

Mgr Anna Magdalena Lenkiewicz

**Udział parkiny w molekularnych mechanizmach  
toksyczności egzogennej  $\alpha$ -synukleiny  
w komórkach dopaminergicznych PC12**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych  
w dyscyplinie: biologia medyczna

Promotor: dr hab. Agata Adamczyk, prof. IMDiK

Promotor pomocniczy: dr Anna Wilkaniec



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

Warszawa 2018

## STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Badania ostatniej dekady wskazują na kluczową rolę białek  $\alpha$ -synukleiny ( $\alpha$ -Syn) oraz parkiny w molekularnych mechanizmach zaangażowanych w procesy obumierania neuronów dopaminergicznych w chorobie Parkinsona (ChP). Mutacje w genie kodującym  $\alpha$ -Syn są odpowiedzialne za rozwój rodzinnej ChP dziedziczonej w sposób autosomalny dominujący, natomiast mutacje w genie kodującym parkinę wpływają na rozwój choroby przekazywanej w sposób autosomalny recesywny. Czynniki wywołujące zmiany zwyrodnieniowe w ChP do chwili obecnej nie zostały ostatecznie określone, jednakże najnowsze badania sugerują, że oligomeryzacja  $\alpha$ -Syn, a następnie agregacja i odkładanie się tego białka w cytoplazmie może mieć kluczowe znaczenie w patomechanizmie tej choroby. Udowodniono, że uwolnione do przestrzeni zewnątrzkomórkowej oligomery  $\alpha$ -Syn wywierają najsilniejsze cytotoksyczne działanie na komórki dopaminergiczne szlaku czarno-prążkowiowego i prowadzą do zaburzeń funkcji motorycznych obserwowanych w ChP. Mechanizm cytotoksycznego działania zewnątrzkomórkowej  $\alpha$ -Syn może obejmować zaburzenia przepuszczalności błony komórkowej i deregulację receptorów błonowych, co skutkuje zaburzeniem homeostazy wapniowej i zwiększonym uwalnianiem tlenku azotu (NO) oraz innych wolnych rodników tlenowych, jak również deregulacją mitochondriów oraz siateczki śródplazmatycznej (ang. endoplasmic reticulum - ER). W konsekwencji prowadzi to do zaburzenia funkcji synaps i neurodegeneracji.

Z kolei, udział parkiny w patomechanizmie sporadycznej ChP jest związany z zahamowaniem jej fizjologicznych funkcji wskutek mutacji lub modyfikacji wywołanych działaniem stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego. Parkina, jako ligaza ubikwitynowa E3, katalizuje ubikwitynację białek i jest enzymem o kluczowym znaczeniu dla prawidłowego funkcjonowania systemu ubikwityna-proteasom (ang. ubiquitin-proteasome system - UPS). Ponadto pełni ona istotną rolę w cyklu życiowym mitochondriów regulując ich biogenezę, fuzję, rozszczepienie oraz degradację na drodze mitofagii. Zaburzenie poziomu i aktywności parkiny, a w konsekwencji utrata jej funkcji fizjologicznych, może więc przyczyniać się do akumulacji nieprawidłowo pofałdowanych lub toksycznych białek oraz zaburzeń funkcji i cyklu życiowego mitochondriów. Pomimo iż zaburzenia funkcji parkiny, jak również oligomeryzacja i zewnątrzkomórkowe uwalnianie  $\alpha$ -Syn są kluczowymi mechanizmami związanymi z powstawaniem i rozwojem ChP, niewiele badań wskazuje na funkcjonalne interakcje pomiędzy tymi białkami.

Ze względu na funkcję parkiny jako ligazy ubikwitynowej E3, zainteresowania naukowców skoncentrowane były wyłącznie na zbadaniu jej udziału w degradacji oraz akumulacji  $\alpha$ -Syn w neuronach. Wykazano jednak, że gromadząca się w warunkach patologicznych  $\alpha$ -Syn nie jest bezpośrednim substratem dla parkiny, a istotną rolę w jej usuwaniu pełni szlak autofago-lizosomalny. Z drugiej strony istnieją dane wskazujące, że w warunkach stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego, który towarzyszy oligomeryzacji/agregacji  $\alpha$ -Syn, może dochodzić do modyfikacji potranslacyjnych parkiny, zaburzenia jej aktywności i utraty funkcji fizjologicznych związanych z usuwaniem nieprawidłowych dysfunkcyjnych białek. Ponieważ parkina jest istotnym białkiem w regulacji cyklu życiowego i kontroli jakości mitochondriów, zaburzenie jej funkcji może prowadzić do nieprawidłowości w funkcjonowaniu całej sieci mitochondrialnej, a w konsekwencji do śmierci neuronów. Jednak do chwili obecnej nie zidentyfikowano czynników odpowiedzialnych za dysfunkcję parkiny. Wobec powyższego **celem pracy** była weryfikacja **hipotezy badawczej**, że  $\alpha$ -Syn w sposób zależny od NO i wolnych rodników tlenowych prowadzi do modyfikacji potranslacyjnych parkiny i zaburzeń jej funkcji, a w konsekwencji do uszkodzenia mitochondriów.

W niniejszych badaniach zastosowano model cytotoksycznego działania egzogennych oligomerów  $\alpha$ -Syn (5  $\mu$ M) w komórkach dopaminergicznych guza chromochłonnego nadnerczy szczura (łac. *Pheochromocytoma* - PC12). Ponadto badania prowadzono na komórkach PC12 ze stabilną nadekspresją parkiny, traktowanych egzogennymi oligomerami  $\alpha$ -Syn oraz na komórkach PC12 z częściowym wyciszeniem parkiny. Badania prowadzono w oparciu o metody spektrofotometryczne, spektrofluorymetryczne, luminescencyjne, immunochemiczne, chromatograficzne oraz mikroskopowe, wzbogacone o analizę poziomu ekspresji genów.

Prezentowane w niniejszej pracy wyniki wykazały, że inkubacja komórek z oligomerami  $\alpha$ -Syn indukowała wzrost poziomu jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ) w cytosolu oraz poziomu wolnych rodników tlenowych, w tym NO. Ponadto wykazano, że w wyniku działania egzogennej  $\alpha$ -Syn dochodzi do zaburzenia potencjału oksydoredukcyjnego, aktywacji stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego, uszkodzenia DNA i indukcji programowanej śmierci komórek dopaminergicznych. Zaobserwowano również, że zahamowanie syntezy NO i innych wolnych rodników tlenowych zapobiega obumieraniu komórek w wyniku działania egzogennej  $\alpha$ -Syn, co sugeruje istotne znaczenie stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego w molekularnych mechanizmach toksyczności tego białka.

Wykazano, że pod wpływem działania oligomerów  $\alpha$ -Syn dochodzi do S-nitrozylacji, autoubikwitynacji, a następnie degradacji parkiny. Z kolei zastosowanie inhibitora syntazy NO (NNLA) lub zmiatacza wolnych rodników, N-acetylocysteiny (NAC) przeciwdziała zależnej od  $\alpha$ -Syn dysfunkcji parkiny. Badania te wskazują, że oligomery  $\alpha$ -Syn w sposób zależny od NO prowadzą do uszkodzenia funkcji parkiny i utraty jej cytoprotekcyjnych właściwości.

Badania niniejszej pracy wykazały, że obniżenie poziomu parkiny w wyniku wyciszenia ekspresji genu *Prkn* skutkuje obniżeniem mitochondrialnego potencjału błonowego, zwiększoną produkcją rodnika nadadtlenkowego oraz spadkiem poziomu wewnątrzkomórkowego ATP. Zaobserwowane w niniejszej pracy zaburzenia funkcji mitochondriów w wyniku zahamowania ekspresji parkiny nie wydają się być bezpośrednio związane z deregulacją dynamiki tych organelli, ponieważ nie wykazano istotnych zmian poziomu białek regulujących procesy fuzji i rozszczepienia mitochondriów. Jednakże wyciszenie ekspresji genu *Prkn* skutkowało znacznym obniżeniem poziomu czynnika transkrypcyjnego PGC-1  $\alpha$ , który jest głównym regulatorem biogenezy mitochondriów, oraz powodowało obumieranie komórek PC12. Wyniki te sugerują, że utrzymywanie prawidłowego poziomu parkiny jest niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania mitochondriów i żywotności komórek dopaminergicznych.

Uzyskane wyniki wskazują, że toksyczne działanie  $\alpha$ -Syn w komórkach PC12 może nie być całkowicie zależne od deregulacji parkiny, bo chociaż zmniejszenie poziomu tego enzymu wywołuje znamienne obniżenie przeżywalności komórek, to efekt ten jest znacznie mniejszy w porównaniu z cytotoksycznością wywołaną przez oligomery  $\alpha$ -Syn. Ponadto, zaobserwowano, że nadekspresja parkiny w komórkach PC12 tylko częściowo zapobiega toksyczności  $\alpha$ -Syn, podczas gdy obniżenie poziomu wolnych rodników tlenowych przyczynia się do całkowitego zahamowania neurodegeneracji wywołanej działaniem tego białka.

W badaniach prowadzonych na komórkach PC12 z nadekspresją parkiny wykazano, że działanie  $\alpha$ -Syn skutkuje obniżeniem mitochondrialnego potencjału błonowego, co wpływa na zwiększenie produkcji mitochondrialnego rodnika nadadtlenkowego oraz obniżenie poziomu wewnątrzkomórkowego ATP. Ponadto w wyniku inkubacji z oligomerami  $\alpha$ -Syn dochodzi do zwiększenia mitochondrialnego potencjału oksydoredukcyjnego. Jednocześnie zaobserwowano protekcyjny wpływ nadekspresji parkiny na zależne od oligomerów  $\alpha$ -Syn zaburzenie funkcji mitochondriów.

Zaobserwowano, że w wyniku działania egzogennych oligomerów  $\alpha$ -Syn dochodzi do fragmentacji mitochondriów oraz obniżenia poziomu mitofuzyny-1 i mitofuzyny-2, białek regulujących fuzję tych organelli.  $\alpha$ -Syn nie wpływała natomiast na poziom pozostałych białek regulujących dynamikę mitochondriów. W niniejszej pracy wykazano, że chociaż nadekspresja parkiny w istotny sposób zapobiega rozszczepieniu mitochondriów wywołanemu przez  $\alpha$ -Syn, to nie wpływa na obniżenie poziomu mitofuzyn w wyniku działania tego białka. Ponadto nadekspresja parkiny wpływa na obniżenie poziomu mitofuzyn *per se*. W świetle tych danych można sugerować, że parkina zapobiega wywołanemu przez  $\alpha$ -Syn rozszczepieniu mitochondriów w sposób niezależny od zmian w ilości białek regulatorowych procesu fuzji/rozszczepienia.

W wyniku inkubacji komórek dopaminergicznych z oligomerami  $\alpha$ -Syn obserwowano nagromadzenie się pofragmentowanych mitochondriów na skutek zaburzenia ich degradacji w lizosomach. Jednocześnie uzyskane wyniki badań pokazują, że w wyniku działania egzogennej  $\alpha$ -Syn dochodzi do zahamowania aktywności mTOR wskutek obniżenia fosforylacji tego enzymu na serynie 2448, co może przyczyniać się do aktywacji procesu autofagii. Obserwowane w niniejszej pracy zaburzenia procesu mitofagii wskutek działania  $\alpha$ -Syn bezpośrednio wynikają z obniżenia poziomu parkiny w mitochondriach, co powoduje spadek ubikwitynacji białek mitochondrialnych. Z kolei nadekspresja parkiny całkowicie zapobiegała deregulacji mitofagii wywołanej przez  $\alpha$ -Syn wskutek zwiększenia poziomu ubikwitynowanych białek mitochondrialnych. Ponadto  $\alpha$ -Syn powodowała zaburzenia syntezy mitochondriów *de novo* poprzez zależne od parkiny obniżenie poziomu PGC-1  $\alpha$ . Uzyskane wyniki pokazują, że w warunkach działania egzogennej  $\alpha$ -Syn obniżony poziom parkiny zaburza równowagę pomiędzy procesami biogenezy mitochondriów i mitofagii, co prowadzi do nagromadzenia uszkodzonych mitochondriów.

Podsumowując, wyniki uzyskane w tej pracy po raz pierwszy wykazały istotne znaczenie deregulacji parkiny w molekularnych mechanizmach toksyczności oligomerów  $\alpha$ -Syn. Co więcej, w niniejszej pracy po raz pierwszy udokumentowano istnienie funkcjonalnych zależności pomiędzy  $\alpha$ -Syn i parkiną, a zaburzeniami funkcji mitochondriów.