

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

Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału



STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Magdalena Cieřlik

**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 uważany jest za jeden z głównych elementów patogenezы 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, 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 neuroprotekcyjnych.

Zaburzenia funkcji mitochondriów zaliczane są do grona kluczowych zjawisk związanych z patomechanizmem wielu chorób neurodegeneracyjnych. Jednym z głównych białek zaangażowanych w prawidłową funkcję mitochondriów jest czynnik indukujący apoptozę (AIF), a jądrowym odbiorcą licznych szlaków przekąźnictwa i kaskady wolnorodnikowej jest syntaza poli(ADP-rybozy) (PARS-1). AIF to flawoproteina związana z przestrzenią międzybłonową mitochondriów, która razem z białkami AMID i AIFL współtworzy rodzinę białek. Ich funkcje fizjo-patologiczne nie są w jeszcze w pełni poznane. W warunkach fizjologicznych AIF posiada właściwości oksydoreduktazy NADH i odgrywa istotną rolę w fosforylacji oksydacyjnej i 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 i w warunkach fizjologicznych biorą udział w transporcie elektronów jako elementy składowe kompleksu I i III łańcucha transportu elektronów (Miramar i wsp., 2001; Vashen i wsp., 2004; Modjtahedi i wsp., 2006; Hangen i wsp., 2010). Wiadomo również, że domena C-końcowa odpowiedzialna jest za właściwości apoptotyczne AIF i 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 (Hong i wsp., 2004; 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). A ponadto, jego niska ekspresja wpływa na upořsiedzenie 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 syntazy poli(ADP-rybozy) (PARS), określanej poprzednio mianem polimerazy (PARP) (Yu i wsp., 2002; Strosznajder i wsp., 2005, 2011; Moroni i wsp. 2011). PARS-1 bierze udział w wykryciu oraz naprawie uszkodzeń DNA, modyfikacji chromatyny oraz w regulacji transkrypcji. Jest on kluczowy dla przebiegu wielu patofizjologicznych i patologicznych procesów takich jak: utrzymanie stabilności genomu, starzenie, stan zapalny, czy karcenogeneza (Strosznajder i wsp., 2003; Beneke i Burkle, 2007, Moroni, 2008; AbdElmageed i wsp., 2011; Moroni i wsp., 2011). W warunkach stresu oksydacyjnego i genotoksycznego dochodzi do nadmiernej aktywacji PARS-1, zużycia β NAD⁺ i w konsekwencji ATP. Ponadto produkt PARS-1, poli(ADP-ryboza) PAR jest częstką sygnalizacyjną, której związanie się z błoną mitochondrialną może prowadzić do wypływu AIF z mitochondriów i jego translokacji do jądra (Yu i wsp., 2006). W konsekwencji prowadzi to do śmierci komórki na drodze apoptozy niezależnej od kaspaz.

Podjęte w niniejszej pracy zagadnienia miały na celu zbadanie ekspresji genu, poziomu białka i udziału AIF w procesach przeżycia i śmierci komórek w warunkach działania peptydów amyloidu β . W badaniach uwzględniono czynniki zaangażowane w aktywację stresu oksydacyjnego/nitrozacyjnego i genotoksycznego. Zbadano zależności pomiędzy poziomem AIF w mitochondriach a aktywnością PARS-1/poziomem PAR i przeżywalnością komórek. Oceniano działanie cytoprotekcyjne inhibitorów wybranych enzymów oraz licznych związków czynnych farmakologicznie.

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 APPwt i genem z mutacją szwedzką APPsw, które endogennie uwalniają

peptydy A β . Ponadto komórki PC12 poddano zewnątrzkomórkowemu działaniu egzogennych peptydów A β 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 fluorymetrycznego testu 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 są szeroko rozpowszechnione w środowisku naturalnym. Należą do nich składowe dymu papierosowego, produkty uboczne procesów przemysłowych czy leki stosowane w terapii antynowotworowej. Ich mechanizm działania i skutki, jakie wywołują w organizmach żywych, a w szczególności w komórkach nerwowych, nie są wystarczająco dobrze poznane. Szczególną uwagę w prowadzonych doświadczeniach zwrócono na znaczenie PARS-1 i pod tym względem przetestowano liczne związki o charakterze neuroprotekcijnym.

W prezentowanych przez nas badaniach zależny od stężenia A β stres oksydacyjny w mitochondriach trzech linii komórek PC12 transfekowanych genem białka dla APP oraz w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennej peptydu A β 1-42, powodował wzrost poziomu białka AIF. Działanie stresu nitrozacyjnego wywołanego donorem NO także wpływało na wzrost poziomu białka AIF w mitochondriach. W warunkach tych obserwowano nieznaczny odsetek obumierających komórek. Podwyższony poziom białka AIF obserwowano również w korze mózgu i prążkowie w zwierzęcym modelu choroby Alzheimera (AD) u myszy transgenicznym APP^{+/+}z mutacją londyńską. Powyższym zmianom towarzyszyło znaczące obniżenie aktywności PARS-1 zarówno w komórkach APPsw, jak i po zastosowaniu donora NO (SNP).

W doświadczeniach prowadzonych w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego czynnikiem alkilującym DNA, MNNG, stwierdzono wzrost uwalniania AIF

z mitochondriów, któremu towarzyszyło obumieranie znaczącej puli komórek. Efekt ten był niwelowany przez zastosowanie inhibitorów PARS-1 (PJ 34 i 3AB), a także tetracyklin trzeciej generacji (mino- i doksycykliny) oraz wielonienasyconego kwasu tłuszczowego DHA. Korzystne dodatkowe działanie wykazywało zahamowanie kalpainy (białka prawdopodobnie zaangażowanego w uwalnianie AIF), 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 (mogącego przyczyniać się do wpływu AIF z mitochondrium).

Podsumowując, uzyskane dane w przedstawionej pracy wskazują na istotny udział białka AIF w procesach obronnych/adaptacyjnych (umożliwiając przeżycie komórkom) w warunkach toksyczności peptydów A β działających endogennie i egzogennie, a także po zadziałaniu donora NO, SNP. Obserwowana obniżona aktywności enzymatyczna PARS-1 może być związana z udziałem uwalnianego przez A β NO i z automodyfikacją enzymu. Może również mieć miejsce degradacja PARS-1 w wyniku aktywacji kaspazy 3. Natomiast obniżenie to wyklucza udział PARS-1 w mechanizmie śmierci, ale może mieć istotne znaczenie w zaburzeniu procesów naprawy DNA.

W badaniach dotyczących mechanizmu śmierci komórek w stresie genotoksycznym wykazano, że ścieżka sygnałowa zależna od AIF oraz PARS-1/PAR odgrywa fundamentalną rolę w mechanizmie śmierci neuronów HT22 w wyniku działania związku alkilującego DNA, MNNG. W warunkach tych inhibitory PARS-1 (PJ 34 i 3-AB), tetracykliny trzeciej generacji (mino- i doksycyklina) oraz wielonienasycony kwas tłuszczowy DHA chroniły komórki HT22 przed stresem genotoksycznym i śmiercią. Korzystne dodatkowe działanie wykazuje również zahamowanie kalpainy (białka prawdopodobnie zaangażowanego w uwalnianie AIF), a także kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym ERK1/2. W mechanizmie cytoprotekcyjnego działania inhibitorów PARS-1 stwierdza się udział PI-3 kinazy, a w śmierć komórek zależną od MNNG nie są zaangażowane: PKC i PKG, białko p53 jak również kaspaza-3.

Uzyskane wyniki badań mogą być pomocne w lepszym zrozumieniu mechanizmu śmierci komórek w wyniku działania stresu oksydacyjnego i genotoksycznego, który towarzyszy chorobom neurodegeneracyjnym oraz działaniu licznych toksyn środowiskowych. Ponadto mogą ułatwić wskazanie punktów uchwytu dla skutecznej cytoprotekcji.