hippocampális cinkürítés nagyban függ nemtől és kortól
- A cink kelátorok alkalmazása igencsak ígéretesnek bizonyulhat Alzheimer-kór terápiás vonatkozásában
- Az alfa-szinuklein és béta-amiloid szinergista módon képes egymás aggregációjának mértékét és sebességét, valamint egymás neurotoxicitását fokozni

## **6. Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Datki Zsoltnak a diák és doktorandusz éveim alatt nyújtott segítségével és bizalmáért, mellyel támogatta a munkámat.

Köszönettel tartozom Dr. Penke Botondnak, hogy lehetővé tette az intézetben doktori munkám elvégzését, továbbá köszönöm segítő hasznos tanácsait.

Köszönetemet fejezem ki az Alzheimer kutatócsoport minden volt és jelenlegi munkatársának kísérleteimben nyújtott áldozatkész segítségért.

Hálával tartozom feleségemnek, családomnak, barátaimnak szeretetükért és biztatásukért, mellyel támogattak egyetemi, és doktori tanulmányaim alatt.

## **Publikációk**

### **Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:**

Mozes E, **Hunya A**, Posa A, Penke B, Datki Z.

A novel method for the rapid determination of beta-amyloid toxicity on acute hippocampal slices using MTT and LDH assays.

Brain Res Bull. 2012 Apr 10;87(6):521-5

Mozes E, **Hunya A**, Toth A, Ayaydin F, Penke B, Datki ZL.

A novel application of the fluorescent dye bis-ANS for labeling neurons in acute brain slices.

Brain Res Bull. 2011 Oct 10;86(3-4):217-21.

**Hunya A**, Földi I, Szegedi V, Soós K, Zarándi M, Szabó A, Zádori D, Penke B, Datki ZL.

Differences between normal and alpha-synuclein overexpressing SH-SY5Y neuroblastoma cells after A $\beta$ (1-42) and NAC treatment.

Brain Res Bull. 2008 Mar 28;75(5):648-54.

Datki ZL, **Hunya A**, Penke B.

A novel and simple fluorescence method for the measurement of presynaptic vesicular zinc release in acute hippocampal slices with a fluorescence plate reader.

Brain Res Bull. 2007 Sep 14;74(1-3):183-7.

