

mgr inż. Przemysław Leonard Wencel

**Udział polimerazy poli(ADP-rybozy)-1 oraz bioaktywnych sfingolipidów
w toksyczności peptydów amyloidu beta w doświadczalnych modelach
choroby Alzheimer**

Rozprawa na stopień doktora
Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie: nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Robert Strosznajder, prof. IMDiK



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2019

Streszczenie

Choroba Alzheimera (ChA) jest chorobą neurodegeneracyjną, powodującą nieodwracalne zmiany w mózgu, które w konsekwencji doprowadzają do ciężkiego otępienia. Pomimo wielomilionowych nakładów na badania i rozwój w dalszym ciągu nie wynaleziono skutecznej terapii, która mogłaby zahamować rozwój tej choroby. Do charakterystycznych cech neuropatologicznych ChA zalicza się nadmierne ufosforylowanie białka tau, które tworzy tzw. sploty neurofibrylarne oraz obecność złogów peptydu amyloidu beta ($A\beta$), który powstaje z białka APP przy udziale enzymów nazywanych sekretazami na drodze amyloidogennej. Kolejną równie ważną cechą związaną z ChA jest obecność ciał Lewy'ego zawierających α -synukleinę (ASN), które są obserwowane podczas autopsji aż u około 50-60% pacjentów z ChA. Zarówno peptyd $A\beta$, jak i ASN w warunkach patologicznych na skutek zmiany konformacji, agregacji oraz oligomeryzacji mogą przybierać formy toksyczne, z których to oligomery (dimery) wymieniane są jako jedne z najbardziej szkodliwych. W wyniku toksycznego oddziaływania peptydu $A\beta$ oraz białka ASN może dochodzić do zaburzenia równowagi jonowej w neuronach, aktywacji procesów zapalnych, zaburzenia i uszkodzenia neuronów (synaps i neurytów), wzrostu stresu oksydacyjnego oraz zmian w aktywności kinaz i fosfataz, co w końcowym efekcie powoduje obumieranie komórek nerwowych.

Jednym z istotnych enzymów, do którego nadreaktywności dochodzi podczas stresu oksydacyjnego jest NAD^+ zależna polimeraza poli(ADP-rybozy)-1 (PARP1). Wzrost jej aktywności zaobserwowano w mózgach osób chorych na ChA. Enzym ten podczas przebiegu ChA zostaje aktywowany w odpowiedzi na dużą liczbę uszkodzeń DNA wywołanych przez $A\beta$. Powoduje to obniżenie się puli NAD^+ oraz ATP, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki. Dodatkowo, PARP1 poprzez regulację dostępności substratu, którym jest NAD^+ może brać udział w modulacji aktywności innej grupy enzymów – deacetylaz histonów klasy III - sirtuin. Sirtuiny (SIRTy), podobnie jak PARPy mają istotne znaczenie w regulacji białek oraz czynników transkrypcyjnych, które są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórki. Jedną z najlepiej poznanych sirtuin jest SIRT1, która wykazuje działanie neuroprotektcyjne w wielu chorobach neurodegeneracyjnych poprzez regulację procesów zapalnych, enzymów antyoksydacyjnych, udział w naprawie DNA, regulację starzenia się oraz śmierci komórki. Sirtuina ta może również brać udział w promowaniu ścieżki nieamyloidogennej

metabolizmu APP poprzez aktywację białka ADAM10 wykazującego działanie α -sekreazy. Niestety poziomy SIRT1 mogą ulegać znacznemu obniżeniu w ChA.

Badania ostatnich lat wykazały, że zarówno do wzrostu poziomu peptydu A β , jak również do nadreaktywności enzymu PARP1 może przyczyniać się ceramid, należący do rodziny bioaktywnych sfingolipidów. Bioaktywne sfingolipidy stanowiące ważny składnik błony komórkowej są również molekułami sygnalizacyjnymi mającymi istotne znaczenie w regulacji procesów zachodzących w komórce, takich jak: przeżycie, różnicowanie, proliferacja czy programowana śmierć. Oprócz ceramidu, który w stanach patologicznych ma działanie pro-apoptotyczne, do rodziny bioaktywnych sfingolipidów można zaliczyć pro-życiowy ceramido-1-fosforan (C1P) oraz sfingozyno-1-fosforan (S1P). Podczas przebiegu ChA w mózgach chorych obserwuje się wzrost poziomu niektórych ceramidów wraz z towarzyszącym mu obniżeniem się poziomu S1P. Sytuacja ta może doprowadzić do zaburzenia równowagi pomiędzy ceramidem a S1P, mającej istotne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórki.

Pomimo wieloletnich badań nad znaczeniem peptydów A β oraz sekwencją procesów molekularnych w patologii ChA, patogeneza choroby nie jest do końca wyjaśniona, a dotychczas stosowana terapia nie przynosi satysfakcjonujących efektów. Wobec powyższego, niezwykle ważnym jest prowadzenie badań zmierzających do lepszego zrozumienia zaburzeń molekularnych leżących u podstaw tej choroby oraz weryfikacja działania wybranych związków neuroprotekcyjnych. Dlatego też, celem niniejszej pracy było zbadanie poziomu mRNA genów kodujących enzymy metabolizmu APP, enzymy NAD⁺-zależne (PARPy i SIRTy), enzymy metabolizmu bioaktywnych sfingolipidów oraz wybrane białka pro- i anty-apoptotyczne w doświadczalnych modelach choroby Alzheimerera. Ponadto, uwzględniono działanie inhibitora polimerazy poli(ADP-rybozy) 1 (PARP1) oraz modulatora receptorów sfingozyno-1-fosforanu (S1P).

W niniejszych badaniach zastosowano komórkowy model toksyczności peptydów A β (linia guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy szczura (*Pheochromocytoma*, PC12)) wywołany poprzez podanie zewnątrzkomórkowe oligomerów A β 1-42, jak również użyto komórek PC12 transfekowanych genem APP, które charakteryzowały się zwiększoną produkcją peptydu A β . Dodatkowo, w komórkach traktowanych A β 1-42 sprawdzono działanie inhibitora polimerazy poli(ADP-rybozy) – PJ-34 na poziom mRNA genów kodujących enzymy metabolizmu APP oraz PARPy i SIRTy. Komórki PC12 traktowano

również egzogennymi oligomerami ASN. Wyniki dotyczące poziomu mRNA genów kodujących enzymy metabolizmu APP, PARPy i SIRTy, kinazy sfingozyny, kinazę ceramidu, receptory S1P oraz białko anty-apoptotyczne Bcl-2 po działaniu A β , A β o i ASNo porównywano z danymi uzyskanymi w modelu zwierzęcym – myszy FVB/APP^{+/-} z mutacją londyńską genu APP^{Val717Ile}, które stanowiły model rodzinnej postaci choroby Alzheimera. Zwierzętom z mutacją genu APP podawany był również modulator receptorów dla S1P – fingolimod/FTY720. Badania prowadzono w oparciu o wybrane metody biologii molekularnej, spektrofotometryczne, spektrofluorymetryczne oraz mikroskopowe.

Przeprowadzone badania wykazały, że egzogenne A β spowodował istotny wzrost poziomu mRNA sekretaz zaangażowanych w amyloidogenną ścieżkę metabolizmu APP (*Bace1*, *Psen1*, 2). Wzrosty te (*Bace1*, *Psen1* i 2), zostały również zaobserwowane w transfekowanych komórkach PC12 zawierających gen APP typu dzikiego (APPwt). Natomiast w komórkach zawierających mutację genu APP typu szwedzkiego (APPsw) wykazano wzrost poziomu mRNA *Psen2*. Ponadto, w komórkach traktowanych ASNo zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA *Adam10*. W modelu tym zaobserwowano też zmiany w poziomie mRNA genów kodujących metaloproteinazy - 2,10,11.

W przypadku genów kodujących PARPy i SIRTy zauważono co najważniejsze obniżenie poziomu mRNA *Sirt1* zarówno po traktowaniu A β o1-42, jak i w mózgach myszy transgenicznym. Efekt ten zaobserwowano również w komórkach PC12 traktowanych egzogennymi ASNo. Ponadto, w modelu komórkowym toksyczności A β o1-42 zaobserwowano istotny wzrost poziomu mRNA *Sirt4* i *Sirt5* oraz wzrost *Parp1*. Natomiast, endogenne peptydy A β powodowały wzrost poziomu mRNA *Sirt3* w komórkach APPwt i APPsw oraz wzrost poziomu mRNA *Parp1* i 2 w linii APPsw. Wykazano również, że egzogenne ASNo wpłynęły na wzrost poziomu mRNA *Sirt3*, 5 oraz *Parp2* i 3. Badania z użyciem inhibitora PARP (PJ-34) po raz pierwszy wykazały jego znaczący udział w regulacji/wzroście transkrypcji genów *Sirt1* i 4, *Parp3*, jak również genów związanych z metabolizmem APP.

Analiza poziomu mRNA dla genów związanych z syntezą S1P wykazała istotne obniżenie poziomu mRNA dla kinazy sfingozyny 2 zarówno w obu liniach komórkowych transfekowanych genem APP, jak również w komórkach nietransfekowanych po podaniu ASNo. Obniżenie to zaobserwowano również w korze mózgowej i hipokampie myszy APP⁺ 12-miesięcznych. Ponadto, zauważono istotne obniżenie się aktywności SPHK1/2 w warunkach toksyczności oligomerów ASN. Kolejną istotną zmianą było zaobserwowane

w przypadku komórek PC12 transfekowanych genem APP, jak i u zwierząt 12-miesięcznych APP⁺ obniżenie poziomu mRNA *Slpr1*, kodującego receptor 1 dla S1P oraz co istotne obniżenie poziomu mRNA dla genu *Cerk*, kodującego kinazę ceramidu (która bierze udział w przekształcaniu ceramidu do jego pro-życiowej formy C1P). W badaniach zaobserwowano również istotne obniżenie poziomu mRNA genu kodującego pro-życiowe białko Bcl-2, zarówno w liniach transfekowanych genem APP, komórkach traktowanych ASNo, jak również u zwierząt transgenicznym. Podanie modulatora receptorów S1P - FTY720 myszom APP⁺ wpłynęło na wzrost poziomu mRNA *Parp1*, *Sirt1*, 3, 5 w korze mózgowej myszy 6- i 12-miesięcznych oraz na zależny od wieku wzrost poziomu mRNA *Sphk*. W niniejszej rozprawie wykazano po raz pierwszy wzrost poziomu mRNA genu kodującego kinazę ceramidu zaobserwowany po podaniu FTY720. Istotną zmianą był również wzrost poziomu mRNA genu kodującego pro-życiową formę białka Bcl-2 po podaniu FTY720 myszom FVB/APP⁺.

Zaobserwowane zmiany w poziomie ekspresji genów kodujących enzymy metabolizmu APP, PARPy i SIRTy, kinazy sfingozyny, kinazę ceramidu, receptory S1P oraz wybrane białka pro- i anty-apoptotyczne wskazują na istotną rolę A β , A β o i ASNo w ich regulacji. Farmakologiczne zahamowanie aktywności PARP1, jak również modulacja receptorów dla S1P może wykazywać działanie neuroprotektoryjne, poprzez regulację poziomu mRNA w/w białek i receptorów. Zastosowanie inhibitorów PARP lub modulatorów receptorów S1P może stanowić potencjalny punkt uchwytu w terapii ChA.