

STRESZCZENIE

Pomimo intensywnych badań wciąż nie są poznane bezpośrednie przyczyny rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. Jedną z obserwowanych zmian w komórkach osób cierpiących na choroby neurodegeneracyjne jest podniesiony poziom wolnych rodników prowadzący do stresu oksydacyjnego. Zjawisko to prowadzi do uszkodzenia makrocząsteczek ważnych dla funkcjonowania komórek (takich jak kwasy nukleinowe, lipidy czy białka), a w efekcie obumierania komórek. W procesach zwyrodnieniowych neuronów występują również dysfunkcje mitochondriów, co prowadzi nie tylko do spadku efektywności produkcji energii, ale również do wzmożonego uwalniania wolnych rodników przez te organelle. Zespół ataksja-teleangiektazja jest spowodowany mutacją kinazy ATM (ang. *Ataxia-telangiectasia muted*), a jej najlepiej poznaną funkcją jest reakcja komórkowa na uszkodzenia DNA. W ostatnich latach zaobserwowano, że może ona także uczestniczyć w odpowiedzi na stres oksydacyjny, a także za utrzymanie homeostazy mitochondrialnej, jednak funkcje te nie są do końca poznane. Jednym z modulatorów funkcji tej kinazy jest białko ATMIN (ang. *ATM interactor*), ale jego rola w kontekście procesów neurodegeneracyjnych jest słabo poznana.

Celem badań było określenie roli kinazy ATM w odpowiedzi komórek neuronalnych na czynniki powodujące stres oksydacyjny i genotoksyczny. Wykorzystano do tego szeroko stosowaną w badaniach nad procesami neurodegeneracyjnymi ludzką linię komórkową SH-SY5Y oraz jej formę różnicowaną do fenotypu neuronalnego przy pomocy kwasu retinowego (RA-SH-SY5Y). W celach porównawczych użyto także w niektórych eksperymentach unieśmiertnionych mysich neuronów hipokampa - HT-22, hodowli pierwotnych mysich komórek ziarnistych mózdzku (CGC) oraz linii komórkowej glejaka C6. Stres komórkowy indukowano doksorubicyną (Dox, czynnik genotoksyczny), nadtlaniem wodoru (H_2O_2 , induktor stresu oksydacyjnego) oraz 6-hydroksydopaminą (6-OHDA, neurotoksyna stosowana w modelowaniu choroby Parkinsona). Do badań nad rolą kinazy ATM wykorzystano inhibitor tego enzymu – KU-55933 i zastosowano szereg testów biochemicznych pozwalających określić żywotność komórek (testy MTT, LDH oraz barwienie jąder komórkowych jodkiem propidyny) oraz poziom aktywności enzymów proteolitycznych (kaspaza-3 oraz katepsyna D). Metodą Western blot dokonywano pomiaru fosforylacji białek odpowiedzialnych za jądrowe funkcje kinazy ATM (pATM, p-p53 oraz γ H2AX) oraz określono przy pomocy specyficznego markera białkowego poziom aktywacji kalpain (fragment 145 kDa α -spektryny). Dodatkowo potwierdzono specyficzność KU-55933, sprawdzając jego wpływ na aktywację innych enzymów z rodziny PIKK (ATR oraz DNA-PK) oraz badając efekty inhibitorów tych kinaz

(VE-821 oraz NU-7441) w zastosowanych modelach uszkodzeń komórek RA-SH-SY5Y. Zmierzono także zmianę poziomu białka ATMIN w komórkach RA-SH-SY5Y poddanych działaniu stresu genotoksycznego oraz oksydacyjnego.

Wykazano, że KU-55933 działa ochronnie na komórki linii SH-SY5Y w modelach stresu genotoksycznego oraz oksydacyjnego, a efekt ten był silniejszy w komórkach neuronalnie różnicowanych (RA-SH-SY5Y), niż w komórkach nieróżnicowanych. Ochronny wpływ inhibitora ATM na uszkodzenia spowodowane H_2O_2 , został potwierdzony w linii HT-22, a także w CGC, lecz nie był obserwowany w komórkach glejaka (C6). KU-55933 zapobiegał uszkodzeniu komórek RA-SH-SY5Y wywołanym 6-OHDA. W modelu uszkodzeń czynnikiem genotoksycznym, KU-55933 powodował obniżenie aktywacji jądrowej ścieżki kinazy ATM, poprzez obniżenie poziomu fosforylacji białek ATM, p53 i H2AX, a w efekcie hamował główny enzym wykonawczy procesu apoptozy - kaspazę-3. W przypadku stresu oksydacyjnego wywołanego H_2O_2 obserwowano wzrost poziomu markerów jądrowej ścieżki ATM. KU-55933 obniżał jedynie poziom pATM, ale nie p-p53, γ H2AX czy kaspazy-3. Wykazano jednak hamujący efekt inhibitora ATM na aktywność innych proteaz – wapniowo zależnych (kalpain) oraz lizosomalnych (katepsyny D), co może świadczyć o zaangażowaniu pozajądrowych funkcji kinazy ATM w modelu uszkodzeń H_2O_2 . Podobne wyniki uzyskano w przypadku uszkodzeń komórek RA-SH-SY5Y przez 6-OHDA, gdzie z jednej strony zanotowano aktywację ścieżki jądrowej, ale KU-55933 obniżał tylko fosforylację ATM. Wykazano również, że 6-OHDA indukuje aktywność kalpain, ale nie katepsyny D, a inhibitor kinazy ATM nie regulował działania tych proteaz, co może świadczyć o zaangażowaniu innych mechanizmów w neuroprotekcyjnych efektach tego związku. Nie zaobserwowano działania KU-55933 na inne badane kinazy z rodziny PIKK, co potwierdza jego specyficzność wobec ATM. Ponadto, specyficzne inhibitory kinaz ATR oraz DNA-PK nie miały ochronnego wpływu na uszkodzenia komórek RA-SH-SY5Y wywołanych Dox lub H_2O_2 . Dodatkowo zaobserwowano spadek poziomu białka ATMIN w komórkach neuronalnych pod wpływem czynników wywołujących stres oksydacyjny (H_2O_2 , 6-OHDA), lecz nie genotoksyczny (Dox).

Uzyskane wyniki potwierdzają rolę kinazy ATM w mechanizmach uszkodzeń komórek neuronalnych. Zahamowanie jej aktywności może chronić neurony zarówno przed stresem genotoksycznym oraz oksydacyjnym. Szczególnie interesującym tematem przyszłych eksperymentów wydają się pozajądrowe funkcje kinazy ATM, a także udział w tych procesach białka towarzyszącego temu enzymowi - ATMIN.

SUMMARY

Despite intensive research, direct causes of neurodegenerative diseases are still unknown. One of the observed cellular changes in people suffering from neurodegenerative diseases is an elevated level of free radicals leading to oxidative stress. This phenomenon results in damage to macromolecules essential to the functioning of cells (nucleic acids, lipids, proteins), and, in consequence, in cells death. In the processes of neuronal degeneration mitochondrial dysfunctions come into play as well, what leads not only to decreased efficiency in energy production, but also to the increased release of free radicals by these organelles. Ataxia-telangiectasia syndrome is caused by mutation of ATM kinase (ataxia-telangiectasia mutated), which the best described function is cellular response to DNA damage. Recently, it was discovered that ATM may also take part in oxidative stress response and mitochondrial homeostasis regulation, but these processes are poorly examined. The functions of this kinase are modulated inter alia by ATMIN (ATM interactor) protein, but its role in neurodegenerative processes need explanation.

The purpose of our study was to determine the role of ATM kinase in neuronal cells response to the factors triggering oxidative stress and genotoxic stress. SH-SY5Y cell line and its form RA-SH-SY5Y (differentiated towards neuronal phenotype with retinoic acid) were used in the study. Some of the experiments involved immortalized mouse hippocampal HT-22 neurons, primary cultures of mouse cerebellum granule cells (CGC), and C6 glioma cell line. Cellular stress was induced with doxorubicin (Dox, genotoxic factor), hydrogen peroxide (H_2O_2 , oxidative stress inducer), and 6-hydroxydopamine (6-OHDA, neurotoxin used in Parkinson's disease models). ATM inhibitor, KU-55933, was used to determine the role of ATM kinase. Moreover, a number of biochemical tests were performed to specify cell viability (MTT, LDH, and propidium iodide staining of cells nuclei) and the levels of proteolytic enzymes activity (caspase-3 and cathepsin D). Western blots measured the phosphorylation of proteins responsible for nuclear functions of ATM kinase (pATM, p-p53 and γH2AX), and the calpain activation level (145 fragment of kDa α -spectrin) was determined by a specific protein marker. In addition, the specificity of KU-55933 was confirmed by verification of its effect on the activation of other PIKK enzymes (ATR and DNA-PK) and determine influence of these kinases inhibitors (VE-821 and NU-7441) on Dox and H_2O_2 toxicity on RA-SH-SY5Y cells. Furthermore, the study included the investigation of changes in ATMIN protein level in neuronal cells under genotoxic and oxidative stress.

KU-55933 was shown to protect cells of SH-SY5Y line in genotoxic and oxidative stress models, and this effect proved to be stronger in RA-SH-SY5Y than in non-differentiated cells. The protective effect of ATM inhibitor against H₂O₂ induced cell damage was confirmed in HT-22 line as well as in CGC, however, it was not observed in glioma cells (C6). KU-55933 prevented the 6-OHDA-induced damage to RA-SH-SY5Y cells. In a genotoxic stress model, KU-55933 reduced the nuclear activation of the ATM kinase pathway by lowering the phosphorylation levels of ATM, p53 and H2AX proteins, and, in consequence, it inhibited caspase-3 – the major enzyme initiating apoptosis. In the case of H₂O₂-induced oxidative stress, the increase in the level of markers of ATM nuclear pathway was observed. KU-55933 reduced only the levels of pATM, but not p-p53, γ H2AX, or caspase-3. However, the suppressing effect of ATM inhibitor on the activity of other proteases – calcium-dependent (calpain) and lysosomal (cathepsin D) – was demonstrated, which may be indicative of the involvement of non-nuclear functions of ATM kinases in a H₂O₂-induced damage model. Similar results were obtained for 6-OHDA-induced RA-SH-SY5Y cells damage. In this case, the nuclear pathway activation was observed, however, KU-55933 decreased only ATM phosphorylation. In addition, 6-OHDA induced activation of calpain but not cathepsin D, and ATM kinase inhibitor did not regulate these proteases, what may suggest that another mechanisms are involved in the neuroprotective effects of this compound. The effect of KU-55933 on other PIKK kinases was not demonstrated, and this confirms its specificity for ATM. Finally, there was a decrease in ATMIN protein levels in neuronal cells under the influence of factors inducing oxidative stress but not genotoxic stress.

The results confirm the role of ATM kinase in mechanisms of neuronal cells damage. Inhibition of its activity can protect neurons from genotoxic and oxidative stress. Non-nuclear functions of ATM kinase and the participation of ATMIN protein accompanying this enzyme in these processes seem to be a particularly interesting subject of future experiments.