

# **AUTOREFERAT**

**dr n. med. Marta Sidoryk-Węgrzynowicz**

**Pracownia Patoneurochemii, Zakład Neurochemii,  
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. M. Mossakowskiego PAN,  
ul. Pawińskiego 502-106 Warszawa**

Warszawa, 2019

**1. Imię i Nazwisko.**

Marta Sidoryk-Węgrzynowicz

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

**2001** - Dyplom ukończenia studiów na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego w Warszawie. Tytuł pracy magisterskiej wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Mikrobiologii Stosowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Bieleckiego "Ocena aktywności fosfolipatycznej w patogenezie szczepu *Listeria monocytogenes*". Uzyskany tytuł: magister biologii, specjalność – mikrobiologia.

**2007** - Dyplom doktora nauk medycznych uzyskany w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie. Tytuł rozprawy doktorskiej pod kierunkiem prof. dr. hab. Jana Albrechta „Ekspresja i funkcje transporterów glutaminy w komórkach nowotworowych pochodzenia glejowego“. Uzyskany stopień naukowy: doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej.

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

**2002- 2007** Studia doktoranckie, Zakład Neurotoksykologii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Warszawa,

**2008-2011** Staż podoktorski (Postdoctoral Research Fellow) w Division of Pediatric Toxicology, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, United States., pod kierunkiem prof. Michael Aschner,

**2012-2016** Staż podoktorski (Postdoctoral Research Associate) w Department of Clinical Neurosciences, University of Cambridge, United Kingdom. 2012-2016, pod kierunkiem prof. Maria Grazia Spillantini,

**2018**-Adiunkt, Zakład Neurochemii Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Warszawa.

**4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl publikacji „**Znaczenie uszkodzeń cyklu glutamina-glutaminian w zaburzeniach integracji astrocytarno-neuronalnej w wybranych stanach patologicznych OUN**”, składający się z 5 prac naukowych o sumarycznym **IF=23, 392; MNiSW=150.**

1. **Sidoryk-Węgrzynowicz M**, Lee E, Albrecht J, Aschner M. (2009) Manganese disrupts astrocyte glutamine transporter expression and function. *J Neurochem*, 110: 822-830 (**IF<sub>2009</sub> – 3,999, MNiSW – 35**). *Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej, przygotowaniu, zaprojektowaniu i wykonaniu części doświadczalnej, opracowaniu wyników, współudziale w pisaniu manuskryptu, odniesieniu się do recenzji i ostatecznej edycji manuskryptu. Mój indywidualny udział w autorstwie pracy szacuję na 65%*.
2. **Sidoryk-Węgrzynowicz M**, Lee ES, Ni M, Aschner M. (2010) Manganese-induced downregulation of astroglial glutamine transporter SNAT3 involves ubiquitin-mediated proteolytic system. *Glia* 58: 1905-1912. (**IF<sub>2010</sub> – 5,186, MNiSW – 40**). *Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej, przygotowaniu, zaprojektowaniu i wykonaniu części doświadczalnej, opracowaniu wyników, na współudziale w pisaniu manuskryptu, odniesieniu się do recenzji i ostatecznej edycji manuskryptu. Mój indywidualny udział w autorstwie pracy szacuję na 60%*.
3. **Sidoryk-Węgrzynowicz M**, Lee ES, Ni M, Aschner M. (2011) Disruption of astrocytic glutamine turnover by manganese is mediated by protein kinase C pathway. *Glia* 59: 1732-1743 (**IF<sub>2011</sub> – 4,820, MNiSW – 40**). *Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej, przygotowaniu, zaprojektowaniu i wykonaniu części doświadczalnej, opracowaniu wyników, na współudziale w pisaniu manuskryptu, odniesieniu się do recenzji i ostatecznej edycji manuskryptu. Mój indywidualny udział w autorstwie pracy szacuję na 65%*.
4. **Sidoryk-Węgrzynowicz M**, Lee E, Aschner M. (2012) Mechanism of Mn(II)-mediated dysregulation of glutamine-glutamate cycle: focus on glutamate turnover. *J Neurochem* 122: 856-67. (**IF<sub>2012</sub> – 3,973, MNiSW – 35**). *Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej, przygotowaniu, zaprojektowaniu i wykonaniu części doświadczalnej, opracowaniu wyników, na współudziale w pisaniu manuskryptu, odniesieniu się do recenzji i ostatecznej edycji manuskryptu. Mój indywidualny udział w autorstwie pracy szacuję na 65%*.
5. **Sidoryk-Węgrzynowicz M**, Gerber YN, Ries M, Sastre M, Tolkovsky AM, Spillantini MG. (2017) Astrocytes in mouse models of tauopathies acquire early deficits and lose neurosupportive functions. *Acta Neuropathol Commun* 5:89. (**IF<sub>2017</sub> – 5,414, MNiSW – nie ma**). *Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w sformułowaniu hipotezy badawczej, przygotowaniu, zaprojektowaniu i wykonaniu części doświadczalnej, opracowaniu wyników i na współudziale w pisaniu manuskryptu, odniesieniu się do recenzji i ostatecznej edycji manuskryptu. Mój indywidualny udział w autorstwie pracy szacuję na 50%*.

## **Wprowadzenie**

Wspólnym zagadnieniem naukowym cyklu publikacji, będącego podstawą do wystąpienia o nadanie stopnia doktora habilitowanego jest znaczenie uszkodzeń cyklu glutamina-glutaminian w zaburzeniach integracji astrocytarno-neuronalnej w wybranych stanach patologicznych OUN.

## **Znaczenie astrogleju w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN): rola cyklu glutamina-glutaminian w integracji neuron-astrocyt.**

Astrocyty (astroglej) są najliczniej występującymi komórkami glejowymi w ludzkim mózgu, a w niektórych jego obszarach ich liczba znacznie przewyższa liczbę neuronów (Nedergaard i wsp., 2003). Astroglej w znacznym stopniu odpowiada za prawidłowe funkcjonowanie i plastyczność mózgu poprzez swój udział w utrzymaniu bariery krew –mózg (blood-brain barrier, BBB). Bierze on również czynny udział w regulacji krążenia mózgowego, w zachowaniu równowagi jonowej, w procesach regeneracyjnych poprzez tworzenie tzw. blizn glejowych. Za pośrednictwem różnych mechanizmów, jak egzocytoza, dyfuzja przez kanały i receptory błonowe astrocyty wydzielają szereg czynników, wśród których wyróżnia się białka, chemokiny, cytokiny, neurotransmitery, neurohormony, związki małowczątkowe: nukleotydy i nukleozydy (Verkhatsky i wsp., 2016).

Astrocyty mają bezpośredni wpływ na funkcjonowanie neuronów, poprzez swój udział w neuronalnej gospodarce energetycznej, metabolicznej, antyoksydacyjnej, neurotransmisyjnej, jak również w procesach synaptogenezy (Allen, 2014). Komunikacja astrocyty z neuronem odbywa się za pośrednictwem kilkuetapowego cyklu glutamina – glutaminian (GGC), pełniącego istotną rolę w zachowaniu homeostazy głównych neuroprzekaźników aminokwasowych: pobudzającego kwasu glutaminowego (Glu) i hamującego kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA) (Sonnewald i wsp., 1997). GGC stanowi podstawowy mechanizm, poprzez który astrocyty wspierają neurony w mózgu, i składa się z sekwencji astrocytarno-neuronalnych reakcji metabolicznych sprzężonych z transferem aminokwasu –glutaminy (Gln) i neuroprzekaźnika aminokwasowego –kwasu glutaminowego (Albrecht i wsp., 2010).

Gln bierze bezpośredni udział w metabolizmie energetycznym komórek. Powstający z glutaminy Glu ulega deaminacji do  $\alpha$  ketoglutaranu - metabolitu pośredniego w cyklu Krebsa. Glutamina jest metabolitem zaangażowanym w wiele procesów komórkowych swoistych dla OUN takich jak metabolizm amoniaku czy synteza Glu i GABA (McKenna i wsp., 2012).

Integracja neuron-astrocyt przez GGC wiąże się z syntezą glutaminy za pośrednictwem specyficznego enzymu astrocytarnego, syntetazy glutaminianowej (GS, z ang. glutamine synthetase). Wyływ tego aminokwasu z astrocytów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, pociąga za sobą jego wychwyty przez neurony, gdzie Gln ulega deamidacji do Glu w reakcji katalizowanej przez glutaminazę (PAG, z ang. phosphate activated glutaminase) (Bak i wsp., 2006). Z kolei uwolniony z neuronów neurotransmitter Glu ulega transportowi do astrocytów, a następnie amidacji do Gln, zamykając tym procesy wchodzące w skład GGC. Oprócz uzupełnienia puli neurotransmitera Gln, w neuronach glutaminianergicznym GGC pośredniczy w biosyntezie GABA poprzez reakcję katalizowaną przez dekarboksylazę glutaminową (GAD, z ang. glutamate decarboxylase) (Schousboe, 2012) (*Schemat 1*).

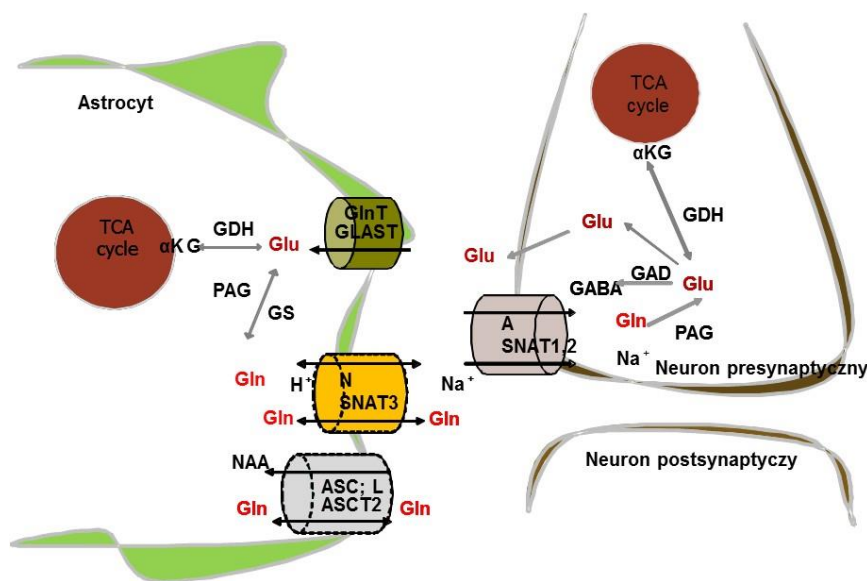
### **Transport glutaminy i glutaminianu pomiędzy astrocytem i neuronem za pośrednictwem GGC.**

Mechanizmy odpowiedzialne za metabolizm i translokację Glu i Gln w astrocytach i w neuronach odgrywają fundamentalną rolę w fizjologii i patofizjologii mózgu. W wyniku aktywacji, kwas glutaminianowy wyrzucany z neuronów glutaminianergicznym w obrębie szczeliny synaptycznej, wiąże się następnie z receptorami Glu zlokalizowanymi w błonie postsynaptycznej. Nadmiar glutaminianu usuwany jest z synaps za pośrednictwem specyficznych transporterów astrocytarnych: transportera glutaminianowo-asparaginowego GLAST (z ang. glutamate aspartate transporter, EAAT1, SLC1A3) i transportera glutaminianowego 1 GLT1 (z ang. glial high affinity glutamate transporter, EAAT2, SLC1A2) (Schousboe i wsp., 2004).

Transport glutaminy przez błony komórkowe OUN odbywa się z udziałem kilku transporterów przynależnych do różnych układów transportujących aminokwasy, w tym zależnego od  $\text{Na}^+$  układu A, ASC, N oraz niezależnego od  $\text{Na}^+$  układu L (Nagaraja i Brookes, 1996). Poszczególne układy różnią się swoistością substratową, zależnością od pH, składu jonowego środowiska, kinetyki transportu, regulacji przez czynniki zewnętrzne, czy też lokalizacją komórkową (Broer i Brookes, 2001). Dwukierunkowy transport glutaminy odbywa się z udziałem transporterów astrocytarnych: SNAT3 (z ang. sodium-coupled neutral amino acid transporter-3; SLC38A3) i SNAT5 (z ang. sodium-coupled neutral amino acid transporter-5; SLC38A5), przynależnych do układu N (Boulland i wsp., 2002). Presynaptyczna lokalizacja SNAT3 a także jego silne powinowactwo do glutaminy, wskazuje na szczególną rolę tego transportera w eksporcie Gln z astrocytów oraz w glutaminianergicznym and GABAergicznym

neurotransmisji. Obok układu N wpływ Gln z astrocytów odbywa się z udziałem przedstawiciela układu ASC, transportera ASCT2 (z ang. alanine-serine-cysteine transporter 2; SLC1A5) i układu L, transportera LAT2 (z ang. L-type AA transporter 2; SLC7A5) (Broer i wsp., 1999; Deitmer i wsp., 2003). Transport Gln do neuronów odbywa się głównie za pośrednictwem SNAT1 (z ang. sodium-coupled neutral amino acid transporter1; SLC38A1), transportera należącego do układu A (Chaudhry i wsp., 2002) (*Schemat 1*).

Zmiany w ekspresji i w funkcjonowaniu występujących swoiście w astrocytach transporterów Gln i Glu mają bezpośredni wpływ na integrację astrocytarno-neuronalną, jak również stanowią podstawę wielu procesów neuropatologicznych. Niniejszy autoreferat dotyczy roli astrocytów oraz znaczenia integracji astrocytów z neuronami poprzez GGC w wybranych stanach patologicznych OUN: w toksyczności manganu oraz tauopatii.



**Schemat 1. Cykl glutamina-glutaminian w integracji astrocytarno-neuronalnej.** Nadmiar glutaminianu usuwany jest z synaps za pośrednictwem specyficznych transporterów astrocytarnych: GLAST i GLT1, gdzie jest następnie metabolizowany do Gln przez GS. Część Gln jest następnie wyrzucana z astrocytów za pośrednictwem transporterów układu N i w mniejszym stopniu za pośrednictwem transporterów układu L i ASC. Gln jest pobierana przez neurony przy udziale układu A. W neuronach Gln stanowi substrat w reakcji katalizowanej przez PAG, której produktem końcowym jest Glu zasilający pulę aminokwasu neurotransyjnego GABA (dekarboksylacja katalizowana przez GAD) i  $\alpha$ KG -metabolitu włączanego do Cyklu Krebsa (deamidacja przy udziale GDH).

### **Procesy neurodegeneracyjne związane z toksycznością manganu.**

Mangan, który powszechnie występuje w przyrodzie zarówno w związkach organicznych jak i nieorganicznych, w organizmach żywych stanowi składnik szeregu metaloenzymów (np. dysmutazy ponadtlenkowej, karboksylazy pirogronianowej czy syntazy glutaminianowej) (Archibald i Tyree, 1987) i jest niezbędny w wielu procesach związanych m.in. z syntezą białek, węglowodanów i lipidów, z odpornością, czy fizjologiczną regulacją cukru we krwi (Kwakye i wsp., 2015). Najczęstszą przyczyną zatrucia manganem u człowieka drogą pokarmową jest spożywanie zanieczyszczonej wody. Zatrucia drogą oddechową spotyka się u ludzi zatrudnionych w przemyśle, a nagromadzenie manganu zaobserwować można w obszarze gałki bladej (globus pallidus), prążkowie (striatum) a także, w mniejszym stopniu, w istocie czarnej (substantia nigra) (O'Neal i Zheng, 2015; Sikk i wsp., 2011). Ekspozycja organizmu na większe dawki manganu prowadzi do wystąpienia licznych objawów klinicznych (np. ogólna dezorientacja, emocjonalna labilność, halucynacje, senność, spowolnienie ruchowe, sztywność i drżenie mięśniowe), które w dużym stopniu przypominają zmiany chorobowe obserwowane w chorobie Parkinsona (PD) (Lucchini i wsp., 2009; Olanow, 2004; Olanow i wsp., 1996). Ponadto stwierdzono, że mangan aktywuje degenerację neuronów dopaminergicznych, obniża poziom dopaminy w prążkowie myszy ekspresjonujących  $\alpha$ -synukleinę, a także ma bezpośredni wpływ na formowanie agregatów  $\alpha$ -synukleiny w korze czółowej zwierząt naczelnych ekspozowanych chronicznie na mangan (Kwakye i wsp., 2015). Cechą odróżniającą manganizm od PD jest obecność zmian neurodegeneracyjnych w obszarze gałki bladej bez występowania charakterystycznych dla PD agregatów białkowych - ciał Lewy'ego (Olanow, 2004). Zatrucie manganem prowadzi do wielu zmian neurodegeneracyjnych, a jego neurotoksyczne działanie obejmuje stres oksydacyjny (Kowaltowski i wsp., 1995), dysfunkcję mitochondriów (Yin i wsp., 2008), pobudzenie szlaku ubiquitynacji białek, zależną od proteasomu degradację białek (Sidoryk-Węgrzynowicz i wsp., 2011), zaburzenia metabolizmu glutaminianu i dopaminy (Chandra i wsp., 1979; Lee i wsp., 2012).

### **Neurotoksyczne właściwości manganu-wpływ na integrację neuron-astrocyt.**

#### **-Zaburzenia ekspresji i funkcji transportu glutaminy.**

Badania własne z użyciem hodowli pierwotnej astrocytów wykazały kilka wrażliwych punktów GGC mogących stanowić punkt wyjściowy procesów związanych z neurotoksycznością manganu. W pracy Sidoryk-Węgrzynowicz i wsp., 2009 (*Publikacja 1. z*

*cyklu prac*) poświęconej temu zagadnieniu z użyciem metody RT-PCR wykazano, że obecność Mn w medium inkubacyjnym obniża ekspresję mRNA kodującego SNAT2 (8 h inkubacja z 1 mM i 24 h inkubacja z 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M i 1 mM Mn(II)), SNAT3 (4 h inkubacja z 1 mM Mn(II) 8 i 24 h inkubacja z 500  $\mu$ M i 1 mM Mn(II)) i LAT2 (8 h inkubacja z 1 mM i 24 h inkubacja z 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M Mn(II) i 1 mM Mn(II)). W podobnym układzie doświadczalnym, metoda Western blot pozwoliła wykazać obniżenie na poziomie białka transporterów SNAT2 (4 h inkubacja z 1 mM Mn(II) i 8 h inkubacji przy stężeniu 500  $\mu$ M i 1 mM Mn(II)), SNAT3 (4 h inkubacja przy stężeniu 500  $\mu$ M i 1 mM Mn(II)), LAT2 (8 h inkubacja przy stężeniu 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M i 1 mM Mn(II)) i ASCT2 (8 h inkubacja z 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M i 1 mM Mn(II)). Badania czynnościowe układów transportujących Gln z użyciem substratowej selekcji poszczególnych układów i znakowanej izotopowo Gln w obecności Mn(II) wykazały wyniki korelujące z ustaloną wcześniej redukcją na poziomie białkowym poszczególnych transporterów. Wykazano też, że 8 h inkubacja astrocytów z 500  $\mu$ M i 1 mM Mn(II) obniża zarówno całkowity wychwyty glutaminy, jak i ten zachodzący przy udziale układów N i ASC. W tych samych warunkach przy użyciu metody HPLC stwierdzono obniżenie całkowitego wyrzutu glutaminy, jak również upośledzenie eksportu Gln do przestrzeni zewnątrzkomórkowej przy udziale transporterów układów N i ASC (8 h inkubacja astrocytów z 500  $\mu$ M i 1 mM Mn (II) oraz L (8 h inkubacja z 1 mM Mn (II)).

Na szczególną uwagę zasługuje największa wrażliwość i degradacja najbardziej swoistego dla Gln transportera układu N -SNAT3 przy stosunkowo krótkim czasie (8 h) inkubacyjnym hodowli pierwotnej astrocytów z manganem. Podobnie, zewnątrz i wewnątrzkomórkowy transport Gln był najsilniej upośledzony w przypadku układu N. Badania opisane w Sidoryk-Węgrzynowicz i wsp., 2010 (*Publikacja 1. z cyklu prac*) z wykorzystaniem hodowli pierwotnej astrocytów wykazały, że inkubacja z Mn(II) (4 h i 8 h 500  $\mu$ M i 1 mM) aktywuje procesy ubikwitynacji białek, podnosi poziom wolnej ubikwityny, a także zwiększa ekspresję mRNA oraz poziom białka ligazy ubikwitynowej Nedd4-2 (z ang. neural precursor cells expressed developmentally downregulated 4-2).

Badania własne, opisane w pracy Sidoryk-Węgrzynowicz i wsp., 2011 (*Publikacja 3. z cyklu prac*), dotyczące mechanizmów związanych z neurotoksycznością Mn w dysfunkcji transportu glutaminy w astrocytach, wskazują na szczególną rolę szlaku sygnałowego inicjowanego przez kinazę białkową C (PKC). Obserwowany wzrost aktywności PKC po 4 h, 8 h i 24 h inkubacji hodowli pierwotnej astrocytów z 500  $\mu$ M i 1 mM Mn(II) korelował ze wzrostem ufosforylowanych form izoformy PKC $\alpha$  (8 h, 1 mM Mn(II); 24 h, 500  $\mu$ M, 1 mM



Mn(II) i PKC $\delta$  (8 h i 24 h, 500  $\mu$ M, 1 mM Mn(II)). Badania wykazały, że 4 h-24 h inkubacja hodowli pierwotnej astrocytów z  $\alpha$ -phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) - czynnikiem indukującym PKC skutkuje obniżeniem transportu glutaminy do wnętrza komórek. Wśród układów wrażliwych na aktywację szlaku PKC notowano układ N oraz ASC. W przypadku układu N 8 h inkubacja astrocytów z PMA skutkowała obniżeniem wychwytu Gln o  $57\% \pm 8\%$  w stosunku do kontroli, a 24 h inkubacja obniżeniem  $63\% \pm 5\%$  w stosunku do warunków kontrolnych. Układ ASC wykazywał wrażliwość na inkubację komórek z PMA objawiającą się spadkiem aktywności transportującej glutaminę do  $67\% \pm 8\%$  w porównaniu do kontroli po 8 h i  $62\% \pm 6\%$  w porównaniu do kontroli po 24 h. Szczegółowe badanie wpływu szlaku inicjowanego przez PKC na poziom białek poszczególnych transporterów Gln wykazało ich zróżnicowaną wrażliwość na obecność w medium inkubacyjnym czynnika aktywującego PKC. Analiza poziomu białek metodą Western blot homogenatów komórkowych wykazała istotne statystycznie obniżenie białka ASCT2 i SNAT3 i brak zmian w przypadku LAT2 i SNAT2 w warunkach inkubacji komórek z PMA. Poziom białka transportera ASCT2 ulegał obniżeniu po 6 h ( $49\% \pm 5\%$  vs kontrola), 8 h ( $67\% \pm 7\%$  vs kontrola) i 24 h ( $61\% \pm 5\%$  vs kontrola) inkubacji komórek z PMA. Transporter SNAT3 wykazywał wrażliwość na PMA, która objawiała się spadkiem poziomu białka po 8 h ( $67\% \pm 4\%$  vs kontrola) i 24 h inkubacji ( $58\% \pm 8\%$  vs kontrola). Następnie wykazano obniżeniem syntezy białka dla transporterów ASCT2 (6 h,  $48\% \pm 5\%$  vs kontrola; 8 h,  $26\% \pm 4\%$  vs kontrola; 24 h,  $28\% \pm 6\%$  vs kontrola) i SNAT3 (4 h,  $15\% \pm 0.9\%$  vs kontrola; 6 h,  $11\% \pm 0.7\%$  vs kontrola; 8 h,  $17\% \pm 0.6\%$  vs kontrola; 24 h,  $21\% \pm 0.9\%$  vs kontrola), we frakcji błonowej w warunkach aktywacji szlaku indukowanego przez PKC.

Negatywny wpływ Mn oraz szlaku sygnałowego inicjowanego przez PKC na translokację glutaminy, jak również wcześniej notowana aktywacja PKC w obecności manganu, zrodziły hipotezę zakładającą udział PKC w zależnym od manganu upośledzeniu transportu Gln. Dalsze badania potwierdziły to założenie i wykazały, że inkubacja komórek w medium zawierającym generalny inhibitor PKC, bisindolylmaleimide II (BisII), hamuje spadek wychwytu Gln wywołany 4 h i 8 h obecnością 500  $\mu$ M i 1 mM Mn(II) w medium inkubacyjnym. Jak wcześniej opisano, badania własne wykazały pozytywny wpływ manganu na stopień ufosforylowania poszczególnych izoform PKC. Kolejne doświadczenia pozwoliły wykazać szczególną rolę manganu w regulacji izoformy PKC $\delta$ . Obok wspomnianego wzrostu ufosforylowanych postaci PKC $\delta$ , metoda Western blot wykazała wzrost immunoreaktywności proteolitycznie ciętej formy (z ang. cleaved PKC $\delta$ ) w warunkach inkubacji hodowli pierwotnej

astrocytów z manganem (4 h, inkubacja z 1 mM Mn(II); 8 h, 24 h inkubacja z 500  $\mu$ M i 1 mM Mn(II)).

Warto zauważyć, że PKC $\delta$  odgrywa dużą rolę w procesach apoptotycznych. Zmiany w ekspresji tej izoformy notowano w starzejącym się mózgu, a także w wielu procesach neurodegeneracyjnych. W przypadku neuronów dopaminergicznych ustalono zasadniczą rolę PKC $\delta$  w procesach apoptozy inicjowanej traktowaniem komórek manganem (Kitazawa i wsp., 2005). W tym wypadku wykazano, że aktywacja apoptotycznych właściwości tej izoformy następuje wskutek zależnego od kaspazy 3 proteolitycznego jej cięcia. Powstająca w ten sposób aktywna forma PKC $\delta$  pobudza procesy apoptotyczne związane z dysfunkcją mitochondrialną i pociąga za sobą wypływ cytochromu c do cytoplazmy i fragmentację DNA (Latchoumycandane i wsp., 2005).

O ile w przypadku badań dotyczących roli szlaku sygnałowego PKC przez mangan w deregulacji transportu glutaminy w astrocytach nie stwierdzono zwiększonej apoptozy komórek, o tyle obserwowano zdarzenie, które mogłyby poprzedzać procesy apoptotyczne. W badaniach własnych stwierdzono, że inkubacja komórek w obecności manganu aktywuje PKC $\delta$  poprzez jej proteolityczne cięcie, co mogłoby promować translokację aktywnej formy PKC $\delta$  do jądra komórki i bezpośrednio indukować apoptozę. Inną istotną obserwacją była notowana integracja izoformy PKC $\delta$  z transporterami glutaminy ASCT2 i SNAT3. Dodatkowo stwierdzono zależny od czasu inkubacji komórek z 500  $\mu$ M Mn(II) wzrost ko-ekspresji ASCT2 z izoformą PKC $\delta$ .

Badania własne opisane w pracy Sidoryk-Węgrzynowicz i wsp., 2010 (**Publikacja 2. z cyklu prac**), z użyciem metody ko-immunoprecypitacji wykazały swoiste współwystępowanie ligazy Nedd4-2 z transporterem SNAT3. Natomiast hodowla astrocytów w obecności manganu promowała procesy ubikwitynacji białek poprzez podniesienie ekspresji Nedd4-2 oraz obniżenie ekspresji negatywnego regulatora ligazy-kinazy białkowej indukowanej glukokortykoidami (SGK1, z ang. glucocorticoid inducible kinase). Dodatkowo zaobserwowano, że aktywacja kinazy PKC zwiększa powinowactwo transportera SNAT3 do ligazy Nedd4-2, sugerując istotną rolę szlaku sygnałowego inicjowanego przez PKC na procesy postranslacyjne regulujące SNAT3. Wyniki te mogłyby wskazywać, że aktywacja procesów ubikwitynacji bierze udział w zależnej od Mn negatywnej regulacji transportera SNAT3 (**Publikacja 3. z cyklu prac**). Podobną negatywną regulację zależną od PKC, objawiającą się spadkiem aktywności transportu i redukcją białek w błonach komórkowych notowano w przypadku kilku transporterów aminokwasów neuroprzekaznikowych, w tym transporterów

dopaminy (Melikian i Buckley, 1999) serotoniny (Qian i wsp., 1997) czy też GABA (Beckman i wsp., 1999). W przypadku regulacji transportera SNAT3, rola manganu opierać się może na wzmocnieniu procesów związanych z ubikwitynacją oraz uaktywnieniem szlaku sygnałowego inicjowanego przez PKC. Wydaje się, że w przypadku transportera ASCT2 dominującą rolę w jego regulacji odgrywać może zależna od manganu aktywacja izoformy PKC $\delta$ .

### **-„Podwójna” rola manganu w dysfunkcji GGC- deregulacja ekspresji i funkcji transportu glutaminianu.**

W optymalnych warunkach fizjologicznych astrocyty zapewniają prawidłowe funkcjonowanie neuronów poprzez regulację poziomu neurotransmiterów wyrzuconych z komórek do szczeliny synaptycznej. W neuronach glutaminian występuje w stężeniu 10 mM, co stanowi wartość znacząco wyższą od jego stężeń w astrocytach. Niskie stężenie glutaminianu w komórkach astrogleju wiąże się z jego szybką syntezą do glutaminy w reakcji swoistej dla astrocytów (Rothstein i wsp., 1996). Wysokie wewnątrzkomórkowe stężenie Gln w neuronach powoduje jego nieznaczny wychwyt przez te komórki. Z kolei aktywny metabolizm Gln i Glu w astrocytach tłumaczy duży udział astrogleju w transporcie glutaminianu z przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Norenberg i Martinez-Hernandez, 1979). Ponad 80% glutaminianu pochodzącego z neuronów jest wychwytywana przez astrocytarne transportery GLAST i GLT1 (Rothstein i wsp., 1996). Aktywność obu transporterów notuje się już w pierwszym tygodniu życia postnatalnego, co świadczy o czynnym udziale astrocytów w regulacji neurotransmisji już na wczesnym etapie rozwojowym (Regan i wsp., 2007).

Badania *in vivo* (hodowle organotypowe) i *in vitro* w warunkach wyciszenie genu kodującego astrocytarne transportery GLAST i GLT1 wykazały podwyższony poziom zewnątrzkomórkowego stężenia glutaminianu oraz neurotoksyczne działania tego neurotransmitera (Rothstein i wsp., 1996). Nieprawidłowe funkcjonowanie transporterów glutaminianowych notowane są w wielu schorzeniach neurodegeneracyjnych. Z tego punktu widzenia astrocytarno-neuronalna integracja odgrywa kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu neuronów, a dysfunkcja astrocytów stanowić może pierwotne podłoże zmian neuropatologicznych.

Anomalie cyklu glutamina-glutaminian w toksyczności manganu wiążą się nie tylko z nieprawidłowościami transportu glutaminy, ale również ze zmiennością funkcjonowania transporterów glutaminianu. Badania własne opisane w Sidoryk-Węgrzynowicz i wsp., 2012 (**Publikacja 4. z cyklu prac**), wykazały zaburzenia w ekspresji i funkcjonowaniu transporterów

glutaminianu w warunkach inkubacji hodowli pierwotnej astrocytów z manganem. Stwierdzono obniżenie syntezy białek transportera GLAST i GLT1 po 4, 8 i 24 h hodowli komórek z 500  $\mu\text{M}$  Mn oraz prawie 60% w spadek wychwytu Gln przez astrocyty hodowane przez 4 i 8 h z 500  $\mu\text{M}$  Mn. Co ciekawe, zaobserwowano, że 4 h inkubacja komórek z manganem (100  $\mu\text{M}$  i 500  $\mu\text{M}$  Mn(II)) i inhibitorem endosomalno/lizosomalnego szlaku degradacji białek –chloroquine (CHLORO) blokuje negatywny wpływ manganu na astrocytarny transport Gln. W tych samych warunkach doświadczalnych notowano blokowanie zależnej od manganu deregulacji syntezy białka dla transportera GLT1. Wyniki te wskazują na znaczący udział manganu w regulacji transportera glutaminianu poprzez aktywację mechanizmów związanych z procesami endosomalno/lizosomalnej degradacji białek. O ile procesy degradacji białek błonowych poprzez procesy związane z endocytozą były dotąd badane, o tyle opisana w Sidoryk-Węgrzynowicz i wsp., 2012 inicjacja endosomalno/lizosomalnej degradacji transportera GLAST w astrocytach hodowanych z manganem jest nowatorskim odkryciem.

Mając na uwadze z jednej strony doniesienia dotyczące wpływu aktywacji ścieżki sygnałowej inicjowanej przez PKC na deregulację transporterów aminokwasów neurotransmisyjnych, a z drugiej własne obserwacje przemawiające za aktywacją szlaku PKC przez mangan, postanowiono podjąć się badań dotyczących znaczenia szlaku PKC w zależnych od manganu zaburzeniach ekspresji i funkcji transporterów Glu. Aby odpowiedzieć na pytanie czy modulacja szlaku sygnałowego inicjowanego przez PKC wpływa na transport glutaminianu przeprowadzono analizę wychwytu Glu przez astrocyty w obecności PMA- czynnika aktywującego PKC oraz BIS II- generalnego inhibitora PKC. Inkubacja hodowli pierwotnej astrocytów z PMA znacząco statystycznie obniżała wychwyt Gln przez komórki w badanych punktach czasowych, a najsilniejszy efekt obserwowany był po 8 h ( $43\% \pm 4\%$  vs kontrola). Z kolei 1 h i 4 h inkubacja komórek z BIS II i manganem (4 h, 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  Mn(II)) znosiła efekt obniżenia transportu glutaminianu.

Nasze wcześniejsze badania wykazały wpływ manganu na stopień ufosforylowania izoformy PKC $\alpha$  i PKC $\delta$  (**Publikacja nr 3 z cyklu prac**), dlatego założyliśmy różny udział obu izoform w zależnej od manganu deregulacji transportu Gln. Badanie transportu Gln w obecności specyficznego inhibitora izoformy PKC $\alpha$ , Gö6976 (Gö) znosiło zależny od manganu efekt obniżenia wychwytu Gln, obserwowany po inkubacji komórek z Mn (1 h, 500  $\mu\text{M}$  Mn(II), 1  $\mu\text{M}$  Gö; 4 h, 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  Mn(II), 1  $\mu\text{M}$  Gö). Dalsza analiza transportu Gln w obecności specyficznego inhibitora izoformy PKC $\delta$ , rottlerin (ROT) wykazała że jednoczesna inkubacja

komórek z Mn i ROT również blokuje zaburzenia wychwytu Gln wywołane inkubacją komórek z manganem (1 h, 500  $\mu$ M Mn(II), 5  $\mu$ M ROT; 4 h i 8 h, 100, 500  $\mu$ M Mn(II), 5  $\mu$ M ROT). Analogiczne działanie do ROT przejawiał inhibitor kaspazy 3 Z-VAD-FMK (Z-Ala-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone) (50  $\mu$ M).

Przedstawione wyniki badań wskazują na to, że obniżenie transportu Gln przez Mn pociąga za sobą zaangażowanie szlaków sygnałowych inicjowanych przez izoformy PKC $\delta$  i PKC $\alpha$ . Wcześniej opisane badania własne wykazały, że izoforma PKC $\delta$  wykazuje największą wrażliwość na mangan (*Publikacja nr 3 z cyklu prac*), co było zauważalne również w badaniu wychwytu Glu w obecności Mn i specyficznego inhibitora PKC $\delta$ , ROT. Aktywacja PKC $\delta$  na skutek inkubacji komórek z Mn odbywa się pod wpływem jej proteolitycznego cięcia zależnego od kaspazy 3. To z kolei mogłoby tłumaczyć podobny wynik zależnego od manganu hamowania spadku wychwytu Gln przez komórki na skutek inkubacji z ROT i Z-VAD-FMK. Obserwacje te są w zgodzie z wcześniej opisaną aktywacją izoformy PKC $\delta$  polegającą na fosforylacji i cięciu proteolitycznym na skutek inkubacji hodowli pierwotnej astrocytów z manganem. Innym argumentem potwierdzającym wysoką wrażliwość PKC $\delta$  na mangan jest indukcja translokacji tej izoformy do jądra komórkowego wskutek 1 h-24 h inkubacji komórek z 100  $\mu$ M i 500  $\mu$ M Mn(II).

Analiza poziomu białek metodą Western blot, wykazała, że obniżenie syntezy transporterów wywołane inkubacją komórek z manganem jest znoszone w obecności inhibitorów Gö, ROT oraz inhibitora kaspazy 3 - Z-VAD-FMK. W przypadku transportera GLUT1 zmiany te były zauważalne po 4 h i 8 h dla wszystkich inhibitorów, a po 24 h dla inhibitora Z-VAD-FMK. Podobną tendencję stwierdzono dla transportera GLAST podczas 4 h inkubacji komórek z Mn i Gö, bądź z Z-VAD-FMK i 8 h inkubacji z Mn i Z-VAD-FMK. Dodatkowe badania transportu Glu w warunkach wyłączenia genów kodujących PKC metodą shRNA wykazały niewrażliwość astrocytów na Mn. Najsilniejszy efekt, który utrzymywał się po 1 h, 4 h (shRNA PKC $\delta$ ; 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M Mn (II)), 8 h i 24 h (shRNA PKC $\delta$ ; 100  $\mu$ M, Mn(II), notowano w przypadku wyłączenia genu kodującego PKC $\delta$ . Wyciszenie genu dla PKC $\alpha$  skutkowało odpornością komórek na inicjowany manganem spadek wychwytu Gln podczas 1 h inkubacji shRNA PKC $\alpha$  z 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M Mn (II). Badania z użyciem ko-immunoprecypitacji wykazały współwystępowanie transportera GLUT1 a nie GLAST zarówno z izoformą PKC $\delta$  jak i PKC $\alpha$ . Co ciekawe 1 h, 4 h i 8h inkubacja komórek z Mn zwiększała powinowactwo GLUT1 z PKC $\delta$ .

Opisane doniesienia po raz pierwszy pokazują mechanizmy toksyczności manganu w zaburzeniach funkcjonowania GGC. Wykazano, że traktowanie astrocytów manganem aktywuje procesy endosomalno/lizosomalnej degradacji białek oraz szlak inicjowany przez PKC i oba te mechanizmy negatywnie wpływają na funkcje transporterów glutaminianu. Wyniki badań własnych wskazują, że aktywacja szlaku sygnałowego inicjowanego przez PKC w toksyczności manganu w dużej mierze jest również zaangażowana w procesy związane z zaburzeniami funkcjonowania transporterów glutaminy. Badania własne po raz pierwszy pokazują szczególną rolę izoformy PKC $\delta$  w toksyczności manganu. Wieloetapowa, zależna od manganu aktywacja tej izoformy obejmująca procesy fosforylacji, cięcia proteolitycznego i translokacji jądrowej, przyczynia się do upośledzenia działania GGC i wpływa negatywnie na transport glutaminy i glutaminianu.

### **Znaczenie GGC i astrocytów w neurodegeneracji związanej z patologią białka tau.**

Wiele chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimerera, otępienie czołowo-skroniowe (frontotemporal dementia, FTDP), zwyrodnienie korowo-podstawne, postępujące porażenie nadjądrowe charakteryzuje się obecnością wewnątrzkomórkowych inkluzji związanego z mikrotubulami białka tau i objęte są wspólną nazwą tauopatii (Spillantini i Goedert, 2013). O ile fizjologicznie białko tau, odgrywa istotną rolę w stabilizacji struktury neuronu, transporcie aksonalnym, regulacji podziału komórki oraz w procesie apoptozy, o tyle obecność jego dysfunkcyjnych form prowadzi do procesów neurodegeneracyjnych (Maeda i wsp., 2007). Identyfikacja mutacji w genie MAPT kodującym tau wykazała jej bezpośredni związek z patologią dziedzicznych form FTDP oraz z zależnym od zaburzeń wiązania białka tau do mikrotubul postępowaniem choroby (Hutton i wsp., 1998). Cechą wspólną tauopatii jest hiperfosforylacja białka tau mająca związek z formowaniem się helikalnie zwiniętych splotów włókienkowych, których agregacja prowadzi następnie do powstania neurofibrylarnych złogów białkowych (Allen i wsp., 2002; Goedert i wsp., 1992). Pomimo wiedzy, że obecność agregatów białkowych jest kluczowa w neurodegeneracji, mechanizmy toksycznego wpływu agregatów białka tau na neurony nie są do końca poznane (Lewis i Dickson, 2016).

Aktywacja astrocytów (astrocytoza) jest uniwersalną odpowiedzią astrogleju na wiele stanów patologicznych mózgu, ma również negatywny wpływ na funkcjonowanie tych komórek i ich neuroprotektoryjne właściwości. Astrocytoza wiąże się ze zmianami morfologicznymi, ze zwiększoną liczbą komórek oraz wzrostem ekspresji markerów związanych ze strukturą komórki: kwaśnym białkiem włókienkowym (GFAP, z ang. glial

fibrillary acidic protein) czy wimentyną. Oprócz tego obserwowane zmiany w funkcjonowaniu astrogeju obejmują procesy związane ze stresem oksydacyjnym (syntaza tlenku azotu, NOS, z ang. nitric oxide synthases; dysmutaza ponadtenkowa, SOD, z ang. superoxide dismutase; glutation), regulacją transkrypcji (NF- $\kappa$ B, z ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; STAT3), regulacją stanów zapalnych (cytokiny, czynniki wzrostu), komunikacją komórek poprzez białka macierzy pozakomórkowej (laminina, integryny, metaloproteazy, chondroityny) i połączenia typu gap (koneksyna, CX43, z ang. connexin43), synaptogenezą (trombospondyna, TSP, z ang. thrombospondin), regulacją naczyniową (prostaglandyny, PGE, z ang. prostaglandin), homeostazą jonową (akwaporyna, AQP4, z ang. aquaporin-4) (Sofroniew, 2009).

Aktywacja astrocytów i wiążąca się z tym dysfunkcja tych komórek jest cechą wspólną wielu chorób neurodegeneracyjnych, w tym również tauopatii (Hutton i wsp., 1998; Mohn i Koob, 2015; Verkhatsky i wsp., 2014). W tauopatii zarówno u pacjentów, jak i w modelach *in vivo*, astrocytoza obejmuje korę, hipokamp oraz regiony mózgu dotknięte chorobą, często poprzedzając utratę neuronów (Kersaitis i wsp., 2004), co z kolei sugeruje bezpośredni wpływ zmian patologicznych astrocytów na rozwój chorób (Yamanaka i wsp., 2008).

Badania z wykorzystaniem mysich modeli opartych na mutacji genu MAPT, wskazują że aktywacja astrocytów może odgrywać znaczącą rolę w patogenezie choroby. Reaktywacja astrocytów jest jedną ze zmian patologicznych w obrębie kory mózgu mysiego modelu z mutacją P301S ludzkiego tau pod neuronalnym promotorem Thy1.2. Inną cechą tego modelu jest patologia tau objawiająca się hiperfosforylacją i agregacją białka prowadzącą do formowania się wewnątrzkomórkowych splotów neurofibrylarnych (NFT, z ang. neurofibrillary tangles), postępująca neurodegeneracja w różnych regionach mózgu oraz liczne zmiany behawioralne (Allen i wsp., 2002).

Ostatnie doniesienia z użyciem mysiego modelu P301S wykazały postępującą, zależną od agregacji tau neurodegenerację i jednocześnie astrocytozę w obrębie kory czołowej (Hampton i wsp., 2010). Ponadto, transplantacja astrocytów wyprowadzonych z neuronalnych komórek progenitorowych (NPC, z ang. neural precursor cells,) do tego rejonu mózgu, skutkowała wzrostem przeżywalności neuronów. Mogłoby to sugerować utratę neuroprotektoryjnych właściwości astrocytów endogennych lub/i nabycie przez nie cech neurotoksyczności.

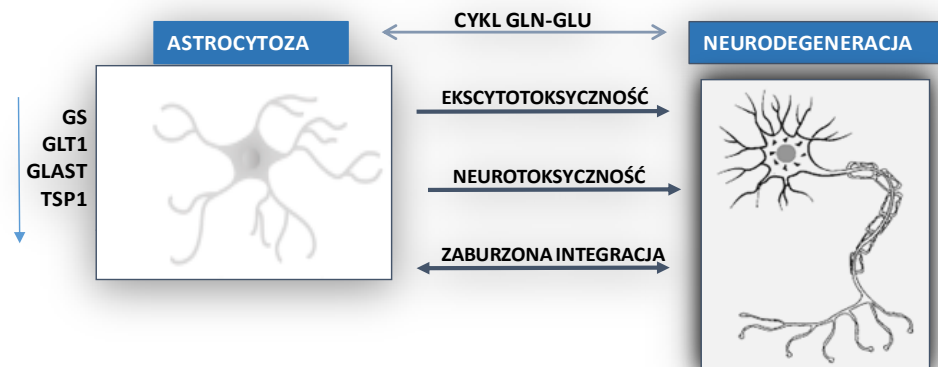
Aby zbadać to zagadnienie, podczas ostatniego stażu podoktorskiego (Department of Clinical Neurosciences, University of Cambridge) stworzyłam kilka wariantów hodowli

pierwotnych astrocytów i neuronów *in vitro* wywodzących się z kory mózgowej co najmniej 7 dniowych kontrolnych C57BL/6 bądź transgenicznych myszy P301S. Wybór zwierząt 7 dniowych uzasadnia notowana w tym czasie ekspresja białka tau w neuronach myszy transgenicznych. Opublikowane badania własne (Sidoryk-Węgrzynowicz i wsp., 2017, **Publikacja 5. z cyklu prac**), wykazały obniżenie przeżywalności neuronów hodowanych w obecności astrocytów pochodzących z myszy P301S (P301SA), bądź eksponowanych na medium z ich hodowli (astrocyte conditioned medium, ACM), w porównaniu z neuronami hodowanymi z astrocytami pochodzących z myszy C57BL/6 (C57A) lub w obecności medium wyprowadzonego z C57A. Ten negatywny wpływ na przeżywalność neuronów był również notowany w przypadku użycia innego modelu mysiego, z mutacją P301L ludzkiego tau (izoforma 2N4R) pod neuronalnym promotorem Thy1.2, co wskazuje, że uzyskane obserwacje są swoiste dla patologii tau. Oprócz zmian w przeżywalności neuronów obserwowano statystycznie znaczące obniżenie (3-4 krotne w stosunku do kontroli) ekspresji markerów presynaptycznych (SNP, z ang. synaptophysin) i postsynaptycznych (PSD95) w hodowlach mieszanych neuronów z astrocytami wyprowadzonymi z myszy P301S. Negatywny wpływ na przeżywalność i funkcjonowanie neuronów hodowanych w obecności P301SA lub ACM wywodzącego się od P301SA, notowano w hodowlach pochodzących od 7 dniowych myszy P301S, u których nie zachodzą jeszcze procesy związane z agregacją białka tau. To z kolei mogłoby sugerować, że toksyczne własności astrocytów poprzedzają pojawienie się wewnątrzkomórkowych inkluzji tau, a dysfunkcja astrocytów wiąże się ze wczesną manifestacją neuronalnej toksyczności białka tau. Badania własne z użyciem metody Western blot wykazały, że astrocyty wywodzące się z kory mózgu, 3 i 5 miesięcznych myszy P301S *in situ* wykazywały podwyższenie specyficznych markerów astrogleju związanych z proliferacją komórkową, takich GFAP (3 krotnie w stosunku do kontroli, 3 i 5 miesięczne myszy) i S100 $\beta$  (2 krotnie w stosunku do kontroli, 5 miesięczne myszy). Ponadto, w tym samym układzie eksperymentalnym, wykazano obniżenie syntezy astrocytarnych białek zaangażowanych w procesy neuroprotekcyjne związane z cyklem glutamina-glutaminian. Stwierdzono spadek syntezy GS (2 krotne w stosunku do kontroli, 3 miesięczne myszy; 1,8 krotne w stosunku do kontroli, 5 miesięczne myszy), GLAST (2 krotne w stosunku do kontroli, 3 miesięczne myszy; 1,5 krotne w stosunku do kontroli, 5 miesięczne myszy) i GLT1 (1,8 krotne w stosunku do kontroli, 3 miesięczne myszy). Co istotne, hodowle pierwotne astrocytów wyprowadzone z kory mózgu z co najmniej 7 dniowych myszy P301S (P301SA), wykazywały podobne zmiany patologiczne jakie notowano w astrocytach *in vivo*. W przypadku P301SA wykazano zwiększoną proliferację komórkową (3 krotna w stosunku do kontroli) i syntezę białka GFAP



oraz obniżoną syntezę GS i GLT1. Obserwowane zmiany fenotypu astrocytów mogłyby świadczyć o upośledzeniu funkcji neuroprotektoryjnych komórek i w dużym stopniu tłumaczyć spadek przeżywalności neuronów hodowanych w obecności P301SA. Warto również zauważyć w tym miejscu, że analiza proteomiczna białek wykazała znaczące różnice w poziomie wielu białek w hodowli astrocytów pierwotnych wyprowadzonych ze zwierząt kontrolnych i transgenicznym. Zmiany te notowano zarówno we frakcji wewnątrzkomórkowej, jak i sekrecyjnej. Co istotne, badania te wykazały znaczący spadek zawartości białka macierzy zewnątrzkomórkowej trombospondyny 1 (TSP1) w ACM wywodzącym się z P301SA. Mając na uwadze doniesienia literaturowe dotyczące udziału TSPs w procesach synaptogenezy (Jayakumar i wsp., 2014; Tyzack i wsp., 2014), opisany wcześniej spadek tego białka w ACM, a także obniżenie syntezy markerów synaptycznych neuronów inkubowanych z P310SACM, założyliśmy kluczową rolę TSP1 w procesach synaptogenezy w naszym układzie doświadczalnym. Nasze badania wykazały, że wyeliminowanie TSP1 z medium inkubacyjnego pochodzącego od astrocytów kontrolnych powoduje nie tylko spadek poziomu białek synaptycznych, lecz także wpływa negatywnie na przeżywalność neuronów.

Upośledzenie synaptogenezy oraz zakłócenie cyklu GGC wynikające z dysfunkcji astrocytów stanowiąc mogą podstawę w neuropatologii związanej z białkiem tau (*Schemat 2*). Proponowane mechanizmy obejmują zaburzenia w integracji neuron-astrocyt. Astrocyty poprzez bezpośredni kontakt z neuronami ekspresjonującymi zmutowane tau nabierają cech patologicznych, wywierając negatywny wpływ na neurony i przyczyniając się do inicjacji patogenezy choroby. Zaburzenia integracji pomiędzy astrocytem a neuronem w patologii białka tau mają bezpośredni związek ze wczesnymi zmianami w syntezie kluczowych białek GGC. Obniżenie syntezy białka GS skutkować może zaburzeniem syntezy glutaminy z glutaminianu. To zjawisko wraz z obniżeniem syntezy białek transportujących Glu upośledza właściwości neuroprotektoryjne astrocytów, takie jak ochrona przed ekscytotoksycznością glutaminianu i zapewnienie neuronom odpowiedniego poziomu aminokwasów neurotransmisyjnych. Ekscytotoksyczność wynikająca z upośledzonego układu transportującego Glu przez astrocyty może z kolei mieć bezpośrednio negatywny wpływ na przeżywalność neuronów.



**Schemat 2. Proponowany schemat zaburzeń integracji astrocytarno-neuronalnej wynikający z patologii astrocytów w neurodegeneracji związanej z białkiem tau.** W patologii białka tau zakłócenia w interakcji neuronów z astrocytami mają związek ze zmianami w funkcjonowaniu GGC. Zaburzenia w transporcie Glu wynikające ze spadku syntezy transporterów GLT1 i GLAST mogą prowadzić do uaktywnienia się ekscytotoksycznych własności glutaminianu. Dodatkowo, obniżenie ekspresji GS upośledza metabolizm Glu i Gln, natomiast zakłócenia w wydzielaniu TSP1 przez astrocyty negatywnie wpływają na procesy synaptogenezy.

### Podsumowanie

Przedstawione wyniki pokazują, że zaburzenia integracji astrocytarno-neuronalnej są wspólną cechą różnych stanów patologicznych OUN. W badanym modelu toksykologicznym stwierdzono dysfunkcje transportu glutaminy i glutaminianu oraz ujawniono komórkowe mechanizmy odpowiedzialne za zależną od manganu deregulację GGC. W przypadku patologii białka tau wykazano zaburzenia syntezy transporterów glutaminianu, a także syntetazy glutaminianowej mającej udział w metabolizmie glutaminy i glutaminianu. Zmianom tym towarzyszyły inne dysfunkcje astrocytów, takie jak wzrost proliferacji komórkowej oraz zmieniony profil ekspresji wielu białek obserwowany zarówno we frakcji wewnątrzkomórkowej, jak i w sekrecyjnej. Wydaje się wielce prawdopodobne, że anomalie w funkcjonowaniu astrocytów stanowią jedną z pierwotnych przyczyn inicjujących patologię omawianych schorzeń.

Wyniki przedstawionych badań własnych zbliżają do zrozumienia mechanizmów odpowiedzialnych za dysfunkcję astrocytów i dezintegrację tych komórek z neuronami, a także

do dokładniejszego zrozumienia podłoża niektórych stanów patologicznych OUN, takich jak neurotoksyczność oraz neurodegeneracja. Badania te stanowią również punkt wyjścia do dalszych, bardziej szczegółowych badań z zakresu neurotoksykologii i neurodegeneracji związanej z patologią białka tau, a także dają szansę na poznanie nowych możliwości zapobiegania zaburzeniom w komunikacji astrocyt-neuron.

### **Literatura**

Albrecht J, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Zielinska M, Aschner M (2010) Roles of glutamine in neurotransmission. *Neuron Glia Biol* 6(4):263-276.

Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, Yoshida H, Holzer M, Craxton M, Emson PC, Atzori C, Migheli A, Crowther RA, Ghetti B, Spillantini MG, Goedert M (2002) Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci* 22(21):9340-9351.

Allen NJ (2014) Astrocyte regulation of synaptic behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30:439-463.

Archibald FS, Tyree C (1987) Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Arch Biochem Biophys* 256(2):638-650.

Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* 98(3):641-653.

Beckman ML, Bernstein EM, Quick MW (1999) Multiple G protein-coupled receptors initiate protein kinase C redistribution of GABA transporters in hippocampal neurons. *J Neurosci* 19(11):RC9.

Boulland JL, Osen KK, Levy LM, Danbolt NC, Edwards RH, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA (2002) Cell-specific expression of the glutamine transporter SN1 suggests differences in dependence on the glutamine cycle. *Eur J Neurosci* 15(10):1615-1631.

Broer A, Brookes N, Ganapathy V, Dimmer KS, Wagner CA, Lang F, Broer S (1999) The astroglial ASCT2 amino acid transporter as a mediator of glutamine efflux. *J Neurochem* 73(5):2184-2194.

Broer S, Brookes N (2001) Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J Neurochem* 77(3):705-719.

Chandra S, Srivastava R, Shukla G (1979) Regional distribution of metals and biogenic amines in the brain of monkeys exposed to manganese. *Toxicology Letters* 4:189-192.

Chaudhry FA, Schmitz D, Reimer RJ, Larsson P, Gray AT, Nicoll R, Kavanaugh M, Edwards RH (2002) Glutamine uptake by neurons: interaction of protons with system a transporters. *J Neurosci* 22(1):62-72.

Deitmer JW, Broer A, Broer S (2003) Glutamine efflux from astrocytes is mediated by multiple pathways. *J Neurochem* 87(1):127-135.

Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA (1992) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8(1):159-168.

- Hampton DW, Webber DJ, Bilican B, Goedert M, Spillantini MG, Chandran S (2010) Cell-mediated neuroprotection in a mouse model of human tauopathy. *J Neurosci* 30(30):9973-9983.
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Che LK, Norton J, Morris JC, Reed LA, Trojanowski J, Basun H, Lannfelt L, Neystat M, Fahn S, Dark F, Tannenberg T, Dodd PR, Hayward N, Kwok JB, Schofield PR, Andreadis A, Snowden J, Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra BA, Hardy J, Goate A, van Swieten J, Mann D, Lynch T, Heutink P (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393(6686):702-705.
- Jayakumar AR, Tong XY, Curtis KM, Ruiz-Cordero R, Shamaladevi N, Abuzamel M, Johnstone J, Gaidosh G, Rama Rao KV, Norenberg MD (2014) Decreased astrocytic thrombospondin-1 secretion after chronic ammonia treatment reduces the level of synaptic proteins: in vitro and in vivo studies. *J Neurochem* 131(3):333-347.
- Kersaitis C, Halliday GM, Kril JJ (2004) Regional and cellular pathology in frontotemporal dementia: relationship to stage of disease in cases with and without Pick bodies. *Acta Neuropathol* 108(6):515-523.
- Kitazawa M, Anantharam V, Yang Y, Hirata Y, Kanthasamy A, Kanthasamy AG (2005) Activation of protein kinase C delta by proteolytic cleavage contributes to manganese-induced apoptosis in dopaminergic cells: protective role of Bcl-2. *Biochem Pharmacol* 69(1):133-146.
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE (1995) Ca(2+)-induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. *Am J Physiol* 269(1 Pt 1):C141-147.
- Kwakye GF, Paoliello MM, Mukhopadhyay S, Bowman AB, Aschner M (2015) Manganese-Induced Parkinsonism and Parkinson's Disease: Shared and Distinguishable Features. *Int J Environ Res Public Health* 12(7):7519-7540.
- Latchoumycandane C, Anantharam V, Kitazawa M, Yang Y, Kanthasamy A, Kanthasamy AG (2005) Protein kinase Cdelta is a key downstream mediator of manganese-induced apoptosis in dopaminergic neuronal cells. *J Pharmacol Exp Ther* 313(1):46-55.
- Lee E, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Wang N, Webb A, Son DS, Lee K, Aschner M (2012) GPR30 regulates glutamate transporter GLT-1 expression in rat primary astrocytes. *J Biol Chem* 287(32):26817-26828.
- Lewis J, Dickson DW (2016) Propagation of tau pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies. *Acta Neuropathol* 131(1):27-48.
- Lucchini RG, Martin CJ, Doney BC (2009) From manganese to manganese-induced parkinsonism: a conceptual model based on the evolution of exposure. *Neuromolecular Med* 11(4):311-321.
- Maeda S, Sahara N, Saito Y, Murayama M, Yoshiike Y, Kim H, Miyasaka T, Murayama S, Ikai A, Takashima A (2007) Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. *Biochemistry* 46(12):3856-3861.
- McKenna M, Dienel GA, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A (2012). Energy metabolism of the brain, w: *Basic Neurochemistry*, edytor: S. T. Brady, G. J. Siegel, R. W. Albers, D. I. Price. Waltham, MS, USA, Academic Press, Elsevier:200-231.
- Melikian HE, Buckley KM (1999) Membrane trafficking regulates the activity of the human dopamine transporter. *J Neurosci* 19(18):7699-7710.

Mohn TC, Koob AO (2015) Adult Astrogenesis and the Etiology of Cortical Neurodegeneration. *J Exp Neurosci* 9(Suppl 2):25-34.

Nagaraja TN, Brookes N (1996) Glutamine transport in mouse cerebral astrocytes. *J Neurochem* 66(4):1665-1674.

Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26(10):523-530.

Norenberg MD, Martinez-Hernandez A (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 161(2):303-310.

O'Neal SL, Zheng W (2015) Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. *Curr Environ Health Rep* 2(3):315-328.

Olanow CW (2004) Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1012:209-223.

Olanow CW, Good PF, Shinotoh H, Hewitt KA, Vingerhoets F, Snow BJ, Beal MF, Calne DB, Perl DP (1996) Manganese intoxication in the rhesus monkey: a clinical, imaging, pathologic, and biochemical study. *Neurology* 46(2):492-498.

Qian Y, Galli A, Ramamoorthy S, Risso S, DeFelice LJ, Blakely RD (1997) Protein kinase C activation regulates human serotonin transporters in HEK-293 cells via altered cell surface expression. *J Neurosci* 17(1):45-57.

Regan MR, Huang YH, Kim YS, Dykes-Hoberg MI, Jin L, Watkins AM, Bergles DE, Rothstein JD (2007) Variations in promoter activity reveal a differential expression and physiology of glutamate transporters by glia in the developing and mature CNS. *J Neurosci* 27(25):6607-6619.

Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16(3):675-686.

Schousboe A (2012). Studies of brain metabolism: A historical perspective, w: *Neural metabolism in vivo*, edytor: I. Choi , R. Gruetter. New York, USA, Springer. 4:909–920.

Schousboe A, Sarup A, Bak LK, Waagepetersen HS, Larsson OM (2004) Role of astrocytic transport processes in glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem Int* 45(4):521-527.

Sidoryk-Węgrzynowicz M, Lee E, Mingwei N, Aschner M (2011) Disruption of astrocytic glutamine turnover by manganese is mediated by the protein kinase C pathway. *Glia* 59(11):1732-1743.

Sikk K, Haldre S, Aquilonius SM, Taba P (2011) Manganese-Induced Parkinsonism due to Ephedrone Abuse. *Parkinsons Dis* 2011:865319.

Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32(12):638-647.

Sonnenwald U, Westergaard N, Schousboe A (1997) Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia* 21(1):56-63.

Spillantini MG, Goedert M (2013) Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol* 12(6):609-622.

Tyzack GE, Sitnikov S, Barson D, Adams-Carr KL, Lau NK, Kwok JC, Zhao C, Franklin RJ, Karadottir RT, Fawcett JW, Lakatos A (2014) Astrocyte response to motor neuron injury promotes structural synaptic plasticity via STAT3-regulated TSP-1 expression. *Nat Commun* 5:4294.

Verkhratsky A, Matteoli M, Parpura V, Mothet JP, Zorec R (2016) Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion. *EMBO J* 35(3):239-257.

Verkhratsky A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Sofroniew M (2014) Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans* 42(5):1291-1301.

Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW (2008) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11(3):251-253.

Yin Z, Aschner JL, dos Santos AP, Aschner M (2008) Mitochondrial-dependent manganese neurotoxicity in rat primary astrocyte cultures. *Brain Res* 1203:1-11.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.

### 5. 1. Wybrane prace przeglądowe i rozdziały książek.

Przedstawione powyżej zagadnienia są nie tylko przedmiotem oryginalnych prac badawczych, ale zostały również omówione przeze mnie w następujących pracach przeglądowych oraz w rozdziałach książkowych.

**Sidoryk-Węgrzynowicz M.** (2014) Impairment of glutamine/glutamate- $\gamma$ -aminobutyric acid cycle in manganese toxicity in the central nervous system. *Folia Neuropathol* 52: 377-82.

**Sidoryk-Węgrzynowicz M, Aschner M.** (2013) Role of astrocytes in manganese mediated neurotoxicity *BMC Pharmacology and Toxicology* 18: 14-23.

**Sidoryk-Węgrzynowicz M, Aschner M.** (2013) Manganese toxicity in the CNS: the glutamine/glutamate- $\gamma$ -aminobutyric acid cycle. *J Intern Med* 273: 466-77.

Albrecht J, **Sidoryk-Węgrzynowicz M**, Zielińska M, Aschner M. (2011) Roles of glutamine in neurotransmission. *Neuron Glia Biology* 21: 1-14.

**Sidoryk-Węgrzynowicz M** and Aschner M. (2013) Manganese and the glutamine/glutamate- $\gamma$ -aminobutyric acid cycle. *Glutamine in Health and Disease*. Victor R Preedy, Springer UK.

**Sidoryk-Węgrzynowicz M** and Aschner M. (2014) Impairment of glutamine/glutamate- $\gamma$ -aminobutyric acid cycle in manganese toxicity in the Central Nervous System. *Manganese in Health and Disease*. Lucio G Costa and Michael Aschner, Royal Society of Chemistry, UK

**Sidoryk-Węgrzynowicz M** and Aschner M. (2014) Manganese Toxicity and the Glutamine–Glutamate Cycle. *Glutamine in Clinical Nutrition*. Rajkumar Rajendram, Victor R. Preedy, Vinood B. Patel, Springer, UK.

Szczegółowy opis metodologii wykorzystanej w pracach dotyczących transportu Gln przy udziale różnych układów transportujących aminokwasy został przedstawiony w następującym rozdziale książkowym:

**Sidoryk-Węgrzynowicz M** and Aschner M. (2011) Culture Models for the Study of Amino Acid Transport and Metabolism. *Cell Culture Techniques. Neuromethods*, Vol. 56 Eds. Aschner M, Suñol C, Bal-Price A, Elsevier USA.

## **5. 2. Inne opublikowane projekty badawcze**

Podczas stażu podoktorskiego obok głównego tematu badawczego brałam udział w projektach z pokrewnej tematyki dotyczącej toksyczności manganu, a także w projektach z odrębnych obszarów badawczych, takich jak toksyczność metalortęci. Moje kilkuletnie doświadczenie naukowe w Division of Pediatric Toxicology, Vanderbilt University Medical Center wiąże się z uczestnictwem, w ramach współpracy, w kilku projektach z odmiennych obszarów badawczych, takich jak niedokrwienie w krążeniu płucnym, ciężkie zaburzenia depresyjne, czy też stworzenie mikroprzepływowego funkcjonalnego modelu mimikującego BBB.

**Lee E, Yin Z, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Jiang H, Aschner M. (2012) 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J<sub>2</sub> modulates manganese-induced activation of the NF- $\kappa$ B, Nrf2, and PI3K pathways in astrocytes. *Free Radic Biol Med* 52: 1067-74.**

Toksyczność manganu objawia się poprzez indukcję stresu oksydacyjnego oraz czynników zapalnych takich jak cyclooxygenaza 2, prostaglandyna E(2) czy kluczowy mediator w stanie zapalnym, jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B (z ang. nuclear factor- $\kappa$ B) i Nrf2 (z ang. nuclear factor erythroid 2-related factor). Nasze badania wykazały, że inkubacja astrocytów z manganem oraz z czynnikiem przeciwzapalnym -prostaglandyną d-PGJ(2) (z ang. 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J(2)) zapobiega zależnej przez manganu aktywacji NF- $\kappa$ B. Wśród protekcyjnych właściwości d-PGJ(2) szczególną rolę odgrywała blokada aktywacji szlaku inicjowanego przez kinazę fosfatydyloinozytolu/kinazę Akt PI3K/Akt (z ang. phosphoinositide 3-kinases/kinase Akt), zależna od fosforylacji kinazy I $\kappa$ BN indukcja NF- $\kappa$ B oraz wzrost ekspresji Nrf2. Wyniki tych badań zbliżają do zrozumienia mechanizmów biorących udział w toksyczności manganu, a także po raz pierwszy wskazują na protekcyjne właściwości d-PGJ(2), które mogłyby być wykorzystane w terapii różnych stanów toksykologicznych i patologicznych OUN.

**Lee E, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Yin Z, Webb A, Son DS, Aschner M. (2012)**

**Transforming growth factor- $\alpha$  mediates estrogen-induced upregulation of glutamate transporter GLT-1 in rat primary astrocytes. *Glia* 60: 1024-36.**

Nasze badania wykazały negatywny wpływ manganu zarówno na funkcję jak i ekspresję transporterów glutaminianu w hodowli pierwotnej astrocytów. Kolejnym projektem badawczym było sprawdzenie czy znane ze swych właściwości neuroprotekcyjnych czynniki wpływające na receptory estrogenowe mogą mieć również znaczenie w zależnej od Mn deregulacji transportu Glu. Badania z użyciem selektywnych modulatorów receptorów estrogenowych (ER), 17 $\beta$ -Estradiolu (E2) oraz tamoksifenu (TX) pokazały efekt odwrócenia zależnej od manganu dysfunkcji transportera GLT1 na poziomie mRNA, białka, a także na poziomie czynnościowym. Zmiany te zależne były od indukowanego przez E2 i TX transformującego czynnika wzrostu TGF $\alpha$  (z ang transforming growth factor  $\alpha$ ) i zachodziły przy współdziałaniu receptorów estrogenowych oraz receptora związanego z białkiem, G - GPR30.

**Lee E, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Wang N, Webb A, Son DS, Lee K, Aschner M. (2012) GPR30 regulates glutamate transporter GLT-1 expression in rat primary astrocytes. *J Biol Chem* 287: 26817-28.**

Kolejny projekt dotyczył zbadania molekularnych podstaw regulacji ekspresji transportera GLT1. Badania z użyciem selektywnego agonisty GPR30, bądź z wykorzystaniem wyciszenia genu kodującego GPR30, wykazały wzrost ekspresji i aktywności transportera GLT1. Szczegółowa analiza aktywności promotora genu kodującego GLT1 wykazała pozytywny wpływ aktywacji GPR30 na ekspresję tego genu. Aktywność promotora zależna była od białka wiążącego się z elementem odpowiedzi na cAMP CREB (z ang. cAMP response element-binding protein) oraz czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B. Aktywacja GPR30 miała również pozytywny wpływ na syntezę białka transportera GLT1 i wiązała się udziałem kilku szlaków sygnałowych inicjowanych przez PI3K/Akt, kinazę aktywowaną mitogenem MAPK (z ang. mitogen-activated protein kinase) oraz kinazę białkową A. Ponadto wykazaliśmy, że inkubacja astrocytów z manganem i agonistą GPR30 blokuje negatywny wpływ Mn na ekspresję i funkcję transportera GLT1. Badania te z jednej strony pokazują udział GPR30 zależnej od manganu deregulacji transportera GLT1, a z drugiej strony dostarczają szczegółowych danych dotyczących mechanizmów i zdarzeń molekularnych zaangażowanych w regulację transportera. Uzyskane wyniki mogą mieć dużą wartość w opracowaniu terapii w schorzeniach OUN, związanych z nieprawidłowym transportem glutaminianu.



**Ni M, Li X, Yin Z, Jiang H, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Milatovic D, Cai J, Aschner M. (2010) Methylmercury induces acute oxidative stress, altering Nrf2 protein level in primary microglial cells. *Toxicol Sci* 116: 590-603.**

**Ni M, Li X, Yin Z, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Jiang H, Farina M, Rocha JB, Syversen T, Aschner M. (2011) Comparative study on the response of rat primary astrocytes and microglia to methylmercury toxicity. *Glia* 59: 810-820.**

Projekt dotyczył roli komórek mikrogleju w toksyczności metaloorganicznej postaci rtęci, metalortęci (MeHg). Mikroglej stanowiący ok. 12% populacji komórek OUN, jest szczególnie wrażliwy na wszelkie zmiany patologiczne mózgu, takie jak stany zapalne czy neurodegeneracyjne. Mikroglej pełni kluczową funkcję w procesach zapalnych, a jego znaczenie w neurotoksyczności MeHg było dotąd niepoznane. Nasze badania wykazały, że inkubacja mikrogleju z MeHg bardzo szybko wywołuje stres oksydacyjny tych komórek, objawiający się zależną od stężenia i czasu inkubacji indukcją ROS (z ang. reactive oxygen species). Stężenie ROS jest ściśle regulowane w komórce przez czynniki mające właściwości antyoksydacyjne, takie jak glutation. W naszym układzie doświadczalnym indukcja ROS wiązała się ze zmianą stosunku zredukowanej formy glutationu do formy utlenionej (z ang. GSH/GSSG ratio). Ponadto w tych warunkach doświadczalnych zauważalne były zaburzenia w ekspresji genów kodujących białka o właściwościach antyoksydacyjnych: oksygenazy hemowej (Ho1, z ang. hem oxygenase-1), NAD(P)H dehydrogenazy (Nqo1, z ang. NAD(P)H dehydrogenase) oraz antyportera cystyna / glutaminian (Xct, z ang. cystine/glutamate transporter). Zmiany te były skutkiem aktywacji czynnika transkrypcyjnego Nrf2 regulującego ekspresję tych genów i polegały na wzroście syntezy białka Nrf2 i jego translokacji do przestrzeni jądrowej komórki.

Kolejne badania dotyczyły porównania toksyczności rtęci w różnych komórkach gleju: mikrogleju i astrogleju. Podobny do obserwowanego w przypadku mikrogleju efekt uruchomienia procesów związanych ze stresem oksydacyjnym zauważalny był również w hodowli pierwotnej astrocytów, jednak dynamika tych procesów była różna w badanych modelach komórkowych. Wykazano, że mikroglej wykazuje większą wrażliwość na inkubację z MeHg w porównaniu z astrocytami. Objawiało się to większym wychwytem MeHg przez komórki mikrogleju i znaczniejszym poziomem ROS. Różnice obserwowane w obu typach komórek świadczą o różnych właściwościach adaptacyjnych mikrogleju i astrogleju w warunkach stresu oksydacyjnego związanego z toksycznością rtęci.

**Fike CD, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Aschner M, Summar M, Prince LS, Cunningham G, Kaplowitz M, Zhang Y, Aschner JL. (2012) Prolonged hypoxia augments L-citrulline**

**transport by System A in the newborn piglet pulmonary circulation. *Cardiovasc Res* 95: 375-84.**

Projekt badawczy w ramach współpracy z dr Candice Fike z Department of Pediatrics Vanderbilt University Medical Centre dotyczył transportu L-cytruliny w warunkach nadciśnienia krążenia płucnego noworodków. Cykl przemian metabolicznych L- argininy do L -cytruliny stanowi sekwencję reakcji, których końcowym produktem jest tlenek azotu NO. Zapotrzebowanie na NO rośnie w warunkach niedotlenienia. Komórki nabłonkowe tętnic płucnych PAECs (z ang. pulmonary arterial endothelial cells) nie mają zdolności syntezy L -cytruliny, a szlak przemian zależny jest od metabolizmu L-argininy. Szczegółowa analiza transportu L-cytruliny przez różne układy transportujące aminokwasy wykazała zdolność do pobierania tego aminokwasu przez PAECs w warunkach niedotlenienia. Analiza transportu wykazała swoisty wychwyt L-cytruliny przez układ A. Badania z wykorzystaniem metody Western blot ustaliły wzrost syntezy SNAT1, transportera przynależnego do aktywnego układu A. Wzrost wewnątrzkomórkowej L-cytruliny oraz poziomu białka SNAT1 był również notowany *in vitro* w tkankach płucnych zwierząt poddawanych chronicznemu niedotlenieniu prowadzącemu do nadciśnienia płucnego. Wyniki tych badań pokazują szczególną rolę transportera SNAT1 w warunkach chronicznego niedotlenienia i w dostarczaniu L -cytruliny jako mechanizmu kompensującego niedobory w syntezie NO. Dokładne poznanie regulacji ekspresji transportera SNAT1 może odnaleźć zastosowanie terapeutyczne w schorzeniach krążenia płucnego występującego u noworodków.

**Shelton RC, Claiborne J, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Reddy R, Aschner M, Lewis DA, Mirnics K. (2011) Altered expression of genes involved in inflammation and apoptosis in frontal cortex in major depression. *Mol Psychiatry* 16: 751-762.**

Projekt badawczy w ramach współpracy z dr Richard Shelton z Department of Psychiatry, Vanderbilt University School of Medicine dotyczył analizy ekspresji genów kory przedczołowej (Brodmann area 10, BA10) pacjentów cierpiących na ciężkie zaburzenia depresyjne MDD (z ang. major depression). Badania z użyciem metody mikromacierzy DNA wykazały znaczący statystycznie wzrost ekspresji genów związanych ze stresem apoptotycznym u osób cierpiących na MDD (materiał pośmiertny) w stosunku do kontroli (materiał pośmiertny pochodzący od odpowiadających wiekowo osób zdrowych). Wśród genów ulegających nadekspresji w MDD notowano następujące czynniki antyapoptotyczne: czynnik transkrypcyjny YB-1 (z ang. Y-box-binding protein 1), inhibitor kaspaz (z ang. caspase-1 dominant-negative inhibitor pseudo-ICE) oraz inhibitor apoptozy FKGS2 (z ang.

putative apoptosis inhibitor FKGS2). Analiza ekspresji genów wykazała ponadto pozytywną regulację genów kodujących czynniki pro i przeciwzapalne takie jak cytokiny, interferon gamma (IFN $\gamma$ ) czy limfotoksyna  $\alpha$ . Wśród genów o obniżonej ekspresji w przypadku MDD notowano gen kodujący metaloproteinę MT1M (z ang. metallothionein 1M), białko odrywające dużą rolę w warunkach stresu oksydacyjnego. Dane te wskazują, że specyficzne zmiany ekspresji genów zaangażowanych w procesy zapalne, apoptotyczne, czy też stres oksydacyjny są wspólną cechą patologiczną w obszarze BA10 mózgu chorych na MDD.

**Prabhakar Pandian B, Shen MC, Nichols JB, Mills IR, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Aschner M, Pant K. (2013) SyM-BBB: a microfluidic blood brain barrier model. *Lab Chip* 13: 1093-101.**

Projekt badawczy w ramach współpracy z Biomedical Technology, CFD Research Corporation, Huntsville, USA polegał na stworzeniu funkcjonalnego syntetycznego modelu mikrokrażenia (SyM-BBB) opartego na zasadzie mikroukładu przepływowego zwanego również systemem lab on chip. Odmianą zaletą tego układu, którego funkcjonalność została potwierdzona przy użyciu linii komórkowej śródbłonna naczyń mózgowych szczura RBE4 i kondycjonowanej pożywki astrocytarnej, jest wierne odtworzenie w układzie eksperymentalnym warunków *in vivo*.

## **6. Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN**

Od 15 października 2018 pracuję jako adiunkt w Zakładzie Neurochemii, w Pracowni Patoneurochemii pod kierunkiem Prof. dr hab. Lidii Strużyńskiej, gdzie jestem zaangażowana w projekty badawcze dotyczące roli interakcji międzykomórkowej w mechanizmie uszkodzeń w modelach tauopatii i autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego.

W grudniu 2018 przystąpiłam do konkursu NCN o przyznanie mi grantu OPUS 16. Projekt ten dotyczy znaczenia integracji astrocytarno-neuronalnej poprzez cykl glutamina-glutaminian w neurodegeneracji związanej z patologią białka tau i jest kontynuacją moich ostatnich badań w Department of Clinical Neurosciences, University of Cambridge, United Kingdom.

Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje 22 prace oryginalne i 7 prac przeglądowych opublikowanych w 28 przypadkach w czasopiśmie z listy filadelfijskiej o łącznym współczynniku wpływu IF = **112,047** oraz punktacji KBN/MNiSW = **793**, łącznej liczbie cytowań = **1246**, łącznej liczbie cytowań z wyłączeniem autocytowań = **1189** i indeksie

Dr Marta Sidoryk-Węgrzynowicz

Załącznik nr 2 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

**H = 17** (Załącznik 6). Mój dorobek uzupełniają 4 rozdziały w podręcznikach międzynarodowych, 2 wykłady na zaproszenie i 3 doniesienia prezentowane na naukowych zjazdach krajowych i międzynarodowych (Załącznik 6).

Marta Sidoryk-Węgrzynowicz