

mgr inż. Katarzyna Anna Dąbrowska

Regulacja ekspresji i funkcji astrocytarnego transportera SN1 w warunkach hiperamonemii *in vitro*

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. Magdalena Zielińska



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

Warszawa, 2019

STRESZCZENIE

Glutamina (Gln) jest najbardziej rozpowszechnionym aminokwasem w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) odgrywającym istotną rolę w szeregu procesów metabolicznych. Gln jest transportowana między astrocytami i neuronami przez swoiste białka, które ze względu na cechy charakterystyczne sklasyfikowano jako układy transportowe: N, A, ASC, L czy γ L. SN1 (SNAT3, Slc38a3) jest białkiem o cechach układu N, takich jak: zależność od jonów sodu czy wrażliwość na jony litu. Zlokalizowane jest w błonie astrocytów, komórek będących jednocześnie głównym miejscem syntezy Gln z glutaminianu (Glu) i amoniaku w OUN. SN1 odpowiedzialny jest za transport zsyntetyzowanej *de novo* Gln do sąsiednich neuronów, co wskazuje na jego istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu cyklu Glu-kwas γ -aminomasłowy (GABA)/Gln, prowadzącym do syntezy głównych neuroprzekaźników aminokwasowych Glu i GABA. Mechanizmy regulacji ekspresji i aktywności SN1 są dopiero poznawane. Do tej pory wykazano m.in. że SN1 jest regulowany przez kinazę białkową C (PKC), przede wszystkim przez izoformy α , δ i γ , które obniżają jego ekspresję i aktywność w oocytach *X.laevis* oraz pierwotnej hodowli astrocytów szczurzych. Ponadto, udowodniono, że interakcje czynnika transkrypcyjnego Sp1 z promotorem *Snat3* w nerce myszy w warunkach kwasicy metabolicznej, prowadzą do wzrostu poziomu ekspresji SN1, co wskazuje na regulację SN1 na poziomie transkrypcji.

Amoniak uważany jest za główny czynnik sprawczy zaburzeń neurologicznych określanych jako encefalopatie hiperamonemiczne, wśród których najczęściej klinicznie rozpoznawane są ostra i przewlekła encefalopatia wątrobowa. Gromadzący się w nadmiernej ilości amoniak odpowiedzialny jest za wystąpienie stresu oksydacyjnego i zaburzeń energetyki komórki. Zaburzenia te wiązane są z upośledzeniem funkcji mitochondriów astrocytarnych oraz bezpośrednio, z wewnątrzkomórkowym gromadzeniem się Gln, co skutkuje obrzmieniem astrocytów, a w następstwie prowadzi do obrzęku mózgu. W zwierzęcych modelach ostrej formy encefalopatii wątrobowej wykazano obniżoną ekspresję transportera SN1, co wskazywało na fakt, iż przyczyną gromadzenia się Gln w astrocytach może być zaburzony aktywny transport Gln na zewnątrz komórki.

Wykazaliśmy, że w warunkach hiperamonemii *in vitro*, w transporcie [3 H]glutaminy z astrocytów kory czołowej myszy, dominującą rolę pełni układ N, z jego głównym transporterem – białkiem SN1. Ponadto pokazaliśmy, że amoniak nie wpływając na poziom ekspresji transporterów układu N obniża wyrzut [3 H]glutaminy z komórek i zmienia metabolizm mitochondrialny astrocytów i funkcjonowanie cyklu Krebsa.

Powyższe obserwacje stały się punktem wyjścia do badań przedstawionych w dysertacji, które dotyczą wpływu amoniaku na ekspresję i aktywność transporterów układu N w mysich hodowlach mieszanych astrocytarno-neuronalnych, a dalej, nad mechanizmami regulacji SN1 przez PKC oraz czynnik transkrypcyjny Sp1 w hodowli pierwotnej astrocytów kory czołowej myszy, w warunkach hiperamonemii *in vitro*.

W pierwszej pracy wykazano, że mieszana hodowla astrocytarno-neuronalna odwzorowuje obserwacje poczynione *in vivo*: obniżenie poziomu białka SN1 i SN2, jak i zależnego od układu N wychwyty [3 H]glutaminy pod

wpływem amoniaku. Przyczyną zmian mogły być wzajemne oddziaływania astrocytów i neuronów, które można tłumaczyć uwalniającymi się z komórek czynnikami troficznymi i/lub metabolitami.

W drugiej pracy wykazano obniżenie aktywności PKC w astrocytach traktowanych amoniakiem. Ponadto aktywacja PKC prowadziła do obniżenia poziomu białka SN1 na błonie komórkowej astrocytów oraz znosiła wpływ amoniaku na zależny od układu N wyrzut [³H]glutaminy. Dalej udokumentowano wzmocnioną interakcję SN1 z izoformą PKCδ, której wyciszenie redukowało wpływ amoniaku na zależny od układu N wyrzut [³H]glutaminy z komórek.

W trzeciej pracy pokazano udział czynnika transkrypcyjnego Sp1 w regulacji ekspresji i funkcji SN1 w warunkach ekspozycji na amoniak. Traktowanie astrocytów amoniakiem prowadziło do wzrostu poziomu ekspresji i translokacji czynnika Sp1 do jądra komórkowego astrocytów, co skutkowało wzmocnieniem wiązania Sp1 do sekwencji promotora *Snat3*. Wyciszenie Sp1 prowadziło do obniżenia ekspresji SN1 oraz zmniejszonego transportu [³H]glutaminy z astrocytów w warunkach ekspozycji na amoniak, ale nie zmieniało badanych parametrów w warunkach kontrolnych. Było to prawdopodobnie związane z aktywacją czynnika Sp1 pod wpływem działania amoniaku. Co więcej, zaobserwowano, że zarówno amoniak jak i aktywacja PKC estrami forbolu, prowadziła do defosforylacji Sp1, co w konsekwencji mogło skutkować obniżoną ekspresją mRNA SN1 pod wpływem aktywacji PKC.

Podsumowując, obniżona ekspresja i aktywność transporterów układu N w hodowlach mieszanych astrocytarno-neuronalnych wskazuje na istotną rolę interakcji astrocyt-neuron w ujawnianiu się działania amoniaku. W warunkach hiperamonemii astrocytarny transporter SN1 regulowany jest przez aktywację oraz oddziaływania z PKC, w szczególności z izoformą PKCδ. Jednocześnie, częściowa defosforylacja czynnika transkrypcyjnego Sp1 może regulować ekspresję SN1 na poziomie transkrypcji.