



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

mgr Anna Aleksandra Radlicka

Molekularne mechanizmy związane z pozaruchowymi objawami choroby Parkinsona

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotorzy:

dr hab. Jan Rodriguez Parkitna, prof. IF PAN
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

prof. dr hab. Joanna Pera
Wydział Lekarski Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Choroba Parkinsona (PD) to schorzenie neurodegeneracyjne o długim przebiegu i złożonej symptomatologii. Do charakterystycznych objawów ruchowych pozwalających postawić diagnozę PD należą: sztywność mięśniowa, spowolnienie ruchowe i drżenie spoczynkowe, jednak oprócz nich u pacjentów z PD rozwijają się jeszcze inne zaburzenia ruchowe i pozaruchowe. Pozaruchowe objawy PD mogą pojawiać się przed objawami ruchowymi i obejmują zaburzenia regulacji ciśnienia krwi, trawienia pokarmu, funkcjonowania narządów zmysłów (w szczególności powonienia), procesów poznawczych (w tym zaburzenia pamięci i uwagi) oraz zaburzeń afektywnych i lękowych.

W niniejszej pracy podjęłam się zbadania udziału dysfunkcji układu dopaminergicznego w powstawaniu wybranych objawów pozaruchowych PD. Badania zostały przeprowadzone na dwóch poziomach: behawioralnym i transkryptomycznym, zarówno na zwierzęcym modelu PD, jak i z udziałem pacjentów, z uwzględnieniem wpływu utraty neuronów dopaminergicznych oraz z zastosowaniem leczenia zwiększającego ilość dopaminy w mózgu. Doświadczenia z użyciem zwierząt obejmowały ocenę wrażliwości węchu, procesów poznawczych, tendencji do poszukiwania wrażeń i zachowań świadczących o anhedonii u genetycznie modyfikowanych myszy szczepu TIF-IA^{DATCreERT2} z postępującą i selektywną utratą neuronów dopaminergicznych. U myszy z mutacją zmierzono efekty 14-dniowych podań L-DOPA na transkryptom poszczególnych struktur przodomózgowia przy pomocy metody analizy przestrzennej ekspresji genów. Nasilenie objawów pozaruchowych u pacjentów zbadano w dwóch punktach czasowych: podczas przyjmowania leków oddziałujących na przekąźnictwo

dopaminergiczne i po ich odstawieniu. Ponadto, w obu punktach czasowych pobrano krew obwodową i oznaczono poziom ekspresji wybranych genów metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy.

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie doświadczeń potwierdzają zróżnicowany udział układu dopaminergicznego w powstawaniu i leczeniu poszczególnych objawów pozaruchowych PD. U myszy TIF-IA^{DATCreERT2} z postępującą utratą neuronów dopaminergicznych zaobserwowałam przejściową nadwrażliwość na nagrodę oraz obniżenie masy ciała w zaawansowanym stadium rozwoju fenotypu. Nie zanotowałam natomiast u nich oznak anhedonii, zaburzeń węchu, pamięci ani procesów uczenia się opartego o wykonywanie zadań instrumentalnych, w tym przeuczania. Myszy z upośledzonym przekazywaniem dopaminergicznym wykazywały natomiast przejściową zwiększoną aktywność w testach wymagających odpowiedzi instrumentalnych, co można interpretować jako nadwrażliwość na nagrodę i nasilenie poszukiwania wrażeń. Efekty chronicznych podań L-DOPA były ograniczone do łagodnych zmian zachowań lękowych, niewielkich zmian w funkcjach ruchowych i obniżeniu preferencji sacharyny u samic. U pacjentów z zaawansowaną PD przyjmowanie leków dopaminergicznych znacząco zmniejszało nasilenie objawów ruchowych, było także korzystne względem funkcji poznawczych i do pewnego stopnia – lęku.

Badania transkryptomyczne wykazały specyficzne efekty L-DOPA wobec podwyższenia poziomu ekspresji genów w poszczególnych strukturach przodomózgowia myszy TIF-IA^{DATCreERT2}. Lek wpłynął znamienne na abudancję transkryptów 20 genów, w tym zaangażowanych w procesy regulacji transkrypcji i rytmy okołodobowe. Zmiany w poziomie ekspresji pod wpływem L-DOPA zidentyfikowano w następujących obszarach: w prążkowie grzbietowym, jądrze półleżącym przegrody, przedmurzu i jądrze wewnątrzgruszkowatym, grzbietowej kory mózgu (warstwy 2/3 do 6b), części kory smakowej i kory gruszkowatej oraz tkance przylegającej do komory bocznej mózgu. O ile w mózgowiu efekty leczenia dopaminergicznego u zwierząt z deficytem tego neuroprzekaźnika na transkryptom były wyraźne, wpływ leków dopaminergicznych na ekspresję genów we krwi nie został zaobserwowany. U pacjentów z zaawansowaną PD nie zanotowano różnic w abudancji transkryptów badanych genów we krwi obwodowej podczas stosowania leków i po ich odstawieniu.

Przeprowadzone badania wykazały zróżnicowaną rolę przekazywania dopaminergicznego w powstawaniu i nasileniu objawów pozaruchowych PD. Znaczenie komponenty dopaminergicznej w mechanizmach związanych z zaburzeniami funkcji poznawczych pokazały wyniki doświadczeń z wykorzystaniem mysiego modelu choroby, jak i z udziałem pacjentów z zaawansowaną PD, jakkolwiek obserwowane zmiany dotyczyły różnych rodzajów zachowań. Wysoce specyficzne działanie L-DOPA względem struktur anatomicznych mózgu i poszczególnych genów pokazało nowe efekty

działania tego leku wobec obszarów zaangażowanych w powstawanie ruchowych i pozaruchowych objawów PD, w tym procesów wykonawczych i motywacyjnych. Wyniki pracy wskazują, że u podłoża terapeutycznego lub niepożądanego działania L-DOPA może leżeć jej selektywne działanie na ekspresję genów w strukturach przodomózgowia, lecz aby potwierdzić te obserwacje potrzebne są dalsze badania transkryptomiczne na tkance ludzkiej.



Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

mgr Anna Aleksandra Radlicka

Molecular mechanisms associated with non-motor symptoms of Parkinson's disease

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotorzy:

dr hab. Jan Rodriguez Parkitna, prof. IF PAN
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

prof. dr hab. Joanna Pera
Wydział Lekarski Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Parkinson's Disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder with complex symptomatology. The hallmark symptoms of PD include muscle rigidity, slowness of movement (bradykinesia) and resting tremors, nevertheless, it should be noted that PD is also associated with several non-motor symptoms. These include altered blood pressure, gastrointestinal dysfunctions, impaired sensory perception (hyposmia or anosmia in particular), cognitive impairments and also affective or anxiety disorders.

Here, I investigate the role of the midbrain dopamine system in the development of selected non-motor PD symptoms. The experiments were performed on two levels: behavioral and gene expression, on samples derived from human PD patients as well as an animal PD model, and taking into account the effects of treatment with L-DOPA. Analyses performed on animals assessed the effects of loss of dopaminergic neurons in genetically modified TIF-IA^{DAT^{Cre}ERT2} mice on olfactory acuity, cognitive functions, novelty seeking-like behaviors and symptoms similar to anhedonia. Mutant mice with advanced loss of dopaminergic neurons were subjected to two-week L-DOPA treatment and the used for spatial analysis of gene expression in the forebrain. In the case of human patients, non-motor PD symptoms were assessed during treatment with drugs affecting dopaminergic transmission and after pharmacotherapy was stopped. Gene expression analyses were performed on blood samples taken at both time-points, and used to assess expression of selected genes by quantitative PCR.

Results of my experiments reveal discrete roles of dopaminergic signaling in the emergence and treatment of non-motor PD symptoms. TIF-IA^{DATCreERT2} mice showed a mild decrease in body mass, as well as a transient increase in reward-driven behaviors in the early stage of dopaminergic degeneration. At the same time, there was no appreciable loss of olfactory acuity, no indication of anhedonia or impaired cognitive impairments in tasks requiring instrumental learning. Mutant mice exhibited temporary increase in activity in instrumental tasks, which suggests reward hypersensitivity and higher sensation seeking. The effects of L-DOPA treatment TIF-IA^{DATCreERT2} mice were limited to mild changes in anxiety like behaviors and motor performance, and also a decrease in saccharin preference in females. Treatment with dopaminergic drugs in human PD patients ameliorated motor deficits, improved cognitive performance and to an extent also anxiety-related symptoms.

Transcriptome analysis in TIF-IA^{DATCreERT2} mice revealed spatially-specific effects of L-DOPA treatment in the forebrain. The analysis identified 20 transcripts with significantly changed abundance, the majority of the associated with immediate-early gene expression and circadian rhythm regulation. The L-DOPA-induced changes were observed in the dorsal striatum, nucleus accumbens, dorsal cortical layers 2/3 to 6b, gustatory and piriform cortex and tissue adjacent to the lateral ventricle. Conversely, no significant effects of treatment on gene expression were observed in blood samples from PD patients.

Taken together, these results reveal discrete role of dopaminergic signaling in the development and treatment of non-motor PD symptoms. Cognitive functions were significantly affected in both humans as well as genetically modified mice, though the observed changes differed qualitatively. Gene-specific effects of L-DOPA treatment in discrete areas of the forebrain suggest differential contributions to motor and non-motor symptoms of PD, including executive functions and motivational processes. In summary, the results suggest that therapeutic and adverse effects of L-DOPA treatment may be linked to specific molecular changes in the brain, though the importance of observed gene expression patterns has to be validated in humans.