

lek. wet. Anita Lewczuk
specjalista weterynaryjnej diagnostyki laboratoryjnej
specjalista patologii i użytkowania zwierząt laboratoryjnych

Zróznicowana wrażliwość mózgu suwaka mongolskiego na
uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne. Udział czynnika
transkrypcyjnego Nrf2 w endogennej neuroprotekcji.

Rozprawa na stopień naukowy doktora
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. Barbara Zabłocka

Promotor pomocniczy: dr Małgorzata Beręsewicz-Haller



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

Warszawa, 2023

Streszczenie

Udar mózgu pozostaje nie tylko główną przyczyną zgonów na całym świecie, ale także powoduje niepełnosprawność u ogromnej liczby pacjentów. Pomimo wielu lat badań, dostępne metody leczenia skutków udaru są ograniczone. W związku z tym, istnieje potrzeba poszukiwania nowych, skutecznych terapii neuroprotektoryjnych. Aktywacja naturalnych mechanizmów ochronnych występujących w mózgu tzn. endogennej neuroprotekcji, jest obecnie szeroko rozważaną metodą terapeutyczną. Poznanie mechanizmów molekularnych zaangażowanych w endogenną neuroprotekcję może wskazać nowe punkty uchwytu i przyczynić się do opracowania użytecznych klinicznie innowacyjnych metod leczniczych.

Przykładem endogennej neuroprotekcji jest selektywna odporność komórek regionu CA2-3, DG hipokampa na uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne (I/R) w porównaniu z regionem wrażliwym - CA1. Niniejsza rozprawa doktorska skupia się na ustaleniu roli czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2) w mechanizmach naturalnej protekcji występujących w neuronach regionu CA2-3, DG hipokampa. Ponadto poszukiwano nowych genów regulowanych przez Nrf2, które mogą być zaangażowane w mechanizmy endogennej neuroprotekcji. Uzasadnienie badań nad Nrf2 jest następujące: (i) Nrf2 jest głównym regulatorem tysięcy genów kodujących białka zaangażowane w procesy antyoksydacyjne, cytoprotekcyjne i przeciwzapalne, (ii) udowodniono dobroczynny efekt aktywacji Nrf2 w badaniach przedklinicznych w modelach miażdżycy, chorób neurodegeneracyjnych czy zawału serca.

W niniejszej rozprawie doktorskiej, że aktywność Nrf2 jest wyższa w CA2-3, DG w porównaniu z CA1 już u kontrolnych suwaków mongolskich. Natomiast 5-minutowe zaciśnięcie tętnic szyjnych i 15 i 30-minutowej oraz 1, 2, 3, 24, 36, 48, 72 i 96 godzinna reperfuzja powoduje krótkotrwałą aktywację Nrf2 w regionie CA1 oraz opóźnioną i długotrwałą aktywację w CA2-3, DG. Ponadto, różnice w aktywności Nrf2 korelują z poziomem białek regulowanych przez Nrf2 takich jak oksygenaza hemowa 1 (HO-1), podjednostka katalityczna (GCLC) i modulatorowej (GCLM) ligazy glutaminianowo-cysteinowej i peroksydaza glutationowa 1 (GPx1), co pośrednio wskazuje na obecność

w jądrach komórkowych aktywnego Nrf2. Poziom oksygenazy hemowej-1 jest znacznie wyższy w CA2-3, DG niż w CA1 już w kontroli, a zależność ta utrzymuje się po epizodzie I/R. Podobnie jak w przypadku HO-1, wyższą immunoreaktywność w kontrolnym CA2-3, DG w porównaniu z CA1 obserwuje się dla GCLM i GPx1. Inaczej jest w przypadku GCLC, którego immunoreaktywność nie różni się między CA1 i CA2-3, DG w kontrolnym hipokampie. Wzrost immunoreaktywności w 48 i 72 godzinie niedokrwieniu obserwuje się zarówno dla GCLC, jak i innych badanych białek. Dokładny mechanizm różnej aktywności Nrf2 w dwóch regionach hipokampa jest niejasny. Jednak, prezentowane dane pokazują, że w kontrolnym, prawidłowym hipokampie poziom KEAP1 (cytoplazmatyczny inhibitor Nrf2) jest wyższy w CA1 niż w CA2-3, DG, a epizod I/R powoduje obniżenie immunoreaktywności KEAP1 w CA1, czego nie obserwujemy w CA2-3, DG. Prezentowane wyniki pokazują również, że farmakologiczna aktywacja Nrf2 przez sulforafan znacząco chroni neurony w regionie CA1 przed śmiercią, zarówno w modelach *in vivo*, jak i *ex vivo* (przejściowe, globalne niedokrwienie przodomózgowia suwaka i organotypowa hodowla skrawków hipokampa szczura). Wykazano również, że sulforafan jest skuteczny w ochronie neuronów, gdy zastosowano go w opóźnieniu w stosunku do bodźca niedokrwiennego, co daje nadzieję na szerokie okno terapeutyczne w badaniach klinicznych.

W celu wyłonienia nowych genów regulowanych przez Nrf2, które mogą być zaangażowane w mechanizmy odporności CA2-3, DG na epizod niedokrwienno-reperfuzyjny, przeprowadzono analizę *in silico* dostępnych baz danych. Korzystając z atlasu RNA kontrolnego hipokampa myszy i bazy danych genów regulowanych przez Nrf2 wyselekcjonowano 15 genów (*Gpc1*, *Brip1*, *Lrp8*, *Aifm2*, *Fzd7*, *Camk1*, *Mpp3*, *Phgdh*, *Hrk*, *Tdo2*, *Ret*, *Itgb8*, *Cxcl12*, *Stc2*, *Shisa2*), które wykazują wyższą ekspresję w odpornym regionie hipokampa CA2-3, DG niż w CA1. Wyniki analizy *in silico* zostały zweryfikowane w kontrolnych, prawidłowych hipokampach suwaka i ujawniły, że 20% wyselekcjonowanych genów (*Mpp3*, *Ret*, *Shisa2*) wykazuje ekspresję wyższą w regionie CA2-3, DG niż w CA1. Następnie zbadano ekspresję wybranych genów i ich produktów białkowych po I/R w celu weryfikacji potencjalnych zależności ze zmianami aktywności Nrf2 po I/R w CA2-3, DG. Sześć badanych genów i sześć

produktów białkowych wyselekcjonowanych genów wykazało zwiększoną ekspresję mRNA i/lub białka w CA2-3, DG po 48, 72 i/lub 96 godzinach reperfuzji i są to: *Aifm2* i FSP1, *Fzd7* i FZD7, *Camk1* i CAMK1, *Brip1* i BRIP1, *Tdo2*, *Gpc1*, PHGDH i STC2. A zatem, można je uznać za geny indukowane przez Nrf2 w warunkach stresowych, co czyni je interesującymi w kontekście endogennej neuroprotekcji.

Podsumowując, przeprowadzone badania są nowatorskie, ponieważ wskazują nowe molekularne ścieżki stojące za zjawiskiem odporności regionu CA2-3, DG hipokampa na skutki przejściowego niedokrwienia i reperfuzji mózgu. Przedstawione dane wskazują, że aktywność cytoprotekcyjnego czynnika transkrypcyjnego Nrf2 jest wyższa w CA2-3, DG niż w CA1 w hipokampie kontrolnym i po epizodzie I/R. Co więcej, wysoka aktywność Nrf2 koreluje z wysokim poziomem białek regulowanych przez niego i związanych ze szlakami antyoksydacyjnymi (HO1, GCLM, GPx1) oraz aktywacją nowo wybranych genów, które mogą uczestniczyć w odpowiedzi obronnej komórki skutkującej przeżyciem. Wskazane tutaj geny i ich produkty białkowe są elementami różnych szlaków molekularnych i nie były dotychczas badane w kontekście niedokrwienia mózgu. Otrzymane wyniki mogą również pomóc w poszukiwaniu nowych terapii neuroprotekcyjnych dla pacjentów po epizodzie niedokrwienno-reperfuzyjnym mózgu.

Summary

Stroke is not only a leading cause of mortality worldwide responsible for a significant number of deaths annually, but it also results in a significant number of disabilities and disorders. Despite many years of research, the available treatments for stroke remain limited. This state of affairs implies the need for a new approach to the search for effective neuroprotection. So it is that the activation of natural adaptive mechanisms (called endogenous neuroprotection) is now discussed increasingly as a promising therapeutic method. It is hypothesized that the identification and characterization of the components of the cellular mechanism of endogenous neuroprotection will allow the development of ways to induce it in the course of stroke in order to achieve clinically effective neuroprotection.

An example of endogenous neuroprotection is the resistance to ischemia-reperfusion (I/R) episode of the abdominal region of hippocampus (CA2-3, DG) *versus* the dorsal, ischemia-vulnerable region (CA1). Here, I hypothesized the core role of the transcription factor Nuclear Factor-E2-Related Factor 2 (Nrf2) in endogenous neuroprotection of CA2-3, DG. Moreover, I have searched for a new genes regulated by Nrf2 which can be involved in mechanisms of endogenous neuroprotection. The rationale for studying Nrf2 are as follow: (i) Nrf2 is the "master regulator" of thousands of genes encoding the antioxidant, cytoprotective and anti-inflammatory proteins, (ii) beneficial effects of Nrf2 in preclinical models of atherosclerosis, neurodegenerative diseases, and cardiac I/R injury has been reported.

Here, using gerbil model of 5-minute bilateral carotid artery ligation, followed by 15 and 30 minutes, and 1, 2, 3, 24, 36, 48, 72 and 96 hours of reperfusion, it was shown that Nrf2 activity is higher in CA2-3, DG compared to CA1 already in control gerbils. Moreover, I/R results in a brief and short-lived Nrf2 activation in CA1, and a delayed and prolonged activation in CA2-3, DG seen 48h after I/R. Interestingly, sub-regional differences in Nrf2 activity correlate with Nrf2 target proteins, including heme oxygenase 1 (HO-1), the catalytic (GCLC) and modulatory (GCLM) sub-units of glutamate-cysteine ligase, and glutathione peroxidase 1 (GPx1). The level of heme oxygenase-1 is significantly higher in CA2-3, DG than in CA1 already in control, and this dependence persists at different times after I/R injury. Similar to HO-1, higher

immunoreactivity in control CA2-3, DG compared to CA1 is observed for GCLM and GPx1. This is different for GCLC, which immunoreactivity does not differ between CA1 and CA2-3, DG in control, however an increase in immunoreactivity 48 and 72 hours after I/R is observed for both GCLC and the other proteins tested. The exact mechanism of the sub-regional difference in Nrf2 activity is unclear. However, the data here show that in controls, the immunoreactivity of KEAP1 (cytoplasmic suppressor of Nrf2) is higher in CA1 than in CA2-3, DG. In turn, I/R causes a decrease in KEAP1 immunoreactivity in CA1, which is not accompanied by changes in CA2-3, DG. Furthermore, pharmacological activation of Nrf2 by sulforaphane significantly protects neurons in CA1 region from death both *in vivo* and *ex vivo* models (transient global forebrain I/R in gerbils and organotypic hippocampal slice culture, respectively). Sulforaphane is also effective when administered later in relation to the stimulus, which gives hope for a wide therapeutic window in clinical studies.

To investigate new genes regulated by Nrf2, which may be involved in the mechanisms of CA2-3, DG resistance to ischemic insult, an *in silico* analysis was performed. Using RNA-seq atlas of control mouse hippocampus and database of Nrf2-regulated genes, 15 genes were identified (*Gpc1, Brip1, Lrp8, Aifm2, Fzd7, Camk1, Mpp3, Phgdh, Hrk, Tdo2, Ret, Itgb8, Cxcl12, Stc2, Shisa2*) that show higher expression in CA2-3, DG than in CA1. The results of *in silico* analysis were verified in the hippocampus of control gerbils and showed that 20% of them (*Mpp3, Ret, Shisa2*) had higher expression in CA2-3, DG sector than in CA1. Subsequently, the expression of selected genes and their proteins was examined after I/R to show potential correlations with observed changes in Nrf2 activity after I/R in CA2-3, DG. Six of these genes and six of its proteins showed increased mRNA and/or protein expression in CA2-3, DG after 48, 72 and/or 96 hours of reperfusion. These genes and proteins are: *Aifm2* i FSP1, *Fzd7* i FZD7, *Camk1* i CAMK1, *Brip1* i BRIP1, *Tdo2, Gpc1, PHGDH* i STC2 and can be described as Nrf2-induced genes/proteins under stress conditions, making them of interest in the context of endogenous neuroprotection.

To conclude, the study conducted is novel as it indicates new molecular pathways behind the phenomenon of ischemia-resistance of CA2-3, DG region of hippocampus. Presented data show that the activity of the cytoprotective transcription factor Nrf2 is higher in CA2-3, DG than in CA1 in control hippocampus and after I/R.

What's more, the activity of Nrf2 is followed by high activity of its effector proteins, connected with antioxidant pathways (HO1, GCLM, GPx1) and post-ischemic activation of newly selected genes that may participate in the defense reaction of cells, and results in its survival. The genes and their proteins indicated here are part of various metabolic pathways and have not been studied so far in the context of brain ischemia. These results may also be an indication for the search for new neuroprotective therapies in ischemic brain pathology.