Michał Rychlik

The role of mouse zinc-sensing GPR39 receptor in memory functions associated with Alzheimer's disease

Abstract

In the mammalian brains synaptic zinc acts as a neuromodulator and as a neurotransmitter. Synapses are also where toxic forms of amyloid beta (Aβ) are formed, which is the first step of a pathological cascade leading to Alzheimer's dementia (AD) in humans. Evidence gathered over the span of last 25 years shows that synaptic zinc exacerbates the effects of Aβ; and, that by binding zinc Aβ disrupts the physiological functions of the ion. One of the most understudied physiological functions in this regard is neurotransmission through the zincergic GPR39 receptor.

The main aim of this work was to establish whether GPR39 modulates memory in mice, especially: an analogue of declarative memory affected in early stages of AD in humans i.e. episodic memory. Secondly, the effects of both acute and chronic pharmacological manipulations of GPR39 with its agonist (TC-G 1008) on declarative memory of mice were investigated; as well as, the effect of GPR39 knock-out (KO) on the action of memantine – a drug used in pharmacotherapy of AD. Lastly, the procognitive potential of both drugs was tested in a model of neurodegeneration – the constitutive heterozygous KO of brain-derived neurotropic factor (*Bdnf*). The battery of behavioral tests used in this work consisted of the episodic-like memory (ELM) test, the Morris Water Maze (MWM) and the modified rota-rod test of procedural memory. In order to explore the molecular underpinnings of GPR39 activity in the hippocampus, *ex vivo* measurements of selected proteins (Western blotting) and mRNA (qRT-PCR) were conducted.

Genetic and acute pharmacological manipulations of the GPR39 suggest the receptor is functionally involved in declarative, but not procedural memory of mice. Chronic TC-G 1008, however, did not affect neither ELM, nor spatial memory. No clear effect of acute memnatine was observed, while chronic memantine had a tendency to improve the spatial component of ELM in both wild-type and KO male mice; as well as, disrupted spatial memory of GPR39 KO mice in the MWM. Mice with lower expression of BDNF displayed an impairment (but not loss of function) of spatial memory in the MWM, which was unaffected by either TC-G 1008 or memantine administered chronically. The results of *ex vivo* molecular experiments point to both

excitatory and inhibitory neurotransmission as being affected by GPR39 manipulations, but the pattern of the observed changes does not offer a clear mechanistic explanation of the behavioral results.

Wpływ receptora cynkowego GPR39 na procesy pamięciowe u myszy związane z chorobą Alzheimera

Streszczenie

W mózgach ssaków cynk synaptyczny pełni podwójną rolę neuroprzekaźnika oraz neuromodulatora. Synapsy są również miejscem, w którym powstają toksyczne formy białka amyloidu beta (Aβ), którego działanie jest pierwszym elementem kaskady prowadzącej do demencji typu Alzheimerowego u ludzi. Ostatnie 25 lat badań dowodzi, że cynk synaptyczny potęguje patologiczne oddziaływanie Aβ, jak również - poprzez wiązanie cynku - Aβ zaburza funkcje fizjologiczne regulowane przez ten pierwiastek śladowy. W tym kontekście, jedną z najsłabiej zbadanych funkcji zależnych od cynku synaptycznego jest neuroprzekaźnictwo zapośredniczone przez receptor cynkowy GPR39.

Głównym celem niniejszej pracy było sprawdzenie, czy GPR39 moduluje pamięć myszy, a w szczególności mysi odpowiednik pamięci deklaratywnej, której zaburzenia obserwowane są we wczesnych stadiach choroby Alzheimera tj. pamięć epizodyczną. Ponadto, zbadano wpływ jednorazowych lub przewlekłych podań agonisty GPR39 (TC-G 1008) na pamięć deklaratywną myszy oraz sprawdzono wpływ nokautu GPR39 na działanie leku stosowanego w łagodzeniu objawów choroby Alzheimera tj. memantyny. Zbadano również potencjał prokognitywny TC-G 1008 i memantyny u zwierząt z heterozygotycznym nokautem genu dla czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego (*Bdnf*), czyli w mysim modelu neurodegeneracji.

Bateria testów behawioralnych składała się z Testu Pamięci Epizodycznopodobnej (TPE), Labiryntu Wodnego Morrisa (LWM) oraz Testu Pamięci Proceduralnej (TPP). Badania *ex vivo* molekularnych mechanizmów oddziaływania GPR39 na hipokamp przeprowadzono z użyciem technik qRT-PCR oraz Western Blot.

Wyniki manipulacji genetycznych (nokaut GPR39) oraz farmakologicznych (jednokrotne podania TC-G 1008) sugerują, że GPR39 odpowiada za pamięć deklaratywną, ale nie za pamięć proceduralną myszy. Podania przewlekłe TC-G 1008 oraz jednokrotne podania memantyny nie

wpłynęły na zachowanie zwierząt w TPE oraz LWM. Natomiast, po przewlekłych podaniach memantyny zaobserwowano trend w kierunku poprawy komponentu przestrzennego pamięci epizodycznopodobnej u zwierząt typu dzikiego oraz nokautów GPR39 w TPE; jak również, zaburzenia pamięci przestrzennej nokautów GPR39 w LWM. U myszy ze zmniejszoną ekspresją genu *Bdnf* zaobserwowano pogorszenie pamięci przestrzennej w LWM (przy zachowaniu tej funkcji), któremu nie udało się zapobiec podaniami przewlekłymi TC-G 1008 lub memantyny. Wyniki badań molekularnych *ex vivo* wskazują, że GPR39 wpływa zarówno na neurotransmisję pobudzającą, jak i hamującą w hipokampie; natomiast, nie znaleziono prostego przełożenia profilu zmian w ekspresji zbadanych genów i białek, na profil zmian procesów pamięciowych u myszy.