UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI

Uniwersytet Medyczny

Wydział Wojskowo-Lekarski

Wioletta Rozpędek

rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

„Inhibitory zależnej od stresu ER kinazy PERK jako potencjalne nowe podejście do terapii choroby Alzheimera"

PROMOTOR: prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek

Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej Międzywydziałowej Katedry Chemii i Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

RECENZENCI: prof. dr hab. Jarosław Dziadek

dr hab. inż. Arkadiusz Szterk, prof. NIL

Streszczenie

Choroba Alzheimera (AD) stanowi najczęściej występującą formę demencji, ponieważ obejmuje 75% wszystkich diagnozowanych przypadków. AD jest ściśle związana z zaburzeniami na poziomie molekularnym, co skutkuje agregacją neurotoksycznych płytek starczych, zbudowanych głównie z białka amyloidu beta (Aβ) złożonego z 42-óch aminokwasów (Aβ42), w tkance mózgowej. Najnowsze dane dowodzą, iż wspomniana agregacja $A\beta_{42}$ jest wynikiem obecności mutacji genetycznych w prekursorowym białku amyloidu beta (APP) na 21 chromosomie, jak również nadmiernej aktywacji szlaku sygnałowego adaptacyjnej odpowiedzi na stres (UPR). Znaczny wzrost niesfałdowanych lub nieprawidłowo sfałdowanych białek w lumen Retikulum Endoplazmatycznego (ER) wywołuje fosforylację oraz oligomeryzację kinazy PERK, która następnie fosforyluje swój główny substrat eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 2α (eIF2α). Wspomniane procesy skutkują zahamowaniem translacji głównych białek w komórce oraz nasiloną translacją wyłącznie białek selektywnych, do których należą czynnik transkrypcyjny 4 (ATF4) oraz sekretaza β (BACE1), która odgrywa kluczową rolę podczas aktywacji patologicznej obróbki białka APP prowadzącej do generacji $A\beta_{42}$. W warunkach słabego oraz umiarkowanego stresu ER białko ATF4 wzmacnia ekspresję genów pro-adaptacyjnych, natomiast w warunkach nasilonego oraz przedłużającego się stresu ER białko ATF4 działa jako czynnik transkrypcyjny dla genów pro-apoptotycznych m.in. jądrowego aktywatora transkrypcji związanego z zahamowaniem wzrostu i indukcją apoptozy (CHOP). Najnowsze dane sugerują, iż CHOP, jako główny marker pro-apoptotycznego szlaku sygnałowego UPR, odgrywa istotną rolę podczas inicjacji procesu neurodegeneracji ściśle skorelowanego z patogenezą oraz progresją AD.

Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej
Wydział Wojskowo-Lekarski

90-136 Łódź, ul. Narutowicza 60
e-mail:ireneusz.majstereki@umed.lodz.pl
www.umed.pl | http://zchbk.umed.pl/

Obecnie dostępne leczenie AD jest wyłącznie objawowe, natomiast wiele danych potwierdza, iż zahamowanie szlaku sygnałowego UPR zależnego od kinazy białkowej umiejscowionej w retikulum endoplazmatycznym (PERK) za pomocą niskocząsteczkowych inhibitorów może stanowić obiecującą, celowaną strategię leczenia AD.

Celem prezentowanego badania była ocena poziomu białek p-eFF2α oraz CHOP w liniach komórkowych traktowanych niskocząsteczkowymi inhibitorami PERK. Ponadto, drugim celem badań była ocena cytotoksyczności inhibitora PERK w komórkowym modelu in vitro. Trzeci cel prezentowanego badania stanowiła analiza poziomu apoptozy oraz progresji cyklu komórkowego w komórkach traktowanych inhibitorem PERK.

Badania zostały przeprowadzone na komercyjnie dostępnych liniach komórkowych, takich jak: embrionalne fibroblasty mysie typu dzikiego (3T3 MEFs WT; $PERK^{+/+}$ MEFs), embrionalne fibroblasty mysie z delecją PERK (3T3 MEFs KO; $PERK^{-/-}$ MEFs), neurony mysie (CATH.a), astrocyty szczurze (DI TNC1) oraz ludzka neuroblastoma z delecją *APP* (SH-SY5Y). Poziom białek p-eFF2α oraz CHOP został zmierzony za pomocą techniki Western blot. W celu zbadania cytotoksyczności analizowanego inhibitora PERK zastosowano kolorymetryczne testy MTT oraz XTT. Poziom apoptozy w komórkach traktowanych inhibitorem PERK został oceniony za pomocą cytometrii przepływowej przy użyciu podwójnego barwienia aneksyną V (Ann-V) oraz jodkiem propidyny (PI), natomiast progresja cyklu komórkowego została oceniona za pomocą cytometrii przepływowej przy użyciu barwienia PI.

Wyniki uzyskane z prezentowanych badań pokazały, iż podwyższony poziom białek p-eIF2α oraz CHOP może być bezpośrednio skorelowany z patogenezą AD. Nasilona fosforylacja białka eIF2α została zaobserwowana wyłącznie w warunkach stresu ER. Inhibitor GSK2606414, charakteryzujący się wysoką cytotoksycznością, wywołał całkowitą inhibicję fosforylacji eIF2α w liniach komórkowych CATH.a oraz SH-SY5Y, 87% inhibicję fosforylacji eIF2α w komórkach $PERK^{+/+}$ MEFs oraz 38% inhibicję fosforylacji eIF2α w linii komórkowej DI TNC1. Badany niskocząsteczkowy inhibitor LDN-0060609 wywołał 48% inhibicję fosforylacji eIF2α w linii komórkowej DI TNC1 oraz 52% inhibicję fosforylacji eIF2α w linii komórkowej SH-SY5Y. Uzyskane wyniki wykazały, iż inhibitor LDN-0060609, w porównaniu z GSK260641, jest niecytotoksyczny w każdym z zastosowanych stężeń oraz czasów inkubacji. Ponadto, LDN-0060609 nie indukuje apoptozy oraz nie wpływa na progresję cyklu komórkowego komórek linii DI TNC1 w każdym z zastosowanych stężeń oraz czasów inkubacji.

Badania wykonane w ramach niniejszej pracy wykazały, iż nadmierna aktywacja szlaku sygnałowego UPR zależnego od kinazy PERK może być ściśle skorelowana z progresją AD. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów molekularnych, których aktywacja skutkuje postępującą utratą neuronów oraz spadkiem funkcji poznawczych u pacjentów z AD. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do opracowania nowatorskiej strategii terapeutycznej przeciwko AD.

Na wykonanie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr RNN/129/15/KE z 19 maja 2015r.

Na podstawie otrzymanych wyników wyciągnięto następujące wnioski:

1. Wysoki poziom białek markerowych szlaku UPR zależnego od kinazy PERK: p-eIF2α oraz CHOP może mieć związek z patogenezą choroby Alzheimera.
2. Fosforylacja czynnika eIF2 zachodzi w warunkach stresu ER, który może być aktywowany w wyniku agregacji złogów Aβ42 w tkance nerwowej mózgu towarzyszącej patogenezie choroby Alzheimera.

Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej
Wydział Wojskowo-Lekarski

90-136 Łódź, ul. Narutowicza 60
e-mail:ireneusz.majstereki@umed.lodz.pl
www.umed.pl | http://zchbk.umed.pl/

3. Zastosowanie niskocząsteczkowych inhibitorów szlaku UPR zależnego od kinazy PERK, prowadzące do znacznego obniżenia fosforylacji czynnika eIF2α oraz ekspresji białka CHOP, może mieć potencjalne znaczenie w leczeniu choroby Alzheimera.

PROMOTOR

KIEROWNIK
Międzywydziałowej Katedry
Chemii i Biochemii Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek

Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek

DOKTORANT

Wioletta Rozpędek

Wioletta Rozpędek

Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej
Wydział Wojskowo-Lekarski

90-136 Łódź, ul. Narutowicza 60
e-mail:ireneusz.majstereki@umed.lodz.pl
www.umed.pl | http://zchbk.umed.pl/