**Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej**

**im. Mirosława Mossakowskiego**

**Polska Akademia Nauk**

**Zespół Kliniczno - Badawczy Neurochirurgii**

**Pracownia Badań Przedklinicznych Związków Neuroprotekcyjnych i Czynników Środowiskowych**

**Kinga Czubowicz**

**ROLA CERAMIDU W MOLEKULARNYCH MECHANIZMACH ŚMIERCI KOMÓREK LUDZKIEJ *NEUROBLASTOMA* SH-SY5Y. ANALIZA DZIAŁANIA WYBRANYCH CYTOPROTEKTANTÓW.**

**Praca doktorska wykonana pod kierunkiem**

**Dr hab. n. med. Roberta Strosznajdera**

**Warszawa 2014**

**Streszczenie**

Do grupy lipidów, które stały się przedmiotem zainteresowań badaczy w ciągu ostatnich dwóch dekad zalicza się sfingolipidy. Ścieżka sygnalizacyjna z udziałem bioaktywnych sfingolipidów do których należą m. in.: ceramidy, sfingozyna i sfingozyno-1-fosforan (S1P) pełni ważną funkcję regulatorową w procesach przeżycia i śmierci komórki. Ceramidy są sfingolipidami, których trzon stanowi długołańcuchowy nienasycony aminoalkohol sfingozyna połączony z resztą nasyconego lub nienasyconego kwasu tłuszczowego o długości łańcucha głównie 14–32 atomów węgla. Ceramidy biorą udział w regulacji takich procesów komórkowych jak: proliferacja i różnicowanie, wzrost, starzenie się oraz śmierć komórki. Zwiększenie poziomu endogennych ceramidów w komórce może być wynikiem: syntezy *de novo*, aktywacji syntaz ceramidu katalizujących ich powstawanie ze sfingozyny lub hydrolizy sfingomieliny. Natomiast, rozpad ceramidów odbywa się za pośrednictwem ceramidaz. Powstająca w wyniku tego rozpadu sfingozyna ulega fosforylacji przez kinazy sfingozyny typu 1 i 2 (Sphk1 oraz Sphk2) do sfingozyno-1-fosforanu (S1P). Ścieżka sygnalizacji S1P jest jednym z kluczowych regulatorów przeżycia, proliferacji i różnicowania komórek. S1P może działać jako przekaźnik pierwszego rzędu za pośrednictwem błonowych receptorów (GPCR) sprzężonych z białkami G oznaczonych S1PR1 do S1PR5 oraz jako wewnątrzkomórkowy przekaźnik drugiego rzędu. W związku z powyższym kinazy sfingozyny uważane są za kluczowe enzymy biorące udział w utrzymaniu równowagi pomiędzy bioaktywnymi sfingolipidami: ceramidem/S1P.

Należy zwrócić uwagę, że w ostatnim dziesięcioleciu dokonał się ogromny postęp w zrozumieniu funkcji bioaktywnych sfingolipidów takich jak: ceramid i S1P oraz enzymów biorących udział w ich metabolizmie, w regulacji wielu procesów komórkowych. Stwierdzono, że nadmierny wzrost poziomu endogennych ceramidów i w konsekwencji zaburzenie biostatu ceramid/S1P obserwowane jest w wielu procesach patologicznych m.in. w niedotlenieniu/niedokrwieniu mózgu, w chorobach neurodegeneracyjnych oraz w procesie nowotworzenia. Mimo intensywnych badań w tym zakresie wiele zagadnień pozostaje nadal nie wyjaśnionych. W związku z powyższym celem pracy byłozbadanie jakie procesy molekularne oraz szlaki przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego biorą udział w śmierci ludzkich komórek neuronalnych SH-SY5Y wywołanej działaniem C2-ceramidu, z uwzględnieniem udziału enzymu jądrowego polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP-1). W licznych stanach patologicznych dochodzi do stresu oksydacyjnego i do nadmiernej aktywacji PARP-1, zużycia βNAD+ i w konsekwencji ATP. Ponadto produkt PARP-1,   
poli(ADP-ryboza) (PAR) jest cząstką sygnalizacyjną, której związanie się z błoną mitochondrialną może prowadzić do wypływu czynnika indukującego apoptozę (AIF) z mitochondriów i jego translokacji do jądra. W konsekwencji prowadzi to do śmierci komórki na drodze apoptozy niezależnej od aktywacji kaspaz.   
Komórki SH-SY5Y traktowano C2-ceramidem (N-acetylo-D-erytro-sfingozyna), sfingolipidem mającym właściwości przechodzenia przez błony komórkowe, w przeciwieństwie do długołańcuchowych ceramidów. Obecność C2-ceramidu w niskich stężeniach stwierdzono w mózgu myszy oraz w ludzkiej korze czołowej w badaniach *postmortem*.   
W przedstawionej przeze mnie pracy po raz pierwszy stwierdzono, że w stresie oksydacyjnym indukowanym przez C2-ceramid w komórkach SH-SY5Y dochodzi do wzrostu aktywności PARP-1 i immunoreaktywności PAR. Ponadto zaobserwowano spadek immunoreaktywności białka AIF we frakcji mitochondrialnej. W warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego ceramidem inhibitor PARP-1 (PJ-34) zwiększał przeżywalność komórek SH-SY5Y oraz obniżał poziom wolnych rodników. Następnie wykazano, że zastosowanie inhibitora PARP-1 zapobiega obniżeniu poziomu białka AIF we frakcji mitochondrialnej w komórkach   
SH-SY5Y.

Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że C2-ceramid powoduje zahamowanie ważnego   
pro-życiowego szlaku PI3-K/Akt. W konsekwencji stwierdzono spadek fosforylacji białek efektorowych kinazy Akt: kinazy syntazy glikogenu 3 (GKS3β) oraz   
pro-apoptotycznego białka Bad. Wyniki pokazały ważną rolę kinazy Akt w cytoprotekcyjnym działaniu inhibitora PJ-34. Zastosowanie inhibitora PJ-34 skutkowało wzrostem fosforylacji kinazy Akt i białka Bad.   
W mechanizmie śmierci komórek SH-SY5Y indukowanej C2-ceramidem stwierdzono udział kinaz białkowych ERK1/2 i JNK oraz białka p53. Dane literaturowe wskazują, że w śmierć komórek na drodze zależnej od PARP-1 mogą być zaangażowane kinazy białkowe, które tak jak ERK1/2 i JNK bezpośrednio wpływają na fosforylację PARP-1 powodując tym samym wzrost aktywności tego enzymu. Uważa się, że PARP-1 jest odpowiedzialny za kontrolę poziomu białka p53 i regulację jego stabilności w komórce.

Wyniki pokazały, że egzogenny S1P ma działanie protekcyjne w wyniku pobudzenia receptorów S1PR1 i S1PR3. Stwierdzono, że S1P powoduje wzrost fosforylacji kinazy Akt i białka Bad w warunkach inkubacji komórek SH-SY5Y z C2-ceramidem. Efekt taki wykazano również dla agonistów receptorów S1P.

W kolejnym etapie badań stwierdzono, że C2-ceramid powoduje spadek ekspresji/immunoreaktywności anty-apoptotycznego białka Bcl-2 oraz wzrost poziomu mRNA białek pro-apoptotycznych: Bax i Hrk. Uzyskane dane pokazują, że S1P oraz inhibitor PARP-1 działały protekcyjnie poprzez modulację ekspresji białek z rodziny Bcl-2.   
Podsumowując, uzyskane wyniki badań mogą być pomocne w lepszym zrozumieniu mechanizmu śmierci komórek w warunkach zwiększonego stężenia ceramidów, które obserwowane jest w wielu stanach patologicznych. W poszukiwaniu nowych związków neuroprotekcyjnych stwierdzono, że S1P oraz modulatory receptorów dla S1P odgrywają ważną rolę neuroprotekcyjną w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego przez ceramid. Dodatkowo zastosowanie inhibitora PARP-1 w znaczący sposób zwiększa przeżycie komórek neuronalnych poddanych działaniu C2-ceramidu.