

EAAT2-proteoliposomy jako detoxifikační agens v případě retinální neurodegenerace



Lékařská
fakulta

Univerzita Palackého
v Olomouci

Student: Zarivnij Alexandr

Školitel: Bouchal Jan, doc. Mgr. Ph.D.

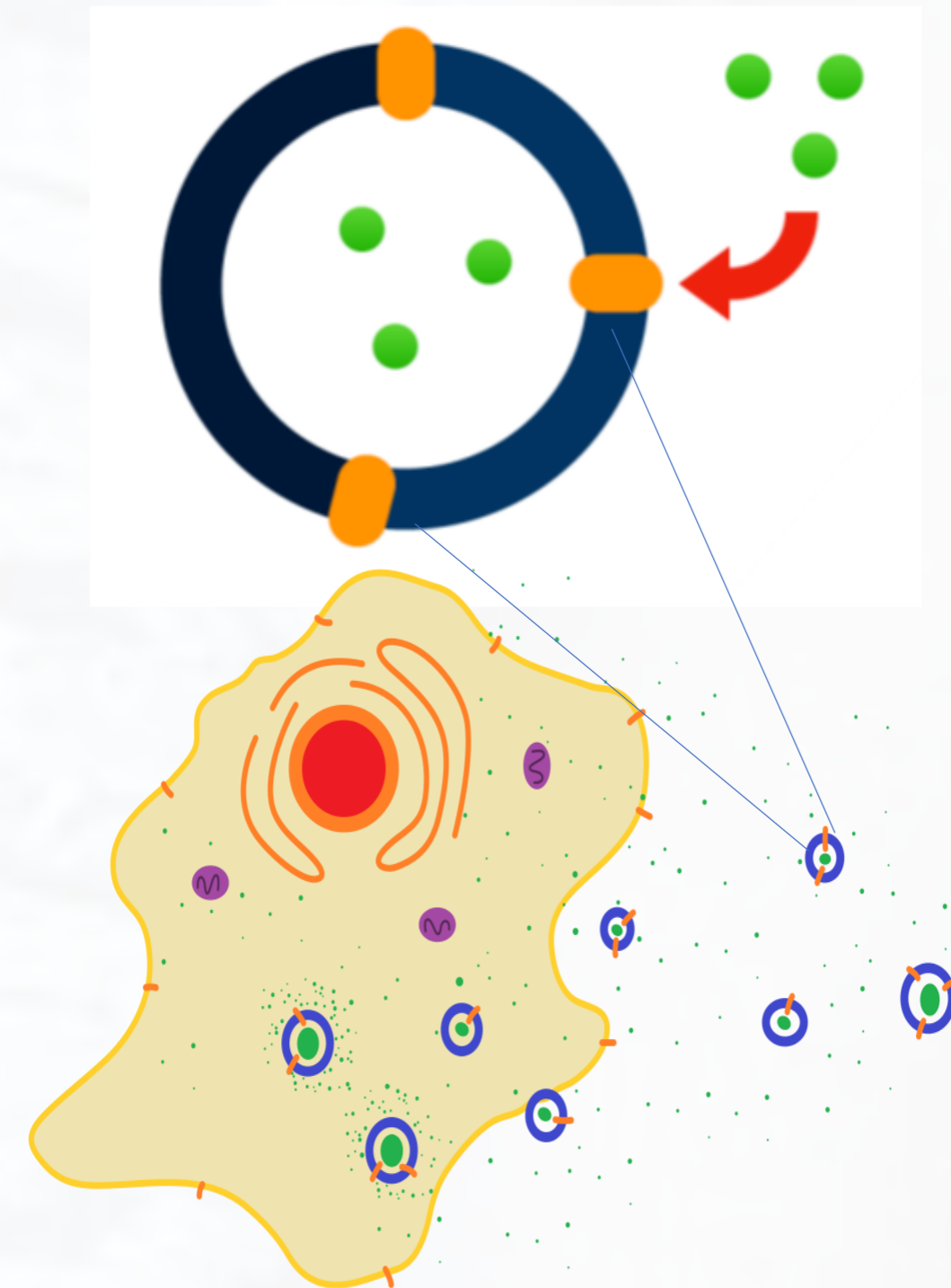
Ústav klinické a molekulární patologie Lékařské Fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

Úvod

V případě neurodegenerace dochází k glutamátové excitotoxicitě jeho nadměrným množstvím mimo nervové buňky. Excitotoxicita vede k apoptóze buněk a dalšímu vylití glutamátu ven z vezikul, čímž se uzavírá bludný kruh (Nickells, 2012).

Zvýšení aktivity či exprese astrocytárního proteinu EAAT2 je neuroprotektivní (Kong et al., 2014).

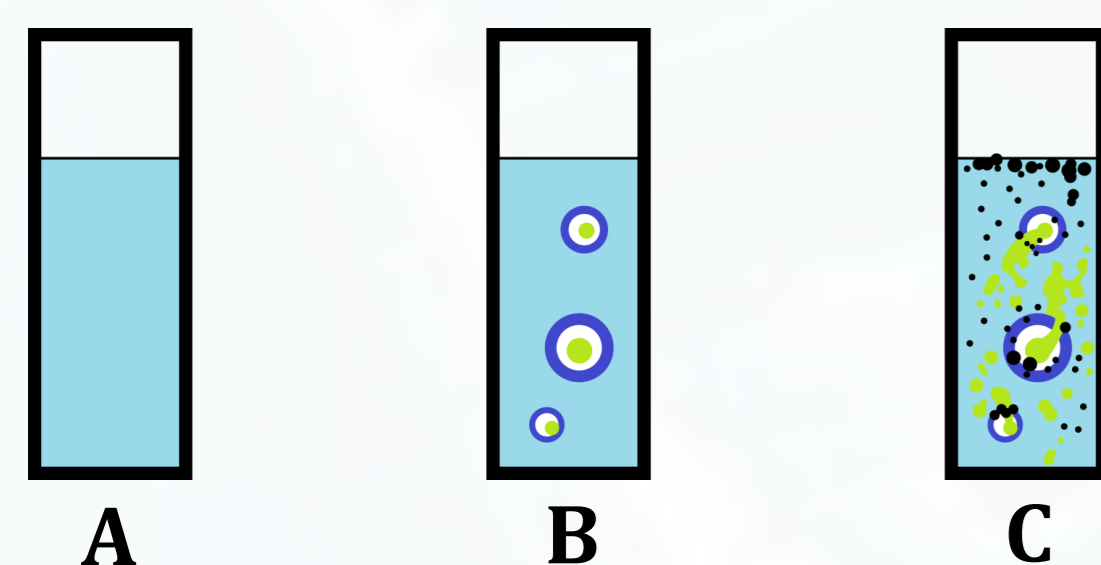
Léčba pomocí liposomů s inkorporovaným funkčním EAAT2 by mohla být neuroprotektivní.



Obr. 1: Model liposomu s inkorporovaným EAAT2 pohlcující glutamát a jeho následná fagocytace gliovou buňkou.

Metodika

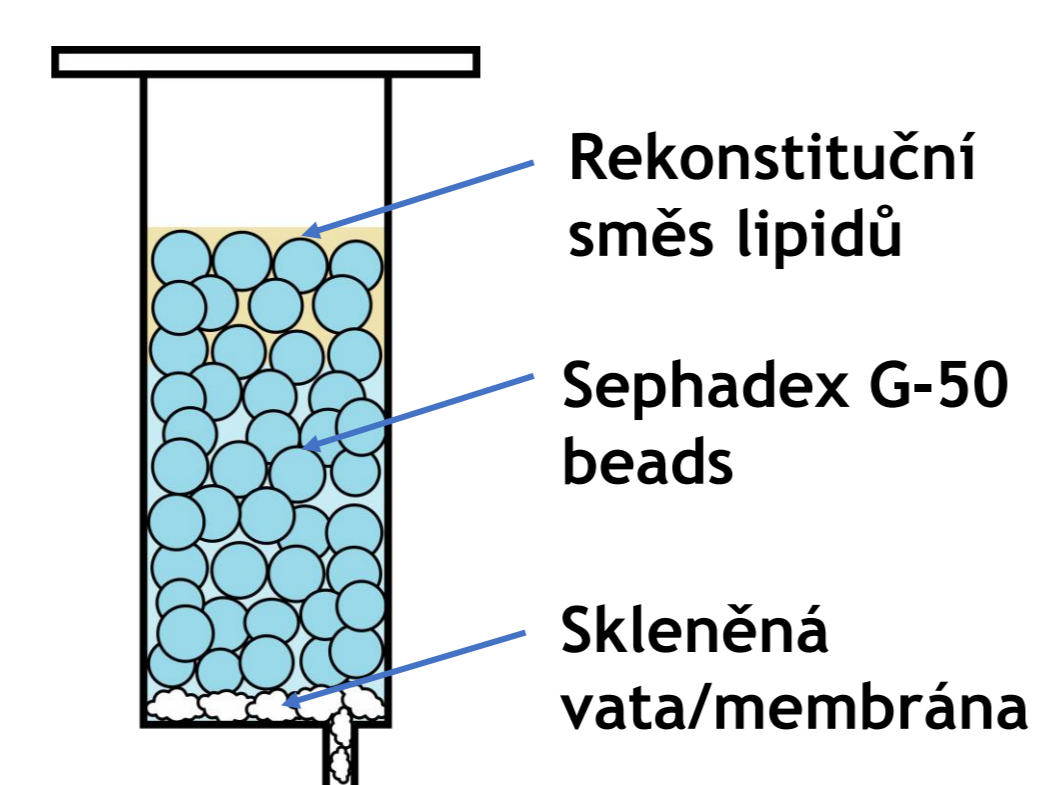
- Liposomy byly připraveny **gelovou chromatografií pomocí Sephadexu G-50** nasáklého interním médiem liposomů.
- Retence interního média** liposomy byla sledována **sondou SPQ**, která zhasne při styku s Cl⁻ v externím médiu po lýze liposomů pomocí Triton X-100. **Pokles fluorescence zaznamenán spektrometrem (Obr. 2).**
- Membrána liposomů** popsána Ramanovým spektrem a pomocí **Raman imaging**. Kvalitativní rozlišení membrány clusteringem spekter.
- EAAT2** byl izolován v supernatantu potkaních mozků centrifugací (39 000 × g, 20 min, 4°C) a **prokázán analýzou Western-blot** (Li-Cor) chemiluminiscenčního substrátu SuperSignal West-Dura via HRP konjugované protilátky.
- Dvoustupňová imunodetekce validovaná** pozitivní kontrolou (SH-SY5Y, U87, HeLa) a negativní kontrolou (A173).



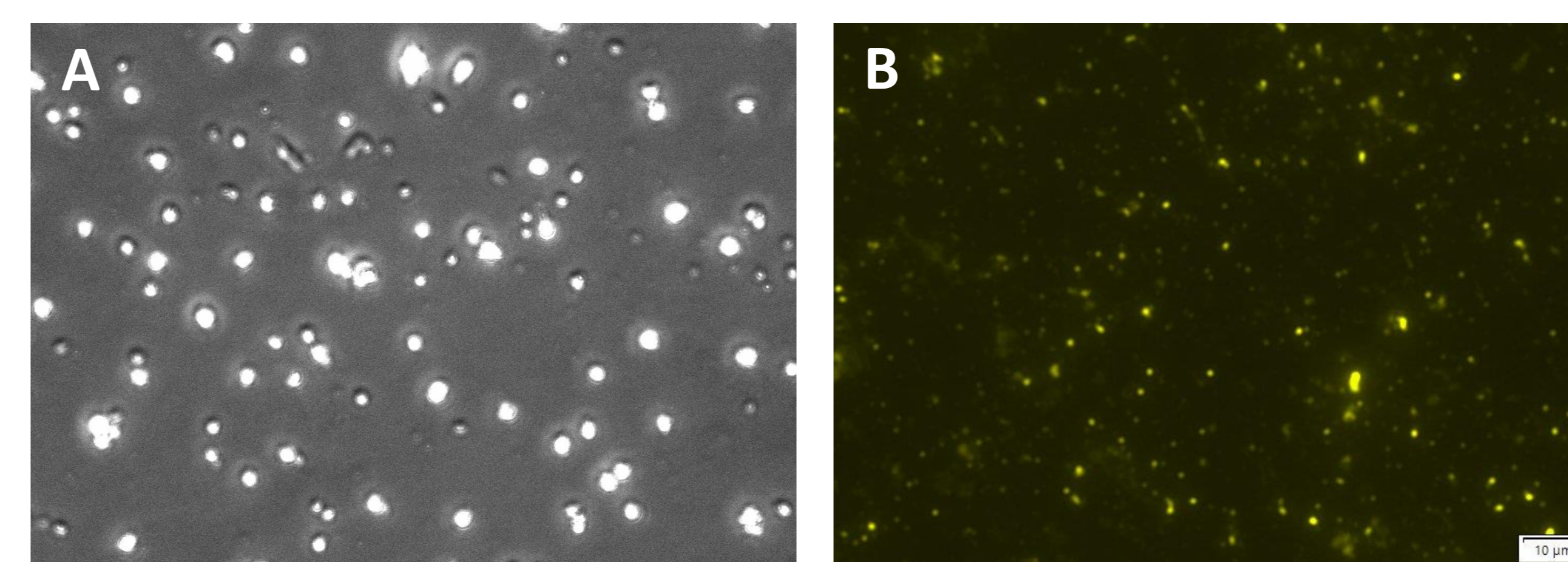
Obr. 2: (A) Kyveta bez liposomů, bez fluorescence. (B) Přidáním liposomů s SPQ, fluorescence ↑. (C) Cílená lýza liposomů a uvolnění SPQ do zářecího média s Cl⁻, fluorescence ↓.

Výsledky

- Roztok lecitinu a porcine brain lipids (Avanti polar lipids) v kyselině cholové byl prohnán kolonou 5 ml Sephadexu G-50 (Obr. 3.) a tím opakovaně **připraveny liposomy o velikosti ≤20μm (Obr. 4).**
- Western-blot analýza prokázala **přítomnost EAAT2** (Obr. 5.) pomocí polyklonální protilátky anti-EAAT2 (#3838, Cell Signalling).



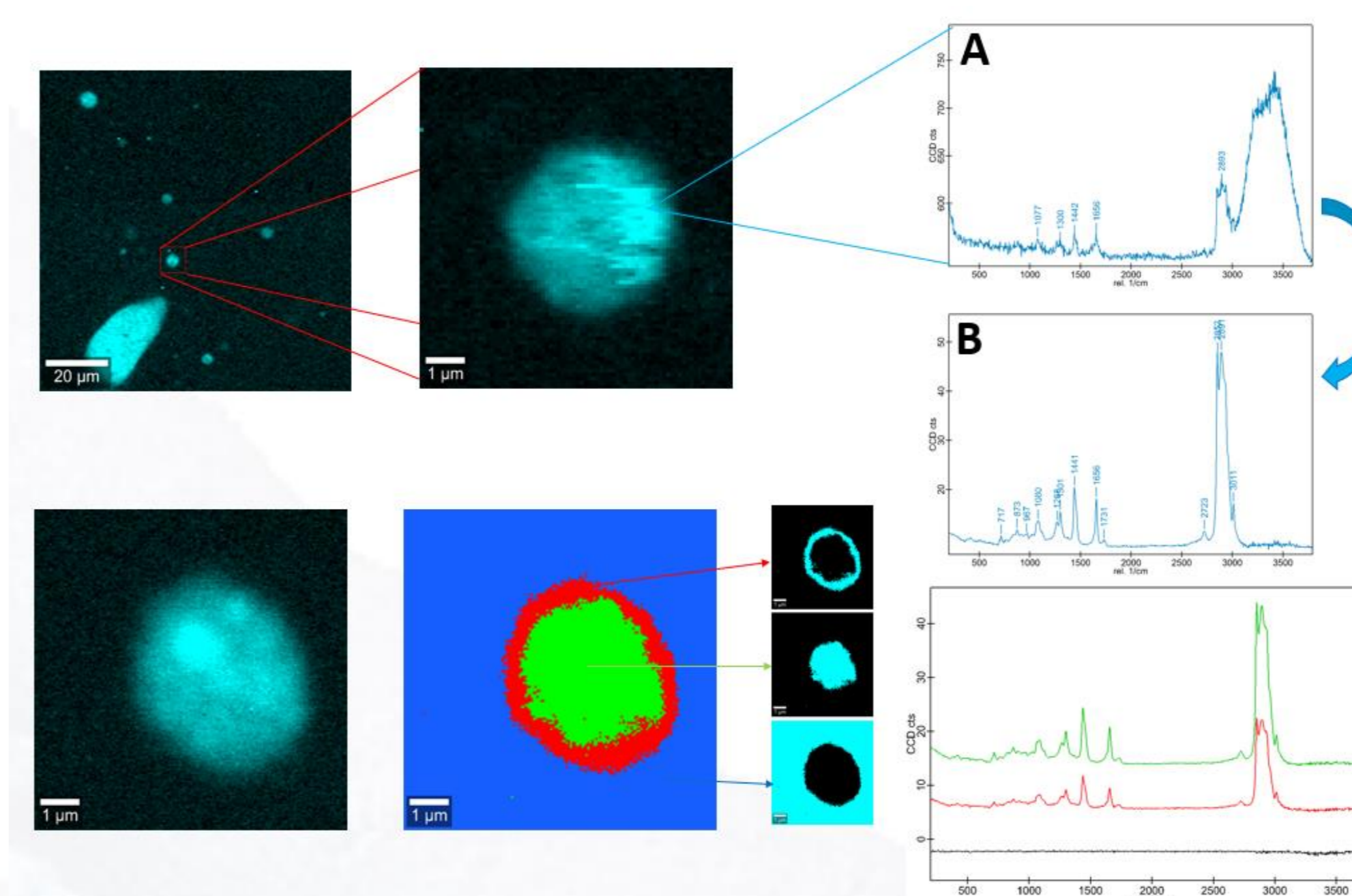
Obr. 3: Gelová chromatografická kolona z injekční stříkačky.



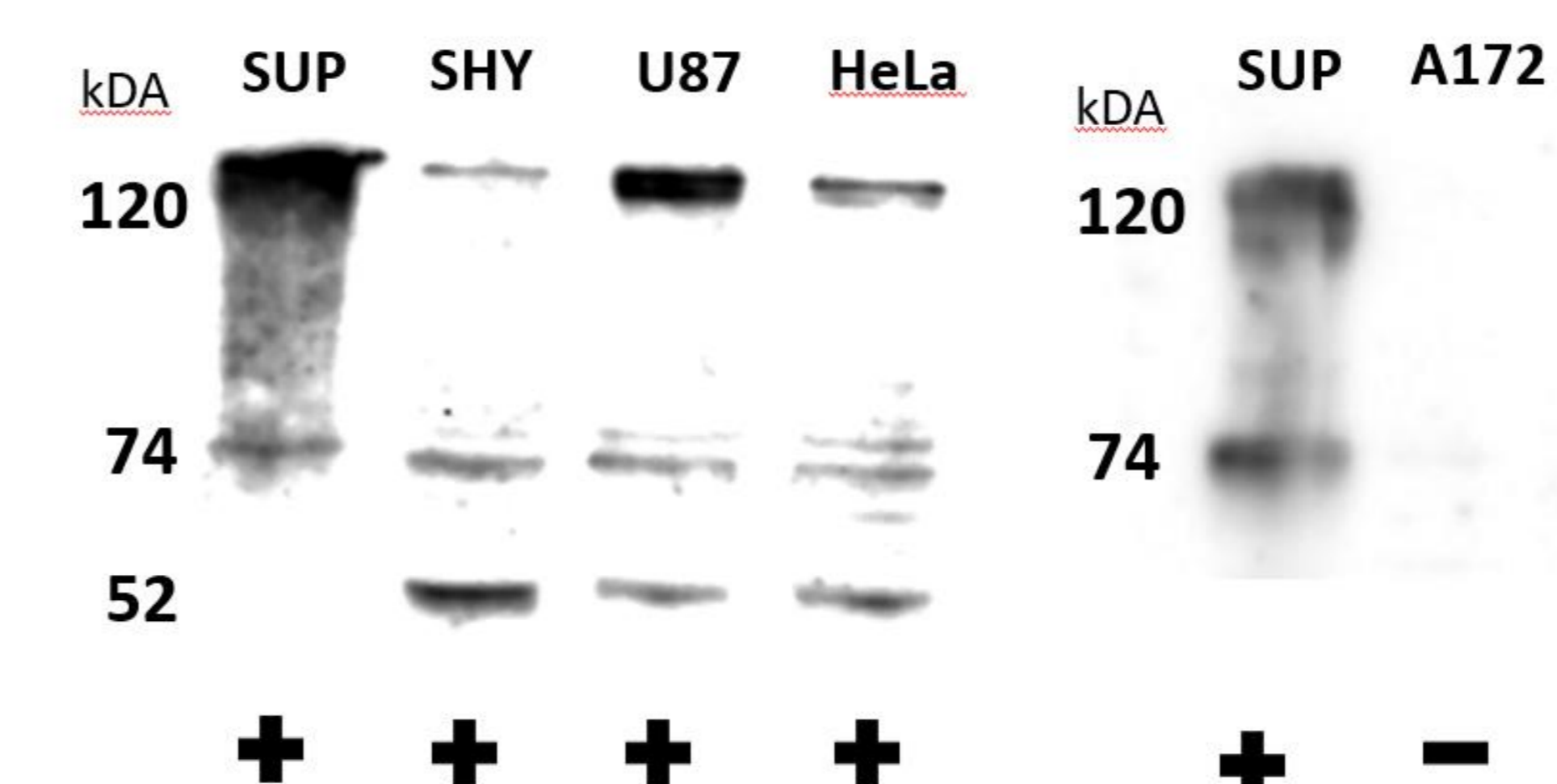
Obr. 4: Pozorování liposomů (A) v zástinu, (B) barvení membrány pomocí Dil (Thermo-Fisher).

- Třetí den došlo k výraznému poklesu fluorescence** následkem spontánní degradace liposomů. Trvanlivost liposomů je tudíž nanejvýš tři dny (Obr. 6).

- Bylo stanoveno Ramanovo spektrum lipidové membrány liposomů imobilizovaných v „low-melting point agarose“. **Analýza spekter multilamelaritu prokázala některých liposomů (Obr. 7).**



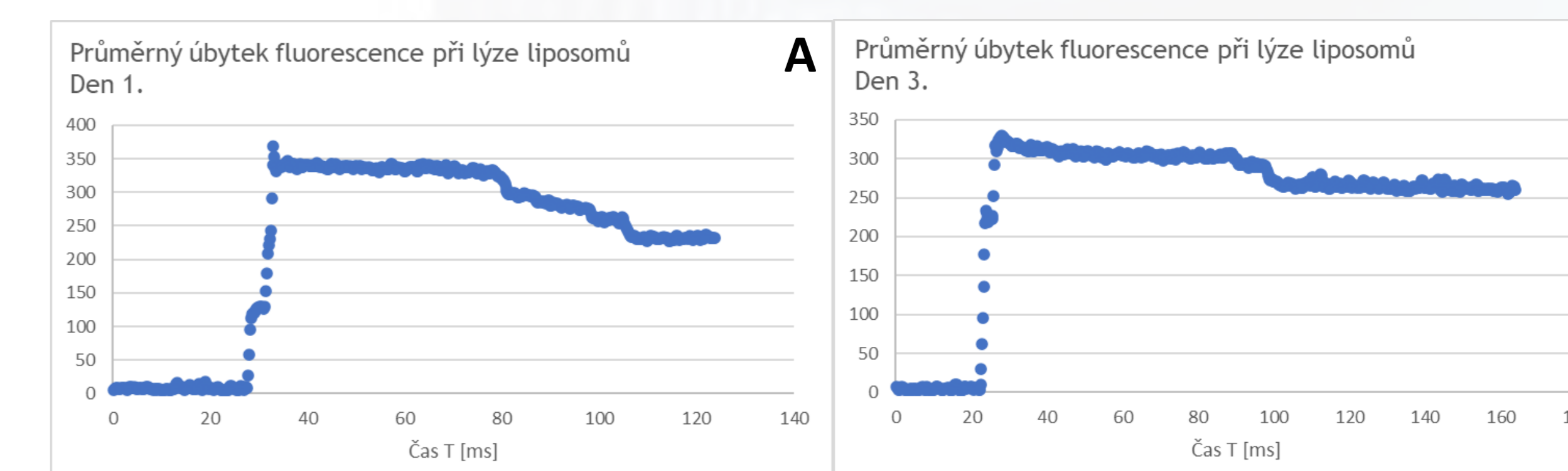
Obr. 7: Raman imaging liposomů a změření Raman spektra a jejich lipidové membrány.



Obr. 5: Supernatant potkaních mozků (SUP) a pozitivní kontroly buněčných linií SH-SY5Y (SHY), U87, HeLa s koherentními bandy 120-52 kDa. Negativní kontrola A172 bez signálu. Bandy SUP vykazují masivní emisi signálu.

Závěr

- Byla vyvinuta **metodika syntézy liposomů** z lecitinu a vepřových mozkových lipidů.
- Liposomy jsou pro potřeby měření a udržení vnitřního média **stabilní nanejvýš 2-3 dny**.
- Liposomy je možné úspěšně imobilizovat v low-melting point agarose aniž by došlo k jejich poškození.
- Byla ověřena **spolehlivá metoda imunodetekce EAAT2** s možností použití pro imunohistochemii a flow-cytometrii liposomů.
- Transport značeného glutamátu liposomy bude zřejmě možné ověřit pomocí Raman imaging.



Obr. 6: Průměrný pokles fluorescence SPQ při lýze liposomů pomocí Triton X-100 v den 1. (A) den 3. (B).

Poděkování

Srdečně děkuji prof. Martinu Modrianskému Ph. D. za pomoc při odborném a technologickém řešení metodiky syntézy liposomů. Děkuji za štědrý dar Ústavu farmakologie v podobě potkaní mozkové tkáně. Velice děkuji Mgr. Vlastimilu Maškovi Ph. D. za snímky Raman imaging liposomů, které otevřely dveře nové metodice.

Zdroje

- ZHOU, Y., X. WANG, A. V. TZINGOUNIS, N. C. DANBOLT a H. P. LARSSON. EAAT2 (GLT-1; slc1a2) Glutamate Transporters Reconstituted in Liposomes Argues against Heteroexchange Being Substantially Faster than Net Uptake. *Journal of Neuroscience* [online]. 2014, 34(40), 13472-13485 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.2282-14.2014
- NICKELLS, Robert W. The Cell and Molecular Biology of Glaucoma: Mechanisms of Retinal Ganglion Cell Death. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* [online]. 2012, 53(5) [cit. 2022-04-18]. ISSN 1552-5783. Dostupné z: doi:10.1167/iovs.12-948h
- KONG, Qionghan, Ling-Chu CHANG, Kou TAKAHASHI, et al. Small-molecule activator of glutamate transporter EAAT2 translation provides neuroprotection. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2014, 124(3), 1255-1267 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI66163