

*Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej*

*im. Mirosława Mossakowskiego*

*Polska Akademia Nauk*

*Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału*

*Joanna Motyl*

**„Znaczenie kinazy sfingozyny-1 oraz  
sfingozyno-1-fosforanu w doświadczalnym  
modelu choroby Parkinsona oraz  
w farmakologicznej cytoprotekcji”**

*Praca doktorska wykonana pod kierunkiem*

*Prof. dr hab. n. med. Joanny B. Strosznajder*

*Warszawa, 2017*

## Streszczenie

Etiopatogeneza idiopatycznej Choroby Parkinsona (ChP) pomimo wieloletnich badań nie została w pełni wyjaśniona, a jej terapia pozostaje nieskuteczna. Poznanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za obumieranie neuronów w ChP jest istotnym wyzwaniem dla współczesnej nauki. W ostatniej dekadzie dokonał się ogromny postęp w zrozumieniu roli zaburzeń sfingolipidów w patogenezie/patomechanizmie chorób neurodegeneracyjnych, takich jak stwardnienie rozsiane (*sclerosis multiplex*, SM) niedotlenienie/niedokrwienie mózgu, urazowe uszkodzenie mózgu czy Choroba Alzheimera (ChA). Badania ostatnich lat wskazują na udział zmian w homeostazie bioaktywnych sfingolipidów. W procesie tym kluczową rolę pełnią kinazy sfingozyny (Sphk1/2) (EC:2.7.1.91), które są konserwatywnymi enzymami lipidowymi, przeprowadzającymi fosforylację sfingozyny do sfingozyno-1-fosforanu (S1P). S1P syntetyzowany przez Sphk1 jest wysoce reaktywną cząsteczką, która wywiera działanie anti-apoptotyczne, bierze udział w regulacji procesów neurogenezy, różnicowania, migracji komórek oraz ich programowanej śmierci. S1P działa na komórce w dwojaki sposób: jako wewnątrzkomórkowy przekaźnik drugiego rzędu oraz jako przekaźnik pierwszego rzędu, za pośrednictwem pięciu receptorów błonowych sprzężonych z białkami G: S1PR1-5. Obie kinazy (Sphk1 i Sphk2) pełnią kluczową rolę w regulacji przeżycia/śmierci komórki poprzez utrzymywanie homeostazy aktywnych sfingolipidów, S1P oraz ceramidu. Lipidy te pełnią przeciwstawną funkcję odpowiednio anti i pro-apoptotyczną, co czyni enzymy syntetyzujące i degradujące S1P cennymi punktami uchwytu w opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych wielu chorób. Wzrost poziomu S1P może wpływać na aktywację procesów nowotworzenia, natomiast obniżenie jego poziomu i jednoczesny wzrost stężenia ceramidu obserwowany jest w ChA oraz w przebiegu innych chorób neurodegeneracyjnych. Agonista receptorów S1P - fingolimod (FTY720) jest pierwszym doustnym lekiem immunosupresyjnym w SM. Znaczenie Sphk1/S1P w patologii ChP jest do chwili obecnej niewyjaśnione.

Celem rozprawy było zbadanie poziomu ekspresji i aktywność Sphk1 oraz jej udziału w mechanizmie śmierci komórek nerwowych. Ponadto badano potencjalne neuroprotektoryjne właściwości S1P, jego analogów oraz agonistów receptorów S1P w modelach doświadczalnych ChP.

Zastosowano chemiczny model ChP, wywołany toksyną 1-metylo-4-fenylopirydyną (MPP+) oraz jej prekursorem zdolnym przenikać barierę krew-mózg: 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyną (MPTP). Działaniu tej toksyny poddano odpowiednio ludzką linię komórkową *neuroblastoma* (SH-SY5Y) oraz dorosłe myszy szczepu C57BL/6. Celem pierwszej części moich badań była analiza poziomu ekspresji/aktywności enzymów metabolizujących S1P, ze szczególnym uwzględnieniem Sphk1 oraz ocena protekcyjnych właściwości i mechanizmu działania S1P w komórkach SH-SY5Y w stresie oksydacyjnym wywołanym MPP+ (3 mM). Prezentowane w niniejszej pracy wyniki po raz pierwszy wykazały obniżenie poziomu ekspresji i aktywności Sphk1 oraz jednoczesny wzrost ekspresji liazy S1P w komórkowym modelu ChP. Wyniki wskazują na obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu tego aktywnego lipidu. Stwierdzono, że hamowanie aktywności Sphk1 powoduje wzrost poziomu wolnych rodników (WR) oraz indukuje procesy molekularne prowadzące do aktywacji apoptotycznej śmierci komórek. Stwierdzono, że w mechanizmie śmierci komórek wywołanej zarówno toksycznością MPP+, jak i farmakologicznym obniżeniem aktywności Sphk1 zaangażowane są procesy molekularne, prowadzące do wzrostu ekspresji białek pro-apoptotycznych (Bax i Hrk), obniżenia poziomu cytochromu c we frakcji mitochondrialnej oraz wzrostu aktywności kaspazy-3, której markerem jest obecność produktu proteolizy polimerazy poli(ADP-rybozy) PARP-1 o ciężarze 89 kDa. Uzyskane wyniki wskazują, że obniżenie ekspresji/aktywności Sphk1, a tym samym syntezy S1P może być kluczowym zjawiskiem w mechanizmie śmierci komórek w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego MPP+.

W kolejnych doświadczeniach zbadano wpływ egzogenego S1P na żywotność komórek SH-SY5Y, poziom WR i wybrane procesy molekularne w warunkach toksyczności MPP+. Wykazano, że S1P (1  $\mu$ M) powoduje obniżenie poziomu WR i ekspresji pro-apoptotycznych białek Bax i Hrk, a także wzrost ekspresji Sphk1 i żywotności komórek SH-SY5Y poddanych działaniu MPP+. Analiza żywotności komórek z udziałem agonistów i antagonistów poszczególnych typów receptorów S1P wykazała, że za cytoprotekcyjny efekt S1P w badanych warunkach stresowych odpowiada aktywacja przekąźnictwa zależnego od receptora S1PR1. Podobny efekt wykazuje analog S1P – FTY720 w formie ufosforylowanej (FTY720-P, 100 pM). Potencjalne neuroprotekcyjne właściwości FTY720 były przedmiotem badań drugiego etapu (*in vivo*) niniejszej rozprawy.

Celem badań w zwierzęcym modelu ChP była ocena działania neuroprotekcynowego FTY720 - analogu sfingozyny i agonisty/modulatora wszystkich receptorów S1P z wyjątkiem S1PR2, na zmiany molekularne oraz na poziom immunoreaktywności hydroksylazy tyrozyny (TH) w prążkowie i śródmózgowiu myszy oraz na aktywność motoryczną zwierząt. Efekt FTY720 porównywano z działaniem pramipeksolu (PPX) – agonisty receptorów D2/D3 i leku stosowanego w terapii ChP. Ponadto ważnym zagadnieniem było zbadanie ekspresji i aktywności Sphk1 w wybranych częściach mózgu myszy w modelu ChP. Badania dotyczyły również udziału pro-życiowej kinazy Akt i zależnej od niej fosforylacji białka Bad. Wszelkie analizy prowadzono po iniekcji dootrzewnowej MPTP, którą podawano w schemacie toksyczności ostrej (w sumarycznej dawce 40 mg/kg mc w 3 iniekcjach). FTY720 i PPX podawano w dawce 1 mg/kg mc 1 godz. po ostatniej iniekcji MPTP oraz przez 10 kolejnych dni. Stwierdzono neuroprotekcynowe właściwości FTY720 w modelu ChP, których miarą był wzrost poziomu immunoreaktywności hydroksylazy tyrozynowej (TH-IR) w prążkowie myszy. Zmiana ta była porównywalna z efektem uzyskanym po podaniu PPX, który również przeciwdziałał obniżeniu aktywności i ekspresji Sphk1 w toksyczności MPTP. Uzyskane wyniki wykazały obniżenie poziomu mRNA i immunoreaktywności Sphk1, a także aktywności tego enzymu w śródmózgowiu myszy poddanych działaniu MPTP. Wyniki *in vivo* potwierdzają zmiany ekspresji i aktywności Sphk1 i kinazy Akt stwierdzone w modelu komórkowym toksyczności MPP+. W mechanizmie działania obydwu substancji farmakologicznych stwierdzono udział pro-życiowej kinazy Akt. Zarówno FTY720, jak i PPX powodują wzrost poziomu fosforylacji/aktywności tej kinazy w śródmózgowiu myszy poddanych działaniu MPTP. Zaobserwowano również zwiększony poziom fosforylacji białka Bad, zależny od aktywności kinazy Akt. W wyniku tej modyfikacji Bad może ulegać sekwestracji w cytozolu, co hamuje jego pro-apoptotyczne działanie. Stwierdzono również obniżenie poziomu ekspresji pro-apoptotycznego białka Bax w śródmózgowiu myszy po podaniu PPX w modelu toksyczności MPTP. Analiza behawioralna wykazała, że podanie FTY720 oraz PPX w porównywalnym stopniu znamienne wpływa na poprawę wymuszonej aktywności motorycznej myszy, mierzonej testem Rotarod, w stosowanym modelu ChP.

Podsumowując, prezentowane w niniejszej pracy badania po raz pierwszy wykazały obniżenie poziomu ekspresji/aktywności Sphk1 w komórkowym i zwierzęcym modelu ChP. Obniżona synteza S1P stanowić może istotny czynnik w patomechanizmie śmierci komórek nerwowych w przebiegu ChP. Uzyskane wyniki wskazują na neuroprotekcijną rolę stymulacji receptorów S1P przez specyficznych agonistów (S1P, SEW2871 - agonistę receptora S1PR1) oraz przez FTY720-P, analog S1P i modulator wszystkich receptorów dla S1P z wyjątkiem S1PR2. W zwierzęcym modelu ChP FTY720 wykazuje neuroprotekcynny efekt porównywalny z PPX zarówno na poziomie molekularnym, jak i w ocenie aktywności lokomotorycznej. Ponadto, w mechanizmie działania neuroprotekcynnego PPX stwierdzono jego wpływ na przemiany metaboliczne bioaktywnych sfingolipidów. Uzyskane wyniki wskazują na celowość dalszych poszukiwań nowych neuroprotektantów działających na procesy przekazywania informacji, zależnej od receptorów S1P celem doskonalenia strategii terapeutycznych ChP.