

Mgr Sylwia Żulińska

*Analiza ekspresji genów białek regulujących funkcję  
i dynamikę mitochondriów w doświadczalnych  
modelach choroby Alzheimera*

Rozprawa na stopień doktora  
Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie: nauki medyczne

Promotor: **prof. dr n. med. Joanna B. Strosznajder**



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową  
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa, 2022



*Promotorowi mojej pracy **Prof. dr hab. n. med. Joannie B. Strosznajder** składam serdeczne podziękowania za wprowadzenie w świat badań i ukierunkowanie mojego rozwoju naukowego. Dziękuję za wyrozumiałość i cierpliwość, poświęcony czas, nieustanną mobilizację do pracy i pomoc w każdej sferze życia.*



*Dziękuję wszystkim **Koleżankom i Kolegom z Zakładu Komórkowej Transdukcji Sygnału** oraz z **Pracowni Badań Przedklinicznych Związków Neuroprotekcyjnych i Czynników Środowiskowych** za stworzenie życzliwej atmosfery pracy, za cenne wskazówki i pomoc w realizacji badań bez, których wsparcia nie powstałaby ta praca.*



*Niniejszą pracę dedykuję moim **Rodzicom, Mężowi i Dzieciom***





*Dziękuję rodzicom, rodzeństwu i mężowi,  
którzy zawsze we mnie wierzyli i mocno mnie wspierali,  
za okazaną pomoc, bez której nie mogłabym łączyć  
pracy naukowej z macierzyństwem*



Większość przedstawionych w tej pracy wyników stanowi treść następujących publikacji:

- Czapski GA, Cieślik M, Wencel PL, **Wójtowicz S**, Strosznajder RP, Strosznajder JB. (2018) Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase-1 alters expression of mitochondria-related genes in PC12 cells: relevance to mitochondrial homeostasis in neurodegenerative disorders. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1865(2):281-288.
- Cieślik M, Czapski GA, **Wójtowicz S**, Wieczorek I, Wencel PL, Strosznajder RP, Jaber V, Lukiw WJ, Strosznajder JB. (2020) Alterations of Transcription of Genes Coding Anti-oxidative and Mitochondria-Related Proteins in Amyloid  $\beta$  Toxicity: Relevance to Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* 57(3):1374-1388. doi: 10.1007/s12035-019-01819-y.
- **Wójtowicz S**, Strosznajder AK, Jeżyna M, Strosznajder JB. (2020) The Novel Role of PPAR Alpha in the Brain: Promising Target in Therapy of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Neurochem Res.* 45(5):972-988.
- **Żulińska S**, Wieczorek I, Wencel PL, Strosznajder RP, Sun GY, Strosznajder JB. (2022) Early age changes in mRNA expression related to NAD-dependent enzymes and mitochondrial proteins in the brain cortex of an Alzheimer's disease mouse model. *Neuromol. Med.* <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1481945/v1> (w recenzji)

Wyniki prezentowane były również w formie licznych doniesień zjazdowych.

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej pracy doktorskiej były finansowane w głównej części z grantów przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki (NCN):

OPUS 5, o numerze 2013/09/B/NZ3/01350,

OPUS 8, o numerze 2014/15/B/NZ3/01049

PRELUDIUM 18, o numerze 2019/35/N/NZ4/03706



# Spis treści

<b>OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY .....</b>	<b>17</b>
<b>WYKAZ RYCIN.....</b>	<b>25</b>
<b>WYKAZ WYKRESÓW .....</b>	<b>26</b>
<b>WYKAZ TABEL .....</b>	<b>28</b>
<b>WSTĘP .....</b>	<b>29</b>
<b>Epidemiologia i klasyfikacja Choroby Alzheimera .....</b>	<b>29</b>
<b>Hipoteza metaboliczna .....</b>	<b>31</b>
<b>Zaburzenia metabolizmu glukozy w chorobie Alzheimera .....</b>	<b>31</b>
<b>Hipoteza kaskady amyloidu.....</b>	<b>36</b>
<b>Rola peptydów A<math>\beta</math> w rozwoju choroby Alzheimera .....</b>	<b>39</b>
<b>Hipoteza mitochondrialna.....</b>	<b>44</b>
<b>Zaburzenia funkcji mitochondriów w chorobie Alzheimera .....</b>	<b>44</b>
<b>Zaburzenia funkcji kompleksów oddechowych w chorobie Alzheimera .....</b>	<b>47</b>
<b>Stres oksydacyjny w dysfunkcji mitochondriów.....</b>	<b>49</b>
<b>Zaburzenia dynamiki mitochondriów w chorobie Alzheimera .....</b>	<b>53</b>
<b>Biogeneza mitochondrialna w chorobie Alzheimera .....</b>	<b>59</b>
<b>CELE PRACY .....</b>	<b>62</b>
<b>MATERIAŁY I METODY .....</b>	<b>63</b>
<b>Komórkowe modele badawcze .....</b>	<b>63</b>
Linia szczurzych komórek pheochromocytoza – PC12 .....	63
Ludzka linia komórkowa SH-SY5Y .....	63
Unieśmiertelnione mysie komórki mikrogleju –BV2.....	64
Zwierzęcy model badawczy .....	65
<b>Warunki hodowli i traktowanie komórek PC12 i SH-SY5Y oraz BV2.....</b>	<b>67</b>
Przygotowanie oligomerów peptydu A $\beta$ 1-42.....	67
Hodowla komórek .....	67
Traktowanie komórek.....	68

<b>Metody spektrofotometryczne .....</b>	<b>69</b>
Oznaczanie zawartości białka w ekstrakcie komórkowym .....	69
Analiza przeżywalności komórek za pomocą testu MTT.....	69
Ocena aktywności enzymatycznej kompleksu IV mitochondrialnego łańcucha oddechowego komórkach SH-SY5Y i BV2 oraz w materiale zwierzęcym .....	70
<b>Metody spektrofluorymetryczne .....</b>	<b>70</b>
Analiza poziomu wolnych rodników przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF .....	70
<b>Metody immunochemiczne .....</b>	<b>71</b>
Przygotowanie materiału do oznaczeń immunochemicznych .....	71
Immunodetekcja białek metoda Western blot .....	71
<b>Analiza poziomu ekspresji genów .....</b>	<b>74</b>
Izolacja RNA.....	74
<b>Reakcja odwrotnej transkrypcji.....</b>	<b>75</b>
Łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym ( <i>ang. quantitative real-time PCR</i> ).....	76
<b>Metody mikroskopowe .....</b>	<b>76</b>
Badanie apoptozy komórek in vitro przy użyciu barwnika Hoechst 33342 z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej .....	76
<b>Statystyczne opracowanie wyników .....</b>	<b>77</b>
<b>WYNIKI.....</b>	<b>78</b>
<b>Żywotność komórek PC12 poddanych działaniu oligomerów peptydu Aβ1-42 (AβO) .....</b>	<b>78</b>
<b>Wpływ czasu działania AβO na poziom komórek apoptotycznych.....</b>	<b>79</b>
<b>Zależny od czasu inkubacji wpływ Aβ na ekspresję genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, białka zaangażowane w regulację dynamiki mitochondriów i ekspresję genów podjednostek łańcucha transportu elektronów.....</b>	<b>81</b>
<b>Wpływ Aβ i PJ-34 na żywotność komórek, poziom immunoreaktywności PAR oraz poziom wolnych rodników.....</b>	<b>83</b>
<b>Wpływ inhibitora PARP-1 (PJ34) na ekspresję genów dla białek antyoksydacyjnych, białek dynamiki mitochondriów, oraz odjednostek kompleksów łańcucha transportu elektronów w warunkach kontrolnych i cytotoksyczności Aβ .....</b>	<b>85</b>
<b>Poziom reaktywnych form tlenu i żywotność komórek BV2 i SH-SY5Y traktowanych oligomerami peptydu Aβ1-42.....</b>	<b>87</b>
<b>Wpływ AβO na ekspresję genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, Sirtuiny, białka zaangażowane w regulację dynamiki mitochondriów i ekspresję genów podjednostek łańcucha transportu elektronów.....</b>	<b>89</b>
<b>Aktywność oksydazy cytochromu C w komórkach SH-SY-5Y oraz BV2 poddanych działaniu oligomerów Aβ 1-42.....</b>	<b>91</b>

Poziom mRNA genów kodujących białka antyoksydacyjne (A), Sirtuiny (B) oraz DNA zależne PARPs (C) w korze myszy transgenicznych z chA (APP+) i kontrolnych (APP-). .....	93
Poziom mRNA genów kodujących białka biogenezy mitochondriów w korze myszy transgenicznych z chA (APP+) i kontrolnych (APP-) .....	97
Poziom mRNA genów kodujących białka dynamiki mitochondriów oraz poziom immunoreaktywności tych białek w korze myszy transgenicznych z chA (APP+) i kontrolnych (APP-).....	100
Poziom mRNA genów kodujących białka podjednostek kompleksów oddechowych łańcucha transportu elektronów (ETC) w korze myszy transgenicznych z chA (APP+) i kontrolnych (APP-) .....	104
Poziom immunoreaktywności wybranych białek podjednostek kompleksów ETC w korze myszy transgenicznych z chA (APP+) i kontrolnych (APP-) oraz aktywność cytochrom C-oksydazy (COX) .....	105
<b>DYSKUSJA .....</b>	<b>108</b>
<b>PODSUMOWANIE.....</b>	<b>128</b>
<b>WNIOSKI.....</b>	<b>130</b>
<b>STRESZCZENIE.....</b>	<b>132</b>
<b>STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM.....</b>	<b>139</b>
<b>INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY .....</b>	<b>145</b>
<b>LITERATURA.....</b>	<b>148</b>





## OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

<b>ABAD</b>	–	dehydrogenaza alkoholowa ( <i>ang. alcohol dehydrogenase</i> )
<b>ACTB</b>	–	gen kodujący $\beta$ -aktynę ( <i>ang. <math>\beta</math>-Actin</i> )
<b>ADI</b>	–	Światowa Organizacja Alzheimerowska ( <i>ang. World Alzheimer's Organization</i> )
<b>AICD</b>	–	cytoplazmatyczny, wewnątrzkomórkowy odcinek białka APP
<b>AIF</b>	–	czynnik indukujący apoptozę ( <i>ang. apoptotic inducing factor</i> )
<b>ALS</b>	–	stwardnienie zanikowe boczne ( <i>ang. amyotrophic lateral sclerosis</i> )
<b>ANOVA</b>	–	test statystyczny ( <i>ang. analysis of variance</i> )
<b>APOE</b>	–	apolipoproteina E ( <i>ang. apolipoprotein E</i> )
<b>APP</b>	–	białko prekursorowe amyloidu $\beta$ ( <i>ang. amyloid beta precursor protein</i> )
<b>ARE</b>	–	element odpowiedzi antyoksydacyjnej ( <i>ang. Antioxidant response element</i> )
<b>ATP</b>	–	adenozynotrifosforan ( <i>ang. adenosine triphosphate</i> )
<b>A<math>\beta</math><sub>40-42</sub></b>	–	amyloid beta
<b>A<math>\beta</math>O</b>	–	oligomery amyloidu beta
<b>sAPP<math>\alpha</math>/sAPP<math>\beta</math></b>	–	rozpuszczalne N-końcowe produkty trawienia białka APP
<b>B27</b>	–	suplement do diety
<b>BACE1</b>	–	$\beta$ -sekretaza amyloidu beta ( <i>ang. beta-secretase 1; <math>\beta</math>-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme-1</i> )
<b>BBB</b>	–	bariera krew-mózg ( <i>ang. blood brain barrier</i> )
<b>Bcl-2</b>	–	białko biorące udział w apoptozie ( <i>ang. apoptosis regulator Bax</i> )
<b>BSA</b>	–	wolna od kwasów tłuszczowych albumina z surowicy bydłowej ( <i>ang. bovine serum albumin</i> )
<b>BV2</b>	–	linia komórkowa mikrogleju mysiego

<b>CAT</b>	–	katalaza ( <i>ang. catalase</i> )
<b>ChA</b>	–	choroba Alzheimerera ( <i>ang. AD, Alzheimer's Disease</i> )
<b>ChH</b>	–	choroba Huntingtona ( <i>ang. HD, Huntington's Disease</i> )
<b>ChP</b>	–	choroba Parkinsona ( <i>ang. PD, Parkinson's Disease</i> )
<b>CL</b>	–	kardiolipina ( <i>ang. Cardiolipin</i> )
<b>COX</b>	–	oksydaza cytochromu C ( <i>ang. Mitochondrially Encoded Cytochrome C Oxidase</i> )
<b>CTF83/CTF99</b>	–	83-aminokwasowy peptyd $\alpha$ CTF/ 99-aminokwasowy peptyd $\alpha$ CTF
<b>Ct</b>	–	cykl progowy Treshold Cycle
<b>Cyp-D</b>	–	Cyklofilina D ( <i>ang. Cyclophilin D</i> )
<b>CytB</b>	–	cytochrom B ( <i>ang. Cytochrome B</i> )
<b>DAT</b>	–	transporter dopaminy ( <i>ang. Dopamine transporter</i> )
<b>DCF</b>	–	2',7'-dichlorofluoresceina
<b>DMEM</b>	–	pożywka Eagle'a zmodyfikowana przez Dulbecco ( <i>ang. Dulbecco Modified Eagle Medium</i> )
<b>DMSO</b>	–	dimetylosulfotlenek ( <i>and. Dimethyl sulfoxide</i> )
<b>cDNA</b>	–	komplementarny DNA ( <i>ang. complementary DNA</i> )
<b>DNA</b>	–	kwas deoksyrybonukleinowy ( <i>ang. deoxyribonucleic acid</i> )
<b>Drp1</b>	–	białko dynamino-podobne ( <i>ang. dynamin related protein 1</i> )
<b>DS.</b>	–	zespół Downa ( <i>ang. Down Syndrome</i> )
<b>EBV</b>	–	wirus Epsteina-Barr ( <i>ang. Human Herpesvirus-4, ludzki herpeswirus 4</i> )
<b>ECL</b>	–	chemiluminescencja ( <i>ang. electrogenerated chemiluminescence</i> )
<b>EDTA</b>	–	sól dwusodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego ( <i>ang. ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>ER</b>	–	siateczka śródplazmatyczna ( <i>ang. endoplasmatic reticulum</i> )

<b>ERR<math>\alpha</math></b>	–	receptor alfa związany z estrogenem ( <i>ang. Estrogen-related receptor alpha</i> )
<b>ETC</b>	–	łańcuch transportu elektronów ( <i>ang. Electron Transport Chain</i> )
<b>5xFAD</b>	–	myszki transgeniczne wyrażające 5 mutacji ludzkiej rodzinnej choroby Alzheimera
<b>FAD</b>	–	postać rodzinna choroby Alzheimera ( <i>ang. Familial Alzheimer's Disease</i> )
<b>FADH<sub>2</sub></b>	–	dinukleotyd flawinoadeninowy – forma zredukowana
<b>FDA</b>	–	Agencja Żywności i Leków ( <i>ang. Food and Drug Administration</i> )
<b>FBS</b>	–	cielęca surowica płodowa ( <i>ang. fetal bovine serum</i> )
<b>Fis1</b>	–	białko rozszczepienia mitochondriów 1 ( <i>ang. Mitochondrial fission 1 protein</i> )
<b>G6PDH</b>	–	dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa ( <i>ang. glucose-6-phosphate dehydrogenase</i> )
<b>GABA</b>	–	kwasy $\gamma$ -aminomasłowe ( <i>ang. <math>\gamma</math>-aminobutyric acid</i> )
<b>GAPDH</b>	–	dehydrogenaza fosforanu aldehydu glicerynowego ( <i>ang. glycer-aldehyde 3-phosphodehydrogenase</i> )
<b>GLUT1/3</b>	–	transportery glukozy 1/3 ( <i>ang. glucose transporter 1/3</i> )
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	–	kinaza 3 $\beta$ syntazy glikogenu ( <i>ang. glycogen synthase kinase 3<math>\beta</math></i> )
<b>Gpx1/4</b>	–	peroksydaza glutationowa 1/4 ( <i>ang. glutathione peroxidase 1/4</i> )
<b>Gsr</b>	–	reduktaza glutationowa
<b>GTP</b>	–	Guanozyno-5'-trifosforan
<b>4-HNE</b>	–	4-hydroksynonenal
<b>H2DCF</b>	–	2',7'-dichlorodihydrofluoresceina ( <i>ang. 2',7'-dichloro-dihydro-fluorescein</i> )
<b>H2DCF-DA</b>	–	dwuoctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny ( <i>ang. 2',7'-dichloro-dihydrofluorescein diacetate</i> )

<b>HBSS</b>	–	zbuforowany roztwór Hanks' a ( <i>ang. Hanks' balanced salt solution</i> )
<b>HCMV</b>	–	wirus Cytomagalii ( <i>ang. human cytomegalovirus</i> )
<b>HEPES</b>	–	kwasy 2-[4-(2-hydroksetylo)-1-piperazyno]etanosulfonowy ( <i>ang. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> )
<b>HHV-6/7</b>	–	wirus opryszczki typu 6/7 ( <i>ang. human betaherpesvirus 6/7</i> )
<b>HO-1</b>	–	oksygenaza hemowa -1
<b>HS</b>	–	surowica końska ( <i>ang. horse serum</i> )
<b>HSV-1</b>	–	wirus opryszczki zwykłej typu 1 ( <i>ang. Herpes simplex virus 1</i> )
<b>HT22</b>	–	unieśmiertelnione mysie komórki hipokampa
<b>Ile</b>	–	aminokwas izoleucyna
<b>IMM</b>	–	wewnętrzna błona mitochondrialna ( <i>ang. Inner mitochondrial membrane</i> )
<b>LTP</b>	–	długotrwałe wzmocnienie synaptyczne
<b>MAPK</b>	–	kinazy aktywowane mitogenami ( <i>ang. mitogen activated protein kinases</i> )
<b>MCI</b>	–	łagodne zaburzenia poznawcze ( <i>ang. mild cognitive impairment</i> )
<b>Mff</b>	–	czynnik rozszczepienia mitochondriów ( <i>ang. mitochondrial fission factor</i> )
<b>MiD49 / 51</b>	–	mitochondrialne białko rozszczepienia 49/51
<b>MEM</b>	–	medium Eagle`a ( <i>ang. Minimum Essential Medium Eagle</i> )
<b>Mfn-1</b>	–	mitofuzyna 1 ( <i>ang. Mitofusin-1</i> )
<b>Mfn-2</b>	–	mitofuzyna 2 ( <i>ang. Mitofusin-2</i> )
<b>MMP</b>	–	potencjał błony mitochondrialnej ( <i>ang. Mitochondrial Membrane Potential</i> )
<b>mPTP</b>	–	przepuszczalność porów mitochondrialnych
<b>MRI</b>	–	rezonans magnetyczny ( <i>ang. magnetic resonance imaging</i> )
<b>MS</b>	–	stwardnienie rozsiane ( <i>ang. Multiple sclerosis</i> )

<b>MTT</b>	–	bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowy
<b>mtDNA</b>	–	mitochondrialny DNA Mitochondrial DNA
<b>mtRNA</b>	–	matrycowy kwas rybonukleinowy ( <i>ang. messenger RNA</i> )
<b>MTT</b>	–	błękit tiazolu, bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowy
<b>N2a</b>	–	komórki nerwiaka niedojrzałego
<b>NAD</b>	–	dinukleotyd nikotynamidoadeninowy
<b>NAD<sup>+</sup></b>	–	utleniona forma dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
<b>NADP<sup>+</sup></b>	–	fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, forma utleniona
<b>NADH</b>	–	dwunukleotyd nikotynoamidoadeninowy, forma zredukowana
<b>NADPH</b>	–	ester fosforanowy dwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego, forma zredukowana
<b>ND1</b>	–	podjednostka 1 dehydrogenazy NADH ( <i>ang. Mitochondrially Encoded NADH, Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 1</i> )
<b>nDNA</b>	–	jądrowe DNA ( <i>ang. nuclear DNA</i> )
<b>NFTs</b>	–	spłątki neurofibrylarne ( <i>ang. neurofibrillary tangles</i> )
<b>NO</b>	–	tlenek azotu ( <i>ang. nitric oxide</i> )
<b>NOX</b>	–	oksydaza NADPH ( <i>ang. NADPH oxidase</i> )
<b>NRF1/2</b>	–	jądrowy czynnik oddechowy ( <i>ang. nuclear respiratory factor 1/2</i> )
<b>NMDA</b>	–	kwas N-metylo-D-asparaginianowy ( <i>ang. N-methyl-D-aspartic acid</i> )
<b>NT</b>	–	nici neutropilowe ( <i>ang. neuropil threads</i> )
<b>OMM</b>	–	zewnętrzna błona mitochondrialna ( <i>ang. outer mitochondrial membran</i> )
<b>OPA1</b>	–	białko 1 zaniku nerwu wzrokowego ( <i>ang. optic atrophy protein 1</i> )
<b>OUN</b>	–	ośrodkowy układ nerwowy ( <i>ang. central nervous system</i> )

<b>OXPHOS</b>	– fosforylacja oksydacyjna ( <i>ang. oxidative phosphorylation</i> )
<b>PAGE</b>	– elektroforeza w żelu poliakrylamidowym ( <i>ang. polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<b>PAR</b>	– poli(ADP)-ryboza ( <i>ang. poly (ADP)-ribose</i> )
<b>PARP</b>	– polimeraza poli(ADP-rybozy) ( <i>ang. poly (ADP-ribose) polymerase</i> )
<b>PBS</b>	– buforowany roztwór soli fizjologicznej ( <i>ang. phosphate buffer saline</i> )
<b>PBS-T</b>	– PBS z Tween-20
<b>PC12</b>	– linia komórkowa wyprowadzona z guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy szczura, Pheochromocytoma
<b>PCR</b>	– reakcja łańcuchowa polimerazy ( <i>ang. polymerase chain reaction</i> )
<b>PET</b>	– badanie pozytonowej tomografii emisyjnej ( <i>ang. positron emission tomography</i> )
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	– receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów koaktywator 1- alfa ( <i>ang. peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i> )
<b>PGC-1<math>\beta</math></b>	– receptor gamma aktywowany przez proliferatory peroksysomów koaktywator-1 beta ( <i>ang. peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 beta</i> )
<b>PJ34</b>	– chlorowodorek N- (6-okso-5,6-dihydrofenantrydyn-2-yl) (N,Ndimetylamino) acetamidu
<b>PPAR</b>	– receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów ( <i>ang. peroxisome proliferator-activated receptor</i> )
<b>PS1/PSEN1</b>	– Presenilina 1 ( <i>ang. Presenilin 1</i> )
<b>PS2/PSEN2</b>	– Presenilina 2 ( <i>ang. Presenilin 2</i> )
<b>PTM</b>	– potranslacyjna modyfikacja białek ( <i>ang. posttranslational modifications of mitochondrial proteins</i> )
<b>qRT-PCR</b>	– ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym ( <i>ang. quantitative real-time polymerase chain reaction</i> )

<b>RA</b>	–	kwasy retinowe ( <i>ang. retinoic acid</i> )
<b>RFT</b>	–	reaktywne formy tlenu
<b>RNA</b>	–	kwasy rybonukleinowe ( <i>ang. ribonucleic acid</i> )
<b>RPMI</b>	–	Pożywka Roswell Park Memorial Institute
<b>RT</b>	–	temperatura pokojowa ( <i>ang. room temperature</i> )
<b>RT-PCR</b>	–	reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym ( <i>ang. real-time polymerase chain reaction</i> )
<b>SAD</b>	–	postać sporadyczna choroby Alzheimera ( <i>ang. Sporadic Alzheimer's Disease</i> )
<b>SCA1</b>	–	zanik rdzeniowo-mózdkowy 1 ( <i>ang. Spinocerebellar ataxia type 1</i> )
<b>SD</b>	–	odchylenie standardowe ( <i>ang. standard deviation</i> )
<b>SDHA</b>	–	podjednostka A dehydrogenazy bursztynianowej ( <i>ang. Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	–	rozdzielanie elektroforetyczne w żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS ( <i>ang. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<b>SEM</b>	–	standardowy błąd pomiaru ( <i>ang. Standard Error of Measurment</i> )
<b>SH-SY5Y</b>	–	ludzka linia komórkowa <i>neuroblastoma</i>
<b>SIRT</b>	–	Sirtuina ( <i>ang. Sirtuin</i> )
<b>SMA</b>	–	rdzeniowy zanik mięśni ( <i>ang. (ang. spinal muscular atrophy)</i> )
<b>SNO</b>	–	S-nitrozitiol
<b>Sod1</b>	–	mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa 1 ( <i>ang. superoxide dismutase 1</i> )
<b>Sod2</b>	–	mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa 2 ( <i>ang. superoxide dismutase 2</i> )
<b>S1P</b>	–	sfingozyna 1 fosforan ( <i>ang. Sphingosine- 1-phosphate</i> )
<b>SP</b>	–	blaszki starcze ( <i>ang. senile plaques</i> )

<b>TBARS</b>	–	kwasy tiobarbiturowe ( <i>ang. Thiobarbituric acid reactive substances</i> )
<b>TBS</b>	–	bufor o składzie 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH doprowadzone HCl do 7,6
<b>TEMED</b>	–	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
<b>TBST</b>	–	bufor TBS z Tween-20
<b>TCA</b>	–	cykl kwasów trikarboksylowych ( <i>ang. the tricarboxylic acid cycle</i> )
<b>TFAM</b>	–	mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A ( <i>ang. mitochondrial transcription factor A</i> )
<b>TOM</b>	–	translokaza błony zewnętrznej ( <i>ang. translocase of the outer membrane</i> )
<b>Tris</b>	–	tris(hydroksymetylo)aminometan
<b>Val</b>	–	aminokwas Walina
<b>WB</b>	–	Western blot
<b>WHO</b>	–	Światowa Organizacja Zdrowia ( <i>ang. World Health Organization</i> )
<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	–	potencjał mitochondrialny



## WYKAZ RYCIN

<b>Rycina 1.</b> Schematyczne przedstawienie metabolizmu glukozy w chorobie Alzheimera.....	<b>32</b>
<b>Rycina 2.</b> Schematyczne przedstawienie metabolizmu glukozy w komórkach nerwowych .....	<b>36</b>
<b>Rycina 3.</b> Schematyczne przedstawienie hipotezy kaskady amyloidowej w patogenezie choroby Alzheimera.....	<b>39</b>
<b>Rycina 4.</b> Schematyczne przedstawienie metabolizmu białka APP na szlaku amyloidogennym i nieamyloidogennym .....	<b>41</b>
<b>Rycina 5.</b> Schematyczne przedstawienie hipotezy kaskady mitochondrialnej w chorobie Alzheimera.....	<b>46</b>
<b>Rycina 6.</b> Schematyczne przedstawienie dynamiki mitochondriów.....	<b>56</b>
<b>Rycina 7.</b> Schematyczne przedstawienie wyników podsumowujących zaburzenia mitochondrialne w modelu zwierzęcych choroby Alzheimera .....	<b>131</b>

## WYKAZ WYKRESÓW

<b>Wykres 1.</b> Analiza immunoreaktywności białka APP w korze mózgu myszy transgeniczných.....	<b>66</b>
<b>Wykres 2.</b> Wpływ A $\beta$ na żywotność komórek PC12. ....	<b>78</b>
<b>Wykres 3.</b> Zależna od czasu działania oligomerów A $\beta$ 1-42 indukcja apoptotycznej śmierci komórek PC12.....	<b>80</b>
<b>Wykres 4.</b> Ekspresja genów dla białek enzymów antyoksydacyjnych (A), białek dynamiki mitochondrialnej (B) oraz genów podjednostek łańcucha transportu elektronów (C) w komórkach PC12. ....	<b>82</b>
<b>Wykres 5.</b> Wpływ oligomerów A $\beta$ 1-42 i inhibitora PARP-1 (PJ34) na poziom immunoreaktywności poli (ADP) rybozy (PAR) (A), poziom wolnych rodników (B) oraz żywotność komórek w obecności PJ34 (C). ....	<b>84</b>
<b>Wykres 6.</b> Wpływ inhibitora PARP-1 (PJ34) na ekspresję genów dla białek enzymów antyoksydacyjnych (A), białek dynamiki mitochondrialnej (B) oraz genów podjednostek łańcucha transportu elektronów (C).....	<b>87</b>
<b>Wykres 7.</b> Wpływ A $\beta$ 1-42 na żywotność komórek BV2 i SHSY-5Y (A) oraz poziom reaktywnych form tlenu (B).....	<b>89</b>
<b>Wykres 8.</b> Wpływ A $\beta$ na ekspresję genów dla białek antyoksydacyjnych (A), Sirtuin (B), białek dynamiki mitochondrialnej (C) oraz genów podjednostek łańcucha transportu elektronów w komórkach SH-SY5Y i BV2.....	<b>91</b>
<b>Wykres 9.</b> Aktywność COX w komórkach neuronalnych SH-SY5Y i komórkach mikrogleju –BV2 .....	<b>92</b>
<b>Wykres 10.</b> Analiza ekspresji genów kodujących białka antyoksydacyjne (A), Sirtuiny (B) oraz DNA zależne PARPs (C) w korze myszy transgeniczných z chA (APP+) i kontrolnych (APP-).....	<b>96</b>
<b>Wykres 11.</b> Analiza ekspresji genów kodujących białka biogenezy mitochondriów oraz poziom immunoreaktywności białka PGC-1 $\alpha$ w korze myszy transgeniczných z chA (APP+) i kontrolnych (APP-).....	<b>99</b>

<b>Wykres 12.</b> Analiza ekspresji genów kodujących białka dynamiki mitochondriów oraz poziom immunoreaktywności tych białek w korze myszy transgenicznych z chA (APP+) i kontrolnych (APP-).....	<b>103</b>
<b>Wykres 13.</b> Analiza ekspresji genów kodujących białka podjednostek kompleksów oddechowych łańcucha transportu elektronów (ETC) w korze myszy transgenicznych z chA (APP+) i kontrolnych (APP-).....	<b>105</b>
<b>Wykres 14.</b> Poziom immunoreaktywności białek podjednostek kompleksów oddechowych łańcucha transportu elektronów (ETC) (A) oraz aktywność cytochromu C oksydazy (COX) (B) w korze myszy transgenicznych z chA (APP+) i kontrolnych (APP-).....	<b>107</b>

## **WYKAZ TABEL**

<b>Tabela 1. Warunki reakcji immunochemicznej dla poszczególnych białek. ....</b>	<b>73</b>
---	-----------

---

## WSTĘP

### Epidemiologia i klasyfikacja Choroby Alzheimera

Choroba Alzheimera (*łac. morbus Alzheimer's*, ChA) należy do najcięższych schorzeń neurodegeneracyjnych, prowadzi do postępujących zaburzeń poznawczych, zdolności uczenia, rozpadu osobowości i otępienia. Typowymi zjawiskami neuropatologicznymi w ChA jest uwalnianie i odkładanie się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej mózgu złogów  $\beta$  amyloidu w formie blaszek starczych (*ang. senile plaques, SP*) (szczególnie w hipokampie) i powstawanie splotków neurofibrylarnych (*ang. neurofibrillary tangles, NFTs*) i nici neutropilowych (*ang. neuropil threads, NT*) w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau (Selkoe i Hardy, 2016).

ChA została scharakteryzowana po raz pierwszy 115 lat temu przez psychiatrę i neuropatologa - Aloisa Alzheimera, który opisał ją jako „osobliwy ciężki proces chorobowy kory mózgowej” i przedstawił na 37 Spotkaniu południowo-zachodnich niemieckich psychiatrów w 1906 roku (Stelzmann i wsp. 1995; Hippus i Neundörfer, 2003). Dane epidemiologiczne wskazują, że ChA dotyka około 1-2% populacji, osób powyżej 65 roku życia. Przypuszcza się, że w Polsce żyje ponad 500 tysięcy osób z otępieniem, a około 350 tysięcy choruje na chA. Według raportu Rzecznika Praw Obywatelskich zatytułowanego: „Sytuacja osób chorych na Alzheimera w Polsce” z 2016 r liczba osób z chA potroi się do 2050 roku i wyniesie ponad milion osób (Szczudlik 2016). Z kolei według danych Światowej Organizacji Alzheimerowskiej (ADI) z 2018 roku co 3 sekundy diagnozowany jest nowy przypadek osoby z demencją, co dodatkowo podkreśla znaczenie tego zaburzenia. Należy zauważyć, że liczba zgonów spowodowanych przez chA jest prawdopodobnie niedoszacowana (Alzheimer's Association, 2021). ChA pozostaje jedyną z dziesięciu najczęstszych przyczyn zgonów, na które nie ma lekarstwa, a wskaźnik śmiertelności stale rośnie, i to o 145 procent od 2000 -2020 roku (Alzheimer's A., 2021). Wylicza się, że przy braku nowych terapii mogących zapobiec lub leczyć chA i inne formy otępienia liczba osób z otępieniem osiągnie ponad 130 milionów do 2050 r. na świecie (Cummings i wsp., 2016; Scheltens i wsp., 2021). Pomimo bardzo intensywnych badań w wiodących ośrodkach naukowych

---

świata w tym USA patogeneza i patomechanizm sporadycznej formy chA pozostaje niewyjaśniony chociaż zidentyfikowano udział licznych czynników genetycznych i środowiskowych.

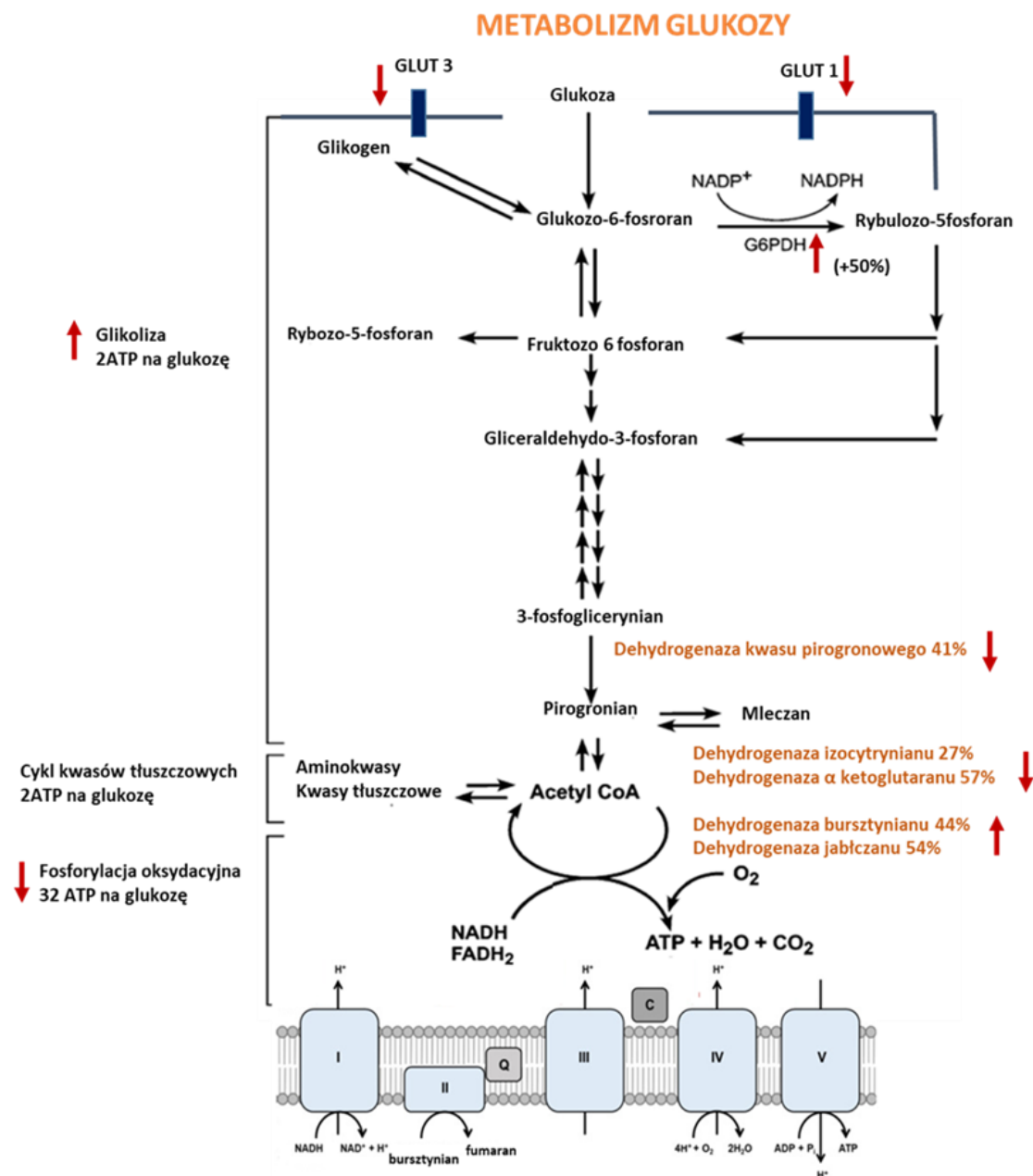
ChA występuje w dwóch postaciach: rodzinna o wczesnym początku (*ang. Familial Alzheimer's Disease, FAD*) i sporadyczna o późnym początku (*ang. Sporadic Alzheimer Disease, SAD*). ChA o wczesnym początku jest rzadką postacią choroby, obserwowaną od 2 do 10% wszystkich przypadków choroby Alzheimera. Mutacje w genach białka prekursorowego amyloidu  $\beta$  (*ang. amyloid precursor protein, APP*), preseniliny 1 (PS1 lub PSEN1) i preseniliny 2 (PS2 lub PSEN2) powodują autosomalną dominującą postać chA. Mutacje w tych genach wywołują zwiększoną nadprodukcję amyloidu- $\beta$  ( $A\beta_{40}$  i  $A\beta_{42}$ ) i jego nagromadzenie w mózgu. Natomiast chA o późnym początku jest bardziej powszechną postacią choroby. Dotyczy około 90% wszystkich chorych i występuje po 65 roku życia (Alzheimer's A., 2021) i towarzyszy jej występowanie homozygot genotypu i apolipoproteiny E (APOE4), wariantu  $\epsilon 4/4$ . Synteza ApoE nasila się w stanach uszkodzenia neuronów w obwodowym i centralnym układzie nerwowym. Wykazano, że dla nosicieli allelu  $\epsilon 4$  charakterystyczne jest występowanie w mózgu większych ilości amyloidu i włókien neurofibrylarnych oraz zaburzenie przekazywania układu cholinergicznego. Możliwe jest także powstanie kompleksu ApoE-amyloid, co prowadzi do jego neurotoksycznego oddziaływania (Villevue i wsp., 2014; Ward i wsp., 2012). W SAD o późnym początku dużą rolę odgrywa kombinacja czynników genetycznych i środowiskowych w tym różnych elementów dotyczących stylu życia (Amakiri i wsp., 2019). Liczne polimorfizmy genów mogą również przyczynić się do wystąpienia SAD (Amakiri i wsp., 2019). Stwierdzenie zależności w zaburzeniach metabolizmu białka APP i genach odpowiedzialnych za jego metabolizm stało się podstawą do sformułowania hipotezy amyloidowej, która zdominowała liczne badania i ukierunkowała poszukiwania terapeutyczne w ostatnich 30 latach. Na przestrzeni tych ostatnich dziesięcioleci zaproponowano wiele różnych hipotez starających się zrozumieć przyczyny i mechanizm tej najbardziej ciężkiej postaci otępienia. Wśród nich jedną z najstarszych jest hipoteza metaboliczna.

---

## Hipoteza metaboliczna

### Zaburzenia metabolizmu glukozy w chorobie Alzheimerera

W ostatnich paru latach renesans przeżywa hipoteza metaboliczna, która stara się wyjaśnić złożony patomechanizm chA mając na uwadze w pierwszym rzędzie zaburzenia metabolizmu glukozy podstawowego substratu energetycznego dla wszystkich procesów życiowych komórki. Mózg ludzki pomimo że stanowi ~ 2% masy ciała to zużywa do ~ 20% tlenu potrzebnego do prawidłowych funkcji fizjologicznych, takich jak procesy oksydacyjnej fosforylacji oraz homeostaza energetyczna i jonowa w tym dotycząca homeostazy jonów wapnia, oraz neuroprzekaźników, jak również procesów odpowiedzialnych za plastyczność neuronów i neurogenę (Kann i Kovacs, 2007; Rusakov, 2006). Prawidłowy przebieg tych procesów zależy od metabolizmu glukozy i sprawności mitochondrialnego cyklu kwasów trójkarboksylowych (TCA) oraz fosforylacji oksydacyjnej i syntezy adenozyntrifosforanu (ATP) (Cisneros-Mejorado i wsp., 2015). Nieefektywne wykorzystanie glukozy, upośledzona produkcja ATP i uszkodzenia oksydacyjne są ze sobą ściśle powiązane, a zaburzenia te mają poważne konsekwencje w przebiegu chA (Di Domenico i wsp., 2017; Szablewski i wsp., 2017). Choroba ta w zaawansowanej postaci prowadzi do znaczących zaburzeń w metabolizmie glukozy co obrazuje Rycina 1.



**Rycina 1. Schematyczne przedstawienie metabolizmu glukozy w chorobie Alzheimera.**

**GLUT1/GLUT3** – transporter glukozy 1/3; **G6PDH**- dehydrogenaza glukoza-6-fosforanowa; **NADP<sup>+</sup>/NADPH**- fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (**NADPH** – forma zredukowana, **NADP<sup>+</sup>** – forma utleniona); **NADH** - dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy – forma zredukowana; **FADH<sub>2</sub>** - dinukleotyd flawinoadeninowy – forma zredukowana. Zmodyfikowano wg Schubert, 2005; Bubber i wsp., 2005; Kim i wsp., 2020



---

Poszczególne regiony mózgu wykazują wyraźne różnice w aktywności metabolicznej, a kluczowa jest funkcja mitochondriów w odniesieniu do określonych regionów mózgu (Andersen i wsp., 2019; Kleinridders i wsp. 2018). Badania sugerowały, że regionalna dysfunkcja mitochondriów w zaawansowanych stadiach chA koreluje z poziomem uwalnianego amyloidu (Dragicevic i wsp. 2010). Badania ostatnich lat nie potwierdzają jednak takiej zależności. Stwierdzono brak korelacji pomiędzy ilością nagromadzonych peptydów A $\beta$  i blaszek amyloidowych, a stopniem otępienia (Selkoe and Hardy, 2016). Wykazano natomiast istotne znaczenie oligomerów A $\beta$ O w obniżeniu funkcji poznawczych (Lesné i wsp., 2006; Selkoe i Hardy, 2016).

W licznych badaniach zademonstrowano znaczące zmniejszenie wychwyty glukozy w mózgach osób z chA, co może być spowodowane: nieprawidłowym sprzężeniem nerwowo-naczyniowym i niedostatecznym dostarczaniem substratu (Cai i wsp., 2017; Kisler i wsp., 2017); nieprawidłowościami mikrostruktury bariery krew-mózg (ang. blood brain barrier, BBB) typowe dla chA (Gejl i wsp., 2017), zmniejszonym transportem glukozy przez BBB lub zmniejszonym transportem do neuronów i metabolizmem w komórkach neuronalnych, jak również w komórkach mikrogleju (Winkler i wsp., 2015; An i wsp., 2018; Fairley i wsp., 2021).

W łagodnych zaburzeniach poznawczych metabolizm glukozy jest znacznie upośledzony w porównaniu z mózgiem w normalnym starzeniu, a spadek metabolizmu glukozy w mózgu następuje przed pojawieniem się zmian neuro patologicznych oraz stopniowo pogarsza się w miarę postępu choroby (Weise i wsp., 2018; Croteau i wsp., 2018). Ocena wskaźnika wykorzystania glukozy w małej kohorcie chorych na chA za pomocą pozytonowej tomografii emisyjnej 18-FDG (PET) wykazała zmniejszenie aktywności metabolicznej w różnych obszarach mózgu, w hipokampie, korze ciemieniowo-skroniowej i prążkowiu na lata przed wystąpieniem objawów klinicznych i stopniowo zmiany te korelowały ze stopniem upośledzenia funkcji poznawczych (An i wsp., 2018; Mosconi i wsp., 2009). Zjawiska te obserwowano pomimo zdolności kompensowania obniżonego metabolizmu glukozy, wykorzystując aminokwasy i kwasy tłuszczowe jako alternatywne źródła energii (Toledo i wsp., 2017). Badania dotyczące obniżonego metabolizmu glukozy, a także zmniejszonej autofagii u osób z chA wykazały

---

że zjawiska te przyczyniają się do dysfunkcji i atrofii neuronów (Chételat i wsp., 2013; Liu i wsp., 2016). Prace Andersena i wsp. (2021) stwierdziły zmniejszony metabolizm w cyklu TCA w hipokampie i zmniejszoną syntezę glutaminy, które mogą doprowadzić do zahamowania neuronalnej syntezy kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA) w hipokampie we wczesnej fazie patologii w mysim modelu chA (5xFAD). W hipokampie myszy 5xFAD stwierdzono dysfunkcję pobudzającej sygnalizacji neuronalnej, obniżony metabolizm komórkowy i zmiany białek takich jak np. APP/A $\beta$ , ApoE. W przeciwieństwie do hipokampa, kora mózgowa 5xFAD wykazywała utrzymaną, a nawet podwyższoną aktywność metaboliczną (Andersen i wsp., 2021). W kilku innych badaniach odnotowano również podwyższony metabolizm APP/A $\beta$  przy obniżonym metabolizmie glukozy w korze mózgowej pacjentów z chA (Benzinger i wsp., 2013; Gordon i wsp., 2018; Cohen i wsp. 2009; Ashraf i wsp., 2015). Jednakże, pomimo znacznie większego uwalniania i nagromadzenia peptydów  $\beta$  amyloidu w korze mózgowej w porównaniu z hipokampem można uznać, że sam A $\beta$  nie jest wystarczającym czynnikiem regionalnej dysfunkcji mitochondrialnej i synaptycznej. Badania Andersen i wsp., (2021) podkreślają, że we wczesnych stadiach chA nie tylko nagromadzenie A $\beta$ , ale także właściwości mitochondriów w poszczególnych regionach mózgu mogą mieć istotne znaczenie na przebieg procesów patologicznych.

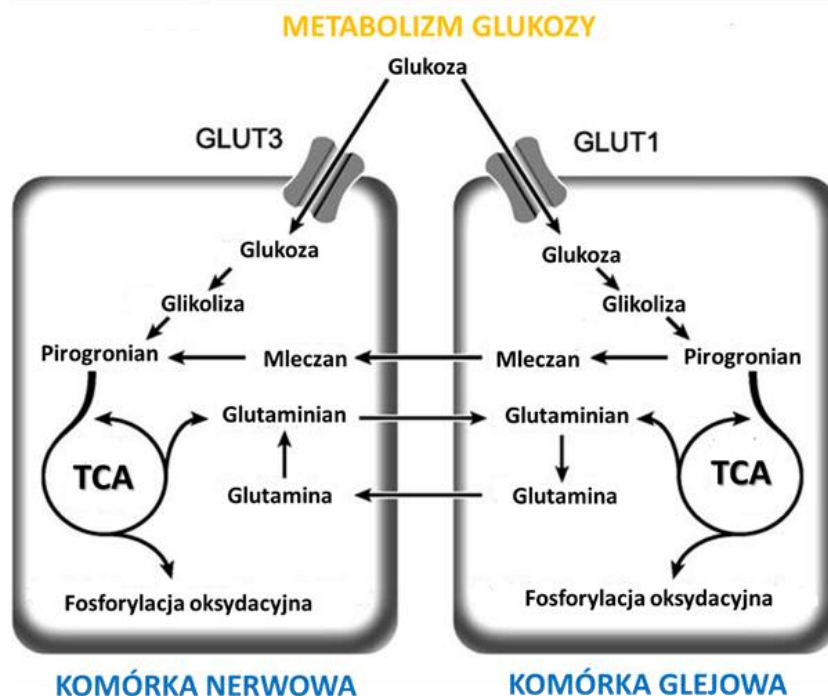
W chA nieodłącznie z zaburzeniami metabolizmu glukozy, powiązany jest również nieprawidłowy metabolizm lipidów, który może wpływać na progresję choroby (Chew i wsp., 2020). Ze względu na swoją różnorodność strukturalną, lipidy odgrywają fundamentalną rolę w różnicowaniu neuronów, synaptogenezie i rozwoju mózgu oraz w procesach pamięci (Grimm i wsp., 2017; Hussain i wsp., 2019). Analiza lipidomiczna mózgow *post mortem* pacjentów z chA i mózgow zwierząt z chA ujawniły zmiany w poziomach kwasów tłuszczowych, glicerolipidów, sfingolipidów i cholesterolu (Mesa-Herrera i wsp., 2019; Chew i wsp., 2020). Ponadto badania metabolomiczne, wykazały zmiany w zawartości lipidów w osoczu, płynie mózgowo-rdzeniowym (Cunnane i wsp., 2012; Joffre i wsp., 2014; Lukiw i wsp., 2005; Proitsi i wsp., 2015). Badania wskazują, że zaburzenia w profilach kwasów tłuszczowych obserwowane w obszarach mózgu podatnych na patologię chA (Cunnane i wsp., 2012; Snowden i wsp., 2017) mogą

---

wpływać na akumulację A $\beta$  i nadmierną fosforylację białka tau (Amtul i wsp., 2012; Barbero-Camps i wsp., 2013; Grimm i wsp., 2011).

Jednym z kluczowych czynników transkrypcyjnych odgrywających ważną rolę w regulacji katabolizmu kwasów tłuszczowych jest receptor alfa aktywowany przez proliferatory peroksosomów (PPAR- $\alpha$ ), który poprzez wpływ na transkrypcję genów kodujących enzymy  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych w mitochondriach, jest głównym metabolicznym regulatorem homeostazy energetycznej (Reddy i Hashimoto, 2001; Schreurs i wsp., 2010; Wang, 2010). Ponadto PPAR- $\alpha$  reguluje metabolizm glukozy, stan redoks oraz neuroprzeżywalność glutaminergiczną, cholinergiczną oraz dopaminergiczną (Kersten i wsp., 2017; Bougarne i wsp., 2018; Cunnane i wsp., 2016). Dodatkowo PPAR- $\alpha$  jest zaangażowany w metabolizm białka prekursorowego amyloidu beta (APP) w mózgu i bezpośrednio lub pośrednio poprzez A $\beta$  może również wpływać na fosforylację białka tau (D’Orio i wsp., 2018).

Hipoteza metaboliczna ściśle wiąże się z hipotezą mitochondrialną. Badania Yang i wsp. (2022) wykazały, że potranslacyjna modyfikacja białek (PTM) mitochondrialnych związana z metabolizmem może wpływać istotnie na przebieg chA. Badacze wykazali że sukcylnylacja białka APP zakłóca jego normalne przetwarzanie proteolityczne, promując akumulację A $\beta$  i tworzenie płytek, a sukcylnylacja białka tau sprzyja jego agregacji do spletków i upośledzeniu formowania mikrotubul (Yang i wsp., 2022). Ponadto, przewlekła ekspozycja na A $\beta$  i białko tau wywołuje zaburzenia mitochondriów i dysfunkcje metaboliczną mikrogleju (Baik i wsp., 2019). Niedawno przeprowadzone badania na dużą skalę dotyczące analizy proteomicznej mózgu w chA wykazały, że wczesne zmiany metaboliczne mogą być zależne od aktywacji mikrogleju (Johnson i wsp., 2020). Już na początku XXI wieku zwracano uwagę na istotne zależności metaboliczne pomiędzy komórkami glejowymi a neuronami w tym dotyczące przemian pirogronianiu, kwasu mlekowego i glutaminianu/glutaminy (Ryc. 2). Już wtedy badania wskazywały na udział peptydów A $\beta$  w zaburzeniach metabolizmu glukozy kolejne badania doprowadziły do sformułowania hipotezy kaskady amyloidowej.



**Rycina 2. Schematyczne przedstawienie metabolizmu glukozy w komórkach nerwowych i komórkach gwałowych**

**TCA-** cykl kwasu cytrynowego – cykl Krebsa; **GLUT1/3-** transportery glukozy 1/3. Glukoza jest przekształcana w mleczan na drodze glikolizy w komórkach gwałowych - astrocytach, a mleczan jest następnie wydzielany i wykorzystywany przez komórki nerwowe jako źródło energii. Metabolizm glukozy w procesie fosforylacji oksydacyjnej jest aktywniejszy w komórkach nerwowych w porównaniu do komórek gwałowych, w których dominuje glikoliza. Zmodyfikowano, wg Schubert (2005)

## Hipoteza kaskady amyloidu

Do tej pory nie ma jednej hipotezy dotyczącej etiologii i patomechanizmu chA, co świadczy o złożonych procesach powstawania i rozwoju sporadycznej postaci tej choroby. ChA jest chorobą wieloczynnikową a liczne mechanizmy z nią związane są niewyjaśnione. Prawie 40 lat temu w zdrowym mózgu wykryto obecność peptydów A $\beta$  w postaci rozpuszczalnej, a u pacjentów z chA w postaci zagregowanej (Glennner i Wong, 1984), zaproponowano hipotezę wyjaśniającą etiologię choroby opartą o powstawanie blaszek starczych amyloidowych charakterystycznych dla obrazu neuropatologicznego chA. Obecnie wiadomo, że blaszki amyloidowe występować mogą

---

obficie w mózgu starczym i nie korelują z zaburzeniami pamięci oraz są biologicznie nie aktywne. Sformułowana na początku lat 90. XX wieku hipoteza kaskady amyloidowej (Hardy i Allsop, 1991; Selkoe, 1991; Hardy i Haggins, 1992) stała się dominującą hipotezą patogenezy chA (Selkoe i Hardy, 2016), pomimo, że wciąż jest kontrowersyjna (Reitz, 2012; Herrup, 2015). Dużym wsparciem dla tej hipotezy były odkrycia mutacji w genach kodujących białko APP oraz enzymy odpowiedzialne za jego metabolizm i uwalnianie A $\beta$  stwierdzone w rodzinnej, uwarunkowanej genetycznie chA. Hipoteza sugerowała, że nieprawidłowy nadmierny zewnątrzkomórkowy wzrost poziomu A $\beta$  w mózgu może prowadzić do agregacji peptydów A $\beta$ . Z czasem okazało się, że mogą to być oligomery, fibryle bogate w peptydy amyloidu o zmienionej konformacji,  $\beta$ -kartki (Cline i wsp. 2018). Agregacja zaczyna się od utworzenia oligomerów, które są reorganizowane w protofibryle i włókienka, znajdujące się w płytkach amyloidu. Sugeruje się, że oligomery nagromadzone w mózgach pacjentów z chA (Ono i Tsuij, 2020) są najbardziej toksycznymi formami peptydów A $\beta$  dla komórek (d'Errico i Meyer-Luehman, 2020), ponieważ mogą one wpływać na przepuszczalność błony komórkowej, tworzyć kanały dla jonów wapnia, inicjując w ten sposób serię zdarzeń prowadzących do dysfunkcji i śmierci komórek (Glabe, 2006) (Ryc. 3).

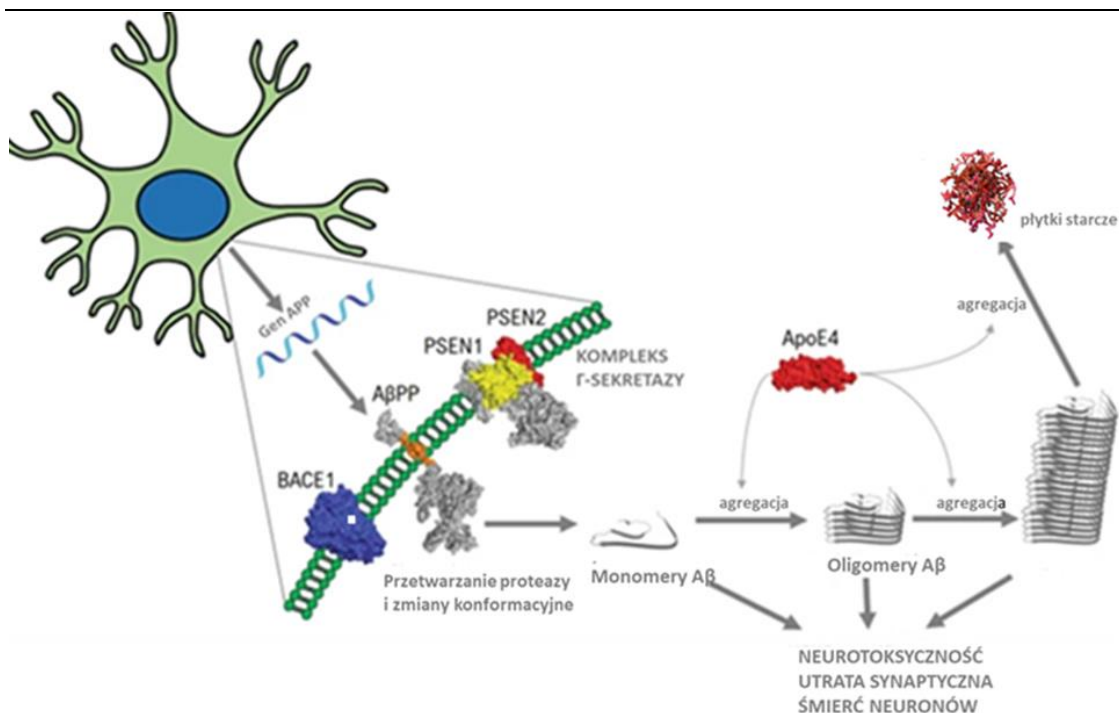
Bardzo dobrym uzasadnieniem słuszności hipotezy amyloidowej było wyizolowanie oligomerów A $\beta$  z mózgu myszy z chA i podanie ich domózgowo zdrowym osobnikom co wywoływało znaczące zaburzenia poznawcze (Lesné i wsp., 2006). Zgodnie z tą hipotezą inne zdarzenia, takie jak wewnątrzkomórkowa nadmierna fosforylacja białka tau i tworzenie się NFTs oraz zakłócenie funkcji synaptycznych, byłyby wynikiem działania oligomerów A $\beta$ . Badania na potrójnie transgenicznych myszach 3xTgAD (APP SWE-PS1M146V-tau P301L) pokazały, że odkładanie  $\beta$ -amyloidu poprzedza patologię neurofibrylarną i zwierzęta te wykazywały więcej patologii neurofibrylarnych niż podwójnie transgeniczne myszy 2xTg (Oddo i wsp., 2003a; Oddo i wsp., 2003b).

Czynniki wpływające na tę kaskadę są modulatorami i mogą mieć istotny wpływ, jak np. stres oksydacyjny. Z kolei istotnymi aktywatorami, modulatorami stresu oksydacyjnego są jony metali, takich jak cynk, żelazo i miedź, których homeostaza ulega

---

zaburzeniu i które stwierdzono również w płytkach amyloidowych (Lovell i wsp., 1998). Jony  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  mogą być uwalnianego szczeliny synaptycznej niektórych zakończeń neuronalnych i mogą odgrywać ważną rolę w agregacji  $\text{A}\beta$  i kaskadzie zjawisk molekularnych wywołanych działaniem peptydów  $\text{A}\beta$  (Tiiman i wsp., 2013), ponieważ mogą wchodzić w interakcję z  $\text{A}\beta$  i mogą modulować proces agregacji. Jony metali mogą oddziaływać, na termodynamikę oraz na morfologię utworzonych agregatów (Faller i wsp., 2013). Agregaty  $\beta$  amyloidu (o niskiej masie cząsteczkowej) z uwiezionymi jonami metali o aktywności redoks, takimi jak jony miedzi, są uważane za bardziej toksyczne niż sam  $\text{A}\beta$ , ponieważ mogą uwalniać większą ilość wolnych rodników (RFT), szkodliwych dla samego peptydu  $\text{A}\beta$  i otaczających go biomolekuł, w tym związanych z błoną neuronalną i zaburzeniem integranłości błony (Bayir, 2005). Dlatego też w ostatnich latach oligomery peptydów  $\text{A}\beta\text{O}$  były uważane za jeden z najbardziej obiecujących celów terapeutycznych w chA. Jednak wiele badań klinicznych III fazy dotyczących licznych związków farmakologicznych w tym przeciwciał przeciw  $\text{A}\beta$  działających w oparciu o hipotezę kaskady  $\text{A}\beta$  nie powiodło się co było podstawą do jej podważania (Uddin i wsp., 2020).

Ostatnie badania kliniczne oparte na hipotezie kaskady amyloidowej przynosiły rozczarowujące wyniki (Sperling i wsp., 2011; Selkoe i wsp., 2013). Niemniej jednak Agencja Żywności i Leków (FDA) zatwierdziła w 2021 nowy lek na chA, aducanumab, po 20 latach intensywnych badań nad monoklonalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciw rozpuszczalnemu i nierozpuszczalnemu formom peptydów  $\text{A}\beta$ . Działanie tego leku polega na przeciwdziałaniu toksyczności peptydów  $\text{A}\beta$  i okazało się skuteczne u 50 % badanych pacjentów z chA. Decyzja FDA spotkała się z dużą falą krytyki i uznana została za kontrowersyjną (Dunn i wsp., 2021; Salloway i Cummings, 2021). Poszukiwania innych nowych skutecznych terapii prowadzone są w wiodących ośrodkach naukowych na świecie i dotyczą licznych punktów uchwytu, w tym modulatorów receptora kwasu N-metylo-D-asparaginianowego (NMDA), memantyny, aktywatorów Sirtuiny1, agonistów /modulatorów receptorów dla sfingozyno 1 fosforanu (S1P) -(Fingolimodu, Siponimodu), czynników wzrostu (Cummings, 2021; Plenn i Tonwley, 2022).



### Rycina 3. Schematyczne przedstawienie hipotezy kaskady amyloidowej w patogenezie choroby Alzheimera.

Transkrypcja genu (*APP*) prowadzi do syntezy białka prekursorowego amyloidu- $\beta$  (APP) i następuje jego przetwarzanie przez  $\beta$ -sekretazę 1 (BACE1) i kompleks  $\gamma$ -sekretazy (składającej się z 4 podjednostek), w tym PSEN1 (presenilina 1), PSEN2 (presenilina 2). Następuje uwalnianie peptydu amyloidu- $\beta$ , w tym patogennego A $\beta$ 42, który ulega zmianie konformacyjnej. A $\beta$ 42 w wyniku agregacji tworzy oligomery i protofibryle (>100 kDa), które są neurotoksyczne i ostatecznie odkładają się w postaci blaszek starczych. Zmodyfikowano wg Castellani i wsp., 2019.

### Rola peptydów A $\beta$ w rozwoju choroby Alzheimera

W rodzinnej chA zmiany genetyczne spowodowane mutacjami w genach kodujących białko APP oraz enzymy zaangażowane w jego degradację powodują zaburzenia uwalniania A $\beta$  lub generują peptydy A $\beta$ , które są bardziej podatne na agregację. W sporadycznej chA zaawansowany wiek i obecność genu kodującego ApoE (allelu  $\epsilon$ 4 w homozygocie) może mieć znaczący wpływ na ryzyko rozwoju chA. Wspólnym zjawiskiem w obu postaciach chA: rodzinnej i sporadycznej jest zmiana

---

konformacyjna A $\beta$ , co czyni je podatnymi na oligomeryzację/ agregację, początkowo rozpuszczalnych oligomerów, a następnie włókienek, które tworzą rozproszone płytki, a na późniejszym etapie płytki starcze, neurytyczne (Blennow i wsp., 2015).

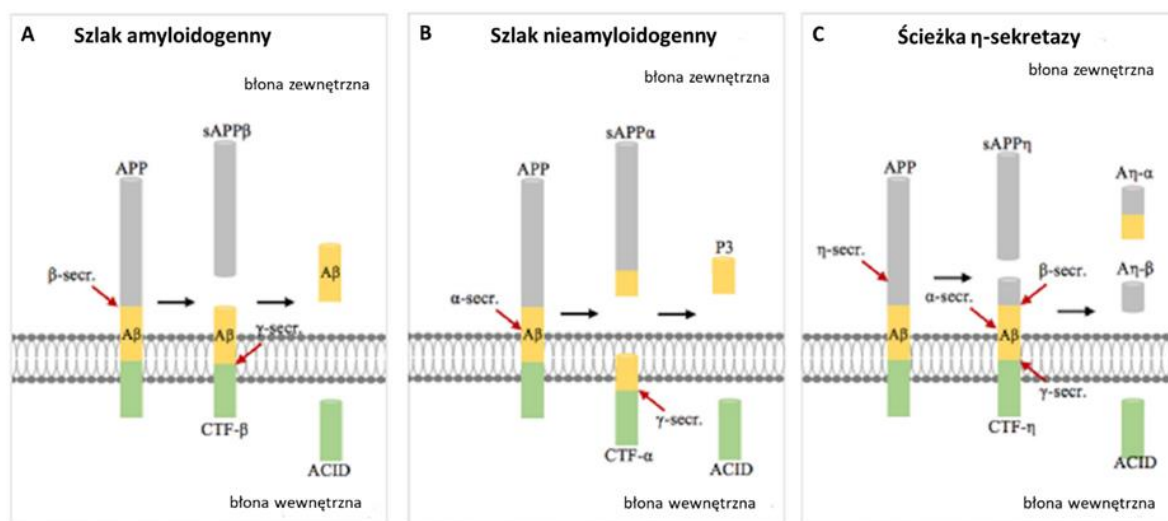
A $\beta$  jest peptydem o długościach od 38 do 43 aminokwasów, którego 1-literowa sekwencja aminokwasowa peptydu to DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVIAT. Powstaje po enzymatycznym rozszczepieniu przez  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekreazy, białka prekursorowego amyloidu - białka transbłonowego typu 1 (APP) ulegającego ekspresji w różnych tkankach, zwłaszcza w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) (Jakob-Roetne i Jacobsen, 2009). Poznanych zostało 8 izoform tego białka. W OUN stwierdza się 3 formy, a najczęstsza izoforma neuronalna obejmuje 695 reszt aminokwasowych (Nalivaeva i wsp., 2014). Poza tym w mózgu występują dwie inne izoformy zawierające 770 i 771 aminokwasów z pośród znanych i opisanych innych 8 izoform tego białka. Funkcja fizjologiczna APP jest nadal niejasna. Jednak na podstawie dotychczasowych badań, można przypuszczać, że może APP może odgrywać ważną rolę w rozwoju mózgu, pamięci i plastyczności synaps (Nalivaeva i wsp., 2014).

Metabolizm APP może przebiegać dwoma różnymi szlakami (Ryc. 4). W przypadku szlaku nie-amyloidogenego (dominującego) APP jest najpierw rozszczepiany przez  $\alpha$ -sekreazę, dając początek rozpuszczalnemu fragmentowi białka prekursora amyloidu- $\alpha$  (sAPP $\alpha$ ) a następnie przez  $\gamma$ -sekreazę, tworząc krótkie peptydy A $\beta$ <sub>17-40/42</sub> (P3). W przypadku szlaku amyloidogenego, który występuje w mniejszym stopniu w warunkach fizjologicznych, ale ulega aktywacji w procesie starzenia i różnych stanach patologicznych APP jest degradowany kolejno przez  $\beta$ -sekreazę (BACE1) prowadząc do powstania rozpuszczalnego fragmentu białka prekursora amyloidu- $\beta$  (sAPP $\beta$ ) i następnie przez  $\gamma$ -sekreazę, prowadząc do powstania peptydów A $\beta$ <sub>36-43</sub> (głównie A $\beta$ <sub>1-40/42</sub>). Oba szlaki prowadzą również do powstania fragmentów końca aminowego APP (sAPP)  $\alpha$  lub  $\beta$  i fragmentów zawierających C koniec z grupą karboksylową (CTF83 lub CTF99), a następnie do uwalniania domeny wewnątrzkomórkowej APP (AICD) (Chow i wsp., 2010). Fragmenty te mogą być zaangażowane w sygnalizację nukleotydową (Nalivaeva i wsp., 2014). W zależności od dokładnej lokalizacji cięcia przez  $\gamma$ -sekreazę, może dochodzić do uwolnienia peptydów



o różnej długości, od  $A\beta_{1-38}$  do  $A\beta_{1-43}$ . Jednak najbardziej obficie uwalniany w mózgu jest  $A\beta_{1-40}$  i w mniejszym stopniu  $A\beta_{1-42}$ . Uważa się, że  $A\beta_{40}$  jest głównie uwalniany w komórkach nieneuronalnych i w komórkach śródbłonna naczyń mózgowych (Welander i wsp., 2009).

Niedawno odkryto trzeci sposób rozszczepiania APP (Willem i wsp. 2015). Badania pokazują, że APP może być rozszczepiany przez  $\delta$ -sekretagę i potencjalną  $\eta$ -sekretagę związaną z błoną, metaloproteinazę macierzy błony typu 5, taką jak MT5-MMP, która kolokalizuje się z blaszkami amyloidowymi w mózgu w chA (García-González i wsp., 2019). Przeprowadzone badania sugerują, że hamowanie BACE1 może powodować wzrost aktywności wymienionych innych sekretaz i może spowodować działania niepożądane pomimo zmniejszenia uwalniania  $A\beta$  na szlaku amyloidogennym przez BACE1 i  $\gamma$ -sekretagę (Willem i wsp., 2015).



#### Rycina 4. Schematyczne przedstawienie metabolizmu białka APP na szlaku amyloidogennym i nieamyloidogennym

Uwalnianie  $\beta$ -amyloidu ( $A\beta$ ) w procesie metabolizmu białka prekursora amyloidu (APP). Peptyd  $A\beta$  jest generowany z APP na szlaku amyloidogennym (A). Metabolizm APP na szlaku nieamyloidogennym (B,C). Zmodyfikowano wg Fan i wsp. (2020).

---

Peptydy A $\beta$  są produktem metabolizmu APP jak opisano powyżej i są głównie wytwarzane wewnątrzkomórkowo w endosomach i uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej mózgu podczas aktywności neuronalnej w warunkach fizjologicznych. Zwiększone uwalnianie oligomeryzacja i agregacja występuje w chA i w różnych innych schorzeniach OUN, np. w niedokrwieniu/ niedotlenieniu mózgu (Zhang i wsp. 2011; Chen i wsp., 2017). Wysokie stężenia oligomerów peptydów A $\beta$  są neurotoksyczne dla neuronów, powodują atrofię dendrytyczną i aksonalną, po której następuje degeneracja zakończeń synaptycznych i śmierć neuronów (Rajmohan i wsp., 2017). Poziom oligomerów A $\beta$  jest skorelowany z obniżeniem funkcji poznawczych (Huber i wsp., 2018). Stwierdzono, że oligomery A $\beta$  hamują *in vivo* długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP) w modelach mysich chA (Mango i wsp., 2019). Ponadto peptydy A $\beta$  wpływają na zwyrodnienie neurofibrylarne, które jest nasilone u myszy transgenicznych z mutacją tau i APP (Lewis i wsp., 2001). Myszy transgeniczne, które wykazują wysoką ekspresję ludzkiego APP w mózgu, miewają spontaniczne napady drgawek, które mogą być spowodowane wzmocnionym hamowaniem synaptycznym GABA-ergicznym i obniżoną plastycznością synaptyczną prawdopodobnie wywołanymi oligomerami A $\beta$  (Palop i wsp., 2007).

APP i A $\beta$  znajduje się również w mitochondriach (Chen i wsp., 2010; Muirhead i wsp., 2010). Badania wykazały, że A $\beta$  nie może być uwalniany lokalnie w mitochondriach, dlatego musi być pobrany przez organellum z innego miejsca wewnątrz komórki. Wykazano, że A $\beta$  jest importowany do mitochondriów przez kompleks translokazy błony zewnętrznej (TOM) a następnie nagromadzany w grzebieniach mitochondrialnych (*cristae*) (Hanson-Peterson i wsp., 2008). A $\beta$  jest obecny w mitochondriach przed utworzeniem się płytki amyloidowej, co sugeruje, że obecność A $\beta$  w tych organellach jest wczesnym zjawiskiem w patomechanizmie chA (Cha i wsp., 2012).

Hipoteza kaskady amyloidowej pozostaje aktualna dla rodzinnej postaci chA. Niemniej jednak przypadki FAD stanowią tylko niewielki procent wszystkich osób z chA, a hipoteza kaskady amyloidu nie wyjaśnia w pełni przyczyn spontanicznej postaci chA. Na przestrzeni lat sformułowano liczne inne hipotezy, np. dotyczącej zaburzeń

---

homeostazy wapnia (Bezprozvanny i Mattson, 2008), zmienionego metabolizmu cholesterolu i fosfolipidów oraz sfingolipidów (Stefani i Liguri, 2009) obejmującego zaburzoną homeostazę pomiędzy S1P a ceramidem. Stwierdzono korelację pomiędzy obniżonym poziomem S1P a otępieniem. Wykazano istotne zmiany ekspresji genów zaangażowanych w regulację metabolizmu bioaktywnych sfingolipidów (Ješko i wsp., 2019; Ješko i wsp., 2020). Ostatnio odżyła hipoteza sugerująca, że chA może być wywołana przez różne bakterie i wirusy (Itzhaki i wsp., 2016; Mastroeni i wsp., 2018; Westman i wsp., 2017). Najnowsze badania wykazują również, że infekcje koronawirusami mogą prowadzić do chorób neurodegeneracyjnych (Krey i wsp., 2021; Gordon i wsp., 2021). Niestety żadna z przedstawianych hipotez nie wyjaśnia w pełni etiologii i mechanizmu sporadycznej chA. Wobec powyższego uważa się, że mogą istnieć inne mechanizmy molekularne i komórkowe zaangażowane w patofizjologię sporadycznej postaci chA. Zaproponowano kolejną hipotezę dotyczącą zaburzeń mitochondriów i wyjaśniającą związek między obecnością A $\beta$  a dysfunkcją mitochondriów z uwzględnieniem interakcji pomiędzy A $\beta$  a dehydrogenazą alkoholową (ABAD). Zademonstrowano w kolejnych badaniach, że kompleks A $\beta$  z ABAD prowadzi do aktywacji stresu oksydacyjnego i może być w konsekwencji odpowiedzialny za aktywację kaskady kolejnych zaburzeń (Lustbader i wsp. 2004). Stwierdzono, że cyklofilina D (Cyp-D), znajdująca się w mitochondriach jest kolejnym białkiem przypuszczalnie również zaangażowanym w ten proces. Zablockowanie Cyp-D prowadzi do zmniejszenia apoptozy indukowanej przez A $\beta$  i wpływa na poprawę zdolności poznawczych u myszy transgeniczných (Du i wsp., 2008). Badania nad znaczeniem peptydów A $\beta$  w rozwoju chA doprowadziły do sformułowania hipotezy mitochondrialnej chA (Swerdlow i wsp., 2004; Swerdlow i wsp., 2010).

---

## Hipoteza mitochondrialna

### Zaburzenia funkcji mitochondriów w chorobie Alzheimera

Coraz więcej badań wskazuje, że upośledzenie funkcji mitochondriów może być głównym patologicznym czynnikiem chorób neurodegeneracyjnych związanych z wiekiem (Stanga i wsp., 2020; Johnson i wsp., 2020). W 2004 roku Swerdlow i Khan po raz pierwszy zaproponowali hipotezę kaskady mitochondrialnej, aby wykazać, że dysfunkcja mitochondriów jest głównym zdarzeniem, które powoduje wszystkie zmiany patologiczne w sporadycznej postaci chA o późnym początku. Zaburzenia funkcji mitochondriów miałyby leżeć u podstaw nagromadzenia się/ odkładania się A $\beta$ , tworzenie NFT, śmierć neuronów i utratę połączeń synaptycznych i synaps (Swerdlow i wsp., 2014; Swerdlow i Khan, 2004; Swerdlow i Khan, 2009). Natomiast uwalnianie i agregacja peptydów A $\beta$  jest bardziej markerem starzenia się mózgu niż początkowym czynnikiem wywołującym chorobę (Swerdlow i wsp., 2014).

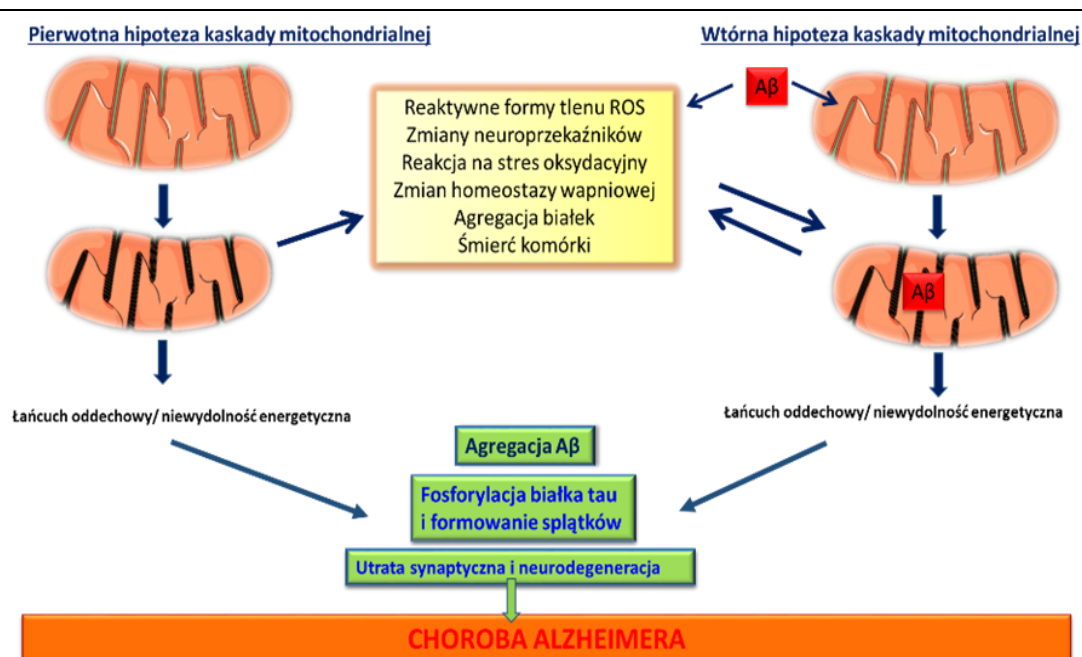
Hipoteza mitochondrialna zakłada istnienie i współzależność trzech głównych zjawisk: Po pierwsze: dziedziczenie genów definiuje podstawową funkcję mitochondrialną jednostki. Pod tym względem zarówno matki, jak i ojcowie przyczyniają się do ryzyka chA ich potomstwa, ale ponieważ mitochondrialne DNA (mtDNA) jest dziedziczone przez matkę, matki mają większy udział w tym zjawisku. Po drugie: tempo zmian mitochondrialnych związanych z wiekiem zależy zarówno od czynników dziedzicznych jak i środowiskowych. Obniżenie funkcji /wydajności mitochondriów wpływa na wzrost populacji starzejących się fenotypów. Po trzecie: tempo zmian funkcji mitochondriów u poszczególnych osób wpływa na chronologię choroby Alzheimera (Swerdlow i wsp., 2014).

Nagromadzenie uszkodzonych mitochondriów może skutkować zarówno zmianami neuropatologicznymi, jak i odpowiadającymi im objawami klinicznymi w chA. W przypadku tej hipotezy starzenie się stanowi wiodący czynnik ryzyka rozwoju SAD a akumulacja A $\beta$  jest wynikiem starzenia, a nie przyczyną zmian neuropatologicznych (Swerdlow i wsp., 2010). Hipotezę tę potwierdza powstawanie blaszek starczych w wyniku nagromadzenia się złogów A $\beta$  w mózgu starczym, któremu

---

towarzyszy niedostateczny metabolizm energetyczny i zwiększenie stresu oksydacyjnego (Lejri i wsp., 2019), a także nieprawidłowa morfologia i funkcja mitochondriów (Oliver i Reddy, 2019). Zwiększone uwalnianie i nagromadzenie peptydów A $\beta$  obserwuje się również w wyniku urazów mózgu, niedokrwienia oraz procesów zapalnych. Należy zaznaczyć, że zaburzenia mitochondrialne nie są również charakterystyczne tylko dla chA (Gorman i wsp., 2016).

W hipotezie kaskady mitochondrialnej chA stwierdza się, że funkcja mitochondriów jest genetycznie ustalona, natomiast nie odpowiada na pytanie jaki czynnik, czy np. A $\beta$  przyczynia się do dysfunkcji mitochondriów, czy jest konsekwencją patologii chA. Hipoteza ta sugeruje, że A $\beta$  postrzegany jest jako marker starzenia się mózgu a nie jako przyczyna chA (Swerdlow i wsp., 2010; Swerdlow i wsp., 2014). Wobec tego zaproponowano alternatywną/wtórą hipotezę kaskady mitochondrialnej, która jest kompatybilna z pierwotną hipotezą kaskady amyloidowej, sugerując istotną rolę stanu funkcjonalnego mitochondriów w uwalnianiu, modyfikacji i akumulacji A $\beta$  i białka tau oraz w tworzeniu oligomerów (Swerdlow, 2018). Hipoteza ta zakłada, że dysfunkcja mitochondriów pośredniczy w toksyczności A $\beta$ . Amyloid  $\beta$  z kolei może pośrednio lub bezpośrednio wpływać na dysfunkcje mitochondriów (Swerdlow, 2018). Inne badania wskazują na dysfunkcję mitochondriów wywołaną przez A $\beta$  i patogenną rolę białka tau oraz ich interakcje w tym również z  $\alpha$ -synukleiną (Vacchi i wsp., 2020; Eckert i wsp., 2010). Nadal dyskutowanym tematem jest, czy dysfunkcja mitochondriów może prowadzić do chA, czy odpowiednie zmiany konformacyjne A $\beta$  mogą następnie powodować dysfunkcję mitochondriów. Zatem zaburzenia mitochondriów może być induktorem zwiększonego uwalniania i oligomeryzacji A $\beta$  oraz nadmiernej fosforylacji białka tau, podczas gdy A $\beta$  i ufosforylowane białko tau mogą dalej zaostrzać dysfunkcję mitochondriów, powodując w ten sposób reakcję błędnego koła w chA (Ryc. 5).



**Rycina 5. Schematyczne przedstawienie hipotezy kaskady mitochondrialnej w chorobie Alzheimera.**

Pierwotna hipoteza kaskady mitochondrialnej jest niezgodna z hipotezą kaskady amyloidowej. Upośledzona funkcja mitochondriów i związane z nią zmiany bioenergetyczne zmieniają homeostazę Aβ i prowadzą do akumulacji Aβ. Z kolei Aβ może przyczyniać się lub nie do rozwoju innych zmian funkcjonalnych i patologii związanych z chA. Wtórna hipoteza kaskady mitochondrialnej jest zgodna z hipotezą kaskady amyloidu i może pośredniczyć w toksyczności Aβ. Jak pokazano, Aβ może bezpośrednio wprowadzać różne zmiany funkcjonalne i patologie związane z chA oraz bezpośrednio lub pośrednio powodować dysfunkcję mitochondriów. Z kolei dysfunkcja mitochondriów wywołana przez Aβ może dalej przyczyniać się do lub inicjować dodatkowe zmiany funkcjonalne i patologie związane z chA. Zmodyfikowano wg Swerdlow (2018)

We wczesnych badaniach zaobserwowano różne typy nieprawidłowości mitochondrialnych w mózгах oraz w narządach obwodowych pacjentów z chA i w modelach zwierzęcych chA (Baloyannis i wsp., 2006; Hirai i wsp., 2001; Lustbader i wsp., 2004; Mecocci i wsp., 1994; Sheng i wsp., 2012; Wang i wsp., 2014). Doświadczenia prowadzone na zwierzęcych modelach genetycznych chA wykazały, że mitochondrialne deficyty bioenergetyczne występują w bardzo młodym wieku, a dysfunkcja mitochondriów poprzedza typowe zmiany neuropatologiczne w chA (Du i wsp., 2010; Yao i wsp. 2009).

---

Kontynuując omawianie zaburzeń mitochondriów i ich znaczenia w chA należy zwrócić uwagę, że te eukariotyczne organelle komórkowe otoczone są dwoma błonami, odpowiednio zwanych zewnętrzną błoną mitochondrialną (OMM) i wewnętrzną błoną mitochondrialną (IMM) (Youlei van der Bliek, 2012). Mitochondria wyróżniają się wśród organelli cytoplazmatycznych, gdyż posiadają własny półautonomiczny genom, zwany mitochondrialnym DNA (mtDNA) (Reddy, 2008). MtDNA zawiera 37 genów, z których 22 koduje tRNA, 2 rRNA (Di Mauro i Schon, 2003). Pozostałe 13 genów kodują niezbędne komponenty kompleksów łańcucha transportu elektronów (ETC). Siedem z nich należy do kompleksu dehydrogenazy I, NADH: oksydoreduktazy ubichinonowej (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6), jeden do kompleksu III, ubichinol: c-oksydoreduktazy żelazocyklochromowej, trzy do kompleksu IV, cyt C oksydazy (COX I, COX II i COX III) i dwa do kompleksu V syntazy ATP i ATPazy. Pozostałe białka mitochondrialne (około 1500), w tym wszystkie podjednostki kompleksu II, są kodowane przez DNA jądrowe (nDNA) (Chinnery i Hudson, 2013).

## **Zaburzenia funkcji kompleksów oddechowych w chorobie Alzheimera**

Wyniki dotychczasowych badań wykazują upośledzenie oddychania mitochondrialnego, nadmierne wytwarzanie RFT, a także zaburzenia potencjału błonowego i aktywności oksydazy cytochromu C w mitochondriach w zaawansowanej postaci chA. Zmiany te stwierdzano w obszarach mózgu związanych z funkcjami poznawczymi, takich jak hipokamp i kora (Dragicevic i wsp., 2010). RFT powstają głównie w kompleksach oddechowych - I i III ETC mitochondriów, prowadząc w ten sposób do powstania anionów ponadtlenkowych ( $O_2^-$ ) i nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ). RFT mogą zakłócać zdolności adaptacyjne neuronów i powodować utratę synaps (Oswald i wsp., 2018). Ze względu na ograniczoną aktywność glikolityczną neuronów są one całkowicie zależne od produkcji energii w mitochondriach. Neurony ustalają potencjał błonowy, syntetyzują i wydzielają neuroprzekaźniki, utrzymując w ten sposób

---

wewnątrzkomórkową homeostazę  $\text{Ca}^{2+}$  i skutecznie przekazując sygnały neuronalne. Badania wykazały, że enzymy ETC i TCA są znacznie obniżone (Butterfield i wsp., 2006). W związku z tym upośledzony mitochondrialny łańcuch oddechowy dodatkowo zaburza wydajność przenoszenia elektronów, zwiększa poziom RFT i prowadzi do uszkodzenia komórek. Również mtDNA zlokalizowane w pobliżu mitochondrialnego łańcucha oddechowego jest podatne na mutacje, co prowadzi do syntezy i zwiększa poziom wadliwych białek i RFT (Grimm i wsp., 2016).

Adav i współpracownicy (2019) przy użyciu analizy proteomicznej zidentyfikowali 434 białka mitochondrialne. W tym 208 białek ulegało zróżnicowanej zmianie ekspresji u pacjentów z chA, które były związane z ETC i syntazą ATP, a większość była komponentami kompleksu I. Trzy białka kompleksu I były specyficznie obniżone w mitochondriach próbek autopsyjnych osobników z chA o wczesnym początku chA, w tym: podjednostki NDUFA4 (NDUFA4); (NDUFA9); (NDUFAB1). Białka te biorą udział w stabilizacji kompleksu I (Stroud i wsp., 2013; Adav i wsp., 2019). Obniżenie poziomu podjednostek oksydazy cytochromu c (COX5A, COX5B COX7A2, COX7A2L) i (CYC1) w mózgu osób z chA o późnym początku wykazywać może na zubożone wytwarzanie energii, co jest kluczową cechą biochemiczną postępu choroby. Badania wskazują, że dysfunkcyjne kompleksy mitochondrialne mogą odgrywać kluczową rolę w patogenezie chA (Adav i wsp., 2019). W świetle analiz proteomicznych, nieprawidłowości kompleksu I wiązały się z zaburzeniami białka tau, natomiast kompleksu IV z  $\text{A}\beta$  (Rhein i wsp., 2009). Podsumowując stwierdzone zmiany w ekspresji białek łańcucha ETC doprowadzają do zaburzeń energetycznych, obniżenia ATP, wzrostu poziomu RFT i zaburzeń homeostazy jonów wapnia.

Badania z użyciem modeli zwierzęcych i komórkowych sugerują, że zarówno  $\text{A}\beta$ , jak i białko tau mają bezpośredni wpływ na działanie ETC. U potrójnie transgenicznych myszy 3xTg-AD (ludzkie geny *APP<sup>SWE</sup>*, *Tau<sup>P301L</sup>* i *PS1<sup>M146V</sup>*) obserwuje się nieprawidłowości w funkcjonowaniu mitochondriów na etapie embrionalnym oraz u młodych myszy na długo przed wzrostem poziomu peptydów  $\beta$  amyloidu (Yao i wsp., 2009). W tym mysim modelu chA stwierdzono w izolowanych mitochondriach u 6 miesięcznych myszy, że większość podjednostek kompleksów I i IV jest obniżonych,



---

a ekspresja kompleksów III i V jest z kolei podwyższona (Chou i wsp., 2011). Do chwili obecnej nie jest jasne, czy funkcjonalne i strukturalne zmiany w ETC obserwowane w chA są wynikiem pierwotnej zmiany mitochondrialnej, jak sugeruje hipoteza mitochondrialna w chA (Swerdlow i wsp., 2010), czy też konsekwencją działania białek o zmienionej konformacji, w tym A $\beta$  w mózgu pacjentów z chA.

W chA, jak powiedziano powyżej nadmierne ufosforylowane białko tau oraz peptydy A $\beta$  hamują funkcję kompleksu I w ETC i powodują wzrost poziomu rodnika ponadtlenkowego. Peptydy A $\beta$  hamują ponadto funkcje kompleksu IV w ETC, jak również aktywują kolejne uwalnianie się rodnika ponadtlenkowego co w konsekwencji może prowadzić do wzrostu stresu oksydacyjnego.

## **Stres oksydacyjny w dysfunkcji mitochondriów**

W chA mitochondria odpowiadają za ok 90% całej produkcji RFT oraz są również celem uszkodzeń oksydacyjnych (Wang i wsp., 2014). RFT są wykorzystywane przez komórki jako cząsteczki sygnałowe, ale w chorobie Alzheimera zachwiana zostaje ścisła równowaga między produkcją RFT a rozpadem i w efekcie doprowadzają do licznych zaburzeń i uszkodzeń makromolekuł szlaków przekazywania i jak wspomniano powyżej do procesów neurozwyrodnieniowych. Stres oksydacyjny występuje nie tylko w neuronach oraz komórkach glejowych, ale także w komórkach narządów obwodowych i może poprzedzać tworzenie się płytek A $\beta$  i wystąpienie objawów chA (Butterfield i wsp., 2002; Aluise i wsp., 2011; Yu i wsp., 2018). Stwierdzono, że poziom biomarkerów stresu oksydacyjnego jest skorelowany z upośledzeniem funkcji poznawczych i progresją choroby od łagodnych zaburzeń poznawczych (MCI) do chA (Ansari i Scheff, 2010). Badania z zastosowaniem modeli eksperymentalnych chA oraz przeprowadzone na materialnie autopsyjnym pochodzących od pacjentów z chA wykazały silny związek między stresem oksydacyjnym a zmianami mitochondriów. U transgenicznych myszy

---

z nadekspresją ludzkiego APP (myszy Tg mAPP) stwierdzono wczesne i postępujące gromadzenie się peptydu A $\beta$  w mitochondriach synaptycznych, które doprowadza do dysfunkcji synaptycznej. Wykazano uszkodzoną mitochondrialną aktywność oddechową, zwiększoną przejściową przepuszczalność porów mitochondrialnych (mPTP) oraz upośledzony transport aksonalny (Du i wsp., 2010).

RFT mogą zwiększać poziomy markerów peroksydacji lipidów, takich jak substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) i 4-hydroksynonenal (4-HNE), przyspieszając w ten sposób uszkodzenie mózgu u pacjentów z chA (Butterfield i wsp., 2002). Podobnie inne dane również potwierdziły, że RFT pochodzące z mitochondriów są wystarczającym wyzwalaczem do uwalniania się A $\beta$  (Leuner i wsp., 2012). Stwierdzono, że zwiększa się aktywność  $\beta$ -sekreazy przez A $\beta$ , w wyniku zwiększonego poziomu RFT i może przyspieszać dysfunkcję mitochondriów oraz dodatkowo produkcję RFT, tym samym zwiększając produkcję A $\beta$  w wyniku błędnego koła zaburzeń metabolicznych przyczyniając się do progresji SAD (Leuner i wsp., 2012). Dodatkowo stres oksydacyjny wywołany oligomerem A $\beta_{42}$  upośledza metabolizm glukozy, prowadząc do dysfunkcji synaptycznej i w ostateczności do śmierci neuronów (Gordon i wsp., 2018).

Mitochondria podlegają ciągłym zmianom kształtu, wielkości i lokalizacji w komórce w zależności od zapotrzebowania na energię lub stresu oksydacyjnego i metabolicznego w komórce (Friedman i Nunnari, 2014). Główną funkcją mitochondriów jest fosforylacja oksydacyjna (OXPHOS), odbywająca się w IMM w kompleksach oddechowych ETC, generując potencjał wewnętrznej błony (mt $\Psi\Psi$ ), który wykorzystywany jest przez kompleks syntazy ATP do syntezy ATP w celu wspierania licznych funkcji komórkowych wymagających energii (Cogliati i wsp., 2021). Ponadto w warunkach fizjologicznych mitochondria mają kluczowe znaczenie dla wielu innych funkcji komórkowych, w tym dla utrzymania wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, żelaza, metabolizm kwasów tłuszczowych i fosfolipidów, generowania RFT dla sygnalizacji komórkowej. Mitochondria w warunkach zwiększonego stresu oksydacyjnego biorą również udział w aktywacji apoptozy poprzez zmiany przepuszczalności błon uwalniając czynnik indukujący apoptozę (*ang. Apoptotic*

---

*Inducing Factor, AIF*) cytochromu C. Mitochondria biorą także udział w aktywacji mitofagii, modyfikacji potencjału redukcyjno-oksydacyjnego komórek (van Giau i wsp., 2108; Jadiya i wsp., 2019; Wang i Youle, 2009; Wang J i wsp., 2005). Mitochondria komunikują się z jądrem poprzez proces zwany sygnalizacją wsteczną (Liu Z i wsp., 2006), który dostarcza informacji o stanie mitochondriów do jądra komórki.

Innym krytycznym czynnikiem patologii chA, który związany jest również ze stresem oksydacyjnym i towarzyszy procesom neurodegeneracyjnym w chA jest stan zapalny. Reakcje zapalne, aktywacja mikrogleju i astrocytów w OUN odgrywają ważną rolę w rozwoju chA (Czapski i Strosznajder, 2021; Bagyinszky i wsp., 2017; Latta i wsp., 2015, Clayton i wsp., 2017). Komórki mikrogleju są makrofagami specyficznymi dla mózgu w OUN i stanowią 10–15% wszystkich komórek mózgowych (Santos i wsp., 2016). Komórki mikrogleju wykazują większą aktywność u pacjentów z chA niż w grupie kontrolnej (Fan i wsp., 2017). Dodatkowo obrazowanie *in vivo* pokazuje, że aktywacja mikrogleju poprzedza wystąpienie chA (Hamelin i wsp., 2016). W przeciwieństwie do tego, aktywacja mikrogleju korelowała z hipometabolizmem glukozy u pacjentów z chA (Fan i wsp., 2015), co sugeruje związek między aktywacją mikrogleju, a dysfunkcją synaptyczną. Stężenie zagregowanych komórek mikrogleju w pobliżu blaszek starczych i neuronów z NFT u pacjentów z chA jest zwykle 2–5 razy wyższe niż u osób zdrowych. Czynniki zapalne, które są indukowane przez mikroglej i kompleksy zgodności tkankowej również powodują stan zapalny (McGeer i wsp., 2010). Ponadto badania *in vitro* powiązały zaburzenia A $\beta$  w chA z zapaleniem układu nerwowego. Wykazano, że A $\beta$  wywiera synergistyczny wpływ na indukowaną przez cytokiny aktywację mikrogleju (Meda i wsp., 1995). Również badania *in vivo* dotyczące toksyczności A $\beta$ , potwierdziły, że A $\beta$  indukują aktywację mikrogleju (El Khoury i wsp., 1996; Weldon i wsp., 1998). A $\beta$  indukuje również stres oksydacyjny w astrocytach poprzez aktywację oksydazy NADPH (NOX), tym samym wytwarzając przewlekłe zapalenie układu nerwowego, wydzielając cytokiny prozapalne i dalej zaostrażając uszkodzenia wywołane stresem oksydacyjnym (Mostafa i wsp., 2016; Wang S i wsp., 2016).

Jednocześnie A $\beta$  może indukować zwiększoną fragmentację lub nieprawidłową fuzję mitochondriów, utratę potencjału błonowego i upośledzoną funkcję oddechową

---

astrocytów (Sarkar i wsp., 2014). Ponadto, liczne badania pokazują, że w warunkach zwiększonego stresu oksydacyjnego po ekspozycji na neurotoksyczny glutaminian, mitochondrialne białko fuzyjne OPA1, normalnie obecne w błonie wewnętrznej mitochondriów, jest odprowadzane do cytozolu z jednoczesnym uwalnianiem cytochromu C. Zdarzeniom tym towarzyszy fragmentacja mitochondriów i apoptoza komórek HT22 (Sanderson i wsp., 2015a). Podobne przypadki uwalniania mitochondrialnego OPA1 i cytochromu C, a następnie apoptozy zaobserwowano w pierwotnych szczerzych komórkach nerwowych w symulowanym modelu niedokrwienno-reperfuzyjnego uszkodzenia niedotlenieniowego (Sanderson i wsp., 2015b). Wyniki te, z co najmniej dwóch różnych modeli uszkodzenia neuronów sugerują, że zwiększony stres oksydacyjny jest zaangażowany w regulację procesu fuzji i rozszczepiania mitochondriów oraz śmierci komórek, chociaż szczegółowy mechanizm, za pomocą którego zwiększony stres oksydacyjny stymuluje uwalnianie OPA1 z mitochondriów, wymaga dalszych badań.

Podsumowując: zaburzenia mitochondrialne mogą być wywołane zwiększonym stresem oksydacyjnym i stanem zapalnym, co przyczynia się do akumulacji A $\beta$  i prowadzi do uszkodzenia struktury i funkcji neuronów i synaps oraz astrocytów w tkankach mózgu, co odgrywa istotną rolę w patogenezie chA.

Stres oksydacyjny jest również ważnym parametrem dobrze opisanym parametrem, który narasta wraz z wiekiem. Główną cechą charakterystyczną jest obniżony system obrony antyoksydacyjnej i upośledzonej aktywności mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej (Grimm i Eckert, 2017). Potwierdza to zespół badawczy kierowany przez prof. Koji Fukui z japońskiego Shibaura Institute of Technology, który wykazał że progresja chA jest związana z oksydacyjnym uszkodzeniem mózgu, które upośledza funkcje poznawcze u transgenicznych myszy z chA w sposób zależny od wieku (Yoshida i wsp., 2022). Objawia się to zwiększoną oksydacją DNA, a generalnie wraz z wiekiem oksydacja mtDNA kumuluje się szybciej niż oksydacja nDNA (Mecocci i wsp., 1994). Co więcej, zwiększone poziomy oligomerów A $\beta$ , wytwarzanego w wyniku zwiększonego stresu oksydacyjnego oraz nitrozacyjnego powodującego aktywację syntazy tlenku azotu oraz NOX, a także

---

hamowanie ETC prowadzi do nadmiernej aktywacji polimerazy poli-ADP-rybozy i inicjuje zmianę przepuszczalności mitochondriów, przyczyniając się do aktywacji szlaków śmierci komórek (Strosznajder i wsp., 2012; Abeti i wsp., 2012). Nadmierną aktywację PARP w chA potwierdzono w różnych badaniach z wykorzystaniem modeli szczurzych i mysich, a także linii komórkowych pochodzących od człowieka (Strosznajder i wsp., 2000; Turunc Bayrakdar i wsp., 2014). Ponadto, bezpośrednie podanie peptydu A $\beta$ <sub>1-42</sub> do hipokampa szczura zwiększyło stres oksydacyjny, wywołało aktywację PARP-1 i ostatecznie doprowadziło do apoptozy komórek w hipokampie i korze szczura. Z kolei wcześniejsze badania wykazały, że PARP-1 chroni neurony przed śmiercią komórkową pod wpływem łagodnego stresu oksydacyjnego, w wyniku udziału w mechanizmie naprawy DNA (Ke i wsp., 2019). W przypadku znaczącego uszkodzenia DNA, PARP-1 jest nadmiernie aktywowany, co może prowadzić do wyczerpania NAD<sup>+</sup> i ATP i ostatecznie do śmierci komórek (Ponce i wsp., 2014; Hurtado-Bagès i wsp., 2020).

Śmierć komórkowa, w której pośredniczy PARP-1 jest związana z mitochondriami, w tym apoptozą zależną od PAR i czynnika indukującego apoptozę (AIF) (Lapucci i wsp., 2011). W świetle coraz większej liczby dowodów potwierdzających udział PARylacji w prawidłowych funkcjach neuronalnych, a także w neurodegeneracji (Narne i wsp., 2017) PARP-1 może stanowić interesujący cel dla nowych terapii chA.

## **Zaburzenia dynamiki mitochondriów w chorobie Alzheimera**

Jak wspomniano w poprzednim rozdziale różne kształty mitochondriów wynikają ze zdolności mitochondriów do dzielenia się, łączenia ze sobą i poruszania się w cytoplazmie (Chen i Chan, 2009). Procesy te nazywane są łącznie dynamiką mitochondrialną i obejmują w dużej mierze dwa unikalne, ściśle kontrolowane procesy, tj. rozszczepienie (podział) i fuzję (Ryc. 6) (Youle i van Der Bliek, 2012; Oliver

---

i Reddy, 2019). Oba te procesy mają kluczowe znaczenie w biologii mitochondriów i kontroli ich jakości (de Castro i wsp., 2010; Youle i van Der Blik, 2012; Fu i wsp., 2019).

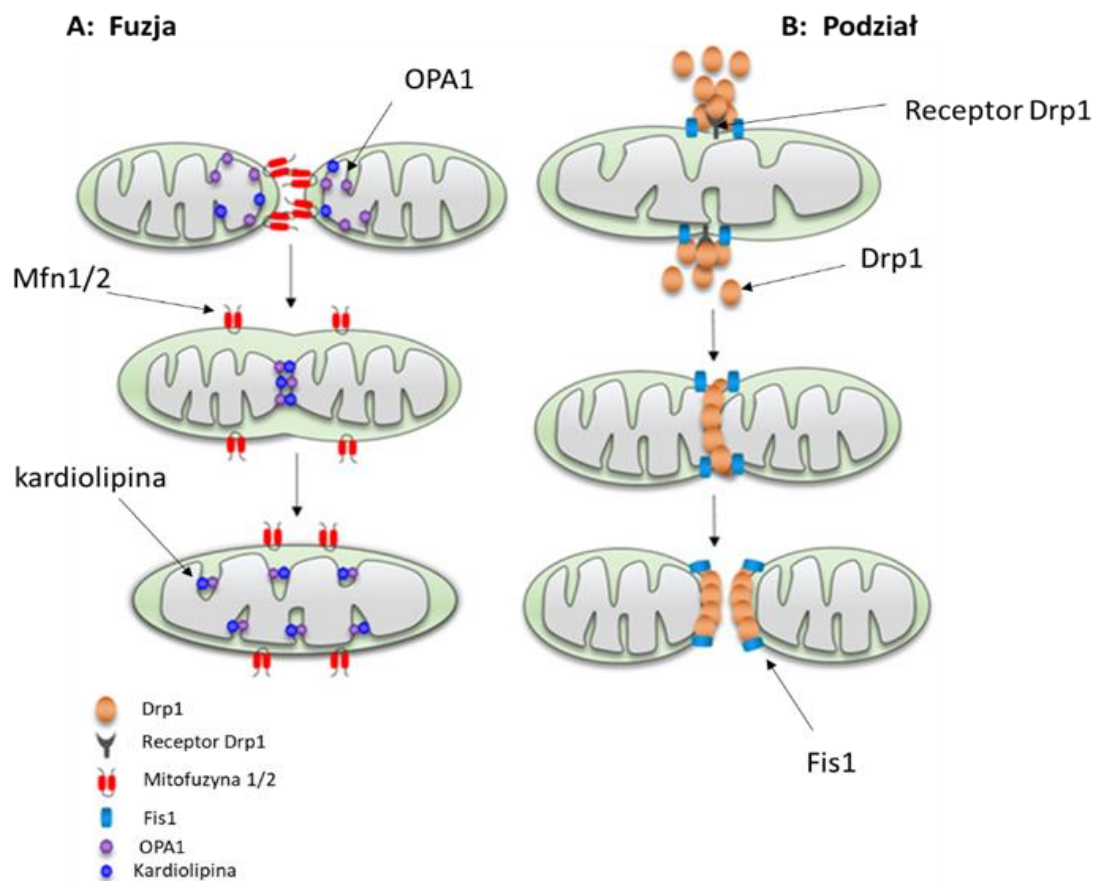
Rozszczepienie mitochondriów jest procesem, w którym z mitochondriów macierzystych powstają dwa mitochondria potomne. Proces ten rozpoczyna się od zwężenia IMM i jest koordynowane przez dwie klasy białek regulatorowych. Obejmują one białka cytozolowe, które przemieszczają się do mitochondriów aby zainicjować rozszczepienie, oraz mitochondrialne białka błonowe, które wbudowują czynniki cytozolowe. Rozszczepienie mitochondriów obejmuje głównie działanie związanego z GTPazą białka zwanego dynaminą 1 (Drp1), które jest białkiem wysoko konserwowanym występującym od drożdży po ssaki (Bleazard i wsp., 1999; Smirnova i wsp., 2001). Drp1 jest transportowany do zewnętrznej błony mitochondrialnej przez różne receptory białkowe, w tym czynnik rozszczepienia mitochondriów (Mff), białko rozszczepienia mitochondriów 1 (Fis1) i mitochondrialne białko rozszczepienia 49/51 (MiD 49/51) (Loson i wsp., 2013). Zgodnie z ich rolą w rozszczepieniu mitochondriów, utrata MFF, MiD49 i MiD50 prowadzi do hiperfuzji mitochondrialnej i zaburzeń rekrutacji Drp1 do mitochondriów (Otera i wsp., 2016; Osellame i wsp., 2016). Drp1 jest ważny dla podziału, rozmiaru, kształtu i dystrybucji mitochondriów. Występuje w ciele komórki, w cytoplazmie, aksonach, dendrytach i zakończeniach nerwowych. Ponadto białko Drp1 ma kluczowe znaczenie dla zachowania równowagi dynamiki mitochondriów, zarządzania rozszczepieniem, mitofagią, a nawet ruchliwością. Działa jednak głównie jako czynnik rozszczepienia mitochondriów, wyzwalając fragmentację mitochondriów (Wenger i wsp., 2013).

Proces rozszczepienia mitochondriów może promować dwa zdarzenia, mitofagię lub biogenezę. Jeśli rozszczepienie jest obwodowe, wyzwalana jest mitofagia, natomiast jeśli miejsce rozszczepienia znajduje się w centrum mitochondrium, preferowana jest biogeneza. W obu przypadkach zaangażowana maszyna wymaga Drp1, jednak w przypadku rozszczepienia obwodowego następuje wzrost białka Fis1, podczas gdy w rozszczepieniu centralnym gromadzi się Mff (Kleele i wsp., 2021).

---

W przypadku fuzji mitochondriów u ssaków w grę wchodzi działanie mitofuzyny-1 (Mfn1) i mitofuzyny-2 (Mfn2), które wiążą zewnętrzne błony mitochondriów przez hydrolizę guanozyno-5'-trifosforanu (GTP), podczas gdy białko OPA1 (białko 1 zaniku nerwu wzrokowego) i kardiolipina (CL) ułatwia fuzję błony wewnętrznej (Ban i wsp., 2018). Fuzja mitochondrialna jest podstawowym procesem replikacji mtDNA w celu utrzymania odpowiedniej liczby kopii mtDNA, poprzez wymianę zawartości macierzy mitochondrialnych (Silva Ramos i wsp., 2019). Utrzymanie potencjału błonowego IMM jest niezbędne do fuzji mitochondrialnej (Ishihara i wsp., 2006). Białko OPA1 oprócz swojej funkcji w fuzji błon, ma również zasadnicze znaczenie dla zachowania prawidłowej struktury IMM (Frezza i wsp., 2006). W procesie składania genu kodującego *OPA1* może dojść do syntezy zarówno długiej (L-OPA1), jak i krótkiej (S-OPA1) izoformy OPA1 (Song i wsp., 2007).

Z kolei Mfn2 nie tylko zaangażowana jest w proces łączenia błon mitochondrialnych, ale także spełnia dodatkowe funkcje komórkowe, takie jak tworzenie i stabilizacja miejsca kontaktu mitochondrium-siateczka śródplazmatyczna (ER), interakcja mitochondrion-lipid, proliferacja komórek, sygnalizacja metaboliczna i mitofagia (Chen i wsp., 2014; Zorzano i wsp., 2015; Naon i wsp., 2016; Boutant i wsp., 2017; McLelland i wsp., 2018). Podobnie jak rozszczepienie, fuzja mitochondrialna umożliwia zmiany morfologiczne mitochondriów w celu spełnienia określonych wymagań komórkowych. Komórki aktywne metabolicznie często tworzą sieci mitochondrialne (Rafelski, 2013). Połączone sieci mitochondrialne umożliwiają wydajną wymianę metabolitów, przenoszenie potencjału błony z mitochondriów w jednej części komórki do drugiej, zwiększoną produkcję ATP i zmniejszoną produkcję RFT. Ponadto fuzja zmniejsza transfer  $Ca^{2+}$  z ER do mitochondrialne  $Ca^{2+}$ , aby zapobiec śmierci komórek indukowanej przez  $Ca^{2+}$  (Buck i wsp., 2016; Jung, 2018; Zhao i wsp., 2017). Zarówno fuzja, jak i rozszczepienie mitochondriów umożliwiają mitochondriom przystosowanie się do ostrych zmian w dostępności składników odżywczych, co jest ważne dla elastyczności metabolicznej. Wiadomo, że fuzja szczególnie zwiększa mitochondrialną produkcję ATP (Yao i wsp., 2019).



### Rycina 6. Schematyczne przedstawienie dynamiki mitochondriów.

**A)** Fuzja czyli łączenie się mitochondriów jest regulowana przez specyficzne białka Mfn1/2 i Opa1, które pośredniczą w fuzji odpowiednio zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej. Mfn1/2 są zakotwiczone w zewnętrznej błonie mitochondriów i oddziałują ze sobą tworząc trzon, który wbudowuje się między lipidową warstwę błony i ostatecznie przywraca jej ciągłość. Po pomyślnym związaniu i fuzji OMM następuje fuzja IMM, w której pośredniczy białko OPA1, co prowadzi do fuzji dwóch oddzielnych mitochondriów **B)** Podczas rozszczepienia Drp1 jest rekrutowany z cytozolu do zewnętrznej błony mitochondriów i oddziałuje z jego białkami receptorowymi i Fis1, tworząc kompleks rozszczepienia w błonie zewnętrznej. Drp1 jest następnie oligomeryzowane we włókna, które owijają się wokół mitochondriów, prowadząc do zwężenia mitochondriów i sekwencyjnego oddzielania błony wewnętrznej i zewnętrznej. Zmodyfikowano wg He i wsp. (2020)

W chA dysfunkcja mitochondrialna związana jest z zakłóceniem procesów rozszczepienia i fuzji, która potwierdzona jest także w różnych innych schorzeniach neurodegeneracyjnych, w tym w chorobie Parkinsona (chP) i chorobie Huntingtona (chH) (Carvalho i wsp., 2015; Bertholet i wsp., 2016; Stanga i wsp., 2020). Zaburzenie



---

dynamiki mitochondriów może być wewnętrznym czynnikiem etiologicznym, który zapoczątkowuje lub zaostrza przebieg procesów patologicznych w chA. Równowaga między rozszczepieniem a fuzją jest ważna nie tylko dla morfologii mitochondriów, ale także dla żywotności komórki i aktywności synaptycznej. Zakłócenia w rozszczepieniu /fuzji mitochondriów i ich ruchliwości mogą prowadzić do istotnych zmian w neuronach. Liczne badania wskazują, że fuzja mitochondriów chroni neurony, prowadząc do wymiany mitochondrialnego DNA, reorganizacji sieci mitochondrialnych i ochrony komórek przed apoptozą, podczas gdy rozszczepienie mitochondriów wydaje się być oznaką ich fragmentacji i apoptozy. Należy jednak zauważyć, że proces rozszczepienia /fuzji jest ściśle powiązany z ruchliwością i rozmieszczeniem mitochondriów (Chen i Chan, 2009).

Nieprawidłowości w rozszczepieniu i fuzji mitochondriów, a w konsekwencji zmiany w morfologii mitochondriów, wpływają na mobilność i dystrybucję tych organelli (Chen i Chan, 2009). Dodatkowo, rozszczepienie i fuzja modulują kształt mitochondriów, topologię błony i dystrybucję białek wewnątrzmitochondrialnych, co dodatkowo wpływa na przepuszczalność błony mitochondrialnej OMM i uwalnianie białek proapoptotycznych (Weaver i wsp., 2014; Renault i wsp., 2015).

Dysfunkcja mitochondriów, którą można przypisać zaburzeniu aktywności Drp1, charakteryzuje patologię chA, zespołu Downa (DS), stwardnienia rozsianego (MS), stwardnienie zanikowe boczne (ALS), chP i chH, rdzeniowy zanik mięśni (SMA), zanik rdzeniowo-mózdkowy 1 (SCA1) i inne (Wang i wsp., 2008a, 2009b; Manczak i wsp., 2011; Reddy i wsp., 2011; Hu i wsp., 2017).

Rozszczepienie mitochondriów i jego szkodliwe skutki są wyraźnie zilustrowane w modelach komórkowych i zwierzęcych z chA, a także w neuronach piramidalnych w mózgach pacjentów z chA (Trushina i wsp., 2012; Gan i wsp., 2014; Reddy i wsp., 2018; Wang i wsp., 2008b; Wang i wsp., 2020; Jiang i wsp., 2019; Wang X i wsp., 2009a). W modelach komórkowych chA, nadekspresja białka APP lub A $\beta$  powoduje głęboką fragmentację i zmienioną dystrybucję mitochondriów, oraz zaburzenia ultrastrukturalne co prawdopodobnie wyzwała indukowane przez A $\beta$  zaburzenia synaptyczne w kulturach neuronalnych (Trushina i wsp., 2012; Gan i wsp., 2014; Reddy i wsp., 2018; Wang i wsp.,

---

2008; Wang X i wsp., 2009a, 2009b; Manczak i wsp., 2011). Fragmentację mitochondriów potwierdzono również w hodowlach komórek neuronalnych uzyskanych z transgenicznego (Tg2576) mysiego modelu chA, w którym gen i białko Fis1 uległy istotnej zwiększonej ekspresji, natomiast ekspresja genu i poziom białka Mfn1 były obniżone (Calkins i wsp., 2011).

Podobnie badania wykazały, że wzrost A $\beta$  może zwiększać poziom uwalnianego tlenku azotu (NO) w mózgu i aktywować nieprawidłową ekspresję neuronalnego Drp1, co skutkuje zwiększonym rozszczepieniem mitochondriów i uszkodzeniem neuronów (Archer, 2013). Najważniejszym genetycznym czynnikiem ryzyka około 90% SAD jest ApoE4. W SAD ApoE4 może obniżać poziom ekspresji białek związanych z dynamiką mitochondriów i ETC (Yin i wsp., 2020). W hipokampie u myszy transgenicznych ApoE4 ekspresja Mfn1, Mfn2 i Drp1 jest zmniejszona (Simonovitch i wsp., 2019). Podobnie, defekty dynamiki mitochondriów zostały zaobserwowane w różnych mysich modelach chA z nadekspresją białka Tau (Schulz i wsp., 2012). Badania demonstrowają, że nie tylko peptydy A $\beta$ , ale również ufosforylowane białko tau powoduje zmiany dynamiki i funkcji mitochondriów (David i wsp., 2005; Li i wsp., 2016; Kandimalla i wsp., 2018). W tkankach mózgu różnych mysich modeli z chA z transfekcją APP, APP/PS1 i 3xTg, wiązanie Drp1 z nadmiernie ufosforylowanym białkiem Tau jest wzmocnione, tym samym pogarszając dysfunkcję mitochondriów i uszkodzenia synaptyczne (Manczak i Reddy, 2012).

Zmniejszone poziomy białek fuzyjnych, wraz ze zwiększonym poziomem białek powodujących rozszczepienie mitochondriów, stwierdzono w mózgach pacjentów z chA i modelach z chA, co sugeruje, że prawdopodobnie wiąże się to z zaburzeniem fuzji lub wzmocnionym rozszczepieniem (Wang X i wsp., 2009; Manczak i wsp., 2011). Zjawiska te obserwowano w zaawansowanych stanach chA, natomiast bardzo mało wiadomo na temat dynamiki mitochondrialnej we wczesnych etapach w procesie rozwoju chA w różnych częściach mózgu. Dogłębne poznanie tych procesów mogłoby umożliwić modulowanie ekspresji i aktywności białek fuzji /rozszczepienia a to mogłoby mieć wpływ na funkcje mitochondriów krytyczną dla zdrowia i żywotności komórek, na takie

---

procesy jak OXPHOS i przepuszczalność błony, w tym także na apoptotyczną śmierć komórki.

Zwiększona produkcja mitochondrialnych RFT, upośledzona funkcja mitochondriów i apoptoza są związane z nadmiernym rozszczepieniem mitochondriów i nieprawidłowościami strukturalnymi mitochondriów (Peña-Blanco *wsp.*, 2021). Biorąc pod uwagę krytyczną rolę dynamiki mitochondriów, wszelkie defekty mechanizmu rozszczepienia mogą mieć druzgocący wpływ na homeostazę redoks, wytwarzanie energii i funkcje mitochondriów.

W przypadku poważnych uszkodzeń w wyniku nadmiernego rozszczepienia mitochondriów, są one segregowane i dostarczane do lizosomów w celu strawienia na drodze mitofagii, która umożliwia komórkom kontrolę jakości i funkcji mitochondriów (Jetto *i wsp.*, 2022). Należy też podkreślić, że proces mitofagii jest zwiększony w mózgu jak i w komórkach obwodowych u pacjentów z chA na początkowym etapie choroby, co umożliwia prawidłowy przebieg biogenezy we wczesnych stadiach chA (Jetto *i wsp.*, 2022). Natomiast procesy te w miarę progresji choroby ulegają istotnym zaburzeniom.

## **Biogeneza mitochondrialna w chorobie Alzheimerera**

Biogeneza mitochondriów to proces, w którym mitochondria zwiększają się pod względem liczby i rozmiaru, który wymaga skoordynowanej syntezy białek kodowanych przez nDNA lub mtDNA. Stała odnowa mitochondriów ma kluczowe znaczenie dla utrzymania liczby zdrowych mitochondriów (Li *i wsp.*, 2017). Jednym z ważnych czynników biogenezy mitochondrialnej jest koaktywator gamma 1 aktywowanego proliferatora peroksysomów (PGC-1), koaktywator transkrypcji, który kontroluje określone czynniki transkrypcji, sekwencyjnie, koordynując ekspresję kluczowych genów mitochondrialnych kodowanych w jądrze komórkowym. PGC-1 $\alpha$

---

koaktywuje transkrypcję jądrowego czynnika oddechowego 1 (NRF1), który może regulować transkrypcję mitochondrialnego regulatora transkrypcji A (TFAM) (Palikaras i Tavernarakis, 2014). Ponadto PGC-1 $\alpha$  i receptor alfa związany z estrogenem (ERR $\alpha$ ) razem stymulują funkcję Mfn2 w celu ułatwienia procesu fuzji (Soriano i wsp., 2006). Dodatkowo aktywność PGC-1 $\alpha$  reaguje na wiele bodźców, w tym między innymi dostępność składników odżywczych, Ca<sup>2+</sup>, RFT, insulinę, hormon estrogenowy, niedotlenienie, zapotrzebowanie na ATP i cytokiny (Huang i wsp., 2020). W różnych tkankach aktywność PGC-1 $\alpha$  jest regulowana przez acetylację poprzez kluczowy mechanizm, który działa jako czujnik stanu energetycznego w komórkach. Sirtuina 1 (SIRT1) jest deacetylazą histonową zlokalizowaną w jądrze komórkowym, która odpowiada na zmianę stosunku NAD<sup>+</sup>/NADH (Tang, 2016). W sytuacjach niskiego stanu energetycznego wzrost NAD<sup>+</sup> /NADH wywołuje aktywację SIRT1 i aktywuje PGC-1 $\alpha$  poprzez jego deacetylację (Rodgers i wsp., 2005). Ekspresja PGC-1 $\alpha$  jest znacznie zwiększona w tkankach o wysokim zapotrzebowaniu na energię; np. mózg, mięsień sercowy oraz mięśnie szkieletowe (Martínez-Redondo i wsp., 2015). Po aktywacji, PGC-1 $\alpha$  indukuje czynniki transkrypcyjne, które kontrolują biogenezę mitochondrialną i fosforylację oksydacyjną (Yoon i wsp., 2001). Oprócz PGC-1 $\alpha$ , inni członkowie rodziny koaktywatorów PGC-1, np. PGC-1 $\beta$  są również zaangażowani w modulowanie funkcji mitochondriów (Scarpulla, 2008; Lu i wsp., 2020).

Jedną z ważniejszych funkcji jaką pełni PGC1- $\alpha$  jest również regulacja mechanizmów obrony antyoksydacyjnej w komórkach. PGC-1- $\alpha$  zwiększa m. in. poziom manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD/SOD2) oraz innych ważnych enzymów antyoksydacyjnych, a tym samym chroni komórki przed dysfunkcją mitochondriów, zapobiegając uszkodzeniom oksydacyjnym (Rius-Pérez i wsp., 2020). W związku z tym brak PGC-1 $\alpha$  jest związany z większą podatnością na uszkodzenia oksydacyjne u myszy (Lin i wsp., 2004).

Ekspresja PGC-1 $\alpha$  jest ujemnie skorelowana z poziomem odkładania się A $\beta$  i wskazuje, że A $\beta$  może hamować biogenezę mitochondriów, co potwierdziły badania *in vitro* na neuronach hipokampa myszy z chA (Tg2576) (Porcellotti i wsp., 2015). Dodatkowo wykazano, że poziom PGC-1 $\alpha$  wyraźnie spada w korelacji ze zmniejszoną

---

funkcjonalnością mitochondriów i amyloidogennym przetwarzaniem białka APP u myszy Tg2576 AD i APP/PS1 (Qin i wsp., 2009; Dong i wsp., 2020). Coraz więcej dowodów postuluje, że upośledzenie szlaku zależnego od PGC-1 $\alpha$  może być związane z wczesną utratą wzmocnienia synaptycznego w obszarach mózgu pacjentów z chA, takich jak hipokamp i kora mózgowa (Cheng i wsp., 2012 ; Bartley i wsp., 2015; Dong i wsp., 2020; Singulani i wsp., 2020). Badania na myszach z niedoborem PGC-1 $\alpha$  wykazywały zmienioną dynamikę mitochondriów, w tym fragmentację mitochondriów i nieprawidłowe wydłużenie, a także defekty w mitochondrialnych białkach fuzyjnych/rozszczepieniowych, takich jak Mfn1 i Drp1 (Uittenbogaard i Chiaramello, 2014; Dabrowska i wsp., 2015; Zhang i wsp., 2020). Obniżone poziomy PGC-1 $\alpha$  i Mfn2 odnotowano w chA (Qin i wsp., 2009; Wang i wsp., 2009a) oraz w komórkach M17 z nadekspresją APP z mutacją szwedzką powodującą zwiększoną aktywność  $\beta$  sekretazy w chA (APP<sup>swe</sup>) (Haass i wsp., 1995; Sheng i wsp., 2012). Zahamowanie Mfn2 powoduje zmniejszenie zużycia tlenu, utleniania glukozy i obniżenie potencjału błony mitochondrialnej ( $\Delta\Psi_m$ ) oraz wzrost ekspresji białek biorących udział w fosforylacji oksydacyjnej (Chen i wsp., 2005). Ponadto w kilku modelach neuronalnej oksyczości A $\beta$  i u pacjentów z umiarkowanym i ciężkim otępieniem, zaobserwowano, że obniżenie poziomu PGC-1 $\alpha$ , co może mieć kluczowe znaczenie w patogenezie chA (Qin i wsp., 2009; Pedrós i wsp., 2014; Bartley i wsp., 2015; Dong i wsp., 2020; Terada i wsp., 2020).

Mając na uwadze omówione dotychczasowe badania patomechanizmu chA, nadal pozostają nie w pełni wyjaśnione mechanizmy molekularne działania oligomerów peptydów A $\beta$ O w chA.

---

## CELE PRACY

Celem pracy było: **zbadanie ekspresji genów kodujących białka antyoksydacyjne, białka transportu elektronów, białka regulujące fuzję/podział i biogenezę mitochondriów oraz ocena poziomu wybranych białek mitochondrialnych w doświadczalnych modelach choroby Alzheimera.**

Cel został zrealizowany poprzez wykonanie następujących zadań szczegółowych, które obejmowały:

- Wpływ oligomerów peptydu  $A\beta_{1-42}$  na poziom wolnych rodników, aktywność PARP, ekspresję genów kodujących białka antyoksydacyjne i białka regulujące dynamikę oraz funkcję mitochondriów w komórkach PC12,
- Zbadanie wpływu  $A\beta_{1-42}$  i inhibitora PARP-1 na ekspresję genów białek łańcucha transportu elektronów i białek odpowiedzialnych za fuzję /podział i biogenezę mitochondriów w komórkach PC12,
- Zbadanie działania oligomerów  $A\beta_{1-42}$  na żywotność komórek, poziom wolnych rodników oraz transkrypcje genów kodujących białka mitochondrialne w komórkach neuronalnych (SH-SY5Y) i glejowych (BV2),
- Zbadanie aktywności cytochromu C oksydazy, enzymu IV kompleksu łańcucha transportu elektronów (ETC) w komórkach neuronalnych (SH-SY5Y) i glejowych (BV2) poddanych działaniu  $A\beta_{1-42}$  oraz w mysim modelu choroby Alzheimera
- Badanie ekspresji genów na poziomie mRNA i białek antyoksydacyjnych, regulujących funkcję oraz dynamikę i biogenezę mitochondriów w korze mózgu w mysim modelu choroby Alzheimera.
- Ocenę immunoreaktywności wybranych białek w mysim modelu choroby Alzheimera

---

## MATERIAŁY I METODY

### Komórkowe modele badawcze

#### Linia szczurzych komórek pheochromocytona – PC12

Badania *in vitro* w niniejszej pracy prowadzono na komórkach szczurzego guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy (łac. Pheochromocytona, PC12). Hodowle pozyskano z Zakładu Farmakologii Biocentrum Uniwersytetu we Frankfurcie nad Menem w Niemczech. Linia ta jest rutynowo używana w badaniach nad molekularnymi zmianami mechanizmów doprowadzających do neurodegeneracji. Wynika to z ich neuroektodermalnego pochodzenia, jak również zdolności do fenotypowego różnicowania się w kierunku komórek nerwowych. Komórki PC12 posiadają cechy komórek dopaminergicznych; wykazują ekspresję transporter dopaminy (DAT) oraz hydroksylazy tyrozynowej (TH), jak również syntetyzują i uwalniają dopaminę.

#### Ludzka linia komórkowa SH-SY5Y

Komórkowy model doświadczalny stanowiła również ludzka linia komórkowa neuroblastoma SH-SY5Y - nerwiak płodowy współczulny, wywodzący się z komórek cewy nerwowej. Komórki SH-SY5Y stanowią jednorodną linię komórkową o fenotypie neuronalnym (Xie i wsp., 2010). Linia ta jest trzykrotnym klonem linii komórkowej neuroblastoma SK-N-SH, która została wyizolowana w 1970 roku z materiału biopsyjnego pochodzącego ze szpiku kostnego 4-letniego pacjenta z nerwiakiem płodowym (Biedler i wsp., 1973). We wczesnych latach osiemdziesiątych zyskała ona szerokie zastosowanie ze względu na wiele funkcjonalnych i biochemicznych właściwości neuronów. Komórki SH-SY5Y są szeroko stosowane w doświadczeniach *in vitro* nad molekularnymi mechanizmami prowadzącymi do przeżycia lub śmierci komórek nerwowych, ze szczególnym uwzględnieniem zmian molekularnych obserwowanych w chP, ale również w chA. Linia SH-SY5Y wykazuje szereg cech

---

znamiennych dla neuronów dopaminergicznych (Oyarce i Fleming, 1991). Ponadto komórki te wykazują ekspresję receptorów opioidowych i muskarynowych oraz receptorów dla neuronalnych czynników wzrostu (Ciccarone i wsp., 1989). W obecności niektórych związków farmakologicznych linia komórkowa SH-SY5Y przybiera bardziej wyrazisty fenotyp neuronów dopaminergicznych, lub ulega zróżnicowaniu do pierwotnych neuronów śródmózgowia. Komórki SH-SY5Y, w zależności od zastosowanych związków, mogą być też różnicowane w kierunku neuronów o fenotypie adrenergicznym lub cholinergicznym. Traktowanie komórek SH-SY5Y estrami forbolu inicjuje ich różnicowanie w kierunku fenotypu adrenergicznego, natomiast inkubacja z kwasem retinowym (RA) w kierunku fenotypu cholinergicznego (Påhlman i wsp., 1984; Adem i wsp., 1987). Niektóre związki, takie jak RA, nadają komórkom SH-SY5Y tolerancję na związki toksyczne m.in. przez aktywację pro-życiowej kinazy białkowej B (Akt), wzrost ekspresji anti-apoptycznego białka Bcl-2 i jednoczesne obniżenie ekspresji pro-apoptycznego białka p53 (Cheung i wsp. 2009).

### **Unieśmiertelnione mysie komórki mikrogleju –BV2**

Mysie komórki mikrogleju BV2 otrzymane w darze od prof. R. Donato (Departament Medycyny Doświadczalnej i Nauk Biochemicznych, Uniwersytet Perugia). Komórki mikrogleju unieśmiertelniono po zakażeniu rekombinowanym retrowirusem v-raf/v-myc. Unieśmiertelniona linia komórek BV2 wykazuje takie same właściwości jak makrofagi w odniesieniu do profilu antygenowego, ich zdolności fagocytarnej i aktywności przeciwdrobnoustrojowej. (Bocchini i wsp., 1992). Podobnie jak inne komórki mikroglejowe, komórki BV2 mogą być aktywowane do uwalniania prozapalnych cytokin przez stres oksydacyjny lub czynniki zapalne, dlatego linia komórkowa BV2 jest szeroko stosowana jako alternatywny układ modelowy dla pierwotnego mikrogleju w badaniach *in vitro* aktywowanych komórek mikrogleju.

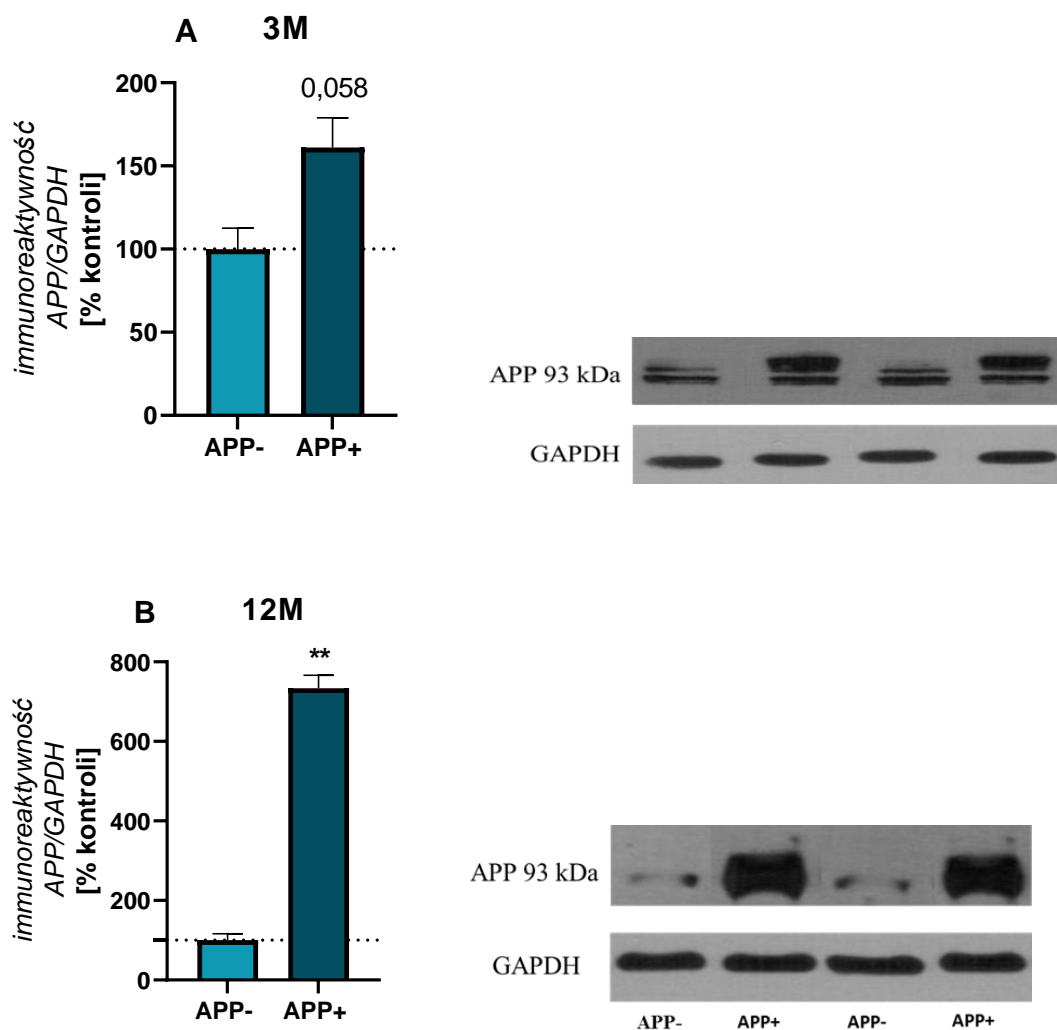


---

### Zwierzęcy model badawczy

Do badań *in vivo* na zwierzętach użyto samice myszy szczepu FVB-Tg (APP LD2/B6). Myszy te charakteryzują się zaburzeniami procesu proteolizy APP oraz zwiększonym stężeniem i akumulacją A $\beta$  w mózgu oraz stopniowo postępującymi zaburzeniami behawioralnymi widocznymi od 8 tygodnia życia jak opisano ostatnio (Jęsko i wsp., 2019; Jęsko i wsp., 2020) oraz wcześniej (Moechars i wsp., 1999; Van Dorpe i wsp., 2000). U badanych myszy występuje tzw. mutacja londyńska w genie APP w okolicach cięcia przez  $\gamma$ -sekretazę, gdzie aminokwas walina (Val) jest zastąpiony przez izoleucynę (Ile) w pozycji 717 (ValAPP<sup>Ile</sup>). Zwierzęta uzyskano z hodowli prowadzonej w zwierzętarni IMDiK PAN. Na przeprowadzenie doświadczeń uzyskano zgodę IV Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (uchwała nr. 67/2015) oraz zgodę Ministra Środowiska (nr. 139 z dnia 22.8.2016r.) na zamknięte użycie organizmów genetycznie zmodyfikowanych.

Myszy szczepu FVB z mutacją genu APP (FVB/APP<sup>+</sup>) pochodzące z 3 grup wiekowych (oznaczone na rycinach jako 3M, 6M, 12M - myszy 3-, 6- i 12-miesięczne). Kontrolę dla myszy APP<sup>+</sup> stanowiły myszy bez transgeny (APP<sup>-</sup>). Po przeprowadzonych doświadczeniach myszy uśmiercano, a korę mózgu myszy pobierano na lodzie do dalszych badań. Ten model myszy charakteryzuje się zwiększonym poziomem ekspresji APP i uwalnianiem A $\beta$ , co przedstawi wykres 1.



### Wykres 1. Analiza immunoreaktywności białka APP w korze mózgu myszy transgenicznyc

Immunoreaktywność białka APP w korze mózgu myszy transgenicznyc FVB 3 M (A) i 12 M (B), badano metodą western blot. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH. Wyniki stanowią średnią arytmetyczną z 3 niezależnych doświadczeń  $\pm$ SEM. Obok wykresów zamieszczono przykładowe wyniki western blot. Do oceny statystycznej zastosowano test t-Studenta,  $** < 0,01$  – różnica istotna statystycznie.

---

## Warunki hodowli i traktowanie komórek PC12 i SH-SY5Y oraz BV2

### Przygotowanie oligomerów peptydu A $\beta$ 1-42

Oligomery A $\beta$ O<sub>1-42</sub> przygotowano według metody opisanej przez (Stine i wsp., 2003). Peptyd A $\beta$ <sub>1-42</sub> (rPeptide) rozpuszczono w bezwodnym DMSO. Następnie, peptyd o stężeniu 5mM rozcieńczono w pożywce hodowlanej o temperaturze 4-8°C (Phenol Red-free Ham's F-12) do końcowego stężenia 100 $\mu$ M. Po 30 sek. worteksowania, A $\beta$ <sub>1-42</sub> inkubowano w temperaturze 4°C przez 24-godz. Siła jonowa i neutralne pH w 4 °C dają oligomery o małych rozmiarach.

### Hodowla komórek

Komórki PC12 hodowane były w standardowej pożywce DMEM (*ang. Dulbecco Modified Eagle Medium, Merck*) z dodatkiem inaktywowanych w 56 °C surowic: 10% płodowej surowicy cielęcej (FBS) oraz 5% surowicy końskiej (HS), 2 mM L-glutaminy, penicyliny (50 jednostek/ml) oraz streptomycyny (50  $\mu$ g/ml).

Nieróżnicowane komórki SH-SY5Y (Sigma-Aldrich) hodowane były w mieszaninie mediów Minimum Essential Medium Eagle/Nutrient Mixture F-12 Ham (MEM/F12 Ham, w proporcji 1:1, Sigma Aldrich) z dodatkiem 15% FBS, inaktywowanej w 56°C, 2 mM L-glutaminy, mieszaniny aminokwasów (Sigma Aldrich) oraz antybiotyków: penicyliny (50 jednostek/ml) oraz streptomycyny (50  $\mu$ g/ml).

Komórki BV2 hodowano w pożywce RPMI uzupełnionym inaktywowanym termicznie 5% FBS, 2 mM L-glutaminą, penicyliną (50 jednostek/ml), streptomycyną (50  $\mu$ g/ml) w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> w 37 °C.

---

**Traktowanie komórek**

Do momentu rozpoczęcia eksperymentu wszystkie komórki pasażowano co 3-4 dni. Przy pasażowaniu komórek stosowano 0,25% roztwór trypsyny z 0,02% EDTA (Merck). W 24 godz. po wysianiu komórek, medium hodowlane wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy (2% FBS, 2 mM glutamina, penicylina (50 jednostek/ml) oraz streptomycyna (50 µg/ml)) lub roztwór Hanks'a (*ang. Hanks' balanced salt solution - HBSS*) (CaCl<sub>2</sub> – 0,185 g/l, MgSO<sub>4</sub> – 0,09767 g/l, KCl – 0,4 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,06 g/l, NaHCO<sub>3</sub> – 0,35 g/l, NaCl – 8,0 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,04788 g/l, D-Glukoza – 1,0 g/l). Następnie komórki traktowano Aβ i inkubowano przez określony czas w 37 °C.

Hodowlę prowadzono w sterylnych jednorazowych plastikowych szalkach w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze nasyconej parą wodną i zawierającej 5% CO<sub>2</sub>. Bank komórek przechowywano w ciekłym azocie, w pożywce o składzie: FBS (50%), DMEM (40%) oraz DMSO (10%).

Morfologię komórek w trakcie hodowli, a następnie po podaniu badanych związków chemicznych, obserwowano w mikroskopie świetlnym Olympus CKX41.

Komórki do analizy poziomu mRNA wysiewano z gęstością: 1-1,5 x 10<sup>6</sup> na szalki o średnicy 10 cm lub 1 x 10<sup>6</sup> komórek na szalki o średnicy 6 cm. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę Neurobasal z dodatkiem suplementu B27 (Thermo Fisher Scientific Inc.) i dodawano badane oligomery (Aβ<sub>1-42</sub> 1µM) dla komórek SH-SY5Y i BV2 oraz (Aβ<sub>1-42</sub> 1µM oraz PJ-34 20µM) dla komórek PC12. Badany związek rozpuszczano w wodzie. Następnie komórki inkubowano ze związkiem i oligomerami przez 24 godz. Po 24 godz. komórki przepłukiwano dwukrotnie buforem PBS o temp. 4-8°C i następnie zawieszano w 1ml odczynnika TRI-reagent.

Do hamowania aktywności PARP-1 użyto wodnego roztworu PJ34 (≥98%, C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>·HCl·x H<sub>2</sub>O Chlorowodorek N-(6-okso-5,6-dihydrofenantrydyn-2-yl)-(N,N-dimetylamino) acetamidu, Sigma). Związek ten jest silnym, specyficznym inhibitorem polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP; Ki=20nM).

---

## Metody spektrofotometryczne

### Oznaczanie zawartości białka w ekstrakcie komórkowym

Zawartość białka w ekstraktach komórkowych oznaczano metodą Bradforda (Bradford, 1976).

### Analiza przeżywalności komórek za pomocą testu MTT

Przeżywalność traktowanych komórek badano w oparciu o zachodzącą w aktywnych metabolicznie komórkach reakcję przekształcenia soli tetrazoliowych (bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowego - MTT) o zabarwieniu żółtym do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu o zabarwieniu fioletowym. Otrzymane kryształy są rozpuszczalne w DMSO. Liczba żywych komórek w badanym materiale jest wprost proporcjonalna do intensywności zabarwienia otrzymanego roztworu, co pozwala na specyficzną analizę przeżywalności komórek (Berridge i wsp., 2005). Dehydrogenaza bursztynianowa NADH-zależna jest enzymem mitochondrialnym, aktywnym tylko w żywych metabolicznie komórkach, co pozwala na szybkie określenia wpływu badanego czynnika na żywotność badanych linii komórkowych.

Komórki PC12, SH-SY5Y, BV-2 wysiewano na szalki 96-dołkowe pokryte kolagenem. Następnego dnia medium hodowlane wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy (2% FBS) i dodawano odpowiednio badane związki. Po 24 i 96 godz. inkubacji dla kom PC12 i 24 godz. inkubacji dla komórek SH-SY5Y i BV2 do pożywki dodawano MTT (0,25 mg/ml) i inkubowano przez 2 godz. W temperaturze 37°C. Następnie usuwano pożywkę, a powstałe fioletowe kryształy formaonu rozpuszczano w DMSO. Absorbancję mierzono przy użyciu spektrofotometru FLUOstar Omega (BMG LABTECH) przy długości fali  $\lambda = 595$  nm. Intensywność fioletowej barwy jest proporcjonalna do ilości żywych i aktywnych metabolicznie komórek.

---

**Ocena aktywności enzymatycznej kompleksu IV mitochondrialnego łańcucha oddechowego komórkach SH-SY5Y i BV2 oraz w materiale zwierzęcym**

Aktywność oksydazy cytochromu C (COX) w lizacie komórkowym lub w homogenacie z kory mózgu była zmierzona według Spinazzi i wsp. (2012). Komórki (około  $5 \times 10^6$ ) zebrano, przepłukano trzykrotnie PBS, a osad komórkowy zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu analizy. Osad komórek i korę mózgu homogenizowano w 0,4 ml 20 mM buforu fosforanowego (pH 7,5). Następnie lizat komórkowy trzykrotnie zamrożono, a następnie rozmrożono. Redukcję Cytochrom C przeprowadzono przez inkubację w obecności 0,5 mM DTT przez 20 min. w temperaturze pokojowej w ciemności. Skuteczność redukcji cytochromu C sprawdzano obliczając stosunek absorbancji 550 nm/ 565 nm (stosunek  $> 6$  wskazuje skuteczną redukcję). Aby zmierzyć aktywność oksydazy cytochromu C, 40  $\mu\text{l}$  homogenatu inkubowano z 25  $\mu\text{M}$  zredukowanego cytochromu C w 25 mM buforze fosforanowym o pH 7,0 w temperaturze pokojowej. Spadek absorbancji przy 550 nm mierzono w ciągu 3 minut. Współczynnik ekstynkcji dla zredukowanego cytochromu C wynosi  $18,5 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

**Metody spektrofluorymetryczne****Analiza poziomu wolnych rodników przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF**

Analiza opiera się na reakcji przekształcenia dwuoctanu 2',7'-dwuchlorodwuhydrofluoresceiny (H2DCF-DA), na skutek wewnątrzkomórkowej deacetylacji, do 2',7'-dwuchlorodwuhydrofluoresceiny (H2DCF), która następnie jest utleniana przez wolne rodniki do fluorescencyjnej 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCF). Test ten pozwala analizować wewnątrzkomórkowy poziom wolnych rodników tlenowych (Royall i Ischiropoulos 1993). Komórki PC12 wysiewano na szalki 96-dołkowe pokryte kolagenem. Następnego dnia medium wymieniano na medium z niską zawartością surowicy (2% FBS), a komórki traktowano odpowiednimi związkami. Po 24 godz.

---

medium usuwano i dodawano bufor Hank's (Sigma – Aldrich), o składzie  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,185 g/l,  $\text{MgSO}_4$  (bezwodny) – 0,09767 g/l,  $\text{KCl}$  – 0,4 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (bezwodny) – 0,06 g/l,  $\text{NaHCO}_3$  – 0,35 g/l,  $\text{NaCl}$  – 8,0 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (bezwodny) – 0,04788 g/l, D-Glukoza – 1,0 g/l. Następnie dodawano  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  (Sigma Aldrich) w stężeniu końcowym 10  $\mu\text{M}$  i inkubowano przez 50 min. w temperaturze 37°C, bez dostępu światła. Fluorescencję mierzono przy użyciu czytnika FLUOstar Omega przy długości fali pobudzenia 488nm i emisji 525nm. Wynik wyrażono jako intensywność fluorescencji na miligram białka.

## **Metody immunochemiczne**

### **Przygotowanie materiału do oznaczeń immunochemicznych**

Po inkubacji z odpowiednimi związkami komórki na szalkach płukano dwukrotnie za pomocą PBS, zawieszano w buforze Tris-HCl pH 7,4 zawierającym inhibitory proteaz Complete (Roche Diagnostics GmbH), zeszkrobywano z szalek i sonifikowano przez 10 sekund. Tak przygotowany materiał odwirowywano przy 14 000 x g przez 10 min. w 4°C. W uzyskanym nadsączy oznaczano zawartość białka, mieszano z buforem denaturująco-obciążającym Laemmli'ego (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 20% glicerol, 2% SDS, 100 mM DTT, 0,2 mM błękit bromofenolu) i denaturowano przez 5 min. w temp. 95°C. Homogenat komórkowy lub tkankę z kory mózgowej przechowywano w -20 °C i używano do oznaczeń immunochemicznych.

### **Immunodetekcja białek metoda Western blot**

Immunochemiczną metodą western blot oznaczano poziom OXPHOS, Mfn1, Mfn2, Drp1, PGC-1 $\alpha$ , PAR, OPA1, Fis1 oraz GAPDH.

---

Rozdział elektroforetyczny białek przeprowadzano w żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS (siarczanu dodecyłu sodu) – metodą SDS-PAGE (*ang. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Białka rozdzielano na żelu poliakrylamidowym o odpowiedniej gęstości w zależności od masy badanego białka. Tak rozdzielone białka przenoszono na membranę nitrocelulozową (Amershan Biosciences) z zastosowaniem transferu ciekiego (2-2,5 godz., 50 V) przy użyciu aparatu firmy Bio-Rad. Po transferze białka barwiono za pomocą roztworu Ponceau S. Membranę płukano w odpowiednim buforze TBS z dodatkiem Tweenu (0,1% TBS-T) i wykonano procedurę detekcji białek, opierającej się na reakcji antygen-przeciwciała. W tym celu inkubowano w roztworze odtłuszczonego mleka lub BSA (Merck) wolnej od kwasów tłuszczowych (Sigma) w temperaturze pokojowej przez 60 min., w celu zablokowania niespecyficznego wiązania się przeciwciał (szczegółowe warunki reakcji dla poszczególnych białek podano w tabeli 1). Następnie membrany inkubowano przez noc w 4°C w roztworze zawierającym odpowiednie przeciwciało pierwszorzędowe. W każdym przypadku wynik analizy Western blot był widoczny w postaci jednego prążka na wysokości odpowiadającej masie cząsteczkowej danego białka, wyznaczonej na podstawie markera ciężaru cząsteczkowego białek (Thermo Scientific). Nadmiar przeciwciała odplukiwano 3-krotnie przez 10 minut w odpowiednim buforze, a następnie membranę inkubowano 1 godz. w roztworze przeciwciała drugorzędowego. Niezwiązane specyficznie przeciwciała usuwano 3-krotnie płuczac błony przez 10 min. w odpowiednim buforze. Następnie membranę poddawano reakcji chemiluminescencyjnej przy użyciu zestawu firmowego ECL (Bio-Rad) i wizualizowano naświetlając światłoczuły film (Hyperfilm-Kodak, Sigma). Klisze poddawano analizie densytometrycznej przy pomocy oprogramowania TotalLab v1.11 (Non Linear Dynamics). Błony wykorzystane uprzednio inkubowano 30 min. w roztworze 1% SDS i 50 mM glicyny-HCl, (pH 2,0) w celu odmycia związanych przeciwciał i płukano 3 x 15 min. w TBS-Tween, po czym używano do kolejnych oznaczeń immunochemicznych. Wielkość i intensywność zaciemnienia danego prążka była proporcjonalna do poziomu immunoreaktywności badanego białka w materiale nałożonym na żel w odpowiedniej ilości.

---



**Tabela 1. Warunki reakcji immunochemicznej dla poszczególnych białek.**

Oznaczone białko	Gęstość żelu	Bufor	Warunki blokujące	Rozcieńczanie i warunki inkubacji przeciwciała I- rzędowego	Rozcieńczanie i warunki inkubacji przeciwciała II- rzędowego
<b>Mfn1</b>	10%	0,1% TBS-Tween (TBS-T)	5% mleko w 0,1% TBS-T (1 godz., RT)	Królicze przeciwciała anti-Mfn-1 5% mleko w 0,1% TBS-T (noc, 4°C) (1 godz., RT) (1:500) Millipore	Przeciwciała anti-królicze 5% mleko w 0,1% TBS-T (1 godz., w RT) (1:8000) (Merck)
<b>Mfn2</b>	10%	0,1% TBS-Tween (TBS-T)	5% mleko w 0,1% TBS-T (1 godz., RT)	Królicze przeciwciała anti-Mfn-2 5% mleko w 0,1% TBS-T (noc, 4°C) (1 godz., RT) (1:200) Cell Signaling	Przeciwciała anti-królicze 5% mleko w 0,1% TBS-T (1 godz., w RT) (1:8000) (Merck)
<b>DRP1</b>	10%	0,1% TBS-Tween (TBS-T)	5% mleko w 0,1% TBS-T (1 godz., RT)	Królicze przeciwciała anti-Drp1 5% mleko w 0,1% TBS-T (noc, 4°C) (1:500) Santa Cruz	Przeciwciała anti-królicze 5% mleko w 0,1% TBS-T (1 godz., w RT) (1:8000) (Merck)
<b>PGC1-<math>\alpha</math></b>	10%	0,1% TBS-Tween (TBS-T)	5% mleko w 0,1% TBS-T (1 godz., RT)	Królicze przeciwciała anti-PGC-1 $\alpha$ 5% mleko w 0,1% TBS-T (noc, 4°C) (1:250) Santa Cruz	Przeciwciała anti-królicze 5% mleko w 0,1% TBS-T (1 godz., w RT) (1:8000) (Merck)
<b>OXPHOS Koktail</b>	10%	0,1% TBS-Tween (TBS-T)	5% mleko w 0,1% TBS-T (1 godz., RT)	Mysie przeciwciała anti-oxphos 1% BSA w 0,1% TBS-T (noc 4°C) (1:250) Abcam	Przeciwciała anti-mysie 5% mleko w 0,1% TBS-T (1 godz., w RT) (1:4000) (Merck)
<b>OPA1</b>	10%	0,1% TBS-Tween (TBS-T)	5% mleko w 0,1% TBS-T (1 godz., RT)	Mysie przeciwciała anti-OPA1 5% mleko w 0,1% TBS-T (noc, 4°C) (1:10000) Abcam	Przeciwciała anti-mysie 5% mleko w 0,1% TBS-T (1 godz., w RT) (1:4000) (Merck)
<b>Fis1</b>	10% lub 15%	0,1% TBS-Tween	5% mleko w 0,1% TBS-T	Mysie przeciwciała anti-Fis1	Przeciwciała anti-królicze

		(TBS-T)	(1 godz., RT)	5% mleko w 0,1% TBS-T (noc, 4oC) (1:1000) Abcam	5% mleko w 0,1% TBS-T (1 godz., w RT) (1:8000) (Merck)
<b>GAPDH</b>	10% lub 15%	0,1% TBS-Tween (TBS-T)	5% mleko w 0,1% TBS-T (1 godz., RT)	Królicze przeciwciało anti-GAPDH 5% mleko w 0,1% TBS-T (noc 4oC) (1:40000) Merck	Przeciwciało anti-królicze 5% mleko w 0,1% TBS-T (1 godz., w RT) (1:8000) (Merck)

TBS - 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6

0,1% TBST - 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,6

BSA - wolna od kwasów tłuszczowych albumina z surowicy bydłej (*ang. bovine serum albumine*)

## Analiza poziomu ekspresji genów

### Izolacja RNA

Opisana metoda była stosowana zarówno w przypadku materiału zwierzęcego jak i komórkowego. Całkowite RNA izolowano z komórek lub kory mózgowej myszy w warunkach sterylnych, zmodyfikowaną metodą Chomczyńskiego i Sacchi (Chomczyński oraz Sacchi, 1987), używając odczynnika TRI-reagent, zgodnie z zaleceniami producenta (Sigma Aldrich).

Komórki wysiewano w gęstości  $2 \times 10^6$  komórek na szalkę o średnicy 6 cm. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy i dodawano badane związki. Po 24 lub 48 godz. komórki płukano 2-krotnie sterylnym buforem PBS. Komórki lub próbki tkanki (o masie 100 mg) zawieszano w 1 ml odczynnika TRI-reagent, kilkakrotnie homogenizowano na lodzie za pomocą strzykawki i odstawiano na 5 min. Następnie, do 1 ml homogenatu dodawano 200  $\mu$ l chloroformu i

---

mieszano przez 15 sek. Uzyskaną mieszaninę pozostawiano na 15 min. w temperaturze pokojowej a następnie wirowano przy obrotach  $12000 \times g$  (10 min.,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Górną fazę wodną zawierającą RNA przenoszono do nowej probówki, dodawano 500  $\mu\text{l}$  zimnego izopropanolu, delikatnie mieszano, pozostawiano na 5 min. w temperaturze pokojowej i wirowano przy obrotach  $12000 \times g$  (10 min. w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ ). Osad przemywano trzykrotnie 1 ml 75% etanolu. Próbkę pozostawiano otwartą w celu odparowania etanolu po czym osad z próbek RNA zawieszano w 20  $\mu\text{l}$  wody pozbawionej RNAz (RNase-free water, Sigma Aldrich). Ilość otrzymanego RNA oznaczano w aparacie NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc.) metodą spektrofotometryczną przy długości fali  $\lambda = 260 \text{ nm}$ . Zanieczyszczenie RNA białkami i DNA oznaczano przy długości fali  $\lambda = 280 \text{ nm}$ . Stosunek OD260/OD280 wynosił od 1,7 do 2,0.

W celu oczyszczenia wyizolowanego RNA, z pozostałości DNA komórkowego, do nowych próbek przenoszono 1  $\mu\text{g}$  RNA i uzupełniano odczynnikami do trawienia DNA (Merck) do objętości 10  $\mu\text{l}$ . Po przygotowaniu, mieszaninę reakcyjną inkubowano 15 min. w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 1  $\mu\text{l}$  odczynnika zatrzymującego reakcję (Stop solution) i dalej prowadzono inkubację (przez 10 min. w temperaturze  $70^{\circ}\text{C}$ ). Po zakończeniu reakcji próbki przenoszono do lodu.

## **Reakcja odwrotnej transkrypcji**

Całkowite wyizolowane RNA (1  $\mu\text{g}$ ) było matrycą dla działania odwrotnej transkrypcji, przy udziale odwrotnej transkryptazy której produktem jest komplementarne DNA (cDNA). Reakcję odwrotnej transkrypcji ( $25^{\circ}\text{C}$  - 10 min.;  $37^{\circ}\text{C}$  - 120 min.;  $85^{\circ}\text{C}$  - 5 min.) przeprowadzono przy użyciu zestawu odczynników firmy Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) w końcowej objętości 20  $\mu\text{l}$ .

---

**Łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative real-time PCR*)**

Zmiany poziomu mRNA genów kodujących wybrane białka, analizowano za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy CR w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative real-time PCR – qRT-PCR*). Na matrycy cDNA uzyskanej z 1 µg RNA przeprowadzono reakcję PCR w czasie rzeczywistym z zastosowaniem TaqMan Master Mix (Applied Biosystems) Reakcję prowadzono odpowiednio przy użyciu sond TaqMan (Applied Biosystems).

Reakcja była przeprowadzona w następujących warunkach: 50°C - 2 min., 95°C - 10 min., 40 cykli amplifikacji (95°C - 15 sek., 60°C – 1 min.). Każda próbka była nakładana na płytkę reakcyjną w trzech do czterech powtórzeń.

Poziom mRNA wyrażano jako względny stosunek próbki badanej do próbki referencyjnej (kalibratora), po uprzedniej normalizacji obydwu względem genu referencyjnego (*Actb*). Reakcję RT-PCR wykonywano przy pomocy aparatu ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Względny poziom mRNA (RQ) obliczono metodą  $\Delta\Delta Ct$ .

**Metody mikroskopowe****Badanie apoptozy komórek *in vitro* przy użyciu barwnika Hoechst 33342 z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej**

Morfologię komórek oraz procent komórek apoptotycznych badano z zastosowaniem barwnika fluorescencyjnego Hoechst 33342 (Merck), który umożliwia wizualizację charakterystycznych dla apoptozy procesów kondensacji i agregacji jądrowego DNA.

Komórki PC12 wysiewano na szalki 96-dołkowe w gęstości  $1 \times 10^5$  komórek na dołek. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy i dodawano badane związki. Po 24 i 48 godz. inkubacji komórki płukano

---

zimnym buforem PBS i utrwalano w metanolu (30 min., -20 °C). Następnie, komórki płukano zimnym PBS i inkubowano z barwnikiem Hoechst 33342 o stężeniu 1 µg/ml w PBS (30 min., w temperaturze pokojowej). Wybarwione jądra analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym Olympus IX71 i fotografowano z użyciem kamery cyfrowej Olympus U-CMAD3 zintegrowanej z mikroskopem przy długości fali pobudzenia  $\lambda = 340$  nm i emisji  $\lambda = 510$  nm przy użyciu 40-krotnego powiększenia.

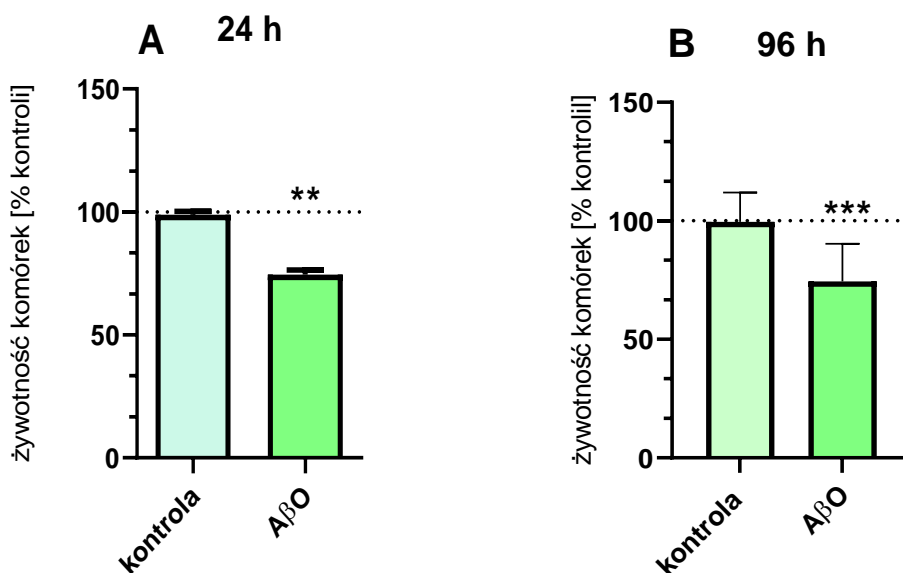
### **Statystyczne opracowanie wyników**

Każde oznaczenie wykonywano w co najmniej trzech powtórzeniach. Wyniki wyrażano jako wartość średnią  $\pm$  błąd standardowy średniej (SEM) obliczone z indywidualnych pomiarów (średnich z powtórzeń). W celu ustalenia wiarygodności różnic w badaniach porównawczych, wartość poszczególnych eksperymentów weryfikowano testem t-Studenta (dwie grupy eksperymentalne) bądź z zastosowaniem jednoczynnikowej lub wieloczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z użyciem testu post-hoc Bonferroniego (trzy lub więcej grup eksperymentalnych). Wyniki uznawano za znamienne statystycznie przy poziomie istotności  $p < 0,05$ . Analizę statystyczną wykonano w oparciu o program GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## WYNIKI

### Żywotność komórek PC12 poddanych działaniu oligomerów peptydu A $\beta$ 1-42 (A $\beta$ O)

Badania ostatnich lat wskazują, że oligomery A $\beta$  (A $\beta$ O) pełnią kluczową rolę w chA. Niniejsze badania dotyczą cytotoksycznego działania A $\beta$ O w trzech liniach komórkowych (PC12, BV2 i SH-SY5Y). Wykresy przedstawiają wpływ A $\beta$  na przeżywalności komórek PC12 po 24 godz. (Wyk 2A) i 96 godz. (Wyk 2B) inkubacji z tym peptydem w stężeniu 1  $\mu$ M. Wykazano, że A $\beta$  powoduje obniżenie przeżywalności komórek o około 30%-25% po 24 i 96 godz. inkubacji z A $\beta$  w porównaniu z kontrolą.



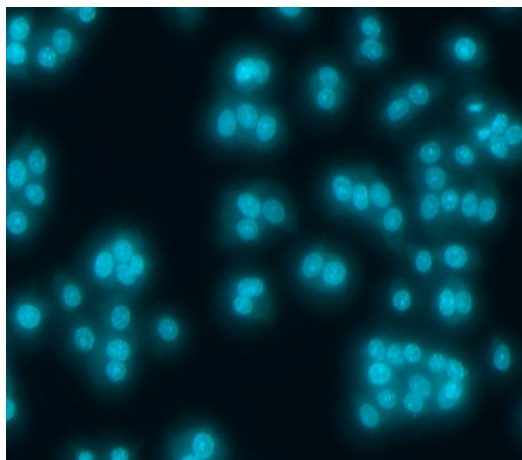
**Wykres. 2** Wpływ A $\beta$  na żywotność komórek PC12.

Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT po 24-godz. **A**) i 96 godz. **B**) inkubacji z oligomerami A $\beta$  w stężeniu 1  $\mu$ M. Wyniki wyrażono jako intensywność fluorescencji. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z trzech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test t-Studenta \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , różnica istotna statystycznie.

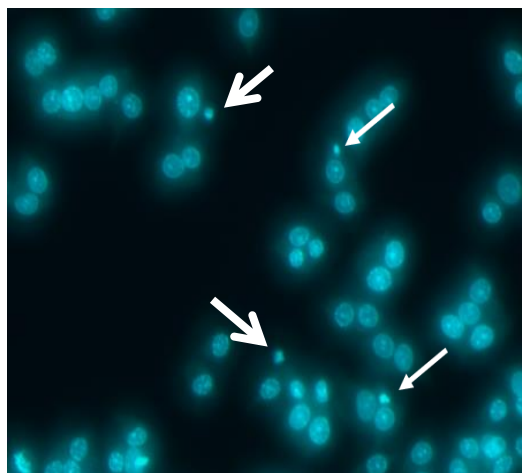
---

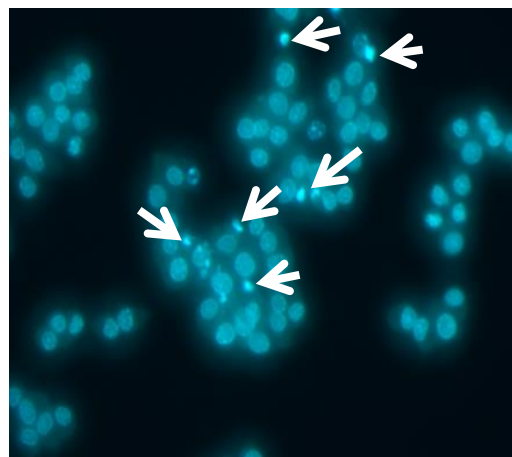
## Wpływ czasu działania A $\beta$ O na poziom komórek apoptotycznych

Następnie badania przeprowadzono w mikroskopie fluorescencyjnym z zużyciem wiążącego DNA fluorochromu Hoechst 33342 (Wyk. 2), które wykazało, że prawidłowe komórki nietraktowane peptydem A $\beta$  miały równomierne zabarwienie jąder. Natomiast komórki apoptotyczne wykazywały nieregularne zabarwienie w wyniku kondensacji chromatyny i fragmentacji jądra. U niektórych komórek stwierdzono typowe ciała apoptotyczne. Liczba komórek apoptotycznych zależna od czasu inkubacji komórek z A $\beta$ . W komórkach traktowanych oligomerami A $\beta_{1-42}$  liczbę komórek apoptotycznych wzrasta prawie dwukrotnie po 24 godz. inkubacji, a po 96 godz. inkubacji wzrasta prawie trzykrotnie w porównaniu do grupy kontrolnej.

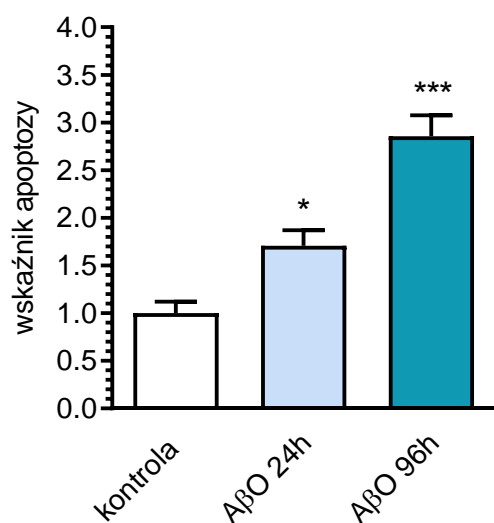


Kontrola 24 godz

A $\beta$ O 24 godz.



AβO 96 godz.



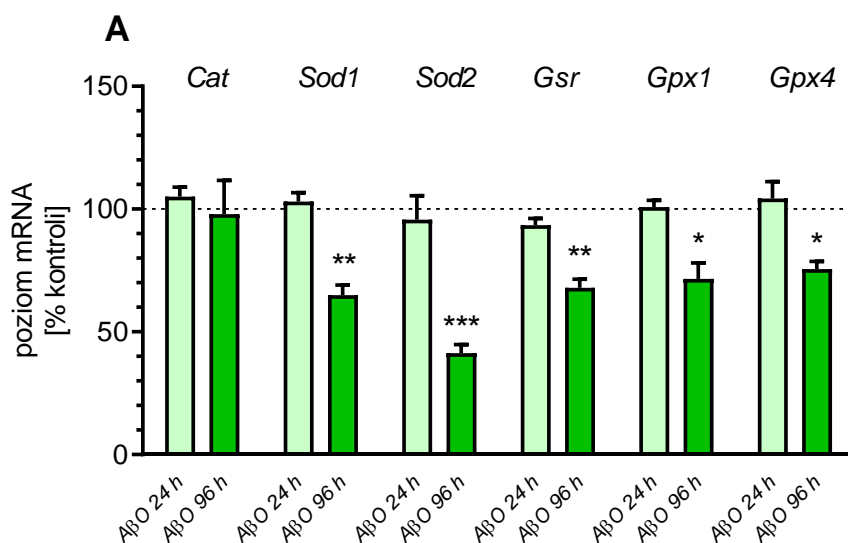
### Wykres. 3 Zależna od czasu działania oligomerów Aβ1-42 indukcja apoptotycznej śmierci komórek PC12.

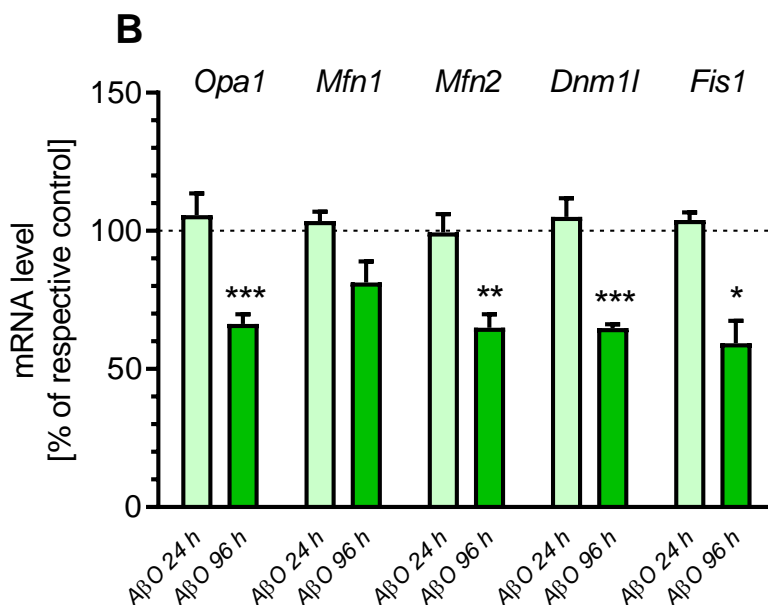
Komórki PC12 inkubowano w obecności oligomerycznego Aβ<sub>1-42</sub> (AβO; 1 μM) przez 24 i 96 godz. i porównano do kontroli. Obecność komórek apoptotycznych oceniono przy zastosowaniu barwnika fluorescencyjnego Hoechst 33342. Wskaźnik apoptozy był określony zgodnie z opisem w sekcji Materiały i Metody. Strzałki pokazują typowe apoptotyczne jądra komórek ze skondensowaną chromatyną. Komórki zbadane pod mikroskopem fluorescencyjnym (Olympus BX51, Japonia) i sfotografowane aparatem cyfrowym (Olympus DP70, Japonia). Zidentyfikowano i policzono komórki o typowej apoptotycznej morfologii jądra (obkurczone jądra komórkowe, kondensacja). Do oceny statystycznej wyników zastosowano test t-Studenta \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001, różnica istotna statystycznie



### Zależny od czasu inkubacji wpływ A $\beta$ na ekspresję genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, białka zaangażowane w regulację dynamiki mitochondriów i ekspresję genów podjednostek łańcucha transportu elektronów.

W kolejnym badaniu analizowano wpływ A $\beta$  na ekspresję genów kodujących białka antyoksydacyjne i mitochondrialne. Zaobserwowano, że 24 godz. inkubacja komórek PC12 z A $\beta$ O (1 $\mu$ M) nie wywiera wpływu na poziom mRNA badanych genów. Natomiast A $\beta$  powoduje znaczne obniżenie ekspresji licznych badanych genów po 96 godzinach inkubacji z A $\beta$ O. Stwierdzono obniżenie transkrypcji genu dysmutazy ponadtlenkowej 1 i 2 (*Sod1* i *Sod2*), reduktazy glutationowej (*Gsr*) i peroksydazy glutationowej 1 i 4 (*Gpx1*, *Gpx4*). A $\beta$ O nie miał natomiast wpływu na ekspresję genu dla katalazy (*Cat*) (Wyk. 4A). Ponadto stwierdzono obniżenie transkrypcji genów białek zaangażowanych w procesy fuzji i rozszczepienia mitochondriów takich jak: *Opal*, *Mfn2*, *Dnm1* i *Fis1* (Wyk. 4B), natomiast brak było istotnego wpływu na ekspresję genu dla *Mfn1*. A $\beta$ O istotnie obniża ekspresję genów podjednostek kompleksów I (*mt-Nd1*), II (*Sdha*) i III (*mt-CytB*) transportu elektronów (Wyk. 4C), nie wywiera wpływu na transkrypcję genu podjednostki kompleksu IV (*mt-Co1*).



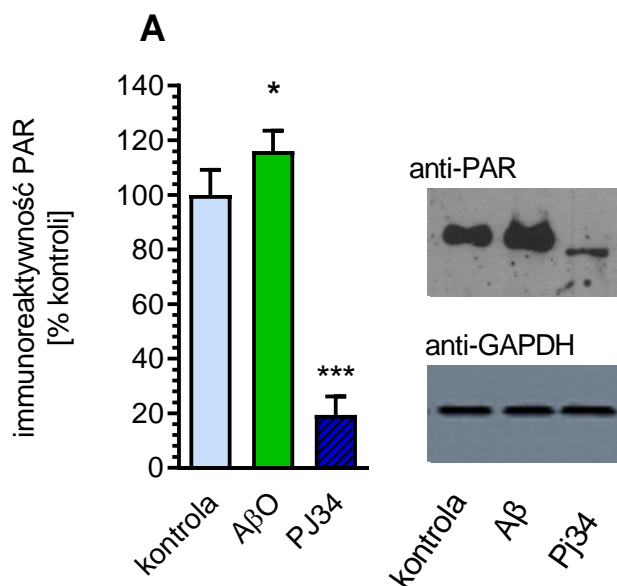


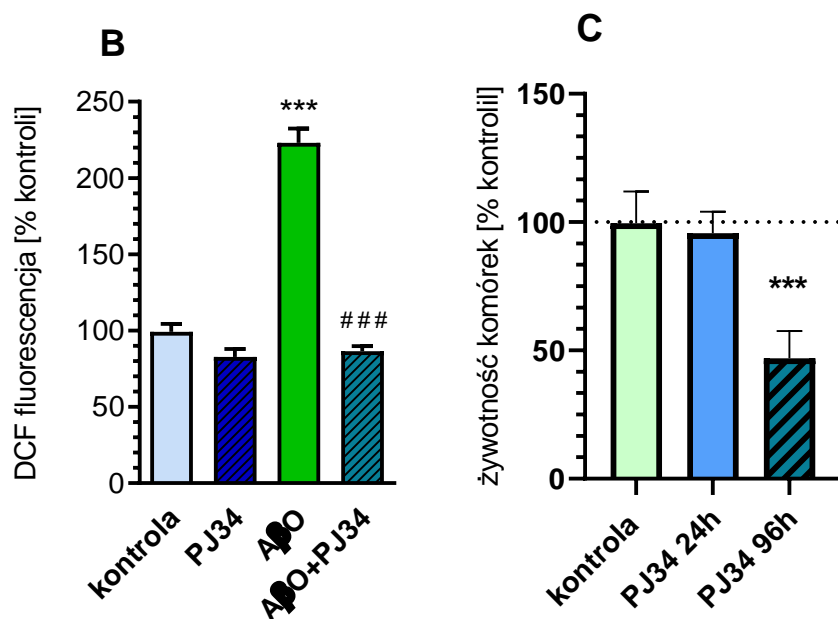
**Wykres. 4 Ekspresja genów dla białek enzymów antyoksydacyjnych (A), białek dynamiki mitochondrialnej (B) oraz genów podjednostek łańcucha transportu elektronów (C) w komórkach PC12.**

Wykresy przedstawiają poziom ekspresji genu badany metodą Real-time PCR (rtPCR) dla badanych białek, a wynik normalizowany jest względem *Actb* z czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach  $\pm$  SEM. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta ( $n=3-4$ ) \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ , w porównaniu z grupą kontrolną. **A)** *Cat*- katalaza, *Sod1*; *Sod2*- dysmutazy nadtlenkowe 1,2; *Gsr*- reduktaza glutationowa; *Gpx1*, *Gpx4* – peroksydaza glutationowa 1,4; **B)** *Opa1* (białko atrofii nerwu wzrokowego 1); *Mfn1*, *Mfn2* – Mitofuzyny 1,2; *Dnm1l*- białko Drp1 (białko dynaminopodobne Drp1) ; *Fis1*- (białko rozszczepienia 1); **C)** *mt-Nd1* - Oksydoreduktaza NADH-koenzym Q (Kompleks I); *Sdha*- Oksydoreduktaza bursztynian-ubichinon (kompleks II); *mtCytb*-Oksydoreduktaza koenzym Q-cytochrom C (kompleks III), *mtCo1*-Oksydaza cytochromu C (Kompleks IV) – podjednostki kompleksów (I-IV)

## Wpływ A $\beta$ i PJ-34 na żywotność komórek, poziom immunoreaktywności PAR oraz poziom wolnych rodników

A $\beta$ O powoduje wzrost poziomu wolnych rodników (Wyk. 5B), które mogą prowadzić do uszkodzenia nici DNA i w konsekwencji aktywacji związanego z DNA enzymu PARP-1, który jest jądrowym odbiorcą sygnałów wolnorodnikowych i molekularnym regulatorem procesów przetrwania i śmierci komórki. W wyniku jego zwiększonej aktywności dochodzi do wzrostu poziomu produktu, czyli poli(ADP-rybozy) ważnej molekule sygnalizacyjnej odpowiedzialnej również za uwalnianie AIF i apoptotyczną śmierć komórek niezależną od kaspaz. Wyniki demonstrują wzrost poziomu PAR po 24h inkubacji PC12 z A $\beta$ O (Wyk. 5A). Zastosowanie inhibitora PARP-1 (PJ34) niweluje nadmierną aktywację PARP-1 określaną wzrostem poziomu immunoreaktywności cząsteczek PAR (Wyk. 5A). Inhibitor PARP-1 obniża poziom wolnych rodników w obecności A $\beta$  (Wyk. 5B). Inhibitor PARP-1 w komórkach PC12 poddanych jego działaniu przez 24 godz. wpłynął korzystnie na ich żywotność, natomiast obniżał znacznie żywotność komórek po 96 godz. inkubacji, dlatego ograniczono się do badania jego efektu wyłącznie w przypadku 24 godz. działania (Wyk. 5C).





**Wykres 5. Wpływ oligomerów A $\beta$ 1-42 i inhibitora PARP-1 (PJ34) na poziom immunoreaktywności poli (ADP) rybozy (PAR) (A), poziom wolnych rodników (B) oraz żywotność komórek w obecności PJ34 (C).**

A) Aktywację PARP-1 analizowano przez pomiar immunochemiczny poziomu poli ADP-rybozy (PAR) po 24 godz. inkubacji. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH. Zastosowano oprogramowanie Total Lab 4. B) Poziom reaktywnych form tlenu oceniono przez pomiar fluorescencji DCF po 24 godz. inkubacji. C) Żywotność komórek mierzono testem MTT po 24 i 96 godz inkubacji w obecności PJ34. Dane reprezentują wartość średnią  $\pm$  S.E.M z 3-4 doświadczeń.. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego (n=3-4) (C) oraz t-Studenta (n=3-4) (A, B) \*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , w porównaniu z grupą kontrolną, ###  $p < 0,001$  w porównaniu z A $\beta$ 0. A $\beta$  (1 $\mu$ M), PJ34 (20 $\mu$ M)

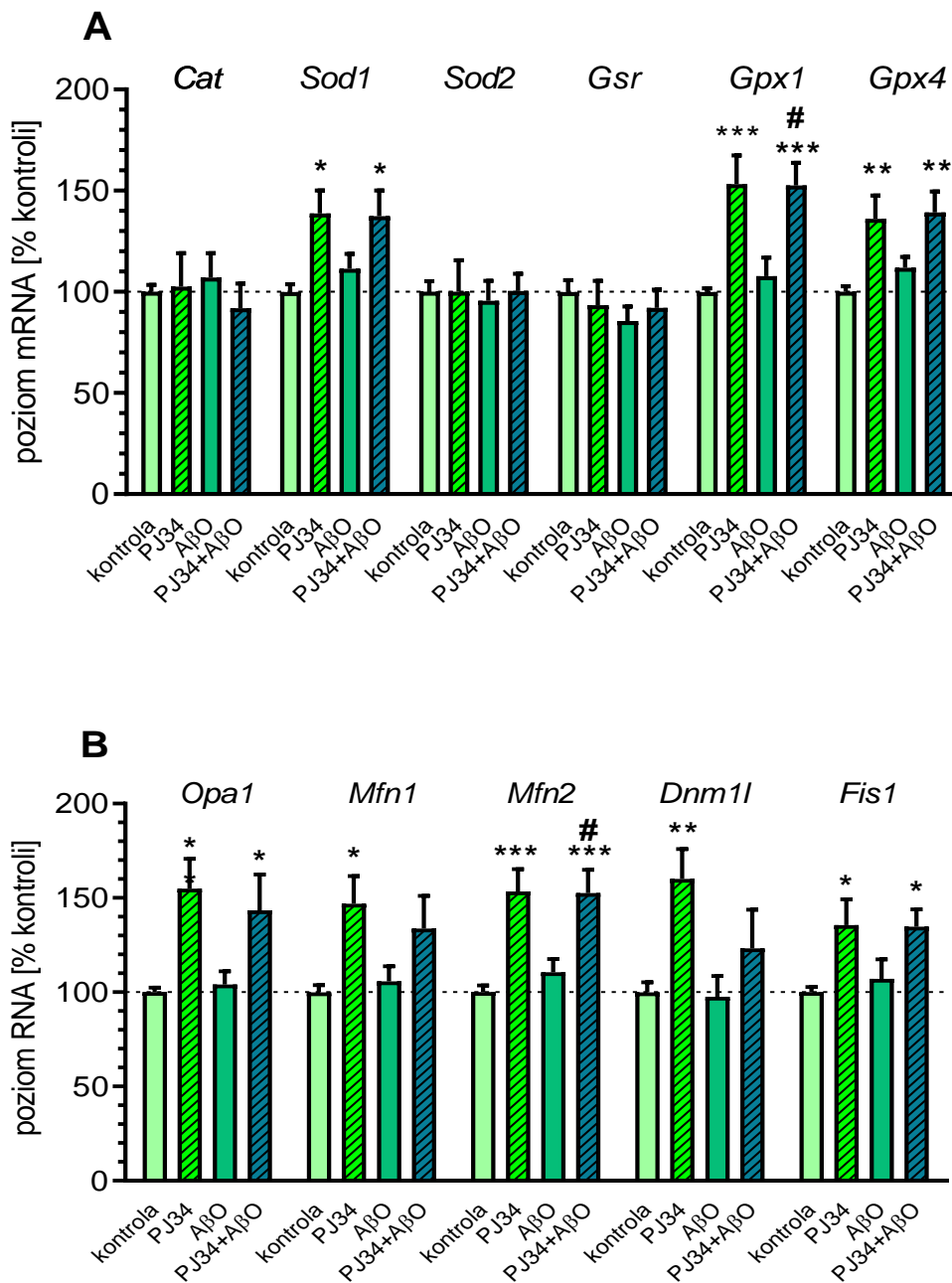
---

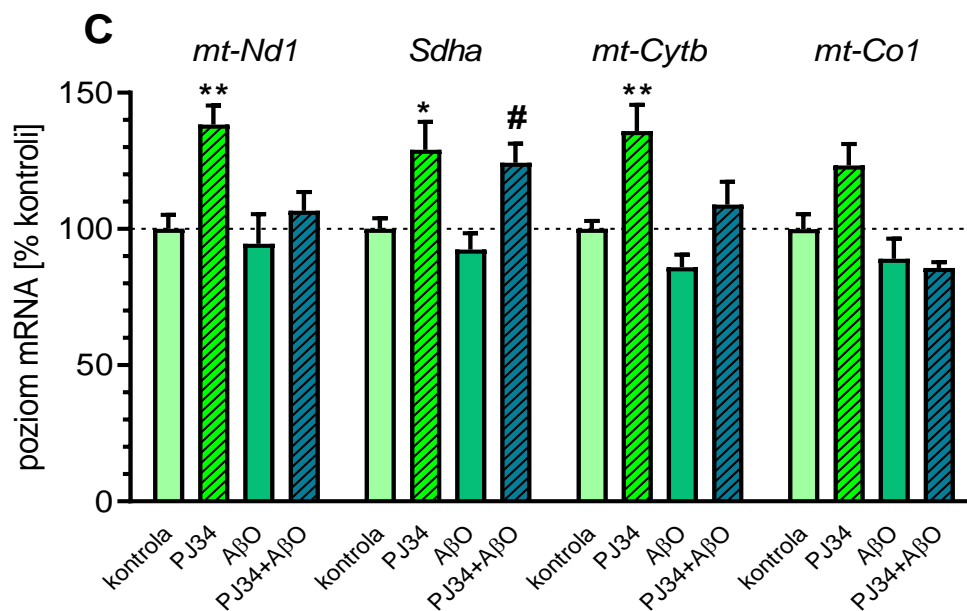
## **Wpływ inhibitora PARP-1 (PJ34) na ekspresję genów dla białek antyoksydacyjnych, białek dynamiki mitochondriów oraz podjednostek kompleksów łańcucha transportu elektronów w warunkach kontrolnych i cytotoksyczności A $\beta$**

W sytuacji zwiększonego stresu oksydacyjnego, w tym w toksyczności peptydów A $\beta$ , wzrost aktywności PARP-1 może prowadzić do zaburzeń poziomu związków energetycznych i funkcji białek mitochondrialnych. Jednak jego rola w regulacji transkrypcji genów kodujących białka mitochondrialne nie jest w pełni poznana. Dlatego też w niniejszej rozprawie doktorskiej analizowano wpływ farmakologicznego zahamowania PARP-1 na transkrypcje genów zaangażowanych w obronę antyoksydacyjną oraz kodujących białka dynamiki mitochondriów, a także podjednostki kompleksów oddechowych łańcucha transportu elektronów w komórkach PC12.

Farmakologiczne zahamowanie aktywności poli ADP-rybozylacji białek przez PJ34 w komórkach PC12 kontrolnych, jak również poddanych działaniu A $\beta$ O<sub>1-42</sub> w czasie 24 godz., powoduje zwiększenie transkrypcji genów enzymów antyoksydacyjnych (*Sod1*, *Gpx1*, *Gpx4*) (Wyk. 6A). Ponadto PJ34, aktywuje geny kodujące białka zaangażowane w fuzję i podział (rozszczenie) mitochondriów (*Mfn1*, *Opal*, *Dnm1*, *Fis1*). W obecności oligomerów A $\beta$ <sub>1-42</sub>, inhibitor PARP-1 (PJ34) w czasie 24godz. inkubacji powoduje znamienny wzrost ekspresji genów *Opal* i *Mfn2* (Wyk. 6B), natomiast same oligomery A $\beta$ <sub>1-42</sub> nie wywierają znamiennego wpływu na ekspresję badanych genów w czasie 24 godz. inkubacji.

Farmakologiczne zahamowanie PARP-1 przy użyciu inhibitora PJ34 istotnie zwiększa poziom mRNA badanych podjednostek trzech kompleksów łańcucha transportu elektronów (*mt-Nd1*, *Sdha*, *mt-Cytb*). W obecności A $\beta$ <sub>1-42</sub> oraz PJ34 stwierdzono znamienny wzrost ekspresji genu kodującego podjednostkę kompleksu II, *Sdha* (Wyk. 6C).





**Wykres 6. Wpływ inhibitora PARP-1 (PJ34) na ekspresję genów dla białek enzymów antyoksydacyjnych (A), białek dynamiki mitochondrialnej (B) oraz genów podjednostek łańcucha transportu elektronów (C).**

Przeprowadzono analizę statystyczną stosując ANOVA z testem post-hoc Bonferroni (n=3-4) \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001, w porównaniu z odpowiednią grupą kontrolną. # P <0,05, w porównaniu z grupą traktowaną AβO. Aβ (1μM), PJ34 (20μM)

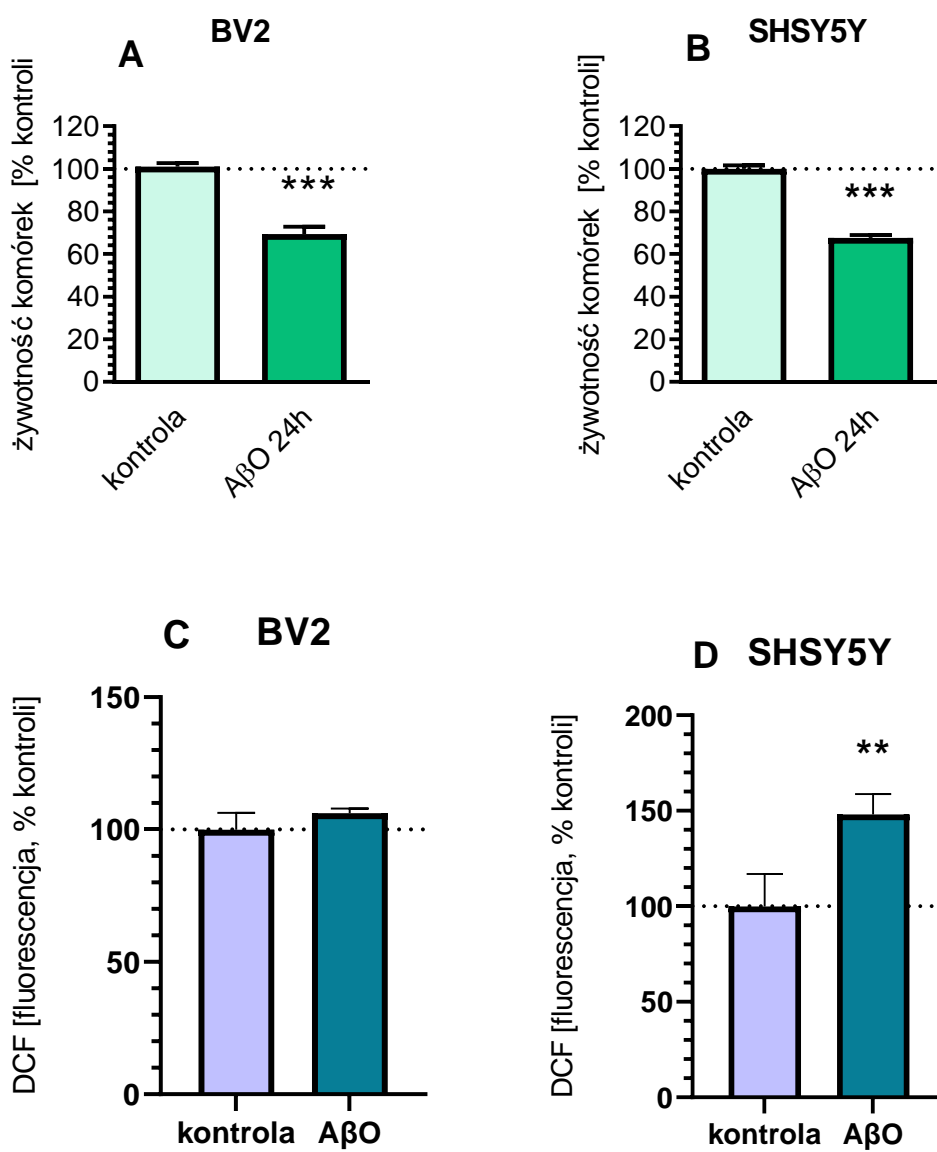
### Poziom reaktywnych form tlenu i żywotność komórek BV2 i SH-SY5Y traktowanych oligomerami peptydu Aβ<sub>1-42</sub>

Celem następnej serii badań była analiza działania oligomerów Aβ<sub>1-42</sub> na żywotność, poziom wolnych rodników i transkrypcję wybranych genów w komórkach neuronalnych i komórkach mikrogleju.

W celu zidentyfikowania specyficznych odpowiedzi poszczególnych typów komórek, porównano działanie AβO w dwóch liniach komórkowych: komórek neuronalnych ludzkich, SH-SY5Y oraz mysich komórek mikrogleju BV2. Aby zbadać

wpływ A $\beta$ , obie linie komórkowe potraktowano je stosując tą samą pożywkę (Neurobasal A z dodatkiem B27), aby wykluczyć różnice wywołane przez czynniki środowiskowe.

Jak pokazano na Wyk. 7C i Wyk. 7D inkubacja komórek z A $\beta_{42}$  powodowała wzrost fluorescencji DCF w komórkach SHSY-5Y po 24 godzinach, co oznacza wzrost poziomu wolnych rodników (RFT) w tych komórkach. Zjawiska tego nie obserwowano w komórkach BV2. Z kolei 24 godzinna inkubacja komórek w obecności A $\beta_{42}$  wywołała istotne obniżenie żywotności komórek, zarówno w linii komórkowej BV2 jak i SH-SY5Y (Wyk. 7A, 7B).





---

**Wykres 7. Wpływ A $\beta$ 1-42 na żywotność komórek BV2 i SHSY-5Y (A) oraz poziom reaktywnych form tlenu (B).**

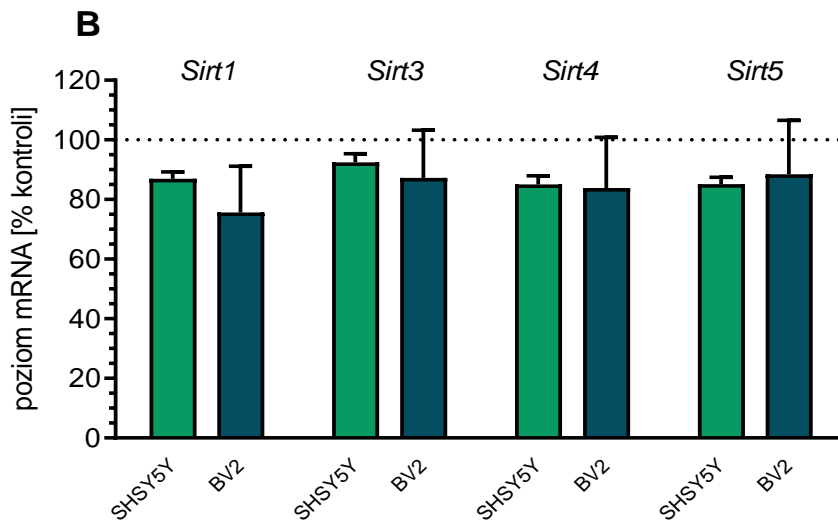
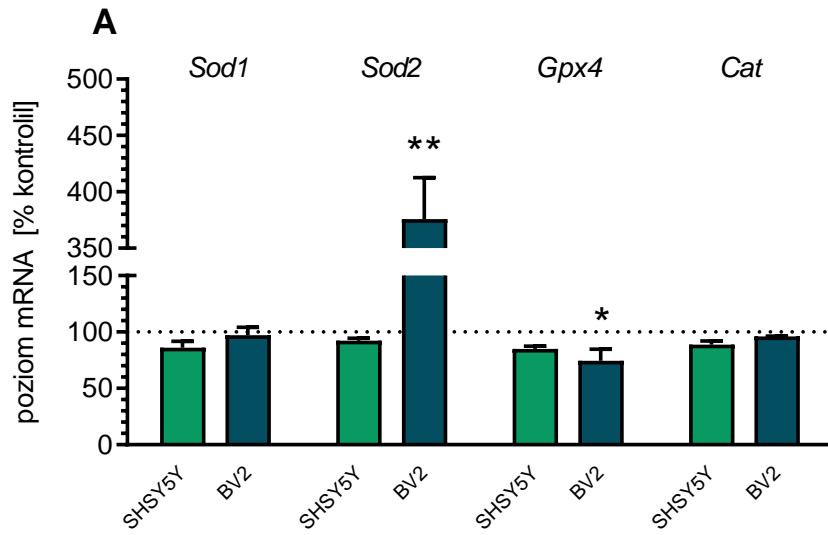
Komórki BV2 i SHSY-5Y inkubowano w obecności oligomerów A $\beta$ <sub>1-42</sub> (A $\beta$ <sub>1-42</sub>; 1  $\mu$ M) przez 24 godziny. A, B) Żywotność komórek mierzono testem MTT po 24 godzinach (n=24). C, D) Poziom reaktywnych form tlenu w komórkach określono poprzez pomiar fluorescencji DCF (n=4). Dane reprezentują średnią  $\pm$  SEM z 3-4 niezależnych doświadczeń. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta (n=3-4) \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001, w porównaniu z grupą kontrolną.

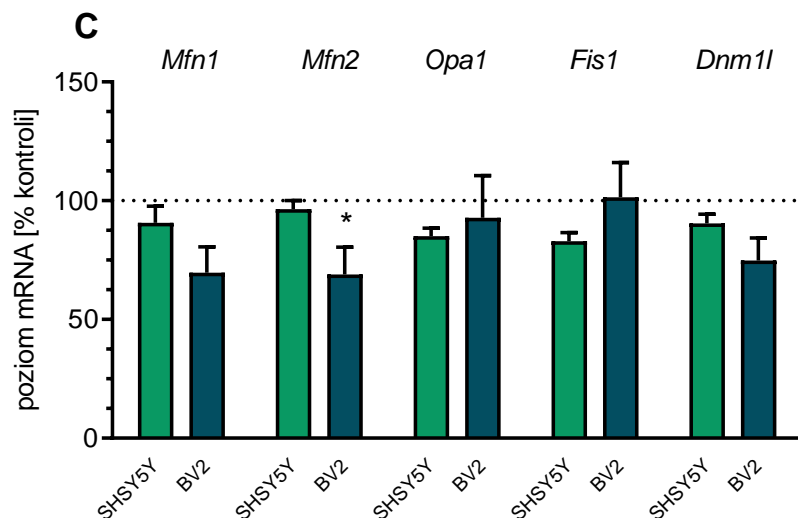
**Wpływ A $\beta$ O na ekspresję genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, Sirtuiny, białka zaangażowane w regulację dynamiki mitochondriów i ekspresję genów podjednostek łańcucha transportu elektronów.**

Kolejne badania dotyczyły oznaczania poziomu transkrypcji genów kodujących białka zaangażowane w obronę antyoksydacyjną z uwzględnieniem wybranych Sirtuin oraz genów kodujących białka mitochondrialne w warunkach toksyczności peptydów A $\beta$ <sub>1-42</sub> w obu liniach komórkowych.

Wyniki wykazują, że A $\beta$ O<sub>1-42</sub> po 24 godz. inkubacji powoduje w komórkach BV2 istotny wzrost (do 370% kontroli) poziomu mRNA dla *Sod2* ważnego mitochondrialnego enzymu antyoksydacyjnego oraz niewielkiego stopnia obniżenie poziomu mRNA dla *Gpx4* (Wyk. 8A). Natomiast oligomery A $\beta$ O<sub>1-42</sub> nie wywierają znamionnego efektu na ekspresję genów kodujących białka antyoksydacyjne oraz Sirtuiny w komórkach neuronalnych SHSY (Wyk. 8A, Wyk. 8B). W badaniach stwierdzono również brak znamionnego efektu A $\beta$ O na poziom mRNA dla Sirtuin w komórkach BV2 (Wyk. 8B). Inkubacja w obecności A $\beta$ O<sub>1-42</sub> przez 24 godz. zmniejszyła ekspresję genu dla *Mfn2* w komórkach BV2, natomiast nie powodowała istotnych zmian w ekspresji genów dla białek dynamiki mitochondriów w komórkach neuronalnych SH-SY5Y (Wyk. 8C).

Uzyskane dane wykazały niższą ekspresję genów kodujących podjednostki kompleksu I i II ETC w komórkach mikrogleju BV2 traktowanych A $\beta$ O (Wyk. 8D). Natomiast analiza ekspresji genów podjednostek ETC w komórkach SH-SY5Y wskazuje na niższy poziom mRNA wyłącznie dla podjednostki kompleksu II (*Sdha*) po 24 godz. działania A $\beta$ O<sub>1-42</sub>.





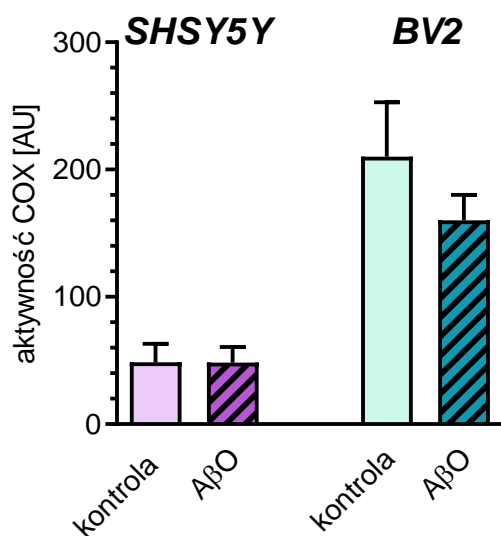
**Wykres 8. Wpływ A $\beta$  na ekspresję genów dla białek antyoksydacyjnych (A), Sirtuin (B), białek dynamiki mitochondrialnej (C) oraz genów podjednostek łańcucha transportu elektronów w komórkach SH-SY5Y i BV2.**

Komórki SH-SY5Y i BV2 inkubowano w obecności oligomerów A $\beta$ <sub>1-42</sub> (A $\beta$ O; 1  $\mu$ M) przez 24 godziny. Poziomy mRNA analizowano metodą qRT-PCR. Wyniki znormalizowano względem ekspresji genu kodującego beta aktynę (Actb). Dane reprezentują wartość średnią  $\pm$  SEM dla 5–8 niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w trzech powtórzeniach. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t - Studenta. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 w porównaniu z odpowiednią grupą kontrolną

### **Aktywność oksydazy cytochromu C w komórkach SH-SY-5Y oraz BV2 poddanych działaniu oligomerów A $\beta$ 1-42**

W łańcuchu transportu elektronów oksydaza cytochromu C (COX) jest końcowym transbłonowym IV kompleksem w fosforylacji oksydacyjnej. Ten proces łączy redukcję przekaźników elektronów podczas metabolizmu z redukcją molekularnego tlenu do wody i równoczesną translokacją protonów z matrix do przestrzeni międzybłonowej. COX odpowiada za zużycie tlenu w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów, który napędza fosforylację oksydacyjną do produkcji ATP. Funkcja mózgu jest krytycznie zależna od zużycia tlenu i produkcji ATP (Watson i McStay, 2020) dlatego też, zbadano aktywności COX w komórkach neuronalnych

i glejowych pod wpływem działania peptydów A $\beta$ . Wyniki pokazały, że aktywność oksydazy cytochromu C była trzykrotnie wyższa w komórkach BV2 w porównaniu z SH-SY5Y ( $p = 0003$ ); jednak A $\beta$ <sub>1-42</sub> nie miał wpływu na aktywność tego enzymu w wymienionych komórkach w czasie 24 godz. inkubacji.



**Wykres 9. Aktywność COX w komórkach neuronalnych SH-SY5Y i komórkach mikrogleju –BV2**

Aktywność COX oznaczono zgodnie z opisem w „Materiałach i metodach”. Dane reprezentują wartość średnią  $\pm$  SEM dla 4–6 niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w trzech powtórzeniach.

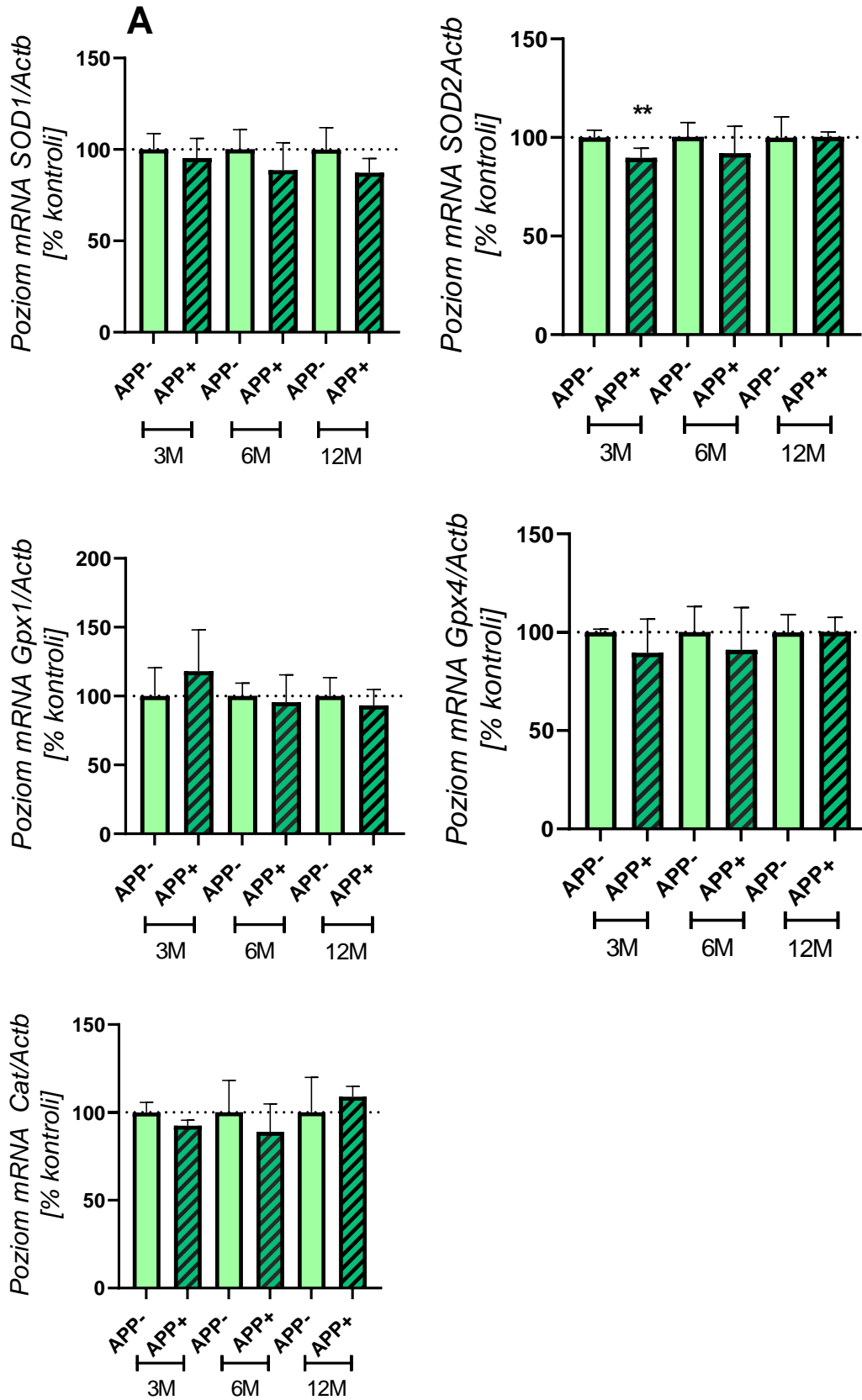
---

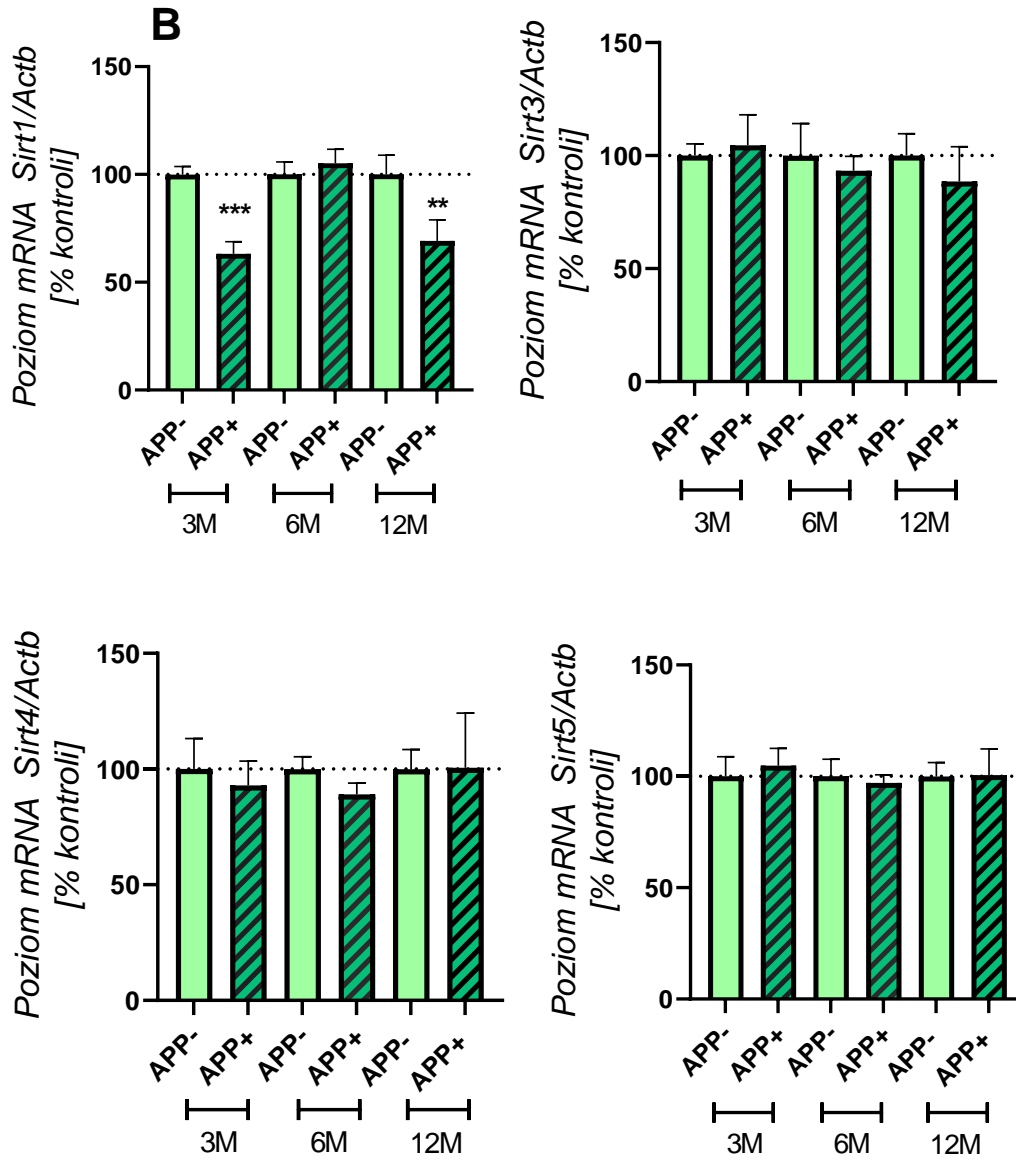
**Poziom mRNA genów kodujących białka antyoksydacyjne (A), Sirtuiny (B) oraz DNA zależne PARPs (C) w korze myszy transgenicznych z chA (APP+) i kontrolnych (APP-).**

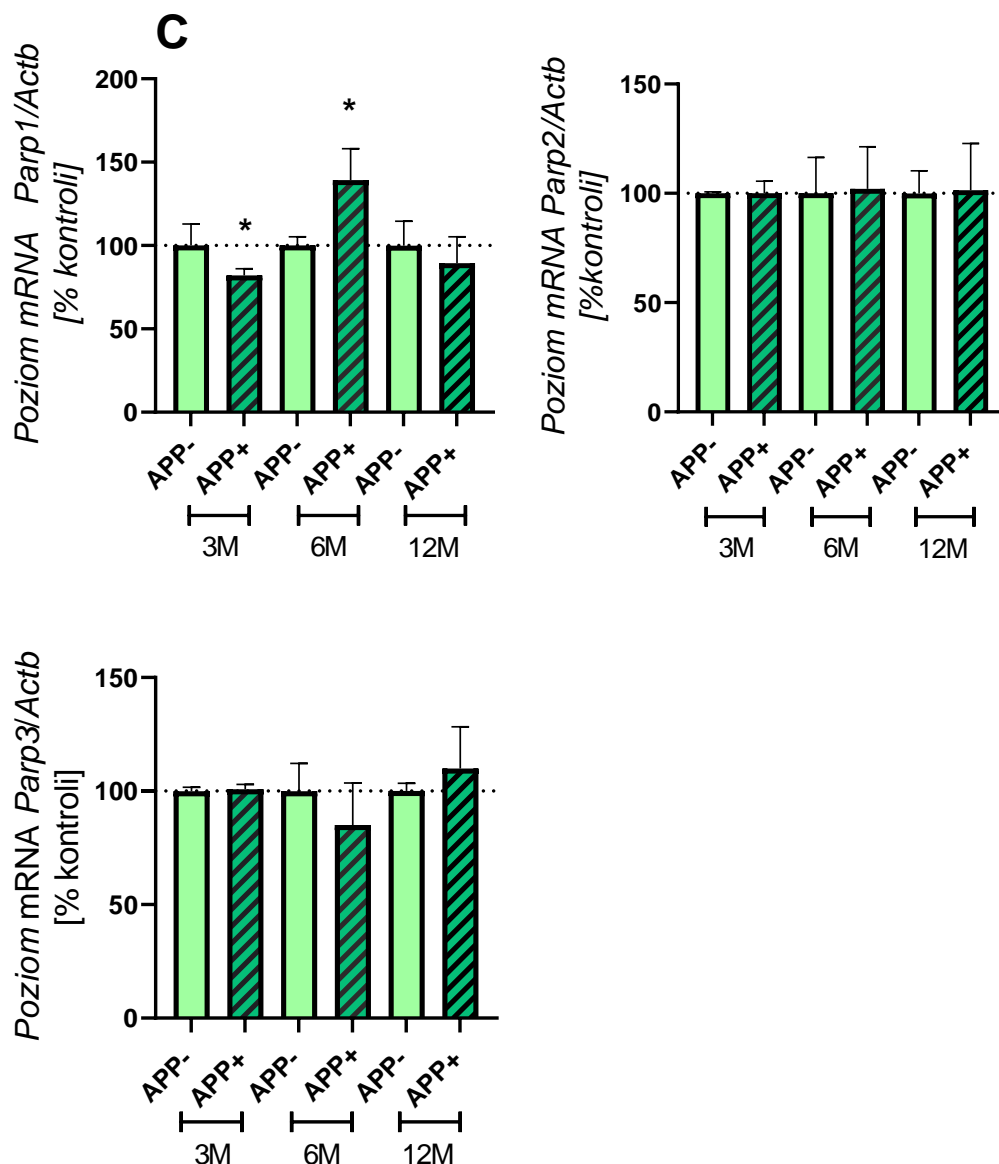
Celem dalszych badań była analiza zmian ekspresji badanych dotychczas genów w korze mózgowej myszy w transgenicznym modelu choroby Alzheimera. Analogicznie jak w badaniach cytotoxycyzności  $A\beta_{1-42}$  analizowano ekspresje genów kodujących białka antyoksydacyjne i białka mitochondrialne w korze mózgu myszy 3, 6 i 12 miesięcznych transfekowanych genem ludzkim dla białka APP z mutacją londyńską (APP+). Wyniki wykazały znaczne obniżenie poziomu ekspresji genów dla *Sod2* w korze 3 miesięcznych myszy z chA. Równocześnie zaobserwowano zbliżone wartości poziomu mRNA dla *Sod1*, peroksydazy glutationowej 1 i 4 oraz katalazy w korze mózgu myszy (APP+) i (APP-) (Wyk. 10A).

Stwierdzono natomiast znaczne obniżenie ekspresji genu dla *Sirt1* w korze 3 miesięcznych myszy i e w korze 12 miesięcznych myszy z nadekspresją genu APP (Wyk. 10B). Poziom mRNA dla mitochondrialnych SIRTs: *Sirt3*, *Sirt4* i *Sirt5* nie ulegał zmianie w korze myszy (APP+) w porównaniu do (APP-).

Wykazano zmiany ekspresji genu dla PARP-1 kolejnego enzymu z rodziny enzymów NAD zależnych, który odgrywa kluczową rolę w reakcji na stres oksydacyjny i podobnie jak Sirtuiny należy do enzymów regulujących mechanizmy przeżycia i śmierci komórek w warunkach stresu. Stwierdzono przejściowe obniżenie transkrypcji genu kodującego PARP-1 w korze 3 miesięcznych myszy natomiast wzrost poziomu mRNA dla PARP-1 u 6 miesięcznych zwierząt. Ekspresja genów dla pozostałych PARPs związanych z DNA: PARP-2 i PARP-3 pozostała niezmienną u myszy (APP+) *versus* (APP-) (Wyk. 10C).







**Wykres 10. Analiza ekspresji genów kodujących białka antyoksydacyjne (A), Sirtuiny (B) oraz DNA zależne PARPs (C) w korze myszy transgeniczných z chA (APP+) i kontrolnych (APP-).**

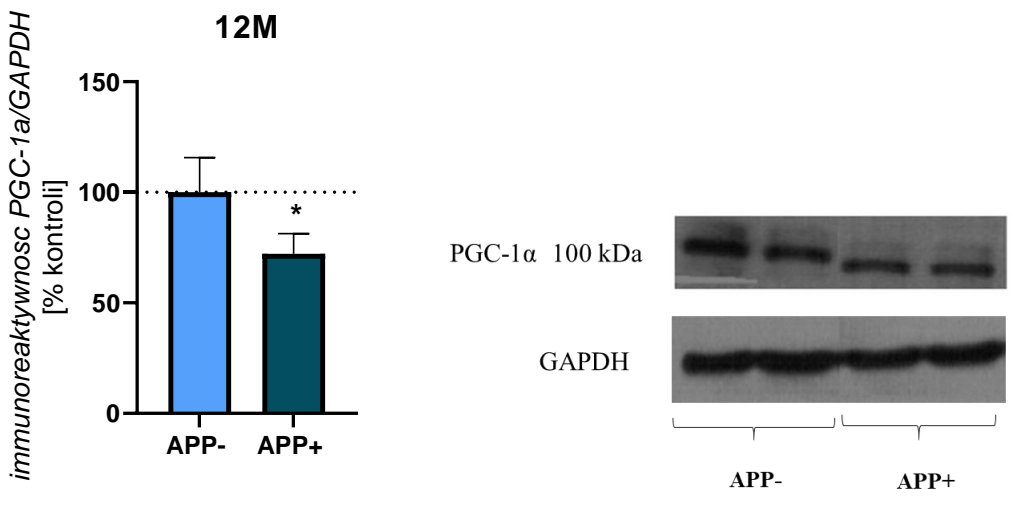
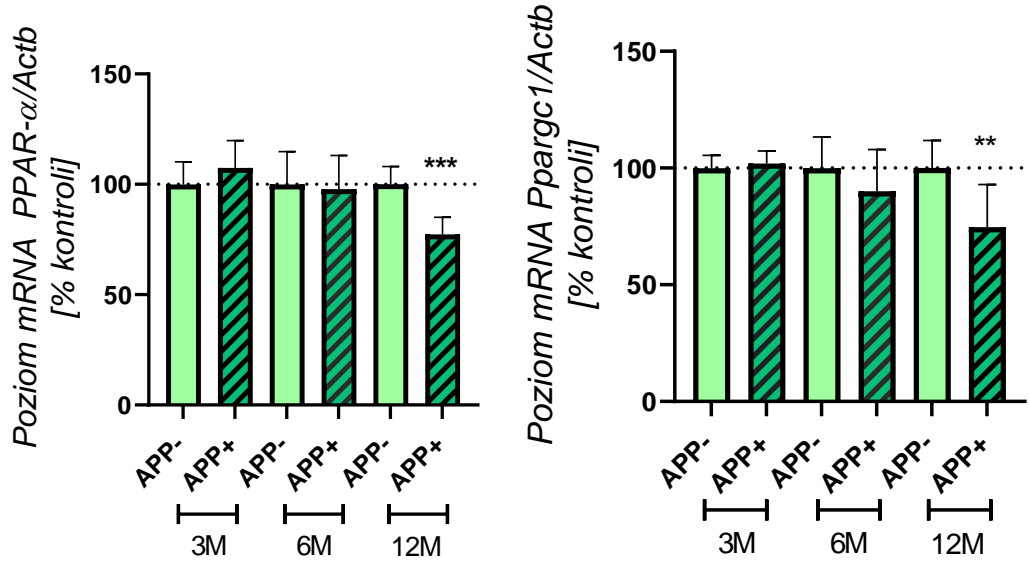
Ekspresja genów: *Sod1*, *Sod2*, *Gpx1*, *Gpx4* oraz *Sirt1*, *Sirt3*, *Sirt4*, *Sirt5* oraz związanych z DNA PARPs mierzono z zastosowaniem metody qRT-PCR. Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (*Actb*). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta (n=3-8) \* p <0,05, \*\*\* p <0,001, w porównaniu z grupą kontrolną.

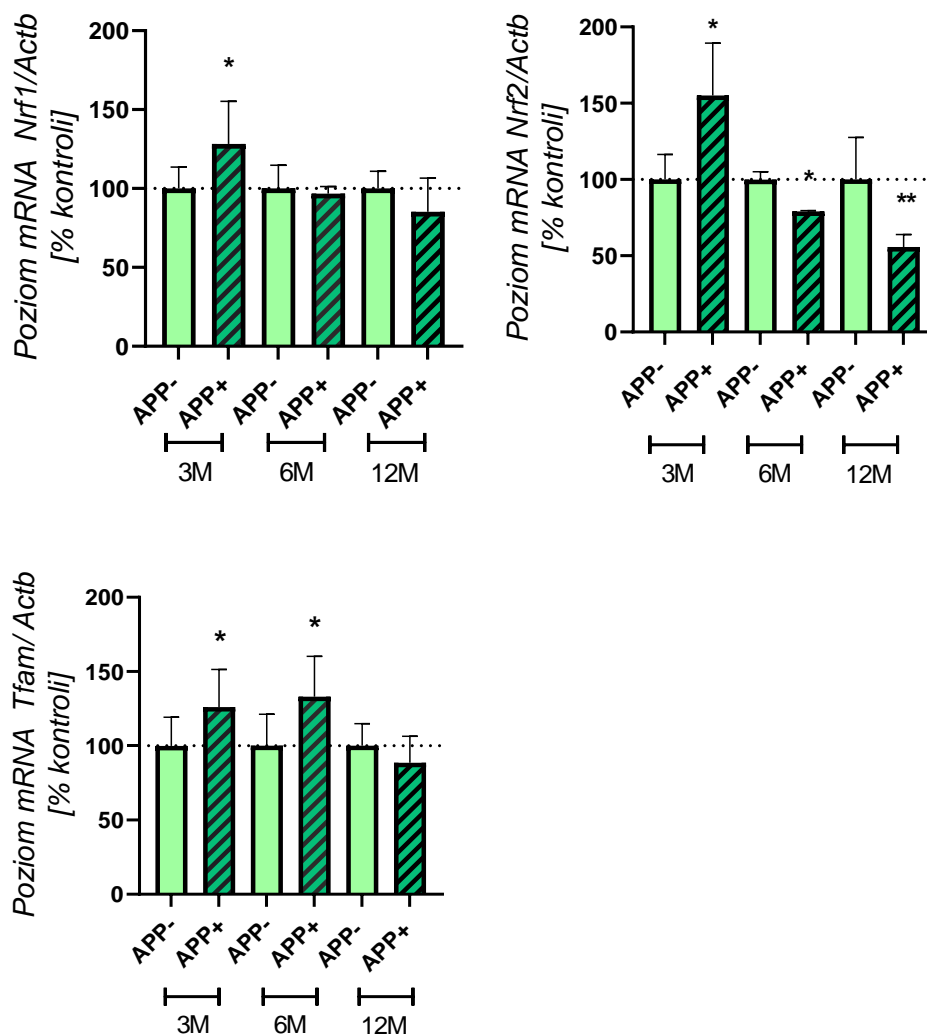


---

**Poziom mRNA genów kodujących białka biogenezy mitochondriów w korze myszy transgenicznych z chA (APP+) i kontrolnych (APP-)**

Kolejnym etapem pracy była analiza transkrypcji genów zaangażowanych w biogenezę mitochondriów. Kluczowym enzymem biogenezy mitochondriów jest PGC-1 $\alpha$ , który ściśle współpracuje z jądrowymi czynnikami transkrypcyjnymi w tym PPAR- $\alpha$ . Uzyskane wyniki badań wykazały utrzymanie poziomu transkrypcji PPAR $\alpha$  i PGC-1 $\alpha$  w korze mózgu myszy (APP+) 3 i 6 miesięcznych na porównywalnym poziomie jak w korze myszy (APP-). Natomiast w korze mózgu myszy 12 M (APP+) zaobserwowano istotne obniżenie ekspresji genów dla PPAR- $\alpha$  i PGC-1 $\alpha$ . Analiza z zastosowaniem metody western blot wykazała statystycznie istotne obniżenie poziomu immunoreaktywności białka PGC-1 $\alpha$  u 12 M myszy APP+ w porównaniu do APP-. Ponadto poziom mRNA dla białek regulujących biogenezę mitochondriów, takich jak NRF1 i NRF2 oraz TFAM, był znacznie podwyższony na wczesnym etapie chA u 3 miesięcznych myszy (APP+) *versus* (APP-). W przypadku ekspresji genu dla *Tfam* podwyższony poziom mRNA był istotnie statystycznie istotny w korze mózgu 6 miesięcznych myszy (APP+) w porównaniu do odpowiedniej grupy wiekowej myszy (APP-). Natomiast poziom mRNA dla genu *Nrf2*, był z kolei istotnie obniżony u 6 i 12 miesięcznych myszy transgenicznych w porównaniu do odpowiednich wiekowo grup kontrolnych.





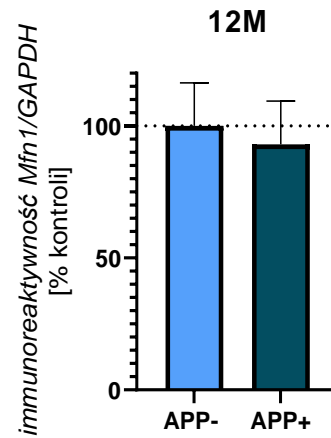
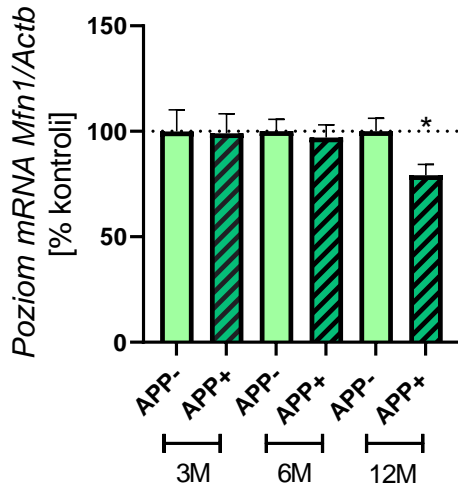
**Wykres 11. Analiza ekspresji genów kodujących białka biogenezy mitochondriów oraz poziom immunoreaktywności białka PGC-1 $\alpha$  w korze myszy transgenicznych z chA (APP<sup>+</sup>) i kontrolnych (APP<sup>-</sup>).**

Ekspresja genów kodujących: *PPAR- $\alpha$* , *PGC-1 $\alpha$* , *Nrf1*, *Nrf2*, *Tfam* mierzona z zastosowaniem metody qRT-PCR. Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (*Actb*). Poziom immunoreaktywność białka PGC-1 $\alpha$  w korze mózgu myszy transgenicznych FVB, 12 miesięcznych badano metodą Western blot. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH. Wyniki stanowią średnią arytmetyczną z 6 niezależnych doświadczeń  $\pm$ SEM. Obok wykresów zamieszczono przykładowe wyniki western blot. Do oceny statystycznej zastosowano test t-Studenta, \*\*<0,01 – różnica istotna statystycznie.

---

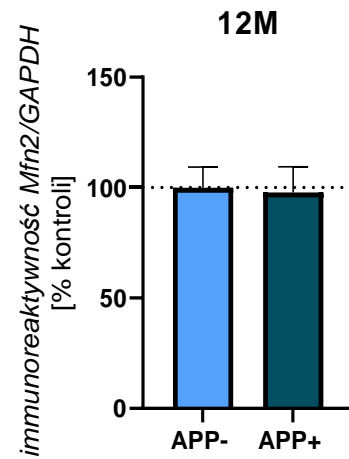
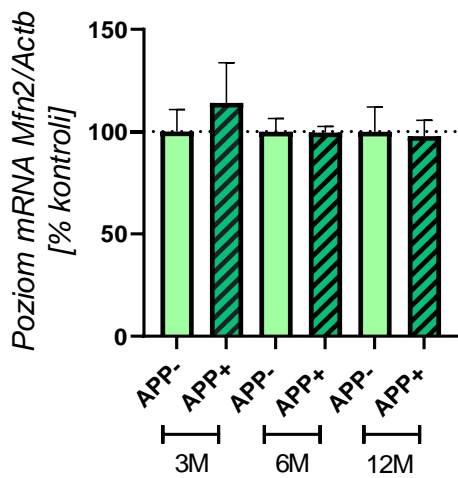
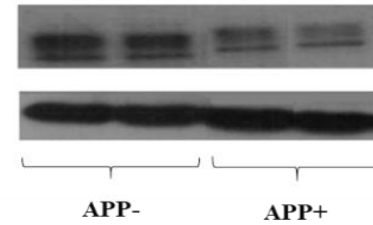
**Poziom mRNA genów kodujących białka dynamiki mitochondriów oraz poziom immunoreaktywności tych białek w korze myszy transgenicznych z chA (APP+) i kontrolnych (APP-)**

Mutacja genu APP typu londyńskiego u myszy 3 i 6 miesięcznych pozostawała bez zmian na ekspresję genów kodujących białka fuzji mitochondriów w korze mózgu 3 i 6 miesięcznych myszy, natomiast spowodowała obniżenie ekspresji genu *Mfn1* u 12 M myszy. Stwierdzono jednak brak zmian w poziomie genu dla *Mfn2* u 12 miesięcznych myszy (APP+) *versus* (APP-). Równocześnie wykazano znaczne podwyższenie ekspresji genu *Opal* u myszy 3 i 6 miesięcznych. Wyniki kolejnych badań demonstrują znaczny wzrost ekspresji genu *Dnm1* kodującego białko zaangażowane w rozszczepienie mitochondriów u transgenicznych 6 M myszy (APP+) *versus* (APP-). Zaobserwowano również podwyższenie transkrypcji genu *Fis1* w korze myszy 3 i 6 miesięcznych (APP+) *versus* (APP-). W przeprowadzonych badaniach poziom mRNA dla *Dnm1* i *Fis1* w korze mózgu myszy 12 miesięcznych (APP+) był zbliżony do obserwowanego u myszy (APP-). Podobnie jak nie towarzyszyły zmiany poziom immunoreaktywności tych białek kodowanych przez wymienione dla tych badane geny u 12 M myszy z mutacją londyńską.



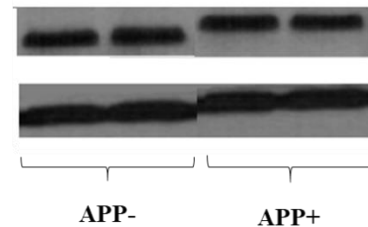
Mfn1 75 kDa

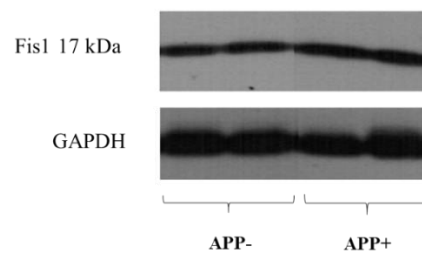
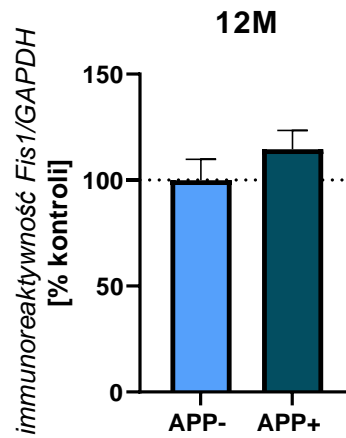
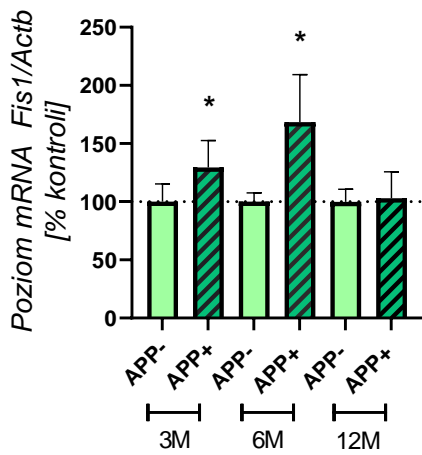
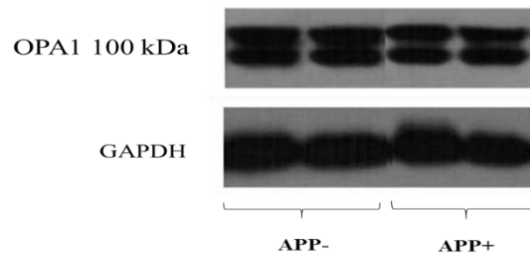
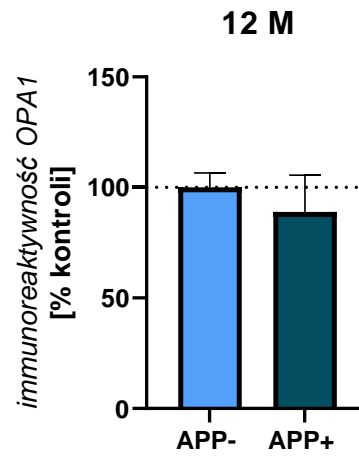
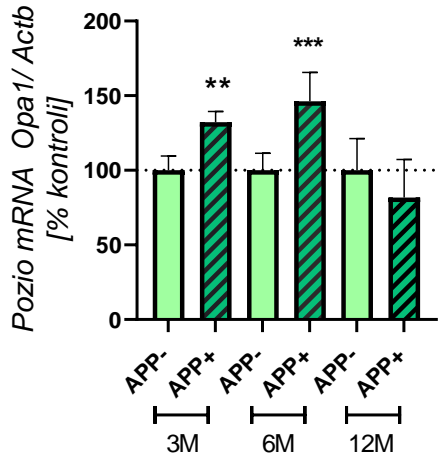
GAPDH

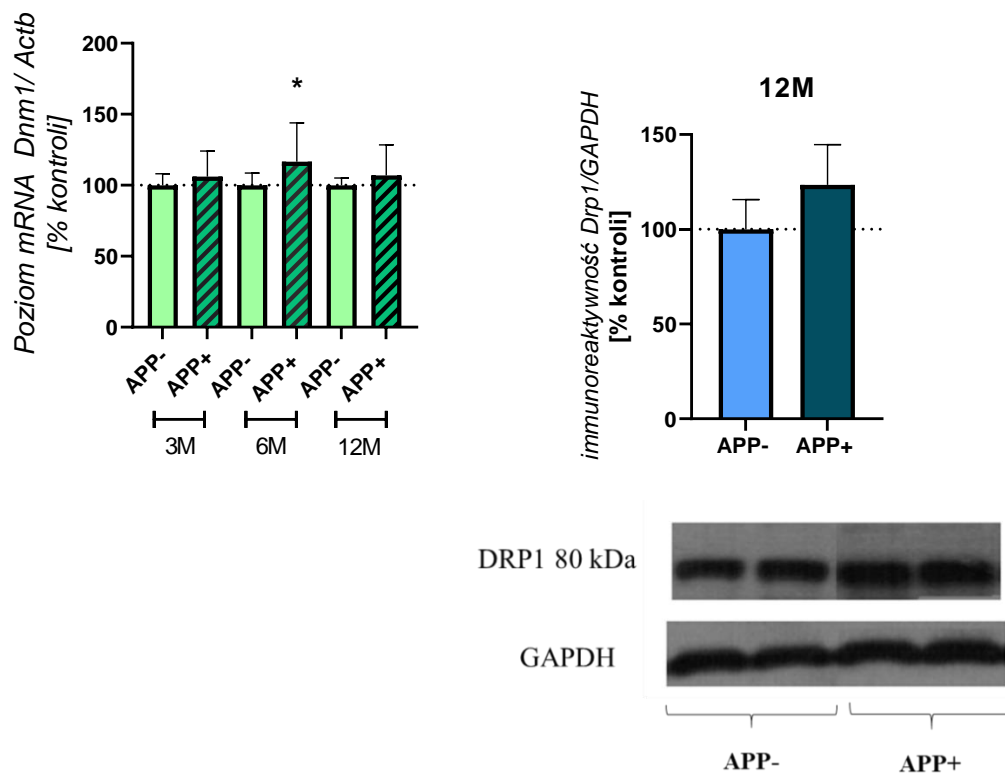


Mfn2 75 kDa

GAPDH





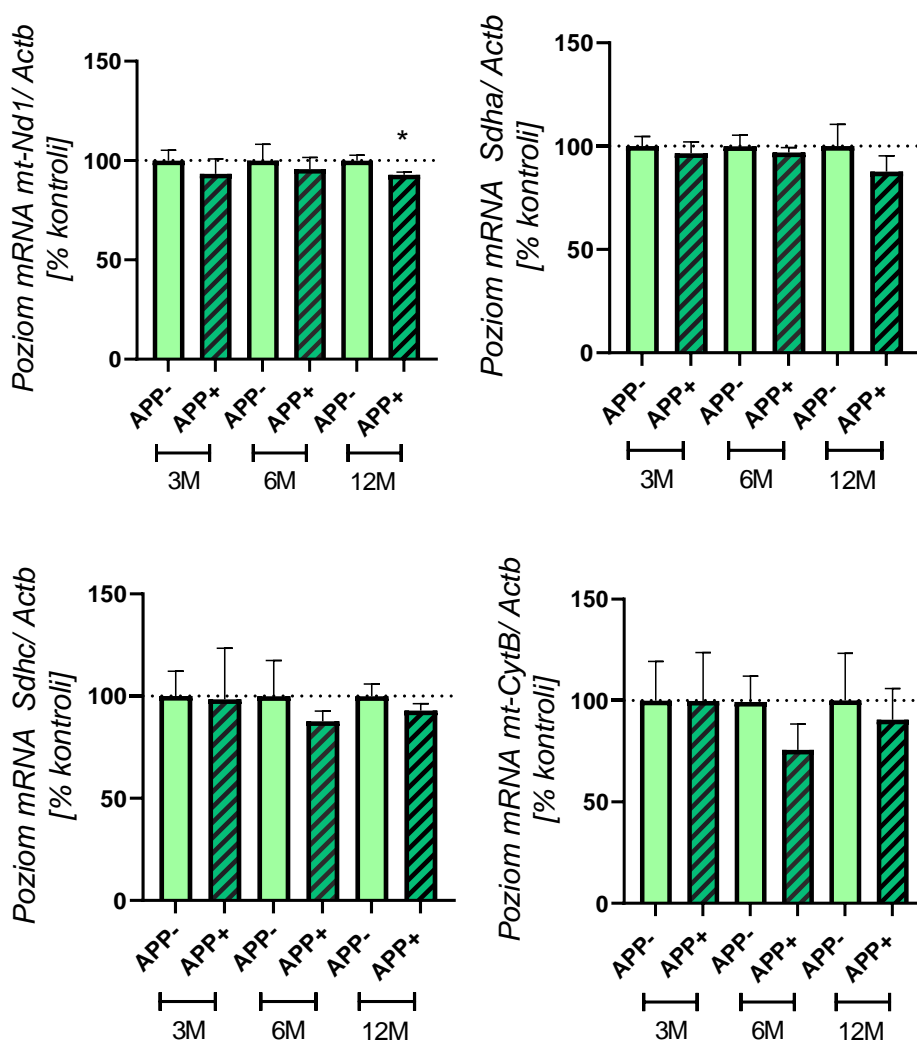


**Wykres 12. Analiza ekspresji genów kodujących białka dynamiki mitochondriów oraz poziom immunoreaktywności tych białek w korze myszy transgenicznych z chA (APP+) i kontrolnych (APP-).**

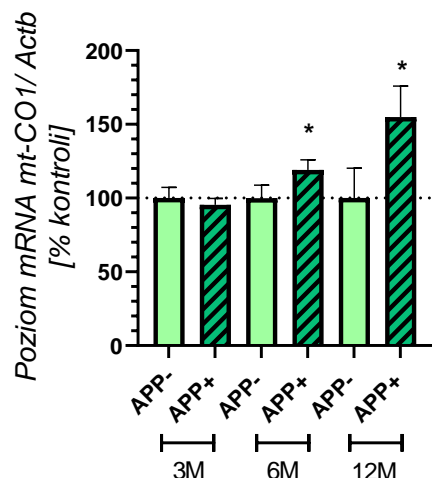
Ekspresja genów: *Mfn-1*, *Mfn-2*, *OPA1*, *Fis1*, *Dnm1* mierzono z zastosowaniem metody qRT-PCR. Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (Actb). Immunoreaktywność tych białek w korze mózgu myszy transgenicznych FVB, 12 miesięcznych badano metodą immunochemiczną - Western blot. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH. Wyniki stanowią średnią arytmetyczną z 6 niezależnych doświadczeń  $\pm$ SEM. Obok wykresów zamieszczono przykładowe wyniki western blot. Do oceny statystycznej zastosowano test t-Studenta,  $p^* < 0,05$ ;  $p^{**} < 0,01$ ;  $p^{***} < 0,001$  – różnica istotna statystycznie.

## Poziom mRNA genów kodujących białka podjednostek kompleksów oddechowych łańcucha transportu elektronów (ETC) w korze myszy transgenicznych z chA (APP+) i kontrolnych (APP-)

Badania poziomu mRNA wybranych podjednostek kompleksów oddechowych łańcucha transportu elektronów w korze myszy (APP+) wykazały nieznamiennie obniżenie ekspresji genów kodujących podjednostki kompleksu I, II i III w korze 6 i 12 miesięcznych myszy i znamienne obniżenie ekspresji podjednostki kompleksu I (*mt-Nd1*) u 12 miesięcznych myszy (APP+) *versus* (APP-). Zmianom tym towarzyszył wzrost ekspresji genu kodującego podjednostkę kompleksu IV ETC (*mt-COI*) w korze mózgu 6 i 12 miesięcznych myszy (APP+) w porównaniu z kontrolą (APP-).





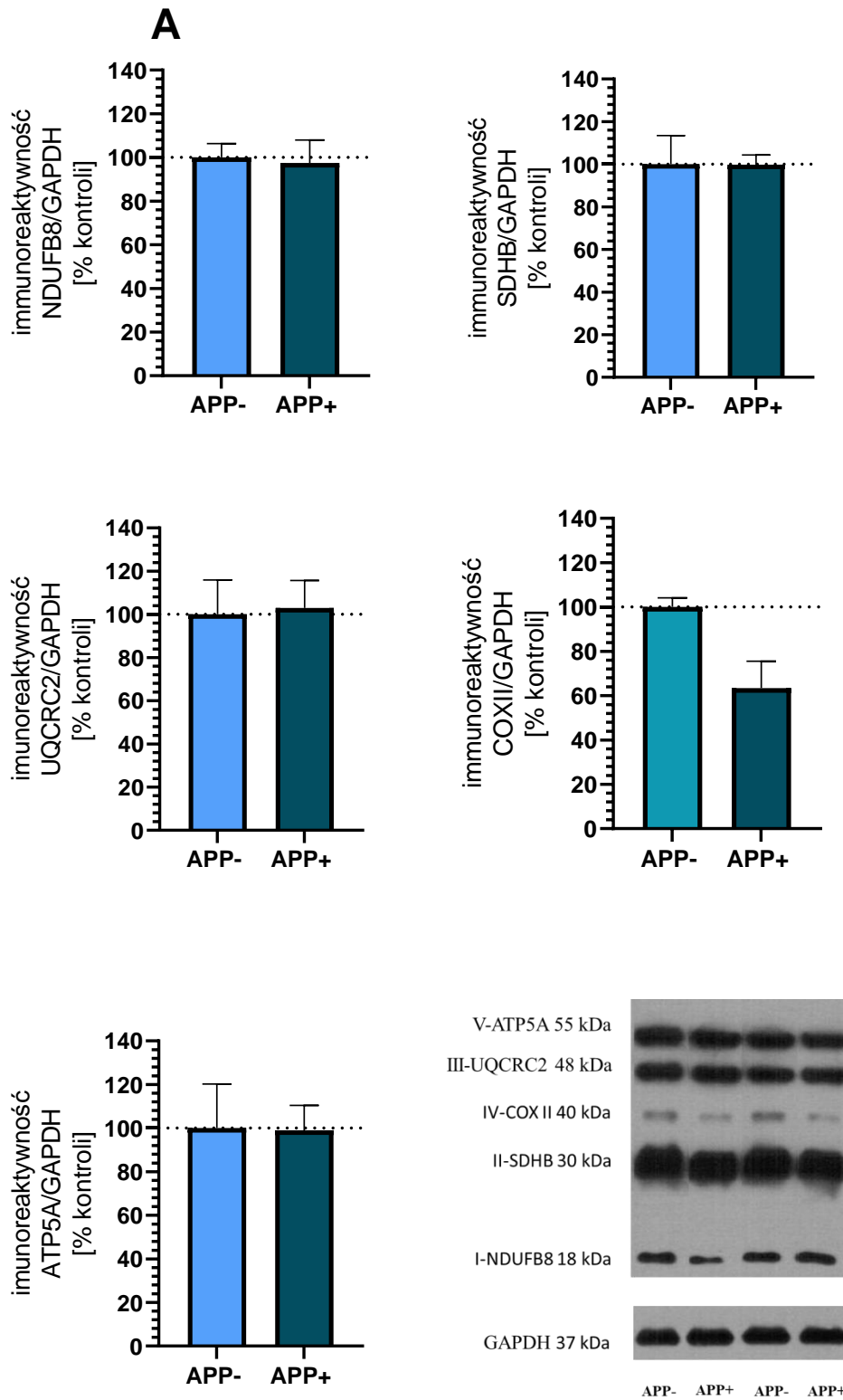


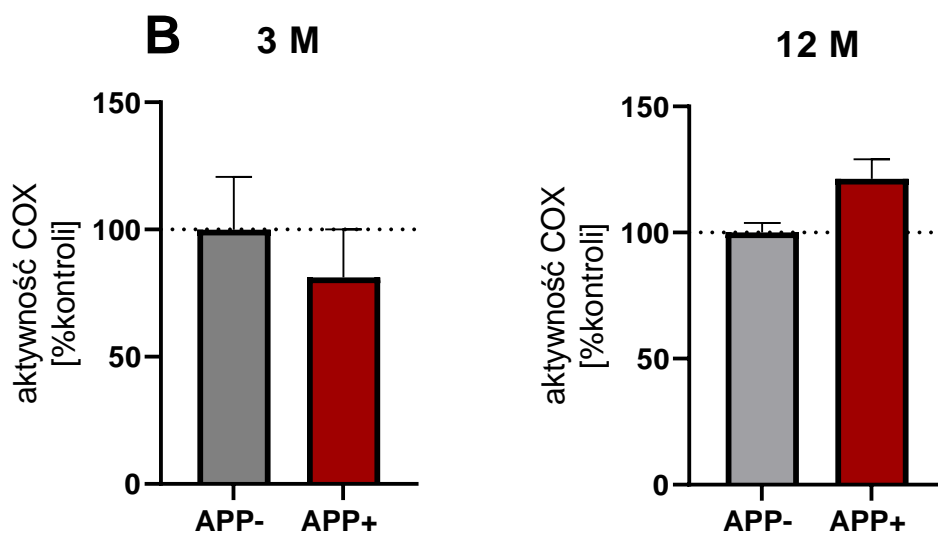
**Wykres 13. Analiza ekspresji genów kodujących białka podjednostek kompleksów oddechowych łańcucha transportu elektronów (ETC) w korze myszy transgenicznych z chA (APP+) i kontrolnych (APP-).**

Ekspresja genów: *mt-Nd1*, *Schab*, *Sdhc*, *mt-CytB*, *mt-CO1* mierzono z zastosowaniem metody qRT-PCR. Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (*Actb*). Wyniki stanowią średnią arytmetyczną z 6 niezależnych doświadczeń  $\pm$ SEM. Obok wykresów zamieszczono przykładowe wyniki western blot. Do oceny statystycznej zastosowano test t-Studenta,  $p^* < 0,05$  – różnica istotna statystycznie.

### **Poziom immunoreaktywności wybranych białek podjednostek kompleksów ETC w korze myszy transgenicznych z chA (APP+) i kontrolnych (APP-) oraz aktywność cytochrom C-oksydazy (COX)**

W kolejnych badaniach ograniczono się wyłącznie do oznaczenia poziomu immunoreaktywności kolejnych podjednostek kompleksów oddechowych ETC takich jak podjednostka kompleksu I- NDUFB8, kompleksu II -SDHB, kompleksu III- UQRC2 i kompleksu IV-COXII oraz kompleksu V -ATP5A. Uzyskane wyniki wykazały zbliżony poziom immunoreaktywności dla badanych podjednostek w korze mózgu myszy (APP+) oraz (APP-). Z jednym wyjątkiem podjednostki kompleksu IV, COXII, gdzie stwierdzono obniżenie poziomu immunoreaktywności w korze mózgu myszy (APP+) *versus* (APP-) o wartości bliskiej znamienności statystycznej (Wyk. 14A). Badanie aktywności cytochrom C oksydazy wykazały niewielki wzrost aktywności, statystycznie nieznamienny w korze mózgowej 12 miesięcznej myszy (APP+) *versus* (APP-) (Wyk. 14B).





**Wykres 14. Poziom immunoreaktywności białek podjednostek kompleksów oddechowych łańcucha transportu elektronów (ETC) (A) oraz aktywność cytochromu C oksydazy (COX) (B) w korze myszy transgenicznych z chA (APP+) i kontrolnych (APP-).**

**A.** Immunoreaktywność białek kompleksów ETC badano w korze mózgu myszy transgenicznych FVB, 12 miesięcznych badano metodą Western blot. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH. Obok wykresów zamieszczono przykładowe wyniki western blot. **B** Aktywność COX u 3 i 12 M oznaczono zgodnie z opisem w „Materiałach i metodach”. Wyniki stanowią średnią arytmetyczną z 6 niezależnych doświadczeń  $\pm$ SEM. Obok wykresów zamieszczono przykładowe wyniki western blot. Do oceny statystycznej zastosowano test t-Studenta,  $p^* < 0,05$  – różnica istotna statystycznie.

---

## DYSKUSJA

Pomimo wielu lat intensywnych badań, etiologia i patomechanizm chA nie są poznane a terapia jest nieskuteczna. Choroba ta jest najcięższą formą otępienia i obecnie cierpi na nią około 30 milionów ludzi na świecie. Liczne badania w znakomitych ośrodkach naukowych zmierzają do zrozumienia przyczyn tej choroby a przede wszystkim jej sporadycznej postaci, która dotyczy 90% osób dotkniętych tą chorobą. Ponadto istotnym zagadnieniem jest lepsze zrozumienie mechanizmu działania peptydów A $\beta$  i innych białek, które zmieniają swoją konformację i odkładają się w zarówno w rodzinnej jak i sporadycznej postaci tej choroby. Badania zmierzają nie tylko do zrozumienia patomechanizmu ich działania, ale przede wszystkim znalezienia nowych obiecujących celów dla terapii tej choroby. Iskierką nadziei na jej poprawę przynajmniej w około 50% przypadków (sporadycznej postaci chA) było zatwierdzenie przez FDA w 2021 roku, po 20 latach badań przeciwciała skierowanego przeciw peptydom A $\beta$  (aducanumab) pomimo wielu kontrowersji i sprzeciwów (Dunn i wsp., 2021; Salloway i Cummings, 2021).

Przez ostatnie dekady hipoteza kaskady amyloidowej zdominowała obszar badań nad chA (Hardy i Selkoe, 2002; Walsh i Selkoe, 2016). Dzięki trwającym debatom na temat tej hipotezy i w świetle ostatnich badań klinicznych opartych na usuwaniu A $\beta$ , wciąż pojawiają się nowe dowody na poparcie tezy. Brak równowagi między produkcją a usuwaniem peptydów A $\beta$  jest zdarzeniem inicjującym procesy patogenne chA (Hempel i wsp., 2021). Nieprawidłowa akumulacja  $\beta$  amyloidu ostatecznie prowadzi do tworzenia blaszek starczych i splątków neurofibrylarnych, dwóch patologicznych cech charakterystycznych w chA. Stwierdzono, że najbardziej toksyczną formą A $\beta$  jest A $\beta$ <sub>1-42</sub> oraz jego oligomery. Liczne badania wykazały, że agregaty A $\beta$ , zwłaszcza rozpuszczalne oligomery, zaburzają zarówno funkcję, jak i strukturę synaps (Kokubo i wsp., 2005; Wilcox i wsp., 2011) i prowadzą do degeneracji neuronów, ich obumierania oraz upośledzenia pamięci (Selkoe i Hardy, 2016). Dlatego też jedną z głównych hipotez nadającej kierunek badań przedstawiony w tej rozprawie była analiza znaczenia

---

peptydów A $\beta$  na właściwości antyoksydacyjne komórek i funkcję mitochondriów w modelach doświadczalnych chA *in vitro* i *in vivo*.

Od wielu lat dyskutowana jest również rola zaburzeń mitochondrialnych w rozwoju chA i innych chorób neurodegeneracyjnych (Moriera i wsp., 2010; Cai i Tammineni, 2016; Cabez-Opazo i wsp., 2015; Swerdlow i wsp., 2014; Swerdlow i wsp., 2018; Spuch i wsp., 2012). Toczy się nadal ożywiona debata na temat tego, czy dysfunkcje mitochondriów są przyczyną, konsekwencją czy skutkiem ubocznym zmian patologicznych w tkance neuronalnej. Hipoteza mitochondrialna chA łączy się ściśle z hipotezą metaboliczną, która w ostatnich latach przeżywa renesans ze względu na wyniki badań nad metabolizmem glukozy i w cukrzycy typu II i wykazaniem, że choroba ta stanowi istotne ryzyko rozwoju chA. Wiadomo, że mitochondria oprócz dobrze znanego udziału w metabolizmie glukozy w cyklu Krebsa i syntezie ATP, a więc w procesach energetycznych są również niezbędne do regulacji innych ważnych funkcji komórkowych takich jak synteza pirymidyn i puryn, produkcja steroidów, synteza hemu, regulacja bilansu azotowego poprzez cykl mocznikowy, produkcja ciał ketonowych, przetwarzanie ksenobiotyków, równowaga redoks i udział w apoptozie (Lukyanova, 2019). W ostatnich latach coraz bardziej widoczna staje się różnorodność uszkodzeń mitochondriów w chA (Ohhta i Ohsawa, 2006; Wilkins i Swerdlow, 2018). Na uwagę zwracają dane dotyczące translokacji A $\beta$  do mitochondriów i jego udział w wiązaniu się z białkami mitochondrialnymi, aktywnymi w wytwarzaniu wolnych rodników. Ponadto istotne są zaburzenia interakcji mitochondriów z strukturami wewnątrzkomórkowymi np. z siateczką śródplazmatyczną, z jądrem komórki. Peptydy A $\beta$  mogą wpływać i aktywować mitochondrialne szlaki prowadzące do śmierci komórek w tkance neuronalnej. Jednak do chwili obecnej nie ma wystarczających danych dotyczących roli peptydów A $\beta$  w indukcji wczesnych zmian ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w regulację funkcji mitochondrialnych w komórkach i w mózгах alzheimerowskich w różnych ich obszarach. Dlatego też w badaniach swoją uwagę skupiłam na analizie ekspresji genów dla białek antyoksydacyjnych i mitochondrialnych w trzech liniach komórkowych poddanych działaniu oligomerów A $\beta$ <sub>1-42</sub> oraz w korze mózgu myszy transgenicznych z chA, 3, 6 i 12 miesięcznych.

---

W kontekście prowadzonych badań należy podkreślić, że poznanie dynamiki zaburzeń ekspresji genów kodujących białka mitochondrialne w warunkach toksyczności peptydów A $\beta$  i w chA jest bardzo istotne ponieważ mogą one mieć fundamentalne znaczenie w patogenezie/ patomechanizmie tej choroby. Stan funkcjonalny mitochondriów odgrywa ważną rolę nie tylko w bioenergetyce komórek i tkanek, ale również w ich reakcji na różne stresujące czynniki. (Picone i wsp., 2020). Mitochondria są ważnymi pośrednikami w przekaźnictwie sygnałów stresowych wchodzących do komórki. W odpowiedzi na stres mitochondria mogą regulować cykl komórkowy, interakcje międzykomórkowe i w krytycznej sytuacji wywołać apoptozę (Wallace, 2005). Pomimo, że patogeneza i patomechanizm chA jest wciąż niepoznany, duża liczba dowodów sugeruje, że uszkodzone mitochondria prawdopodobnie odgrywają fundamentalną rolę w patomechanizmie i w progresji chA. Uważa się, że zdrowa pula mitochondriów nie tylko wspiera aktywność neuronów poprzez dostarczanie wystarczającej ilości energii i utrzymanie innych funkcji mitochondrialnych, ale także chroni neurony poprzez minimalizowanie uszkodzeń oksydacyjnych. Mając to wszystko na uwadze, badanie mechanizmów zmian procesów zachodzących w mitochondriach w przebiegu chA może prowadzić do wskazania nowych obiecujących punktów uchwytu w terapii tej choroby (Wang i wsp., 2020).

Przedstawione w pracy wyniki dotyczą wpływu toksyczności oligomerów peptydu A $\beta$ <sub>1-42</sub> na transkrypcję genów kodujących białka mitochondrialne w trzech liniach komórkowych. Uwzględniono szczurze komórki PC12 *pheochromocytoma* rdzenia nadnerczy pochodzenia nerwowego, ludzkie komórki neuronalne - SH-SY5Y oraz mysie komórki mikrogleju-BV2. Ponadto badania prowadzono również na korze mózgowej uzyskanej z myszy transgenicznym FVB-Tg (APP LD2/B6) z wprowadzonym genem dla APP zawierającym mutację londyńską (Thy1; APP) Val717Ile. Model ten charakteryzuje zwiększony poziom A $\beta$ <sub>1-42</sub> i zaburzony stosunek A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub>, a także obecność wielu typowych objawów i cech choroby Alzheimera. Gromadzące się złogi A $\beta$  powodują w zaawansowanym stadium uszkodzenie mitochondriów oraz uwalnianie wolnych rodników (Moechars i wsp., 1999; Van Dorpe i wsp., 2000).

---

Z dostępnych danych literaturowych wiadomo, że stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w procesie starzenia oraz może być kluczowy w patomechanizmie chA. Stres oksydacyjny jest pomostem łączącym różne zjawiska i mechanizmy chA. Jest to proces powodujący uszkodzenie neuronów i przebiegający różnymi szlakami (Bai i wsp., 2022). Co więcej, wykazano również, że dysfunkcja mitochondriów i aktywacja mikrogleju może wzmacniać produkcję reaktywnych form tlenu (RFT), które następnie mogą przyczyniać się do progresji chA. W niniejszej rozprawie doktorskiej zbadano, jak oligomery A $\beta$  wpływają na ekspresję wybranych genów zaangażowanych w obronę antyoksydacyjną i funkcję mitochondriów w neuronalnych komórkach SH-SY5Y oraz w unieśmiertelnionych komórkach mikrogleju - BV2 w hodowli. W celu stwierdzenia czy w badanych modelach komórkowych dochodzi do wzrostu produkcji wolnych rodników w obecności oligomerów A $\beta$ O przeprowadzono eksperymenty z wykorzystaniem wskaźnika fluorescencyjnego (DCF). Zaobserwowano, że oligomery A $\beta$ <sub>1-42</sub> znacząco wpływały na poziom wolnych rodników w komórkach neuronalnych SH-SY5Y oraz PC12, ale nie miały wpływu na poziom ROS w komórkach mikrogleju BV2 w badanych czasach inkubacji 24 godz. W przedstawionej pracy stwierdzono również, że A $\beta$  znacząco przyczynia się do obniżenia żywotności wszystkich badanych komórek. W przypadku komórek PC12 zaobserwowano również wzrost komórek apoptotycznych zależny od czasu inkubacji z oligomerami peptydu A $\beta$ O.

W systemie obrony komórek przed stresem oksydacyjnym ważną rolę odgrywają enzymy antyoksydacyjne takie jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa (Kurtas, 2016). W przeprowadzonych badaniach stwierdzono znaczący ponad 4-krotny wzrost ekspresji genu kodującego SOD2 w komórkach BV2 poddanych działaniu oligomerów A $\beta$ <sub>1-42</sub> w porównaniu do komórek kontrolnych. SOD2 może być odpowiedzialny za ochronę tych komórek przed wzrostem poziomu wolnych rodników, w tej linii komórkowej poddanej działaniu A $\beta$ O. Regulacja równowagi redoks jest niezbędna dla prawidłowej funkcji komórek, i uważa się, że dysfunkcja mechanizmów leżących u podstaw równowagi redoks jest zaangażowana w procesy neurodegeneracji. Chociaż pozostaje niejasne, czy stres oksydacyjny jest główną przyczyną, czy jedynie konsekwencją dysfunkcji komórkowej związanej z neurodegeneracją (Andersen, 2004). Zgromadzone dane sugerują, że upośledzona funkcja energetyczna mitochondriów

---

i zwiększone uszkodzenie oksydacyjne mitochondriów mogą być wczesnymi zaburzeniami prowadzącymi do neurodegeneracji (Beal, 1996). Nadtlenek ( $O_2^{\cdot-}$ ), jeden z istotnych RFT wytwarzany w łańcuchu transportu elektronów w mitochondriach, bierze udział w różnych procesach biologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym (Maier i Chan, 2002). Dysmutazy ponadtlenkowe (SOD) to enzymy, które katalizują konwersję  $O_2^{\cdot-}$  do nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) i zapobiegają tworzeniu się kolejnych aktywnych rodników w reakcji  $O_2^{\cdot-}$ , np. z tlenkiem azotu (NO). Enzymy te są odpowiedzialne za ochronę komórek i tkanek przed kaskadą wolnorodnikową RFT. Mitochondria są zarówno głównym źródłem RFT, jak i głównym celem uszkodzenia komórek indukowanego przez wolne rodniki. Badania od dawna pokazują że stres oksydacyjny pochodzący od mitochondriów jest kluczowym wyzwalaczem uszkodzeń neuronów i ich śmierci charakteryzujących chA. Poziom antyoksydantów i aktywność SOD2 jest obniżona w mózgach pacjentów z chA (Omar i wsp., 1999). Uważa się, że mitochondrialny SOD2 odgrywa ważną rolę w obronie komórkowej przed uszkodzeniem oksydacyjnym przez RFT. Wcześniej wykazano, że SOD2 i SOD1 są kluczowe w dezaktywacji rodników ponadtlenkowych i tlenku azotu, zapobiegając tworzeniu się nadtlenoazotynów i dysfunkcji mitochondriów (Kirby i wsp., 2002; Lebovitz i wsp., 1996). Uzyskane w niniejszej rozprawie wyniki pokazują, że ekspresja genów kodujących kluczowe enzymy antyoksydacyjne SOD1 i SOD2 przebiega odmiennie w zależności od typu komórek. Ekspresja genu dla mitochondrialnego *Sod2* była prawie czterokrotnie wyższa po 24 godz. traktowania  $A\beta$ O w komórkach BV2, co może świadczyć o uruchomieniu mechanizmów obronnych w komórce zapobiegając przed wzrostem stresu oksydacyjnego o czym wspomniano powyżej. Natomiast ekspresja genu tego enzymu w komórkach neuronalnych SH-SY5Y była zahamowana. Uważa się, że deregulacja równowagi redoks bierze udział w starzeniu się i patogenezie chA (Kandlur i wsp., 2020). Badania Sasaki i wsp. (2011) pokazują, że myszy pozbawione SOD2 wykazywały zwiększoną ilość RFT w wyniku stresu oksydacyjnego w niedotlenieniu, co sugeruje że SOD2 odgrywa centralną rolę w eliminacji RFT (Sasaki i wsp., 2011).

W badaniach na komórkach PC12 stres oksydacyjny wywołany przez  $A\beta$  również indukuje obniżenie transkrypcji genów zaangażowanych w obronę antyoksydacyjną powodując zmniejszenie poziomu mRNA genów *Sod1* i *Sod2*, a także pozostałych



---

badanych genów kodujących enzymy antyoksydacyjne np. *Cat* po 96 godz. inkubacji z A $\beta$ O. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy mogą sugerować, że ekspresja genu *Sod2* w mikrogleju może odpowiadać za stwierdzany brak zmian w poziomie RFT w komórkach mikrogleju BV2 w warunkach toksyczności A $\beta$ O. Jednak toksyczność A $\beta$  znacząco wpływa na żywotność wszystkich typów komórek, co sugeruje, że różne mechanizmy mogą być odpowiedzialne za regulację szlaku przeżycia/śmierci tych komórek.

Wiadomo, że neurony są najbardziej podatnymi komórkami na uszkodzenia oksydacyjne, podczas gdy komórki mikrogleju i astrocyty są znacznie bardziej odporne (Lassmann i wsp., 2016). Uszkodzenia oksydacyjne są jednym z najwcześniejszych i najważniejszych zdarzeń w chA (Persson i wsp., 2014; Perry i wsp., 2002; Nunomura i wsp., 2001; Gella i Durany, 2009). Oligomery A $\beta$  zwiększają poziom wolnych rodników, zmieniają równowagę między procesami prooksydacyjnymi i antyoksydacyjnymi, prowadząc do zmian kinaz, prożyciowych szlaków sygnałowych, do upośledzenia funkcji neuronów i zwyrodnienia synaptycznego, na które wskazuje wiele badań, w tym przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej (Schmitt i wsp., 2012; Cieślik i wsp., 2015). W konsekwencji uszkodzenia oksydacyjne wywołane przez A $\beta$  mogą wpływać na funkcję czynników transkrypcyjnych i zmianę ekspresji genów, funkcję mitochondriów i integralność DNA. Wolne rodniki wywołują pęknięcia pojedynczej i podwójnej nici DNA, które z kolei mogą być odpowiedzialne za zwiększoną aktywację PARP-1 i akumulację poli(ADP-rybozy) (PAR) ważnej cząsteczki sygnałowej, która bierze udział w regulacji wielu czynników transkrypcyjnych. Ponadto PAR uczestniczy w przekazywaniu informacji pomiędzy jądrem komórkowym a mitochondriami. PAR może również przyczyniać się do zmian przepuszczalności błony mitochondrialnej i uwalniania czynnika indukującego apoptozę (AIF) oraz doprowadzić do apoptozy niezależnej od kaspaz (Dawson i Dawson, 2004; Fatokun i wsp., 2014). Wyniki analizy immunochemicznej przedstawione w pracy pokazują wzrost poziomu PAR w komórkach PC12 traktowanych A $\beta$ . Należy podkreślić, że PARP jest produktem aktywności enzymatycznej PARP-1, który jest ważnym enzymem maszynarii molekularnej biorącej udział w przebudowie chromatyny. Enzym ten reguluje replikację, transkrypcję i naprawę DNA oraz jest molekularnym regulatorem procesów przeżycia

---

i śmierci komórek (Park i wsp., 2020). Liczne badania wskazują, że PARP-1 jest zaangażowany w regulację ekspresji licznych genów poprzez liczne czynniki transkrypcyjne w tym NFκB, p53, PPARs oraz przez kilka innych mechanizmów (Strosznajder i wsp., 2012; Luo i Kraus, 2012). PARP-1 jest uważany jako epigenetyczny regulator plastyczności i pamięci (Zeng i wsp., 2016) i jego nadmierna aktywacja może odgrywać ważną rolę w zaburzeniach poznawczych (Jacewicz i wsp., 2009). Coraz więcej dowodów uzyskanych w różnych modelach eksperymentalnych sugeruje, że nadmierny wzrost aktywności PARP-1 może być kluczowym elementem molekularnych zaburzeń odpowiedzialnych za patogenezę chA (Mao i Zhang, 2021). Nadmierna aktywacja PARP-1 spowodowana masowym uszkodzeniem DNA może prowadzić do wyczerpania NAD<sup>+</sup>, który jest substratem dla PARPs a przede wszystkim dla PARP-1, który odpowiedzialny jest w ponad 90% za procesy poli(ADP-rybo) zylacji białek w mózgu. Ponadto NAD<sup>+</sup> jest również substratem Sirtuin, a wyczerpanie NAD<sup>+</sup> prowadzi nieuchronnie do zahamowania deacetylacji białek katalizowanej przez Sirtuinę. Dlatego zmiany ekspresji genów kodujących PARP-1 i wzrost jego aktywności mogą prowadzić do zaburzeń aktywności deacetylaz histonowych typu III, Sirtuin, których aktywność zależy od poziomu NAD<sup>+</sup>. Uważa się, że inhibitory PARP-1 są równocześnie najlepszymi aktywatorami Sirtuin, w tym SIRT1 (Bai i wsp., 2011). Poprzednie badania koncentrowały się na roli PARP-1 w śmierci i przeżyciu komórek w różnych warunkach stresowych (Strosznajder i wsp., 2012; Strosznajder i wsp., 2010). Badania te wykazały, że nadaktywacja PARP-1 prowadzi do śmierci komórek neuronalnych w hipokampie, a hamowanie PARP-1 znacząco chroni populację komórek neuronalnych po krótkim niedokrwieniu mózgu, ale nie po długotrwałym epizodzie niedokrwienia (Strosznajder i wsp., 2003). W przedstawionej rozprawie doktorskiej stwierdzono, że zahamowanie aktywności PARP-1 przez 24 godz. w znaczący sposób wpływa stymulująco na ekspresję genów zaangażowanych w obronę antyoksydacyjną zarówno w komórkach kontrolnych jak i traktowanych AβO, zwiększa poziom mRNA genów *Sod1*, *Gpx1* i *Gpx4* oraz wpływa znamienne stymulująco na transkrypcje genów kodujących podjednostkę kompleksu I, ECT i białka dynamiki mitochondriów w komórkach PC12 kontrolnych i w obecności AβO zwiększa poziom mRNA genów kodujących: OPA1, Mnf2 i Fis1. W przypadku komórek poddanych działaniu AβO hamowanie PARP-1 zwiększało ekspresję

---

geny *Sdha*, kodującą podjednostkę kompleksu oddechowego II. Natomiast w badaniach Lapucci i wsp. (2011) dotyczących działania inhibitora PJ34 w czasie 72 godz. inkubacji wykazano jego odmienne działanie. Rozbieżności mogą być związane z czasem hamowania PARP-1 (24 godz. w naszym badaniu *versus* 72 godz. opisanych przez Lappuciego i współpracowników). Jednak inne badanie wykazało, że farmakologiczne hamowanie PARP-1 również w czasie 72 godz. poprawia stan bioenergetyczny mitochondriów (Felici i wsp., 2014; Felici i wsp., 2015). Badania Martire i współpracowników (2016) pokazują, że aktywacja PARP-1 wpływa na dysfunkcję mitochondriów u transgenicznych myszy z chorobą Alzheimera oraz w komórkach traktowanych peptydami A $\beta$ . Aktywacja PARP-1 w tych warunkach doświadczalnych przyczynia się do deficytu bioenergetyki poprzez zmniejszenie poziomu oksydazy cytochromu C (IV), zużycia tlenu prowadzącego do istotnych zmian potencjału błony mitochondrialnej (MMP) oraz wpływa na modulację szlaku glikolitycznego poprzez aktywację kinazy pirogronianowej 2. Inhibitor PARP-1 wywierał tutaj działanie cytoochronne (Martire i wsp., 2016).

W przypadku naszych badań w stosowanych warunkach doświadczalnych, A $\beta$ O znacząco obniżył żywotność komórek PC12, a zastosowanie inhibitora PARP, (PJ34) nie chroniło komórek przed wzrostem produkcji RFT i nie miało wpływu na żywotność komórek poddanych działaniu peptydów A $\beta$ O przez 24 godz. Natomiast PJ34 obniżał żywotność komórek PC12 po 96 godz. inkubacji i dlatego nie był stosowany już w kolejnych doświadczeniach dotyczących transkrypcji genów w komórkach PC12 poddanych działaniu peptydów A $\beta$ O przez 96 godz. Stosowanie inhibitorów wymaga szczególnej uwagi i ostrożności przy doborze stężeń i czasu działania. Przedstawione w niniejszej pracy badania wskazują, że hamowanie PARP-1 przez PJ34 aktywuje ekspresję genów zaangażowanych w obronę antyoksydacyjną i regulację dynamiki mitochondriów (rozszczerzenie/fuzja). W opisanych badaniach nasze dane sugerują, że stres oksydacyjny wywołany przez A $\beta$ O (24 godziny) może indukować zmiany w ekspresji genów kodujących białka mitochondrialne i zaangażowane w obronę antyoksydacyjną oraz w rozszczerzenie i fuzję. W przeprowadzonych badaniach na komórkach PC12 wykazano, że w wyniku 96 godz. inkubacji z peptydami A $\beta$ O dochodzi do obniżenia transkrypcji genów (*Opa1*, *Mfn2*, *Dnm1*, *Fis1*) kodujących białka

---

zaangażowane w procesie rozszczepienia i fuzji mitochondriów. Wyniki świadczą, że efekt toksyczności A $\beta$ O zależy ściśle od czasu działania. Ponadto uzyskane dane wskazują na szczególną wrażliwość genów zaangażowanych w proces transkrypcji białek dynamiki mitochondriów na toksyczność A $\beta$ O (w komórkach PC12).

W badaniach na innych liniach komórkowych zaobserwowano, że w przypadku komórek BV2 A $\beta$ O w czasie 24 godz. powoduje obniżenie genu *Mfn2* i pozostaje bez wpływu na pozostałe białka dynamiki mitochondrialnej. Stwierdzono także, że A $\beta$ O w komórkach neuronalnych (SH-SY5Y i PC12), nie wywiera istotnego wpływu na badane białka zaangażowane w procesy rozszczepienia i fuzji mitochondriów w czasie 24 godzin.

Ponadto wyniki badań dotyczące toksyczności peptydów A $\beta$  wskazują na niższą ekspresję genu badanych podjednostek kompleksu I (*mt-Nd1*) i II (*Sdha*) ETC w komórkach mikrogleju BV2 traktowanych A $\beta$ O. Istotne zmiany zaobserwowano po krótkotrwałej inkubacji (24 godziny). Natomiast istotna aktywacja ekspresji genu *Sod2* w komórkach BV2 może sugerować, że jest to element mechanizmu chroniącego mitochondria przed RFT generowanymi przez toksyczności A $\beta$ O. Analiza ekspresji genów podjednostek ETC w komórkach SH-SY5Y wykazała niższy poziom mRNA dla podjednostki kompleksu II (*Sdha*) po 24 godz. traktowania A $\beta$ O. Na uwagę zasługuje brak zmian ekspresji genów dla podjednostki IV kompleksu ETC oraz brak wpływu A $\beta$ O na aktywność oksydazy cytochromu C w badanych liniach komórkowych. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o udziale tego genu w dążeniu do utrzymywania funkcji ETC po 24 godz. inkubacji z A $\beta$ O, pomimo stwierdzanej obniżonej żywotności komórek.

Aktywność oksydazy cytochromu C w komórkach BV2 była trzykrotnie wyższa w porównaniu do aktywności tego enzymu w komórkach SH-SY5Y. Poprzednie dane wykazały, że kompleks IV jest zmieniony w mózgach z chA. Stwierdzono, że aktywność oksydazy cytochromu C (COX) jest istotnie obniżona w mózgach autopsyjnych uzyskanych od pacjentów z zaawansowaną chA w porównaniu do wartości kontrolnych (wiekowo odpowiednich) uzyskanych w badaniach mózgow *post mortem* od osób zdrowych (Mosconi i wsp., 2011). Badania *in vitro* wykazały z kolei, że hamujący wpływ A $\beta$ <sub>1-42</sub> na aktywność COX jest zależny od obecności jonów Cu<sup>2+</sup> (Crouch i wsp., 2006;

---

Crouch i wsp., 2005). Efekt ten wydaje się być specyficzny dla jonów miedzi, ponieważ nie zaobserwowano go w obecności  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ . Zależne od miedzi hamowanie COX przez  $\text{A}\beta_{1-42}$  wymaga zredukowania metioniny-35 i wydaje się być zależne od zdolności  $\text{A}\beta$  do wiązania i redukcji  $\text{Cu}^{2+}$ .

Kolejne moje doświadczenia prowadzone na mysim modelu choroby Alzheimera pokazały znaczące zmiany w ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w obronę antyoksydacyjną i dynamikę mitochondriów w korze mózgowej myszy (APP+) w porównaniu z myszami kontrolnymi bez transgeny (APP-, wiekowo odpowiednimi). Najistotniejsze przedstawione w tej pracy zmiany dotyczą ekspresji genów kodujących *Sirt1* i *PARP-1*, enzymów zależnych od NAD, które obecne są głównie w jądrze komórkowym, ale również zlokalizowane w mitochondriach. Sirtuiny i PARP-1 wykorzystują  $\text{NAD}^+$  jako substrat i zaproponowano, że inhibitory PARP są najlepszymi aktywatorami Sirtuin (Bai i wsp., 2011). W mysim modelu chA stwierdzono zmiany ekspresji genu kodującego PARP-1, obniżenie u 3 M i większy wzrost poziomu mRNA w korze myszy transgenicznych- 6 M z chA, natomiast transkrypcja genu dla pozostałych dwóch PARPs związanych z DNA czyli PARP-2 i PARP-3 nie ulegała zmianie. Stwierdzony zmiany t ekspresji genu kodującego PARP-1 mogą w istotny sposób modyfikować funkcje tego enzymu w tym jego udział w procesach naprawy DNA. Należy jeszcze raz podkreślić, że PARP-1 w mózgu jest odpowiedzialny istotnie za proces poli (ADP) rybozylacji białek i za epigenetyczne modyfikacje. Dla obu rodzin enzymów (18 enzymów PARPs i 7 enzymów Sirtuin) NAD syntetyzowany w mitochondriach jest substratem, wobec tego dodatkowo ma to istotny wpływ na energetykę komórki (bowiem synteza 1 cząsteczki NAD wymaga 3 cząsteczek ATP).

Przedstawione tutaj badania wykazały znaczące obniżenie ekspresji genów dla *Sirt1* u 3 i 12 miesięcznych myszy transgenicznych. Ponieważ SIRT1 jest najlepiej zbadanym i najważniejszym członkiem z rodziny Sirtuin, obniżenie poziomu transkrypcji tego enzymu we wczesnych stadiach chA może odgrywać ważną rolę w progresji patologii chA (Jęsko i wsp., 2017; Jęsko i Strosznajder, 2016). Obniżenie to może prowadzić do zaburzeń homeostazy pomiędzy nieamyloidogennym szlakiem degradacji APP poprzez sekretazę- $\alpha$  a amyloidogennym szlakiem zależnym od działania

---

sekreazy- $\beta$ , co w konsekwencji może prowadzić do nadmiernego uwalniania peptydów A $\beta$  (Jęsko i wsp., 2017). W ostatnich 2 dziesięcioleciach opublikowano wiele badań dotyczących Sirtuiny 3 zlokalizowanej w mitochondriach i jej roli w procesie starzenia się i neurodegeneracji (Kincaid i wsp., 2013; Bell i wsp., 2011). Obie Sirtuiny, SIRT1 i SIRT3 kontrolują funkcję mitochondriów i enzymy antyoksydacyjne poprzez deacetylację np. SOD2, Gpx, PGC-1 $\alpha$  (Kincaid i wsp., 2013; Jęsko i Strosznajder, 2016; Jęsko i wsp., 2017). Szlak NAD/Sirtuina wpływa również na długość życia i sugeruje się, że aktywacja Sirtuin z wyjątkiem Sirtuiny 2, może chronić mózg przed neurodegeneracją (Jęsko i wsp., 2017; Jiang i wsp., 2014; Polito i Albani, 2017; Van Bulck i wsp., 2019). Również poprzednie wyniki wykazały, że inhibitor PARP-1 wzmacnia ekspresję *Sirt1*, *Sirt4* i *Sirt6* w komórkach kontrolnych oraz *Sirt1* również w warunkach toksyczności A $\beta$ O (Wencel i wsp., 2018). Hamowanie PARP-1 może bowiem wywierać działanie cytoochronne poprzez aktywację ekspresji *Sirt1* i *Sirt6* (Wencel i wsp., 2018). Stosunkowo mało wiemy o roli SIRT4 i SIRT5 pozostałych dwóch z spośród trzech mitochondrialnych Sirtuin w procesie starzenia i w chA. Odpowiedź mitochondriów na stres oraz rola SIRTs i PARPs fakt, że nie jest w pełni wyjaśniona do chwili obecnej. Ostatnie badania wskazują na istotne znaczenie kompleksowej odpowiedzi mitochondriów na stres określanej jako mitochondrialna odpowiedź zintegrowana na stres mitolSR (*ang. mitochondrial integrated stress response, ISR*), która jest składową bardziej całościowej zintegrowanej odpowiedzi komórki na stres. Odpowiedź ta z kolei wymaga udziału interakcji wielu enzymów i czynników transkrypcyjnych regulujących odpowiedź mitochondriów (Kaspar i wsp., 2021). Te złożone procesy wykraczają znacznie poza zakres prezentowanych badań, ale powinny być pomocne w ocenie skomplikowanej odpowiedzi mitochondriów na stres w tym również w przebiegu chA. Niemniej jednak niezależnie od złożoności procesu odpowiedzi na stres bardzo ważne jest poznanie dynamiki zmian transkrypcji genów zaangażowanych w obronę antyoksydacyjną i funkcje mitochondriów we wczesnych stadiach chA w korze mózgu i innych częściach mózgu. Dalsze intensywne badania prowadzone są w celu odpowiedzi jakiej natury są zachodzące zmiany i które z nich mogą być pierwotne a które są konsekwencją innych zjawisk. Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki badań mają na celu podjęcie próby odpowiedzi na to pytanie.

---

Funkcjonowanie mózgu w sposób krytyczny opiera się na syntezie ATP przez kompleksy oddechowe w ETC w mitochondriach. W niniejszym badaniu transkrypcja genów kodujących podjednostki kompleksów oddechowych zaangażowanych w ETC w korze mózgu myszy z chA była, obniżona, ale w żadnym przypadku nie osiągnęła znamienności statystycznej z jednym wyjątkiem znacznego podwyższenia ekspresji genu kodującego podjednostkę kompleksu IV (*mt-COI*), prawdopodobnie w wyniku mechanizmu kompensacyjnego dla zmian we wszystkich pozostałych kompleksach, a także w reakcji na obniżony poziom immunoreaktywności białka podjednostki COX II kompleksu IV stwierdzony w korze mózgowej myszy z chA porównaniu z kontrolami. W mózgu pacjentów z chA (badanych *post mortem*) zaobserwowano obniżenie aktywności oksydazy cytochromu C. Należy jednak podkreślić, że dotyczy to późnych zaawansowanych etapów choroby (Mauer i wsp., 2000). Ponieważ wykazano, że peptydy A $\beta$  mają zarówno pozytywny jak i negatywny wpływ na poziom produkcji RFT w chA, dogłębne poznanie zjawisk molekularnych odpowiedzialnych za zaburzenia ekspresji genów kodujących białka mitochondrialne jest kluczem do zrozumienia rozwoju zmian patologicznych w tej chorobie. Pomimo wielu badań w dalszym ciągu wyjaśnienia wymagają mechanizmy działania oligomerów peptydów A $\beta$ <sub>42</sub>.

Nieodłącznie ze stresem oksydacyjnym wywołanym przez peptydy A $\beta$ O łączą się zaburzenia aktywności PARP-1, Sirtuin i obniżona funkcja enzymów antyoksydacyjnych oraz nieprawidłowa dynamika mitochondrialna w chA (Wang i wsp., 2020). Zjawiska te mogą leżeć u podłoża początkowej fazy chA, która rozpoczyna się na lata przed pojawieniem się blaszek A $\beta$  i deficytów poznawczych (Styr i Slutsky, 2018). Ostatnie badania sugerują, że dysfunkcja mitochondriów (Wang i wsp., 2020) oraz nieprawidłowa transmisja synaptyczna (Hardy i Selkoe, 2002; Styr i Slutsky, 2018) występują we wczesnym stadium choroby i wyprzedzają pojawienie się nieprawidłowości histopatologicznych lub klinicznych. Dlatego identyfikacja wczesnych zmian mitochondrialnych i synaptycznych w prodromalnej/wczesnej fazie chA ma ogromne znaczenie dla opracowania lepszych narzędzi diagnostycznych i skuteczniejszych interwencji terapeutycznych. Dużą uwagę przywiązuje się do badań dynamiki mitochondriów i jej znaczenia w patomechanizmie chA. Dane sugerują się, że zmiany organizacji sieci mitochondrialnej mogą przyczynić się do powstawania

---

i rozwoju tej choroby (Burte i wsp., 2015). Wykazano, że zaburzenia równowagi pomiędzy procesami fuzji i fragmentacji (rozszczenia) mitochondriów wpływają na niewłaściwą organizację sieci mitochondrialnej i mogą być przyczyną licznych zaburzeń metabolicznych w chA. Dokładna równowaga między procesem fuzji i rozszczenia jest utrzymywana przez mitochondrialne białka błonowe, GTPazy, takie jak OPA1 i Mfn1/2. Mutacje w tych białkach prowadzą do wadliwej sieci mitochondrialnej, powodując liczne zaburzenia bioenergetyki, zakłócają kontrolę jakości białek oraz proliferacji mitochondriów (Burte i wsp., 2015). Wiele współczesnych badań wskazuje, że obserwowane w chA zaburzenia metabolizmu białka APP mogą być odpowiedzialne za dysfunkcję mitochondriów, w szczególności ich fuzji i rozszczenia (Lee i wsp., 2022; Lopez Sanchez i wsp., 2019). Zgodnie z danymi literaturowymi zaburzenie metabolizmu energetycznego poprzedza kliniczny początek chA, a dysfunkcja mitochondriów została uznana za wczesną i znaczącą cechę choroby (Swerdlow, 2018; Wang i wsp., 2014), co sugeruje kluczową ich rolę w patogenezie chA. Dlatego też niniejsza rozprawa doktorska ma na celu analizę ekspresji genów dla białek mitochondrialnych w warunkach toksyczności A $\beta$ <sub>1-42</sub> w trzech różnych liniach komórkowych oraz w korze mózgu myszy transgenicznych, aby lepiej zrozumieć mechanizmy molekularne leżące u podstaw dysfunkcji mitochondriów w chA i wskazać nowe cele dla przyszłego rozwoju terapii.

Zaobserwowane w naszych badaniach zaburzenia funkcji mitochondriów w wyniku zwiększonego metabolizmu białka APP w mózgach myszy transgenicznych w różnych przedziałach wiekowych wykazało, że istotne zmiany w zaburzeniach dynamiki mitochondrialnej dotyczą szczególnie początkowej fazy choroby. W przeprowadzonych doświadczeniach zaprezentowanych w naszych badaniach zaobserwowaliśmy aktywację ekspresji genu *Fis1* u 3 i 6 miesięcznych myszy z chA i wzrost ekspresji genu kodującego Drp1 w korze myszy 6 M z chA. Z kolei w przypadku myszy 12 M stwierdzono obniżoną ekspresję genu *Mfn1*. Wyniki te korespondują z badaniami na komórkach neuronalnych uzyskanych z transgenicznego (Tg2576) mysiego modelu chA, gdzie poziom genu i białka *Fis1* są istotnie podwyższone, natomiast poziom genu *Mfn1* były obniżone (Calkins i wsp., 2011). W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano również zwiększenie ekspresji genów kodujących białko OPA1, biorącego



---

udział w fuzji mitochondriów u 3 M i 6 M myszy z chA. Podwyższony poziom mRNA genu kodującego *OPA1* w naszych badaniach może sugerować aktywację procesu kompensacyjnego lub ochronnego. Bowiem jak pokazały inne doniesienia literaturowe ekspresja genu *OPA1* jest niezbędna aby chronić komórki przed apoptozą. Badania poprzednich lat pokazują, że nadekspresja genu *OPA1* zapobiega rozszczepieniu mitochondriów i chroni komórki przed śmiercią apoptotyczną zachodzącą na szlaku mitochondrialnym, ale nie przed apoptozą indukowaną przez szlak receptorowo zależny (Frezza i wsp., 2006). Jednak badania ukazują również, że *OPA1* wymaga *Mfn1* a nie *Mfn2* do zainicjowania fuzji mitochondrialnej. W naszych badaniach jak wspomniano powyżej podwyższone poziomy ekspresji genu *OPA1* mogą świadczyć, że komórki starają się dostosować do obniżonej transkrypcji genów kodujących białka fuzyjne w tym *Mfn1*. Również jak pokazują badania *in vitro*, w których zastosowano komórki M17 lub Na2 z nadekspresją prekursora peptydu A $\beta$  typu dzikiego (A $\beta$ PP) lub zawierającego mutację szwedzką (A $\beta$ PPsw), zwiększona akumulacja A $\beta$  powodowała obniżenie poziomu ekspresji genu *Mfn1*, *Mfn2* oraz *OPA1*, podczas gdy poziom ekspresji genu *Fis1* uległ zwiększeniu, czemu towarzyszyła fragmentacja mitochondriów i zmniejszenie ich liczby (Wang i wsp., 2008a; Park i wsp., 2015). Te przedstawione wyniki sugerują zaburzenie czyrównowagi między procesem rozszczepienia i fuzji mitochondriów.

W przedstawionym manuskrypcie pracy doktorskiej wykazano również podwyższony poziom ekspresji genu *Dnm1* w korze mózgowej 6 M myszy z chA, bez zmian ekspresji w przypadku 3 i 12 miesięcznych. Te rozbieżności w poziomach mRNA genu kodującego *Drp1* w różnym wieku mogą być również zależne od płci zwierząt i modyfikacji funkcji licznych czynników w tym transkrypcyjnych w różnym wieku. Podobne wyniki uzyskane zostały w mitochondriach z kory mózgu myszy 3xTg, 2 i 6 miesięcznych, gdzie zaobserwowano podwyższony poziom *Drp1* u samic (Wang i wsp., 2008a). Pomimo rozbieżności w zmianach poziomów mRNA dla *Drp1*, badania sugerują, że wzrost ekspresji genu *Dnm1* i *Fis1* może prowadzić do wzmożonego rozszczepienia mitochondriów i może być zaangażowany w dysfunkcję neuronów w chorobie Alzheimerera. Ponadto wykazano wspólną lokalizację *Drp1* i A $\beta$ , zwiększone poziomy ekspresji genu *Dnm1* oraz obniżone poziomy mitochondrialnych białek fuzyjnych

---

w mózgach autopsyjnych z chA (Manczak i wsp., 2011). Jednak inne badania demonstrowały obniżony poziom białka Drp1, OPA1, Mfn1 i Mfn2 oraz znacząco podwyższony poziom białka Fis1 w mózgu w chorobie Alzheimera (Wang i wsp., 2009a, 2009b). Natomiast badania Huang i współpracowników (2011) pokazały, że Drp1 może wchodzić w interakcje z Mfn2 na powierzchni mitochondriów, a nadekspresja genu *Dnm1* może ułatwiać fuzje mitochondriów w komórkach z niedoborem Mfn2 lub Mfn1, co wskazuje, że Drp1 może uczestniczyć nie tylko w rozszczepieniu, ale także w fuzji mitochondriów (Huang i wsp., 2011). Z kolei wyniki badań Anand i wsp. (2014) dostarczają dodatkowych danych dotyczących zakłócenia pomiędzy mechanizmami rozszczepienia i fuzji mitochondriów w wyniku działania długich i krótkich form OPA1. Stwierdzono, że krótkie formy OPA1 wywołują fragmentację mitochondriów i kolokalizują się z białkami biorącymi udział w rozszczepieniu, co z kolei sugeruje, że metabolizm białka OPA1 może regulować równowagę pomiędzy rozszczepieniem a fuzją mitochondriów (Anand i wsp., 2014).

W naszych badaniach pokazujemy, że największe zmiany dotyczą wzrostu ekspresji genu kodującego Fis1, biorącego udział w fragmentacji mitochondriów w początkowej fazie choroby, a tylko nieznaczny jest udział Drp1. Badania te wskazują, że być może to nie Drp1 jest odpowiedzialne za nadmierną fragmentację mitochondriów, ale Fis1. Do podobnego wniosku doszli autorzy badania pokazującego, że nadekspresja genu *Fis1* może wywołać rozległą fragmentację mitochondriów, nawet przy braku zmian poziomu Drp1 lub innego członka z rodziny związanego z dynaminą 2 (Dyn2) (Yu i wsp., 2019). Wskazuje to, że Drp1 / Dyn2 może być w dużej mierze zbędne w przypadku fragmentacji mitochondriów indukowanej przez Fis1. Istnienie zależnych od Fis1, ale niezależnych od Drp1 / Dyn2 szlaków rozszczepienia mitochondriów u ssaków. Fis1 bowiem silnie oddziałuje z pro-fuzyjnymi GTPazami Mfn1, Mfn2 i OPA1 na poziomach endogennych, co potwierdza przypuszczenia, że Fis1 może regulować dynamikę mitochondriów poprzez wpływ na procesy fuzji (Yu i wsp., 2019). Zgodnie z tą koncepcją Fis1 zmniejsza aktywność GTPazy Mfn1, Mfn2. Nadekspresja *Fis1* zmniejsza fuzję mitochondrialną, podczas gdy zahamowanie Fis1 nasila wymianę zawartości macierzy między mitochondriami, niezależnie od tego, czy Drp1 jest obecny czy nie w komórkach. Niniejsza praca wykazuje istotne zmiany poziomu mRNA dla Fis1, który może brać

---

udział w dwukierunkowej regulacji rozszczepienia mitochondriów i białek odpowiedzialnych za fuzję. Fis1, znany jako czynnik rozszczepiający mitochondria może być rozpatrywany również jako białko hamujące fuzję mitochondrialną. Ponadto zaobserwowano, że Fis1 może zmieniać się w różnych modelach chA, zarówno, gdy stwierdzono wzrost poziomu dla *Dnm1* (Kandimalla i wsp., 2018; Manczak i wsp., 2018), jak również w przypadku gdy dochodziło do zmniejszenia poziomu *Dnm1* (Wang i wsp., 2008a; Wang i wsp., 2009a, 2009b). Brak zmian w poziomach mRNA *Dnm1* w 3 i 12 miesięcznych myszach transgenicznym z chA i nieznaczny wzrost poziomu immunoreaktywności białka Drp1 u 12 myszy z chA może sugerować że białko to na badanym etapie chA u myszy nie jest zaangażowane aktywnie w proces dynamiki mitochondriów. Znaczenie może mieć potranslacyjna modyfikacja Drp1, która w pewnym stopniu może wyjaśnić te sprzeczne wyniki. Modyfikacja potranslacyjna jest kluczowa w działaniu Drp1. S-nitrozylacja to kowalencyjne wiązanie grupy tlenu azotu z tiolem cysteiny w celu utworzenia S-nitrozotolu (SNO), może mieć szczególne znaczenie w chA. Tlenek azotu (NO) jest wytwarzany w odpowiedzi na peptydy A $\beta$ , co prowadzi do s-nitrozylacji Drp1 (SNO-Drp1). Proces ten powoduje zwiększone rozszczepienie mitochondriów, utratę synaps i uszkodzenie neuronów w pierwotnych hodowlach neuronów szczurów (Barsoum i wsp., 2006), jak i w tkance mózgowej osób z chA w badaniach pośmiertnych (Cho i wsp., 2009). Wyniki te pokazały dodatkowo, że w mózгах pacjentów z chA dotyczące Drp1, zapobieganie nitrozylacji łagodzi uszkodzenia neuronów. Jednak inni badacze odkryli, że s-nitrozylacja nie ma wpływu na aktywność Drp1, a SNO-Drp1 nie różni się znacząco w chA w porównaniu z grupą kontrolną (Bossy i wsp., 2010).

Biogeneza mitochondrialna jest również zmieniona w chA. W naszych badaniach przeanalizowaliśmy zależne od wieku zmiany transkrypcji genów biorących udział w biogenezie mitochondriów w korze mózgu myszy transgenicznym z chA. Badania wykazały obniżenie ekspresji genu kodującego PGC-1 $\alpha$  (koaktywator gamma receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów 1 $\alpha$ ), który jest głównym regulatorem biogenezy mitochondriów u 12 M myszy transgenicznym z chA. Równocześnie stwierdzono obniżenie poziomu immunoreaktywności białka PGC-1 $\alpha$ . Obniżeniu ulega również ekspresja genu *PPAR- $\alpha$* . Wyniki mogą sugerować zmniejszenie zdolności

---

komórek do tworzenia nowych mitochondriów w tym modelu chA. Dane te są zgodne z innymi pracami, które przedstawiają zmiany w ekspresji genu *Pparg1* w mózgu pacjentów z chA i w zwierzęcych modelach chA. Poziom białka PGC-1 $\alpha$  był obniżony w mózgach mysiego modelu Tg2576 (z nadekspresją APP z mutacją szwedzką) (Qin i wsp., 2009; Wang i wsp., 2021). Z danych literaturowych wynika, że nadekspresja genu *Pparg1* chroni komórki nerwowe w hodowli przed stresem oksydacyjnym (St-Pierre i wsp., 2006) oraz zwiększa tworzenie i utrzymanie kolców dendrytycznych w neuronach hipokampa (Cheng i wsp., 2012). Obniżenie ekspresji tego ważnego czynnika wpływa na zwiększenie poziomu RFT w komórkach i może prowadzić do zmian molekularnych odpowiedzialnych za starzenie komórki. Z kolei obniżenie poziomu mRNA dla genu *PPAR- $\alpha$*  może w konsekwencji modulować metabolizm APP poprzez szlak amyloidogenny i doprowadzać do zwiększonego uwalniania/akumulacji A $\beta$  w mózgu (Corbett i wsp., 2015). Można sugerować, że peptydy A $\beta$  uwalniane w nadmiernej ilości w korze mózgu myszy 12 M z chA mogą być odpowiedzialne za obserwowane w prezentowanych danych obniżenie poziomu mRNA genu kodującego *PPAR- $\alpha$*  i *PGC-1 $\alpha$* . Opisane zjawiska molekularne mogą zamykać błędne koło zdarzeń patologicznych w chA.

Kolejnym białkiem biorącym udział w biogenezie mitochondriów jest mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A (TFAM), który odpowiedzialny jest za biosyntezę mtDNA (Miranda i wsp., 2022). Liczne doniesienia literaturowe wskazują, że w chA i w innych chorobach neurodegeneracyjnych, zmniejszona jest liczba kopii mtDNA (Filograna i wsp., 2021; Klein i wsp., 2021). Zjawisko to koreluje z zaburzeniami funkcji poznawczych (Andrews i Goate, 2020). Dane te sugerują, że zachowanie liczby kopii genomu mitochondrialnego i integralności jego sekwencji może odgrywać kluczową rolę w utrzymaniu poziomu ATP i zachowaniu żywotności komórek w warunkach stresu. W niniejszej rozprawie pokazano, że ekspresja genu *Tfam* – białka kodowanego w jądrze komórkowym, które odgrywa zasadniczą rolę w metabolizmie mtDNA, w początkowym etapie (3 i 6 miesięcznych myszy z nadekspresją APP) jest istotnie podwyższona. Wyniki świadczą, że podwyższona transkrypcja genu *Tfam* może zwiększać liczbę mtDNA koordynując tym samym biogenezę mitochondrialną, pełniąc jednocześnie funkcje obronną w stosunku do

---

obniżonego poziomu ekspresji genu *Pparg1* oraz *PPAR-α*. Wzrost ekspresji tego genu może wpływać na utrzymanie stabilności genomu mitochondrialnego w warunkach stresu i sugerować jego udział w mechanizmach obronnych przed nadmiernym stresem oksydacyjnym (Miranda i wsp., 2022). Zgodnie z tymi obserwacjami, poprzednie prace opisywały ochronny wpływ nadekspresji TFAM w komórkach poddanych działaniu peptydów Aβ (Xu i wsp., 2009). Wzrost ekspresji genu *Tfam*, poprzez utrzymanie poziomu mtDNA, chronił komórki SH-SY5Y transfekowane ludzkim genem APP z mutacją szwedzką przed stresem oksydacyjnym wywołanym zwiększonym uwalnianiem Aβ. Ponadto chronił przed obniżeniem poziomu aktywności oksydazy cytochromu C, enzymu IV kompleksu ETC w tych komórkach (Xu i wsp., 2009).

Liczne badania wykazały, że pod wpływem stresu oksydacyjnego komórki mózgowe dostosowują swój metabolizm i ekspresję genów, aby utrzymać homeostazę redoks poprzez aktywację Nrf2 i innych szlaków odpowiedzi na stres (Yang i wsp., 2015; Cuadrado i wsp., 2018). Powszechnie wiadomo, że Nrf2 przemieszcza się do jądra po aktywacji przez stres oksydacyjny, gdzie wiąże się z elementem odpowiedzi antyoksydacyjnej (ARE) w promotorze kilku genów kodujących takie enzymy jak: SOD1, transferazy glutationowe, ligaza glutaminianowo-cysteinowa i oksygenaza hemowa-1 (HO-1). Wykazano, że nadekspresja genu *Nrf2* ma działanie cytoochronne, podczas gdy wyciszenie genu *Nrf2* zwiększa wrażliwość na stres (Davies i wsp., 2021; He i wsp., 2020). W niniejszej rozprawie doktorskiej zaobserwowano również podwyższone poziomy ekspresji genów takich jak: *Nrf1*, *Nrf2* w początkowej fazie choroby. Kodowane przez te geny czynniki transkrypcyjne biorą istotny udział w biogenezie mitochondriów i w stresie oksydacyjnym oraz w wielu innych ważnych procesach molekularnych zaangażowanych w regulację plastyczności synaptycznej i pamięci (Davies i wsp., 2021). Przedstawione dane również mogą sugerować, że NRF2 chroni mitochondria przed zaburzeniami u myszy 3 miesięcznych a jego obniżony poziom ekspresji u 6 i 12 miesięcznych myszy z mutacją londyńską może świadczyć o postępie choroby i dalszym zaburzeniu szlaków przekąźnictwa zależnych of NRF2. Z kolei w doświadczeniach z muszkami owocowymi wykazano, że umiarkowana aktywacja genu *Nrf2* wydłużała życie. Natomiast utrzymująca się długotrwała hiperaktywacja *Nrf2* znacznie skracała długość życia u dorosłych muszek

---

i prowadziła do wzrostu ich śmiertelności w stadium larwalnym (Tsakiri i wsp., 2013). Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie mogą sugerować, że obniżony poziom ekspresji genu *Nrf2* ma niekorzystne działanie na stan fizjologiczny mitochondriów, biogenezę i funkcje mitochondriów.

Kolejne wyniki uzyskane w rozprawie pokazują, że ekspresje genów dla podjednostek łańcucha transportu elektronów są obniżone nieznamiennie w modelu zwierzęcym chA z wyjątkiem wzrostu poziomu mRNA dla podjednostki IV kompleksu (mt-CO1) oksydazy cytochromu C u 6 M. Ten wzrost ekspresji genu dla COX1 oraz wzrost niewielki wzrost aktywność COX u 12 M myszy z chA, który obserwujemy w naszych badaniach może świadczyć o uruchomieniu mechanizmów zabezpieczających utrzymanie poziomu ATP w komórce. Natomiast badania przeprowadzone przez Bosetti i wsp. (2002) oraz Mastroeni i wsp. (2017) wykazany obniżenie aktywności tego enzymu *post mortem* w mózgach pacjentów w zaawansowanym stadium choroby Alzheimerera. Rozbieżności w uzyskanych wynikach można wytłumaczyć różnymi warunkami towarzyszącymi przygotowaniu materiału do oznaczeń aktywności.

Nasze badania demonstrują obniżony poziom immunoreaktywności białka, jednej z wielu podjednostek oksydazy cytochromu C (COX2) kompleksu IV. Istnieje wiele podjednostek dla kompleksu IV cytochromu C oksydazy. U ssaków COX składa się z 13 podjednostek (Kadenbach i wsp., 2015; Soto i wsp., 2012), z czego 3 podjednostki są kodowane przez genom mitochondrialny (COX1, COX2 i COX3) i są rdzeniem katalitycznym COX, podczas gdy pozostałe 10 podjednostek (COX4, COX5a, COX5b, COX6a, COX6b, COX6c, COX7a, COX7b, COX7c i COX8) są kodowane genom jądrowy i są podjednostkami strukturalnymi otaczającymi rdzeń katalityczny (Kadenbach i wsp., 2015; Soto i wsp., 2012). Ze względu na złożoną budowę COX trudno na podstawie zmian poziomu jednej z podjednostek oceniać poziom białka całego enzymu w badanym modelu chA.

Podsumowując należy podkreślić, że do chwili obecnej rola oligomerów peptydu A $\beta$ <sub>42</sub> w zaburzeniach transkrypcji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne i białka mitochondriów w korze mózgowej, a także dynamika tych zmian w zależności od wieku z uwzględnieniem wczesnych etapów chA w modelach doświadczalnych nie została

---

w pełni wyjaśniona. Badane zagadnienie jest nowatorskie a uzyskane w pracy doktorskiej wyniki demonstrują istotne obniżenia ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w procesy antyoksydacyjne w bardzo wczesnych stadiach choroby oraz istotne obniżenie poziomu mRNA dla białek biogenezy w zaawansowanym stadium choroby. Uzyskane wyniki badań wskazują konkretne cele dla strategii terapeutycznej dotyczące aktywacji SOD2 oraz SIRT1, który jest najważniejszym enzymem z rodziny deacetylaz histonowych grupy III, zaangażowanym w regulację przemian APP i proces biogenezy mitochondriów. Aktywatory SIRT1 mogą istotnie korzystnie wpływać na szlaki przeżycia i śmierci komórek, a tym samym wywierać działanie neuroprotekcyjne, Uzyskane wyniki wskazują również na efekt inhibitora PARP-1, który poprzez wpływ na transkrypcję genów kodujących liczne białka mitochondrialne może mieć również zależne od czasu korzystne działanie neuroprotekcyjne w chA. Ponadto stwierdzone w badaniach istotne obniżenie transkrypcji genów kodujących białka biogenezy mitochondriów wskazuje, że aktywatory NRF2, PPAR- $\alpha$  i PGC-1 $\alpha$  powinny w istotny sposób łagodzić /spowalniać przebieg chA.

---

## PODSUMOWANIE

- Uzyskane wyniki wskazują że oligomery  $A\beta_{O_{1-42}}$  znacząco wpływają na ekspresję niektórych genów regulujących stan oksydo-redukcyjny w komórce, dynamikę oraz biogenezę mitochondriów i mogą stanowić jeden z ważnych czynników odpowiedzialnych za zaburzenia tych organelli w chorobie Alzheimera.
- Inhibitor PARP-1 w krótkim czasie działania może korzystnie wpływać na transkrypcję genów zaangażowanych w funkcje mitochondriów, również w warunkach cytotoxyczności  $A\beta_{O}$ , co wskazuje na jego ważne znaczenie cytoprotekcyjne.
- Wyniki demonstrują istotne obniżenie poziomu mRNA dla białek zaangażowanych w obronę antyoksydacyjną: SOD2, SIRT1 i PARP-1 we wczesnych etapach choroby, co w efekcie może przyczyniać się do wzrostu oksydacyjnego i osłabienia szlaku przeżycia komórki.
- Wykazano istotne zmiany ekspresji genów zaangażowanych w biogenezę mitochondriów dotyczące mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego A (TFAM), którego ekspresja ulega aktywacji oraz znaczącego obniżenia poziomu mRNA genu kodującego białko Nrf2 PGC-1 $\alpha$  u myszy z chA.
- Ponadto wykazaliśmy aktywację genów zaangażowanych w rozszczepianie mitochondriów (*Fis1*, *Dnm1*) oraz obniżoną ekspresję genu dla Mitofuzyny 1 (*Mfn1*), która odgrywa ważną rolę w fuzji mitochondriów. Zaburzenie ekspresji wymienionych genów może mieć również istotne znaczenie nie tylko w dynamice mitochondriów ale również w procesach energetycznych komórek.
- Znamienne wyższy poziom mRNA oksydazy cytochromu C, podjednostki kompleksu IV (*mt-COI*) u myszy z chA może wskazywać na mechanizm kompensacyjny w odpowiedzi na obniżoną transkrypcję genów dla pozostałych badanych podjednostek kompleksów (I, II, III) ETC oraz na obniżony poziom immunoreaktywności białka badanej podjednostki COX2. Należy podkreślić, że aktywność cytochrom C oksydazy w mózgu myszy z chA utrzymuje się na



---

poziomie wartości kontrolnych. Uzyskane wyniki świadczą o zdolności mitochondriów w utrzymaniu funkcji IV kompleksu w łańcuchu transportu elektronów i tym samym o istotnych endogennych mechanizmach obronnych zabezpieczających funkcje mitochondriów w zaawansowanym stadium chA.

- Na podstawie analizy transkrypcji genów w badaniach toksyczności peptydów A $\beta$  w mysim modelu chA, można wnioskować, że aktywatory SIRT1 (w tym inhibitor PARP-1) oraz PGC-1 $\alpha$ , Fis1, NRF2 mogą odgrywać ważną rolę w udoskonalaniu strategii terapeutycznej chA.

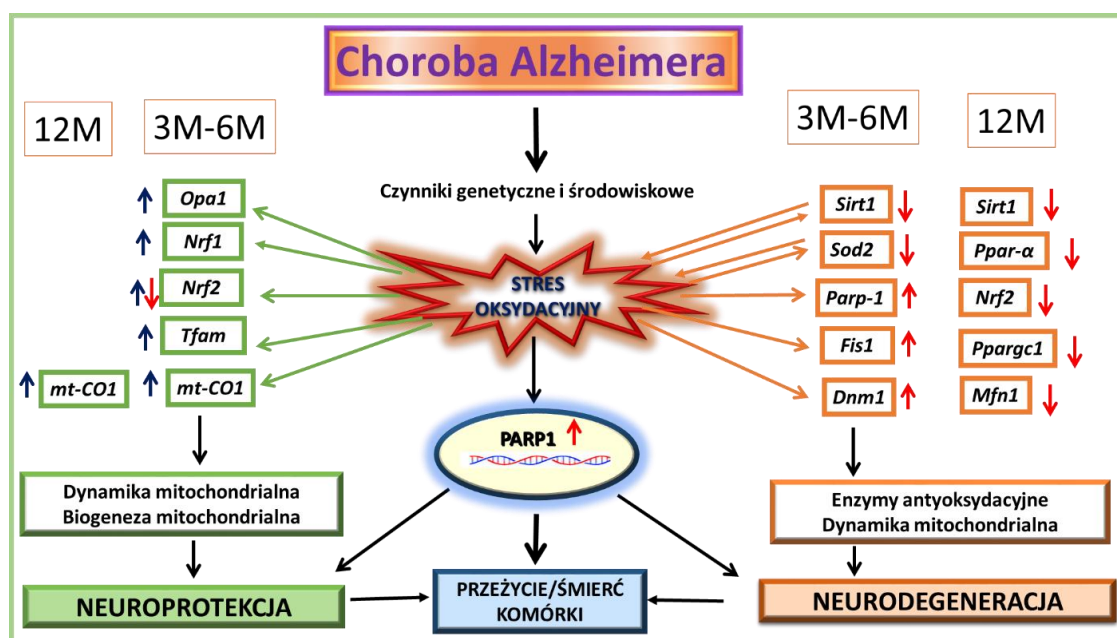
---

## WNIOSKI

- Zmiany transkrypcji genów w wyniku działania peptydów A $\beta$  zależą od czasu ich działania, rodzaju komórek a w przypadku zwierzęcego modelu chA od wieku, stadium zaawansowania zmian patologicznych oraz części mózgu. Wyłącznie wczesna faza działania peptydów A $\beta$  / wczesny etap chA stwarza szanse na aktywację procesów cytoprotekcyjnych, które mogą chronić komórki przed aktywacją procesów prowadzących do degeneracji i śmierci.
- Inhibitor PARP-1 poprzez aktywację ekspresji genów enzymów antyoksydacyjnych i białek dynamiki mitochondriów oraz podjednostek kompleksów oddechowych w krótkim czasie działania może korzystnie wpłynąć na poziom wolnych rodników i stan energetyczny komórek i wywierać efekt cytoprotekcyjny również w chorobach neurodegeneracyjnych.
- Zmiany ekspresji genów antyoksydacyjnych, w komórkach mikroglejowych poddanych działaniu A $\beta$ O w tym znaczący, znamieny wzrost poziomu mRNA dla *Sod2* może chronić te komórki przed aktywacją kaskady wolnorodnikowej i wpływać istotnie na ich funkcje ochronne /protekcyjne w stosunku do komórek nerwowych w określonych warunkach stresu.
- Zwiększony poziom ekspresji APP i wzrost poziomu peptydów A $\beta$  w korze mózgu myszy z chA poprzez wpływ na zmianę transkrypcji genów kodujących białka obrony antyoksydacyjnej, w tym SOD2 w mitochondriach oraz enzymów zależnych od NAD, SIRT1 i PARP-1, jądrowych odbiorców kaskady wolnorodnikowej może w konsekwencji zaburzać funkcje licznych czynników transkrypcyjnych i przemian metabolicznych APP w kierunku szlaku amyloidogenego.
- Uzyskane wyniki wskazują że peptydy A $\beta$  i wywołane przez nie zmiany transkrypcji genów dla białek dynamiki i biogenezy mitochondriów stwierdzone w korze mózgu zwierząt z chA są zjawiskami molekularnymi towarzyszącymi progresji zmian patologicznych. Równocześnie otrzymane dane wskazują na duże zdolności mitochondriów w utrzymaniu funkcji w tym

przede wszystkim funkcji IV kompleksu ETC, aktywności cytochromu C oksydazy w warunkach stresu wywołanego działaniem peptydów.

- Na podstawie analizy transkrypcji genów w mysim modelu chA można wnioskować, że aktywatory SIRT1 (w tym inhibitory PARP-1) oraz aktywatory PPAR  $\alpha$ /PGC-1 $\alpha$  i NRF2, jak również inhibitory Fis1 mogą wywierać obiecujące działanie neuroprotecyjne zastosowane we wczesnym stadium chA.



Rycina 7. Schematyczne przedstawienie wyników podsumowujących zaburzenia mitochondrialne w modelu zwierzęcej choroby Alzheimera

---

## STRESZCZENIE

Choroba Alzheimera (chA) jest chorobą zwyrodnieniową układu nerwowego i najcięższą formą otępienia. Starzenie się jest istotnym czynnikiem ryzyka dla sporadycznej postaci chA o niewyjaśnionej etiologii i mechanizmie występującej u ponad 90% osób chorych na chA. Pozostałe 5-10% stanowi rodzinna postać chA o wczesnym początku uwarunkowana zmianami genetycznymi. Kluczowymi zmianami neuropatologicznymi stwierdzanymi w mózgu osób chorych jest akumulacja peptydu  $\beta$  amyloidu ( $A\beta$ ) i nadmiernie ufosforylowanego białka tau, które w procesie chorobowym zmieniają konformację i ulegają agregacji prowadząc do tworzenia odpowiednio oligomerów  $A\beta$  ( $A\beta O$ ), fibryli i zewnątrzkomórkowych blaszek starczych oraz wewnątrzkomórkowych splątków neurofibrylarnych.  $A\beta O$ , ale także ufosforylowane białko tau mogą wywoływać zaburzenia neuronalne poprzez kilka mechanizmów, w tym aktywację kaskady wolnorodnikowej i aktywację stresu oksydacyjnego, upośledzenie szlaków sygnałowych oraz dysfunkcję mitochondriów.

W ciągu ostatnich lat sformułowano wiele hipotez próbujących wyjaśniających potencjalne patomechanizmy/ przyczyny chA. Wśród nich dominująca od ponad 25 lat i nadal aktualna jest hipoteza kaskady amyloidowej, hipoteza stresu oksydacyjnego oraz od dekady coraz częściej rozpatrywana hipoteza metaboliczna i mitochondrialna. Obecnie hipoteza mitochondrialna nadal zajmuje kluczową pozycję ze względu na istotną /fundamentalną rolę mitochondriów w komórkach eukariotycznych. Ściśle z nią połączona jest hipoteza metaboliczna dotycząca zaburzeń przemian glukozy, która w ostatnim dziesięcioleciu przeżywa renesans ze względu na liczne badania wskazujące, że cukrzyca typu II stanowi poważne ryzyko dla rozwoju chA.

Upośledzenie funkcji mitochondriów wydaje się być wczesnym i krytycznie ważnym zdarzeniem w procesie starzenia się mózgu i w patogenezie/patomechanizmie chA. Dysfunkcja mitochondriów może mieć wpływ na ekspresję i przetwarzanie białka prekursorowego amyloidu (APP), a także akumulację  $A\beta$ , a zatem może być uważana za wyzwalacz odpowiedzialny za rozwój zmian molekularnych i funkcjonalnych

---

charakterystycznych objawów chA. A $\beta$  może wywoływać dysfunkcje metaboliczne, zmniejszenie zużycia tlenu, obniżenie mitochondrialnej obrony antyoksydacyjnej oraz poziomu ATP/NAD<sup>+</sup> i aktywację glikolizy. Znaczenie zaburzeń przemian białka APP i  $\beta$  amyloidu nie budzi wątpliwości w rodzinnej postaci chA, natomiast nie jest w pełni akceptowane i wywołuje liczne kontrowersje i dyskusje w przypadku postaci sporadycznej chA. Uwalnianie peptydów A $\beta$  i wzrost ich stężenia w przestrzeni zewnątrzkomarkowej wpływa nie tylko na funkcje zakończeń synaptycznych i neurony, ale również na otaczające komórki glejowe, a przede wszystkim na komórki mikrogleju, które pełnią ważne funkcje zarówno neuroprotektoryjne, jak również aktywują procesy zapalne i odgrywają istotną rolę w progresji chA. Komórki mikrogleju, wpływają na rozwój mózgu, żywotności neuronów procesy starzenia się i neurodegeneracji. Wzajemna interakcja między komórkami nerwowymi i glejowymi ma kluczowe znaczenie dla przebiegu neurodegeneracji/ neurozapalenia. Oddziaływanie A $\beta$ O z mikroglejem może prowadzić do ich aktywacji i skutkować wytwarzaniem chemokin, neurotoksycznych cytokin oraz reaktywnych form tlenu i azotu, które są szkodliwe dla OUN. Mikroglej pełni również rolę neuroprotektoryjną, poprzez swoją zdolność do fagocytowania A $\beta$  i uwalniania cytokin przeciwzapalnych. W związku z tym istnieje potrzeba zbadania znaczenia oligomerów A $\beta$  w zaburzeniach procesów molekularnych, transkrypcji genów kodujących białka zaangażowane w dynamikę i funkcję mitochondriów. Pomimo wieloletnich badań nad znaczeniem peptydów A $\beta$  w patologii chA, procesy molekularne leżące u podstaw toksyczności tych peptydów nie są w pełni wyjaśnione.

Dlatego celem niniejszych badań było zbadanie transkrypcji genów kodujących białka antyoksydacyjne, białka kompleksów oddechowych łańcucha transportu elektronów oraz białek regulujących fuzję/podział i biogenezę mitochondriów w modelu komórkowym cytotoxyczności A $\beta$ O oraz w modelu zwierzęcym choroby Alzheimera. Analizowano również poziom wybranych białek i aktywność końcowego enzymu w łańcuchu transportu elektronów -oksydazy cytochromu C.

W niniejszej pracy zastosowano model cytotoxycznego działania egzogennych oligomerów peptydu A $\beta$  (A $\beta$ O<sub>1-42</sub>) w komórkach guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy szczura (*lac. Pheochromocytoma*-PC12. Ponadto inkubowano z A $\beta$ O ludzkie

---

komórki neuronalne –SH-SY5Y neuroblastomy oraz unieśmiertelnione mysie komórki mikrogleju –BV2.

W badaniach na komórkach oceniono wpływ A $\beta$ O na wewnątrzkomórkowy poziom wolnych rodników za pomocą fluorometrycznego testu DCF, wrażliwość komórek na stres oksydacyjny i ich przeżycie za pomocą testu MTT, a w przypadku komórek PC12 zbadano dodatkowo poziom komórek apoptotycznych w różnym czasie inkubacji z A $\beta$ O oraz poziom immunoreaktywności dla cząsteczki sygnalizacyjnej poli (ADP-rybozy) - PAR, która jest produktem aktywności poli (ADP-rybozo) polimerazy, PARP-1, enzymu jądrowego związanego z DNA. Enzym ten jest jądrowym odbiorcą kaskady wolnorodnikowej i molekularnym regulatorem procesów przeżycia i śmierci komórki. Wobec powyższego w badaniach uwzględniono działanie inhibitora polimerazy poli (ADP-rybozy) 1 (PARP-1). Z kolei w komórkach mikroglejowych i neuronalnych oceniono aktywność oksydazy cytochromu C.

Ponadto badania prowadzono na korze mózgowej uzyskanej z myszy transgenicznym FVB-Tg (APP LD2/B6) z wprowadzonym ludzkim genem dla APP zawierającym mutację londyńską (Thy1; APP) Val717Ile, które stanowią model rodzinnej postaci choroby Alzheimerera. Do badań użyto 3 grupy wiekowe zwierząt – 3, 6 i 12 miesięczne. W zwierzęcym modelu doświadczalnym zbadano również poziom immunoreaktywności dla białek dynamiki mitochondrialnej oraz enzymów dla wybranych podjednostek kompleksów oddechowych u 12 miesięcznych myszy oraz aktywność oksydazy cytochromu C u 3 i 12 miesięcznych myszy.

W przedstawionej pracy stwierdzono, że A $\beta$  znacząco wpływa na obniżenie żywotności wszystkich badanych komórek. W przypadku komórek PC12 zaobserwowano również wzrost komórek apoptotycznych zależny od czasu inkubacji z A $\beta$ . Prezentowane w niniejszej pracy wyniki na komórkach wykazały, że oligomery A $\beta$ <sub>1-42</sub> znacząco wpływały na poziom wolnych rodników w komórkach neuronalnych PC12i SH-SY5Y oraz ale nie miały wpływu na poziom ROS w komórkach mikrogleju BV2 w badanych czasach inkubacji -24 godz.

W prowadzonych badaniach na komórkach PC12 wykazano, że peptydy A $\beta$ O w wyniku działania w czasie 96 godz. inkubacji spowodowały obniżenie transkrypcji

---

genów (*Sod1*, *Sod2*, *Gpx1*, *Gpx4*, *Gsr*), kodujących białka antyoksydacyjne oraz obniżenie transkrypcji genów (*Opal*, *Mfn2*, *Dnm1*, *Fis1*) kodujących białka zaangażowane w procesie rozszczepienia i fuzji mitochondriów, jak również obniżenie ekspresji genów: *mt-Nd1*, *Sdha*, *mt-CytB* kodujących białka podjednostek kompleksów oddechowych (I, II, III) ETC. Peptydy A $\beta$ O nie miały natomiast wpływu na poziom ekspresji genu (*Cat*) kodującego katalazę, na transkrypcję genu *Mfn1* oraz genu *mt-CoI*, kodującego podjednostkę kompleksu IV. Ponadto peptydy A $\beta$ O w krótkim czasie działania (24 godz. inkubacji) pozostawały bez istotnego wpływu na poziom ekspresji wszystkich badanych genów.

Wyniki badań na komórkach PC12 pokazały wzrost poziomu PAR po 24 godz. inkubacji z A $\beta$ . Natomiast zastosowanie inhibitora PARP-1 (PJ34) niwelowało nadmierną aktywację PARP-1 określaną wzrostem poziomu immunoreaktywności cząsteczek PAR. Kolejno sprawdzono działanie inhibitora PJ43 na poziom mRNA dla wyżej wymienionych genów. Wyniki pokazały, że farmakologiczne zahamowanie PARP-1 przy użyciu inhibitora PJ34 istotnie zwiększa poziom mRNA genów (*mt-Nd1*, *Sdha*, *mt-Cytb*) kodujących białka trzech kompleksów oddechowych. W obecności A $\beta$ <sub>1-42</sub> inhibitor ten wpływał wyłącznie na poziom mRNA genu *Sdha* kodującego podjednostkę kompleksu II. Ponadto PJ34 aktywował ekspresje genów *Opal* i *Mfn2* w obecności peptydów A $\beta$ . Uzyskane wyniki na komórkach PC12 pokazują, że inhibitor PARP-1 poprzez aktywację ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne i białka dynamiki mitochondriów oraz podjednostki kompleksów oddechowych w krótkim czasie działania może korzystnie wpłynąć na poziom wolnych rodników i stan energetyczny komórek i wywierać cytoprotekcyjny efekt.

Uzyskane w niniejszej rozprawie wyniki na komórkach neuronalnych i glejowych pokazują, że ekspresja genów kodujących kluczowe enzymy antyoksydacyjne *Sod1* i *Sod2* przebiega odmiennie w zależności od rodzaju komórek. Ekspresja genu dla mitochondrialnego *Sod2* była prawie czterokrotnie wyższa po 24 godzinach traktowania A $\beta$ O w komórkach BV2, co może świadczyć o uruchomieniu mechanizmów obronnych w komórce zapobiegając przed wzrostem stresu

---

oksydacyjnego. Natomiast ekspresja genu tego enzymu w komórkach neuronalnych SH-SY5Y była obniżona.

Ponadto wyniki badań dotyczące toksyczności peptydów A $\beta$  wskazują na niższą ekspresję genu badanych podjednostek kompleksu I (*mt-Nd1*) i II (*Sdha*) ETC w komórkach mikrogleju BV2 traktowanych A $\beta$ O. Istotne zmiany zaobserwowano po krótkotrwałej inkubacji (24 godziny). Natomiast znacząca ponad 4-krotna aktywacja ekspresji genu kodującego *Sod2* w komórkach BV2 może sugerować, że jest to element mechanizmu chroniącego mitochondria przed wzrostem poziomu wolnych rodników generowanych przez upośledzoną ETC w warunkach toksyczności A $\beta$ O. Analiza ekspresji genów podjednostek ETC w komórkach SH-SY5Y wykazała niższy poziom mRNA dla podjednostki kompleksu II (*Sdha*) po 24 godz. traktowania A $\beta$ O.

Aktywność oksydazy cytochromu C w komórkach BV2 była trzykrotnie wyższa w porównaniu do aktywności tego enzymu w komórkach SH-SY5Y. Traktowanie komórek A $\beta$ O przez 24 godz. nie powodowało zmian aktywności tego enzymu.

Wyniki uzyskane na komórkach neuronalnych (SH-SY5Y) i komórkach mikrogleju (BV2) świadczą o tym, że zmiany ekspresji badanych genów w komórkach mikroglejowych (BV2) są silniej wyrażone niż w komórkach neuronalnych (SH-SY5Y). Należy jednak z ogromną ostrożnością porównywać wpływ A $\beta$  w tych obu liniach komórkowych. Niemniej jednak zjawiska te mogą mieć znaczenie dla zrozumienia procesów molekularnych przebiegających w różnych typach komórek w odpowiedzi na stres wywołany działaniem A $\beta$ O i mogą być pomocne w ocenie znaczenia roli mikrogleju w pełnieniu funkcji ochronnych, cytoprotekcyjnych w stosunku do komórek neuronalnych w określonych warunkach.

Doświadczenia prowadzone na mysich modelach choroby Alzheimera pokazały znaczące zmiany w ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w obronę antyoksydacyjną i dynamikę mitochondriów w korze mózgowej myszy z chA (APP+) w porównaniu do odpowiednich wiekowo mysz kontrolnych bez transgeny (APP-). W przeprowadzonych badaniach w korze mózgu myszy z chA, stwierdzono obniżenie genu dla *Sirt1* u 3 i 12 miesięcznych myszy, enzymu ważnego w licznych procesach życiowych komórki oraz w metabolizmie białka APP poprzez regulacje sekretazy alfa.



---

Ponadto stwierdzono zmiany ekspresji genu *PARP-1*, który koduje kolejny enzym, podobnie jak *Sirt1*, należący do rodziny enzymów zależnych od NAD. *PARP-1* pełni kluczową rolę w regulacji licznych czynników transkrypcyjnych, w mechanizmie naprawy DNA w warunkach stresu oksydacyjnego i jak wspomniano wyżej odpowiedzialny jest za mechanizmy przeżycia i śmierci komórek. Wyniki pokazują przejściowe obniżenie transkrypcji genu kodującego *PARP-1* w korze 3 miesięcznych myszy i wzrost poziomu mRNA u 6 miesięcznych zwierząt i zmiany te mogą być wynikiem reakcji na stres oksydacyjny towarzyszący działaniu A $\beta$ O.

W kolejnych badaniach przeanalizowano ekspresję genów dla białek dynamiki mitochondriów. Stwierdzono podwyższoną ekspresję genów dla *Fis1* u 3 i 6 miesięcznych myszy oraz genu *Dnm1* u 6 miesięcznych myszy APP+ z chA, natomiast zmian tych nie obserwowano w korze 12 miesięcznych myszy z chA. W badaniu poziomu białka metodą immunochemiczną w korze mózgu 12 miesięcznych myszy z chA nie stwierdzono również zmian w poziomie immunoreaktywności Drp1 i Fis 1. Równocześnie na wczesnym etapie chA u 3 i 6 M myszy stwierdzono wzrost ekspresji genu dla OPA1 i brak zmian w korze 12 M myszy z chA w porównaniu do kontroli odpowiednich wiekowo. Poziom immunoreaktywności tego białka również nie ulegał zmianie w korze mózgu 12 M myszy z chA. Stwierdzono natomiast obniżenie poziomu mRNA i białka dla *Mfn1* u 12 miesięcznych myszy z chA. Wyniki te mogą sugerować, że zmiany te mogą zaburzać dynamikę mitochondriów. Prezentowane badania ekspresji genów dla wybranych podjednostek kompleksów oddechowych w korze mózgowej myszy wykazały, że ekspresja genu dla podjednostka kompleks I (*mt-Nd1*) jest znamienne obniżona u 12 miesięcznych myszy transgenicznych. Poziom mRNA dla pozostałych badanych podjednostek jest nieznamienne obniżony, z wyjątkiem IV kompleksu mitochondrialnego, gdzie zaobserwowano podwyższony znamienne poziom mRNA dla podjednostki *mt-Co1* u 6 i 12 miesięcznych myszy z chA. Przeprowadzono badania poziomu immunoreaktywności dla innej podjednostki IV-COXII kompleksu IV i stwierdzono obniżenie jej poziomu.

Prezentowane w niniejszej pracy wyniki odnośnie biogenezy mitochondrialnej wykazały, że poziom mRNA dla *Pparg1* i *PPAR- $\alpha$*  jest statystycznie znamienne

---

obniżona u 12 miesięcznych myszy APP<sup>+</sup>, co może świadczyć o zaburzeniu biogenezy mitochondrialnej w późnym stadium chA. Również wynik poziomu immunoreaktywności dla PGC-1 $\alpha$  potwierdził tę zależność. Stwierdzono także, że poziomy mRNA genu *Tfam*, odpowiedzialnego za metabolizm mtDNA oraz genów jądrowych takich jak: *Nrf1* i *Nrf2* są podwyższone na wczesnym stadium, co z kolei sugeruje uruchomienie mechanizmów zabezpieczających przed zaburzoną biogenezą. Jednak w kolejnym stadium u 6 i 12 miesięcznych myszy zaobserwowano jego istotne obniżenie, co wpływa na zaburzoną strukturę i funkcję mitochondrialną.

Uzyskane wyniki badań mogą być pomocne w lepszym zrozumieniu mechanizmów toksyczności peptydów A $\beta$  poprzez poznanie ich roli w zmianach transkrypcji genów zaangażowanych w regulację stresu oksydacyjnego, dynamiki i biogenezy mitochondriów w modelach doświadczalnych chA. Ponadto wyniki te umożliwiają wskazanie nowych punktów uchwytu dla strategii cytoprotekcyjnej w tym w przebiegu chA.

---

## STRESZCZENIE W JEZYKU ANGIELSKIM

Alzheimer's disease (AD) is the most severe degenerative disorder of the nervous system associated with aging. AD is the most severe dementia that attack more as 30 million people around the world. The ethiology and pathomechanism of sporadic form of AD is unknown and this form accounting for about 90% of all AD cases. The other form is familiar AD, which is the early onset disease related to genes alterations /mutations in APP and enzymes involved in APP/A $\beta$  metabolism. In the both form the accumulation of amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) peptide and hyperphosphorylated tau are a hallmark and crucial element of both form of AD. The conformation changes of A $\beta$  leading to the formation of oligomers, fibrils and to formation of extracellular senile plaques and intracellular neurofibrillary tangles. A $\beta$ O can induce synaptic/ neuronal disorders through several mechanisms, including impaired signaling cascades, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction leading to synaptic degeneration and neuronal death.

It is proposed, that impairment of mitochondrial function appears to be an early and critically important event in brain aging and in the pathogenesis/pathomechanism of AD. According to this hypothesis, mitochondrial dysfunction must be primary event, that may affect the expression and processing of amyloid precursor protein (APP) leading to accumulation of A $\beta$  and therefore mitochondria may be considered as a trigger responsible for the development of AD symptoms. However, many genetic and experimental studies demonstrated that soluble oligomers of A $\beta$ O, the most toxic form of this peptide can be responsible for molecular alteration leading to impairment of cognition and to severe dementia through metabolic dysfunction, decrease consumption of oxygen, suppression of mitochondrial antioxidant defense and ATP/NAD<sup>+</sup> level and increase the rate of glycolysis. In consequence, A $\beta$ O may be responsible for synaptic degeneration and neuronal death.

Microglial cells may protect neuronal cells against A $\beta$ O toxicity at the early stage of AD but they also play an important role in the activation of neuroinflammation and in progression of AD. The mutual interaction between neuronal and glial cells is critical at each stage of AD. The interaction of microglia with A $\beta$  oligomers leads to their activation

---

and results in the production of chemokines, neurotoxic cytokines, reactive oxygen and nitrogen species that are harmful to the CNS. Microglia also has a neuroprotective role through its ability to phagocytose A $\beta$  and release several growth factors, anti-inflammatory cytokines. The exact mechanisms by which these cells contribute to the pathology of AD is not fully elucidated.

The role of A $\beta$ O in regulation/alteration of transcription of genes encoded proteins engaged in mitochondria dynamic, function and biogenesis was not fully understood and was neither investigated in the brain cortex during aging in animal model of AD.

Investigation of the alterations of molecular processes evoked by A $\beta$ O may not only improve our knowledge but should be important for indication of new targets, offering hope for better strategies in the development of disease-modifying therapies. Despite many years of research on the role of A $\beta$  peptides in the pathology of AD, the molecular processes and pathways responsible of cells degeneration /death are not fully understood.

Therefore, the aim of this study was to investigate the mRNA level of genes encoding enzymes of antioxidant defense, proteins of electron transport chain respiratory complexes, and of mitochondrial fusion / fission and involved in biogenesis in a cellular and animal model of A $\beta$ O toxicity and in brain cortex of AD Tg mice respectively. Moreover, the effect of a poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) polymerase inhibitor (PJ34) was studied in control PC12 cells and in PC12 cells subjected to A $\beta$ O toxicity during 24 h.

In this study, the cytotoxic effect of exogenous A $\beta$  peptide oligomers (A $\beta$ O<sub>1-42</sub>) was investigated in rat pheochromocytoma (*Pheochromocytoma*)-PC12 cells, human neuroblastoma neuronal cells-SH-SY5Y and murine immortalized microglial cells –BV2. The effect of A $\beta$ O on cells viability and on the intracellular level of free radicals was analyzed using MMT test and fluorometric DCF assay respectively. Moreover, the level of apoptotic cells was detected using Hoechst 33342 test at different incubation times with A $\beta$  and the level of immunoreactivity for the PAR molecule, the product of PARP-1 activity (involved in caspase independent apoptotic death) were also investigated using

---

immunochemical method. Then the activity of cytochrome C oxidase was assessed in microglial and neuronal cells, and in brain cortex.

Studies were also carried out on the cerebral cortexes obtained from FVB-Tg transgenic mice (APP LD2 / B6) with the introduced human gene for APP containing the London mutation (Thy1; APP) Val717Ile, which are a model of familial Alzheimer's disease. Three age groups of animals were used - 3, 6 and 12 months old female mice. In an experimental animal model, the transcription of genes encoded anti-oxidative enzymes and several other mitochondria proteins were determined on the level of mRNA and in selected cases on the level of proteins. Immunoreactivity for proteins of mitochondrial dynamics and enzymes of selected subunits of respiratory complexes in 12-month-old mice was analyzed using immunochemical method. The activity of cytochrome C oxidase in 3 and 12-month-old mice were also determined.

The results presented in this study showed that the A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomers (A $\beta$ O) significantly influenced the level of free radicals in SH-SY5Y and PC12 neuronal cells, but did not affect the ROS level in BV2 microglial cells. In the presented study, it was also found that A $\beta$ O significantly reduces the viability of all tested cells. In the case of PC12 cells, an increase of apoptotic cells, was also observed depending on the time of incubation with A $\beta$ .

In our research on PC12 cells the results showed that, incubation of cells with A $\beta$  peptides during 96h reduced transcription of genes (*Sod1*, *Sod2*, *Gpx1*, *Gpx4*, *Gsr*) coding antioxidant proteins and also significantly affected expression of genes (*Opa1*, *Mfn2*, *Dnm1*, *Fis1*) encoded proteins involved in the process of mitochondrial cleavage and fusion. Moreover, A $\beta$ O after 96 h decreased the level of mRNA of genes such as: *mt-Nd1*, *Sdha*, *mt-CyB* for ETC respiratory complex proteins. However, it had no effect after the short-time of action (24 h of incubation).

The results also showed an increase of immunoreactivity of PAR level after 24 h incubation with A $\beta$ O. Inhibitor (PJ34) of PARP-1 eliminates the excessive activation of PARP-1 determined by the increase in the level of immunoreactivity of PAR molecules. Therefore, the action of the inhibitor was examined on the mRNA level for the above-mentioned genes. The results showed that pharmacological inhibition of PARP-1 with

---

PJ34, significantly increased the mRNA level of genes (*mt-Nd1*, *Sdha*, *mt-Cytb*) coding the respiratory complexes and in the presence of A $\beta$ <sub>1-42</sub>. It is also enhanced expression of gene *Sdha* coding subunit of complex II, In addition, PJ34 activated genes *OPA1* and *Mfn2* coding proteins of mitochondrial dynamics in the presence of A $\beta$  peptides.

The results obtained on PC12 cells show that, the PARP-1 inhibitor by activating the expression of genes of anti-oxidative enzymes and proteins of mitochondrial dynamics and subunits of respiratory complexes in a short time of action can positively affect the level of free radicals and the energy state of cells and exert a cytoprotective effect.

The results obtained in this dissertation on neuronal and glial cells show that the expression of genes encoding the key antioxidant enzymes Sod1 and Sod2 differs depending on the cell types. The expression of the gene for mitochondrial Sod2 was almost four times higher after 24 hours of treatment with A $\beta$ O in BV2 cells, which may indicate the activation of defense mechanisms in the cell preventing cells from increasing of oxidative stress. In contrast, expression of the gene of this enzyme in SH-SY5Y neuronal cells was inhibited.

Moreover, the results of the A $\beta$  peptide toxicity show a lower expression of gene (*mt-Nd1*, *Sdha*) coding subunits of ETC complex I and II in BV2 microglial cells treated with A $\beta$ O. Significant changes were observed after short-term incubation (24 hours). On the other hand, activation of gene *Sod2* expression in BV2 cells may suggest that it is an element of the mechanism of antioxidative defence that, protects mitochondria against ROS generated by impaired ETC under conditions of A $\beta$ O toxicity. Analysis of ETC, subunit gene expression in SH-SY5Y cells showed lower level of mRNA of gene (*Sdha*) coding Complex II subunit after treatment with A $\beta$ O for 24h.

The activity of cytochrome c oxidase in BV2 cells was three times higher, compared to the activity of this enzyme in SH-SY5Y cells. A $\beta$ O did not affect the activity of this enzyme.

The results obtained on neuronal cells (SH-SY5Y) and microglial cells (BV2) show that changes in the expression of the studied genes, evoked by A $\beta$ O in microglial

---

cells (BV2) are more strongly expressed than in this neuronal cells (SHSY-5Y). These phenomena may be of significant importance for relationship between these cells under different stress conditions.

Experiments in murine models of Alzheimer's disease showed significant changes in the expression of genes encoding enzymes involved in antioxidant defense and mitochondrial dynamics in the cerebral cortex of AD Tg (APP+) mice compared to age matched control mice without the transgene (APP-).

The results on mitochondrial biogenesis presented in this study showed that the mRNA level of genes for *Pparg1* and *PPAR- $\alpha$*  was statistically significantly reduced in 12-month-old APP+ mice model, which could be responsible for disturbances in mitochondrial biogenesis in advance-stage of AD. The level of immunoreactivity for PGC-1 $\alpha$  is also lower in 12 months old AD Tg mice. It was also found, that the levels of mRNA for *Tfam*, and other genes responsible for-coding Nrf1, Nrf2, are elevated at an early stage. However, in the next stage in 6 and 12 month old mice, significant reduction of expression of these genes was observed, which may affects and the disturbed several mitochondrial function.

In further research, gene expression for mitochondrial dynamics proteins was analyzed. It was shown increased gene expression for Fis1 was found in 3 and 6 month old mice and Dnm1 in 6 month old APP+ mice with AD, which suggests that excessive mitochondrial fragmentation may occur at an early stage of AD. However, this was not confirmed by studies on the level of immunoreactivity for these proteins. At the same time, the *OPA1* gene was overexpressed at an early stage in 3 and 6 month old mice, while the level of *Mfn1* was lowered in 12 month old APP+ AD Tg mice. These results may suggest that mitochondria try to maintain their biological function in nerve cells for as long as possible, protecting them in the initial stages.

The presented studies of gene expression for selected subunits of respiratory complexes in the cerebral cortex of mice showed that they showed that the subunit complex I (mt-Nd1) is significantly reduced in 12-month-old transgenic mice. The remaining subunits are insignificantly decreased, with the exception of the IV mitochondrial complex, where its increased levels were observed in 6 and 12-month-old

---

mice with AD, possibly for decreased activity of cytochrome c oxidase. However, this was not confirmed by studies on the level of immunoreactivity for this complex, where it was found to decrease close to significance. However, the differences obtained may be due to the different subunits used for this complex. Elevated levels of respiratory complex IV mRNA may suggest that some protective processes may be triggered in response to pathological changes in the mitochondria.

The obtained research results may be helpful in a better understanding of the mechanisms of A $\beta$  toxicity as a result of oxidative stress and, consequently, the disturbed processes of mitochondrial dynamics and biogenesis accompanying neurodegenerative diseases. Moreover, these results facilitate the identification of new target points for effective cytoprotection therapy already at the cellular stage occurring at an early stage of the disease.



---

## INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY

Przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badania przedstawiają znaczenie toksyczności oligomerów peptydów A $\beta$ <sub>1-42</sub> w zmianach transkrypcji genów zaangażowanych w procesy antyoksydacyjne i funkcje mitochondriów w wybranych liniach komórkowych oraz w zwierzęcym modelu rodzinnej postaci choroby Alzheimera (chA). Po raz pierwszy w takim ujęciu badano szeroki wachlarz genów w korze mózgu myszy w trzech grupach wiekowych (3, 6, 12 M) w korze mózgowej myszy z chA. Uzyskane wyniki badań wykazały:

- Istotne znaczenie oligomerów A $\beta$ <sub>1-42</sub> w modyfikacji ekspresji genów kodujących białka antyoksydacyjne i zaangażowane w regulację dynamiki i funkcji mitochondriów. Efekt toksyczności A $\beta$ O zależy od rodzaju komórek, na które działają i od czasu działania.
- Stwierdzono, istotną rolę enzymu jądrowego PARP-1 w regulacji, aktywacji transkrypcji genów kodujących białka antyoksydacyjne (*Sod1*, *Gpx1* i *Gp4*) oraz jego istotny wpływ na poziom mRNA dla genów zaangażowanych w dynamikę mitochondriów i transport elektronów. Po raz pierwszy w warunkach toksyczności peptydów A $\beta$ O wykazano, że inhibicja PARP-1 powoduje wzrost poziomu mRNA dla enzymów antyoksydacyjnych (*Gpx1* i *Gpx4*), białek dynamiki mitochondriów (*Opa1*, *Mnf2*, *Fis1*) oraz podjednostki II kompleksu oddechowego. Uzyskane wyniki sugerują, że zastosowanie inhibitora PARP-1 (w odpowiedniej dawce i czasie) może mieć istotne działanie cytoprotekcyjne, również w chA.
- Stwierdzono istotne zmiany ekspresji genów w korze mózgu myszy z chA w procesie starzenia. Wykazano u 3 miesięcznych myszy z chA obniżenie poziomu transkrypcji genów kodujących enzymy zaangażowane w obronę antyoksydacyjną (*Sod2*, *Sirt1*, *PARP-1*). Uzyskane wyniki sugerują, że zaburzenia ekspresji wymienionych genów mogą leżeć u podstaw kolejnych niekorzystnych

---

zjawisk w chA. Wyniki wskazują na obiecujące cele dla wczesnej interwencji terapeutycznej w chA.

- Wykazano zależne od wieku zmiany transkrypcji genów zaangażowanych w dynamikę i biogenezę mitochondriów. Wyniki sugerują, że aktywacja biogenezy mitochondriów (Nrf2, PGC-1 $\alpha$  i PPAR- $\alpha$ ) mogłaby mieć korzystne znaczenie w opracowaniu nowej strategii terapeutycznej w zaawansowanych stadiach chA.
- Wyniki badań po raz pierwszy wykazały, że ostatni enzym w łańcuchu transportu elektronów (ETC) oksydaza cytochromu C utrzymuje swoją aktywność na niezmiennym poziomie w toksyczności A $\beta$ O w trzech liniach komórkowych oraz w korze mózgu myszy z chA co sugeruje na jej istotne znaczenie w utrzymaniu jak najdłuższej funkcji mitochondriów.
- Wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy poszerzają i uzupełniają stan wiedzy dotyczący znaczenia peptydów oligomerów A $\beta$ O w regulacji /modulacji transkrypcji genów i mogą być pomocne w opracowaniu nowych strategii neuroprotektoryjnych.



---

## LITERATURA

1. Abeti, R.; Duchen, M.R. (2012) Activation of PARP by oxidative stress induced by beta-amyloid: Implications for Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 2012, 37, 2589–2596.
2. Adav SS, Park JE, Sze SK. (2019) Quantitative profiling brain proteomes revealed mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Mol Brain*, 12(1):1–12.
3. Adem A, Mattsson ME, Nordberg A, Pahlman S. (1987) Muscarinic receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cell line: regulation by phorbol ester and retinoic acid-induced differentiation. *Brain Res.* 430:235-42.
4. Alzheimer's Association. (2021) 2021 Alzheimer's disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement*, 17, 327-406.
5. Aluise CD, Robinson RA, Cai J, Pierce WM, Markesbery WR, Butterfield DA. (2011) Redox proteomics analysis of brains from subjects with amnesic mild cognitive impairment compared to brains from subjects with preclinical Alzheimer's disease: insights into memory loss in MCI. *J. Alzheimers Dis*, 23, 257–269
6. Amakiri N, Kubosumi A, Tran J, Reddy PH. (2019) Amyloid beta and MicroRNAs in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci*, 3; 13, 430.
7. An Y, Varma VR, Varma S, Casanova R, Dammer E, Pletnikova O i wsp. (2018) Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 14:318-329.
8. Anand R, Wai T, Baker MJ, Kladt N, Schauss AC, Rugarli E i wsp. (2014) The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J Cell Biol*, 204:919–29.
9. Andersen JK. (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Medicine*, 10 (supplement):S18–S25
10. Andersen JV, Skotte NH, Christensen SK, Polli FS, Shabani M, Markussen KH i wsp. (2021) Hippocampal disruptions of synaptic and astrocyte metabolism are primary events of early amyloid pathology in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death*, 16;12(11):954.
11. Andersen JV, Jakobsen E, Waagepetersen HS, Aldana BI. (2019) Distinct differences in rates of oxygen consumption and ATP synthesis of regionally isolated nonsynaptic mouse brain mitochondria. *J Neurosci Res*, 97:961–74.
12. Andrews SJ, Goate AM. (2020) Mitochondrial DNA copy number is associated with cognitive impairment. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*. 16(S5) e047543.
13. Ansari M A, Scheff SW. (2010) Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, 69, 155–167.
14. Archer SL. (2013) Mitochondrial dynamics-mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N. Engl. J. Med*, 369, 2236–2251.
15. Ashraf A, Fan Z, Brooks DJ, Edison P. (2015) Cortical hypermetabolism in MCI subjects: a compensatory mechanism? *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 42(3):447-58.
16. Amtul Z, Uhrig M, Wang L, Rozmahel RF, Beyreuther K. (2012) Detrimental effects of arachidonic acid and its metabolites in cellular and mouse models of Alzheimer's disease: Structural insight. *Neurobiol. Aging*. 33(4):831.e21-31.

17. Ansari MA, Scheff SW. (2010) Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69, 155–167.
18. Bagyinszky E, Giau VV, Shim K, Suk K, An SSA, Kim S. (2017) Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. *J Neurol Sci*, 15;376:242-254.
19. Bai P, Cantó C, Oudart H, Brunyánszki A, Cen Y, Thomas C i wsp. (2011) PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. *Cell metabolism*, 13(4), 461–468.
20. Bai R, Guo J, Ye XY, Xie Y, Xie T. (2022) Oxidative stress: the core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*, 5:101619.
21. Baik SH, Kang S, Lee W, Choi H, Chung S, Kim J i wsp. (2019) A breakdown in metabolic reprogramming causes microglia dysfunction in Alzheimer's disease. *Cell Metab*, 30(3):493–507.e6. 10.1016/j.cmet.2019.06.005
22. Baloyannis SJ. (2006) Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 9: 119–126.
23. Ban T, Kohno H, Ishihara T, Ishihara N. (2018) Relationship between OPA1 and cardiolipin in mitochondrial inner-membrane fusion. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 1859(9):951-957.
24. Barbero-Camps E, Fernández A, Martínez L, Fernández-Checa JC, Colell A. (2013) APP/PS1 mice overexpressing SREBP-2 exhibit combined A $\beta$  accumulation and tau pathology underlying Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 1;22(17):3460-76
25. Bartley AF, Lucas EK, Brady LJ, Li Q, Hablitz JJ, Cowell RM, Dobrunz LE (2015) Interneuron transcriptional dysregulation causes frequency-dependent alterations in the balance of inhibition and excitation in hippocampus. *J Neurosci* 35:15276-15290.
26. Barsoum MJ, Yuan H, Gerencser AA, Liot G, Kushnareva Y, Graber S. i wsp. (2006) Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *EMBO J.* 25, 3900–3911.
27. Bayir H. (2005) Reactive oxygen species. *Crit. Care Med*, 33(12):S498–S501.
28. Beal MF. (1996) Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. *Current Opinion in Neurobiology*, 6(5):661–666.
29. Bell EL, Guarente L (2011) The SirT3 divining rod points to oxidative stress. *Mol Cell*, 42:561–568.
30. Benzinger TL, Blazey T, Jack CR Jr., Koeppe RA, Su Y, Xiong C i wsp. (2013) Regional variability of imaging biomarkers in autosomal dominant Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110:E4502–9.
31. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127-152.
32. Bertholet AM, Delerue T, Millet AM, Moulis MF, David C, Daloyau M i wsp. (2016) Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity. *Neurobiol. Dis.* 90, 3–19.
33. Bezprozvanny I, Mattson MP. (2008) Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 31, 454–463 10.1016/j.tins.2008.06.005
34. Biedler JL, Helson L, Spengler BA. (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*, 33: 2643–52.

- 
35. Bleazard W, Mccaffery JM, King EJ, Bale S, Mozdy A, Tieu Q i wsp. (1999) The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* 1, 298–304.
  36. Blennow K, Mattsson N, Scholl M, Hansson O, Zetterberg H. (2015) Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*, 36, 297–309.
  37. Bocchini V, Mazzolla R, Barluzzi R, Blasi E, Sick P, Kettenmann H. (1992) An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. *J Neurosci Res.* 31(4):616-21.
  38. Bosetti F, Brizzi F, Barogi S, Mancuso M, Siciliano G, Tendi EA. i wsp. (2002) Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 23:371–6.
  39. Bossy B, Petrilli A, Klinglmayr E, Chen J, Lütz-Meindl U, Knott AB. (2010) S-nitrosylation of DRP1 does not affect enzymatic activity and is not specific to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2(Suppl 2):S513-26.
  40. Bougarne N, Weyers B, Desmet SJ, Deckers J, Ray DW, Staels B, De Bosscher K. (2018) Molecular Actions of PPAR $\alpha$  in Lipid Metabolism and Inflammation. *Endocr. Rev.* 1;39(5):760-802
  41. Boutant M, Kulkarni SS, Joffraud M, Ratajczak J, Valera-Alberni M, Combe R i wsp. (2017) Mfn2 is critical for brown adipose tissue thermogenic function. *EMBO J.* 36, 1543–1558.
  42. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
  43. Bubber P, Haroutunian V, Fisch G, Blass JP, Gibson GE. (2005) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Ann Neurol.* 57(5):695-703.
  44. Buck MD, O'Sullivan D, Klein Geltink RI, Curtis JD, Chang C-H, Sanin DE. i wsp. (2016) Mitochondrial dynamics controls T cell fate through metabolic programming. *Cell*, 166: 63 – 76.
  45. Burte F, Carelli V, Chinnery PF and Yu-Wai-Man P (2015) Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol*, 11, 11-24
  46. Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J. (2002) Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol. Aging*, 23, 655–664.
  47. Butterfield DA, Perluigi M, Sultana R. (2006) Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: new insights from redox proteomics. *Eur. J. Pharmacol*, 545, 39–50.
  48. Cabezas-Opazo FA, Vergara-Pulgar K, Pérez MJ, Jara C, Osorio-Fuentealba C, Quintanilla RA. (2015) Mitochondrial dysfunction contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Oxid. Med. Cell. Longev*, 2015, 509654
  49. Cai Q, Tammineni P. (2016) Alterations in mitochondrial quality control in Alzheimer's disease, *Front. Cell. Neurosci*, 9;10:24.
  50. Cai W, Zhang K, Li P, Zhu L, Xu J, Yang B i wsp. (2017) Dysfunction of the neurovascular unit in ischemic stroke and neurodegenerative diseases: An aging effect. *Ageing Res Rev*, 34:77-87.
  51. Calkins MJ, Manczak M, Mao P, Shirendeb U, Reddy PH. (2011) Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal
-

- 
- mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 20, 4515–4529.
52. Carvalho C, Correia SC, Cardoso S, Plácido AI, Candeias E, Duarte AI, Moreira P. (2015) The role of mitochondrial disturbances in Alzheimer, Parkinson and Huntington diseases. *Expert Rev. Neurother.* 15, 867–884.
53. Castellani RJ, Plascencia-Villa G, Perry G. (2019) The amyloid cascade and Alzheimer's disease therapeutics: theory versus observation. *Lab Invest.* 99(7):958-970.
54. Cha MY, Han SH, Son SM, Hong HS, Choi YJ, Byun J, Mook-Jung I. (2012) Mitochondria-specific accumulation of amyloid beta induces mitochondrial dysfunction leading to apoptotic cell death. *PLoS One.* 7(4):e34929.
55. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, Xu HE. (2017) Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin.* 38(9):1205-1235.
56. Chen H, Chan DC. (2009) Mitochondrial dynamics—fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* 18, R169–R176.
57. Chen H, Chomyn A, Chan DC. (2005) Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem.* 15;280(28):26185-92.
58. Chen JX, Yan SS. (2010) Role of mitochondrial amyloid-beta in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 20(Suppl 2):S569–S578.
59. Chen KH, Dasgupta A, Ding J, Indig FE, GhoshP, Longo DL. (2014) Role of mitofusin 2 (Mfn2) in controlling cellular proliferation. *FASEB J.* 28, 382–394.
60. Cheng A, Wan R, Yang JL, Kamimura N, Son TG, Ouyang X, Luo Y, Okun E, Mattson MP. (2012) Involvement of PGC-1 $\alpha$  in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines. *Nat Commun*, 3:1250
61. Chételat G, Ossenkoppele R, Villemagne VL, Perrotin A, Landeau B, Mézence F i wsp. (2013) Atrophy, hypometabolism and clinical trajectories in patients with amyloid-negative Alzheimer's disease. *Brain.* 139(Pt 9):2528-39.
62. Cheung YT, Lau WK, Yu MS, Lai CS, Yeung SC, So KF, Chang RC. (2009) Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*, 30: 127–35.
63. Chew H, Solomon V A, Fonteh AN. (2020) Involvement of lipids in Alzheimer's disease pathology and potential therapies. *Front. Physiol.* 9;11:598
64. Chinnery PF, Hudson G. (2013) Mitochondrial genetics. *British Medical Bulletin*, 106 (1): 135–159.
65. Chomczyński P, Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.
66. Cho DH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, Lipton SA. (2009) S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science*, 3;324(5923):102-5.
67. Chou JL, Shenoy DV, Thomas N, Choudhary PK, Laferla FM, Goodman SR, Breen GA. (2011) Early dysregulation of the mitochondrial proteome in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Proteomics*, 1;74(4):466-79.
68. Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M. (2010) An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med.* 2(1):1-12.
-

- 
69. Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA. (1989) Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: Expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res*, 49: 219–25.
  70. Cieślak M, Czapski GA, Strosznajder JB. (2015) The Molecular Mechanism of Amyloid  $\beta$ 42 Peptide Toxicity: The Role of Sphingosine Kinase-1 and Mitochondrial Sirtuins. *PLoS One*. 3;10(9):e0137193.
  71. Cisneros-Mejorado A, Perez-Samartin A, Gottlieb M, Matute C. (2015) ATP signaling in brain: release, excitotoxicity and potential therapeutic targets. *Cell. Mol. Neurobiol.* 35, 1–6.
  72. Clayton KA, Van Enoo AA, Ikezu T. (2017) Alzheimer's Disease: The Role of Microglia in Brain Homeostasis and Proteopathy. *Front Neurosci.* 12;11:680.
  73. Cline EN, Bicca MA, Viola KL, Klein WL. (2018) The Amyloid- $\beta$  Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *J Alzheimers Dis.* 64(s1):S567-S610.
  74. Cogliati S, Cabrera-Alarcón JL, Enriquez JA. (2021) Regulation and functional role of the electron transport chain supercomplexes. *Biochem Soc Trans.* 17;49(6):2655-2668.
  75. Cohen AD, Price JC, Weissfeld LA, James J, Rosario BL, Bi W i wsp. (2009) Basal cerebral metabolism may modulate the cognitive effects of Abeta in mild cognitive impairment: an example of brain reserve. *J Neurosci.* 29:14770–8.
  76. Corbett GT, Gonzalez FJ, Pahan K. (2015) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  stimulates ADAM10-mediated proteolysis of APP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112(27):8445–8450.
  77. Croteau E, Castellano CA, Fortier M, Bocti C, Fulop T, Paquet N, Cunnane SC. (2018) A cross-sectional comparison of brain glucose and ketone metabolism in cognitively healthy older adults, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* 1;107:18-26.
  78. Crouch PJ, Blake R, Duce JA, Ciccotosto GD, Li QX, Barnham KJ. i wsp. (2005) Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid-beta1-42. *J Neurosci*, 19;25(3):672-9.
  79. Crouch PJ, Barnham KJ, Duce JA, Blake RE, Masters CL, Trounce IA. (2006) Copper-dependent inhibition of cytochrome c oxidase by Abeta (1-42) requires reduced methionine at residue 35 of the Abeta peptide. *J Neurochem*, 99(1):226-36.
  80. Cuadrado A, Kügler S, Lastres-Becker I. (2018) Pharmacological targeting of GSK-3 and NRF2 provides neuroprotection in a preclinical model of tauopathy. *Redox Biol*, 14:522–534.
  81. Cummings J. (2021) New approaches to symptomatic treatments for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 13;16(1):2. doi: 10.1186/s13024-021-00424-9. Erratum in: *Mol Neurodegener.* 2021 1;16(1):21.
  82. Cummings J, Aisen PS, DuBois B, Frölich L, Jack CR Jr., Jones RW. i wsp. (2016) Drug development in Alzheimer's disease: The path to 2025. *Alzheimers Res. Ther.* 8:39.
  83. Cunnane SC, Courchesne-Loyer A, Vandenberghe C, St-Pierre V, Fortier M, Hennebelle M. i wsp. (2016) Can Ketones Help Rescue Brain Fuel Supply in Later Life? Implications for Cognitive Health during Aging and the Treatment of Alzheimer's Disease. *Front. Mol. Neurosci.* 8;9:53.
-



- 
84. Cunnane SC, Schneider JA, Tangney C, Tremblay-Mercier J, Fortier M, Bennett DA, Morris MC. (2012) Plasma and Brain Fatty Acid Profiles in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* 29(3):691–697.
  85. Czapski GA, Strosznajder JB. (2021) Glutamate and GABA in Microglia-Neuron Cross-Talk in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 28;22(21):11677.
  86. Dabrowska A, Venero JL, Iwasawa R, Hankir MK, Rahman S, Boobis A, Hajji N. (2015) PGC-1 $\alpha$  controls mitochondrial biogenesis and dynamics in lead-induced neurotoxicity. *Aging (Albany NY)*, 7:629–647.
  87. Dawson VL, Dawson TM. (2004) Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *J Bioenerg Biomembr*, 36:287–94.
  88. David DC, Hauptmann S, Scherping I, Schuessel K, Keil U, Rizzu P. i wsp. (2005) Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 280, 23802–23814.
  89. Davies DA, Adlimoghaddam A, Albensi BC. (2021) Role of Nrf2 in Synaptic Plasticity and Memory in Alzheimer's Disease. *Cells.* 25;10(8):1884.
  90. d'Errico P, Meyer-Luehmann M. (2020) Mechanisms of Pathogenic Tau and A $\beta$  Protein Spreading in Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* 12:265.
  91. de Castro IP, Martins LM, Tufi R (2010) Mitochondrial quality control and neurological disease: an emerging connection. *Expert Rev Mol Med*, 12:e12.
  92. Di Domenico F, Barone E, Perluigi M, Butterfield DA. (2017) The triangle of death in Alzheimer's disease brain: the aberrant cross-talk among energy metabolism, mammalian target of rapamycin signaling, and protein homeostasis revealed by redox proteomics. *Antioxid. Redox Signal.* 26, 364–387.
  93. Dong YT, Cao K, Xiang J, Shan L, Guan ZZ. (2020) Silent mating-type information regulation 2 Homolog 1 attenuates the neurotoxicity associated with Alzheimer disease via a mechanism which may involve regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- $\alpha$ . *Am J Pathol*, 190:1545–1564.
  94. D'Orio B, Fracassi A, Cerù MP, Moreno S (2017) Targeting PPAR $\alpha$  in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 15(4):345–354.
  95. Dragicevic N, Mamcarz M, Zhu Y, Buzzeo R, Tan J, Arendash GW i wsp. (2010) Mitochondrial amyloid-beta levels are associated with the extent of mitochondrial dysfunction in different brain regions and the degree of cognitive impairment in Alzheimer's transgenic mice. *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2:S535–50.
  96. Du H, Guo L, Fang F, Chen D, Sosunov AA, McKhann GM i wsp. (2008) Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat Med*, 14(10):1097–1105
  97. Du H, Guo L, Yan S, Sosunov AA, McKhann GM, Yan SS. (2010) Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 18670–18675, 2010
  98. Dunn B, Stein P, Cavazzoni P. (2021) Approval of Aducanumab for Alzheimer Disease-The FDA's Perspective. *JAMA Intern Med.* 1;181(10):1276–1278.
  99. Eckert A, Schulz KL, Rhein V, Götz J. (2010) Convergence of amyloid-beta and tau pathologies on mitochondria in vivo. *Mol Neurobiol.* 41(2-3):107–14.
  100. El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Loike JD, Silverstein SC. (1998) Microglia, scavenger receptors, and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 19(1 Suppl):S81–4.
-

- 
101. Fairley LH, Wong JH, Barron AM. **(2021)** Mitochondrial Regulation of Microglial Immunometabolism in Alzheimer's Disease. *Front Immunol*, 25;12:624538.
  102. Faller P, Hureau C, Berthoumieu O. **(2013)** Role of metal ions in the self-assembly of the Alzheimer's amyloid- $\beta$  peptide. *Inorg. Chem*, 52(21):12193–12206.
  103. Fan L, Mao C, Hu X, Zhang S, Yang Z, Hu Z, i wsp. **(2020)** New Insights Into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front Neurol*, 10;10:1312.
  104. Fan Z, Okello AA, Brooks DJ, Edison P. **(2015)** Longitudinal influence of microglial activation and amyloid on neuronal function in Alzheimer's disease. *Brain*, 138(pt 12):3685–3698.
  105. Fan Z, Brooks DJ, Okello A, Edison P. **(2017)** An early and late peak in microglial activation in Alzheimer's disease trajectory. *Brain*, 140(3):792–803.
  106. Fatokun AA, Dawson VL, Dawson TM. **(2014)** Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol*. 171:2000-16.
  107. Fecher C, Trovò L, Müller SA, Snaidero N, Wettmarshausen J, Heink S. i wsp **(2019)** Cell-type-specific profiling of brain mitochondria reveals functional and molecular diversity. *Nat Neurosci*. 22(10):1731-1742.
  108. Felici R, Cavone L, Lapucci A, Guasti D, Bani D, Chiarugi A. **(2014)** PARP inhibition delays progression of mitochondrial encephalopathy in mice. *Neurotherapeutics*. 11(3):651-64.
  109. Felici R, Lapucci A, Cavone L, Pratesi S, Berlinguer-Palmini R, Chiarugi A. **(2015)** Pharmacological NAD-Boosting Strategies Improve Mitochondrial Homeostasis in Human Complex I-Mutant Fibroblasts. *Mol Pharmacol*. 87(6):965-71.
  110. Filograna R, Mennuni M, Alsina D, Larsson NG. **(2021)** Mitochondrial DNA copy number in human disease: the more the better? *FEBS Lett*. 595(8):976-1002.
  111. Frezza C, Cipolat S, Martins De Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, i wsp. **(2006)** OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*, 126, 177–189.
  112. Friedman JR, Nunnari J. **(2014)** Mitochondrial form and function. *Nature*, 505, 335–343.
  113. Fu W, Liu Y, Yin H. **(2019)** Mitochondrial Dynamics: Biogenesis, Fission, Fusion, and Mitophagy in the Regulation of Stem Cell Behaviors. *Stem Cells Int*, 7;2019:9757201.
  114. Gan X, Huang S, Wu L, Wang Y, Hu G, Li G, i wsp. **(2014)** Inhibition of ERK-DLP1 signaling and mitochondrial division alleviates mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease hybrid cell. *Biochim Biophys Acta*, 1842(2):220-31.
  115. García-González L, Pilat D, Baranger K, Rivera S. **(2019)** Emerging Alternative Proteinases in APP Metabolism and Alzheimer's Disease Pathogenesis: A Focus on MT1-MMP and MT5-MMP. *Front Aging Neurosci*, 24;11:244.
  116. Gejl M, Brock B, Egefjord L, Vang K, Rungby J, Gjedde A. **(2017)** Blood-Brain Glucose Transfer in Alzheimer's disease: Effect of GLP-1 Analog Treatment. *Sci Rep*, 13;7(1):17490.
  117. Gella A, Durany N. **(2009)** Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adh Migr*. 3(1):88-93.
  118. Glabe CG. **(2006)** Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol. Aging*, 27(4):570–575.
-

- 
119. Glenner GG, Wong CW. **(1984)** Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 16;120(3):885-90.
  120. Gordon BA, Blazey TM, Su Y, Hari-Raj A, Dincer A, Flores S i wsp. **(2018)** Spatial patterns of neuroimaging biomarker change in individuals from families with autosomal dominant Alzheimer's disease: a longitudinal study. *Lancet Neurol*, 17(3):241-250.
  121. Gordon MN, Heneka MT, Le Page LM, Limberger C, Morgan D, Tenner AJ. i wsp. **(2021)** Impact of COVID-19 on the Onset and Progression of Alzheimer's Disease and Related Dementias: A Roadmap for Future Research. *Alzheimers Dement*, 7:10.1002/alz.12488.
  122. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R. i wsp. **(2016)** Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 20;2:16080.
  123. Grimm, A., and Eckert, A. **(2017)** Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view. *J. Neurochem*. 143, 418–431.
  124. Grimm A, Friedland K, Eckert A. **(2016)** Mitochondrial dysfunction: the missing link between aging and sporadic Alzheimer's disease. *Biogerontology*, 17, 281–296.
  125. Grimm MOW, Kuchenbecker J, Grösgen S, Burg VK, Hundsdörfer B, Rothhaar TL. i wsp. **(2011)** Docosahexaenoic Acid Reduces Amyloid  $\beta$  Production via Multiple Pleiotropic Mechanisms. *J. Biol. Chem*. 22;286(16):14028-39
  126. Grimm MOW, Michaelson DM, Hartmann T. **(2017)** Omega-3 fatty acids, lipids, and apoE lipidation in Alzheimer's disease: A rationale for multi-nutrient dementia prevention. *J. Lipid Res*. 58(11):2083–2101.
  127. Hamelin L, Lagarde J, Dorothée G, Leroy C, Labit M, Comley RA. i wsp. **(2016)** Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using 18F-DPA-714 PET imaging. *Brain*. 139(Pt 4):1252-64.
  128. Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH. i wsp **(2021)** The Amyloid- $\beta$  Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry*. 26(10):5481-5503.
  129. Hansson Petersen CA, Alikhani N, Behbahani H, Wiehager B, Pavlov PF, Alafuzoff I i wsp. **(2008)** The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2;105(35):13145-50.
  130. Hardy J, Allsop D. **(1991)** Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*, 12(10):383-8.
  131. Hardy JA, Higgins GA. **(1992)** Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 10;256(5054):184-5.
  132. Hardy J, Selkoe DJ. **(2002)** The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 19;297(5580):353-6.
  133. Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, Lannfelt L, Selkoe DJ. **(1995)** The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med*. 1(12):1291-6.
  134. He F, Ru X, Wen T. **(2020)** NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci*. 6;21(13):4777.
  135. He Z, Ning N, Zhou Q, Khoshnam SE, Farzaneh M. **(2020)** Mitochondria as a therapeutic target for ischemic stroke. *Free Radic Biol Med*, 146:45-58.
  136. Herrup K. **(2015)** The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci* 18, 794–799
-

- 
137. Hippus H, Neundörfer G. (2003) The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*, 5:101–8.
  138. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS i wsp. (2001) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21, 3017–3023.
  139. Hu C, Huang Y, Li L. (2017) Drp1–Dependent Mitochondrial Fission Plays Critical Roles in Physiological and Pathological Progresses in Mammals. *Int. J.Mol. Sci*, 13;18(1):144.
  140. Huang J B, Hsu SP, Pan HY, Chen SD, Chen SF, Lin TK. i wsp. (2020) Peroxisome Proliferator–Activated Receptor gamma Coactivator 1alpha Activates Vascular Endothelial Growth Factor That Protects Against Neuronal Cell Death Following Status Epilepticus through PI3K/AKT and MEK/ERK Signaling. *Int. J. Mol. Sci*. 30;21(19):7247.
  141. Huang P, Galloway CA, Yoon Y. (2011) Control of mitochondrial morphology through differential interactions of mitochondrial fusion and fission proteins. *PLoS ONE*. 6:e20655.
  142. Huber CM, Yee C, May T, Dhanala A, Mitchell CS. (2018) Cognitive Decline in Preclinical Alzheimer's Disease: Amyloid-Beta versus Tauopathy. *J Alzheimers Dis*, 61(1):265-281.
  143. Hurtado-Bagès S, Knobloch G, Ladurner AG, Buschbeck M. (2020) The taming of PARP1 and its impact on NAD<sup>+</sup> metabolism. *Mol Metab*. 38:100950
  144. Hussain G, Wang J, Rasul A, Anwar H, Imran A, Qasim M. i wsp. (2019) Role of cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases. *Lipids Health Dis*. 25;18(1):26
  145. Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K. (2006) Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J*, 25, 2966–2977.
  146. Itzhaki RF, Lathe R, Balin BJ, Ball MJ, Bearer EL, Braak H i wsp. (2016) Microbes and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 51(4):979-84.
  147. Jacewicz M, Czapski GA, Katkowska I, Strosznajder RP. (2009) Systemic administration of lipopolysaccharide impairs glutathione redox state and object recognition in male mice. The effect of PARP-1 inhibitor. *Folia Neuropathol*. 47(4):321-8.
  148. Jadiya P, Kolmetzky DW, Tomar D, Di Meco A, Lombardi AA, Lambert JP. i wsp. (2019) Impaired mitochondrial calcium efflux contributes to disease progression in models of Alzheimer's disease. *Nat Commun*, 29;10(1):3885.
  149. Jakob-Roetne R, Jacobsen H. (2009) Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(17):3030-59.
  150. Jetto CT, Nambiar A, Manjithaya R. (2022) Mitophagy and Neurodegeneration: Between the Knowns and the Unknowns. *Front Cell Dev Biol*. 22;10:837337
  151. Jęśko H, Strosznajder RP. (2016) Sirtuins and their interactions with transcription factors and poly(ADP-ribose) polymerases. *Folia Neuropathol*. 54(3):212-233.
  152. Jęśko H, Wencel P, Strosznajder RP, Strosznajder JB. (2017) Sirtuins and Their Roles in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders. *Neurochem Res*. 42(3):876-890.
  153. Jęśko H, Wencel PL, Lukiw WJ, Strosznajder RP. (2019) Modulatory Effects of Fingolimod (FTY720) on the Expression of Sphingolipid Metabolism-Related Genes in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*. 56(1):174-185.
  154. Jęśko H, Wencel PL, Wójtowicz S, Strosznajder J, Lukiw WJ, Strosznajder RP. (2020) Fingolimod Affects Transcription of Genes Encoding Enzymes of Ceramide
-

- 
- Metabolism in Animal Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*, 57(6):2799-2811.
155. Jiang M, Zheng J, Peng Q, Hou Z, Zhang J, Mori S. i wsp. (2014) Sirtuin 1 activator SRT2104 protects Huntington's disease mice. *Ann Clin Transl Neurol*, 1:1047–1052
156. Jiang S, Shao C, Tang F, Wang W, Zhu X. (2019) Dynamin-like protein 1 cleavage by calpain in Alzheimer's disease. *Aging Cell*, 18(3):e12912.
157. Joffre C, Nadjar A, Lebbadi M, Calon F, Laye S. (2014) n-3 LCPUFA improves cognition: The young, the old and the sick. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*. 91(1-2):1-20
158. Johnson ECB, Dammer EB, Duong DM, Ping L, Zhou M, Yin L. i wsp. (2020) Large-scale proteomic analysis of Alzheimer's disease brain and cerebrospinal fluid reveals early changes in energy metabolism associated with microglia and astrocyte activation. *Nat Med*, 26(5):769–80.
159. Jung Kim M. (2018) Betaine enhances the cellular survival via mitochondrial fusion and fission factors, MFN2 and DRP1. *Anim Cells Syst*, 22: 289 – 298
160. Kadenbach B, Huttemann M. (2015) The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. *Mitochondrion*. 24:64–76.
161. Kann O, Kovacs R. (2007) Mitochondria and neuronal activity. *American journal of physiology. Cell physiology*, 292, C641–657.
162. Kandimalla R, Manczak M, Yin X, Wang R, Reddy PH. (2018) Hippocampal phosphorylated tau induced cognitive decline, dendritic spine loss and mitochondrial abnormalities in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet*, 27, 30–40.
163. Kandlur A, Satyamoorthy K, Gangadharan G. (2020) Oxidative Stress in Cognitive and Epigenetic Aging: A Retrospective Glance. *Front Mol Neurosci*. 18;13:41.
164. Kaspar S, Oertlin C, Szczepanowska K, Kukat A, Senft K, Lucas C. i wsp. (2021) Adaptation to mitochondrial stress requires CHOP-directed tuning of ISR. *Sci Adv*. 26;7(22):eabf0971.
165. Ke Y, Wang C, Zhang J, Zhong X, Wang R, Zeng X, Ba X. (2019) The role of PARPs in inflammation- and metabolic-related diseases: molecular mechanisms and beyond. *Cells* 8, 1047.
166. Kim J, Cheong JH. (2020) Role of Mitochondria-Cytoskeleton Interactions in the Regulation of Mitochondrial Structure and Function in Cancer Stem Cells. *Cells*. 14;9(7):1691.
167. Kincaid B, Bossy-Wetzel E. (2013) Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci*, 6;5:48.
168. Kirby K, Hu J, Hilliker AJ, Phillips JP. (2002) RNA interference-mediated silencing of Sod2 in *Drosophila* leads to early adult-onset mortality and elevated endogenous oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(25):16162-7.
169. Kisler K, Nelson AR, Montagne A, Zlokovic BV (2017) Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*, 18:419-434.
170. Kleele T, Rey T, Winter J, Zaganelli S, Mahecic D, Perreten Lambert H. i wsp. (2021) Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis. *Nature*, 593(7859):435-439.
-

- 
171. Klein HU, Trumpff C, Yang HS, Lee AJ, Picard M, Bennett DA, De Jager PL. (2021) Characterization of mitochondrial DNA quantity and quality in the human aged and Alzheimer's disease brain. *Mol Neurodegener.* 6;16(1):75.
  172. Kleinridders A, Ferris HA, Reyzer ML, Rath M, Soto M, Manier ML. i wsp. (2018) Regional differences in brain glucose metabolism determined by imaging mass spectrometry. *Mol Metab,* 12:113–21.
  173. Kokubo H, Kaye R, Glabe CG & Yamaguchi H (2005) Soluble Abeta oligomers ultrastructurally localize to cell processes and might be related to synaptic dysfunction in Alzheimer's disease brain. *Brain Res,* 1031, 222– 228.
  174. Krey L, Huber MK, Höglinger GU, Wegner F. (2021) Can SARS-CoV-2 Infection Lead to Neurodegeneration and Parkinson's Disease? *Brain Sci,* 18;11(12):1654.
  175. Kurutas EB. (2016) The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J.* 25;15(1):71.
  176. Lapucci A, Pittelli M, Rapizzi E, Felici R, Moroni F, Chiarugi A. (2011) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a nuclear epigenetic regulator of mitochondrial DNA repair and transcription. *Mol Pharmacol,* 79(6):932–940.
  177. Lassmann H, van Horssen J. (2016) Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis lesions. *Biochim Biophys Acta,* 1862:506–510
  178. Latta CH, Brothers HM, Wilcock DM. (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease; A source of heterogeneity and target for personalized therapy. *Neuroscience,* 302, 103–111.
  179. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N. i wsp. (1996) Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3;93(18):9782-7.
  180. Lee SE, Kwon D, Shin N, Kong D, Kim NG, Kim HY. i wsp. (2022) Accumulation of APP-CTF induces mitophagy dysfunction in the iNSCs model of Alzheimer's disease. *Cell Death Discov.* 10;8(1):1.
  181. Lejri I, Agapouda A, Grimm A, Eckert A. (2019) Mitochondria- and oxidative stress-targeting substances in cognitive decline-related disorders: from molecular mechanisms to clinical evidence. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2019:9695412.
  182. Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature.* 16;440(7082):352-7.
  183. Leuner K, Schütt T, Kurz C, Eckert SH, Schiller C, Occhipinti A. i wsp. (2012) Mitochondrion-derived reactive oxygen species lead to enhanced amyloid beta formation. *Antioxid Redox Signal.* 15;16(12):1421-33.
  184. Lewis J, Dickson D W, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G. i wsp. (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science,* 293, 1487–1491.
  185. Li XC, Hu Y, Wang ZH, Luo Y, Zhang Y, Liu XP. i wsp. (2016) Human wild-type full-length tau accumulation disrupts mitochondrial dynamics and the functions via increasing mitofusins. *Sci. Rep,* 6:24756.
  186. Li PA, Hou X, Hao S. (2017) Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration. *J. Neurosci. Res,* 95, 2025–2029.
  187. Lin J, Wu PH, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J, Zhang CY. i wsp. (2004) Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell.* 1;119(1):121-35.
-

- 
188. Liu Z, Butow RA. (2006) Mitochondrial retrograde signaling. *Annu Rev Genet*, 40:159–85.
  189. Liu ZD, Zhang S, Hao JJ, Xie TR, Kang JS. (2016) Cellular model of neuronal atrophy induced by DYNC1H1 deficiency reveals pro-TECTIVE roles of RAS-RAFMEK signaling. *Protein Cell*, 7, 638–650.
  190. Lopez Sanchez MIG, van Wijngaarden P, Trounce IA. (2019) Amyloid precursor protein-mediated mitochondrial regulation and Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol*. 176(18):3464-3474.
  191. Loson OC, Song Z, Chen H, Chan DC. (2013) Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell*, 24, 659–667.
  192. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci*, 158, 47–52.
  193. Lu K, Policar T, Song X, Rahimnejad S. (2020) Molecular Characterization of PGC-1 $\beta$  (PPAR Gamma Coactivator 1 $\beta$ ) and its Roles in Mitochondrial Biogenesis in Blunt Snout Bream (*Megalobrama amblycephala*). *Int J Mol Sci*. 12;21(6):1935.
  194. Lukiw WJ, Pappolla M, Pelaez RP, Bazan NG. (2005) Alzheimer's Disease—A Dysfunction in Cholesterol and Lipid Metabolism. *Cell. Mol. Neurobiol*. 25(3-4):475-83
  195. Lukyanova LD. (2019) Signaling mechanisms of hypoxia, Moscow: RAS, p. 215.
  196. Luo X, Kraus WL. (2012) On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev*. 1;26(5):417-32.
  197. Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N. *et al* (2004) A $\beta$ AD directly links A $\beta$  to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science*, 304 (5669):448–452
  198. Maier CM, Chan PH. (2002) Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist*. 8:323–334.
  199. Manczak M, Calkins MJ, Reddy PH. (2011) Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: Implications for neuronal damage. *Hum. Mol. Genet*, 20, 2495–2509.
  200. Manczak, M, Kandimalla R, Yin X, Reddy PH. (2018) Hippocampal mutant APP and amyloid beta-induced cognitive decline, dendritic spine loss, defective autophagy, mitophagy and mitochondrial abnormalities in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet*. 15;27(8):1332-1342
  201. Manczak M, Reddy PH. (2012) Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease neurons: implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage. *Hum. Mol. Genet*. 21, 2538–2547.
  202. Mango D, Saidi A, Cisale GY, Feligioni M, Corbo M and Nisticò R (2019) Targeting Synaptic Plasticity in Experimental Models of Alzheimer's Disease. *Front. Pharmacol*, 10:778.
  203. Mao K, Zhang G. (2021) The role of PARP1 in neurodegenerative diseases and aging. *FEBS J*. 289(8):2013-2024
  204. Martínez-Redondo V., Pettersson A. T., Ruas J. L. (2015) The hitchhiker's guide to PGC-1 $\alpha$  isoform structure and biological functions. *Diabetology*. 58(9):1969–1977.
-

- 
205. Martire S, Fusco A, Mosca L, Forte E, Correani V, Fontana M. i wsp. (2016) Bioenergetic impairment in animal and cellular models of Alzheimer's disease: PARP-1 inhibition rescues metabolic dysfunctions. *J Alzheimers Dis*, 54(1):307–324.
  206. Mastroeni D, Khmour OM, Delvaux E, Nolz J, Olsen G, Berchtold N. i wsp. (2017) Nuclear but not mitochondrial-encoded oxidative phosphorylation genes are altered in aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 13:510–9.
  207. Mastroeni D, Nolz J, Sekar S, Delvaux E, Serrano G, Cuyugan L. i wsp. (2018) Laser-captured microglia in the Alzheimer's and Parkinson's brain reveal unique regional expression profiles and suggest a potential role for hepatitis B in the Alzheimer's brain. *Neurobiol Aging*, 63:12-21.
  208. Maurer I, Zierz S, Moller HJ. (2000) A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol Aging*, 21:455–462
  209. McGeer EG, McGeer PL. (2010) Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. *J. Alzheimer's. Dis*, 19, 355–361.
  210. McLelland GL, Goiran T, Yi W, Dorval G, Chen CX, Lauinger ND. i wsp. (2018) Mfn2 ubiquitination by PINK1/parkin gates the p97-dependent release of ER from mitochondria to drive mitophagy. *Elife*, 20;7:e32866.
  211. Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF. (1994) Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 36: 747–751.
  212. Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L Jr, Baron P, Villalba M i wsp. (1995) Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature*, 13;374(6523):647-50.
  213. Mesa-Herrera F, Taoro-Gonzalez L, Valdes-Baizabal C, Diaz M, Marin R (2019) Lipid and lipid raft alteration in aging and neurodegenerative diseases: a window for the development of new biomarkers. *Int. J. Mol. Sci.* 4;20(15):3810.
  214. Miranda M, Bonekamp NA, Kühl I. (2022) Starting the engine of the powerhouse: mitochondrial transcription and beyond. *Biol Chem*. 2022 31. doi: 10.1515/hsz-2021-0416.
  215. Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A. i wsp. (1999) Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem*, 274:6483-92.
  216. Moreira PI, Carvalho C, Zhu X, Smith MA, Perry G. (2010) Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology, *Biochim. Biophys. Acta*, 1802(1):2-10.
  217. Mosconi L, de Leon M, Murray J, Lezi E, Lu J, Javier E. i wsp. (2011) Reduced mitochondria cytochrome oxidase activity in adult children of mothers with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 27(3):483-90.
  218. Mosconi L, Mistur R, Switalski R, Tsui WH, Glodzik L, Li Y. i wsp. (2009) FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 36, 811-822.
  219. Mostafa DK, El Azhary NM, Nasra RA. (2016) The hydrogen sulfide releasing compounds ATB-346 and diallyl trisulfide attenuate streptozotocin-induced cognitive impairment, neuroinflammation, and oxidative stress in rats: involvement of asymmetric dimethylarginine. *Can J Physiol Pharmacol*, 94(7):699-708.
-



- 
220. Muirhead KE, Borger E, Aitken L, Conway SJ, Gunn-Moore FJ. (2010) The consequences of mitochondrial amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Biochem J*, 24;426(3):255-70.
  221. Nalivaeva NN, Belyaev ND, Kerridge C, Turner AJ. (2014) Amyloid-clearing proteins and their epigenetic regulation as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*, 17;6:235.
  222. Naon D, Zaninello M, Giacomello M, Varanita T, Grespi F, Lakshminaranayan S. i wsp. (2016) Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum-mitochondria tether. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 4;113(40):11249-11254.
  223. Narne P, Pandey V, Simhadri PK, Phanithi PB. (2017) Poly (ADP-ribose) polymerase-1 hyperactivation in neurodegenerative diseases: The death knell tolls for neurons. *Semin Cell Dev Biol*. 63:154-166.
  224. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK. i wsp. (2001) Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60(8): 759–767.
  225. Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. (2003a) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 24: 1063– 70.
  226. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R. (2003b) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39: 409– 21.
  227. Ohta S, Ohsawa I. (2006) Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease: on defects in the cytochrome c oxidase complex and aldehyde detoxification, *J. Alzheimers Dis*, 9(2):155-66.
  228. Oliver DMA, Reddy PH. (2019) Molecular Basis of Alzheimer's Disease: Focus on Mitochondria. *J Alzheimers Dis*, 72(s1):S95-S116.
  229. Omar RA, Chyan YJ, Andorn AC, Poeggeler B, Robakis NK, Pappolla MA. (1999) Increased expression but reduced activity of antioxidant enzymes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 1(3):139-145.
  230. Ono K, Tsuji M. (2020) Protofibrils of Amyloid-β are Important Targets of a Disease-Modifying Approach for Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*, 21(3):952.
  231. Osellame LD, Singh AP, Stroud DA, Palmer CS, Stojanovski D, Ramachandran R, Ryan MT. (2016) Cooperative and independent roles of the Drp1 adaptors Mff, MiD49 and MiD51 in mitochondrial fission. *J Cell Sci*. 1;129(11):2170-81.
  232. Oswald MCW, Garnham N, Sweeney ST, Landgraf M. (2018) Regulation of neuronal development and function by ROS. *FEBS Lett*, 592(5):679-691
  233. Otera H, Miyata N, Kuge O, Mihara K. (2016) Drp1-dependent mitochondrial fission via MiD49/51 is essential for apoptotic cristae remodeling. *J Cell Biol*. 29;212(5):531-44.
  234. Oyarce AM, Fleming PJ. (1991) Multiple forms of human dopamine beta-hydroxylase in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys*, 1;290(2):503-10.
  235. Oyewole AO, Birch-Machin MA. (2015) Mitochondria-targeted antioxidants. *FASEB J.*, 29(12):4766-71
  236. Pählman S, Ruusala AI, Abrahamsson L, Mattsson ME, Esscher T. (1984) Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ*. 14: 135–44.
-

- 
237. Palikaras K, Tavernarakis N. (2014) Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp Gerontol*, 56:182-8..
  238. Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N. i wsp. (2007) Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron*, 6;55(5):697-711.
  239. Park H, Kam TI, Dawson TM, Dawson VL. (2020) Poly (ADP-ribose) (PAR)-dependent cell death in neurodegenerative diseases. *Int Rev Cell Mol Biol*. 353:1-29.
  240. Park J, Choi H, Min JS, Kim B, Lee SR, Yun JW. i wsp. (2015) Loss of mitofusin 2 links beta-amyloid-mediated mitochondrial fragmentation and Cdk5-induced oxidative stress in neuron cells. *J Neurochem*, 132, 687-702.
  241. Pedrós I, Petrov D, Allgaier M, Sureda F, Barroso E, Beas-Zarate C. i wsp. (2014) Early alterations in energy metabolism in the hippocampus of APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1842:1556-1566
  242. Peña-Blanco A, Haschka MD, Jenner A, Zuleger T, Proikas-Cezanne T, Villunger A. i wsp. (2021) Correction: Drp1 modulates mitochondrial stress responses to mitotic arrest. *Cell Death Differ*, 23.
  243. Perry G, Cash AD, Smith MA (2002) Alzheimer disease and oxidative stress. *J Biomed Biotechnol* 2:120–123.
  244. Persson T, Popescu BO, Cedazo-Minguez A. (2014) Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? *Oxid Med Cell Longev*. 2014:427318
  245. Picone P, Nuzzo D, Giacomazza D, Carlo MD. (2020)  $\beta$ -Amyloid peptide: the cell compartment multi-faceted interaction in Alzheimer's disease. *Neurotox. Res.*, 37(2):250-263
  246. Pleen J, Townley R. (2022) Alzheimer's disease clinical trial update 2019-2021. *J Neurol*, 269(2):1038-1051.
  247. Polito LB, Albani GD. (2017) Sirtuin modulation as novel neuroprotective strategy for Alzheimer's disease. In: Gozes I (ed) *Neuroprotection in Alzheimer's Disease*. Elsevier/Academic Press, pp 149–173
  248. Ponce DP, Salech F, SanMartin CD, Silva M, Xiong C, Roe CM, Henriquez M, Quest AF & Behrens MI (2014) Increased susceptibility to oxidative death of lymphocytes from Alzheimer patients correlates with dementia severity. *Curr Alzheimer Res* 11, 892– 898.
  249. Porcellotti S, Fanelli F, Fracassi A, Sepe S, Cecconi F, Bernardi C. i wsp. (2015) Oxidative Stress during the Progression of  $\beta$ -Amyloid Pathology in the Neocortex of the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2015:967203.
  250. Proitsi P, Kim M, Whiley L, Pritchard M, Leung R, Soininen H. i wsp. (2015) Plasma lipidomics analysis finds long chain cholesteryl esters to be associated with Alzheimer's disease. *Transl. Psychiatry*. 13;5(1):e494.
  251. Qin W, Haroutunian V, Katsel P, Cardozo CP, Ho L, Buxbaum JD, Pasinetti GM. (2009) PGC-1 $\alpha$  expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia. *Arch Neurol*, 66:352-361.
  252. Rafelski SM. (2013) Mitochondrial network morphology: building an integrative, geometrical view. *BMC Biol*, 24;11:71.
-

- 
253. Rajmohan R, Reddy PH. (2017) Amyloid-Beta and Phosphorylated Tau Accumulations Cause Abnormalities at Synapses of Alzheimer's disease Neurons. *J Alzheimers Dis*, 57(4):975-999.
254. Reddy PH. (2008) Mitochondrial medicine for aging and neurodegenerative diseases. *Neuromol Med*, 10:291-315.
255. Reddy JK, Hashimoto T. (2001) Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr*. 21:193-230
256. Reddy PH, Reddy TP, Manczak M, Calkins MJ, Shirendeb U, Mao P. (2011) Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*, 24:67(1-2):103-18.
257. Reddy PH, Yin X, Manczak M, Kumar S, Pradeepkiran JA, Vijayan M, Reddy AP. (2018) Mutant APP and amyloid beta-induced defective autophagy, mitophagy, mitochondrial structural and functional changes and synaptic damage in hippocampal neurons from Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 15;27(14):2502-2516.
258. Renault TT, Floros KV, Elkholi R, Corrigan KA, Kushnareva Y, Wieder SY. i wsp. (2015) Mitochondrial shape governs BAX-induced membrane permeabilization and apoptosis. *Mol Cell*, 8;57(1):69-82.
259. Reitz C. (2012) Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review. *Int J Alzheimers Dis*, 2012:369808.
260. RheinV, Song X, Wiesner A, Ittner LM, Baysang G, Meier F, Ozmen L. i wsp. (2009) Amyloid-beta and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 20057-20062.
261. Rius-Pérez S, Torres-Cuevas I, Millán I, Ortega ÁL, Pérez S. (2020) PGC-1 $\alpha$ , Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism. *Oxid Med Cell Longev*. 9;2020:1452696.
262. Rodgers JT, Lerin C. Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1. *Nature*. 434(7029):113–118.
263. Rusakov DA. (2006) Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanisms of presynaptic control at central synapses. *Neuroscientist*, 12(4):317-26.
264. Salloway S, Cummings J. (2021) Aducanumab, amyloid lowering, and slowing of Alzheimer disease. *Neurology*. 14;97(11):543-544.
265. Sanderson TH, Raghunayakula S, Kumar R. (2015a) Release of mitochondrial Opa1 following oxidative stress in HT22 cells. *Mol. Cell Neurosci*. 64:116–122.
266. Sanderson TH, Raghunayakula S, Kumar R. (2015b) Neuronal hypoxia disrupts mitochondrial fusion. *Neuroscience*. 301:71–78.
267. Santos LE, Beckman D, Ferreira ST. (2016) Microglial dysfunction connects depression and Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun*, 55:151-165.
268. Sarkar P, Zaja I, Bienengraeber M, Rarick KR, Terashvili M, Canfield S. i wsp. (2014) Epoxyeicosatrienoic acids pretreatment improves amyloid  $\beta$ -induced mitochondrial dysfunction in cultured rat hippocampal astrocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 15;306(4):H475-84.
269. Sasaki T, Shimizu T, Koyama T, Sakai M, Uchiyama S, Kawakami S. i wsp. (2011) Superoxide dismutase deficiency enhances superoxide levels in brain tissues during
-

- 
- oxygenation and hypoxia-reoxygenation. *Journal of Neuroscience Research*. 89(4):601–610.
270. Scarpulla RC. (2008) Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 1147, 321–334.
271. Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE. i wsp. (2021) Alzheimer's disease. *Lancet*, 24;397(10284):1577-1590.
272. Schmitt K, Grimm A, Kazmierczak A, Strosznajder JB, Götz J, Eckert A. (2012) Insights into mitochondrial dysfunction: aging, amyloid- $\beta$ , and tau-A deleterious trio. *Antioxid Redox Signal*. 15;16(12):1456-66.
273. Schreurs M, Kuipers F, Van Der Leij FR. (2010) Regulatory enzymes of mitochondrial  $\beta$ -oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. *Obes. Rev*. 11(5):380–388.
274. Schubert D. (2005) Glucose metabolism and Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 4(2):240-57.
275. Schulz KL, Eckert A, Rhein V, Mai S, Haase W, Reichert AS. i wsp. (2012) A new link to mitochondrial impairment in tauopathies. *Mol. Neurobiol*. 46, 205–216.
276. Selfridge JE, E L, Lu J, Swerdlow RH. (2013) Role of mitochondrial homeostasis and dynamics in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 51:3-12.
277. Selkoe DJ. (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 6, 487–498.
278. Selkoe DJ, Hardy J. (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*, 8(6):595-608.
279. Sheng B, Wang X, Su B, Lee HG, Casadesus G, Perry G, Zhou X. (2012) Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J. Neurochem*, 120, 419–429.
280. Silva Ramos E, Motori E, Brüser C, Kühl I, Yeroslaviz A, Ruzzenente B. i wsp. (2019) Mitochondrial fusion is required for regulation of mitochondrial DNA replication. *PLoS Genet*, 6;15(6):e1008085.
281. Simonovitch S, Schmukler E, Masliah E, Pinkas-Kramarski R, Michaelson DM. (2019) The effects of APOE4 on mitochondrial dynamics and proteins in vivo. *J. Alzheimers Dis*. 70, 861–875.
282. Singulani MP, Pereira CPM, Ferreira AFF, Garcia PC, Ferrari GD, Alberici LC, Britto LR. (2020) Impairment of PGC-1 $\alpha$ -mediated mitochondrial biogenesis precedes mitochondrial dysfunction and Alzheimer's pathology in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*, 133:110882
283. Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM. (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 12(8):2245-56.
284. Snowden SG, Ebshiana AA, Hye A, An Y, Pletnikova O, O'Brien R. i wsp. (2017) Association between fatty acid metabolism in the brain and Alzheimer disease neuropathology and cognitive performance: A nontargeted metabolomic study. *PLoS Med*. 21;14(3):e1002266.
285. Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC. (2007) OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol*. 27;178(5):749-55.
-

- 
286. Soriano FX, Liesa M, Bach D, Chan DC, Palacín M, Zorzano A. (2006) Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2. *Diabetes*. 55(6):1783-91.
  287. Soto IC, Fontanesi F, Liu J, Barrientos A. (2012) Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochim Biophys Acta*. 1817:883–97.
  288. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM. i wsp. (2011) Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the national institute on aging-Alzheimer's association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 7, 280–292.
  289. Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Salviati L, Angelini C. (2012) Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat Protoc*, 7:1235–1246.
  290. Spuch C, Ortolano S, Navarro C. (2012) New insights in the amyloid-beta interaction with mitochondria. *J. Aging Res*, 2012:324968
  291. Stanga S, Caretto A, Boido M, Vercelli A. (2020) Mitochondrial dysfunctions: a red thread across neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci*, 21:3719.
  292. Stefani M, Liguri G. (2009) Cholesterol in Alzheimer's disease: unresolved questions. *Curr. Alzheimer Res*, 6(1):15-29
  293. Stine WB Jr, Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ. (2003) In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem*, 278:11612-22.
  294. Stelzmann RA, Norman Schnitzlein H, Reed Murtagh F. (1995) An english translation of alzheimer's 1907 paper, "über eine eigenartige erkankung der hirnrinde". *Clin. Anat*, 8: 429-431.
  295. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S. i wsp. (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*. 127:397–408.
  296. Strosznajder JB, Czapski GA, Adamczyk A, Strosznajder RP. (2012) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 in amyloid beta toxicity and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 46(1):78-84.
  297. Strosznajder JB, Ješko H, Strosznajder RP. (2000) Effect of amyloid beta peptide on poly(ADP-ribose) polymerase activity in adult and aged rat hippocampus. *Acta Biochim Pol*. 47(3):847-54.
  298. Strosznajder RP, Czubowicz K, Jesko H, Strosznajder JB (2010) Poly(ADP-ribose) metabolism in brain and its role in ischemia pathology. *Mol Neurobiol* 41(2–3):187–196.
  299. Strosznajder RP, Gadamski R, Czapski GA, Jesko H, Strosznajder JB (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase during reperfusion after transient forebrain ischemia: its role in brain edema and cell death. *J Mol Neurosci*, 20(1):61–72.
  300. Styr B, Slutsky I. (2018) Imbalance between firing homeostasis and synaptic plasticity drives early-phase Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci*. 21, 463–473.
  301. Swerdlow RH. (2018) Mitochondria and mitochondrial cascades in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis*, 62, 1403–1416.
  302. Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. (2014) The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. *Biochim Biophys Acta*, 1842, 1219-1231.
-

- 
303. Swerdlow RH, Khan SM. (2004) A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer's disease. *Med Hypotheses*, 63(1):8-20.
  304. Swerdlow RH, Khan SM. (2009) The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: an update. *Exp Neurol*, 218: 308–315.
  305. Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. (2010) The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. *J. Alzheimers Dis*, 20(Suppl. 2), 265–279.
  306. Szablewski L. (2017) Glucose transporters in brain: in health and in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's. Dis*, 55, 1307–1320.
  307. Szczudlik A. (red.) (2016) Sytuacja osób chorych na chorobę Alzheimer'a w Polsce. Warszawa: Biuro Rzecznika Praw Obywatelskich.
  308. Tang BL. (2016) Sirt1 and the Mitochondria. *Mol. Cells*, 39, 87–95.
  309. Terada T, Obi T, Bunai T, Matsudaira T, Yoshikawa E, Ando I. i wsp. (2020) In vivo mitochondrial and glycolytic impairments in patients with Alzheimer disease. *Neurology*, 14;94(15):e1592-e1604.
  310. Tiiman A, Palumaa P, Tõugu V. (2013) The missing link in the amyloid cascade of Alzheimer's disease – metal ions. *Neurochem. Int*, 62(4):367–378.
  311. Toledo JB, Arnold M, Kastentmüller G, Chang R, Baillie RA, Han X. i wsp. (2017) Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative and the Alzheimer Disease Metabolomics Consortium. Metabolic network failures in Alzheimer's disease: A biochemical road map. *Alzheimers Dement*, 13(9):965-984.
  312. Trushina E, Nemutlu E, Zhang S, Christensen T, Camp J, Mesa J. i wsp. (2012) Defects in mitochondrial dynamics and metabolomic signatures of evolving energetic stress in mouse models of familial Alzheimer's disease. *PLoS One*, 7(2):e32737.
  313. Tsakiri EN, Sykiotis GP, Papassideri IS, Terpos E, Dimopoulos MA, Gorgoulis VG. i wsp. (2013) Proteasome dysfunction in *Drosophila* signals to an Nrf2-dependent regulatory circuit aiming to restore proteostasis and prevent premature aging. *Aging Cell*. 12(5):802-13.
  314. Turunc Bayraktar E, Uyanikgil Y, Kanit L, Koçlu E, Yalçın A. (2014) Nicotinamide treatment reduces the levels of oxidative stress, apoptosis, and PARP-1 activity in A $\beta$ (1-42)-induced rat model of Alzheimer's disease. *Free Radic Res*. 48(2):146-58.
  315. Uddin MS, Kabir MT, Rahman MS, Behl T, Jeandet P, Ashraf GM. i wsp. (2020) Revisiting the Amyloid Cascade Hypothesis: From Anti-A $\beta$  Therapeutics to Auspicious New Ways for Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*, 14;21(16):5858.
  316. Uittenbogaard M, Chiaramello A. (2014) Mitochondrial biogenesis: a therapeutic target for neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des*, 20:5574-5593.
  317. Vacchi E, Kaelin-Lang A, Melli G. (2020) Tau and Alpha Synuclein Synergistic Effect in Neurodegenerative Diseases: When the Periphery Is the Core. *Int J Mol Sci*. 16;21(14):5030.
  318. Van Bulck M, Sierra-Magro A, Alarcon-Gil J, Perez-Castillo A, Morales-Garcia JA (2019) Novel approaches for the treatment of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Int J Mol Sci*, 8;20(3):719
  319. Van Dorpe J, Smeijers L, Dewachter I, Nuyens D, Spittaels K, Van Den Haute i wsp. (2000) Prominent cerebral amyloid angiopathy in transgenic mice overexpressing the london mutant of human APP in neurons. *Am J Pathol*, 157:1283-98.
  320. Van Giau V, An SSA, Hulme JP. (2018) Mitochondrial therapeutic interventions in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci*, 395, 62–70.
-

- 
321. Villeneuve S, Bisson D, Marchant NL, Gaudet D. **(2014)** The potential applications of Apolipoprotein E in personalized medicine. *Front Aging Neurosci.* 8;6:154.
  322. Wallace DC. **(2005)** A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* 39:359-407.
  323. Walsh DM, Selkoe DJ. **(2016)** A critical appraisal of the pathogenic protein spread hypothesis of neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 17(4):251-60.
  324. Wang C, Youle RJ. **(2009)** The role of mitochondria in apoptosis. *Annu. Rev. Gene,* 43, 95–118.
  325. Wang J, Guo MN, Liu ZZ, Ma SF, Liu WJ, Qian JJ. i wsp. **(2021)** PGC-1alpha reduces Amyloid-beta deposition in Alzheimer's disease: Effect of increased VDR expression. *Neurosci. Lett.* 744:135598
  326. Wang J, Xiong S, Xie C, Markesbery WR, Lovell MA. **(2005)** Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J. Neurochem,* 93, 953–962.
  327. Wang SW, Yang SG, Liu W, Zhang YX, Xu PX, Wang T. i wsp. **(2016)** Alpha-tocopherol quinine ameliorates spatial memory deficits by reducing beta-amyloid oligomers, neuroinflammation and oxidative stress in transgenic mice with Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res,* 296, 109–117.
  328. Wang W, Zhao F, Ma X, Perry G, Zhu X. **(2020)** Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances. *Mol Neurodegener.* 29;15 (1):30.
  329. Wang X, Su B, Fujioka H, Zhu X. **(2008a)** Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Am. J. Pathol.* 173, 470–482.
  330. Wang X, Su B, Lee H-G, Li X, Perry G, Smith MA, Zhu X. **(2009a)** Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci,* 29: 9090–9103, 2009
  331. Wang X, Su B, Siedlak SL, Moreira PI, Fujioka H, Wang Y. i wsp. **(2008b)** Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 105, 19318-19323.
  332. Wang X, Su B, Zheng L, Perry G, Smith M.A Zhu X. **(2009b)** The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem,* 109 Suppl 1(Suppl 1):153-9.
  333. Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee HG, Zhu X. **(2014)** Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1842(8):1240–7.
  334. Wang YX. **(2010)** PPARs: Diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell Res.* 20(2):124-37
  335. Kersten S, Stienstra R. **(2017)** The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. *Biochimie.* 136:75–84.
  336. Ward A, Crean S, Mercaldi CJ, Collins JM, Boyd D, Cook MN, Arrighi HM. **(2012)** Prevalence of apolipoprotein E4 genotype and homozygotes (APOE e4/4) among patients diagnosed with Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology.* 38(1):1-17.
-

- 
337. Watson SA, McStay GP. (2020) Functions of Cytochrome c oxidase Assembly Factors. *Int J Mol Sci.* 30;21(19):7254.
338. Weaver D, Eisner V, Liu X, Varnai P, Hunyady L, Gross A. i wsp. (2014) Distribution and apoptotic function of outer membrane proteins depend on mitochondrial fusion. *Mol. Cell*, 54, 870–878.
339. Welander H, Frånberg J, Graff C, Sundström E, Winblad B, Tjernberg LO. (2009) Abeta43 is more frequent than Abeta40 in amyloid plaque cores from Alzheimer disease brains. *J. Neurochem*, 110, 697–706.
340. Weise CM, Chen K, Chen Y, Kuang X, Savage CR, Reiman EM. (2018) Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Left lateralized cerebral glucose metabolism declines in amyloid- $\beta$  positive persons with mild cognitive impairment. *Neuroimage Clin*, 17;20:286-296.
341. Weldon DT, Rogers SD, Ghilardi JR, Finke MP, Cleary JP, O'Hare E. i wsp. (1998) Fibrillar beta-amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS in vivo. *J Neurosci*, 15;18(6):2161-73.
342. Wencel PL, Lukiw WJ, Strosznajder JB, Strosznajder RP. (2018) Inhibition of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Enhances Gene Expression of Selected Sirtuins and APP Cleaving Enzymes in Amyloid Beta Cytotoxicity. *Mol Neurobiol.* 55(6):4612-4623.
343. Wenger J, Klinglmayr E, Frohlich C, Eibl C, Gimeno A, Hessenberger M. i wsp. (2013) Functional mapping of human dynamin-1-like GTPase domain based on x-ray structure analyses. *PLoS One*, 8:e71835.
344. Westman G, Blomberg J, Yun Z, Lannfelt L, Ingelsson M, Eriksson BM. (2017) Decreased HHV-6 IgG in Alzheimer's Disease. *Front Neurol*, 20;8:40.
345. Wilcox KC, Lacor PN, Pitt J, Klein WL. (2011) A $\beta$  oligomer-induced synapse degeneration in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol.* 31(6):939-48.
346. Wilkins HM, Swerdlow RH. (2017) Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Res. Bull*, 133, 71-79.
347. Willem M, Tahirovic S, Busche MA, Ovsepian SV, Chafai M, Kootar S. i wsp. (2015)  $\eta$ -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature.* 15;526(7573):443-7.
348. Winkler EA, Nishida Y, Sagare AP, Rege SV, Bell RD, Perlmutter D. i wsp. (2015) GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nat Neurosci*, 18:521-530.
349. Xie H, Hu L, Li G. (2010) SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)*, 123: 1086–92.
350. Xu S, Zhong M, Zhang L, Wang Y, Zhou Z, Hao Y. i wsp. (2009) Overexpression of Tfam protects mitochondria against beta-amyloid-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells. *FEBS J*, 276, 3800–3809.
351. Yang Y, Jiang S, Yan J, Li Y, Xin Z, Lin Y, Qu Y. (2015) An overview of the molecular mechanisms and novel roles of Nrf2 in neurodegenerative disorders. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26:47–57.
352. Yang Y, Tapias V, Acosta D, Xu H, Chen H, Bhawal R. i wsp. (2022) Altered succinylation of mitochondrial proteins, APP and tau in Alzheimer's disease. *Nat Commun*, 10;13(1):159.
-



- 
353. Yao C-H, Wang R, Wang Y, Kung C-P, Weber JD, Patti GJ. (2019) Mitochondrial fusion supports increased oxidative phosphorylation during cell proliferation. *Elife*, 8 : e41351.
354. Yao J, Irwin RW, Zhao L, Nilsen J, Hamilton RT, Brinton RD. (2009) Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 14670–14675, 2009
355. Yin J, Reiman EM, Beach TG, Serrano GE, Sabbagh MN, Nielsen M. i wsp. (2020) Effect of ApoE isoforms on mitochondria in Alzheimer disease. *Neurology*, 94, 2404–2411.
356. Yoon JC, Puigserver P, Chen G. i wsp. (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*. 413(6852):131–138.
357. Yoshida N, Kato Y, Takatsu H, Fukui K. (2022) Relationship between Cognitive Dysfunction and Age-Related Variability in Oxidative Markers in Isolated Mitochondria of Alzheimer's Disease Transgenic Mouse Brains. *Biomedicines*, 26;10(2):281.
358. Youle RJ, van Der Bliek AM. (2012) Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 337, 1062–1065.
359. Yu L, Liu Y, Jin Y, Cao X, Chen J, Jin J. i wsp. (2018) Lentivirus-mediated HDAC3 inhibition attenuates oxidative stress in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice. *J. Alzheimers Dis*, 61, 1411–1424.
360. Yu R, Jin SB, Lendahl U, Nister M, Zhao J. (2019) Human Fis1 regulates mitochondrial dynamics through inhibition of the fusion machinery. *EMBO J*. 38:e99748.
361. Zeng J, Libien J, Shaik F, Wolk J, Hernández AI. (2016) Nucleolar PARP-1 Expression Is Decreased in Alzheimer's Disease: Consequences for Epigenetic Regulation of rDNA and Cognition. *Neural Plast*. 2016:8987928.
362. Zhang L, Zhang Y, Chang X, Zhang X. (2020) Imbalance in mitochondrial dynamics induced by low PGC-1 $\alpha$  expression contributes to hepatocyte EMT and liver fibrosis. *Cell Death Dis*, 8;11(4):226.
363. Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. (2011) APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*, 7;4:3.
364. Zhao G, Cao K, Xu C, Sun A, Lu W, Zheng Y. i wsp. (2017) Crosstalk between Mitochondrial Fission and Oxidative Stress in Paraquat-Induced Apoptosis in Mouse Alveolar Type II Cells. *Int J Biol Sci*, 7;13(7):888-900.
365. Zorzano A, Hernandez-Alvarez MI, Sebastian D, Munoz JP. (2015) Mitofusin 2 as a driver that controls energy metabolism and insulin signaling. *Antioxid Redox. Signal*, 22, 1020–1031.
-