

STRESZCZENIE

Kinaza syntazy glikogenu 3 (GSK3) znana obecnie również, jako kinaza białka tau (TPK1 - tau protein kinase-1) to wysoce konserwowana, wielozadaniowa kinaza serynowo-treoninowa, która w tkankach ssaków występuje w dwóch izoformach: GSK3 α i GSK3 β . W pracy skoncentrowałam swoją uwagę na GSK3 β , która jest pojedynczym polipeptydem zbudowanym z 433 aminokwasów, o masie 47 kDa. Wykazuje najwyższy poziom ekspresji w mózgu, w porównaniu do innych organów [Takashima 2006, Perez- Costas i wsp., 2010]. Ekspresja tego enzymu zachodzi intensywniej w neuronach niż w komórkach glejowych [Takahashi i wsp., 2000].

GSK3 β jest przede wszystkim kinazą cytozolową, ale jej obecność stwierdzono również we frakcji jądrowej i mitochondrialnej [Franca-Koh i wsp., 2002, Fujimuro i Hayward, 2003, Meares i Jope, 2007, Songin i wsp., 2011ab, Pająk i wsp., 2009]. GSK3 β początkowo została zidentyfikowana, jako regulator metabolizmu glikogenu, a obecnie wiadomo, że enzym ten ma liczne funkcje komórkowe takie jak regulacja licznych czynników transkrypcyjnych, ekspresji genów dla białek sygnałowych, strukturalnych biorących udział w „architekturze” komórki i w apoptozie. GSK3 β odgrywa istotną rolę w syntezie białek, proliferacji i różnicowaniu komórek, dynamice mikrotubul, motoryce komórki.

Kinaza ta wpływa na wymienione funkcje poprzez fosforylację czynników transkrypcyjnych, czynników inicjacyjnych białek biorących udział w cyklu komórkowym oraz białek zaangażowanych w funkcje mikrotubul i adhezję komórek. Jest kinazą odpowiedzialną za fosforylację białka tau. Podsumowując, GSK3 β reguluje funkcję białek cytoszkieletu, przeżycie i śmierć komórek.

GSK3 β posiada dwa miejsca fosforylacji, które wpływają na jej aktywność katalityczną. Jest to seryna 9 i tyrozyna 216. Fosforylacja na tyrozinie 216 znajduje się w domenie kinazy w miejscu aktywacji, co prowadzi do wzrostu aktywności GSK3 β . Mechanizm tej regulacji nie jest dobrze poznany [Wang i wsp., 1994]. Część ośrodków badawczych wskazuje na ważną rolę autofosforylacji w regulacji aktywności GSK3 β [Cole i wsp., 2004] lub na fosforylację przez inne kinazy tyrozynowe [Hughes i wsp., 1993, Kim i wsp., 1999, Lesort i wsp., 1999, Wang i wsp., 2003,]. Lepiej poznany jest mechanizm hamowania aktywności GSK3 β , w wyniku fosforylacji seryny 9, co zmniejsza aktywność enzymu na drodze zmian

konformacyjnych, dzięki którym dochodzi do odpowiedniego fałdowania i blokowania miejsca aktywnego koniecznego do wiązania substratu. Istniejące dane literaturowe wskazują na istotne znaczenie GSK3 β w patogenezie i patomechanizmie choroby Parkinsona (ChP) i choroby Alzheimera (ChA).

Obecnie szacuje się, że około 400 milionów ludzi cierpi z powodu chorób degeneracyjnego centralnego systemu nerwowego. Problem dotyczy głównie ChA oraz ChP. Podłoże i przyczyny tych chorób nie są dotychczas dobrze poznane. Do związków szczególnie toksycznych dla neuronów zaliczamy pestycydy, herbicydy i chemikalia przemysłowe, które wywołują silny stres oksydacyjny, przez co są uważane za potencjalne czynniki ryzyka w chorobach neurodegeneracyjnych.

Toksyny pochodzące ze środowiska mogą zwiększać wrażliwość neuronów lub powodować ich degenerację oraz uszkodzenia naczyń krwionośnych, które towarzyszą tym chorobom [Miller i wsp., 2002].

Jedną z często wskazywanych substancji, pozytywnie korelującą z częstością pojawiania się ChP, jest powszechnie stosowany herbicyd – parakwat (PQ) [Hertzman i wsp., 1990, Liou i wsp., 1997]. Jego struktura chemiczna jest podobna do związku MPP⁺/MPTP (1-methyl-4-phenylpyridinium). PQ w sytuacji nie zaburzającej bariery krew-mózg przenika do mózgu w niewielkim stopniu przy pomocy transportera dla obojętnych aminokwasów [Shimizu i wsp., 2001]. Neurotoksyczność centralna PQ jest z tego powodu dużo mniejsza niż MPTP czy 6-hydroksydopaminy (6-OHDA) [Corasaniti i Nistico 1993, Shimizu i wsp., 2001, Barlow i wsp., 2003, Ossowska i wsp., 2005, Prasad i wsp., 2007]. Mechanizm toksyczności PQ jest indukowany przez stres oksydacyjny oraz uszkodzenie mitochondriów [Drechsel i Patel, 2008], które mają kluczowe znaczenie w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych [Lin i Beal, 2006; Pagani i Eckert, 2011]. Użycie PQ jako modelu doświadczalnego może być przydatne w badaniach nad rolą mitochondriów w mechanizmie zarówno ChP, jak i ChA.

Z danych literaturowych wynika, że peptydy A β wpływają na uszkodzenia mitochondriów [Sultana i Butterfield, 2009], natomiast Chen i wsp., 2011 wykazują, że uszkodzenia mitochondriów mogą być wynikiem działania PQ, a dopiero w kolejnym etapie dochodzi do wzrostu poziomu A β .

Podjęte w niniejszej pracy zagadnienia miały na celu zbadanie wpływu PQ na ekspresję i poziom białka GSK3 β *in vivo* jak i *in vitro*. W analizie *in vivo* prowadzonej na samcach szczura

szczepu Wistar badano krótkoterminowe działanie PQ po jego jednorazowym podaniu dootrzewnowym w dawce 40 mg/kg masy ciała. Mózg do dalszych doświadczeń pobierano po 3 i 24 godzinach od iniekcji PQ. Ten model badawczy posłużył do poznania wpływu PQ na ekspresję i poziom białka GSK3 β i jej aktywnej formy ufosforylowanej na tyrozynie 216 (GSK3 β pY216) oraz na ekspresję genów kodujących białka GSK3 β , TNF- α , iNOS, COX-2 w śródmózgowiu i prążkowiu szczura. Zbadano również długoterminowe działanie PQ, gdzie związek ten podawany był raz w tygodniu w dawce 10 mg/kg m.c przez 4 i 37 tygodni. Dawki PQ zostały wybrane eksperymentalnie oraz na podstawie wyników opublikowanych badań [Ossowska i wsp., 2005a,b, Ossowska i wsp., 2006, Kuter i wsp., 2007, Shimizu i wsp., 2003]. W tym modelu doświadczalnym zbadano poziom białka GSK3 β i GSK3 β pY216 w śródmózgowiu i prążkowiu oraz we frakcjach podkomórkowych. Badania *in vitro* prowadzono na szczurzych komórkach guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy (pheochromocytoma, PC12). Komórki te były stabilnie transfekowane ludzkim genem białka prekursorowego amyloidu β (APP) z mutacją typu szwedzkiego (APP^{sw}, K670M/N671L), a w przypadku komórek kontrolnych, samym wektorem. Stwierdzono, że w komórkach APP^{sw} poziom uwalnianych peptydów A β jest 4,8- krotnie wyższy w porównaniu do komórek kontrolnych [Chalimoniuk i wsp., 2007]. Zbadano działanie PQ (1mM) i endogennie uwalnianych peptydów A β na poziom białka GSK3 β i jej form ufosforylowanych (GSK3 β pY216 i GSK3 β pS9) w komórkach PC12. 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.

W badaniach krótkoterminowego działania PQ *in vivo* stwierdzono wzrost ekspresji genów dla indukowanej izoforny NOS (iNOS) i cyklooksygenazy 2 (COX-2), które są enzymami zaangażowanymi w procesy prozapalne, a ich nadmierna aktywność zapoczątkowywać może proces cytotoksyczności i neurodegeneracji. W przedstawionych w tej pracy wynikach, po 3 i 24 godzinach od podania PQ w prążkowiu i śródmózgowiu zaobserwowałam wzrost poziomu mRNA iNOS, wzrost poziomu wolnych rodników i stresu oksydacyjnego, co w konsekwencji może prowadzić do obumierania komórek. Ponadto prezentowane w tej pracy wyniki wykazały również wzrost poziomu mRNA COX-2 w śródmózgowiu po 3 godzinach od podania PQ. W badanych strukturach mózgu nie stwierdzono natomiast zmian ekspresji GSK3 β ani po

3 dni po 24 godzinach od podania PQ. Zjawisko to może wynikać ze zbyt krótkiego działania PQ lub wieku szczurów doświadczalnych.

Wpływ długoterminowego podania PQ na poziom białka GSK3 β i jej aktywnej formy GSK3 β pY216 różnił się w badanych strukturach mózgu. Po pierwsze, herbicyd powodował znamienny spadek GSK3 β w homogenatach w prążkowie przy jednoczesnym wzroście w śródmózgowiu. Interesującym wydawało się zagadnienie dotyczące występowania obu postaci GSK3 β w różnych kompartmentach komórki. Przeprowadzone doświadczenia na zgrubnych frakcjach podkomórkowych jak: frakcja jądrowa, mitochondrialna i cytozolowa potwierdziły znaczący spadek poziomu białka GSK3 β we wszystkich wymienionych frakcjach podkomórkowych w prążkowie. Dodatkowo badania wykazały obniżenie poziomu immunoreaktywności białka GSK3 β pY216. Natomiast obserwowano wzrost poziomu białka zarówno całkowitej i aktywnej formy GSK3 β w śródmózgowiu również we wszystkich badanych frakcjach podkomórkowych. Jest wielce prawdopodobne, że obniżony poziom GSK3 β w prążkowie związany jest z zaburzeniami transportu aksonalnego ze śródmózgowia do prążkowie. Taki proces może być również odpowiedzialny za zwiększoną akumulację GSK3 β w śródmózgowiu i obserwowany w naszych doświadczeniach wzrost immunoreaktywności tego białka. Zwiększenie poziomu białka GSK3 β w śródmózgowiu przez długotrwałe podawanie PQ, może być przyczyną uszkodzenia cytoszkieletu poprzez nadmierną fosforylację białek związanych z mikrotubulami znanymi, jako substraty GSK3 β prowadząc do destabilizacji mikrotubul [Jope i Johnson, 2004]. Jednak, bezpośredniego wpływu PQ na neurony prążkowie nie można wykluczyć. Dodatkowo w grę mogą wchodzić zmiany wywołane procesem starzenia. W badaniach mózgu starczego w porównaniu do mózgu dojrzałego wykazaliśmy wybiórcze obniżenie poziomu GSK3 β i jej formy aktywnej w prążkowie w porównaniu do mózgu dojrzałego.

Prezentowane w obecnej pracy badania na komórkach dopaminergicznych PC12 potwierdziły toksyczne działanie PQ. Stwierdzono, że po 24 godzinach inkubacji w obecności 1mM PQ przeżywało około 50% komórek. W naszych badaniach stwierdziliśmy znaczne obniżenie poziomu immunoreaktywności całkowitej, GSK3 β jak i formy ufosforylowanej GSK3 β pY216 w komórkach PC12. Spadek aktywnej formy enzymu może być odpowiedzią obronną na zmiany zachodzące w komórce po toksycznym działaniu PQ.

Równocześnie związek ten nie wpływał na poziom immunoreaktywności białka GSK3 β pS9. Wyniki mogą wskazywać, że obniżona przeżywalność komórek w wyniku działania PQ może być spowodowana wzrostem procesów wolnorodnikowych. Kolejne dane doświadczalne wskazują, że wzrost uwalnianych endogennie peptydów A β powoduje zwiększoną aktywność GSK3 β pS9 w komórkach APPsw, natomiast peptydy A β nie wpływają na poziom immunoreaktywności białka GSK3 β i GSK3 β pY216. Aby podkreślić zależność pomiędzy wzrostem poziomu A β , a wzrostem aktywności GSK3 β zbadano poziom immunoreaktywności białka tau na Ser396, które obecnie wiadomo, że jest fosforylowane przez GSK3 β . Stwierdzono, że wraz ze wzrostem aktywności GSK3 β dochodzi do wzrostu poziomu ufosforylowanego białka tau w komórkach APPsw. Zjawiska te mogą powodować zaburzenie funkcji cytoszkieletu komórek APPsw w porównaniu do komórek kontrolnych PC12.