



RAPAMYCYNA – SKARB NEUROBIOLOGÓW Z WYSPIY WIELKANOCNEJ

Rapamycin – an Easter Island
neuroscientist's treasure



Jacek Jaworski (Warszawa)

Streszczenie

W roku 1964 z Kanady wyruszył w kierunku Wyspy Wielkanocnej H.M.C.S. Cape Scott należący do Królewskiej Kanadyjskiej Marynarki Wojennej. Na jego pokładzie znajdowało się około 40 naukowców i lekarzy, których celem było dokładne zbadanie środowiska i chorób ludzi zamieszkujących Wyspę Wielkanocną. Nikt z nich nie przypuszczał, iż efektem tej wyprawy będzie odkrycie nowej substancji – rapamycyny, która stanie się 50 lat później istotnym narzędziem w badaniach nad biologią molekularną układu nerwowego oraz ważnym lekiem stosowanym w leczeniu chorób neurologicznych. Rapamycyna jest substancją naturalną produkowaną przez bakterie glebowe – *Streptomyces hygroscopicus*. Natomiast biochemicznie jest inhibitorem ważnego regulatora metabolizmu komórek – ssaczego celu rapamycyny (mTOR). W niniejszym artykule omówiono po krótku pełną zwrotów akcji i determinacji badaczy historię rapamycyny. Następnie trochę bardziej szczegółowo opisano, czym jest mTOR i czego dzięki użyciu rapamycyny dowiedzieliśmy się o jego roli w rozwoju, fizjologii i starzeniu się układu nerwowego. W końcu niniejszy artykuł omawia choroby układu nerwowego związane ze zmianami aktywności mTOR i możliwości klinicznego wykorzystania rapamycyny.

Abstract

In 1964, the Royal Canadian Navy's H.M.C.S. Cape Scott set sail from Canada for Easter Island. On board were about 40 scientists and doctors whose purpose was to study in detail the environment and diseases of the people living on Easter Island. None of them expected that this expedition would result in the discovery of a new substance - rapamycin, which 50 years later would become an important tool in the study of the molecular biology of the nervous system and an important drug used to treat neurological diseases. Rapamycin is a natural substance produced by the soil bacterium, *Streptomyces hygroscopicus*. However, biochemically it is an inhibitor of an important regulator of cell metabolism, the mammalian target of rapamycin (mTOR). This article briefly discusses the history of rapamycin, full of twists and turns and determined researchers. It then describes in a little more detail what mTOR is and what we have learned through the use of rapamycin about its role in the development, physiology, and aging of the nervous system. Finally, this article discusses diseases of the nervous system associated with changes in mTOR activity and the potential clinical use of rapamycin.

Wstęp: Rapamycyna – lek, który mógł pozostać w zamrażarce

W roku 1964 z portu Halifax w Kanadzie wyruszył w kierunku Wyspy Wielkanocnej H.M.C.S. Cape Scott należący do Królewskiej Kanadyjskiej Marynarki Wojennej. Na jego pokładzie znajdowało się około 40 naukowców i lekarzy, których celem

było dokładne zbadanie środowiska i chorób ludzi zamieszkujących Wyspę Wielkanocną, która do tego momentu pozostawała w izolacji ze względu na położenie wyspy. Jednym z zadań badawczych było pobranie próbek gleby z 67 działek w celu zrozumienia, dlaczego mieszkańcy wyspy nie chorowali na tężec pomimo bardzo sprzyjających warunków. Okazało się, iż pobrane przez naukowców próbki stały się

źródłem największego odkrycia tej wyprawy – rapamycyny. Jednak docenienie jego wagi, jak to często bywa w nauce, wymagało czasu, szczęśliwych przypadków i determinacji kilku badaczy, którzy byli dogłębnie przekonani, iż odkryli coś, co zmieni naszą wiedzę i życie wielu ludzi.

Wspomniane próbki gleby, po sprawdzeniu na obecność pałeczek tężca, trafiły na półkę na kilka lat, po czym w roku 1969 zostały przekazane naukowcom z firmy Ayerst Pharmaceuticals, którzy byli zainteresowani poszukiwaniem potencjalnie leczniczych substancji produkowanych przez bakterie występujące w środowisku naturalnym. Pośród zidentyfikowanych w próbkach gleby bakterii była *Streptomyces hygroscopicus*, z której wyizolowano nową substancję. Nazwano ją rapamycyną, od nazwy Wyspy Wielkanocnej w języku jej rdzennych mieszkańców – Rapa Nui. Wśród odkrywców rapamycyny znalazł się Suren Sehgal, mikrobiolog zwany dziś ojcem rapamycyny. Dzięki jego determinacji udowodniono, iż rapamycyna hamuje aktywację układu odpornościowego (jest tzw. immunosupresantem) oraz stanowi nową klasę leków – cytostatyków, które nie zabijają komórek nowotworowych, ale efektywnie blokują ich wzrost. Jednak, pomimo tych obiecujących wyników, w roku 1982 projekt „rapamycyna” został definitywnie zakończony przez firmę Ayerst, a substancja praktycznie zapomniana. Ale nie przez Sehgała, który zapakował pozostałe próbki namnożonego szczepu *S. hygroscopicus* i trzymał w domu w zamrażalniku aż do roku 1988, kiedy nadarzyła się okazja wznowienia prac nad rapamycyną. Ayerst została połączona z firmą Wyeth, a Sehgal przekonał zarząd firmy, iż rapamycyna jest ich skarbem i może się stać rewolucyjnym lekiem immunosupresyjnym. Okazało się to prawdą, a leki oparte na rapamycynie są do dziś powszechne w transplantologii. Rapamycyna została uratowana, jednak mechanizm działania pozostawał nieznan aż do lat 90. Przełomowym krokiem było wykazanie przez Stuarta Schreibera, iż rapamycyna oddziałuje z białkiem FKBP12, należącym do rodziny immunofilin, znanym w tamtych czasach głównie z tego, iż wiąże lek immunosupresyjny FK506, prowadząc do zahamowania aktywności bardzo ważnego enzymu – kalcyneuryny. To doprowadziło niezależnie samego Schreibera, Davida Sabatiniego oraz Roberta Abrahama do odkrycia nowego białka – ssaczego celu rapamycyny (ang. *mammalian target of rapamycin*, mTOR) [16]. W tym samym czasie, wykorzystując testy genetyczne, Michael Hall i George Livi niezależnie odkryli cel rapamycyny w drożdżach [16]. Rapamycyna okazała się ważnym narzędziem w naukach podstawowych, które pozwoliło na odkrycie wielu

zagadek regulacji metabolizmu komórek. Jednocześnie odkrycie mTOR pozwoliło zrozumieć powiązania metabolizmu z licznymi chorobami człowieka, a rapamycyna jest obecnie wykorzystywana nie tylko w transplantologii, ale także w leczeniu nowotworów, części chorób metabolicznych, a także chorób układu nerwowego. Niniejszy artykuł poświęcam właśnie wykorzystaniu rapamycyny w badaniach nad rozwojem i funkcjami układu nerwowego, a także jej wykorzystaniu w leczeniu chorób neurologicznych.

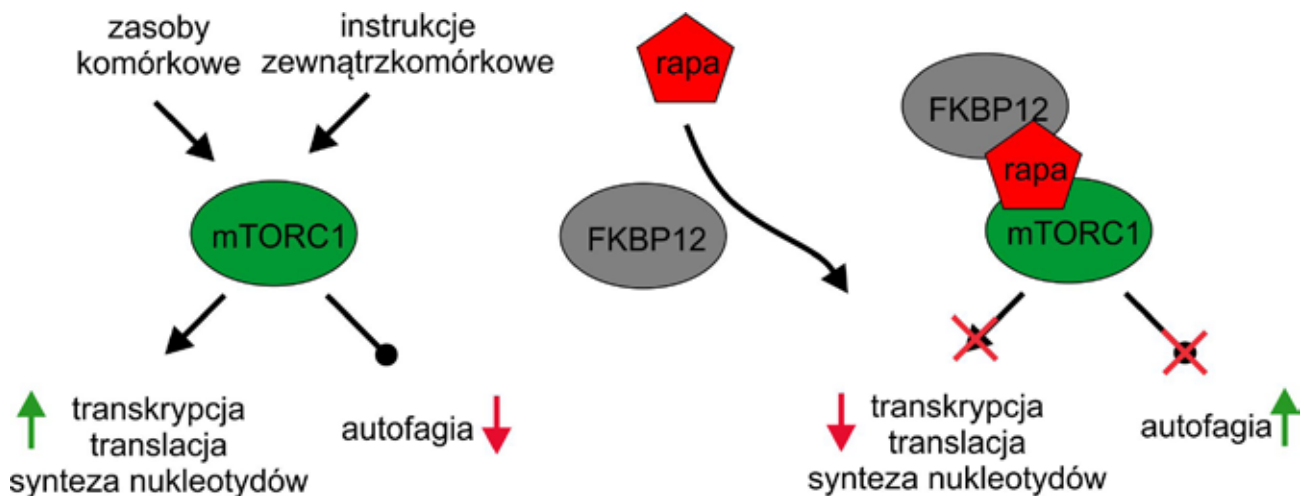
Czym jest mTOR – ssaczy cel rapamycyny

Jak wspomniano we wstępie, rapamycyna jest inhibitorem mTOR, jednego z ważniejszych białek regulujących metabolizm wszystkich rodzajów komórek [17]. Sposób regulacji metabolizmu przez to białko jest konserwatywny i zachowany od drożdży po człowieka. Biochemicznie mTOR jest kinazą białkową, czyli enzymem, który dołącza grupę fosforanową do swoich substratów, co prowadzi do zmian w funkcjonowaniu, poziomie lub dostępności tych ostatnich. W komórkach ssaków mTOR wchodzi w skład dwóch kompleksów białkowych, tzw. pierwszego (mTORC1) i drugiego (mTORC2) kompleksu mTOR [12]. Mają one różny skład białkowy, który definiuje, jakie substraty mogą być przez nie związane i jakie funkcje komórkowe pełni dany kompleks [12]. mTORC1 jest poznany dużo lepiej właśnie dzięki odkryciu rapamycyny, gdyż bezpośrednio hamuje ona tylko jego aktywność. Jednakże długotrwałe podawanie rapamycyny w niektórych rodzajach komórek skutkuje również zahamowaniem aktywności mTORC2. Rapamycyna jest dość nietypowym inhibitorem. Aby mogła hamować aktywność mTORC1 musi również wiązać białko FKBP12 (Ryc. 1). Dopiero kompleks FKBP12, rapamycyny i mTOR prowadzi do zahamowania funkcji mTORC1. mTOR znajdujący się w składzie mTORC2 nie może być związany przez rapamycynę i FKBP12. Dlatego lek ten nie ma bezpośredniego wpływu na aktywność mTORC2. Jednak kompleks rapamycyny, FKBP12 i mTOR stanowi swoistą pułapkę dla tego ostatniego. Z czasem (po około 24 godzinach traktowania rapamycyną) ilość mTOR dostępnego do formowania mTORC2 przestaje być wystarczająca, co prowadzi do niebezpośredniego hamowania jego aktywności.

Pomimo pewnych ograniczeń, rapamycyna stała się kluczowym narzędziem dla zrozumienia funkcji komórkowych mTORC1. Obecnie wiemy, iż mTORC1 jest regulowany przez sygnały zewnątrzkomórkowe (np. czynniki wzrostowe czy neurotransmitery) oraz wewnętrzne zasoby komórkowe, takie jak poziom

aminokwasów, glukozy czy dostępność ATP, czyli głównego „paliwa” komórkowego [12]. Integrując te wszystkie informacje, w miarę dostępności zasobów wewnątrzkomórkowych, mTORC1 dostosowuje poziom odpowiedzi komórkowej do możliwości komórki (Ryc. 1). Jeśli zasoby są wystarczające, stymulacja

zpolimerów aktyny)[13]. Jak opisuję poniżej, zarówno mTORC1, jak i mTORC2 pełnią istotne funkcje w układzie nerwowym. W przypadku mTORC1, jak łatwo się domyśleć, postęp wiedzy dokonywał się dużo szybciej dzięki wykorzystaniu rapamycyny, bez której neurobiolodzy i neurologicy nie odkryliby



Ryc. 1. Regulacja mTORC1 i sposób hamowania jego aktywności przez rapamycynę. Kompleks I mTOR (mTORC1) jest regulowany w komórkach zarówno przez dostępność zasobów wewnątrzkomórkowych (np. aminokwasów), jak i instrukcje zewnątrzkomórkowe (np. czynniki wzrostu). To prowadzi do przyspieszenia procesów anabolicznych (np. translacja) i hamowania procesów katabolicznych (np. autofagia). W obecności rapamycyny (rapa) mTORC1 tworzy kompleks z białkiem FKBP12, co prowadzi do dezaktywacji mTORC1 i odwrócenia dynamiki procesów anabolicznych i katabolicznych w komórce.

zewnątrzkomórkowa będzie zwiększać aktywność mTORC1, która będzie się przekładać na zwiększenie procesów anabolicznych (budujących zasoby komórki), jak np. produkcja białek (translacja), mRNA (transkrypcja) czy synteza nukleotydów [12] (Ryc. 1). Jednocześnie mTORC1 hamuje procesy odwrotne, takie jak np. autofagia (Ryc. 1), czyli proces rozkładu białek oraz całych organelli w strukturach zwanych autofagosomami [12]. W efekcie umożliwia to np. wzrost komórki czy jej podziały komórkowe. Oprócz wymienionych procesów mTORC1 reguluje szereg innych zjawisk koniecznych dla rozwoju komórki, np. transport pęcherzykowy czy dynamikę i interakcję elementów cytoszkieletu. Wiedza na temat mTORC2 jest dużo uboższa, co bardzo dobrze ilustruje, jak ważnym narzędziem dla badania mTORC1 okazała się rapamycyna. W przeciwieństwie do mTORC1, dotychczas nie opracowano specyficznego inhibitora mTORC2. Wiedza na temat tego kompleksu została zdobyta dzięki narzędziom genetycznym pozwalającym na zaburzenie ekspresji genów kodujących białka specyficzne dla tego kompleksu, np. *Rictor*. Dzięki wykorzystaniu np. myszy pozbawionych *Rictor*, dowiedziono, iż mTORC2 reguluje przeżywalność komórek oraz dynamikę mikrofilamentów (elementów cytoszkieletu zbudowanych

części mechanizmów molekularnych istotnych dla rozwoju i funkcjonowania neuronów, jak również licznych, często powszechnych, objawów neurologicznych i neuropsychologicznych.

Rola mTOR w zdrowym układzie nerwowym

Jak omówiono w poprzednim podrozdziale, rapamycyna jest inhibitorem aktywności kluczowego dla metabolizmu komórek białka mTOR. Aby zrozumieć, dlaczego rapamycyna jest ważna dla neurologów i neurobiologów oraz czy może być stosowana jako lek, konieczne jest zrozumienie, jaką funkcję pełni mTOR w prawidłowo działającym układzie nerwowym i jak jego rozmaite funkcje komórkowe ulegają zaburzeniu wraz z wiekiem lub w stanach neuropatologicznych. Zagadnienia te omawiam bardziej szczegółowo w tym oraz kolejnym podrozdziale.

Pierwsze doniesienia o roli mTOR w układzie nerwowym ssaków pojawiły się w literaturze w latach 2002–2006 [5,18]. Ze względu na dobrze udokumentowaną rolę mTOR w regulacji translacji oraz istotności syntezy białek dla długotrwałej plastyczności synaptycznej przede wszystkim skupiono się na tym zagadnieniu. I rzeczywiście dość szybko wykazano, iż w wyniku silnego pobudzenia neuronu prowadzącego

do stabilnej zmiany siły jego połączeń synaptycznych (tzw. długotrwałe wzmocnienie synaptyczne) następuje zwiększenie aktywności mTOR, a podanie rapamycyny blokuje zmiany transmisji synaptycznej [21 *long-term potentiation* (LTP)]. Ponieważ długotrwałe wzmocnienie synaptyczne jest uważane za elektrofizjologiczny odpowiednik uczenia się i pamięci, potwierdzenie, że rapamycyna blokuje także te procesy, okazało się tylko kwestią czasu [1,22].

Mniej więcej w podobnym okresie mTOR zaczęli się interesować neurobiolodzy zajmujący się rozwojem układu nerwowego. Pracując w tym czasie w Massachusetts Institute of Technology, pod kierunkiem prof. Morgana Sheng, wykazałem, właśnie przy użyciu rapamycyny, iż aktywność mTOR jest kluczowa dla prawidłowego wzrostu dendrytów, charakterystycznych wypustek formowanych przez komórki nerwowe w celu zbierania informacji od pozostałych neuronów [6]. Równoległe zespół prof. Gang-Yi Wu z Baylor College of Medicine wsparł nasze obserwacje, dodatkowo pokazując, iż podanie rapamycyny neuronom rozwijającym się w hodowli wpływa negatywnie na rozwój tzw. kolców dendrytycznych [7]. Kolce dendrytyczne stanowią morfologiczny odpowiednik synaps pobudzających, a zmiany ich kształtu w odpowiedzi na aktywność komórkową najprawdopodobniej są kluczowe dla powstawania śladów pamięciowych podczas uczenia się. Wkrótce po tych pierwszych doniesieniach kolejne grupy wykazały, iż mTOR jest zaangażowany w prawidłowy rozwój aksonów (drugi rodzaj wypustek formowanych przez neurony, przystosowany do wysyłania informacji) [15]. W końcu badania grup kierowanych przez Markusa Ruegga i Angeli-que Bordey w bardzo elegancki sposób pokazały, iż mTORC1 kontroluje proliferację i różnicowanie neuralnych komórek macierzystych, jak i migrację ich „potomstwa” w rozwijającym się mózgu *in vivo* [3,4]. W większości tych prac, szczególnie z początkowego okresu, badacze wykazywali również kluczową rolę procesu translacji i substratów mTOR zaangażowanych w ten proces. Jednak prowadzone później badania, w tym przez naszą grupę w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, wykazały, iż w przypadku procesu formowania drzewka dendrytycznego również inne procesy zależne od mTOR (jak np. transkrypcja, interakcje elementów cytoszkieletu czy też transport błonowy) są również ważne.

Powyższe przykłady skupiały się na roli mTORC1, którego aktywność jest hamowana przez rapamycynę bezpośrednio. Jednak w niektórych typach komórek, np. w komórkach nerwowych, dłu-

gotrwałe podanie rapamycyny hamuje również mTORC2 [23]. Stąd część efektów fenotypowych obserwowanych w pionierskich doświadczeniach mogła wynikać z efektu rapamycyny zarówno na mTORC1, jak i na mTORC2. Dlatego liczne doniesienia starały się rozróżnić efekty obu kompleksów, zarówno w kontekście rozwoju neuronów, jak i ich plastyczności. W efekcie wykazano, iż często obydwa te kompleksy regulują te same etapy rozwoju czy funkcje neuronów, ale wykorzystując inne procesy komórkowe. Dobrym przykładem może znów być proces dendrytogenezy, w którym mTORC2 jest równie istotny jak mTORC1, jednak reguluje takie procesy jak dynamika mikrofilamentów (element cytoszkieletu komórkowego zbudowany z aktyny) czy transport mRNA wzdłuż mikrotubul (element cytoszkieletu komórkowego zbudowany z tubuliny) w dendrytach [19]. Podobnie w przypadku kolców dendrytycznych czy uczenia się i pamięci, regulacja mikrofilamentów okazała się być główną funkcją komórkową mTORC2 [19].

W związku z powszechnym udziałem kompleksów mTOR w rozwoju i plastyczności neuronów mogłoby się wydawać, iż hamowanie mTOR w warunkach fizjologicznych zawsze będzie skutkowało poważnymi zaburzeniami np. funkcji poznawczych. Powodowało to pewien sceptycyzm wśród części neurobiologów w kwestii terapeutycznego wykorzystania rapamycyny lub jej pochodnych. Jednak natura, jak wielokrotnie wcześniej, zaskoczyła badaczy. Rzeczywiście kilkutygodniowe podawanie wysokich dawek rapamycyny szczurom prowadziło do objawów wodogłowia i podatności na wywoływane farmakologicznie napady drgawkowe, co potwierdzało stanowisko sceptyków [10]. Jednak doświadczenia grupy kierowanej przez Salvatore Oddo wykazały, iż wielomiesięczne podawanie myszom niskich dawek rapamycyny bardzo pozytywnie wpływało na poziom wykonania przez nie testów pamięciowych, kiedy się zestarzały [11]. Te pozytywne efekty przypisywano obniżeniu w mózgu poziomu zapalnej cytokiny – interleukiny 1 β oraz poprawie przewodnictwa synaptycznego. Z kolei inni badacze raportowali u „starych” myszy zarówno wzrost aktywności mTOR w mózgu, jak i oznaki mniej wydajnej autofagii. Sugeruje to, iż wzrost aktywności mTORC1 w starzejącym się mózgu hamuje efektywne „oczyszczanie” komórek nerwowych ze zużytych białek czy organelli, co prowadzi do ich dysfunkcji. Jednak nie wszystkie doniesienia są zgodne w tej kwestii i hipoteza ta nie została do końca dowiedziona. Natomiast udało się wykazać, iż wraz ze starzeniem się w mózgu myszy dochodzi do spadku aktywności mTORC2,

a stymulacja farmakologiczna tego kompleksu przywraca funkcje kognitywne starych myszy do poziomu osobników młodych lub w „średnim” wieku.

mTOR i choroby układu nerwowego

Bardzo wszechstronne zaangażowanie mTOR w rozwój i funkcjonowanie układu nerwowego skutkuje tym, iż zaburzenia w poziomie lub aktywności tego białka prowadzą do wielu schorzeń z objawami neurologicznymi lub neuropsychiatrycznymi. Omówienie ich wszystkich na pewno wykracza poza ramy tego artykułu, ale zainteresowani czytelnicy mogą znaleźć dodatkowe informacje w anglojęzycznej literaturze specjalistycznej [9,19]. Najlepiej poznaną chorobą związaną z nadmierną aktywnością mTORC1 jest stwardnienie guzowate (SG). Jest to rzadka choroba genetyczna, w której nadaktywność mTOR wynika z mutacji w genach *TSC1* lub *TSC2*, których produkty tworzą kompleks białkowy hamujący właśnie tę kinazę [20]. Choć SG jest chorobą ogólnoustrojową, to ważnym jej aspektem, szczególnie na wczesnych etapach życia, są zmiany neuroanatomiczne i symptomy związane z nieprawidłowym funkcjonowaniem układu nerwowego. Do najczęstszych objawów SG należą łagodne guzy mózgu: guzki korowe (częste) i gwiaździki olbrzymiokomórkowe. (tzw. SEGA; relatywnie rzadkie). Pierwsze z nich tworzą się w korze mózgowej. Natomiast drugie rozwijają się w stronę komór mózgu. Choć nie są to nowotwory złośliwe, to guzki korowe powodują zaburzenia anatomii kory mózgowej, co jest jedną z prawdopodobnych przyczyn epilepsji. Z kolei SEGA mogą prowadzić do zablokowania przepływu płynu mózgowo-rdzeniowego, skutkującego wzrostem ciśnienia śródczaszkowego, co przy braku odpowiedniego leczenia może prowadzić do utraty wzroku lub nawet śmierci. Poza guzami mózgu na poziomie anatomicznym stwierdza się pewne nieprawidłowości połączeń między półkulami mózgu, co z kolei może leżeć u podstaw części objawów neuropsychiatrycznych SG, np. autyzmu. I właśnie wspomniana wcześniej epilepsja i autyzm, obok niepełnosprawności intelektualnej są najczęstszymi symptomami SG. Epilepsja jest jednym z najczęstszych objawów i występuje w 90% przypadków. Właściwe leczenie padaczki może ograniczyć stopień niepełnosprawności intelektualnej, stąd szacunki dotyczące tego objawu mogą się różnić. Z kolei autyzm w jakiejś formie dotyka, w zależności od raportów, od 30 do 50% pacjentów z SG. Jako przyczyny powyższych objawów neurologicznych wymienia się związane z aktywnością mTOR: nadmierny wzrost komórek, zaburzenia proliferacji i różnicowania neu-

ralnych komórek macierzystych, zmiany w migracji w korze mózgowej niedojrzałych neuronów i w końcu zaburzenia w pobudzającej i hamującej aktywności neuronów.

Może dziwić, że naukowcy i klinicyści poświęcili tyle czasu na badanie tak rzadkiej choroby jak SG. Jest to związane z tym, że choć jest to choroba rzadka, to epilepsja, niepełnosprawność intelektualna oraz choroby spektrum autyzmu rzadkie nie są. Zrozumienie roli mTOR w SG otworzyło wielkie pole badań nad zaburzeniami ścieżki sygnałowej tej kinazy w wielu innych chorobach. Część z nich, zwanych mTORopatiami, ma szereg cech wspólnych. Cechuje je powodowana genetycznie nadaktywność mTOR oraz połączenie epilepsji, niepełnosprawności intelektualnej i autyzmu [19]. Są to między innymi różnego typu megalencefalie, dysplazje korowe czy zespoły związane z mutacjami w genie *P TEN*. Jednak nadaktywność mTOR towarzyszy również padaczkom o innej etiologii, zespołowi Downa, zespołowi łamliwego chromosomu X czy chorobom ze spektrum autyzmu, co wykazano zarówno w modelach przedklinicznych, jak i w niektórych przypadkach u pacjentów [19].

Jednak choroby związane z zaburzeniami aktywności mTOR nie ograniczają się tylko do chorób neurorozwojowych. Zmiany aktywności mTORC1 czy mTORC2 raportowano w schizofrenii czy depresji. Co ciekawe, w tym ostatnim przypadku za przyczynę uważa się raczej spadek aktywności mTOR, zjawisko w zasadzie niespotykane w przypadku chorób neurorozwojowych. Ostatnią grupą chorób związanych z zaburzeniami aktywności mTORC1 i jej roli we wspomnianej już powyżej kontroli translacji i autofagii są choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Alzheimera (AD), choroba Parkinsona czy choroba Huntingtona, w których stwierdzano nadaktywność mTOR [2,14]. We wszystkich przypadkach chorób, gdzie występuje nadmierna aktywacja ścieżki mTORC1, rapamycyna i jej pochodne mogą być realną szansą na kontrolowanie postępów choroby i poprawienie jakości życia.

Możliwości stosowania rapamycyny i jej pochodnych w leczeniu wybranych chorób układu nerwowego

Ze względu na to, iż nadaktywność mTOR jest bezpośrednią konsekwencją mutacji w genach *TSC1* i *TSC2* oraz z uwagi na towarzyszące SG poważne objawy neurologiczne, właśnie w modelach przedklinicznych tej choroby sprawdzono, czy rapamycyna może być wykorzystana jako lek w przypadku chorób układu nerwowego. Wykorzystując mysie modele (ale także

model ryby danio pęgowanego) dość szybko wykazano, iż podanie rapamycyny pozwala kontrolować związaną z SG epilepsję, jak również poprawia zaburzone u tych zwierząt zachowania społeczne, co mogło wskazywać, iż będzie ona pomocna w przypadku zaburzeń ze spektrum autyzmu [19]. Jednak rapamycyna musiała być stosowana w sposób chroniczny, gdyż zaprzestanie jej podawania przywracało np. napady drgawkowe. Efektywność pochodnej rapamycyny, Everolimusu, w leczeniu związanej z SG padaczki lekoopornej (jako terapii wspomagającej, tzn. stosowanej dodatkowo do standardowej terapii lekami przeciwdrgawkowymi, np. wigabatryny) potwierdzono w badaniu klinicznym EXIST-III, które wykazało znaczącą redukcję częstotliwości napadów drgawkowych u pacjentów. Również inne niezależne badania kliniczne potwierdziły skuteczność rapamycyny w leczeniu padaczki związanej z SG. Natomiast nie było jasne czy rapamycyna okaże się pomocna w leczeniu wspomnianych powyżej guzów mózgu, w szczególności SEGA, gdyż w większości modeli zwierzęcych nie udaje się ich odtworzyć. Na to pytanie odpowiedziało jednak bezpośrednio badanie kliniczne EXIST-1, które wykazało, iż podanie Everolimusu hamowało rozrost guzów. Był to przełom w leczeniu, gdyż do momentu wprowadzenia rapamycyny skuteczne było tylko chirurgiczne usunięcie guza, które wiązało się z dużo większym ryzykiem dla pacjenta niż przyjęcie leku. Obecnie leczenie rapamycyną lub jej pochodnymi jest terapią pierwszego wyboru w przypadku leczenia SEGA.

Pozytywne efekty wykorzystania rapamycyny w przeciwdziałaniu epilepsji w przedklinicznych modelach stwardnienia guzowatego spowodowały, iż zaczęto testować efektywność rapamycyny również w innych mTORopatiach charakteryzujących się padaczką, np. związanych z mutacjami w genach *PTEN* czy *MTOR*. Również w tym przypadku efekty okazały się obiecujące [19]. Podobnie zresztą, jak w przypadku części modeli zwierzęcych, w których padaczkę wywołano farmakologicznie lub przy użyciu elektrostymulacji [19]. Stąd nadzieja, iż rapamycyna stanie się istotnym dodatkiem do arsenału leków, jakie będą mogli wykorzystać lekarze do wspomagania leczenia szczególnie ciężkich przypadków epilepsji. Na przykład do leczenia tych przypadków, w których zwiodło leczenie operacyjne (ClinicalTrials.gov Identyfikator: NCT03646240).

Jednak SG i towarzysząca jej padaczka nie są jedyne choroby związane z układem nerwowym, w których terapii rozważane jest użycie rapamycyny lub jej pochodnych. Na stronie ClinicalTrials.gov zarejestrowanych jest obecnie ponad 20 badań klinicz-

nych tego typu. Duża część z nich dotyczy guzów mózgu. Inną interesującą grupę stanowią badania mające na celu wspomoczenie terapii osób z chorobą Alzheimera. Zainteresowanie możliwością wykorzystania rapamycyny w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, w szczególności choroby Alzheimera, wynika z dwóch głównych przyczyn. Po pierwsze, ze względu na udział mTOR w regulacji syntezy i degradacji białek. Symptomy chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy Huntingtona, są między innymi powodowane przez nadmierne nagromadzenie się w komórkach wadliwie sformowanych białek. A zatem ograniczenie ich syntezy lub wspomoczenie ich degradacji przy użyciu rapamycyny mogłoby przynieść efekty terapeutyczne. Z drugiej strony, szczególnie w przypadku choroby Alzheimera, głównym czynnikiem ryzyka jest wiek. Badania z wykorzystaniem różnych organizmów modelowych jasno wskazywały, iż rapamycyna, prowadząc do zahamowania mTOR, przedłuża życie i najprawdopodobniej spowalnia starzenie oraz, jak już wspomniano powyżej, poprawia funkcje kognitywne w wybranych sytuacjach. Dlatego też już dość wcześnie zaczęto prowadzić badania z wykorzystaniem materiału od pacjentów w celu określenia aktywności ścieżki mTOR w chorobie Alzheimera. Z kolei w modelach zwierzęcych tej choroby starano się oszacować potencjalną użyteczność rapamycyny jako leku. I choć badania prowadzone przez różnych autorów niekoniecznie zgadzały się w 100%, wydaje się, iż istotnie zastosowanie rapamycyny w modelach przedklinicznych chorób neurodegeneracyjnych pozwala przeciwdziałać takim zjawiskom jak śmierć komórek neuronalnych czy deficyty uczenia się i pamięci [2]. Na poziomie komórkowym wykazano, iż podawanie rapamycyny przeciwdziało gromadzeniu się toksycznego β -amyloidu i spadkowi wydajności mitochondriów, stanowiących energetyczne centra komórki, kluczowe dla sprawnego funkcjonowania neuronów. Na poziomie całego mózgu rapamycyna poprawiała wydajność systemu naczyniowego mózgu (np. przepływ krwi w mózgu, gęstość i szczelność naczyń), jak i podnosiła sprawność metaboliczną mózgu [8]. To wszystko najprawdopodobniej przekładało się ostatecznie na lepsze wyniki testów pamięciowych u mysich pacjentów traktowanych rapamycyną. Czy podobne efekty uda się uzyskać u ludzi? Na stronie clinicaltrials.gov zarejestrowane są obecnie dwa badania kliniczne adresujące to pytanie i dopiero ich wyniki dadzą wstępną odpowiedź.

Powyższe przykłady wskazują na duży potencjał terapeutyczny rapamycyny w przypadku niektórych chorób układu nerwowego, zarówno w okresie jego

rozwoju, jak i starzenia się. Wydaje się również, iż podawanie rapamycyny może skutkować poprawą funkcji kognitywnych w trakcie normalnego procesu starzenia się mózgu (przynajmniej u zwierząt). Stąd głosy wielkich entuzjastów rapamycyny, iż nie należy dłużej czekać z jej powszechnym wprowadzaniem do kliniki, a niewątpliwe efekty uboczne jej stosowania są albo zaniedbywalne albo do uniknięcia przy innym reżimie jej stosowania. Taka postawa wydaje się chyba nadmiernie optymistyczna, choćby w kontekście odkryć dotyczących związku obniżenia aktywności mTORC1 z objawami neuropsychiatrycznymi, np. z depresją. W tym kontekście warto wspomnieć dwa badania, w których u pewnej liczby pacjentów po przeszczepie nerek, przyjmujących długoterminowo pochodne rapamycyny, notowano zaburzenia uwagi, pamięci krótkotrwałej czy zaburzenia adaptacyjne. Te ostatnie miały być efektem wpływu leku na neuralne komórki macierzyste mózgu. Warto nadmienić w tym kontekście, iż firma Navitor Pharma prowadzi badania nad wykorzystaniem aktywatora mTORC1 do leczenia lekoopornej depresji. Stąd wydaje się, że rapamycyna nie będzie panaceum na wszystko i jej stosowanie jednak powinno mieć solidne przesłanki molekularne. Alternatywą może być też bardziej celowane użycie rapamycyny, ograniczające jej działanie systemowe. Taki sposób jest powszechny w przypadku kardiochirurgii, jednak w przypadku

chorób mózgu jego zastosowanie może być ogromnym wyzwaniem.

Podsumowanie

Prawie 60 lat temu rozpoczęła się historia rapamycyny, substancji, która w XXI wieku stała się zarówno ważnym narzędziem badań podstawowych nad układem nerwowym, jak i potencjalnym lekiem w terapii padaczki czy choroby Alzheimera. Dzięki rapamycynie dowiedzieliśmy się, jak ważny dla rozwoju i funkcjonowania układu nerwowego jest mTOR. Powiązaliśmy poszczególne etapy rozwoju czy funkcje neuronów z konkretnymi zmianami patologicznymi, zarówno w rozwoju mózgu, jak i na dalszych etapach naszego życia. Podczas gdy wciąż wielu badaczy pracuje nad coraz bardziej szczegółowym wyjaśnieniem, co robi w komórkach nerwowych mTOR, z perspektywy społeczeństwa najciekawszy rozdział w historii rapamycyny właśnie nadchodzi i dotyczy jej wykorzystania jako leku w schorzeniach układu nerwowego. Nie tylko tych opisanych w niniejszym artykule, ale także w przypadku chorób neuropsychiatrycznych. Czas pokaże, czy rapamycyna lub jej pochodne pomogą w terapii niepełnosprawności umysłowej czy chorób ze spektrum autyzmu, ale badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych pozwalają mieć taką nadzieję.

Bibliografia

1. Bekinschtein P, Katze C, Slipczuk LN, Igaz LM, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. (2007) mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiol Learn Mem.*;87:303–7.
2. Celebi-Birand ED, Karoglu ET, Doldur-Balli F, Adams MM. (2016) Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), Aging, Neuroscience, and Their Association with Aging-Related Diseases. In: *Molecules to Medicine with mTOR*. Elsevier; p. 185–203. doi:10.1016/B978-0-12-802733-2.00007-4
3. Cloetta D, Thomanetz V, Baranek C, Lustenberger RM, Lin S, Oliveri F, Atanasoski S, Ruegg MA. (2013) Inactivation of mTORC1 in the developing brain causes microcephaly and affects gliogenesis. *J Neurosci.*;33:7799–810. doi:10.1523/JNEUROSCI.3294-12.2013
4. Hartman NW, Lin TV, Zhang L, Paquelet GE, Feliciano DM, Bordey A. (2013) mTORC1 targets the translational repressor 4E-BP2, but not S6 kinase 1/2, to regulate neural stem cell self-renewal in vivo. *Cell Reports.*;5:433–444. doi:10.1016/j.celrep.2013.09.017
5. Jaworski J, Sheng M. (2006) The growing role of mTOR in neuronal development and plasticity. *Mol Neurobiol.*;34:205–19. doi:10.1385/MN:34:3:205
6. Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M. (2005) Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci.*;25:11300–12. doi:10.1523/JNEUROSCI.2270-05.2005
7. Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J, Wu GY. (2005) Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci.*;25:11288–99. doi:10.1523/JNEUROSCI.2284-05.2005

8. Lee J, Yanckello LM, Ma D, Hoffman JD, Parikh I, Thalman S, Bauer B, Hartz AMS, Hyder F, Lin A-L. (2018) Neuroimaging Biomarkers of mTOR Inhibition on Vascular and Metabolic Functions in Aging Brain and Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience.*;10:225. doi:10.3389/fnagi.2018.00225
9. Lipton JO, Sahin M. (2014) The neurology of mTOR. *Neuron.*;84:275–291. doi:10.1016/j.neuron.2014.09.034
10. Macias M, Blazejczyk M, Kazmierska P, Caban B, Skalecka A, Tarkowski B, Rodo A, Konopacki J, Jaworski J. (2013) Spatiotemporal characterization of mTOR kinase activity following kainic acid induced status epilepticus and analysis of rat brain response to chronic rapamycin treatment. *PLoS One.*;8:e64455. doi:10.1371/journal.pone.0064455
11. Majumder S, Caccamo A, Medina DX, Benavides AD, Javors MA, Kraig E, Strong R, Richardson A, Oddo S. (2012) Lifelong rapamycin administration ameliorates age-dependent cognitive deficits by reducing IL-1 β and enhancing NMDA signaling. *Aging Cell.*;11:326–335. doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00791.x
12. Malik AR, Urbanska M, Macias M, Skalecka A, Jaworski J. (2013) Beyond control of protein translation: what we have learned about the non-canonical regulation and function of mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochim Biophys Acta.*;1834:1434–48. doi:10.1016/j.bbapap.2012.12.010
13. Oh WJ, Jacinto E. (2011) mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle.*;10:2305–2316. doi:10.4161/cc.10.14.16586
14. Perluigi M, Di Domenico F, Butterfield DA. (2015) mTOR signaling in aging and neurodegeneration: At the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy. *Neurobiol. Dis.*;84:39-49. doi:10.1016/j.nbd.2015.03.014
15. Piper M, Anderson R, Dwivedy A, Weinl C, van Horeck F, Leung KM, Cogill E, Holt C. (2006) Signaling mechanisms underlying Slit2-induced collapse of Xenopus retinal growth cones. *Neuron.*;49:215–28.
16. Sabatini DM. (2017) Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*;114:11818–11825. doi:10.1073/pnas.1716173114
17. Saxton RA, Sabatini DM. (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell.*;168:960–976. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004
18. Swiech L, Perycz M, Malik A, Jaworski J. (2008) Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochim Biophys Acta.*;1784:116–32. doi:10.1016/j.bbapap.2007.08.015
19. Switon K, Kotulska K, Janusz-Kaminska A, Zmorzynska J, Jaworski J. Molecular neurobiology of mTOR. (2017) *Neuroscience.*;341:112–153. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.11.017
20. Switon K, Kotulska K, Janusz-Kaminska A, Zmorzynska J, Jaworski J. (2016) Tuberous sclerosis complex: From molecular biology to novel therapeutic approaches. *IUBMB life.*;68:955–962. doi:10.1002/iub.1579
21. Tang SJ, Reis G, Kang H, Gingras AC, Sonenberg N, Schuman EM. (2002) A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;99:467–72. doi: 10.1073/pnas.012605299
22. Tischmeyer W, Schicknick H, Kraus M, Seidenbecher CI, Staak S, Scheich H, Gundelfinger ED. (2003) Rapamycin-sensitive signalling in long-term consolidation of auditory cortex-dependent memory. *Eur J Neurosci.*; 18:942–50. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02820.x.
23. Urbanska M, Gozdz A, Swiech LJ, Jaworski J. (2012) Mammalian target of rapamycin complex 1 (MTORC1) and 2 MTORC2) control the dendritic arbor morphology of hippocampal neurons. *J Biol Chem.*;287: 30240–30256. doi: 10.1074/jbc.M112.374405