

**Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego
Polska Akademia Nauk**

Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału



AUTOREFERAT ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Magdalena Cieślik

**Znaczenie czynnika indukującego apoptozę AIF
w toksyczności peptydów amyloidu β
i w genotoksyczności N-metyl-N'-nitro-N-
nitrozoguanidyny MNNG**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. n. med. Joanny B. Strosznajder

Warszawa 2012

Stres oksydacyjny odgrywa istotne znaczenie w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Alzheimera i Parkinsona. Pomimo intensywnych badań dokładny mechanizm prowadzący do stresu oksydacyjnego w tych schorzeniach nie jest dokładnie poznany, a zjawiska molekularne i szlaki obumierania komórek spowodowane aktywacją stresu oksydacyjnego i genotoksycznego, nie są w pełni wyjaśnione. W wyniku działania wolnych rodników może dochodzić do zmian wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału, ekspresji genów oraz zmian strukturalnych i funkcjonalnych, w tym do zaburzenia funkcji mitochondriów i enzymów naprawy DNA. W konsekwencji zmiany te mogą prowadzić do aktywacji szlaków śmierci komórki. Poznanie mechanizmów warunkujących przeżycie lub doprowadzających do śmierci jest istotne w odniesieniu do nowych działań neuroprotektoryjnych.

Zaburzenia funkcji mitochondriów zaliczane są do kluczowych zjawisk w patomechanizmie wielu chorób neurodegeneracyjnych. Jednym z głównych białek zaangażowanych w prawidłową funkcję mitochondriów jest czynnik indukujący apoptozę (AIF). Natomiast odbiorcą licznych szlaków przekazywania i kaskady wolnorodnikowej jest jądrowy enzym synteza poli(ADP-rybozy) (PARS-1), która w znaczący sposób wpływa na stan energetyczny komórki i potencjał błony mitochondrialnej oraz dodatkowo może regulować poziom AIF.

Białko AIF to flawoproteina związana z przestrzenią międzybłonową mitochondriów, która razem z białkami AMID i AIFL współtworzy jedną rodzinę, której funkcje fizjo-patologiczne nie są jeszcze w pełni poznane. W warunkach fizjologicznych AIF posiada właściwości oksydoreduktazy NADH i odgrywa istotną rolę w fosforylacji oksydacyjnej oraz w obronie wolnorodnikowej (Susin i wsp., 1999; Miramar i wsp., 2001; Hangen i wsp., 2010). Zawiera trzy funkcjonalne domeny: wiążącą FAD, wiążącą NADH i domenę C-końcową (Otera i wsp., 2005; Modjtahedi i wsp., 2006). Dwie pierwsze domeny AIF odpowiedzialne są za oksydoredukcyjną funkcję białka. W warunkach fizjologicznych biorą one udział w transporcie elektronów jako elementy składowe kompleksu I i III łańcucha transportu elektronów (Modjtahedi i wsp., 2006; Hangen i wsp., 2010). Wiadomo również, że domena C-końcowa odpowiedzialna jest za właściwości apoptotyczne AIF. W odpowiedzi na sygnał proapoptotyczny białko to transportowane jest z mitochondrium do jądra komórki, gdzie wraz z cyklofiliną A

indukuje kondensację chromatyny i fragmentację DNA, na drodze niezależnej od kaspaz (Yu i wsp., 2006; Krantic i wsp., 2007).

Dotychczasowe badania pokazują, że białko AIF jest bardzo konserwowane ewolucyjnie i niezbędne dla rozwoju embrionalnego (już od dziewiątego dnia) (Brown i wsp., 2006). Jego brak prowadzi do neurodegeneracji, zaniku mięśni szkieletowych i kardiomiopatii (Klein i wsp., 2002). Ponadto, jego niska ekspresja wpływa na upośledzenie homeostazy wolnych rodników (Apostolova i wsp., 2006), co w konsekwencji prowadzi do stresu oksydacyjnego i uszkodzenia makromolekuł. Oksydacja DNA i jedno lub dwuniciowe jego pęknięcie powodują aktywację jądrowego enzymu PARS, określanego również mianem polimerazy (PARP) (Strosznajder i wsp., 2005a, 2011; Moroni i wsp., 2011). PARS-1 bierze udział w wykryciu oraz naprawie uszkodzeń DNA, w modyfikacji chromatyny oraz w regulacji transkrypcji. Jest on kluczowy dla utrzymania stabilności genomu i zaangażowany w przebieg patofizjologicznych i patologicznych procesów takich jak: starzenie, niedokrwienie mózgu i serca, stan zapalny (Strosznajder i wsp., 2005a, b, 2011; Moroni i wsp., 2011). W warunkach stresu oksydacyjnego i genotoksycznego dochodzi do nadmiernej aktywacji PARS-1, zużycia βNAD^+ , a w konsekwencji i ATP. Ponadto produkt PARS-1, poli(ADP-ryboza) PAR jest cząstką sygnalizacyjną, która bierze udział w regulacji funkcji czynników transkrypcyjnych (np. p53), a dodatkowo może wiązać się z błoną mitochondrialną i prowadzić do wypływu AIF z mitochondriów oraz jego translokacji do jądra (Yu i wsp., 2006). W konsekwencji prowadzi to do śmierci komórki na drodze apoptozy niezależnej od kaspaz określanej mianem partanatos (Andrabi i wsp., 2008).

Celem pracy było zbadanie **ekspresji genu i poziomu białka czynnika indukującego apoptozę (AIF) oraz jego udziału w procesach przeżycia i śmierci komórek w warunkach działania peptydów amyloidu β , stresu oksydacyjnego/nitrozacyjnego oraz genotoksycznego. Ponadto, zbadano zależność pomiędzy poziomem AIF w mitochondriach a aktywnością PARS-1/poziomem PAR i przeżywalnością komórek.**

Cel został zrealizowany przez wykonanie następujących zadań szczegółowych:

- Zbadanie poziomu i lokalizacji białka AIF w komórkach PC12, transfekowanych ludzkim genem APP typu dzikiego (APPwt) oraz z mutacją

szwedzką (APP^{sw}), charakteryzujących się różnym poziomem sekrecji peptydów A β ₁₋₄₀, a także poddanych działaniu egzogennych peptydów A β ₁₋₄₂. Porównanie uzyskanych wyników *in vitro* z badaniami w zwierzęcym modelu choroby Alzheimera, myszach transgenicznym APP^{+/+}.

- Określenie poziomu i aktywności PARS-1 we frakcji jądrowej trzech typów komórek PC12, charakteryzujących się różnym poziomem sekrecji peptydów A β .
- Zbadanie i porównanie wpływu stresu nitrozacyjnego wywołanego donorem tlenku azotu, nitroprusydkiem sodu (SNP), na poziom białka AIF, poziom i aktywność PARS oraz przeżywalność komórek PC12.
- Zbadanie znaczenia AIF i PAR w obumieraniu neuronów hipokampa, komórek HT22 w odpowiedzi na stres genotoksyczny wywołany czynnikiem alkilującym DNA, MNNG. Ocena działania inhibitorów PARS-1 i innych wyselekcjonowanych związków protekcyjnych na poziom AIF w mitochondriach i przeżywalność komórek.

Badania prowadzono na szczurzych komórkach pochodzenia nerwowego PC12 oraz na mysich neuronach hipokampa HT22. Do badań użyto komórki PC12 transfekowane pustym wektorem oraz ludzkim genem dla białka prekursorowego A β typu dzikiego APP^{wt} i z mutacją szwedzką APP^{sw}. Wymienione komórki endogennie uwalniają różne ilości peptydów A β ₁₋₄₀. Ponadto komórki PC12 kontrolne poddano zewnątrzkomórkowemu działaniu egzogennych peptydów A β ₁₋₄₂ i dodatkowemu stresowi nitrozacyjnemu. Wyniki dotyczące poziomu i ekspresji AIF po działaniu peptydów A β porównywano z danymi uzyskanymi w badaniach na zwierzętach transgenicznym - myszach z mutacją londyńską w genie dla APP (FVB^{Tg}(Thy1;APP)^{Val717Ile}), które stanowią model rodzinnej choroby Alzheimera. W badaniach molekularnych zjawisk wpływających na poziom AIF w mitochondriach i jego translokację do jądra, szczególną uwagę zwrócono na aktywność i integralność jądrowego enzymu PARS-1. W badaniach oceniano także wewnątrzkomórkowy poziom wolnych rodników za pomocą testu fluorymetrycznego DCF oraz wrażliwość komórek na stres oksydacyjny i ich przeżycie za pomocą testu MTT. Udział AIF w molekularnych mechanizmach przeżycia i śmierci komórek badano również w warunkach stresu genotoksycznego, wywołanego alkilacją DNA przez związek genotoksyczny – MNNG.

Związki genotoksyczne sę szeroko rozpowszechnione w řrodowisku naturalnym. Należę do nich składowe dymu papierosowego, produkty uboczne procesów przemysłowych oraz np. leki stosowane w terapii antynowotworowej. Ich mechanizm działania i skutki, jakie wywołują w organizmach żywych, a w szczególności w komórkach nerwowych, nie sę wystarczająco dobrze poznane. Szczególnę uwagę w prowadzonych doświadczeniach zwrócono na znaczenie PARS-1 i pod tym względem przetestowano liczne związki o charakterze neuroprotekcijnym.

W prezentowanych badaniach stwierdzono zależny od stężenia A β i stresu oksydacyjnego wzrost poziomu białka AIF w mitochondriach komórek PC12 transfekowanych genem dla APP oraz w komórkach PC12 kontrolnych, poddanych działaniu egzogenneę peptydu A β ₁₋₄₂. Działanie stresu nitrozacyjnego wywołanego donorem NO także powodowało wzrost poziomu białka AIF w mitochondriach. W warunkach tych obserwowano nieznaczny odsetek obumierających komórek. Podwyższony poziom białka AIF obserwowano również w korze mózgu i prędkowiu w zwierzęcym modelu choroby Alzheimera (AD) u myszy transgenicznę APP^{+/+} z mutacją londyńską. Powyższę zmianom towarzyszyło znaczące obniżenie aktywności PARS-1 zarówno w komórkach APP^{sw}, jak i po zastosowaniu donora NO (nitroprusydku sodu, SNP).

W doświadczeniach prowadzonych w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego czynnikiem alkilującym DNA, MNNG, stwierdzono wzrost uwalniania AIF z mitochondriów i jego translokację do jądra. Równocześnie zaobserwowano wzrost poziomu PAR (świadczący o aktywacji PARS-1) oraz obumieranie znaczącej puli komórek. Efekt ten był niwelowany przez zastosowanie inhibitorów PARS-1 (PJ 34 i 3-AB), a także tetracyklin trzeciej generacji (mino- i doksycykliny) oraz wielonienasyconego kwasu tłuszczowego dokozaheksaenowego (DHA). Korzystne dodatkowe działanie wykazywało zahamowanie kalpainy, a także kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym ERK1/2.

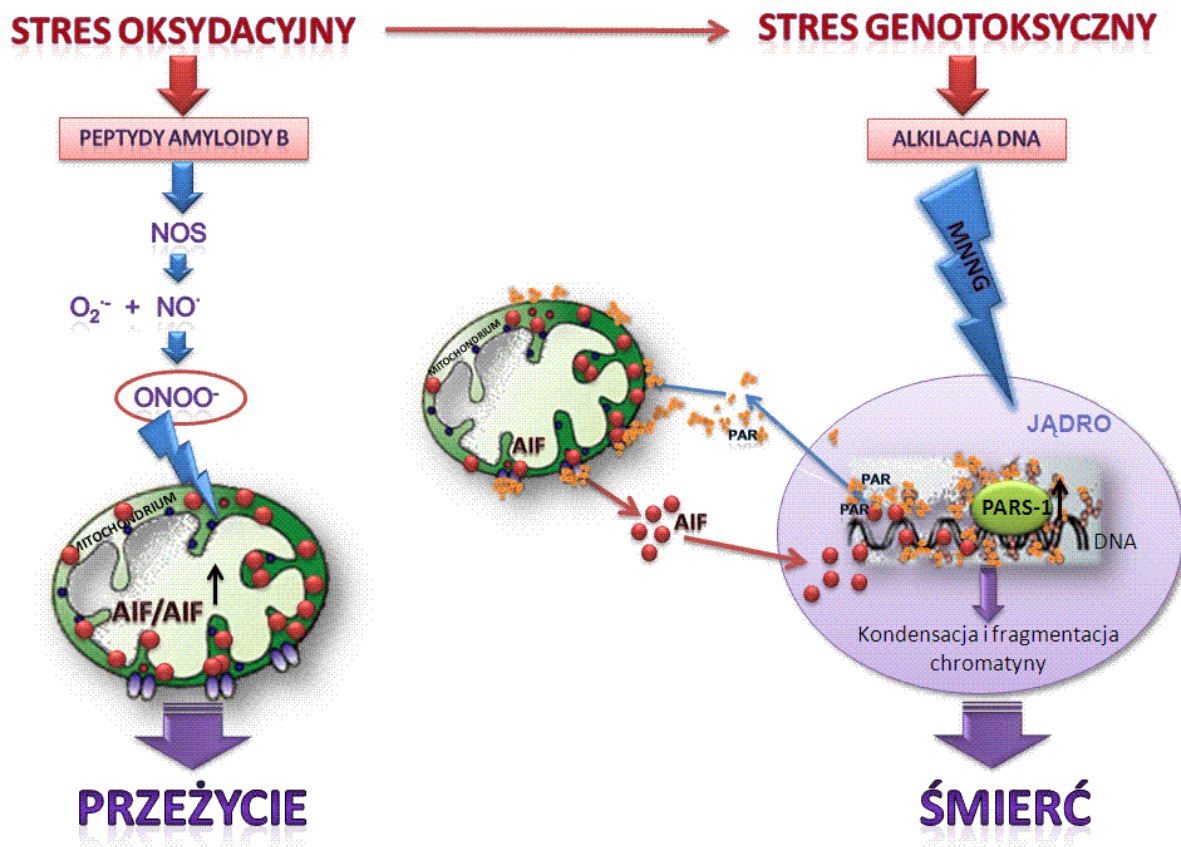
Dodatkowo zaobserwowano, że stres genotoksyczny wywołany alkilacją DNA powoduje obniżenie ekspresji białek antyapoptotycznych BclXl i Bcl2 oraz wzrost ekspresji genu dla białka proapoptotycznego Bax, które może przyczyniać się do wpływu AIF z mitochondrium.

Uzyskane dane pozwoliły na poniższe podsumowanie i wysunięcie nastęęujących wniosków:

- ♦ Stwierdzono podwyższony poziom białka AIF w mitochondriach komórek PC12 transfekowanych genem APP z mutacją szwedzką (APP^{sw}) oraz w zwierzęcym modelu AD u myszy transgeniczných z mutacją londyńską APP^{+/+}. Te same zmiany wykazano w komórkach PC12 kontrolnych poddanych działaniu egzogenneę A β ₁₋₄₂ i stresu nitrozacyjnego. W opisanych warunkach stwierdzono obumieranie niewielkiej puli komórek.

Wyniki te mogą wskazywać na udział białka AIF w procesach obronnych/adaptacyjnych umożliwiających przeżycie dużej populacji komórek.

- ♦ Obniżenie aktywności PARS-1 w komórkach APP^{sw} może być spowodowane działaniem NO uwalnianego przez A β lub automodyfikacją enzymu. Stwierdzona modyfikacja enzymu wyklucza jego aktywny udział w mechanizmie śmierci komórek, ale w istotny sposób może zaburzać proces naprawy DNA.
- ♦ Uzyskane wyniki wskazują na fundamentalne znaczenie ścieżki sygnałowej zależnej od AIF i PARS-1/PAR w mechanizmie śmierci komórek HT22 w wyniku działania czynnika genotoksycznego MNNG. W śmierć komórek zależną od MNNG nie są zaangażowane: PKC i PKG, megakanał mitochondrialny, białko p53 ani też kaspaza-3.
- ♦ Stres genotoksyczny wywołany alkilacją DNA powoduje obniżenie ekspresji białek antyapoptotycznych Bcl-Xl i Bcl-2 oraz wzrost ekspresji genu dla białka proapoptotycznego Bax.
Zaburzenie ekspresji wymienionych białek i ich wzajemnych relacji może przyczyniać się do zmiany funkcji mitochondriów i wpływu AIF w badanych warunkach.
- ♦ W warunkach stresu genotoksycznego wywołanego zależną od MNNG alkilacją DNA inhibitory PARS-1 chronią komórki przed syntezą PAR, uwalnianiem AIF z mitochondriów i jego translokacją do jądra. W efekcie zwiększają one znacząco przeżycie neuronalnych komórek HT22. Tetracykliny trzeciej generacji oraz wielonienasycony kwas tłuszczowy DHA wykazują również istotne cytoprotekcyjne działanie.



Rycina 1. Podsumowanie

Stres oksydacyjny i genotoksyczny wpływają na uszkodzenie mitochondriów i nici DNA. Obserwowany podwyższony poziom białka AIF w mitochondriach komórek PC12 transfekowanych genem APP z mutacją szwedzką (APP^{Sw}) oraz w zwierzęcym modelu AD u myszy transgenicznych z mutacją londyńską APP^{+/-}, jak również w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennej $A\beta_{1-42}$ i stresu nitrozacyjnego, wskazuje na udział białka AIF w procesach obronnych/adaptacyjnych umożliwiających przeżycie komórek w tych warunkach.

W mechanizmie śmierci komórek w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego zależną od MNNG alkilacją DNA fundamentalną rolę odgrywa ścieżka sygnalizacyjna zależnej od AIF i PARS-1/PAR.

LITERATURA

- Apostolova N, Cervera AM, Victor VM, Cadenas S, Sanjuan-Pla A, AlvarezBarrientos A, Esplugues JV, McCreath KJ **(2006)** Loss of apoptosis-inducing factor leads to an increase in reactive oxygen species, and an impairment of respiration that can be reversed by antioxidants. *Cell Death Differ.* 13; 354–357
- Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL **(2008)** Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Ann N Y Acad Sci.* 1147; 233-41
- Brown D, Yu BD, Joza N, Benit P, Meneses J, Firpo M, Rustin P, Penninger JM, Martin GR **(2006)** Loss of Aif function causes cell death in the mouse embryo, but the temporal progression of patterning is normal. *PNAS*, 103, 26; 9918-9923
- Hangen E, Blomgren K, Bénit P, Kroemer G, Modjtahedi N **(2010)** Life with or without AIF. *Trends Biochem Sci.* 35(5):278-287
- Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL **(2002)** The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419(6905): 367-374
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion E **(2007)** Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death. *Progress in Neurobiology*, 81, 179-196
- Miramar D, Constantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, Susin SA **2001**. NADH oxidase activity 75 of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 19; 16391-16398
- Modjtahedi N, Giordanetto F, Madeo F, Kroemer G **(2006)** Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends in Cell Biology*, 16; 264-272
- Moroni F, Cozzi A, Chiarugi A, Formentini L, Camaioni E, Pellegrini-Giampietro DE, Chen Y, Liang S, Zaleska MM, Gonzales C, Wood A, Pellicciari R **(2011)** Long-lasting neuroprotection and neurological improvement in stroke models with new, potent and brain permeable poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Br J Pharmacol.* Sep 13. (online)
- Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, Ishihara N, Mihara K **(2005)** Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *The EMBO Journal*, 24; 1375-1386
- Strosznajder RP, Czubowicz K, Jesko H, Strosznajder JB **(2011)** Poly(ADP-ribose) metabolism in brain and its role in ischemia pathology. *Mol Neurobiol.* 41(2-3); 187-96
- Strosznajder RP, Jesko H, Adamczyk A **(2005)** Effect of aging and oxidative/genotoxic stress on poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity in rat brain. *Acta Biochim Pol.* 52(4); 909-914 a
- Strosznajder RP, Jesko H, Zambrzycka A **(2005)** Poly(ADP-ribose) polymerase. The nuclear target in signal transduction and its role in brain ischemia-reperfusion injury. *Mol Neurobiol*, 31; 149-167b
- Yu S-W, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL **(2006)** Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *PNAS*, 103(48); 18314-18319

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G **(1999)** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397; 441-446