

Mgr Sylwia Żulińska

*Analiza ekspresji genów białek regulujących funkcję
i dynamikę mitochondriów w doświadczalnych modelach
choroby Alzheimera*

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

Promotor: **prof. dr n. med. Joanna B. Strosznajder**



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

Warszawa, 2022

STRESZCZENIE

Choroba Alzheimera (chA) jest chorobą zwyrodnieniową układu nerwowego i najcięższą formą otępienia. Starzenie się jest istotnym czynnikiem ryzyka dla sporadycznej postaci chA o niewyjaśnionej etiologii i mechanizmie występującej u ponad 90% osób chorych na chA. Pozostałe 5-10% stanowi rodzinna postać chA o wczesnym początku uwarunkowana zmianami genetycznymi. Kluczowymi zmianami neuropatologicznymi stwierdzanymi w mózgu osób chorych jest akumulacja peptydu β amyloidu ($A\beta$) i nadmiernie ufosforylowanego białka tau, które w procesie chorobowym zmieniają konformację i ulegają agregacji prowadząc do tworzenia odpowiednio oligomerów $A\beta$ ($A\beta O$), fibryli i zewnątrzkomórkowych blaszek starczych oraz wewnątrzkomórkowych splątków neurofibrylarnych. $A\beta O$, ale także ufosforylowane białko tau mogą wywoływać zaburzenia neuronalne poprzez kilka mechanizmów, w tym aktywację kaskady wolnorodnikowej, stresu oksydacyjnego, upośledzenie szlaków sygnałowych oraz dysfunkcję połączeń synaptycznych i mitochondriów.

W ciągu ostatnich lat sformułowano wiele hipotez próbujących wyjaśniających potencjalne patomechanizmy/ przyczyny chA. Wśród nich dominująca od ponad 25 lat i nadal aktualna jest hipoteza kaskady amyloidowej, hipoteza stresu oksydacyjnego oraz od dekady coraz częściej rozpatrywana hipoteza metaboliczna i mitochondrialna. Obecnie hipoteza mitochondrialna nadal zajmuje kluczową pozycję ze względu na istotną /fundamentalną rolę mitochondriów w komórkach eukariotycznych. Ściśle z nią połączona jest hipoteza metaboliczna dotycząca zaburzeń przemian glukozy, która w ostatnim dziesięcioleciu przeżywa renesans ze względu na liczne badania wskazujące, że cukrzyca typu II stanowi poważne ryzyko dla rozwoju chA.

Upośledzenie funkcji mitochondriów wydaje się być wczesnym i krytycznie ważnym zdarzeniem w procesie starzenia się mózgu i w patogenezie/patomechanizmie chA. Dysfunkcja mitochondriów może mieć wpływ na ekspresję i metabolizm białka prekursorowego amyloidu (APP), a także akumulację $A\beta$, a zatem może być uważana za wyzwalacz odpowiedzialny za rozwój zmian molekularnych i funkcjonalnych charakterystycznych objawów chA. $A\beta$ może wywoływać dysfunkcje metaboliczne, zmniejszenie zużycia tlenu, obniżenie mitochondrialnej obrony antyoksydacyjnej oraz poziomu ATP/NAD⁺ i aktywację glikolizy. Znaczenie zaburzeń przemian białka APP i β amyloidu nie budzi wątpliwości w rodzinnej postaci chA, natomiast nie

jest w pełni akceptowane i wywołują liczne kontrowersje i dyskusje w przypadku postaci sporadycznej chA. Uwalnianie peptydów A β i wzrost ich stężenia w przestrzeni zewnątrzkomorkowej wpływa nie tylko na funkcje zakończeń synaptycznych i neurony, ale również na otaczające komórki glejowe, a przede wszystkim na komórki mikrogleju, które pełnią ważne funkcje zarówno neuroprotektcyjne, jak również aktywują procesy zapalne i odgrywają istotną rolę w progresji chA. Komórki mikrogleju, wpływają na rozwój mózgu, żywotności neuronów procesy starzenia się i neurodegeneracji. Wzajemna interakcja między komórkami nerwowymi i glejowymi ma kluczowe znaczenie dla przebiegu neurodegeneracji/ neurozapalenia. Oddziaływanie A β O z mikroglejem może prowadzić do ich aktywacji i skutkować wytwarzaniem chemokin, neurotoksycznych cytokin oraz reaktywnych form tlenu i azotu, które są szkodliwe dla OUN. Mikroglej pełni również rolę neuroprotektcyjną, poprzez swoją zdolność do fagocytowania A β i uwalniania cytokin przeciwzapalnych. W związku z powyższym istnieje nadal potrzeba zbadania znaczenia oligomerów A β w zaburzeniach procesów molekularnych, transkrypcji genów kodujących białka zaangażowane w dynamikę i funkcję mitochondriów. Pomimo wieloletnich badań nad znaczeniem peptydów A β w patologii chA, procesy molekularne leżące u podstaw toksyczności tych peptydów nie są w pełni wyjaśnione.

Dlatego celem niniejszych badań było zbadanie transkrypcji genów kodujących białka antyoksydacyjne, białka kompleksów oddechowych łańcucha transportu elektronów oraz białek regulujących fuzję/podział i biogenezę mitochondriów w modelu komórkowym cytotoxyczności A β O oraz w modelu zwierzęcym choroby Alzheimera. Analizowano również poziom wybranych białek i aktywność oksydazy cytochromu C końcowego enzymu w łańcuchu transportu elektronów.

W niniejszej pracy zastosowano model cytotoxycznego działania egzogennych oligomerów peptydu A β (A β O₁₋₄₂) w komórkach guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy szczura (*łac. Pheochromocytoma*-PC12. Ponadto inkubowano z A β O komórki neuronalne – SH-SY5Y ludzkiej neuroblastomy oraz unieśmiertelnione mysie komórki mikrogleju –BV2.

W badaniach na komórkach oceniono wpływ A β O na poziom wolnych rodników za pomocą sondy fluorescencyjnej (DCF), wrażliwość komórek na stres oksydacyjny i ich przeżycie za pomocą testu z użyciem soli tetrazolowych (MTT), a w przypadku komórek PC12 zbadano dodatkowo poziom komórek apoptotycznych w różnym czasie inkubacji z A β O oraz

poziom immunoreaktywności dla cząsteczki sygnalizacyjnej poli (ADP-rybozy) - PAR, która jest produktem aktywności poli (ADP-rybozo) polimerazy, PARP-1, enzymu jądrowego związanego z DNA. Enzym ten jest jądrowym odbiorcą kaskady wolnorodnikowej i molekularnym regulatorem procesów przeżycia i śmierci komórki. Wobec powyższego w badaniach uwzględniono działanie inhibitora polimerazy poli (ADP-rybozy) 1 (PARP-1). Z kolei w komórkach mikroglejowych i neuronalnych oceniono aktywność oksydazy cytochromu C.

Ponadto badania prowadzono na korze mózgowej uzyskanej z myszy transgenicznym FVB-Tg (APP LD2/B6) z wprowadzonym ludzkim genem dla APP zawierającym mutację londyńską (Thy1; APP) Val717Ile, które stanowią model rodzinnej postaci choroby Alzheimera. Do badań użyto 3 grupy wiekowe zwierząt – 3, 6 i 12 miesięczne. Grupy kontrolne o odpowiednim wieku stanowiły zwierzęta bez transgeny. W zwierzęcym modelu doświadczalnym zbadano również poziom immunoreaktywności dla białek dynamiki mitochondrialnej oraz enzymów dla wybranych podjednostek kompleksów oddechowych u 12 miesięcznych myszy oraz aktywność oksydazy cytochromu C u 3 i 12 miesięcznych myszy.

W przedstawionej pracy stwierdzono, że A β znacząco wpływa na obniżenie żywotności wszystkich badanych komórek. W przypadku komórek PC12 zaobserwowano również wzrost komórek apoptotycznych zależny od czasu inkubacji z A β . Prezentowane w niniejszej pracy wyniki na komórkach wykazały, że oligomery A β ₁₋₄₂ znacząco wpływały na poziom wolnych rodników w komórkach neuronalnych PC12i SH-SY5Y oraz ale nie miały wpływu na poziom ROS w komórkach mikrogleju BV2 w badanych czasach inkubacji -24 godz.

W prowadzonych badaniach na komórkach PC12 wykazano, że peptydy A β O w wyniku działania w czasie 96 godz. inkubacji spowodowały obniżenie transkrypcji genów (*Sod1*, *Sod2*, *Gpx1*, *Gpx4*, *Gsr*), kodujących białka antyoksydacyjne oraz obniżenie transkrypcji genów (*Opa1*, *Mfn2*, *Dnm1*, *Fis1*) kodujących białka zaangażowane w procesie rozszczepienia i fuzji mitochondriów, jak również obniżenie ekspresji genów: *mt-Nd1*, *Sdha*, *mt-CytB* kodujących białka podjednostek kompleksów oddechowych (I, II, III) ETC. Peptydy A β O nie miały natomiast wpływu na poziom ekspresji genu (*Cat*) kodującego katalazę, na transkrypcję genu *Mnfl* oraz genu *mt-CoI*, kodującego podjednostkę kompleksu IV. Ponadto peptydy A β O w krótkim czasie działania (24 godz. inkubacji) pozostawały bez istotnego wpływu na poziom ekspresji wszystkich badanych genów.

Wyniki badań na komórkach PC12 pokazały wzrost poziomu PAR po 24 godz. inkubacji z A β . Natomiast zastosowanie inhibitora PARP-1 (PJ34) niwelowało nadmierną aktywację PARP-1 określaną wzrostem poziomu immunoreaktywności cząsteczek PAR. Kolejno sprawdzono działanie inhibitora PJ43 na poziom mRNA dla wyżej wymienionych genów. Wyniki pokazały, że farmakologiczne zahamowanie PARP-1 przy użyciu inhibitora PJ34 istotnie zwiększa poziom mRNA genów (*mt-Nd1*, *Sdha*, *mt-Cytb*) kodujących białka trzech kompleksów oddechowych. W obecności A β ₁₋₄₂ inhibitor ten wpływał wyłącznie na poziom mRNA genu *Sdha* kodującego podjednostkę kompleksu II. Ponadto PJ34 aktywował ekspresje genów *Opa1* i *Mfn2* w obecności peptydów A β . Uzyskane wyniki na komórkach PC12 pokazują, że inhibitor PARP-1 poprzez aktywację ekspresji genów kodujących enzymy anty-oksydacyjne i białka dynamiki mitochondriów oraz podjednostki kompleksów oddechowych w krótkim czasie działania może korzystnie wpłynąć na poziom wolnych rodników i stan energetyczny komórek i wywierać cytoprotekcyjny efekt.

Uzyskane w niniejszej rozprawie wyniki na komórkach neuronalnych i glijowych pokazują, że ekspresja genów kodujących kluczowe enzymy antyoksydacyjne *Sod1* i *Sod2* przebiega odmiennie w zależności od rodzaju komórek. Ekspresja genu dla mitochondrialnego *Sod2* była prawie czterokrotnie wyższa po 24 godzinach traktowania A β O w komórkach BV2, co może świadczyć o uruchomieniu mechanizmów obronnych w komórce zapobiegając przed wzrostem stresu oksydacyjnego. Natomiast ekspresja genu tego enzymu w komórkach neuronalnych SH-SY5Y była obniżona.

Ponadto wyniki badań dotyczące toksyczności peptydów A β wskazują na niższą ekspresję genu badanych podjednostek kompleksu I (*mt-Nd1*) i II (*Sdha*) ETC w komórkach mikrogleju BV2 traktowanych A β O. Istotne zmiany zaobserwowano po krótkotrwałej inkubacji (24 godziny). Natomiast znacząca ponad 4-krotna aktywacja ekspresji genu kodującego *Sod2* w komórkach BV2 może sugerować, że jest to element mechanizmu chroniącego mitochondria przed wzrostem poziomu wolnych rodników generowanych przez upośledzoną ETC w warunkach toksyczności A β O. Analiza ekspresji genów podjednostek ETC w komórkach SH-SY5Y wykazała niższy poziom mRNA dla podjednostki kompleksu II (*Sdha*) po 24 godz. traktowania A β O.

Aktywność oksydazy cytochromu C w komórkach BV2 była trzykrotnie wyższa w porównaniu do aktywności tego enzymu w komórkach SH-SY5Y. Traktowanie komórek A β O przez 24 godz. nie powodowało zmian aktywności tego enzymu.

Wyniki uzyskane na komórkach neuronalnych (SH-SY5Y) i komórkach mikrogleju (BV2) świadczą o tym, że zmiany ekspresji badanych genów w komórkach mikroglejowych (BV2) są silniej wyrażone niż w komórkach neuronalnych (SHSY-5Y). Należy jednak z ogromną ostrożnością porównywać wpływ A β w tych obu liniach komórkowych. Niemniej jednak zjawiska te mogą mieć znaczenie dla zrozumienia procesów molekularnych przebiegających w różnych typach komórek w odpowiedzi na stres wywołany działaniem A β O i mogą być pomocne w ocenie znaczenia roli mikrogleju w pełnieniu funkcji ochronnych, cytoprotekcyjnych w stosunku do komórek neuronalnych w określonych warunkach.

Doświadczenia prowadzone na mysich modelach choroby Alzheimera pokazały znaczące zmiany w ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w obronę antyoksydacyjną i dynamikę mitochondriów w korze mózgowej myszy z chA (APP+) w porównaniu do odpowiednich wiekowo mysz kontrolnych bez transgenu (APP-). W przeprowadzonych badaniach w korze mózgu myszy z chA, stwierdzono obniżenie genu dla *Sirt1* u 3 i 12 miesięcznych myszy, enzymu ważnego w licznych procesach życiowych komórki oraz w metabolizmie białka APP poprzez regulację sekretazy alfa.

Ponadto stwierdzono zmiany ekspresji genu *PARP-1*, który koduje kolejny enzym, podobnie jak *Sirt1*, należący do rodziny enzymów zależnych od NAD. PARP-1 pełni kluczową rolę w regulacji licznych czynników transkrypcyjnych, w mechanizmie naprawy DNA w warunkach stresu oksydacyjnego i jak wspomniano wyżej odpowiedzialny jest za mechanizmy przeżycia i śmierci komórek. Wyniki pokazują przejściowe obniżenie transkrypcji genu kodującego PARP-1 w korze 3 miesięcznych myszy i wzrost poziomu mRNA u 6 miesięcznych zwierząt i zmiany te mogą być wynikiem reakcji na stres oksydacyjny towarzyszący działaniu A β O.

W kolejnych badaniach przeanalizowano ekspresję genów dla białek dynamiki mitochondriów. Stwierdzono podwyższoną ekspresję genów dla *Fis1* u 3 i 6 miesięcznych myszy oraz genu *Dnm1* u 6 miesięcznych myszy APP+ z chA, natomiast zmian tych nie obserwowano w korze 12 miesięcznych myszy z chA. W badaniu poziomu białka metodą immunochemiczną

w korze mózgu 12 miesięcznych myszy z chA nie stwierdzono również zmian w poziomie immunoreaktywności Drp1 i Fis 1. Równocześnie na wczesnym etapie chA u 3 i 6 M myszy stwierdzono wzrost ekspresji genu dla OPA1 i brak zmian w korze 12 M myszy z chA w porównaniu do kontroli odpowiednich wiekowo. Poziom immunoreaktywności tego białka również nie ulegał zmianie w korze mózgu 12 M myszy z chA. Stwierdzono natomiast obniżenie poziomu mRNA i białka dla Mfn1 u 12 miesięcznych myszy z chA. Wyniki te mogą sugerować, że zmiany te mogą zaburzać dynamikę mitochondriów. Prezentowane badania ekspresji genów dla wybranych podjednostek kompleksów oddechowych w korze mózgowej myszy wykazały, że ekspresja genu dla podjednostka kompleks I (*mt-Nd1*) jest znamienne obniżona u 12 miesięcznych myszy transgeniczných. Poziom mRNA dla pozostałych badanych podjednostek jest nieznamienne obniżony, z wyjątkiem IV kompleksu mitochondrialnego, gdzie zaobserwowano podwyższony znamienne poziomy mRNA dla podjednostki *mt-Co1* u 6 i 12 miesięcznych myszy z chA. Przeprowadzono badania poziomu immunoreaktywności dla innej podjednostki IV-COXII kompleksu IV i stwierdzono obniżenie jej poziomu.

Prezentowane w niniejszej pracy wyniki odnośnie biogenezy mitochondrialnej wykazały, że poziomy mRNA dla *Pparg1* i *PPAR- α* jest statystycznie znamienne obniżony u 12 miesięcznych myszy APP+, co może świadczyć o zaburzeniu biogenezy mitochondrialnej w średnio zawansowanym stadium chA. Również wynik poziomu immunoreaktywności dla PGC-1 α potwierdził tę zależność. Stwierdzono także, że poziomy mRNA genu *Tfam*, odpowiedzialnego za metabolizm mtDNA oraz genów jądrowych takich jak: *Nrf1* i *Nrf2* są podwyższone na wczesnym stadium, co z kolei sugeruje uruchomienie mechanizmów ochronnych. Jednak w kolejnym stadium u 6 i 12 miesięcznych myszy zaobserwowano istotne obniżenie ekspresji genów *Nrf2*, co ze względu na jego istotne znaczenie może wpływać na zaburzenie struktury i funkcji mitochondriów.

Uzyskane wyniki badań mogą być pomocne w lepszym zrozumieniu mechanizmów toksyczności oligomerów peptydów A β poprzez poznanie ich roli w zmianach transkrypcji genów zaangażowanych w regulację stresu oksydacyjnego, dynamiki i biogenezy mitochondriów w modelach doświadczalnych chA. Ponadto wyniki te umożliwiają wskazanie nowych punktów uchwytu dla strategii cytoprotekcyjnej w chA.