

ABSTRAKT

Intracelulární sledování pohybu protilátky proti amyloidnímu prekurzorovému proteinu

Alzheimerova choroba je neuropatologické onemocnění, klinicky se projevující postupným zhoršováním funkcí centrální nervové soustavy, především pak paměti, kognitivních funkcí, změněným chováním (včetně paranoi) a zhoršováním jazykových funkcí. Alzheimerova choroba je nejčastější příčinou demence ve středním a vyšším věku. Příčiny a samotný proces rozvoje choroby nejsou doposud plně objasněny, nicméně jedním z rozhodujících faktorů se zdá být nahromadění β -amyloidního peptidu ($A\beta$) v určitých oblastech CNS. $A\beta$ je ovšem přirozeným a fyziologickým metabolitem a lze ho izolovat z tělesných tekutin zdravých jedinců.

$A\beta$ vzniká proteolytickým štěpením amyloidního prekurzorového proteinu (APP), což je fyziologický, evolučně vysoce konzervativní, membránový protein. APP může být štěpen v takzvané neamyloidogenní cestě α -sekretázou a následně γ -sekretázou za vzniku dobře rozpustných peptidů nepodílejících se na vzniku depozitů, nebo β -sekretázou a γ -sekretázou za vzniku $A\beta$ s tendencí k agregaci (amyloidogenní cesta). Pohyb APP v buňce je velmi komplexní. Po jeho syntéze je posttranslačně modifikován a distribuován sekreční cestou k buněčnému povrchu, kde je exponován. Poměrně rychle je APP podroben endocytóze a následně směřován do lysosomů k degradaci a nebo recyklován zpět na buněčný povrch. K amyloidogennímu štěpení (produkci $A\beta$) dochází z velké části v průběhu těchto recyklačních kroků.

Nová monoklonální protilátka 2B12 byla připravena v roce 2006 imunizací myší syntetickým peptidem obsahujícím sekvenci aminokyselin odpovídající místu štěpení APP β -sekretázou. Bylo prokázáno, že 2B12 se váže na APP a snižuje sekreci $A\beta$ v buněčných kulturách. Předpokládá se, že navázaná protilátka stericky inhibuje štěpení APP β -sekretázou. Tento přístup má zřetelné výhody oproti ostatním imunologickým metodám založeným na aktivní či pasivní imunizaci proti $A\beta$. Klinické testy látky tohoto typu byly zastaveny pro rozvinutí zánětlivé reakce v CNS zprostředkované Th1 lymfocyty u několika jedinců. U 2B12, která se významně neváže na samotný $A\beta$, je toto riziko nízké.

Dle vyslovené hypotézy se 2B12 váže na molekuly APP exponované na buněčném povrchu (plazmatické membráně) a takto vzniklý komplex je internalizován přirozenou

endocytózou. Tato hypotéza vychází z předchozích studií a byla potvrzena prací Pei San Ho (2007), která sledovala internalizaci 2B12 v buněčné kultuře astrocytomu MOG-G-UVW.

Cílem této práce bylo získat další důkazy podporující výše zmíněnou hypotézu pomocí studia lokalizace 2B12 v jednotlivých buněčných kompartmentech, které se dle dostupných informací účastní koloběhu APP v buňce (ranné a pozdní endosomy, lysosomy, endoplazmatické retikulum - ER, vezikuly trans-Golgiho aparátu - TGN). Potvrzení selektivní přítomnosti 2B12 v těchto kompartmentech by bylo dalším důkazem naznačujícím správnost této hypotézy.

Lokalizace 2B12 byla studována pomocí imunocytochemických metod na buňkách lidského astrocytomu MOG-G-UVW, konstitutivně produkujícího APP. Původním záměrem bylo inkubovat 2B12 s živými buňkami a jejich fixaci provádět až před aplikací druhé primární protilátky. Tento postup by zajistil selektivní označení jen těch molekul APP, které již byly exponovány na buněčném povrchu a umožnil by sledovat proces endocytózy 2B12 (lokalizaci v jednotlivých kompartmentech) v čase. Kvůli snížené stabilitě 2B12 (důvod neznámý) tento přístup nemohl být realizován. Fixované a permeabilizované buňky byly tedy nejprve inkubovány s 2B12 a poté s jednou z komerčně dostupných protilátek vázících se na proteiny typické pro jednotlivé buněčné kompartmenty (EEA1 – ranné endosomy, M6PR – pozdní endosomy, LAMP1 – lysosomy, Bcl-2 – ER, TGN46 – síť vezikul trans-Golgiho aparátu, Hsp60 - mitochondrie). Navázané primární protilátky byly poté zviditelněny použitím patřičných sekundárních protilátek značených biotinem a fluorescenčních barviv (fluorescein a texaská červeň) konjugovaných s avidinem (klasický postup využívající silné vazby mezi biotinem a avidinem). Použitím odlišných fluorescenčních barviv pro 2B12 a druhou ze dvojice primárních protilátek v rámci jednoho pokusu bylo možné detekovat lokalizaci obou těchto protilátek zároveň i jejich případnou kolokalizaci, která se projevila složením obou základních barev. Významná kolokalizace byla považována za důkaz přítomnosti 2B12 v daném buněčném kompartmentu. Výsledky byly vyhodnocovány pomocí fluorescenčního mikroskopu a laserového konfokálního mikroskopu. Všechny pokusy byly opakovány minimálně třikrát ($n = 3$) a byly prováděny příslušné negativní kontroly sloužící k posouzení vlivu případného nespecifického vázání protilátek na dosažené výsledky.

Přítomnost 2B12 byla očekávána ve všech výše zmíněných kompartmentech kromě mitochondrií (testování přítomnosti 2B12 v mitochondriích mělo za cíl ověřit schopnost použité metody dojít k negativnímu výsledku). Přítomnost 2B12 byla prokázána v pozdních endosomech (anti-M6PR protilátka), lysosomech (anti-LAMP1) a endoplazmatickém retikulu (anti-Bcl-2). Údaje o přítomnosti 2B12 v časných endosomech byly proměnlivé a odhalená

lokalizace byla malá (anti-EEA1). Oproti očekávání se přítomnost 2B12 nepodařila prokázat v TGN (anti-TGN46). Přítomnost 2B12 v mitochondriích (anti-Hsp 60) byla negativní. Příčiny nesrovnalostí mezi přepokládanými a dosaženými výsledky mohou být různé. Lze doporučit opakování daných pokusů s jinými primárními protilátkami (jiný výrobce), případně testování na transfekčních buňkách produkujících vyšší než běžné hladiny APP. Většina výsledků této práce nepřímo potvrzuje schopnost 2B12 vázat se na molekuly APP a být s těmito internalizována. Výsledky rovněž svědčí o značné stabilitě komplexu 2B12 – APP, která je podmínkou případného farmakologického účinku v podobě snížení produkce A β . 2B12 tak nadále zůstává potenciálně perspektivní možností terapie Alzheimerovy nemoci.