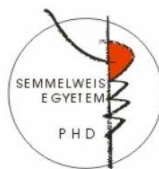


Alfa7 altípusú nikotinos acetilkolin receptorok pozitív alloszterikus modulátorainak hatásmechanizmus vizsgálata

Doktori értekezés

Pesti Krisztina

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Mike Árpád Ph.D tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Bartók Ádám tudományos főmunkatárs
Dr. Némethy Zsolt Ph.D, tudományos főmunkatárs

Martonvásár
2020

1. Bevezetés

Az öregedés természetes folyamata, betegség vagy agysérülés az értelmi képességek csökkenéséhez vezethet. A kialakult kórképet mentális cselekvésképtelenség, memóriazavarok, személyiségváltozás jellemzik, melynek háttérében az idegsejtek funkcióvesztése, vagy rosszabb esetben előrehaladott állapotú sejtpusztulás állhat. A neurodegeneratív- és pszichiátriai betegségeket kísérő demencia, szerte a világon komoly egészségügyi problémát okoz, amelynek mérséklésére az utóbbi években számos kísérlet történt. Sajnos a mentális leépülési folyamatok egyenlőre nem visszafordíthatóak. A korai szakaszban diagnosztizált, illetve időben elkezdett gyógyszeres kezelés azonban lelassíthatja a betegség előrehaladását, valamint mérsékelheti az értelmi hanyatlás tüneteit. Azokat a hatóanyagokat amelyek pozitívan befolyásolják az emlékezőképességet, elősegítik az éberséget, a fókuszált figyelmet, serkentik tanulási és memória folyamatokat, nootróp vagy szellemi kapacitást fokozó vegyületeknek nevezzük. Gyógyszer-célpontként olyan receptorokat, enzimeket érdemes keresni, amelyeknek ismert a kognitív funkciókban betöltött szerepe.

Egy ilyen célfehérje rendelkezik bizonyos ligandum kötőhelyekkel. A receptorok esetében az *ortosztérikus* kötőhelyen kötődő aktiváló anyagokat *agonistának*, az ugyanott kötődő, de agonistára adott választ csökkentő vagy gátló hatású anyagokat pedig *antagonistának* nevezik. Sok receptor rendelkezik az ortosztérikustól térbelileg elkülönülő, de a konformációs változások szintjén kapcsolatban álló,

alloszterikus kötőhelyel, amelyhez *modulátor* ligandumok köthetnek. A moduláló hatás kiváltódásához elengedhetetlen az agonista kötődése (mivel önmagukban nem képesek csatornanyitást előidézni¹), és a két nem átfedő kötőhely betöltöttsége idéz elő egy egyedi, visszafordítható, átmeneti fehérjeszerkezetbeli változást.

A dolgozatomban részletesen ismertetett homopentamer felépítésű $\alpha 7$ típusú nikotinikus acetilkolin receptor ($\alpha 7$ nAChR) szintén potenciális terápiás célpont lehet kognitív tüneteket okozó neurológiai betegségekben. Szelektív agonistái és pozitív alloszterikus modulátorai (PAM) prokognitív hatással bírnak. E receptor alulműködése agyi érkatasztrófát követően és más központi idegrendszeret érintő megbetegedésekben mint például Alzheimer-, Parkinson-kórban, skizofréniában valamint a nikotin függőségben szenvedők körében figyelhető meg. Az $\alpha 7$ nAChR fontos szerepet játszik a memória- és tanulási folyamatokban, ezért a demencia elleni gyógyszerek kutatásának egyik fő célpontjává vált. Dolgozatomban a receptor pozitív modulátorait tárgyalom. A PAM-ok számos előnnyel bírnak az agonistákhoz képest: általában az alloszterikus kötőhely kevésbé konzervált, ezért könnyebb altípus-szelektív anyagokat találni; nem okoznak deszenzitizációt illetve a hatást kompenzáló felszabályozódást; és használatukkor a normális idegsejt aktivitási mintázat megőrződik, mivel egy meglévő endogén jelet erősítenek fel. Az $\alpha 7$ nAChR PAM-ok a kognitív zavarok kezelése mellett gyulladáscsökkentő hatásúak is lehetnek.

¹ Léteznek kivételek, amelyek a moduláció mellett önállóan aktiválni is képesek a receptort, bár nem az ortoszterikus kötőhelyhez köthetnek. Ezeket alloszterikus aktivátorok vagy Ago-PAM-oknak nevezik.

akut és krónikus neurodegeneratív kórképek valamint a különböző fájdalom szindrómák kezelésében is hasznosak lehetnek.

2. Célkitűzés

A gyógyszergyárak közötti kielezett verseny miatt, többnyire a nagy áteresztőképességre törekszenek, a hatásmechanizmus elmélyült kutatása helyett. HTS módszerekkel egyszerűbben lehet találni a vizsgált célfehérjén ható anyagokat (majd állatkísérletekben később kiderül a terápiás hatékonyság, és utólag is elég megállapítani “mi is akadt fenn a horgon” agonista, PAM, illetve milyen típusú PAM). Ha a terápiás hatás kimutatható, akkor a hatásmechanizmus lényegében mindegy. Pedig a terápiás hatást jobban meg lehetne jósolni a hatásmechanizmus ismeretében. Költséghatékonyság szempontjából talán az a megközelítés lenne célravezetőbb, hogy először megtervezzük, hogy milyen hatásmechanizmusú anyagokra szeretnénk szűrni. A hatásmechanizmus megértéséhez először meg kell vizsgálni a receptor fiziológias működését (kapuzási kinetika), majd azt hogy ez hogyan változik adott ligandumok kötése hatására, mindezt összevetve a ligandumok asszociációs- disszociációs kinetikájával. Ha ezt nagyobb áteresztőképességgel, automata rendszeren meg akarjuk valósítani, mindenképp előtte manuális rendszeren kivitelezett előkísérletekre van szükség, és megfelelő időbeli felbontásra, mind a regisztráláshoz, mind pedig az oldatcseréhez. Dolgozatomban elsősorban az $\alpha 7$ nAChR két szelektív alloszterikus modulátorának, a PNU-120596 és az A-867744 anyagoknak hatásmechanizmusával foglalkozom. Mindkét hatóanyag

a II. típusú pozitív alloszerikus modulátorok csoportjába sorolható, vagyis az agonistára adott válasz méretére és kinetikájára is hatással vannak. A transzmembrán domének között elhelyezkedő kötőhelyük valószínűleg részben átfedő, de az erre vonatkozó irodalmi adatok ellentmondóak.

A következő kérdésekre kerestük a választ:

- 1) Milyen gyors a receptorok "saját" kinetikája (modulátor kötés nélkül)?
- 2) A receptor populáció hány százaléka nyílik ki egyszerre? Hány százaléka nyílik ki egyáltalán?
- 3) Milyen folyamatokat tükröz az áramok felfutása, lecsengése?
- 4) Hogyan változik a kinetika a ligandumok hatására?
- 4) Feltételezhetünk-e a hasonló hatásmechanizmust a két modulátor esetében?
- 5) A két modulátor ugyanazon a kötőhelyért verseng?
- 6) A kidolgozott vizsgálati módszerek hogyan alkalmazhatók nagyáteresztő képességű rendszeren?

Úgy véljük, hogy a PAM-ok csoportosítása további finomításra szorulna. Reméljük, hogy eredményeink hozzájárulnak a kedvező terápiás hatású, ígéretes molekulák alaposabb megismeréséhez és az értelmi hanyatlás kezelésére irányuló gyógyszerkutatás hatékonyabbá tételéhez.

3. Módszerek

Manuális patch clamp

A GH4C1 sejteken kifejeződő $\alpha 7nAChR$ -kat standard patch clamp módszerrel vizsgáltuk “whole-cell” és “outside-out” konfigurációkban. A méréshez Axopatch 200 B (Molecular Devices) típusú erősítőt, Digidata 1322A analóg – digitális átalakítót és a pClamp 10.7 programot használtunk. A mérések során a tartófeszültséget -70 mV-on rögzítettük. Az agonistával (legtöbbször 10 mM kolinnal) kiváltott áramokat 100 vagy 20 kHz-en digitalizáltuk, és 10 kHz-en szűrtük. A kísérleteket szobahőmérsékleten ($\sim 25^\circ\text{C}$) végeztük. A méréshez használt mikropipettákat boroszilikát üvegapillárisokból készítettük (World Precision Instruments). A pipettákat CsOH-dal pH 7.2 -re állított intracelluláris oldattal (50 mM CsCl, 60 mM CsF, 10 mM NaCl, 10 mM HEPES, és 20 mM EGTA) töltöttük meg. Az üvegpipetták ellenállása 1.7 és 4 M Ω között mozgott, a soros ellenállás $2,1$ és $9,0$ M Ω között volt. A kísérletre kiválasztott 35 mm-es petricsészén a tápfolyadékot HEPES puffer tartalmú, NaOH-dal 7.3 -ra pH-zott extracelluláris oldatra (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES-Na, 10 mM D-glükóz) cseréltük. (A perfúziós kamrában a folyamatos oldatáramlás ~ 1.66 ml/perc). A mérőoldatok ozmolaritását ~ 330 mOsm-ra állítottuk. Az ultragyors anyagadáshoz piezoelektromos vezérlésű (PZ-150M Driver, Burleigh) theta csövet használtunk. Az optimális oldatáramlási sebességet nyomás-szabályozott vezérlőegység (DAD-12, ALA Scientific Instruments

Inc., Farmingdale, NY) segítségével állítottuk be ~0.2-0.3 ml/perc értékre. Az adatelemzést Microsoft Excel program, a görbeillesztéseket a beépített Solver funkcióval végeztük.

Automata patch clamp

Az automata patch clamp mérésekhez a manuális rendszerben is használt GH4C1 sejtvonalat használtuk. A kísérletet megelőző napon a tenyészedényeket 30 °C-os inkubátorba helyeztük (A csökkentett hőmérséklet növeli az expresszió hatékonyságát). A sejtlevétel Accutase-os (Corning) emésztéssel történt. Centrifugálást követően szérum mentes oldatban, folyamatos billegtetés mellett egy órán át pihentettük a felvett sejteket. (A kísérlethez használt Ensemble plate-ek valamint a munkaoldatok előkészítését, mosását, az inkubációs időben végeztük). Az inkubációs idő leteltével a sejteket ismételt centrifugálás után extracelluláris oldatban felvéve (3-5 millió sejt/ml-es végkoncentrációban) 8 csatornás pipettával töltöttük be a plate-be. Az extra- és intracelluláris oldatok összetétele és ozmolaritása megegyezett a manuális kísérletekben használt oldatokéval. Az áramok kiváltásához 1-10 mM kolint használtunk. A kísérletekben -70 mV-os tartófeszültséget állítottunk be. 10 kHz-el mintavételeztünk, 2 kHz-en szűrtünk. A protokollok tervezéséhez, méréshez, az előértékeléséhez, és az adatok exportálásához a műszer beépített szoftverét használtuk. További értékeléshez a pClamp Clampfit 10.7-et, és Microsoft Excelt használtuk.

4. Eredmények

Manualis patch clamp kísérletek

Az $\alpha 7$ nAChR-ok vizsgálata során megállapítottuk, hogy a receptor egyedülállóan alacsony nyitási valószínűséggel rendelkezik: az áram csúcspontján is csak a receptor populáció mintegy 3 %-a van egyszerre nyitva, és a legtöbb receptor (75-80%) agonista hatására nyitás nélkül deszenzitizálódik. Ebből érdekes módon az is következik, hogy ellentétben a megszokott helyzettel, nem úgy van hogy az áram felfutása az aktiváció sebességétől, lecsengése pedig a deszenzitizáció sebességétől függ. Mind a felfutás, mind a lecsengés sebességét a záródás és a deszenzitizáció sebességi állandói határozzák meg. A nyitás sebességi állandója elsősorban csak az aktiválódó receptorok arányát határozza meg. A kísérletek során az áramok amplitúdóját és kinetikáját ezen kívül alapvetően meghatározza az oldatkicserélődés sebessége. A nem megfelelően gyors oldatcsere annál nagyobb torzítást okoz, minél nagyobb agonista koncentrációval váltjuk ki a választ. A 10 mM kolinnal kiváltott válaszok esetén még az 1 ms-os (10 %-ostól 90 %-os kicserélődésig eltelt idő) oldatkicserélési sebesség is túl lassú. Becslésünk szerint az azonnali oldatkicserélődés megkétszerezné az amplitúdót, és kb. 2-3-szor gyorsabb kinetikájú áramot eredményezne.

A pozitív modulátorok (PAM-ok) alapvetően képesek megváltoztatni a receptor kinetikáját és a nyitott állapotú receptorok arányát.

Az $\alpha 7$ nAChR PAM-ok szerkezetileg nagyon különbözőek lehetnek. A receptorral való kölcsönhatásuk és hatásmechanizmusuk még nem teljesen tisztázott. Két típusba sorolják őket a moduláló hatás alapján: Az I-es típusú modulátorok az áramok tranziens jellegén nem változtatnak, csak a csúcs-amplitúdót növelik meg, míg a II. típusúak az amplitúdó növelésén kívül elnyújtott aktivációt, megváltozott kinetikát is okoznak. Megfelelő időbeli felbontással végzett részletesebb hatásmechanizmus vizsgálatok alapján a modulátorok korábban létrehozott osztályozási kategóriái ma már túlságosan leegyszerűsítettnek tűnnek. A PAM-ok eltérő hatásmechanizmusai különböző terápiás hatások szempontjából lehetnek előnyösek. Ahol hosszantartó tónusos aktivitás növekedésre van szükség, ott várhatóan a II. típusú PAM-ok előnyösebbek (pl. gyulladáscsökkentő folyamatok kezelése). Ahol azonban vélhetőleg fontos az eredeti idegi aktivitás-mintázat megőrzése (kognitív hanyatlás megelőzése), ott alkalmasabbnak tűnnek az I. típusú PAM vegyületek.

A két PAM vizsgálatok a következő lényeges különbségeket találtuk:

- 1) Az A-867744 képes szabadon kötődni a nyugalmi állapotú receptorokhoz, míg a PNU-120596 asszociációt akadályozza a receptor nyugalmi állapota.
- 2) A PNU-120596 erőteljesen megnyújtja a receptorok nyitott állapotban töltött idejét, és hosszan tartó burst-öket indukál, amit "whole-cell" szinten a moduláló hatás lassú felfutása ($\tau \approx 100$ ms) és elhúzódo befűjeződűse is tükröz ($\tau \approx 300$ ms ha az agonistát és a

modulátort is eltávolítjuk, $\tau \approx 2000$ ms ha a modulátor továbbra is jelen van). Ezzel szemben az A-867744 moduláló hatása körülbelül tízszer gyorsabban alakult ki mint a PNU-12056 esetében ($\tau \approx 10$ ms), és ez a különbség még nagyobb volt a deaktiváció lecsengését illetően ($\tau < 10$ ms, a modulátor jelenlététől függetlenül). Ez azt mutatja, hogy az A-867744 moduláció hatását valószínűleg a rövidebb single-channel nyitások illetve burst-ök jellemzik.

Mivel mindkét anyag jellegzetes időbeli mintázatot mutat, amikor a két modulátort egymás után adjuk, nyomon lehet követni ahogy azok kicserélődnek a receptor kötőhelyein. A kísérlet során nem tapasztaltuk a moduláló hatások összeadódását, inkább úgy tűnt, hogy az egyik modulátor jelenléte a gátolja másik hatását. Ez azonban nem bizonyítja, hogy ugyanazon a kötőhelyen osztoznak, mivel a kölcsönhatás a konformációk szintjén is lehetséges lenne. Ha azonban az egyik modulátorral telített kötőhelyek esetén azt tapasztaljuk, hogy a másik modulátor koncentrációjának növelésekor annak jellegzetességei jelennek meg az áram formájában, az arra utal, hogy valóban ugyanazért a kötőhelyért versengnek. Azonos koncentrációban alkalmazva a két modulátort az A-867744 által modulált áramalakot figyeltük meg, hatása elnyomta a PNU-120596 hatását. A magyarázat lehet a receptorhoz való nagyobb affinitás, de lehet az eltérő sztöchiometria is. Kimutatták ugyanis, hogy a PNU-120596 hatása csak akkor tud érvényesülni, ha az 5-ből 4 vagy 5

kötőhelyet elfoglalt². Ha feltételezzük, hogy az A-867744 moduláló hatás megjelenéséhez 1, 2 vagy 3 kötőhely betöltöttsége is elegendő, akkor érthető, hogy a vegyes betöltöttségi állapotú receptorok miatt az A-867744-je jellemző kinetikát mutatják. A PNU-120596 koncentrációjának növelésével azonban megfordult a helyzet, megjelentek a PNU-120596 jellegzetességei az áramformában. Ez arra utal, hogy a két modulátor valóban azonos vagy nagyban átfedő kötőhelyért verseng.

Automa patch-clamp kísérletek

Ahhoz hogy az általunk javasolt hatásmechanizmus vizsgálatok bekerülhessenek a gyógyszerfejlesztés gyakorlatába, fontos lenne ezeket a protokollokat nagyobb áteresztő képességű, automata rendszerekre is adaptálni. Elsőként az IonFlux Mercury rendszerre való alkalmazhatóságot vizsgáltuk meg, mivel a kereskedelmi forgalomban kapható automata patch-clamp mérőállomások közül ez az egyik legjobb konstrukciójú műszer, ami az oldatcsere technológiáját illeti. Precíz nyomás szabályozott, plate-be integrált mikrofluidikai elven alapuló oldatcserélő rendszere lehetővé teszi a gyors oldatcserét, a folyamatos oldat áramlást, valamint a feszültség lépésekkel szinkronizált komplex perfúziós protokollokat. Ezen

² daCosta, C. J. B. & Sine, S. M. Stoichiometry for drug potentiation of a pentameric ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 6595–6600 (2013).

tulajdonságai különösen előnyösek amikor ligandum-kölcsönhatásokat illetve a ligandum hatásának kinetikáját kell tanulmányozni.

Az $\alpha 7nAChR$ -ok tanulmányozása automata patch clamp rendszerrel több szempontból is kihívás: Egyrészt az agonista önmagában rendkívül kis választ vált csak ki (amint azt fentebb tárgyaltuk, a receptorok $<3\%$ -a lehet csak nyitva egyszerre). Másrészt a pozitív modulátorok erősen lipofil anyagok lévén hajlamosak kitapadni a szilikon és műanyag felszínre, ahonnan rendkívül lassan mosódnak csak ki, ami lehetetlenné teszi a modulátor-mentes agonista által kiváltott válasz regisztrálását. A következő módosításokat hajtottuk végre: 1) Teszteltük a különböző nyomás beállítások oldatcsere sebességére gyakorolt hatását. A gyors oldatcserének köszönhetően az agonista válaszok önmagukban is detektálhatókká váltak. 2) Drasztikusan lerövidítettük a kísérletet megelőző mosási fázist. Ezzel elkerülhetővé vált a modulátorok idő előtti perfúzióba jutása, valamint a keresztszennyeződés kialakulása. 3) Az egyik hatóanyag-csatornából folyamatosan extracelluláris oldatot perfundáltunk. Ez minimálisra csökkentette a kereszt-kontaminációt, és sokkal jobb minőségű válaszokat eredményezett. 4) Egyes hatóanyagok esetében szükségesnek találtuk a megfelelő hosszúságú preinkubációt.

5. Következtetések

Az $\alpha 7$ nAChR-ok tanulmányozása esetén az eredmények értelmezéséhez elengedhetetlen a tanulmányozáshoz használt technika ismerete, elsősorban tudnunk kell az oldatsere sebességét. Kísérleteinkben mind a manuális- mind az automata patch clamp módszerek előnyeit és hátrányait felderítettük. A két vizsgálati rendszer technikai előnyeinek ötvözésével a vizsgált célmolekuláról sokkal több információ gyűjthető. A manuális patch clamp esetében a pipetta-sejtmembrán kapcsolat jobb minőségű, de kevésbé stabil. A pulzusok és a regisztrátumok hossza rövidebb időintervallumra korlátozódik ezért kevésbé alkalmas a több percen át tartó modulátor applikáció hatásainak vizsgálatára. Előnye viszont, hogy a piezo elektromos vezérlésű theta-cső jóval gyorsabb oldatcserét tesz lehetővé, amely elősegíti az események jobb időbeli felbontással történő követését. Az egy napon vizsgálható anyagok száma azonban limitált. Az automata patch clamp esetében a plate és sejt közti kapcsolat rosszabb minőségű, de rendkívül stabil, ezért nyugodtan lehet percekig tartó perfúziót is alkalmazni, és hét különböző anyag hatását lehet vizsgálni (a nyolcadik csatornát fenntartva kontroll oldatnak).

Manuális patch clamp kísérletekben az ultragyors oldatsere segítségével először sikerült meghatározni az $\alpha 7$ nAChR-ok sajátos kapuzási kinetikáját, ahol a receptor populációnak csak egy kisebb része aktiválódik egyáltalán, és az is csak nagyon rövid időre. Megállapítottuk, hogy milyen gyorsan képes a receptor reagálni

hirtelen koncentráció emelkedésre (például szinaptikus receptorok esetében), és azt is, hogy paradox módon a felfutás sebességét a deszenzitizáció és a záródás sebessége határozza meg, az aktiváció sebességének csak az amplitúdó meghatározásában van szerepe.

A két II. típusú PAM-nak tartott vegyület vizsgálata során azt a meglepő felfedezést tettük, hogy hatásmechanizmusuk alapvető különbségeket mutat, amelyek terápiás használhatóságukat is meghatározhatják. Különösen érdekes az A-867744 hatásmechanizmusa, amely egyesíteni látszik az I. és II. típusú PAM-ok tulajdonságait. Feltételezhető, hogy egy hosszabb ideig fennálló magas agonista koncentráció (pl. sérült agyterületen megemelkedett kolin szint) esetén PAM II-ként működve reaktiválhatná a deszenzitizált receptorokat. Fiziológias működés esetén azonban képes lenne az agonista pulzus mintázatot hűen megtartva PAM I –ként “viselkedni”, ha az $\alpha 7$ nAChR-ok szinaptikusan vagy periszinaptikusan helyezkednek el, mert gyorsan képes reagálni a hirtelen agonista koncentráció változásokra.

Úgy gondoljuk, érdemes lenne a különböző indikációk területén végzett *in vivo* hatékonyság vizsgálatokat és az *in vitro* hatásmechanizmus kutatást összekapcsolni.

Saját publikációk jegyzéke

A dolgozat témájához kapcsolódó publikációk:

Type I-like behavior of the type II $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor positive allosteric modulator A-867744

Pesti K, Lukács P., Mike Á.

PeerJ. 2019 jul doi:10.7717/peerj.7542 Epub 2019 sept 2.

Kinetic properties and open probability of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors.

Pesti K, Szabo AK, Mike A, Vizi ES.

Neuropharmacology. 2014 Jun;81:101-15. doi:

10.1016/j.neuropharm.2014.01.034. Epub 2014 Jan 31.

Mode of action of the positive modulator PNU-120596 on $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors.

Szabo AK, Pesti K, Mike A, Vizi ES.

Neuropharmacology. 2014 Jun;81:42-54. doi:

10.1016/j.neuropharm.2014.01.033. Epub 2014 Jan 31.

A dolgozat témájához nem kapcsolódó publikációk:

Comparison of 2D and 3D neural induction methods for the generation of neural progenitor cells from human induced pluripotent stem cells.

Chandrasekaran A, Avcı HX, Ochalek A, Rösingh LN, Molnár K, László L, Bellák T, Téglási A, Pesti K, Mike A, Phanthong P, Bíró O, Hall V, Kitiyanant N, Krause KH, Kobolák J, Dinnyés A.

Stem Cell Res. 2017 Dec;25:139-151. doi:

10.1016/j.scr.2017.10.010. Epub 2017 Oct 14.

Different pH-sensitivity patterns of 30 sodium channel inhibitors suggest chemically different pools along the access pathway.

Lazar A, Lenkey N, Pesti K, Fodor L, Mike A.

Front Pharmacol. 2015 Sep 25;6:210. doi:

10.3389/fphar.2015.00210. eCollection 2015.