

Raport științific final (2022 - 2024)

(max. 25 pag)

Competiția:	Proiect experimental demonstrativ - PED2021
Nr. contract:	618 PED din 21/06/2022
Cod proiect:	PN-III-P2-2.1-PED-2021-2241
Domeniul de cercetare:	MEDICINA
Titlul :	Reducerea neuroinflamației și afectării cognitive induse de Aβ pe un model de șoricel tip APP/PS1 având ca și țintă protein kinaza 2 activată de MAPK
Acronim:	NeuroMAP Aβ
Data începere proiect:	21.06.2022
Data finalizare proiect:	20.06.2024
Durata (luni):	24 luni
Buget total:	598.331
Sursa 1 Bugetul de stat	UEFISCDI
Sursa 2 Alte surse atrase (cofinanțare):	-
Pagina web proiect:	https://umfst.ro/universitate/departament-proiecte-europene/proiecte/cercetare/fonduri-nationale/uefiscdi/neuromap/
Instituția coordonatoare:	UMFST „G.E.PALADE”
Director de proiect:	Prof.univ.dr. MARK A. SLEVIN
Partener 1 proiect (P1):	-
Partener n proiect (Pn):	-

- 1. Prezentarea generală a obiectivelor ale proiectului, cu punerea în evidență a rezultatelor și gradul de realizare a obiectivelor. Prezentarea trebuie să includă explicații care să justifice diferențele (dacă există) dintre activitățile preconizate și cele realizate.**

Boala Alzheimer (AD) este o tulburare neurodegenerativă a creierului caracterizată printr-un declin progresiv al funcțiilor cognitive și o autonomie redusă prin deteriorarea celulelor neuronale și a rețelelor lor. Boala Alzheimer a fost atribuită în principal acumulărilor extracelulare de proteine amiloid β (Aβ) pliate anormal care polimerizează și agregă formând plăci precipitate sau oligomeri solubili circulanți. Având în vedere fenotipul patologic, în ultimele decenii, accentul cercetării a vizat agresiv beta-amiloidul pentru dezvoltarea terapiei care modifică boala. În consecință, medicamentele care elimină amiloidul ar oferi un beneficiu incremental pentru a întârzia, eventual, progresia degenerării în cel mai bun caz. Cu toate acestea, există încă o nevoie presantă de a viza și de a înțelege debutul bolii Alzheimer, în timp ce dovezile contradictorii susțin alte ținte etiopatogenice, poate concordante, ca posibile cauze ale bolii Alzheimer[1,2].

Cascada de semnalizare mGluR-p38-MK2 este crescută la șoarecele APPswe/PS1dE9 (APP/PS1), un model neurodegenerativ de șoarece de Alzheimer, deoarece acumularea de oligomeri solubili A β formează o schelă extracelulară pentru mGluR5, restricționând difuzia laterală în membrană, ducând la gruparea receptorului și activarea crescută.

Studiile clinice vizează mGluR5, cu toate acestea, au demonstrat efecte secundare severe, sugerând că, pentru a inversa deficiențele cognitive, este necesar să se vizeze moleculele de semnalizare în aval în cascadă [3,4,5]. Proteina kinază 2 activată de MAPK (MK2) este o componentă importantă a cascadei de semnalizare care leagă receptorii glutamatului metabotropic din grupul de activare 1 (GI-mGluR1/5) de endocitoza receptorilor AMPA de tip glutamat din membrana postsinaptică care duce la inducerea depresiei pe termen lung GI- mGluR (mGluR-LTD) în hipocamp [6,7]. În plus, semnalizarea p38-MK2 este esențială pentru exprimarea producției factorului de necroză tumorală alfa (TNF α) și regulatorul cheie al factorilor proinflamatori [8,9].

Pentru acest proiect am folosit inhibarea kinazei MK2 de tip sălbatic (WT), APP / PS1 la șoarece APP / PS1 pentru a investiga rolul cascadei de semnalizare mGluR-p38-MK2 pentru a controla inflamația sistemică în timpul progresiei bolii AD.

Obiectivele noastre au fost: Crearea unui model murin de neurodegenerare transgenică modulată MK-2 și caracterizarea acestuia prin studii comportamentale riguroase, analize de proteine și histologie și imunohistochimie (IHC) - am reușit acest lucru în limitele proiectului

2. Prezentarea și argumentarea nivelului de maturitate tehnologică (TRL) la finalul proiectului

Proiectul a început la TRL3-Lucrările publicate de alții și de laboratorul nostru au furnizat dovezi puternice că cascada MK2 este un mecanism molecular cheie care reglează LTD-ul mediat de mGluR și funcția cognitivă la șoarecii de tip sălbatic. Datele pilot in vitro au confirmat acest lucru, arătând că amplitudinea LTD-mGluR este amplificată în CA3 și că in vivo, generarea unui nou șoarece modificat genetic, unde MK2 a fost eliminat în APP/PS1, a părut să încetinească procesul degenerativ.

TRL-ul final al proiectului este 4 și acest lucru este susținut de ipoteza proof-of-concept propusă și identificată aici și de rezultatele studiului pre-clinic. Am demonstrat că inhibarea activității MK2 in vivo a fost suficientă pentru a încetini deficitele cognitive observate la modelul de șoarece APP/PS1 de AD. De asemenea, am arătat că activitatea p38 MAPK și MK2 a fost crescută în țesutul cerebral ex-vivo obținut de la șoareci mutați, dar aceasta a fost redusă în prezența inhibitorului MK2, în timp ce inhibitorul a protejat parțial șoarecii împotriva dezvoltării defectelor comportamentale.

În viitor, munca va avansa către TRL5 cu dezvoltarea de medicamente și potențiale studii clinice

3. Gradul de atingere a rezultatelor estimate (prezentarea produsului/tehnologiei sau a serviciului rezultat al proiectului)

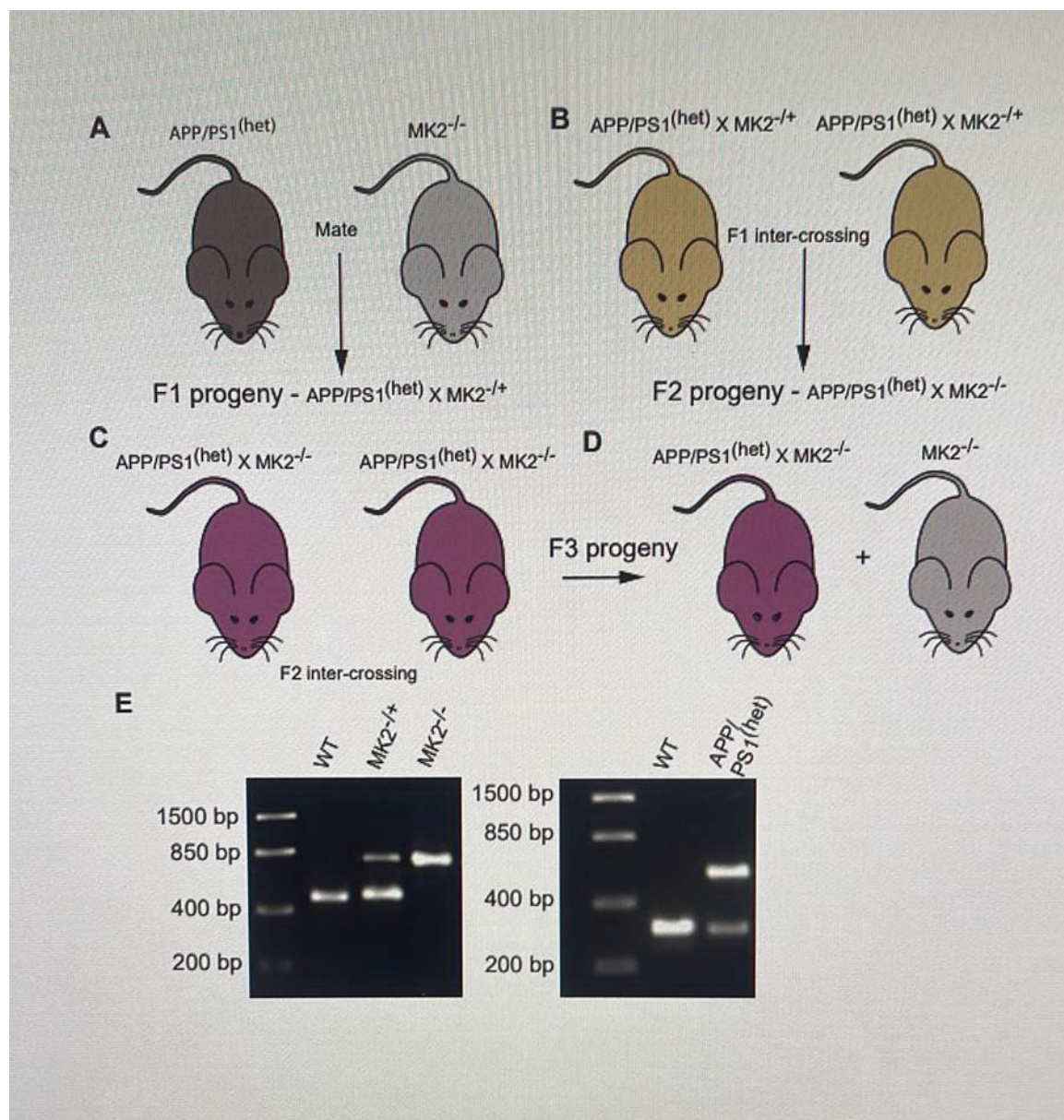
Generarea și întreținerea modelelor Murine ale bolii Alzheimer (APP / PS1):

Șoarecii APP / PS1-/- au fost furnizați inițial de Clinica Mayo, Arizona, SUA în decembrie 2022. După perioada de carantină, șoarecii au fost încrucișați cu WT (wilde type – varietatea sălbatică de la Institutul Cantacuzino) și genotipați, așa cum a indicat compania. Am reușit să obținem o cohortă de 25 de șoareci APP / PS1 (9M și 16F); șoarecii au fost ținuti în

heterozigoză. Șoarecii au fost crescuți în condiții sterile (cuști IVC –individual ventilated cages). Principalele sarcini din primul an sunt/au fost prezentate mai jos cu exemple

Dezvoltarea coloniilor de șoareci

Dezvoltarea coloniei a durat mai mult decât se anticipase [datorită sensibilității lor extreme la condițiile de mediu și temperatură / umiditate, precum și a numărului mai mic de șoareci mutanți decât se aștepta pe rundă de reproducere; prin urmare, timpul necesar pentru a ajunge la vârsta de 7 luni și $n = 11$ pe grup] - așadar, studiile comportamentale au început în octombrie 2023 și au fost finalizate până în luna 20 a proiectului.



După cum se arată în figura de mai sus - este descrisă metoda de dezvoltare a coloniilor murine (rețineți modificarea metodologiei - se va utiliza injectarea IV a inhibitorului MK2 în locul șoarecelui mutant $-/-$). I.P. nu I.V. (intraperitoneal nu intravenos)

1. Cuști IVC (cuști ventilate individual)



Mentținerea lotului APP/PS1

2. Cuști convenționale



Mentținerea lotului martor (WT)

Anestezia și marcarea șoricilor cu clips auricular

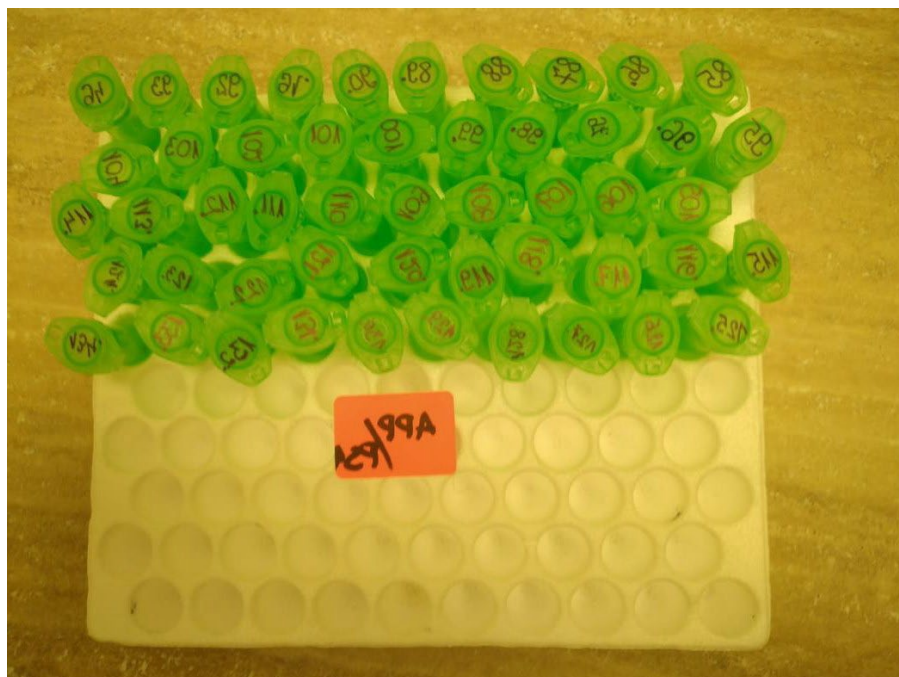


Anestezie inhalatorie pe mască cu izofluran și marcarea șoarecilor cu clips auricular.



Marcarea șoarecilor din grupul martor (WT) atât prin clips auricular cât și marcaj caudal pentru o identificare mai ușoară pe perioada testelor comportamentale.

Genotiparea coloniilor de șoareci



Colectarea probelor de țesut auricular în vederea genotipării

Genotipare APP1

Izolarea ADN-ului s-a realizat din fragment de țesut provenit din codița sau urechiușa șoarecelui, utilizându-se kitul PureLink Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, USA). Pentru genotipare s-a utilizat o reacție de polimerizare în lanț (PCR) de tip multiplex pentru gena APP respectiv pentru gena primerii utilizați fiind:

Primer antisens control_Rev_GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC

ATC C Primer sens APP_Fw_AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG

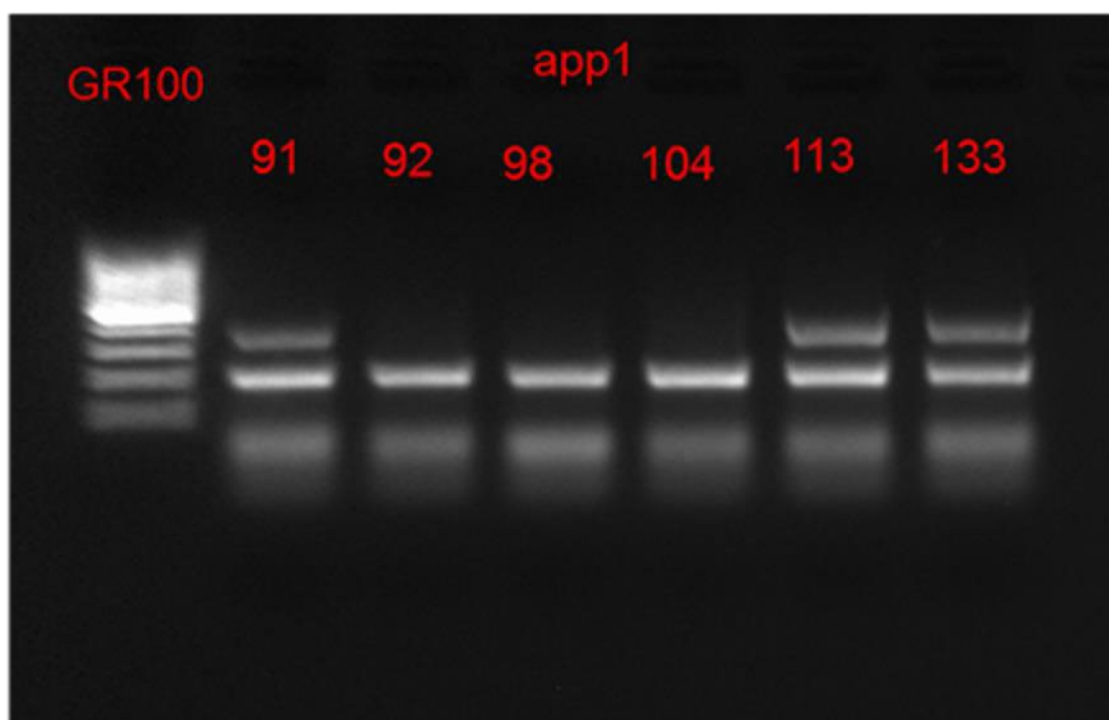
Primer antisens APP_Rev_CGG GGG TCT AGT TCT GCA T

Primer sens control APP_Fw_CAA ATG TTG CTT GTC

TGG TG

Primer antisens control APP_Rev_GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT

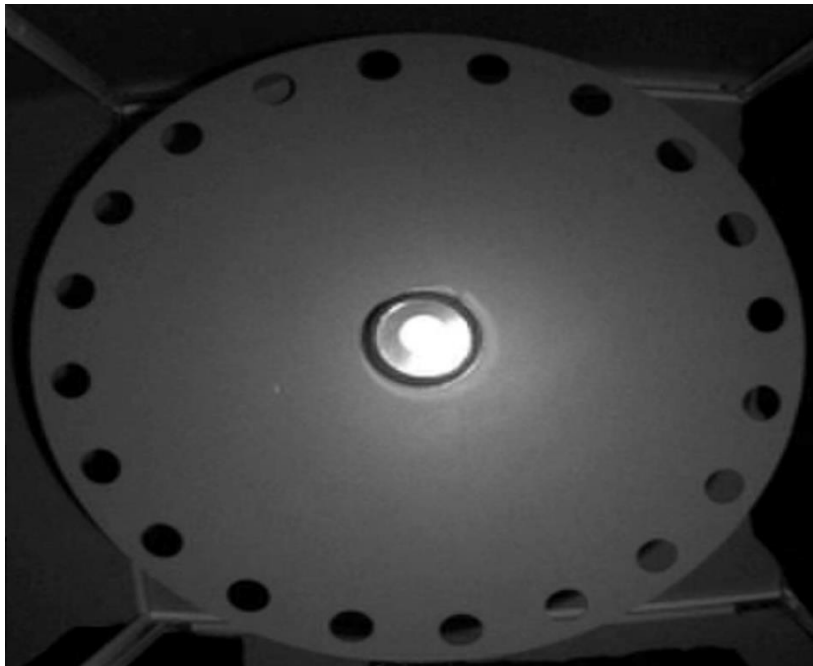
Pentru vizualizarea produsilor de amplificare s-a realizat o electroforeză în gel de agaroză 2%, folosind agaroză TopVision (Thermo Scientific, USA).



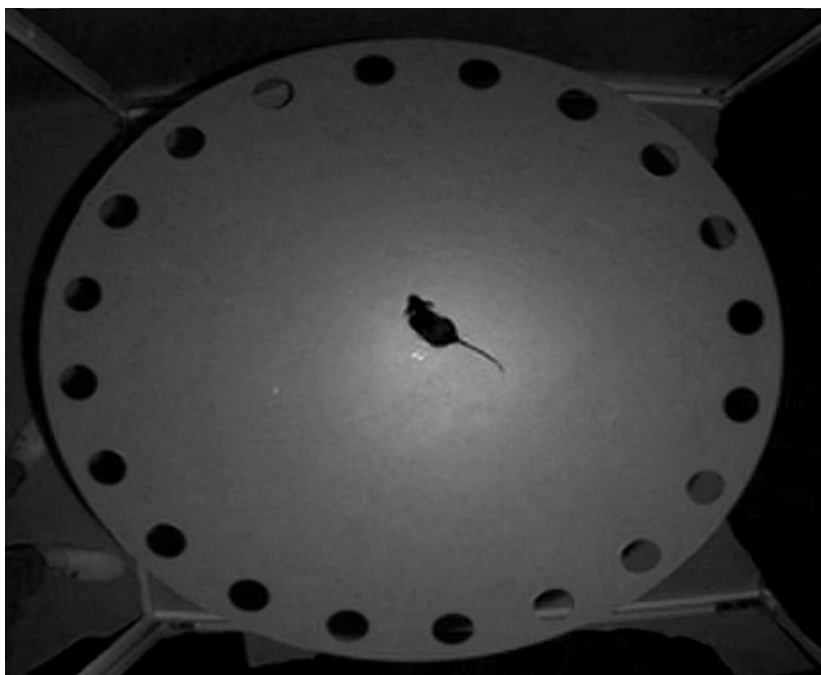
Pentru animalele de tip “wild-type” (nemodificate genetic) se evidențiază o singură bandă (probele cu cifrele 92, 98, 104), șoarecii transgenici prezintă 2 benzi (probele cu cifrele 91, 113, 133). GR100=marker de greutate moleculară 100pb

Teste comportamentale, optimizare preliminară și testare la lotul martor (WT)

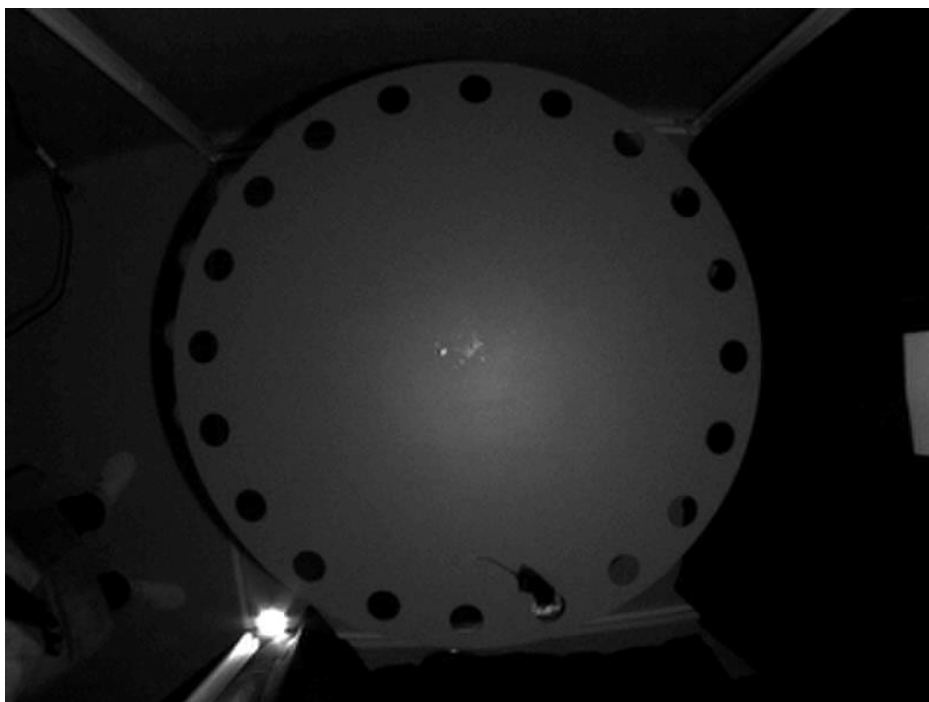
1. Barnes Maze



Începerea testului comportamental (șoarecele este plasat sub cutia opacă pentru a nu vedea traseul).



Ridicarea capacului și începerea învățării traseului.



Momentul când ajunge în ascunzătoare (cutie).

2. Rotarod Test



Pregătirea și anestezia pentru recoltarea creierului de la grupul martor (WT) și

APP/PS1

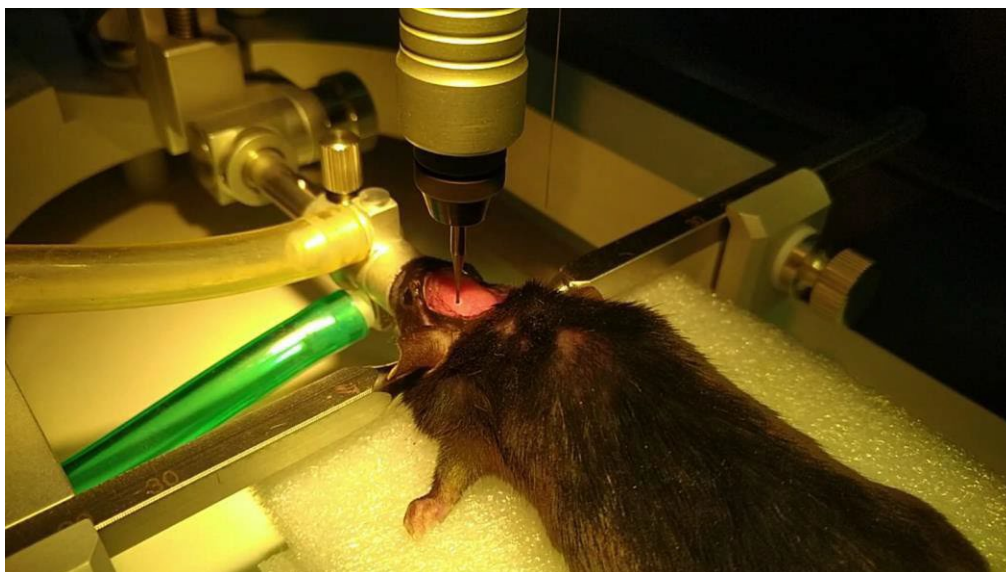


Aparat de anestezie inhalatorie cu isofluran + injectomat pentru PBS și Formol 4%



Șoarece anesteziat prin anestezie inhalatorie (isofluran) și injectare intracardiacă cu PBS pentru evacuarea sângelui din sistemul circulator și de la nivelul creierului, și injectarea intracardiacă cu Formol 4% pentru fixarea creierului

Încanularea stereotaxică la șoareci



s-a optat pentru injectarea intraperitoneală o dată la două zile timp de 4 săptămâni a inhibitorului MK2 (0.1ml/șoarece, i.p.) Eutanasierea șoarecilor din lotul martor (WT) și APP/PS1, pregătirea preliminară, conservarea și analiza morfologică a creierului în vederea testelor de imunohistochimie. Etapă finalizată la WP2.2 la această dată

In perioada Ianuarie-Iunie 2024:

Tratamentul cronic (injecții i.p.) cu PF 3644022 (MK2) sau vehicul a durat 4 săptămâni (30 mg/kgc tot la 2 zile. La sfârșitul tratamentului, 7 dintre șoarecii APP / PS1 au fost perfuzați cu paraformaldehidă (PFA) și creierul fixat pentru procesarea imunohistochimică. Șoarecii rămași au fost sacrificați prin luxație cervicală, iar creierul a fost colectat pentru analiza Western Blot.

Analiza țesutului cerebral

Analiza biochimică a țesutului hipocampal și cortexului frontal

Au fost utilizate pentru a măsura nivelurile de oligomeri A β 1-40 și A β 1-42, proteinele TNF α și IL-1 β , precum și nivelurile de fosforilare p38 MAPK și HSP27 (numai țesut) ca o citire funcțională complementară a acumulării A β și a inhibării MK2. Feliile de creier au fost colorate cu anticorpi disponibili în comerț pentru beta-amiloid și proteina adaptoare ionizată de calciu 1 (IBA-1).

Markerii pentru identificarea celulelor neuronale și microgliale au fost, de asemenea, utilizați.

Rezultatele au fost comparate pentru a evalua dacă tratamentul cronic cu inhibitor MK2 a fost capabil să reducă și / sau să prevină inflamația și impactul asupra progresiei bolii în modelul murin de Alzheimer.

1. Lotul în vârstă de șoareci APP/PS1 și șoareci WT

ID	Geno	SEX	DOB	Parents	MK2/Control
096	WT	M	14.11.2023	APP/PS1 083 x 063,065,066 F	MK2
097	WT	M	14.11.2023	APP/PS1 083 x 063,065,066 F	MK2
098	WT	M	14.11.2023	APP/PS1 083 x 063,065,066 F	MK2
102	WT	M	23.10.2023	APP/PS1 034 x 016 F	Control
106	WT	M	23.10.2023	APP/PS1 031 x 025,027 F	Control
108	WT	M	21.11.2023	APP/PS1 013 x 019,020 F	Control
119	WT	F	12.11.2023	APP/PS1 080 x 042,044,045 F	MK2
123	WT	F	15.11.2023	APP/PS1 081 x 064, 073 F	MK2
127	WT	F	27.09.2023	APP/PS1 028 x 029	Control
128	WT	F	23.10.2023	APP/PS1 031 x 025,027 F	MK2
133	WT	F	14.11.2023	APP/PS1 083 x 063,065,066 F	Control
138	WT	F	14.11.2023	APP/PS1 083 x 063,065,066 F	Control
103	APP/PS1	M	23.10.2023	APP/PS1 031 x 025,027 F	Control
104	APP/PS1	M	23.10.2023	APP/PS1 031 x 025,027 F	MK2
105	APP/PS1	M	23.10.2023	APP/PS1 031 x 025,027 F	Control
107	APP/PS1	M	23.10.2023	APP/PS1 031 x 025,027 F	MK2
112	APP/PS1	M	16.11.2023	APP/PS1 028 x 029 F	MK2
116	APP/PS1	M	12.11.2023	APP/PS1 080 x 042,044,045 F	Control
117	APP/PS1	F	12.11.2023	APP/PS1 080 x 042,044,045 F	MK2
118	APP/PS1	M	12.11.2023	APP/PS1 080 x 042,044,045 F	Control
120	APP/PS1	F	12.11.2023	APP/PS1 080 x 042,044,045 F	MK2
124	APP/PS1	F	15.11.2023	APP/PS1 081 x 064, 073 F	MK2
132	APP/PS1	F	14.11.2023	APP/PS1 083 x 063,065,066 F	Control
134	APP/PS1	F	14.11.2023	APP/PS1 083 x 063,065,066 F	MK2
136	APP/PS1	F	14.11.2023	APP/PS1 083 x 063,065,066 F	Control

2. Lotul tânăr de șoareci APP/PS1 și șoareci WT

ID	Geno	SEX	DOB	Parents	MK2/Control
166	WT	M	05.03.2024	APP/PS1 031 X 042,045 F	MK2
169	WT	M	05.03.2024	APP/PS1 031 X 042,045 F	MK2
173	WT	M	05.03.2024	APP/PS1 031 X 042,045 F	MK2
175	WT	F	28.01.2024	APP/PS1 125/126 x 124, WT 123 F	MK2
177	WT	F	28.01.2024	APP/PS1 125/126 x 124, WT 123 F	MK2
179	WT	M	28.01.2024	APP/PS1 125/126 x 124, WT 123 F	Control
181	WT	M	05.03.2024	APP/PS1 083 X 044,066 F	MK2
182	WT	M	05.03.2024	APP/PS1 083 X 044,066 F	Control
184	WT	F	05.03.2024	APP/PS1 080 X 064 F	Control
185	WT	F	05.03.2024	APP/PS1 080 X 064 F	Control
188	WT	M	05.03.2024	APP/PS1 080 X 064 F	Control
189	WT	M	05.03.2024	APP/PS1 080 X 064 F	Control
162	APP/PS1	F	05.03.2024	APP/PS1 031 X 042,045 F	Control
163	APP/PS1	F	05.03.2024	APP/PS1 031 X 042,045 F	Control
164	APP/PS1	F	05.03.2024	APP/PS1 031 X 042,045 F	MK2
180	APP/PS1	F	05.03.2024	APP/PS1 083 X 044,066 F	MK2
193	APP/PS1	F	06.03.2024	APP/PS1 112 X 132,134,136 F	MK2
194	APP/PS1	F	06.03.2024	APP/PS1 112 X 132,134,136 F	Control
170	APP/PS1	M	05.03.2024	APP/PS1 031 X 042,045 F	Control
171	APP/PS1	M	05.03.2024	APP/PS1 031 X 042,045 F	MK2
172	APP/PS1	M	05.03.2024	APP/PS1 031 X 042,045 F	MK2
183	APP/PS1	M	05.03.2024	APP/PS1 083 X 044,066 F	MK2
187	APP/PS1	M	05.03.2024	APP/PS1 080 X 064 F	MK2
190	APP/PS1	M	05.03.2024	APP/PS1 080 X 064 F	Control
191	APP/PS1	M	06.03.2024	APP/PS1 112 X 132,134,136 F	Control

3. Lotul de șoareci APP/PS1 pentru imunohistochimie(IHC)

ID	Geno	SEX	DOB	Parents	MK2/Control
154	APP/PS1	M	28.01.2024	APP/PS1 125/126 x 124, WT 123 F	MK2
155	APP/PS1	M	28.01.2024	APP/PS1 125/126 x 124, WT 123 F	Control
156	APP/PS1	M	28.01.2024	APP/PS1 125/126 x 124, WT 123 F	MK2
157	APP/PS1	F	28.01.2024	APP/PS1 125/126 x 124, WT 123 F	Control

158	APP/PS1	F	28.01.2024	APP/PS1 125/126 x 124, WT 123 F	MK2
159	APP/PS1	F	28.01.2024	APP/PS1 125/126 x 124, WT 123 F	MK2
095	APP/PS2	M	14.11.2024	APP/PS1 083 X 063,065,066 F	Control

Lotul de șoareci în vârstă



Lotul de șoareci tineri și lotul de șoareci pentru IHC



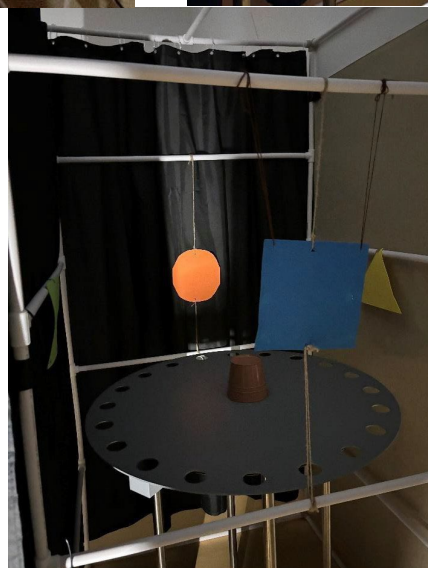
Substanțele utilizate pentru injectare (MK2 /Control)



Injectarea cu MK2 /Control a șoarecilor APP/PS1 și a șoarecilor WT



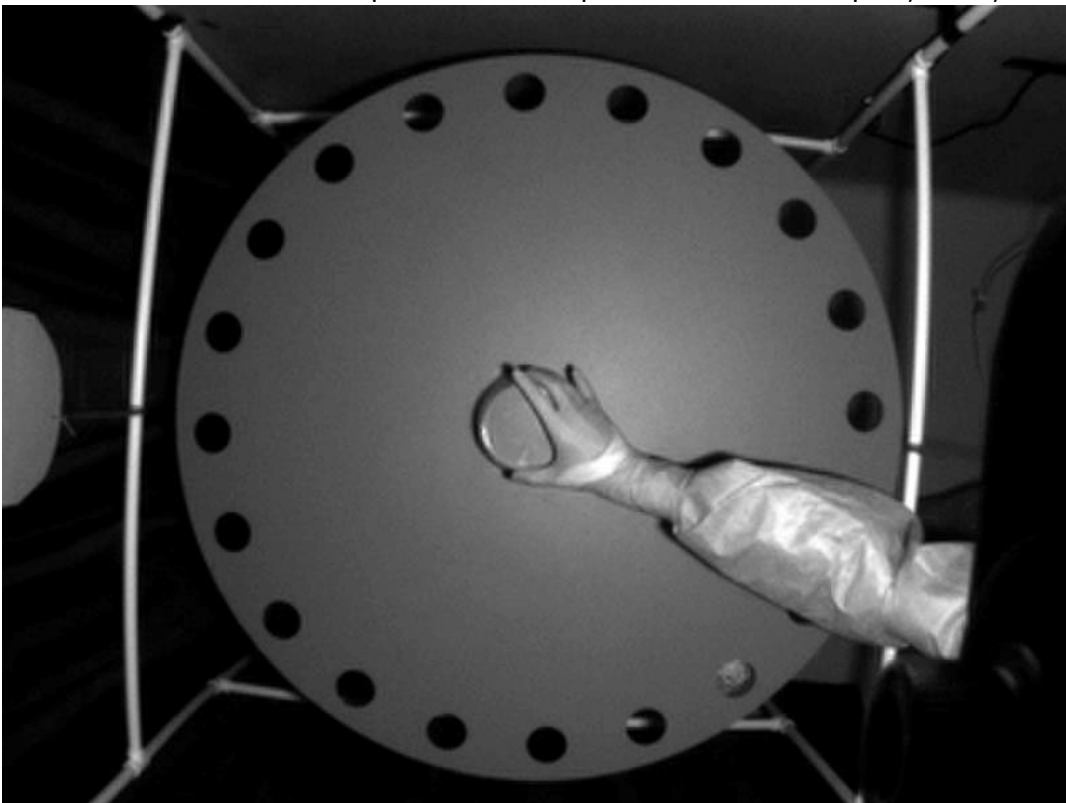
Testul comportamental - Barnes Maze



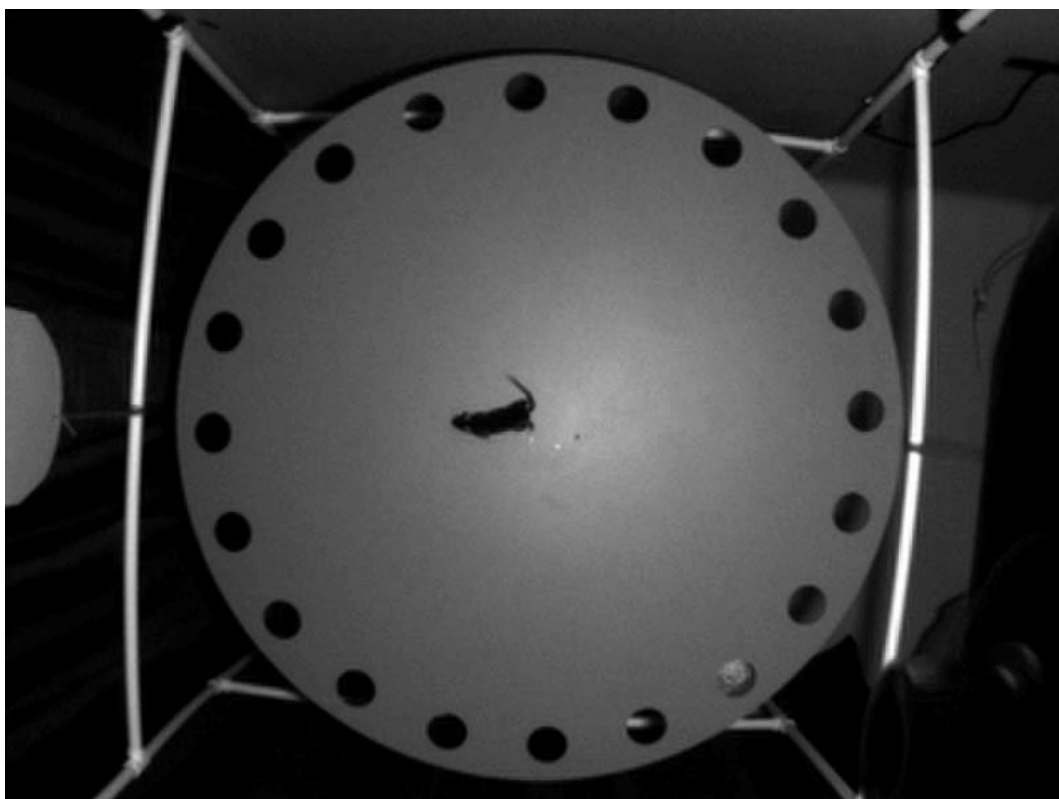
Începerea testului comportamental, în întuneric, prin plasarea șoarecelui sub cutia opacă pentru a nu vedea traseul.



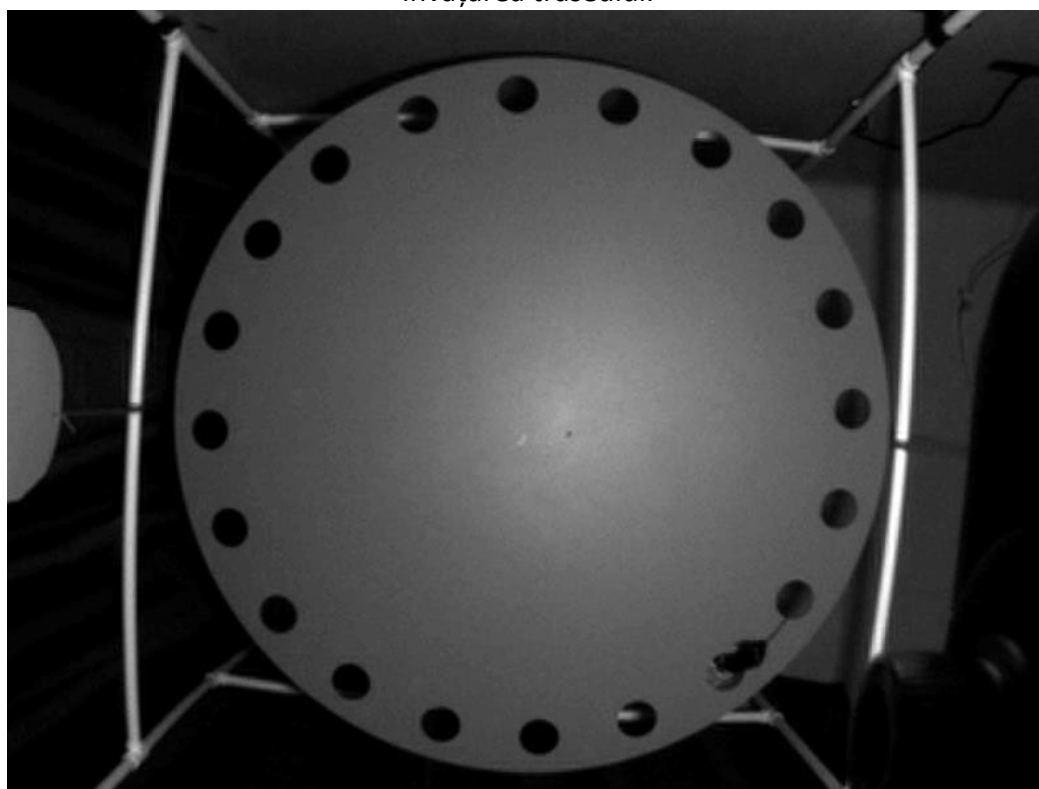
Aprinderea unei surse de lumini puternice deasupra mesei unde este poziționat șoarecele.



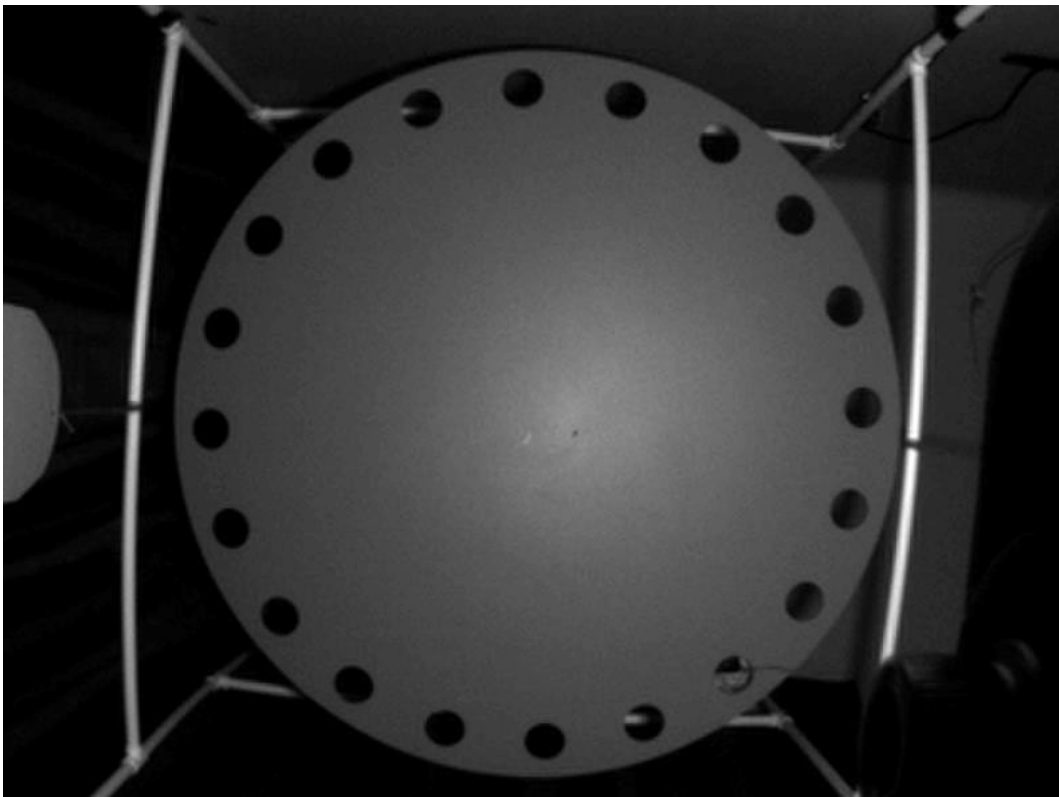
Ridicarea capacului și începerea învățării traseului.



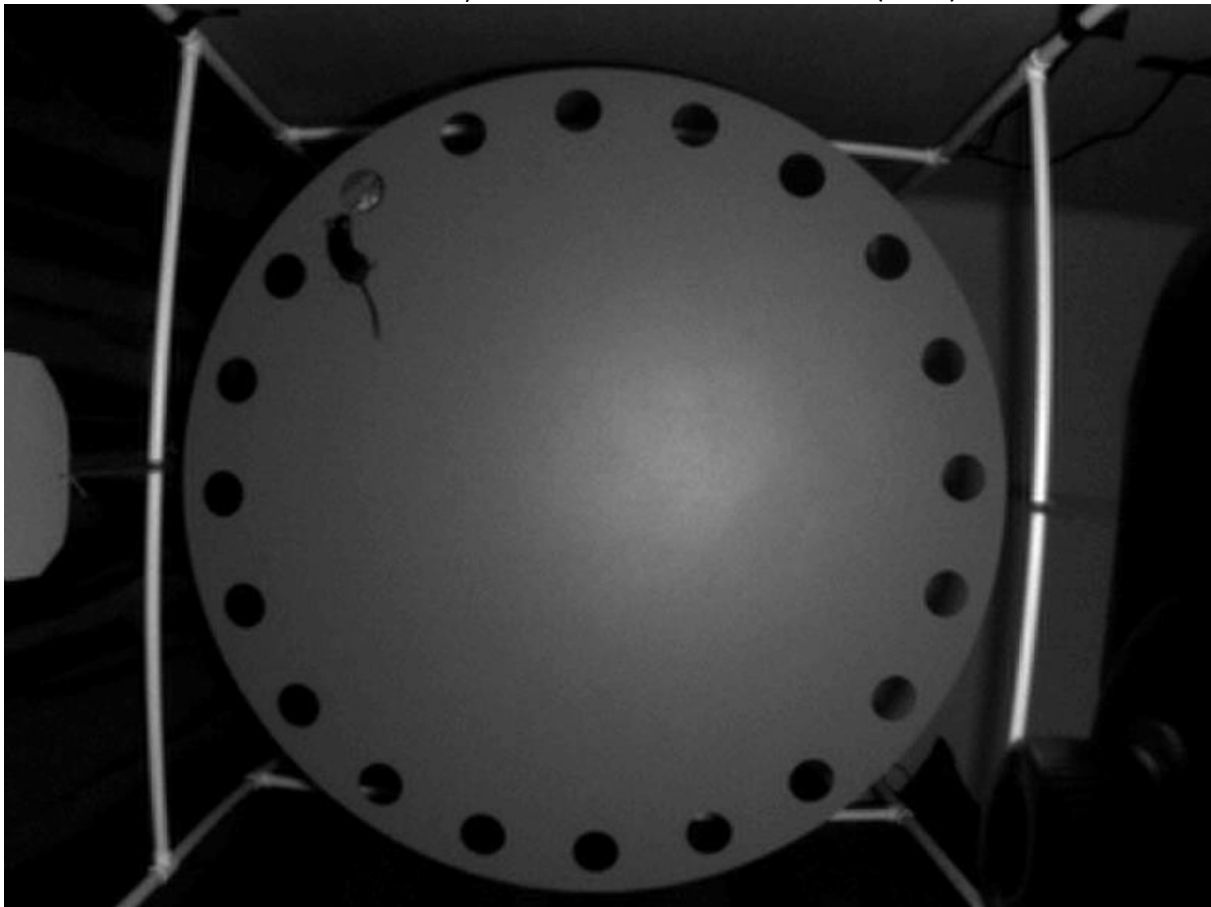
Învățarea traseului.



Momentul când șoarecele găsește ascunzătoarea (cutia).



Momentul când șoarecele intră în ascunzătoare (cutie).



Rotirea mesei la 180° după 10 zile de învățare a traseului initial.

Timpii fiecărui șoarece APP/PS1 și șoarece WT din lotul în vârstă, în cele 15 zile de testare

ACQUISITION DAYS (10 zile)

NR.	ID	Geno	SEX	DOB	MK2/Control	ACQ DAY 1	ACQ DAY 2	ACQ DAY 3	ACQ DAY 4	ACQ DAY 5	ACQ DAY 6	ACQ DAY 7	ACQ DAY 8	ACQ DAY 9	ACQ DAY 10
M1	096	WT	M	14.11.2023	MK2	01:50	04:22	01:20	02:50	00:17	01:28	01:25	00:41	00:30	01:46
M2	097	WT	M	14.11.2023	MK2	06:00	06:20	02:20	02:11	01:47	00:50	02:36	02:00	01:57	01:50
M3	098	WT	M	14.11.2023	MK2	02:23	05:50	03:43	01:30	00:52	01:58	02:00	02:23	00:49	01:19
M4	102	WT	M	23.10.2023	Control	09:30	02:34	00:33	00:20	00:38	01:08	02:05	04:16	00:16	00:12
M5	106	WT	M	23.10.2023	Control	10:30	04:50	01:24	05:29	05:41	01:37	00:47	01:22	01:32	04:05
M6	108	WT	M	21.11.2023	Control	10:40	04:23	11:00	03:11	02:06	09:19	05:23	03:00	01:40	02:51
M7	119	WT	F	12.11.2023	MK2	11:20	00:30	07:55	00:30	00:20	08:05	07:02	06:41	02:43	04:46
M8	123	WT	F	15.11.2023	MK2	11:50	06:37	01:57	02:52	07:02	04:50	00:40	02:39	06:10	08:58
M9	127	WT	F	27.09.2023	Control	10:14	05:28	05:35	09:50	13:00	06:59	04:51	02:53	03:21	03:23
M10	128	WT	F	23.10.2023	MK2	10:40	11:00	10:20	01:57	08:27	01:10	00:57	00:14	00:17	02:16
M11	133	WT	F	14.11.2023	Control	03:25	00:47	01:39	00:24	01:30	00:27	00:30	00:52	00:13	01:24
M12	138	WT	F	14.11.2023	Control	04:45	02:51	01:23	02:31	02:18	00:56	00:47	00:50	01:27	00:20
M13	103	APP/PS1	M	23.10.2023	Control	04:20	10:45	01:32	03:02	00:57	04:16	02:06	02:49	06:50	07:45
M14	104	APP/PS1	M	23.10.2023	MK2	04:35	03:58	01:02	05:30	08:09	07:14	02:15	01:13	02:03	00:30
M15	105	APP/PS1	M	23.10.2023	Control	09:45	10:00	04:44	01:30	01:36	04:42	00:29	03:34	00:50	00:54
M16	107	APP/PS1	M	23.10.2023	MK2	02:20	01:40	00:44	00:55	01:57	01:15	00:19	02:12	07:38	04:28
M17	112	APP/PS1	M	16.11.2023	MK2	04:10	08:25	09:31	01:25	04:24	00:49	03:56	02:02	04:44	02:49
M18	116	APP/PS1	M	12.11.2023	Control	11:00	11:50	10:37	04:51	07:18	03:31	03:33	07:37	10:03	06:06
M19	117	APP/PS1	F	12.11.2023	MK2	11:00	08:50	02:31	00:20	01:41	00:30	00:20	00:14	03:20	00:37
M20	118	APP/PS1	M	12.11.2023	Control	03:20	02:23	00:14	00:30	00:13	02:28	01:11	01:21	00:27	00:15
M21	120	APP/PS1	F	12.11.2023	MK2	10:20	03:53	01:18	00:13	01:05	00:46	00:24	00:14	00:19	00:24
M22	124	APP/PS1	F	15.11.2023	MK2	05:45	10:55	11:49	04:50	08:47	14:15	04:42	02:14	06:02	02:30
M23	132	APP/PS1	F	14.11.2023	Control	01:50	10:10	03:54	03:00	06:24	03:58	00:15	01:17	01:52	05:14
M24	134	APP/PS1	F	14.11.2023	MK2	02:16	02:42	00:58	01:00	01:50	00:24	01:25	00:15	00:42	00:22
M25	136	APP/PS1	F	14.11.2023	Control	04:52	02:34	11:45	12:19	13:00	02:05	01:40	00:30	01:20	01:14

REVERSAL DAYS (5 zile)

NR.	ID	Geno	SEX	DOB	MK2/Control	REV DAY 1	REV DAY 2	REV DAY 3	REV DAY 4	REV DAY 5
M1	096	WT	M	14.11.2023	MK2	04:16	00:44	01:22	05:00	03:05
M2	097	WT	M	14.11.2023	MK2	01:42	01:28	00:30	00:47	00:17
M3	098	WT	M	14.11.2023	MK2	03:22	02:31	01:03	02:22	01:31
M4	102	WT	M	23.10.2023	Control	03:10	00:30	01:31	00:50	03:48
M5	106	WT	M	23.10.2023	Control	03:56	01:53	02:43	04:55	04:50
M6	108	WT	M	21.11.2023	Control	05:42	02:16	00:35	09:30	02:51
M7	119	WT	F	12.11.2023	MK2	02:28	01:47	05:15	09:29	02:50
M8	123	WT	F	15.11.2023	MK2	06:49	11:29	02:07	02:30	11:34
M9	127	WT	F	27.09.2023	Control	05:45	10:33	08:16	09:05	09:56
M10	128	WT	F	23.10.2023	MK2	01:55	01:45	00:43	03:40	00:30
M11	133	WT	F	14.11.2023	Control	03:30	00:30	00:17	00:32	01:00
M12	138	WT	F	14.11.2023	Control	01:07	00:47	02:03	01:13	00:20
M13	103	APP/PS1	M	23.10.2023	Control	07:23	08:25	08:32	01:38	04:16
M14	104	APP/PS1	M	23.10.2023	MK2	06:58	03:55	02:55	06:28	02:54
M15	105	APP/PS1	M	23.10.2023	Control	04:25	04:49	04:26	00:42	00:30
M16	107	APP/PS1	M	23.10.2023	MK2	02:38	01:06	02:59	01:15	02:06
M17	112	APP/PS1	M	16.11.2023	MK2	03:42	11:25	02:38	05:10	06:11
M18	116	APP/PS1	M	12.11.2023	Control	05:52	04:45	06:46	07:50	03:29
M19	117	APP/PS1	F	12.11.2023	MK2	03:57	00:45	00:22	00:23	00:29
M20	118	APP/PS1	M	12.11.2023	Control	00:33	01:15	00:33	00:30	00:23
M21	120	APP/PS1	F	12.11.2023	MK2	00:18	00:10	00:47	00:59	00:14
M22	124	APP/PS1	F	15.11.2023	MK2	02:09	03:12	01:55	08:17	01:42
M23	132	APP/PS1	F	14.11.2023	Control	01:26	01:04	03:46	02:50	02:03
M24	134	APP/PS1	F	14.11.2023	MK2	02:58	01:01	01:40	01:15	00:31
M25	136	APP/PS1	F	14.11.2023	Control	10:48	00:50	01:09	00:50	01:08

Timpii fiecărui șoarece APP/PS1 și șoarece WT din lotul tânăr în cele 15 zile de testare
ACQUISITION DAYS (10 zile)

NR.	ID	Geno	SEX	DOB	Drug/Control	ACQ DAY 1	ACQ DAY 2	ACQ DAY 3	ACQ DAY 4	ACQ DAY 5	ACQ DAY 6	ACQ DAY 7	ACQ DAY 8	ACQ DAY 9	ACQ DAY 10
M51	166	WT	M	05.03.2024	Drug	620	610	619	610	315	503	17	197	295	208
M52	169	WT	M	05.03.2024	Drug	630	644	213	397	619	283	419	266	318	333
M53	173	WT	M	05.03.2024	Drug	610	234	499	581	396	590	202	290	334	258
M54	175	WT	F	28.01.2024	Drug	536	542	630	620	720	319	248	226	616	280
M55	177	WT	F	28.01.2024	Drug	90	627	590	537	629	318	577	620	404	382
M56	179	WT	M	28.01.2024	Control	503	608	191	580	359	263	297	350	340	342
M57	181	WT	M	05.03.2024	Drug	625	584	622	626	294	615	222	313	155	151
M58	182	WT	M	05.03.2024	Control	630	610	127	131	58	618	42	192	213	510
M59	184	WT	F	05.03.2024	Control	502	348	176	630	610	487	310	620	620	627
M60	185	WT	F	05.03.2024	Control	600	198	63	26	30	62	62	193	96	70
M61	188	WT	M	05.03.2024	Control	168	184	152	260	226	380	157	224	95	167
M62	189	WT	M	05.03.2024	Control	572	650	624	760	254	472	540	274	219	261
M63	162	APP/PS1	F	05.03.2024	Control										
M64	163	APP/PS1	F	05.03.2024	Control	660	328	93	262	573	322	20	46	37	48
M65	164	APP/PS1	F	05.03.2024	Drug										
M66	180	APP/PS1	F	05.03.2024	Drug	575	158	209	121	89	174	125	280	397	152
M67	193	APP/PS1	F	05.03.2024	Drug	173	190	536	58	180	36	37	19	16	30
M68	194	APP/PS1	F	06.03.2024	Control	625	433	555	453	142	96	48	138	169	38
M69	170	APP/PS1	M	05.03.2024	Control	600	287	50	183	86	97	240	328	86	111
M70	171	APP/PS1	M	05.03.2024	Drug	610	242	236							
M71	172	APP/PS1	M	05.03.2024	Drug	610	165	231	304	136	90	13	123	61	141
M72	183	APP/PS1	M	05.03.2024	Drug	625	379	176	395	131	322	37	182	274	267
M73	187	APP/PS1	M	05.03.2024	Drug	625	530	610	649	94	204	201	247	220	81
M74	190	APP/PS1	M	05.03.2024	Control	290	647	647	203	177	273	284	230	262	119
M75	191	APP/PS1	M	06.03.2024	Control	219	320	268	173	60	108	16	114	91	166

REVERSAL DAYS (5 zile)

NR.	ID	Geno	SEX	DOB	Drug/Control	REV DAY 1	REV DAY 2	REV DAY 3	REV DAY 4	REV DAY 5
M51	166	WT	M	05.03.2024	Drug	510	317	202	630	270
M52	169	WT	M	05.03.2024	Drug	156	315	137	137	152
M53	173	WT	M	05.03.2024	Drug	330	268	209	226	330
M54	175	WT	F	28.01.2024	Drug	645	349	158	364	105
M55	177	WT	F	28.01.2024	Drug	617	207	634	231	507
M56	179	WT	M	28.01.2024	Control	433	90	199	258	234
M57	181	WT	M	05.03.2024	Drug	350	129	137	182	313
M58	182	WT	M	05.03.2024	Control	265	113	147	281	205
M59	184	WT	F	05.03.2024	Control	142	176	35	29	123
M60	185	WT	F	05.03.2024	Control	105	87	272	518	266
M61	188	WT	M	05.03.2024	Control	214	184	273	298	190
M62	189	WT	M	05.03.2024	Control	362	300	180	169	308
M63	162	APP/PS1	F	05.03.2024	Control					
M64	163	APP/PS1	F	05.03.2024	Control	549	324	246	218	236
M65	164	APP/PS1	F	05.03.2024	Drug					
M66	180	APP/PS1	F	05.03.2024	Drug	239	21	124	99	47
M67	193	APP/PS1	F	06.03.2024	Drug	50	150	134	144	28
M68	194	APP/PS1	F	06.03.2024	Control	131	119	47	190	439
M69	170	APP/PS1	M	05.03.2024	Control	269	267	126	107	135
M70	171	APP/PS1	M	05.03.2024	Drug					
M71	172	APP/PS1	M	05.03.2024	Drug	65	132	102	100	28
M72	183	APP/PS1	M	05.03.2024	Drug	650	333	294	193	205
M73	187	APP/PS1	M	05.03.2024	Drug	536	153	203	123	177
M74	190	APP/PS1	M	05.03.2024	Control	200	119	117	190	26
M75	191	APP/PS1	M	06.03.2024	Control	30	129	141	90	68

Recoltarea probelor de creier și congelarea acestora în azot lichid



Probele de creier recoltate de la primul lot de șoareci (lotul în vârstă)



Probele de creier de la al 2-lea lot - lotul de șoareci tineri (alături de lotul bătrân)

M6	108	WT	M	21.11.2023	31.05.2024	26	26	Control
M7	119	WT	F	12.11.2023	31.05.2024	24	25	Drug
M8	123	WT	F	15.11.2023	31.05.2024	24	24	Drug
M9	127	WT	F	27.09.2023	31.05.2024	20	19	Control
M10	128	WT	F	23.10.2023	31.05.2024	23	23	Drug
M11	133	WT	F	14.11.2023	31.05.2024	22	22	Control
M12	138	WT	F	14.11.2023	31.05.2024	20	19	Control
M13	103	APP/PS1	M	23.10.2023	31.05.2024	29	27	Control
M14	104	APP/PS1	M	23.10.2023	31.05.2024	21	21	Drug
M15	105	APP/PS1	M	23.10.2023	31.05.2024	31	34	Control
M16	107	APP/PS1	M	23.10.2023	31.05.2024	21	25	Drug
M17	112	APP/PS1	M	16.11.2023	31.05.2024	27	27	Drug
M18	116	APP/PS1	M	12.11.2023	31.05.2024	33	30	Control
M19	117	APP/PS1	F	12.11.2023	31.05.2024	23	25	Drug
M20	118	APP/PS1	M	12.11.2023	31.05.2024	30	30	Control
M21	120	APP/PS1	F	12.11.2023	31.05.2024	25	26	Drug
M22	124	APP/PS1	F	15.11.2023	31.05.2024	24	24	Drug
M23	132	APP/PS1	F	14.11.2023	31.05.2024	21	20	Control
M24	134	APP/PS1	F	14.11.2023	31.05.2024	25	22	Drug
M25	136	APP/PS1	F	14.11.2023	31.05.2024	22	22	Control

Greutatea șoarecilor din lotul tânăr la începerea și la finalul testării

Nr.	ID	Geno	SEX	DOB	DOD	Weight (g) START	Weight (g) END	Drug/Control
M51	166	WT	M	05.03.2024	28.06.2024	24	25	Drug
M52	169	WT	M	05.03.2024	28.06.2024	23	24	Drug
M53	173	WT	M	05.03.2024	28.06.2024	24	26	Drug
M54	175	WT	F	28.01.2024	28.06.2024	19	20	Drug
M55	177	WT	F	28.01.2024	28.06.2024	15	15	Drug
M56	179	WT	M	28.01.2024	28.06.2024	26	25	Control
M57	181	WT	M	05.03.2024	28.06.2024	23	24	Drug
M58	182	WT	M	05.03.2024	28.06.2024	23	25	Control
M59	184	WT	F	05.03.2024	28.06.2024	18	19	Control
M60	185	WT	F	05.03.2024	28.06.2024	19	20	Control
M61	188	WT	M	05.03.2024	28.06.2024	25	24	Control
M62	189	WT	M	05.03.2024	28.06.2024	25	25	Control
M63	162	APP/PS1	F	05.03.2024	06.06.2024	22		Control
M64	163	APP/PS1	F	05.03.2024	28.06.2024	21	21	Control
M65	164	APP/PS1	F	05.03.2024	04.06.2024	24		Drug
M66	180	APP/PS1	F	05.03.2024	28.06.2024	25	23	Drug
M67	193	APP/PS1	F	06.03.2024	28.06.2024	25	28	Drug
M68	194	APP/PS1	F	06.03.2024	28.06.2024	19	19	Control
M69	170	APP/PS1	M	05.03.2024	28.06.2024	28	27	Control
M70	171	APP/PS1	M	05.03.2024	17.06.2024	25		Drug
M71	172	APP/PS1	M	05.03.2024	28.06.2024	25	27	Drug
M72	183	APP/PS1	M	05.03.2024	28.06.2024	26	28	Drug
M73	187	APP/PS1	M	05.03.2024	28.06.2024	25	25	Drug
M74	190	APP/PS1	M	05.03.2024	28.06.2024	27	26	Control
M75	191	APP/PS1	M	06.03.2024	28.06.2024	21	22	Control

Injectiile cu inhibitor MK2 nu au avut efecte adverse asupra sănătății și comportamentului șoarecilor. În plus, nu am observat nicio modificare semnificativă a greutății din cauza tratamentului (Figură prezentată mai jos)

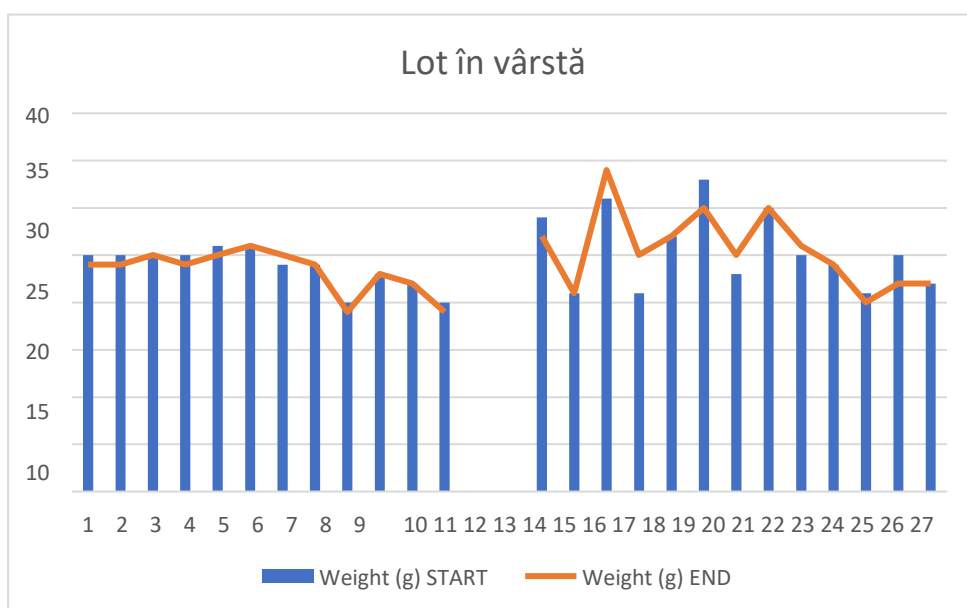
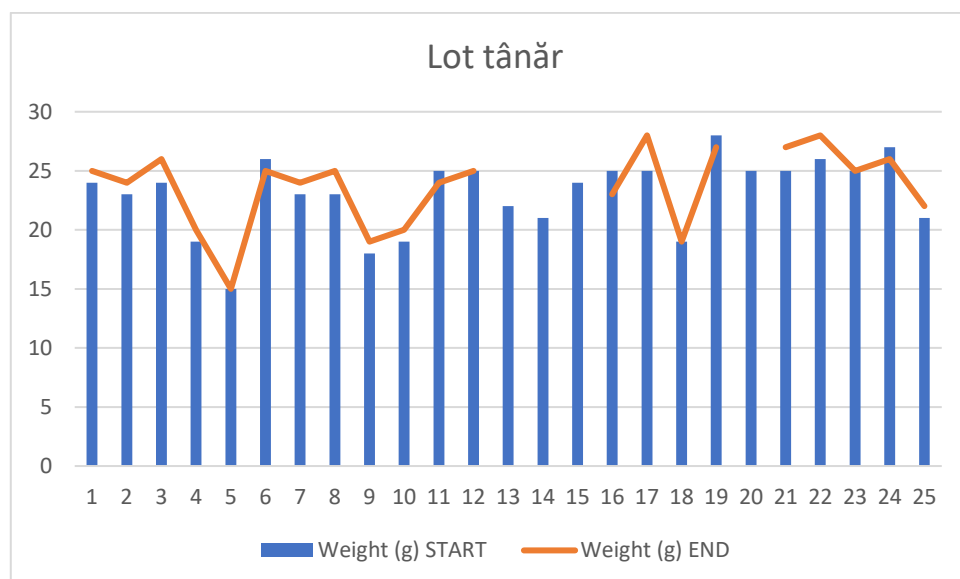


Fig. de mai sus Înregistrarea greutateii șoarecilor înainte și după injecțiile i.p.



Greutatea șoarecilor APP/PS1 pentru imunohistochimie la începerea și la sfârșitul injectării

Nr.	ID	Geno	SEX	DOB	DOD	Weight (g) START	Weight (g) END	Drug/Control
M31	154	APP/PS1	M	28.01.2024	02.07.2024	26	27	Drug
M32	155	APP/PS1	M	28.01.2024	02.07.2024	24	25	Control
M33	156	APP/PS1	M	28.01.2024	02.07.2024	24	26	Drug
M34	157	APP/PS1	F	28.01.2024	02.07.2024	21	22	Control
M35	158	APP/PS1	F	28.01.2024	02.07.2024	23	23	Drug
M36	159	APP/PS1	F	28.01.2024	02.07.2024	22	23	Drug
M37	095	APP/PS2	M	14.11.2024	02.07.2024	17	18	Control

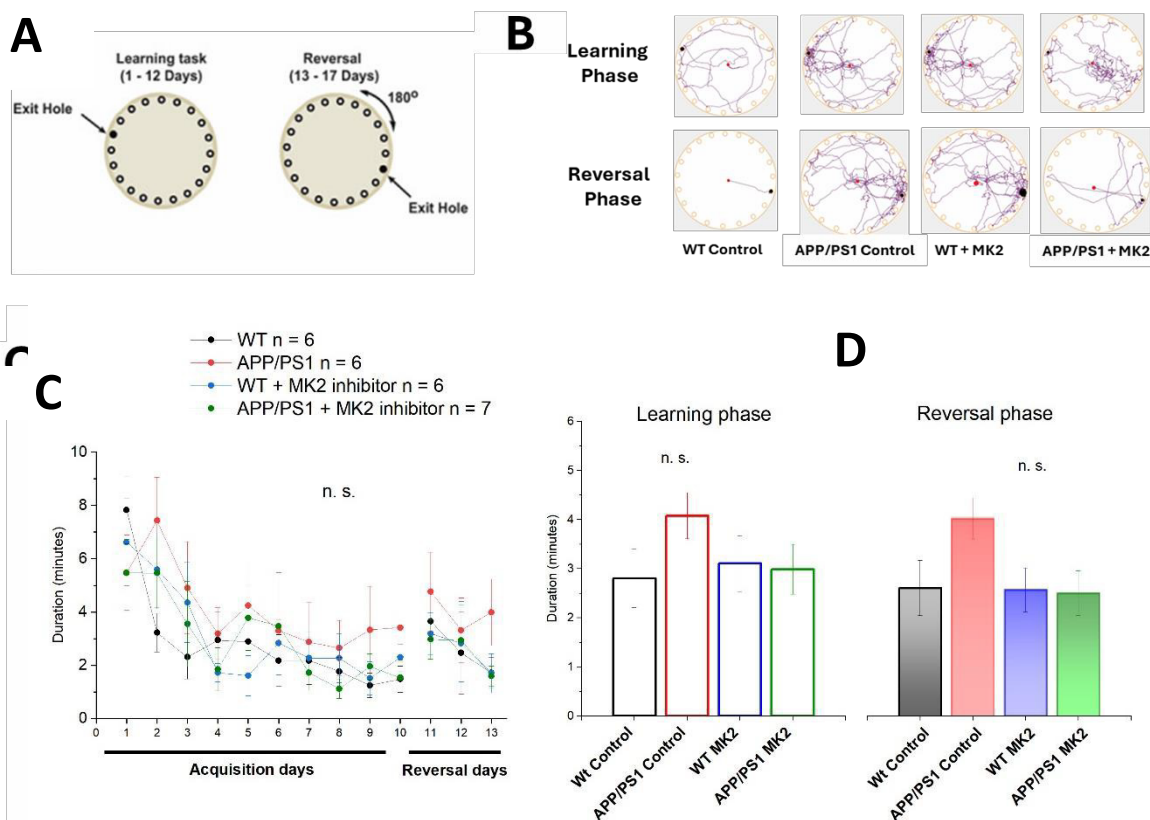
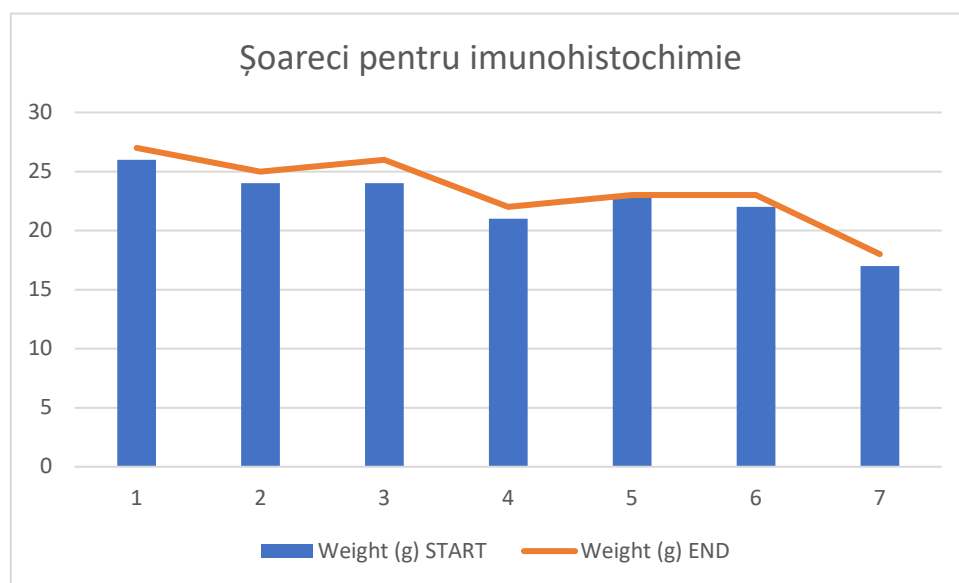


Figura de mai sus (a) Configurația experimentală a labirintului Barnes. (b) Traiectoria luată de șoarecii WT și APP/PS1 tratați cu control sau MK2 pentru a finaliza sarcina. (c) Timpul mediu necesar șoarecilor pentru a finaliza sarcina în timpul achiziției (Zilele 1-10, $p = 0,58$) și fazelor de inversare (Zilele 11-13, $p = 0,47$). (d) Durata medie pe grupe pentru faza de învățare (n.s., $p = 0,58$) și faza de inversare (n.s., $p = 0,47$).

4. Impactul rezultatelor obținute, cu sublinierea celui mai semnificativ rezultat obținut

Rezultatele studiilor de mai sus arată un exemplu reprezentativ al efectelor protectoare ale co-tratamentului cu MK2 în care a reușit să normalizeze caracteristicile comportamentale ale animalelor transgenice „degenerante” în mod normal.

Analiza țesutului cerebral:

Exprimarea și localizarea proteinelor/analiza biochimică

Imunohistochimie: După eutanasiere, creierii de șoareci au fost congelați rapid și apoi procesați pentru studiu. Creierii întregi au fost fixați în paraformaldehidă 4% și apoi procesați și încorporați în ceară de parafină. Secțiunile de șase microni au fost tăiate longitudinal în creier și secțiunile selectate la intervale de 0,1 mm colorate cu hematoxină și eozină pentru a identifica regiunile și locațiile structurilor majore și pentru a căuta orice anomalie macto în structurile celulare.

Exemple de rezultate sunt prezentate mai jos:

Preparate histologice, pregătite pentru analiza imunohistochimică.



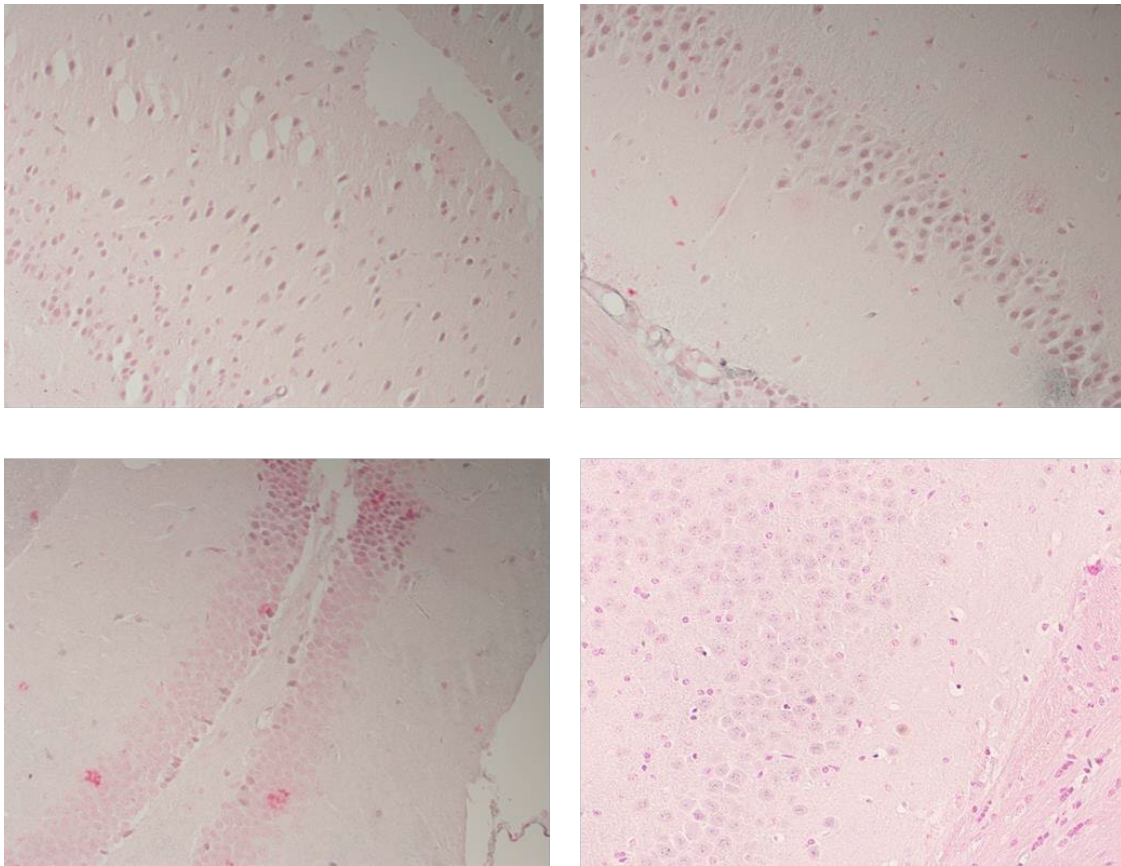
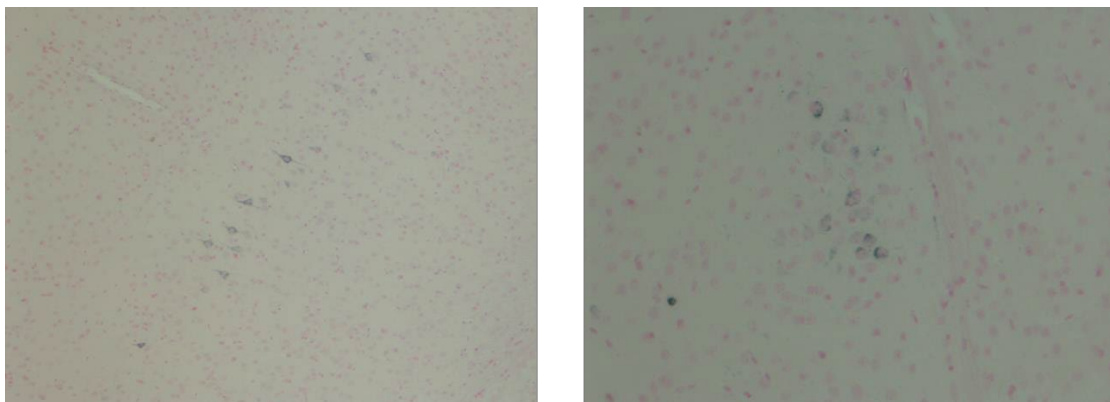


Figura de mai sus arată: Colorarea cu H și E a regiunilor cortexului și hipocampusului care sunt în centrul studiului - la șoarecii WT nemodificați genetic exemplul de mai sus arată structura și organizarea neuronilor caracteristici cu aspect morfologic normal.

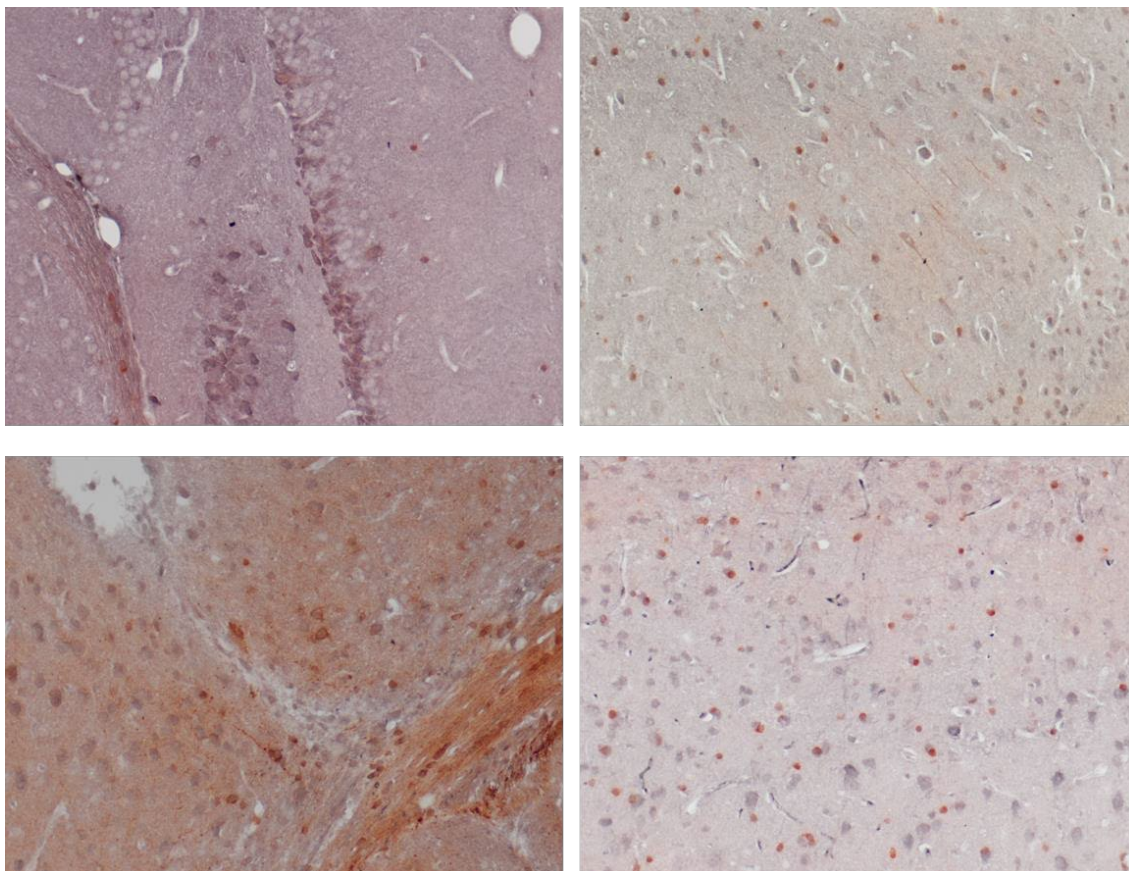


Animalele transgenice au prezentat colorare citoplasmatică pentru beta-amiloid (colorare albastră; colorare albastră DAB) atât în neuronii hipocampali (stânga) cât și corticali (dreapta). Un rezultat similar a fost observat pentru p-Tau.

Șoarecii cu inhibitor MK2 au prezentat mai puțină colorare cu beta-amiloid, determinată din media a 4 vizualizări la x 40 per diapozitiv și 3 diapozitive per comparație în regiunea cortexului (analiza statistică finală va fi finalizată până la 28 iunie 2024 și încorporată în articolul de jurnal în pregătire) :

Mai jos se arată un exemplu de colorare redusă observată la animalele Tg tratate cu MK2

(imagini din partea dreaptă) în comparație cu transgenic netratat (imagini din partea stângă)
- p-Tau în cortex și hipocamp).

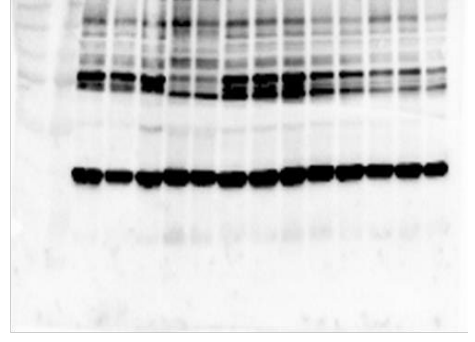
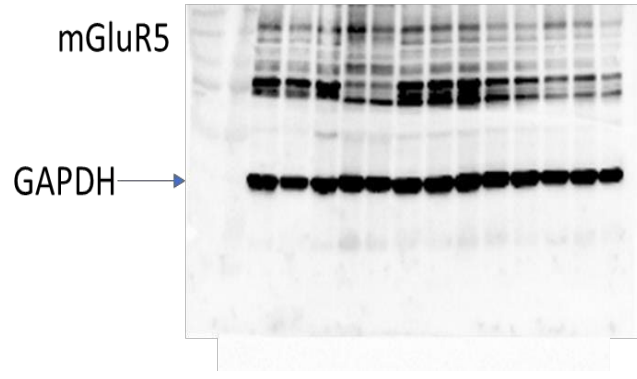


Expresia suplimentară de analiză IHC a TNF/IL-1 și p38 a fost finalizată și toate rezultatele vor fi incluse în articolul pe care îl pregătim spre publicare.

Rezultate Western blot:

Păstrarea controlului în care probele au fost egalizate pentru încărcarea proteinelor folosind GAPDH și comparații efectuate între control normal, nemodificat genetic, pozitiv transgenic, control plus MK2 și transgenic plus MK2.

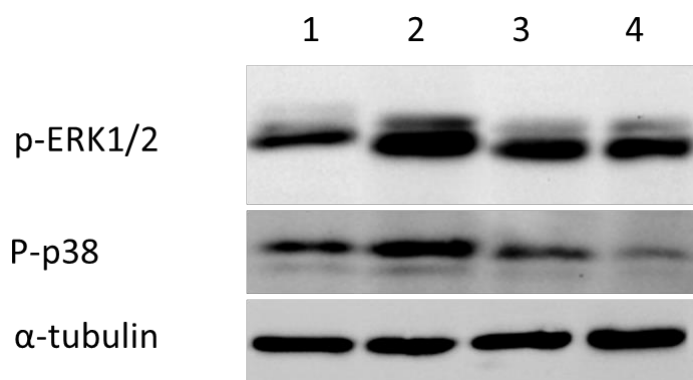
Rezultatele Western blot au arătat o reducere generală a activității MAP kinazei în prezența inhibitorului MK-2 în omogenate transgenice ale creierului de șoarece.





Mai sus prezintă exemple reprezentative de Western blotting pentru nivelurile de proteine mGluR5 și Arc în hipocampus șoarecilor APP/PS1. Bloturi care arată nivelurile de expresie a proteinei de Arc și mGluR5 (**p = 0,0041; WT: N = 6, APP: N = 5) în APP/PS1 în comparație cu șoarecii WT. Ambele proteine au fost crescute considerabil la șoarecii transgenici concomitent cu β -amiloid și p-Tau, iar prezența inhibitorului MK-2 a blocat parțial exprimarea acestora (analiza datelor și analiza statistică pentru această lucrare vor fi finalizate și incluse în publicația aflată în pregătire)

Mai jos sunt prezentate exemple de loturi de control față de rezultatele Tg MK-2 și MK-2 + Tg: și indică o expresie crescută a proteinelor fosforilate la animalele transgenice (banda 2) redusă în prezența inhibitorului MK-2 (banda 4)



(figura de mai sus) Omogenate de proteine ale creierului de șoarece supuse Western blot; Control banda 1; banda 2 Tg pozitiv; banda 3 injecție MK-2; banda 4 MK-2 + Tg p-ERK/pp38 crește la animalele TG și acest lucru a fost perturbat în prezența inhibitorului MK-2.

5. Detalii privind exploatarea și diseminarea rezultatelor proiectului.

Concluzii ale proiectului: Datele noastre în general au dezvăluit o importanță critică a dereglării căilor de semnalizare MK2 în procesele asimilate cu neurodegenerarea la șoarecii transgenici. Activitatea kinazei MAP și proteinele specifice cunoscute a fi generate în cadrul șoarecilor transgenici, cum ar fi β -amiloid și p-Tau, au fost reduse în urma co-tratamentului cu inhibitorul MK-2. În plus, comportamentul animalului a fost normalizat pe perioada studiului, în timp ce co-injecția MK-2 a crescut, de asemenea, nivelurile de noi proteine T- Arc și mGluR5, datele noastre indică faptul că acest lucru a fost blocat prin

inclusiunea inhibitorului MK-2. sugerează posibilitatea utilizării unor medicamente care pot bloca semnalizarea MAP kinazei (MAP-pp38) în protecția împotriva dezvoltării demenței.

Am creat în cadrul acestui proiect un nou model preclinic care poate fi folosit de noi înșine și de alții pentru a investiga aceste posibilități în continuare.

Potrivindu-se cu rezultatele și livrabilele originale, stabilite în PED:

s-a demonstrat că inhibarea activității MK2 in vivo este suficientă pentru ameliorarea cognitivă a deficienței observate în modelul de șoarece APP/PS1 al AD (Boala Alzheimer).

Și, am caracterizat că activitatea p38 MAPK și MK2 este crescută în țesutul cerebral ex-vivo obținut din cohortele de șoareci WT și APP/PS1 de control și tratați, utilizați pentru teste comportamentale, cu reduceri prezentate la șoarecii inhibați concomitent cu un rezultat îmbunătățit.

6.Prezentarea livrabilelor/indicatorilor obținuți la finalul proiectului comparativ cu cei propuși.

Livrabilele pentru WP-1 – toate acestea sunt finalizate

Livrabilele pentru WP-2 – completate; totuși, componentele de histologie rămase au fost realizate între 5 și 19 iulie, iar datele sunt în prezent în curs de analiză

Livrabilele pentru WP-3 – analiza finală a datelor și trimiterea pentru publicare sunt în desfășurare și urmează a fi finalizate înainte de sfârșitul lunii noiembrie 2024

O publicație care include toate datele originale noi este în curs de pregătire pentru depunere concomitent cu o revizuire care evidențiază modul în care lucrarea actuală contribuie la stadiul tehnicii în domeniu-Titulul articolului este redactat ca „MODULAREA POTENȚIALĂ A NEUROINFLAMAȚIEI ȘI ÎNCETINIRII COGNITIVE INDUSE DE Aβ ÎNTR-UN MODEL DE ȘOARECI APP/PS1 PRIN INTERMEDIUL KINAZEI DE PROTEINE ACTIVATE DE MAPK 2” și lucrarea este programată pentru a fi prezentată la Festivalul de Neuroștiințe al British Neuroscience Association (BNA 2025) - <https://meetings.bna.org.uk/bna2025/>

Bibliografie

1. Breijyeh Z, Karaman R. *Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. Molecules. 2020 Dec 8;25(24):5789. doi: 10.3390/molecules25245789. PMID: 33302541; PMCID: PMC7764106.*
2. Huang Y, Mucke L. *Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. Cell. 2012 Mar 16;148(6):1204-22. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.040. PMID: 22424230; PMCID: PMC3319071.*

3. Hamilton, A., et al., *Chronic Pharmacological mGluR5 Inhibition Prevents Cognitive Impairment and Reduces Pathogenesis in an Alzheimer Disease Mouse Model*. *Cell Rep*, 2016. 15(9): p. 1859-65.
4. Renner, M., et al., *Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5*. *Neuron*, 2010. 66(5): p. 739-54.
5. 12. Um, J.W., et al., *Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer abeta oligomer bound to cellular prion protein*. *Neuron*, 2013. 79(5): p. 887-902.
6. Eales, K.L., et al., *The MK2/3 cascade regulates AMPAR trafficking and cognitive flexibility*. *NatCommun*, 2014. 5: p. 4701.
7. Privitera, L., et al., *The MK2 cascade regulates mGluR-dependent synaptic plasticity and reversal learning*. *Neuropharmacology*, 2019. 155: p. 121-130.
8. Bachstetter AD, Van Eldik LJ. *The p38 MAP Kinase Family as Regulators of Proinflammatory Cytokine Production in Degenerative Diseases of the CNS*. *Aging Dis*. 2010 Dec;1(3):199-211. Epub 2010 Sep 24. PMID: 22720195; PMCID: PMC3377763.
9. Beamer E, Corrêa SAL. *The p38MAPK-MK2 Signaling Axis as a Critical Link Between Inflammation and Synaptic Transmission*. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jan 28;9:635636. doi: 10.3389/fcell.2021.635636. PMID: 33585492; PMCID: PMC7876405.

Director de proiect

Prof.univ.dr. Mark A. Slevin

