

mgr inż. Przemysław Leonard Wencel

**Udział polimerazy poli(ADP-rybozy)-1 oraz bioaktywnych sfingolipidów  
w toksyczności peptydów amyloidu beta w doświadczalnych modelach  
choroby Alzheimerera**

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

Promotor: dr hab. n. med. Robert Strosznajder, prof. IMDiK



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

Warszawa 2019



*Niniejszą pracę dedykuję  
mojej wspaniałej żonie Agnieszce  
oraz córce Hannie*



*Promotorowi mojej pracy Panu Dr hab. n. med. Robertowi Strosznajderowi składam serdeczne podziękowania za pomoc, ukierunkowanie mojego rozwoju naukowego oraz cenne wskazówki udzielone w trakcie wykonywania i redagowania tej pracy*



*Składam także serdeczne podziękowania: Koleżankom i Kolegom  
z Zakładu Komórkowej Transdukcji Sygnału i z Zespołu  
Kliniczno-Badawczego Neurochirurgii*

Wyniki zamieszczone w rozprawie doktorskiej zostały w części opublikowane w następujących pracach:

1. Inhibition of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Enhances Gene Expression of Selected Sirtuins and APP Cleaving Enzymes in Amyloid Beta Cytotoxicity. Wencel PL, Lukiw WJ, Strosznajder JB, Strosznajder RP. **Mol Neurobiol.** 2018 **Jun;55(6):4612-4623.** doi: 10.1007/s12035-017-0646-8. Epub 2017 Jul 12. PMID: 28698968.
2. Modulatory Effects of Fingolimod (FTY720) on the Expression of Sphingolipid Metabolism-Related Genes in an Animal Model of Alzheimer's Disease. Jęsko H, Wencel PL, Lukiw WJ, Strosznajder RP. **Mol Neurobiol.** 2019 **Jan;56(1):174-185.** doi: 10.1007/s12035-018-1040-x. Epub 2018 Apr 23. PMID: 29687345.
3. Alpha-synuclein alters differently gene expression of Sirts, PARPs and other stress response proteins: implications for neurodegenerative disorders. Motyl J, Wencel PL, Cieślik M, Strosznajder RP, Strosznajder JB. **Mol Neurobiol.** 2018 **Jan;55(1):727-740.** doi: 10.1007/s12035-016-0317-1. Epub 2017 Jan 3. PMID: 28050792.

Przedstawione były również w formie licznych komunikatów na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej pracy doktorskiej były finansowane w głównej części z grantów przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) o numerze NCN/2014/15/B/NZ3/01049 oraz NCN/2013/09/B/NZ3/01350.



## **Wykaz najważniejszych skrótów użytych w pracy:**

- AceCS2 – syntetaza 2 acetylo-koenzymu A (ang. *acetyl-CoA synthetase 2*)
- ACER – zasadowa ceramidaza (ang. *alkaline ceramidase*)
- AChE – acetylocholinesteraza
- AIF – czynnik indukujący apoptozę (ang. *apoptosis inducing factor*)
- AMPK – kinaza aktywowana 5'AMP (ang. *5'AMP-activated protein kinase*)
- ANT – translokaza nukleotydów adeninowych (ang. *adenine nucleotide translocator*)
- AP-1 – czynnik transkrypcyjny 1 (ang. *activating protein-1*)
- APP – białko prekursorowe amyloidu beta (ang. *amyloid precursor protein*)
- APPsw – komórki PC12 transfekowane wektorem ekspresyjnym zawierającym ludzki gen APP z mutacją typu szwedzkiego (KM670/671NL)
- APPwt – komórki PC12 transfekowane wektorem ekspresyjnym zawierającym ludzki gen APP typu „dzikiego”
- ASAH – kwaśna ceramidaza (ang. *acidic ceramidase; N-acylsphingosine amidohydrolase*)
- ASN – alfa synukleina
- ASNo – oligomery alfa synukleiny
- ATP – adenozylo-5'-trifosforan (ang. *adenosine triphosphate*)
- A $\beta$  – amyloid beta
- A $\beta$ o – oligomery amyloidu beta
- A $\beta$ scr – peptyd o takim samym składzie aminokwasowym co A $\beta$  ale w zmienionej kolejności aminokwasów (ang. *A $\beta$  scrambled*)
- BACE –  $\beta$ -sekretaza (ang. *beta-secretase 1;  $\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme-1*)
- BDNF – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived neurotrophic factor*)
- BER – naprawa przez wycięcie zasad (ang. *base excision repair*)
- C1P – ceramido-1-fosforan (ang. *ceramide-1-phosphate*)
- C1PP – fosfataza C1P (ang. *ceramide 1-phosphate phosphatase*)
- cDNA – komplementarny DNA (ang. *complementary DNA*)
- CERK – kinaza ceramidu (ang. *ceramide kinase*)

CERS – syntaza ceramidu (ang. *ceramide synthase*)

ChA – choroba Alzheimerera (ang. *AD, Alzheimer's Disease*)

ChH – choroba Huntingtona (ang. *HD, Huntington's Disease*)

ChP – choroba Parkinsona (ang. *PD, Parkinson's Disease*)

CTF $\beta$  – fragment C-końcowy APP (ang. *membrane-bound C-terminal fragment  $\beta$* )

DCF – 2',7-dichlorofluoresceina

DMSO – dimetylosulfotlenek (ang. *dimethyl sulfoxide*)

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)

DTT – ditiotreitól (ang. *dithiothreitol*)

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

ER – retikulum endoplazmatyczne/ siateczka śródplazmatyczna (ang. *endoplasmatic reticulum*)

ERK – kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. *extracellular signal regulated kinase*)

FAD – postać rodzinna choroby Alzheimerera (ang. *Familial Alzheimer's Disease*)

FDA – Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*)

FoxO – czynnik transkrypcyjny (*forkhead transcription factors of the O class*)

FTY720 – fingolimod

GDH – dehydrogenaza glutaminianowa (ang. *glutamate dehydrogenase*)

GSK-3 $\beta$  – kinaza 3  $\beta$  syntazy glikogenu (ang. *glycogen synthase kinase 3 beta*)

H<sub>2</sub>DCF – 2',7'-dichlorodihydrofluoresceina (ang. *2',7'-dichlorodihydrofluorescein*)

H<sub>2</sub>DCF-DA – dwuoctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (ang. *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*)

HEPES – kwas 2-[4-(2-hydroksetylo)-1-piperazyno]etanosulfonowy (ang. *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)

IDE – enzym degradujący insulinę (ang. *insulin degrading enzyme*)

IDH – dehydrogenaza izocytrynianowa (ang. *isocitrate dehydrogenase*)

IL1 $\beta$  – interleukina 1 beta

iNOS – indukowana syntaza tlenku azotu (ang. *inducible nitric oxide synthase*)

JNK – kinaza N-końcowa c-JUN, (ang. *c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase*)

$K_m$  – stała Michaelisa

LCL – limfoblastoidalna linia komórkowa (ang. *lymphoblastoid cell line*)

MMP – Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *matrix metalloproteinases*)

MnSOD – mitochondrialna manganowa dysmutaza ponadtlenkowa (ang. *manganese superoxide dismutase*)

MPTP – 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyna (ang. *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*)

mRNA – matrycowy kwas rybonukleinowy (ang. *messenger RNA*)

MTT – bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-terazoliowy

NAC – składnik płytek starczych niebędący białkiem  $\beta$ -amyloidowym (ang. *non-amyloid  $\beta$  component of Alzheimer disease plaques*)

NAD<sup>+</sup> – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide*)

NER – naprawa przez wycięcie nukleotydu (ang. *nucleotide excision repair*)

NMDA – kwas N-metylo-D-asparaginowy

NO<sup>•</sup> – tlenek azotu

NOS – syntaza tlenku azotu (ang. *nitric oxide synthase*)

NRF-1 – jądrowy czynnik oddechowy (ang. *nuclear respiratory factor 1*)

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – anionorodnik ponadtlenkowy

ONOO<sup>-</sup> – nadtlenoazotyn

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PAR – poli(ADP-ryboza) (ang. *poly (ADP-ribose)*)

PARP – polimeraza poli(ADP-rybozy) (ang. *poly (ADP-ribose) polymerase*)

PC12 – linia komórkowa wyprowadzona z guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy szczura, *Pheochromocytoma*

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)

PGC-1 $\alpha$  – (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*)

PI3K - kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (ang. *phosphoinositide 3-kinase*)

PKB/AKT – kinaza białkowa B (ang. *protein kinase B*)

PKC $\alpha$  – kinaza białkowa C alfa (ang. *protein kinase C alpha*)

Prx – peroksyredoksyna (ang. *peroxiredoxin*)

PSEN – presenilina (ang. *presenilin*)

qPCR – ilościowa reakcja łańcuchowej polimerazy (ang. *quantitative PCR*)

S1P – sfingozyno-1-fosforan (ang. *sphingosine-1-phosphate*)

S1PR – receptor sfingozyno-1-fosforanu (ang. *sphingosine-1-phosphate receptor*)

S1PR1-5 – receptory dla sfingozyno-1-fosforanu (ang. *sphingosine-1-phosphate receptors*)

SAD – postać sporadyczna choroby Alzheimera (ang. *Sporadic Alzheimer's Disease*)

SDS-PAGE – rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym zawierającym SDS (ang. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SGPL1 – liaza sfingozyno-1-fosforanu (ang. *sphingosine-1-phosphate lyase*)

SGPP – fosfataza sfingozyno-1-fosforanu (ang. *sphingosine-1-phosphate phosphatase 1*)

SIRT – sirtuina (ang. *sirtuin*)

SPHK – kinaza sfingozyny (ang. *sphingosine kinase*)

SPT – palmitoilotransferaza serynowa (ang. *serine palmitoyl-CoA transferase*)

TFAM – mitochondrialny czynnik transkrypcyjny (ang. *mitochondrial transcription factor A*)

Th-T – tioflawina T (ang. *thioflavin T*)

TNF $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* )

Trx – tioredoksyna (ang. *thioredoxin*)

## Spis treści

|  |    |
|--|----|
| 1. Wstęp .....   | 1  |
| 1.1. Choroba Alzheimerera oraz rola zagregowanych peptydów .....   | 1  |
| 1.2. Enzymy NAD <sup>+</sup> -zależne: polimerazy poli(ADP-rybozy) – (PARPy) i deacetylazy histonów klasy III (sirtuiny) oraz ich rola w ChA ..... | 8  |
| 1.2.1. PARPy .....   | 8  |
| 1.2.2. SIRTy .....   | 11 |
| 1.3. Bioaktywne sfingolipidy .....   | 15 |
| 1.3.1. Rola ceramidu i sfingozyno-1-fosforanu w chorobach neurodegeneracyjnych.....  | 16 |
| 1.3.2. Fingolimod i jego działanie w układzie nerwowym .....   | 19 |
| 2. Cele pracy .....  | 22 |
| 2.1. Cel ogólny.....   | 22 |
| 2.2. Cele szczegółowe .....  | 22 |
| 3. Materiały i metody.....   | 23 |
| 3.1. Modele badawcze .....   | 23 |
| 3.1.1. Badania <i>in vitro</i> .....   | 23 |
| 3.1.1.1. Przygotowanie oligomerów peptydu Aβ1-42 i traktowanie nimi nietransfekowanych komórek PC12 .....  | 24 |
| 3.1.1.2. Przygotowanie oligomerów ASN i traktowanie nimi nietransfekowanych komórek PC12 .....   | 24 |
| 3.1.1.3. Analiza żywotności komórek za pomocą testu MTT .....  | 25 |
| 3.1.1.4. Analiza poziomu wolnych rodników przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF.....  | 26 |
| 3.1.1.5. Ocena procesu oligomeryzacji za pomocą testu tioflawinowego.....  | 26 |
| 3.1.1.6. Rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE z barwieniem srebrem .....  | 27 |
| 3.1.1.7. Oznaczenie aktywności kinaz sfingozyny w komórkach traktowanych ASN.....  | 27 |
| 3.1.2. Badania <i>in vivo</i> .....  | 28 |
| 3.1.3. Analiza poziomu mRNA.....   | 29 |

|  |    |
|--|----|
| 3.1.4. Statystyczne opracowanie wyników .....  | 31 |
| 4. Wyniki.....   | 31 |
| 4.1. Badania <i>in vitro</i> .....   | 31 |
| 4.1.1. Charakterystyka oligomerów A $\beta$ i ich wpływ na żywotność komórek linii PC12 .....  | 31 |
| 4.1.2. Zbadanie wpływu toksyczności A $\beta$ oraz zahamowania aktywności PARP na poziom mRNA enzymów metabolizujących APP oraz PARPów i SIRTuin .....   | 32 |
| 4.1.2.1. Wpływ A $\beta$ na poziom mRNA białek związanych z metabolizmem APP .....   | 33 |
| 4.1.2.2. Wpływ endogennego peptydu A $\beta$ na poziom mRNA białek związanych z metabolizmem APP .....   | 34 |
| 4.1.2.3. Wpływ A $\beta$ na poziom mRNA PARPów i SIRTuin.....  | 34 |
| 4.1.2.4. Wpływ endogennego peptydu A $\beta$ na poziom mRNA PARPów i SIRTuin.....  | 36 |
| 4.1.2.5. Wpływ A $\beta$ oraz inhibitora PARP1 na poziom mRNA białek związanych z metabolizmem APP .....   | 36 |
| 4.1.2.6. Wpływ A $\beta$ oraz inhibitora PARP1 na poziom mRNA PARPów i SIRTuin .....   | 37 |
| 4.1.3. Charakterystyka oligomerów ASN i ich wpływ na żywotność komórek linii PC12 .....  | 39 |
| 4.1.4. Zbadanie wpływu ASNo na poziom mRNA białek metabolizmu APP i A $\beta$ oraz PARPów i SIRTuin.....   | 40 |
| 4.1.4.1. Wpływ ASNo na poziom mRNA białek metabolizmu APP .....  | 41 |
| 4.1.4.2. Wpływ egzogennych oligomerów ASN na poziom mRNA PARPów i SIRTuin .....  | 42 |
| 4.1.5. Zbadanie wpływu endogennego peptydu A $\beta$ oraz ASNo na poziom mRNA enzymów metabolizmu bioaktywnych sfingolidów oraz receptorów dla S1P ..... | 42 |
| 4.1.5.1. Wpływ egzogennych oligomerów ASN na poziom mRNA i aktywność SPHK1/2 oraz poziom mRNA białka anty-apoptycznego Bcl-2 .....                       | 43 |
| 4.1.5.2. Wpływ działania endogennego peptydu A $\beta$ na poziom mRNA kinaz sfingozyny, receptorów S1P, kinazy ceramidu oraz białka Bcl-2 .....          | 44 |

|   |    |
|---|----|
| 4.2. Badania <i>in vivo</i> .....   | 46 |
| 4.2.1. Zbadanie wpływu mutacji genu APP oraz modulatora receptorów sfingozyno-1-fosforanu (FTY720) na poziom mRNA PARPów i SIRTuin..... | 46 |
| 4.2.2. Wpływ mutacji genu APP oraz FTY720 na poziom mRNA kinaz sfingozyny oraz receptorów dla S1P.....                                  | 50 |
| 4.2.3. Zbadanie wpływu mutacji genu APP oraz FTY720 na poziom mRNA kinazy ceramidu oraz białek pro- i anty-apoptotycznych .....         | 53 |
| 5. Dyskusja.....  | 55 |
| 6. Podsumowanie i wnioski.....  | 69 |
| 6.1. Model <i>in vitro</i> .....  | 69 |
| 6.2. Model <i>in vivo</i> .....   | 71 |
| 6.3. Wniosek końcowy .....  | 71 |
| 7. Streszczenie .....   | 72 |
| 8. Streszczenie w języku angielskim.....  | 76 |
| 9. Innowacyjność rozprawy.....  | 80 |
| 10. Literatura.....   | 81 |





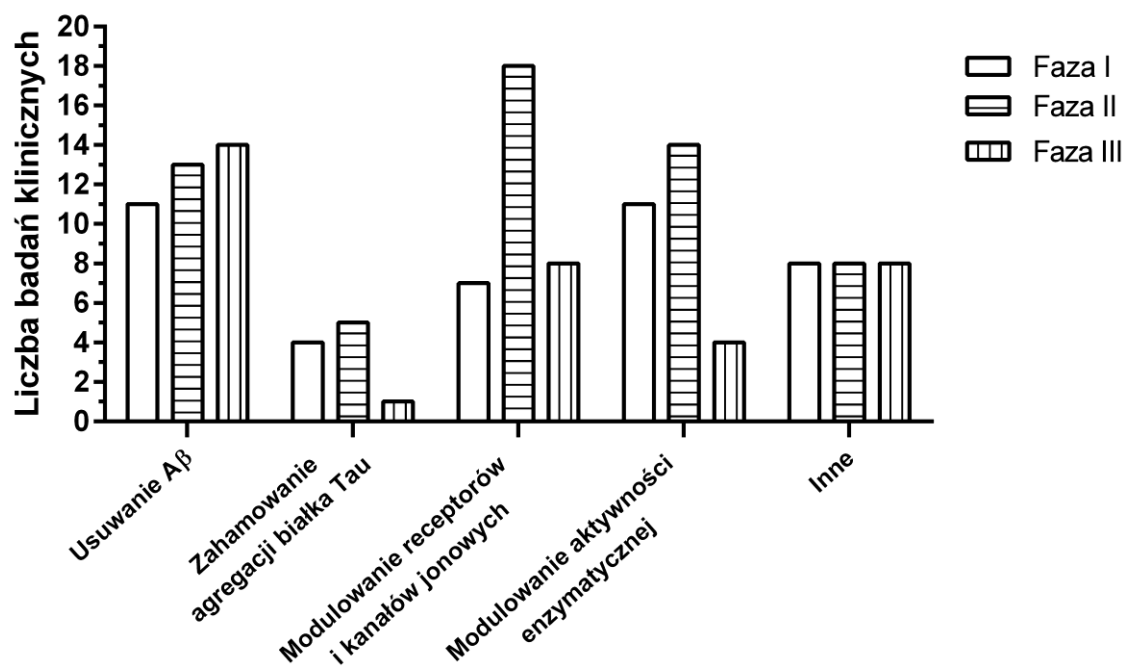
# 1. Wstęp

## 1.1. Choroba Alzheimera oraz rola zagregowanych peptydów

Choroba Alzheimera (ChA) jest najcięższą chorobą neurodegeneracyjną, która w nieodwracalny sposób doprowadza do uszkodzenia mózgu i utraty funkcji poznawczych. Obecnie szacuje się, że w samej Europie około 10 milionów osób cierpi na demencję (z czego około 50-70% stanowi ChA), przy czym należy spodziewać się tendencji wzrostowej w związku ze wzrostem przeciętnej długości życia (Novak *i wsp.*, 2017, Winblad *i wsp.*, 2016). Ponadto, do dnia dzisiejszego nie odkryto jeszcze leku, który mógłby być w pełni skuteczny w ChA, a obecnie stosowane terapie skupiają się na leczeniu objawowym i polegają na poprawieniu zaburzonej funkcji układu cholinergicznego i glutaminianergicznego. Do leków zatwierdzonych przez FDA (*Food and Drug Administration*, Agencja Żywności i Leków) stosowanych w ChA można zaliczyć: inhibitory acetylocholinesterazy (AChE) takie jak: donepezil (zatwierdzony w 1996r.), rywastygminę (2000r.), galantaminę (2001r.) oraz antagonistę receptora NMDA (N-metylo-D-asparaginowego) – memantynę (2003r.). Niestety od ponad 15 lat pomimo wielomilionowych nakładów na badania nad opracowaniem i wdrożeniem do terapii ChA nowego leku, nie wprowadzono żadnego nowego związku, a wszelkie podjęte próby w większości przypadków skończyły się porażką z efektywnością na poziomie ok. 0,6% (Cummings *i wsp.*, 2014). Do związków aktualnie testowanych w różnych fazach badań klinicznych należą:

- przeciwciała monoklonalne, mające na celu usunięcie peptydu amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ) (Aducanumab, Bapineuzumab, Solanezumab, Crenezumab, Gantenerumab);
- inhibitory  $\beta$ -sekretazy (MK8931, Verubecestat, JNJ-54861911);
- inhibitory  $\gamma$ -sekretazy (Avagacestat, Semagacestat);
- związki zapobiegające agregacji  $A\beta$  (ALZT-OP1, GV-971) i białka tau (RG-7345, AADvac-1, TRx-0014);
- substancje modulujące receptory i kanały jonowe (ligandy receptorów serotoninowych, acetylocholinowych, NMDA);
- inhibitory enzymów zaangażowanych w neuronalne przekazywanie sygnału (inhibitory: AChE, monoaminoooksydazy, fosfolipazy A2, fosfodiesteraz oraz kinaz i cyklaz) (Bachurin *i wsp.*, 2017, Cummings *i wsp.*, 2019, Folch *i wsp.*, 2016, Mehta *i wsp.*, 2017).

Wykaz niektórych badań wraz z ich zaawansowaniem przedstawiono na poniższej rycinie [Ryc. 1].



**Rycina 1.** Zestawienie aktualnie prowadzonych badań klinicznych (stan na 06.2016r.) na podstawie (Bachurin i wsp., 2017)

Do charakterystycznych cech neuropatologicznych ChA zalicza się nadmierne ufosforylowanie białka tau oraz obecność złogów peptydu Aβ, które powstają z białka prekursorowego amyloidu beta (APP) przy udziale enzymów zwanych sekretazami na drodze amyloidogennej. Na drodze tej APP hydrolizowane jest za pomocą β-sekretazy (BACE1) do β-APPs oraz peptydu C99, który następnie degradowany jest przez γ-sekretazę do peptydu Aβ (Czeczor i McGee, 2017). Powstałe w ten sposób peptydy mogą wraz z upływem czasu ulegać stopniowej agregacji przyjmując struktury o nieprawidłowej konformacji, mające silne działanie toksyczne na otaczające środowisko komórkowe (Selkoe i Hardy, 2016).

Wyróżnia się dwie główne postaci ChA: postać sporadyczną (*Sporadic Alzheimer's Disease, SAD*), która stanowi ponad 90% przypadków zachorowań oraz postać rodzinną (*Familial Alzheimer's Disease, FAD*). SAD jest chorobą o wysokim odsetku dziedziczenia (wynoszącym około 58-79%), która determinowana jest w 70% przez rzadkie warianty genetyczne (zidentyfikowano już ponad 40 loci zwiększających ryzyko zachorowania) oraz w 30% przez czynniki środowiskowe (takie jak: dieta, ekspozycja na toksyny,

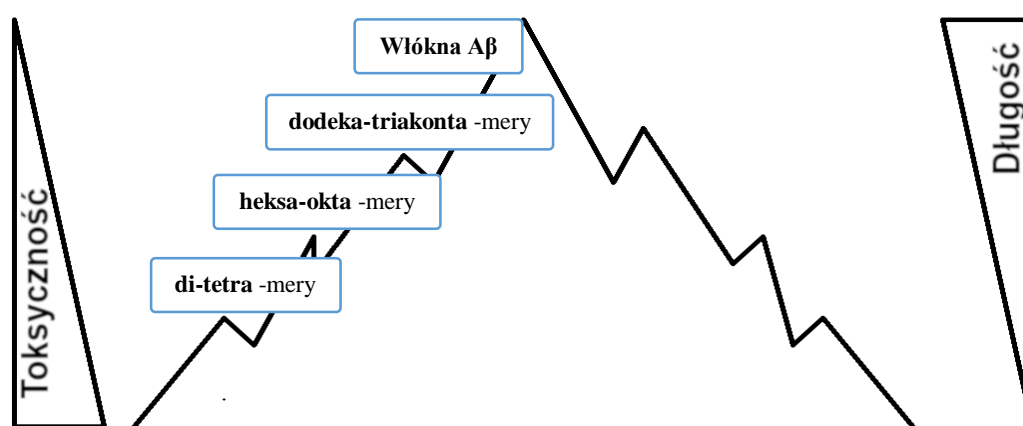
czy działanie hormonów) (Dorszewska *i wsp.*, 2016, Gatz *i wsp.*, 2006, Grozeva *i wsp.*, 2019, Kunkle *i wsp.*, 2019). Do mutacji występujących w FAD zalicza się mutacje genów kodujących białko APP oraz mutacje w rejonach genów kodujących preseniliny (PSEN1, PSEN2). Według bazy danych portalu [alzforum.org](http://www.alzforum.org) do najczęściej występujących mutacji w FAD, które są związane z powstawaniem peptydu A $\beta$ , należą mutacje genu kodującego PSEN1 (około 267 mutacji z czego około 221 mutacji jest patogennych). Ponadto, są one uważane za najczęstsze przyczyny wczesnej postaci ChA (Lanoiselée *i wsp.*, 2017) (Link1: <https://www.alzforum.org/mutations/psen-1>). Drugą mutacją pod względem częstości występowania jest mutacja genu kodującego APP (około 59 mutacji, z czego około 30 jest patogennych) (Link2: <https://www.alzforum.org/mutations/app>). Natomiast do najczęściej używanych modeli badawczych, które wykorzystują mutację genu APP można zaliczyć mutacje:

- szwedzką (KM670/671NL, około 65 modeli badawczych), gdzie obserwowany jest podwyższony poziom całkowitego peptydu A $\beta$ , brak zmian w proporcjach pomiędzy A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 oraz zwiększona produkcja i wydzielanie peptydu A $\beta$ 42 i A $\beta$ 40 (Ancolio *i wsp.*, 1999, Mullan *i wsp.*, 1992, Sinha i Lieberburg, 1999);
- londyńską (V717I, około 22 modele), gdzie obserwowana jest zwiększona proporcja pomiędzy A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 i zwiększone wydzielanie A $\beta$ 42 (Goate *i wsp.*, 1991, Sinha i Lieberburg, 1999);
- Indiana (V717F, około 13 modeli), gdzie obserwowana jest zwiększona proporcja pomiędzy A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 (Murrell *i wsp.*, 1991, Tamaoka *i wsp.*, 1994).

To właśnie zaburzenia metabolizmu białka APP, nadmierna produkcja peptydu A $\beta$ , jego agregacja oraz oligomeryzacja zapoczątkowały powstanie w roku 1991 hipotezy kaskady A $\beta$ . Hipoteza ta zakłada, że w następstwie toksycznego działania peptydu A $\beta$  dochodzi kolejno do: aktywacji mikrogleju i astrocytów, zaburzeń funkcji i uszkodzenia neuronów (synaps i neurytów), zmiany równowagi jonowej w neuronach, uszkodzeń oksydacyjnych, zmian w aktywności kinaz i fosfataz (nadmierna fosforylacja białka tau), prowadząc do obumierania komórek nerwowych (Hardy i Higgins, 1992, Selkoe, 1991). Przez pewien czas od momentu powstania hipotezy kaskady A $\beta$  uważano, że to nie oligomery peptydu A $\beta$ , lecz płytki starcze są najbardziej toksyczną formą peptydu A $\beta$ . Hipoteza ta była wiele razy podważana i poddawana dyskusji, zwłaszcza biorąc pod uwagę fakt, iż płytki starcze są też obserwowane u osób nie mających zaburzeń kognitywnych (Sloane *i wsp.*, 1997). Skutkowało to powstaniem w 1998 roku hipotezy oligomerów

peptydu A $\beta$  (A $\beta$ o), która poszerzyła hipotezę kaskady amyloidu (Hayden i Teplow, 2013). Według niej, A $\beta$ o są uważane za najbardziej toksyczne formy peptydu A $\beta$  i odgrywają one ważną rolę w dysfunkcji mitochondriów, zaburzeniu przepuszczalności błon biologicznych oraz powstawaniu wolnych rodników, w konsekwencji doprowadzając do aktywacji kaskady procesów prowadzących do śmierci komórki (Eckert *i wsp.*, 2008, Hayden i Teplow, 2013, Kaminsky *i wsp.*, 2015, Kaye i Lasagna-Reeves, 2013, Lambert *i wsp.*, 1998, Walsh *i wsp.*, 2002). Pomimo upływu wielu lat od zaproponowania hipotezy amyloidowej, rola peptydu A $\beta$  jako głównego czynnika w patogenezie ChA podlega ciągłej debacie (Selkoe i Hardy, 2016).

W ChA stwierdzono wiele form rozpuszczalnych oligomerów peptydu A $\beta$ , do których zalicza się: dimery, trimery, tetramery, pentamery, dekamery, dodekamery oraz A $\beta$ \*56 (Ferreira *i wsp.*, 2015, Tsigelny *i wsp.*, 2014, Walsh *i wsp.*, 2000, Yang *i wsp.*, 2017). Najnowsze badania dowodzą, że toksyczność oligomerów A $\beta$  zależy od ich długości i wskazują na to, że krótsze formy oligomerów są bardziej toksyczne w porównaniu do dłuższych form [Ryc. 2]. Przypuszcza się, że do największej toksyczności peptydów A $\beta$  dochodzi w wyniku rozpadu dużych oligomerów na mniejsze formy o małej masie cząsteczkowej (~8–70 kDa) (Yang *i wsp.*, 2017).

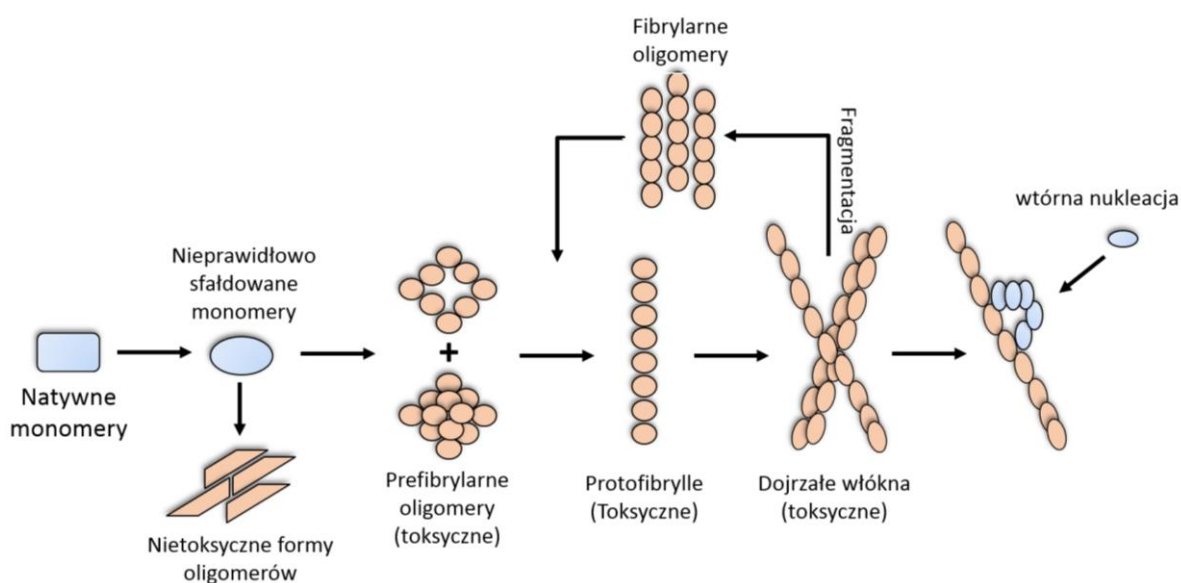


**Rycina 2.** Wpływ stopnia oligomeryzacji na toksyczność

W mózgu osób chorych na ChA stwierdzono dwie główne izoformy peptydu A $\beta$ : A $\beta$ 1-42 oraz A $\beta$ 1-40, z których to A $\beta$ 1-42 znacznie łatwiej ulega odkładaniu się w płytkach starczych (Gu i Guo, 2013). Pomimo, iż forma A $\beta$ 1-40 powstaje w dużych ilościach w ludzkim mózgu, to właśnie forma A $\beta$ 1-42 ulega znacznemu wzrostowi w ChA (Fu *i wsp.*, 2017). Ponadto, A $\beta$ 1-42 należy do jednych z częściej badanych form w kontekście oligomeryzacji (Banerjee *i wsp.*, 2017). Wykazano, że peptyd A $\beta$ 1-42 w porównaniu

do A $\beta$ 1-40 i A $\beta$ 1-43 znacznie szybciej przybiera formy oligomeryczne, wykazując się największą toksycznością (Fu *i wsp.*, 2017). Shankar *i wsp.* w swych badaniach wykazali, że rozpuszczalne oligomery peptydu A $\beta$ 1-42 wyizolowane z mózgu osoby chorej na ChA podane dorosłym zdrowym szczurom, powodują w zależności od dawki zmniejszenie liczby synaps oraz zaburzenie ich funkcji wraz z osłabieniem pamięci poznawczej (Shankar *i wsp.*, 2008). Jednym z proponowanych mechanizmów toksyczności A $\beta$ o jest ich zdolność do oddziaływania z błoną komórkową neuronów skutkująca tworzeniem się w niej kanałów jonowych, którym przypisuje się zaburzenie potencjału błonowego i rozregulowanie gospodarki wapniowej (Arispe *i wsp.*, 2007). Badania prowadzone przez zespół Serra-Batiste *i wsp.* wykazały, że to A $\beta$ o1-42, a nie A $\beta$ o1-40 biorą udział w tworzeniu kanałów jonowych poprzez tworzenie struktury – beta-baryłki, która w przypadku oligomerów większych niż trimery powoduje napływ jonów Ca<sup>2+</sup> do komórki (Bode *i wsp.*, 2017, Drews *i wsp.*, 2016, Serra-Batiste *i wsp.*, 2016).

O ile istnieje wiele czynników (wzrost temperatury, stres oksydacyjny, graniczne wartości pH, mutacje czy glikacje) doprowadzających do powstania białek o nieprawidłowej strukturze, to sam mechanizm powstawania zagregowanych peptydów wygląda tak samo. Krytyczny poziom białek o nieprawidłowej strukturze prowadzi do formowania się oligomerów. Następnie oligomery zaczynają się układać w protofibrille aby docelowo utworzyć włókna. Dojrzałe włókna mogą służyć jako matryca dla fibrylarnych oligomerów lub mogą one ulegać wtórnej nukleacji doprowadzając do utworzenia rozpuszczalnych form oligomerów [Ryc. 3].



**Rycina 3.** Schematyczne przedstawienie procesu agregacji białek wg (Verma *i wsp.*, 2015).

Peptydy A $\beta$  zarówno o prawidłowej strukturze, jak i te zagregowane mogą być degradowane głównie na drodze proteolitycznej i lizosomalnej. Niestety, w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak ChA, czy choroba Parkinsona (ChP) często dochodzi do zaburzeń w działaniu kompleksu ubikwityna-proteasom, jak również samej degradacji zależnej od proteasomów, co przekłada się na zwiększoną produkcję i nagromadzenie się splotów neurofibrylarnych oraz w mniejszym stopniu peptydów A $\beta$ . W mózgach osób chorych na ChA zaobserwowano również zaburzenia proteolizy lizosomalnej, które jak się przypuszcza mogą być skutkiem nagromadzenia się i ko-lokalizacji endosomów oraz autofagicznych wakuol w pobliżu kompleksów  $\gamma$ -sekreazy, APP oraz CTF $\beta$  (fragment C-końcowy APP) (Boland *i wsp.*, 2008, Nakanishi *i wsp.*, 1997). Oprócz dwóch wymienionych wcześniej ścieżek, w komórce istnieją jeszcze inne mechanizmy, mające na celu utrzymanie proteostazy oraz optymalnego poziomu A $\beta$ . Do jednych z nich można zaliczyć działanie metaloproteinaz (MMP, *Matrix metalloproteinase*) – grupy enzymów proteolitycznych zależnych od cynku. Spośród całej rodziny metaloproteinaz, MMP2 może degradować zarówno A $\beta$ 1-42, jak i A $\beta$ 1-40 (Hernandez-Guillamon *i wsp.*, 2015, Liao i Van Nostrand, 2010, Roher *i wsp.*, 1994). MMP3 może degradować A $\beta$  pośrednio poprzez aktywację innych MMP m. in. MMP9, która może rozszczepiać peptyd A $\beta$  w miejscach, które uważa się za istotne dla tworzenia się struktury  $\beta$ -kartki (Backstrom *i wsp.*, 1996). Ponadto, MMP9 może brać udział w usuwaniu włókien peptydu A $\beta$  (Backstrom *i wsp.*, 1996, Hernandez-Guillamon *i wsp.*, 2015, Liao i Van Nostrand, 2010). Coraz więcej badań wskazuje, że w przypadku późno występującej ChA (*late onset*), do akumulacji peptydu A $\beta$  bardziej przyczynia się jego niewystarczający katabolizm, a nie zwiększona produkcja peptydu (Bateman *i wsp.*, 2006).

Do zmian patologicznych związanych z ChA można zaliczyć obecność ciał Lewy'ego zawierających  $\alpha$ -synukleinę (ASN) – główne białko charakteryzujące inne choroby neurodegeneracyjne, takie jak ChP oraz otępienie z ciałami Lewy'ego. Ciała Lewy'ego są obserwowane *post mortem* u około 50-60% pacjentów z SAD i FAD (Hamilton, 2000, Shi *i wsp.*, 2018). ASN jest białkiem neuronalnym występującym w jądrze komórkowym, zakończeniach presynaptycznych oraz w tratwach lipidowych błony plazmatycznej (Fortin *i wsp.*, 2004). Podobnie jak A $\beta$ , ASN pełni ważną rolę w fizjologii komórki. Wiadomo, że białko to bierze istotny udział w dojrzewaniu synaps i ich działaniu, transporcie aksonalnym, produkcji dopaminy i jej metabolizmie, a spadek poziomu ASN

w komórce wiąże się z obniżoną produkcją pęcherzyków synaptycznych (Adamczyk *i wsp.*, 2006, Bellani *i wsp.*, 2010, Burré, 2015, Sidhu *i wsp.*, 2004). Oprócz znaczącej roli tego białka w rozwoju ChP, ASN zaczęła zwracać uwagę badaczy jako czynnik mający znaczenie w patogenezie ChA. Kenji Ueda *i wsp.* po raz pierwszy opisali 1993r. nie-amyloidowy komponent płytek starczych (NAC, *Non-amyloid  $\beta$  component of Alzheimer disease plaques*), będący jednocześnie fragmentem ASN w mózgach osób chorych na ChA (Ueda *i wsp.*, 1993). Obecność NAC sprzyja tworzeniu przez ASN struktury  $\beta$ -kartki, która inicjuje proces agregacji i powstawania oligomerów wykazujących tendencję do tworzenia nierozpuszczalnych złogów odkładanych w postaci ciał Lewy'ego (Li *i wsp.*, 2002, Pineda *i Burré*, 2017, Roeters *i wsp.*, 2017). Aktualnie coraz częściej zwraca się uwagę na potencjalne wykorzystanie ASN jako dodatkowego markera w ChA. Niektóre z badań wskazują na zwiększony poziom tego białka w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów chorych na ChA (Majbour *i wsp.*, 2017, Shi *i wsp.*, 2018, Toledo *i wsp.*, 2013). Ponadto, zaczyna się poszukiwać mechanizmu oddziaływania ASN na zmiany patologiczne zachodzące w ChA.

Zarówno ASN, jak i  $A\beta$  wykazują między sobą wiele podobieństw. Białko ASN oraz peptydy  $A\beta$  mogą:

- tworzyć nierozpuszczalne agregaty, które są głównymi czynnikami patologicznymi w ChA i ChP (Aguzzi *i O'Connor*, 2010, Irvine *i wsp.*, 2008),
- tworzyć ze sobą kompleksy ASN/ $A\beta$ , które przyczyniają się do zwiększenia napływu jonów  $Ca^{2+}$  do komórki (Tsigelny *i wsp.*, 2014),
- wchodzić w obustronną interakcję z białkiem tau poprzez aktywację kinazy GSK-3 $\beta$  i nasilać jego toksyczność w komórkach (Badiola *i wsp.*, 2011, Credle *i wsp.*, 2014, Duka *i wsp.*, 2009, Gąssowska *i wsp.*, 2014b, Qu *i wsp.*, 2014).

Nie bez znaczenia pozostaje też wzajemne oddziaływanie obu tych czynników patologicznych. Badania z wykorzystaniem komórek neuronalnych wyizolowanych z podwzgórza (GT1-7) transfekowanych genem ASN, które były traktowane  $A\beta_{1-42}$  lub  $A\beta_{1-40}$  wykazały, że  $A\beta_{1-42}$  jako jedyny powoduje wzrost wewnątrzkomórkowej produkcji zagregowanych form ASN (Masliah *i wsp.*, 2001). Ta sama grupa badaczy kilka lat później udowodniła, że sama ASN może wpływać na nasilenie produkcji  $A\beta_{1-42}$ . Podczas inkubacji ASN z  $A\beta_{1-42}$  lub  $A\beta_{1-40}$  zaobserwowano, że ASN tworzy z  $A\beta_{1-42}$  nierozpuszczalne oligomery, podczas gdy  $A\beta_{1-40}$  pozostaje dalej w formie rozpuszczalnej (Mandal *i wsp.*, 2006). Stwierdzono, że ASN może się wiązać z błonami, np. pęcherzyków synaptycznych, siateczki śródplazmatycznej/aparatu Golgiego i mitochondriów.

Jej toksyczne formy mogą więc brać udział w hamowaniu przekazywania neuronalnego, zaburzeniu funkcjonowania mitochondriów (Miraglia *i wsp.*, 2018). Ponadto wykazano, że ASN podana egzogenicznie do linii komórkowej PC12 transfekowanej białkiem APP, zawierającym podwójną mutację szwedzką, wpływa na wzrost toksyczności i uwalniania peptydu A $\beta$  prowadząc do zwiększenia zaburzeń mitochondrialnych oraz do programowanej śmierci komórkowej zależnej od kaspaz (Każmierczak *i wsp.*, 2008). Zarówno ASN, jak i A $\beta$  mogą powodować zaburzenia swojego metabolizmu poprzez upośledzenie funkcji proteasomów, co może w konsekwencji doprowadzać do zwiększonej akumulacji białka tau oraz zagregowanych peptydów (Lindersson *i wsp.*, 2004, Marsh i Blurton-Jones, 2012, Tseng *i wsp.*, 2008).

Podsumowując, zagregowane białka i peptydy, takie jak A $\beta$  i ASN pełnią ważną rolę w inicjacji kaskady wielu procesów przyczyniających się do rozwoju ChA. Uwagę zwraca fakt, że pomimo wieloletnich badań dotyczących powiązań pomiędzy ASN a A $\beta$  oraz prób wykorzystania tej zależności jako biomarkera w chorobach neurodegeneracyjnych, obserwuje się niewielki postęp w wyjaśnieniu molekularnych przyczyn ich powstawania (Roberts *i wsp.*, 2017). Dlatego też, niektóre z najnowszych doniesień zaczęły skupiać się na roli ASN w powstawaniu peptydu A $\beta$ , gdzie zaczęto przypisywać ASN rolę w regulacji ekspresji i aktywności sekretaz, metaloproteinaz, a nawet w regulacji powstawania/działania bioaktywnych sfingolipidów, takich jak sfingozyno-1-fosforan (S1P) (Motyl *i wsp.*, 2018b, Roberts *i wsp.*, 2017).

## **1.2. Enzymy NAD<sup>+</sup>-zależne: polimerazy poli(ADP-rybozy) – (PARPy) i deacetylazy histonów klasy III (sirtuiny) oraz ich rola w ChA**

### **1.2.1. PARPy**

Polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARPy) należą do grupy enzymów biorących udział w poli(ADP-rybozylacji) białek. Reakcja ta wykorzystuje jako źródło jednostek ADP-rybozy dinukleotyd nikotynoamidowy (NAD<sup>+</sup>) i prowadzi do przyłączania się cząsteczek ADP-rybozy w postaci liniowej lub rozgałęzionych polimerów do docelowych białek (heteromodyfikacja) lub do samego PARPu (automodyfikacja) [Ryc.4]. Rodzina polimeraz poli(ADP-rybozy) (PARP) liczy u człowieka 17 białek, z których białko PARP1 (113 kDa) jako pierwsze zostało dokładnie scharakteryzowane oraz przebadane pod kątem procesów wykrywania i naprawy uszkodzeń DNA (Javle i Curtin, 2011). Należy tutaj

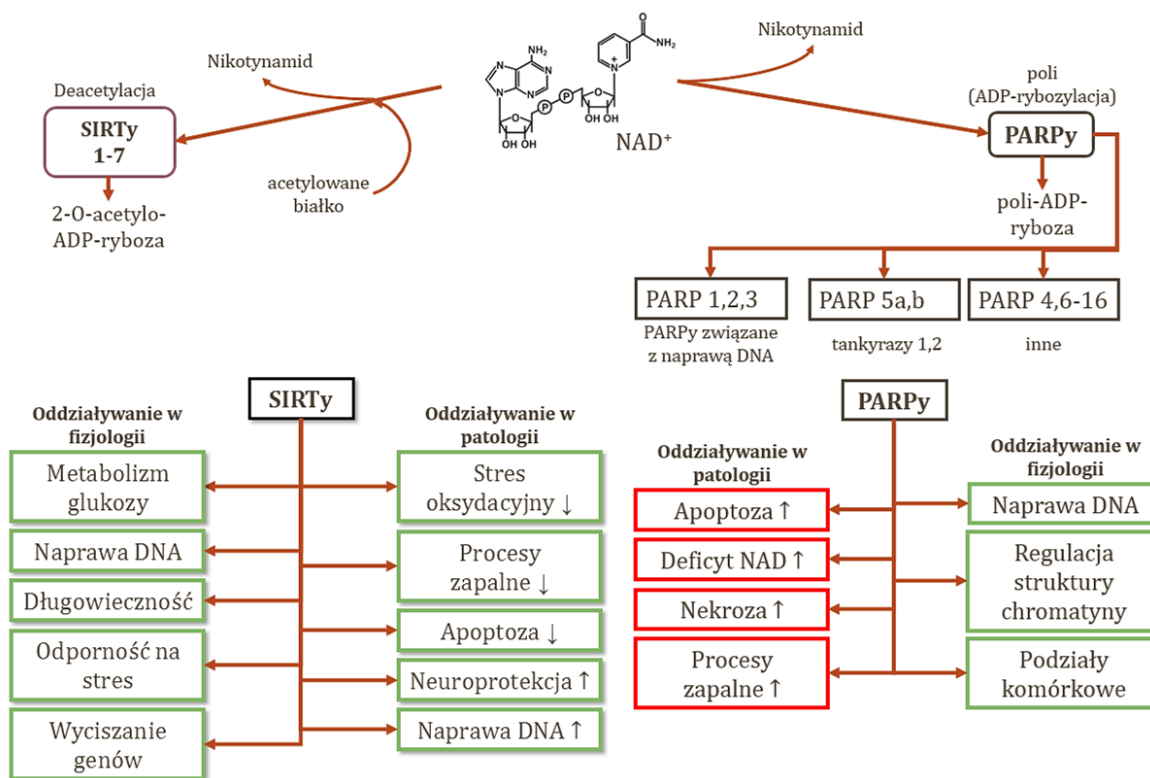


nadmienić, iż PARP1 nie jest *per se* enzymem odpowiedzialnym bezpośrednio za naprawę DNA, lecz jest enzymem pomagającym innym białkom w zainicjowaniu i wykonaniu procesów naprawy DNA (Berger *i wsp.*, 2018). Ponadto, PARP1 jest odpowiedzialny za ponad 90% poli(ADP-rybozylacji) w mózgu (Banasik *i wsp.*, 2012). Oprócz białka PARP1 w procesach naprawy DNA mogą również uczestniczyć PARP2 i PARP3 (Beck *i wsp.*, 2014, Javle i Curtin, 2011, Lapucci *i wsp.*, 2011).

W warunkach fizjologicznych aktywność PARP1 jest bardzo niska. Podstawowa aktywność PARP1 może ulec gwałtownemu podwyższeniu w warunkach patologicznych, np. podczas toksyczności wywołanej działaniem peptydu A $\beta$ , gdzie dochodzi do wzrostu stresu oksydacyjnego, procesów zapalnych, czy też uszkodzeń DNA (Strosznajder i Banasik, 2000). Duża liczba uszkodzeń DNA może prowadzić do nadreaktywności PARP1 i do obniżenia puli NAD<sup>+</sup> oraz ATP, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki, wywołanej aktywacją czynnika indukującego apoptozę (AIF, *apoptosis inducing factor*) (Adamczyk *i wsp.*, 2005, Alano *i wsp.*, 2010, Strosznajder i Gajkowska, 2006) [Ryc. 5]. PARP1 w chorobach neurodegeneracyjnych, oprócz istotnego udziału w nekrotycznej śmierci komórkowej, może również brać udział w regulacji licznych ścieżek sygnałowych doprowadzających do apoptozy, nekroptozy, parthanatos (specyficzny rodzaj śmierci indukowany nadreaktywnością PARP1), mitofagii i autofagii (Basello i Scovassi, 2015). PARP1 bierze również udział w regulacji wielu innych białek i czynników transkrypcyjnych związanych z procesami zapalnymi oraz regulacją śmierci i przeżycia komórki, do których można zaliczyć: p53, NF- $\kappa$ B, HIF-1, FoxO1, BAX, Bcl-2 (Hassa *i wsp.*, 2005, Kauppinen *i wsp.*, 2013, Martire *i wsp.*, 2015, Strosznajder *i wsp.*, 2010, Wesierska-Gadek i Schmid, 2001).

Podwyższony poziom PARP1 obserwowany jest w korze czołowej i skroniowej w mózgu pacjentów chorych na ChA (Love *i wsp.*, 1999). Za ten stan może odpowiadać A $\beta$ , który poprzez aktywację syntazy tlenku azotu (NOS), oksydazy NADPH oraz zahamowanie mitochondrialnego łańcucha oddechowego może prowadzić do powstania wolnych rodników oraz do uszkodzenia DNA (Shelat *i wsp.*, 2008, Strosznajder *i wsp.*, 2000) [Ryc. 5]. Wykazano również, że A $\beta$  przy udziale PARP1 aktywuje procesy zapalne poprzez czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B (Martire *i wsp.*, 2013). Aktualnie prowadzonych jest wiele badań nad zastosowaniem inhibitorów PARPu w chorobach nowotworowych, stwardnieniu rozsianym, niedokrwieniu, ChA oraz ChP (El Amki *i wsp.*, 2018, Hu *i wsp.*, 2018, Olsen i Feany, 2019). Niektóre z nich (talazoparib, veliparib) osiągnęły etap fazy

klinicznej lub zostały już zaakceptowane przez FDA (olaparib, rucaparib, niraparib) do leczenia niektórych chorób nowotworowych (Berger *i wsp.*, 2018, Carney *i wsp.*, 2018, Wiśnik *i wsp.*, 2016). Badania *in vitro* i *ex vivo* wykazały protekcyjną rolę inhibitorów PARP1, takich jak 3-aminobenzamid, czy nikotynamid, w stresie oksydacyjnym wywołanym toksycznością peptydu A $\beta$ 1–42 (Bayrakdar *i wsp.*, 2014, Turunc Bayrakdar *i wsp.*, 2014). Ponadto, wykazano protekcyjne działanie inhibitora PARP1 w stresie oksydacyjnym wywołanym toksycznością peptydu A $\beta$ 1–42 poprzez wzrost ekspresji genów kodujących białka antyoksydacyjne (*Gpx1*, *Gpx4*) oraz obniżenie ekspresji niektórych czynników transkrypcyjnych (*Nrf1*, *Trp53*, *Nfkb1*) (Czapski *i wsp.*, 2018). PARP1 wpływa również na regulację innych enzymów NAD<sup>+</sup>-zależnych, takich jak sirtuiny (SIRTy) poprzez regulację ich transkrypcji oraz dostępności NAD<sup>+</sup> (Jeśko i Strosznajder, 2016). Mechanizm działania PARPów i SIRTuin, jak również ich rola w fizjologii i patologii przedstawia rycina 4.



**Rycina 4.** Rola PARPów i SIRTuin w fizjologii i patologii. Zarówno PARPy, jak i SIRTy korzystają z tego samego substratu, którym jest NAD<sup>+</sup>. SIRTy biorą udział w reakcji deacetylacji białek, natomiast PARPy w reakcji poli(ADP-rybozylacji). W wyniku działania obu enzymów powstaje dodatkowo nikotynamid, który może działać jako inhibitor PARPów i SIRTuin. Podczas, gdy SIRTy wykazują głównie działanie pro-życiowe, rola PARPów jest zależna od stopnia ich reaktywności, który ulega nasileniu w wielu chorobach neurodegeneracyjnych.

Pomimo wieloletnich badań nad mechanizmami działania PARP1 do dnia dzisiejszego w dalszym ciągu nie jest wiadomo czy enzym ten może bezpośrednio oddziaływać na metabolizm białka APP [Ryc. 5].

### 1.2.2. SIRTy

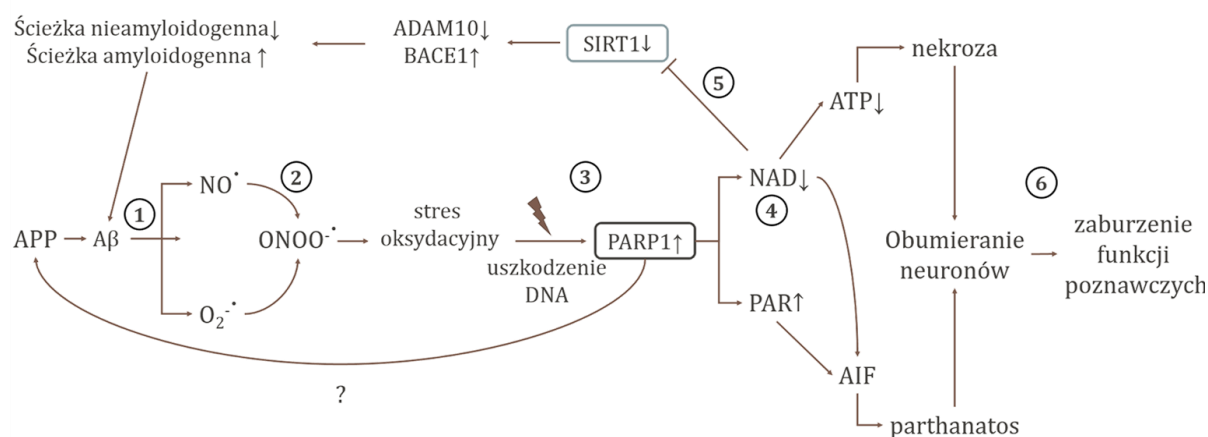
Sirtuiny należą do klasy III deacetylaz histonów (HDACs, *histone deacetylases*). Niektóre z sirtuin oprócz zdolności do deacetylacji, mogą wykazywać aktywność ADP-rybozylotransferazy [Ryc. 4]. Rodzina sirtuin liczy 7 białek (SIRT1-7). Na podstawie lokalizacji wewnątrzkomórkowej SIRTy można podzielić na: jądrowe (SIRT1,6 i 7); cytoplazmatyczne (SIRT2) oraz mitochondrialne (SIRT3,4,5). Enzymy te oprócz histonów deacetylują wiele białek regulatorowych i czynników transkrypcyjnych, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórki. SIRT1 jest najlepiej poznaną i opisaną sirtuiną. Bierze ona udział w regulacji funkcji licznych białek związanych z naprawą DNA, biogenezą mitochondrialną, homeostazą glukozy, procesami zapalnymi oraz apoptozą (Chen *i wsp.*, 2005, Jeong *i wsp.*, 2007, Mei *i wsp.*, 2016). Ponadto, SIRT1 odpowiedzialna jest również za regulację funkcji endokrynych oraz rytmu dobowego. W mózgu może brać ona udział w procesach konsolidacji pamięci poprzez modulowanie plastyczności synaptycznej, promowanie wydłużania się aksonów oraz rozgałęzień dendrytycznych (Herskovits i Guarente, 2014). Dlatego też nie bez znaczenia jest fakt, iż SIRT1 jest najczęściej kojarzona z procesami związanymi z długowiecznością oraz z jej działaniem neuroprotekcijnym (Haigis i Guarente, 2006). Poziom białka i aktywność enzymatyczna SIRT1 ulega obniżeniu u osób starszych i otyłych. Natomiast aktywacja SIRT1 polepsza stan tych osób (Choi *i wsp.*, 2017, Guarente, 2011, Haigis i Guarente, 2006, Kwon *i wsp.*, 2017, Kwon *i wsp.*, 2015). Podczas badań poziomu ekspresji genu *SIRT1* w liniach komórkowych LCL (*lymphoblastoid cell line*) wyizolowanych od stulatków, zaobserwowano zwiększony poziom ekspresji *SIRT1* w porównaniu do osób w wieku 56-82 lat lub osób chorych na ChA (Hadar *i wsp.*, 2018). SIRT1 może regulować aktywność PGC-1 $\alpha$  (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1 Alpha*), który jest kluczowym regulatorem biogenezy mitochondrialnej poprzez jego bezpośrednią deacetylację. Poprzez aktywację PGC-1 $\alpha$ , SIRT1 może wpływać także na ekspresję czynników transkrypcyjnych z grupy FoxO (*forkhead transcription factors of the O class*). Czynniki FoxO bierze udział w regulacji aktywności niektórych białek antyoksydacyjnych (np. SOD) oraz jądrowego czynnika oddechowego (NRF-1, *nuclear respiratory factor 1*), który z kolei reguluje aktywację mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego TFAM (*mitochondrial*

*transcription factor A*) odpowiedzialnego za stymulację replikacji mitochondrialnego DNA oraz wzrost ekspresji licznych genów mitochondrialnych (Campbell *i wsp.*, 2012, Tang, 2016, Zhang *i wsp.*, 2019). Dodatkowo, SIRT1 poprzez oddziaływanie na PGC-1 $\alpha$  może również pośrednio regulować ekspresję SIRT3, jak również bezpośrednio deacetylować SIRT3 (Kwon *i wsp.*, 2017). SIRT1 jest również bardzo ważnym regulatorem przeżycia komórki. Może ona hamować ekspresję pro-apoptycznego białka BAX, kaspazę-3, jak również deacetylować i hamować białko p53 (Alcendor Ralph *i wsp.*, 2004, Hsu *i wsp.*, 2010). Ponadto, SIRT1 bierze udział w regulacji procesów zapalnych poprzez hamowanie czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, wynikające z deacetylacji: białka p65, histonu H4K16 oraz metylotransferazy SUV39H1 (Min *i wsp.*, 2013). SIRT1 podobnie jak PARP 1-3 może pełnić również rolę strażnika genomu, poprzez koordynację procesów naprawy DNA, takich jak wycięcie zasad (BER, *Base Excision Repair*) oraz wycięcie nukleotydów (NER, *Nucleotide Excision Repair*) (Choi i Mostoslavsky, 2014, Yamamori *i wsp.*, 2010).

SIRT1 pełni również ważną rolę w ChA. Wpływa ona na obniżenie poziomu peptydu A $\beta$ , poprzez aktywację białka ADAM10, które wykazuje aktywność  $\alpha$ -sekreazy. Dodatkowo, może ona pośrednio obniżać poziom białka oraz mRNA BACE1 poprzez hamowanie czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B (Chen *i wsp.*, 2012, Jęsko i Strosznajder, 2016, Lee *i wsp.*, 2014, Wang *i wsp.*, 2013). Ponadto, SIRT1 zapobiega nadmiernej akumulacji białka tau, poprzez jego deacetylację. Deacetylacja białka tau powoduje jego zwiększoną poliubikwitynację, a następnie degradację przy udziale proteasomów (Julien *i wsp.*, 2009, Min *i wsp.*, 2013). SIRT1 bierze też udział w degradacji peptydu A $\beta$  na drodze lizosomalnej poprzez deacetylację białek zależnych od lizosomów, co powoduje wzrost ilości lizosomów w astrocytach (Li *i wsp.*, 2018). Co więcej SIRT1 może zmniejszać powstawanie zagregowanych form ASN. Efekt ten prawdopodobnie wynika ze zwiększenia mechanizmów ochrony antyoksydacyjnej wynikającej z aktywacji PGC-1 $\alpha$ , jak również aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny FoxO (Singh *i wsp.*, 2017).

Zarówno PARPy jak i SIRTy konkurują o ten sam substrat, jakim jest NAD<sup>+</sup>. Zależność ta jest niezwykle ważna podczas stresu oksydacyjnego do którego dochodzi w wyniku toksyczności peptydu A $\beta$  [Ryc. 5, punkt 1], co doprowadza w konsekwencji do stymulowania indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS) w komórce [Ryc. 5, punkt 2]. Na skutek licznych uszkodzeń DNA wywołanych m. in. przez tlenek azotu (NO) dochodzi do nadmiernej aktywacji enzymu jądrowego PARP1 [Ryc. 5, punkt 3], co prowadzi do obniżenia poziomu NAD<sup>+</sup> [Ryc. 5, punkt 4] i zahamowania aktywności SIRT1

(co wynika z niższej wartości stałej Michaelisa -  $K_m$  (20-60  $\mu\text{M}$  dla PARP1,  $\sim 130 \mu\text{M}$  dla SIRT1) [Ryc. 5, punkt 5] (Canto *i wsp.*, 2013). PARPy mogą również regulować aktywność SIRT1 na drodze transkrypcyjnej. Bai *i wsp.* wykazali, że PARP2 może hamować aktywność SIRT1 poprzez wiązanie się z rejonami promotora SIRT1 (Bai *i wsp.*, 2011). SIRT1 może również hamować aktywność PARP1 poprzez jego deacetylację (Rajamohan *i wsp.*, 2009). Poprzez zahamowanie aktywności SIRT1, PARP1 może wpływać na wzrost produkcji peptydu  $A\beta$ , jak również na obumieranie neuronów, co może prowadzić do zaburzeń funkcji poznawczych [Ryc. 5, punkt 6]. Proces ten przedstawiono na rycinie 5.



**Rycina 5.** Wpływ interakcji pomiędzy PARP1 a SIRT1 na produkcję peptydu  $A\beta$ . APP - białko prekursorowe amyloidu beta;  $A\beta$  - amyloid beta;  $\text{ONOO}^\bullet$  - nadtlenoazotyn;  $(\text{NO})^\bullet$  - tlenek azotu;  $\text{O}_2^{\bullet-}$  - anionorodnik ponadtlenkowy; NAD - dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy; PAR - poli (ADP-ryboza); ATP - adenozy-5'-trifosforan; AIF - czynnik indukujący apoptozę.

SIRT3, 4, 5 występują głównie w mitochondriach, za wyjątkiem SIRT3, która może również ulec przemieszczeniu do jądra komórkowego np. na skutek stresu oksydacyjnego (Iwahara *i wsp.*, 2012). Sirtuiny mitochondrialne mogą wykazywać się aktywnością antyoksydacyjną i chronić komórkę przed stresem oksydacyjnym poprzez: aktywację enzymów antyoksydacyjnych lub poprawę działania mitochondrialnego łańcucha elektronów. Spośród wszystkich sirtuin mitochondrialnych SIRT3 jest najbardziej przebadaną SIRTuiną. Wykazuje się ona szeroką obecnością w tkankach o wysokiej aktywności metabolicznej, takich jak: mózg, serce, mięśnie, wątroba, nerki, brunatna tkanka tłuszczowa (Dittenhafer-Reed *i wsp.*, 2015, Mahlkecht *i Voelter-Mahlkecht*, 2011, Matsushima *i Sadoshima*, 2015, Srivastava *i wsp.*, 2013). SIRT3 bierze udział w deacetylacji wielu białek mitochondrialnych zaangażowanych w metabolizm, odpowiedź na stres oksydacyjny, przeżycie komórki, jak również w deacetylacji czynników transkrypcyjnych. Sirtuina ta poprzez pośrednie oddziaływanie na czynnik transkrypcyjny FoxO3 bierze udział

w obniżaniu stresu oksydacyjnego poprzez transaktywację katalazy, mitochondrialnej manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD), peroksyredoksyny 3 i 5 (Prx3,Prx5), oraz tioredoksyny 2 (Trx2) (Tseng *i wsp.*, 2014). Ponadto, SIRT3 może bezpośrednio oddziaływać na dehydrogenazę izocytrynianową (IDH2), dehydrogenazę glutaminianową (GDH), syntetazę 2 acetylo-koenzymu A (AceCS2) oraz MnSOD (Chen *i wsp.*, 2015, Finley *i wsp.*, 2011, Hirschey *i wsp.*, 2011, Pacella-Ince *i wsp.*, 2014, Sheng *i wsp.*, 2015). SIRT3 poprzez deacetylację wpływa również na działanie kompleksów mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów. Sirtuina ta może również brać udział w regulacji biogenezy mitochondrialnej poprzez pośrednią aktywację PGC-1 $\alpha$  za pomocą kinazy AMPK (Kincaid i Bossy-Wetzel, 2013). Nadekspresja SIRT3 powoduje wzrost aktywności kompleksów: I, III, IV i V (Dai *i wsp.*, 2014, Kim *i wsp.*, 2010, Rahman *i wsp.*, 2014). Najnowsze badania nad udziałem SIRT3 w ChA wskazują na to, że zarówno ekspresja jak i poziom białka SIRT3 ulegają obniżeniu zarówno w modelach zwierzęcych, jak i w mózgach osób chorych ChA (Lee *i wsp.*, 2018a, Yang *i wsp.*, 2015a). Uważa się, że SIRT3 bierze udział w regulacji białka p53 w mitochondriach poprzez jego deacetylację. Obniżenie się aktywności SIRT3 może doprowadzić do wzrostu aktywności białka p53, zaburzeń w pracy mitochondriów i neuronów oraz do ich uszkodzenia (Lee *i wsp.*, 2018a).

SIRT4 i 5 charakteryzują się niską bądź znikomą aktywnością deacetylazy. SIRT4 oprócz aktywności deacetylazy wykazuje się zdolnością do mono-ADP-rybozylacji i bierze udział w regulacji homeostazy ATP oraz w regulacji mitochondrialnej biogenezy (Ho *i wsp.*, 2013). Enzym ten bierze również udział w modulowaniu metabolizmu poprzez oddziaływanie na enzym degradujący insulinę (IDE) oraz dehydrogenazę glutaminianową (GDH) (Haigis *i wsp.*, 2006, Liu *i wsp.*, 2019). Natomiast SIRT5 wykazuje się zdolnością do odłączenia grup bursztynylowych, malonylowych, glutarylowych z aktywnością katalityczną 1000 razy większą niż w przypadku deacetylacji (Du *i wsp.*, 2011, Yang *i wsp.*, 2015b). SIRT5, podobnie do pozostałych sirtuin mitochondrialnych, bierze udział w modulowaniu działania białek mitochondrialnych oraz syntezy ATP poprzez reakcje desukcynylacji (Buler *i wsp.*, 2014).

Biorąc pod uwagę fakt, że zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondriów są ważnym czynnikiem w patofizjologii ChA, a sam peptyd A $\beta$  może wpływać na zaburzenia w funkcjonowaniu łańcucha transportu elektronów, zrozumienie mechanizmu działania sirtuin oraz ich protekcyjnego działania w stresie oksydacyjnym może przyczynić się do opracowania nowych strategii terapeutycznych opartych o enzymy NAD<sup>+</sup>-zależne.

### 1.3. Bioaktywne sfingolipidy

W ostatnim czasie uwagę badaczy zarówno w kontekście ChA jak i innych chorób neurodegeneracyjnych związanych z ośrodkowym układem nerwowym (OUN) zaczęły przyciągać bioaktywne sfingolipidy będące nie tylko częścią składową błony komórkowej, ale również cząsteczkami sygnalizacyjnymi mającymi istotne znaczenie w przekaźnictwie sygnałów i regulacji procesów zachodzących w komórce, takich jak: przeżycie, różnicowanie, proliferacja czy programowana śmierć (Chakrabarti *i wsp.*, 2016, Espaillat *i wsp.*, 2015). Zaliczamy do nich m. in.: ceramid, ceramido-1-fosforan (C1P), sfingozynę oraz sfingozyno-1-fosforan (S1P). Ceramid znajduje się w centralnym punkcie ścieżki metabolizmu sfingolipidów i może powstawać w wyniku syntezy *de novo*, hydrolizy sfingomieliny oraz poprzez tzw. „szlak ratunkowy” w wyniku działania syntaz ceramidu (CERS) [Ryc. 6].



**Rycina 6.** Metabolizm bioaktywnych sfingolipidów. SPT - palmitoilotransferaza serynowa; CERS - syntaza ceramidu; CERK - kinaza ceramidu; C1PP - fosfataza C1P; SGMS - syntaza sfingomieliny; SMPD - sfingomielinaza; ASAHI - ceramidaza kwaśna; ACER- ceramidaza zasadowa; SPHK - kinaza sfingozyna; SGPP - fosfataza S1P, SGPL - liaza S1P

Synteza *de novo* ceramidu zachodzi w retikulum endoplazmatycznym (RE), gdzie przy udziale palmitoilotransferazy serynowej (SPT) w wyniku kondensacji palmitoilo-CoA i seryny powstaje 3-ketosfinganina, która jest szybko redukowana do sfinganiny. Następnie, przy udziale syntazy ceramidu (CERS) powstaje dihydroceramid, który przekształcany jest do ceramidu przy udziale desaturazy dihydroceramidu. Tak powstały ceramid może: a) służyć jako szkielet do budowy bardziej złożonych sfingolipidów, takich jak sfingomielinina czy glikosfingolipidy; b) być metabolizowany przy udziale ceramidaz do sfingozyny; c) zostać ufosforylowany do pro-życiowej formy – C1P przy udziale kinazy ceramidu (CERK). Szlak w wyniku którego dochodzi do powstania ceramidu ze sfingozyny przy udziale syntazy ceramidu nazywany jest szlakiem ratunkowym (*salvage pathway*). Sfingozyna, podobnie jak ceramid, może również zostać przekształcona do pro-życiowej formy, w tym przypadku do S1P przy udziale kinaz sfingozyny (SPHK1 i 2). Tak powstałe bioaktywne sfingolipidy stają się składnikiem błon komórkowych oraz źródłem przekaźników komórkowych.

### **1.3.1. Rola ceramidu i sfingozyno-1-fosforanu w chorobach neurodegeneracyjnych**

Podwyższony poziom ceramidu obserwowany jest w mózgu (w korze czołowej i skroniowej), płynie mózgowo-rdzeniowym i surowicy osób chorych na ChA oraz w zwierzęcych modelach ChA (Ellis *i wsp.*, 2015, Filippov *i wsp.*, 2012, Mielke *i wsp.*, 2014). W stanie równowagi komórkowej ceramid nie podlega akumulacji i może być prekursorem dla innych sfingolipidów. Natomiast w stanach patologicznych wysoki poziom ceramidu może nasilać stres oksydacyjny oraz indukować śmierć neuronów zależną od mitochondriów (Czubowicz i Strosznajder, 2014). Ceramidy mogą wykazywać swoje działanie pro-apoptotyczne poprzez aktywację kaspazy 3 i 8, aktywację proteazy – katepsyny B i D, aktywację kinazy białkowej JNK oraz hamowanie pro-życiowych szlaków z udziałem białek z rodziny Bcl-2 oraz kinaz białkowych B i Ca (PKB i PKC $\alpha$ ) (Hearps *i wsp.*, 2002, Liu *i wsp.*, 2016, Morales *i wsp.*, 2007, Wang *i wsp.*, 2000). Wzrost poziomu ceramidu w komórce może nastąpić na skutek: syntezy *de novo*, aktywacji szlaku ratunkowego lub hydrolizy sfingomielininy przy udziale kwaśnej i obojętnej sfingomielinazy (Hannun i Obeid, 2008, Kitatani *i wsp.*, 2008) [Ryc. 6]. Co istotne, do wzrostu poziomu ceramidu w ChA może dochodzić pod wpływem oligomerów peptydu A $\beta$  poprzez aktywację obojętnej sfingomielinazy (Jana i Pahan, 2010, Lee *i wsp.*, 2004). Ceramid w ChA może zwiększać powstawanie peptydu A $\beta$  oraz nasilać jego toksyczność poprzez post-translacyjną



stabilizację  $\beta$ -sekreazy oraz aktywację  $\gamma$ -sekreazy (Jembrek *i wsp.*, 2013, Puglielli *i wsp.*, 2003, Takasugi *i wsp.*, 2015). Wynikać to może z faktu, iż ceramidy oraz inne sfingolipidy biorą udział w tworzeniu tratw lipidowych znajdujących się w błonach komórkowych, w których znajduje się część białka APP, która ulega proteolitycznej obróbce przy udziale  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekreazy (Hicks *i wsp.*, 2012). Ponadto zaobserwowano, że nadmierny wzrost poziomu ceramidu może prowadzić do zaburzenia równowagi pomiędzy ceramidem a S1P, która jest istotna dla prawidłowego funkcjonowania komórki (Ceccom *i wsp.*, 2014, Cuvillier *i wsp.*, 1996). Zjawisko to obserwowane jest w ChA, stwardnieniu rozsianym, niedokrwieniu mózgu, chorobie Gauchera, sepsie oraz w chorobach nowotworowych (Haughey *i wsp.*, 2010, Novgorodov i Gudź, 2009, Patwardhan *i wsp.*, 2016, Vidaurre *i wsp.*, 2014).

Jednym ze sfingolipidów, który w odróżnieniu od ceramidu wykazuje działanie pro-życiowe, jest powstały w wyniku fosforylacji sfingozyny przy udziale kinazy sfingozyny (SPHK), sfingozyno-1-fosforan (S1P). S1P jako cząsteczka sygnałowa może wpływać na przeżycie, różnicowanie, proliferację oraz fenotyp dojrzałych neuronów (morfologię neurytów, działanie neurotransmiterów oraz plastyczność synaptyczną). Aktywność pro-życiowa S1P zależna jest od lokalizacji wewnątrzkomórkowej kinazy sfingozyny i jej izoformy. SPHK1, która jest kojarzona z procesami pro-życiowymi, znajduje się głównie w cytoplazmie oraz błonie komórkowej (Di Pardo i Maglione, 2018, Dominguez *i wsp.*, 2018). Funkcja SPHK2 zależna jest od jej lokalizacji komórkowej. Jeśli kinaza ta znajduje się w jądrze komórkowym to bierze ona udział w regulacji syntezy DNA oraz regulacji deacetylaz histonów klasy I (Fu *i wsp.*, 2018). Natomiast gdy SPHK2 występuje w ER to może brać udział w promowaniu apoptozy poprzez produkcję S1P będącego substratem w szlaku ratunkowym, w wyniku którego powstaje ceramid (Maceyka *i wsp.*, 2005). SPHK2, podobnie jak SPHK1 może wykazywać działanie pro-życiowe wówczas, gdy znajduje się w błonie komórkowej (Neubauer *i wsp.*, 2019). Bierze ona wtedy udział w produkcji S1P, który oddziałuje autokrynnie albo parakrynnie za pośrednictwem błonowych receptorów (S1PR1-5) sprzężonych z białkami G (Gq, G12/13 i Gi) oraz jako wewnątrzkomórkowy przekaźnik drugiego rzędu (Brunkhorst *i wsp.*, 2014, Maceyka *i wsp.*, 2012, Neubauer i Pitson, 2013). Aby S1P mógł oddziaływać w sposób autokrynnie lub parakrynnie na swoje receptory, musi przemieścić się na zewnątrz komórki za pomocą białek transporterowych z rodziny ABC oraz białka Spinster 2 (Donoviel *i wsp.*, 2015, Nagahashi *i wsp.*, 2014). S1P poprzez swoje receptory oddziałuje na ścieżki z udziałem PI3 kinazy-Akt,

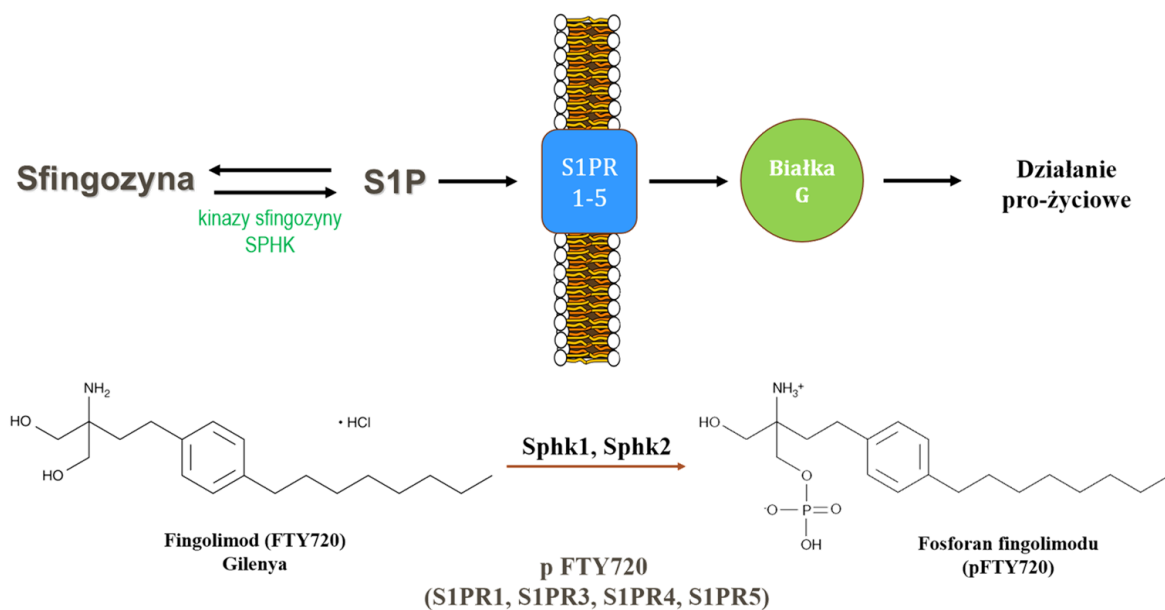
ERK, kinazy Jnk (*c-Jun N-terminal kinase*), fosfolipazy C lub cyklazy adenylowej (*adenylate cyclase*), które z kolei mogą aktywować czynniki transkrypcyjne, w tym AP-1 (*activator protein*) oraz NF- $\kappa$ B (Huang *i wsp.*, 2014). Cztery z pięciu receptorów S1P (S1PR1-3, 5) znajdują się w OUN. Mogą one występować na neuronach, astrocytach, oligodendrocytach oraz mikrogleju, gdzie biorą udział w regulowaniu neurogenezy, aktywności synaptycznej, proliferacji i migracji komórek oraz regulacji powstawania cytokin i czynników wzrostu (Martin i Sospedra, 2014, O'Sullivan i Dev, 2017). Dlatego też zaburzenia w funkcjonowaniu S1P mogą skutkować nieprawidłową regulacją wyżej wymienionych procesów. W tym kontekście niezwykle ważne jest zaobserwowane obniżenie poziomu S1P w mózгах osób chorych na ChA (He *i wsp.*, 2010). Wykazano również, że zarówno w ChA, jak i w komórkowych modelach tej choroby, następuje obniżenie aktywności SPHK1 – kluczowego enzymu odpowiedzialnego za powstawanie S1P (Couttas *i wsp.*, 2014, Gąssowska *i wsp.*, 2014a). Ponadto wykazano, że w mózгах osób z ChA wzrostowi ulega ekspresja genów odpowiedzialnych za powstawanie ceramidu (*CERS1*, 2) i genu kodującego enzym degradujący S1P – liazę S1P (*SGPL1*). Dodatkowo zaobserwowano, że obniżeniu ulegają geny kodujące kwaśną ceramidazę (*ASAH1*) oraz CERK (Katsel *i wsp.*, 2007).

Jak uprzednio wspomniano, promujący apoptozę ceramid podobnie jak sfingozyna może zostać ufosforylowany do pro-życiowej postaci – C1P przy udziale CERK. C1P może wpływać korzystnie na wzrost komórek i ich przeżycie poprzez blokowanie aktywacji kaspazy 3 i 9, aktywację ścieżki z udziałem kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (*phosphoinositide 3-kinase*, PI3K), kinazy białkowej B (*protein kinase B*, PKB)/AKT oraz wzrost poziomu pro-życiowego białka Bcl-X<sub>L</sub> (Gómez-Muñoz *i wsp.*, 2005). C1P może również blokować pro-apoptotyczne działanie ceramidu poprzez hamowanie aktywności kwaśnej sfingomielinazy oraz SPT, co powoduje zmniejszenie ilości powstającego ceramidu (Gomez-Munoz *i wsp.*, 2004, Granada *i wsp.*, 2009). Zarówno C1P, jak i S1P odgrywają niezwykle ważną rolę w regulacji procesów zapalnych np. poprzez oddziaływanie na czynnik NF- $\kappa$ B lub czynnik martwicy nowotworu (TNF $\alpha$ ), aczkolwiek w zależności od modelu lub umiejscowienia w komórce, ich oddziaływanie może mieć albo pro- albo przeciwzapalny charakter. Dlatego też w dalszym ciągu prowadzone są badania mające na celu dokładne wyjaśnienie roli S1P i C1P w procesach zapalnych (Hait i Maiti, 2017). O ile znane jest działanie S1P w mózgu, jak również zmiany w jego poziomie w przebiegu różnych chorób neurodegeneracyjnych, tak o roli C1P wiadomo jest niewiele.

Dlatego też potrzebne są dalsze badania mające na celu wyjaśnienie znaczenia tego bioaktywnego sfingolipidu zarówno w fizjologii, jak i w stanach patologicznych (Di Pardo i Maglione, 2018).

### 1.3.2. Fingolimod i jego działanie w układzie nerwowym

Fingolimod (FTY720) jest strukturalnym analogiem sfingozyny. Został on dopuszczony w U.S.A. w 2010 roku przez FDA, a rok później w Europie pod nazwą handlową Gilenya jako lek w terapii osób dorosłych z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego (SM) (Park i Im, 2017). FTY720 jest lipofilnym pro-lekiem, który po ufosforylowaniu przy udziale kinaz sfingozyny I i II (SPHK1 i SPHK2) może ulec transportowi z komórek i wiązać się z wysokim powinowactwem z czterema receptorami dla sfingozyno-1-fosforanu (S1PR1, S1PR3-5). Należy podkreślić, że wykazuje on największe powinowactwo do receptorów S1PR1 i S1PR3 [Ryc. 7]. Zarówno SPHK1 oraz SPHK2 biorą udział w fosforylacji FTY720. SPHK2 wykazuje się około 30-krotnie większą wydajnością fosforylacji FTY720 w porównaniu do SPHK1, co wynika z posiadania niższej wartości  $K_m$  (Billich *i wsp.*, 2003, Paugh *i wsp.*, 2003). Do niedawna FTY720 przypisywano głównie działanie immunosupresyjne, aktualnie zaczyna się dostrzegać neuroprotektoryjny potencjał tego leku w OUN (O'Sullivan i Dev, 2017, Słowik *i wsp.*, 2015, Yanagawa *i wsp.*, 1998). Działanie immunosupresyjne FTY720P w SM polega na jego wiązaniu z receptorami dla S1P na limfocytach oraz regulacji uwalniania limfocytów z tkanek limfoidalnych do układu krążenia. FTY720P aktywuje receptory S1PR1 oraz S1PR3-4 na limfocytach i następnie poprzez długotrwałe związanie z tymi receptorami doprowadza do ich wyciszenia i zapobiega uwalnianiu limfocytów z węzłów chłonnych (Mullershausen *i wsp.*, 2009). W końcowym efekcie następuje obniżenie procesów zapalnych i neurodegeneracyjnych wynikające ze spadku migracji limfocytów autoagresywnych do OUN (Chun i Hartung, 2010, Słowik *i wsp.*, 2015).



**Rycina 7.** Mechanizm działania S1P oraz FTY720. S1P wykazuje działanie pro-życiowe poprzez błonowe receptory (S1PR) sprzężone z białkami G. FTY720 jest strukturalnym analogiem sfingozyny. Aby móc oddziaływać na receptory S1P, FTY720 musi zostać najpierw ufosforylowany do fosforanu fingolimodu (pFTY720) przy udziale kinaz sfingozyny (SPHK).

Neuroprotektoryjne działanie FTY720 w chorobach neurodegeneracyjnych może przejawiać się w stymulowaniu neuronalnej ekspresji genów, regeneracji aksonów oraz ich wzrostu (Anastasiadou i Knöll, 2016). FTY720 może również stymulować wydzielanie licznych czynników neurotroficznych przez astrocyty (Hoffmann *i wsp.*, 2015). Ponadto, zarówno S1P, jak i FTY720 mogą hamować aktywność deacetylasy histonów klasy I w jądrze komórkowym, przez co mogą wpływać na poprawę procesów pamięciowych (Hait *i wsp.*, 2009, Hait *i wsp.*, 2014). Udowodniono również neuroprotektoryjne działanie FTY720 w zwierzęcych modelach toksyczności peptydu A $\beta$ . Wykazano, że FTY720 zmniejsza uszkodzenia neuronów hipokampa wywołane toksycznością A $\beta$  oraz poprawia procesy pamięciowe (Asle-Rousta *i wsp.*, 2013). Fingolimod może wpływać również na poprawę plastyczności synaptycznej oraz procesów pamięciowych poprzez zwiększenie poziomu BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) oraz zmniejszenie astrogliozy w innym schorzeniu neurodegeneracyjnym – chorobie Huntingtona (ChH). Ponadto, może on chronić hipokamp myszy ChH przed nadmierną aktywacją NF- $\kappa$ B poprzez zmniejszenie poziomu TNF $\alpha$  oraz iNOS (Miguez *i wsp.*, 2015). FTY720 może również brać udział w mobilizacji pozasynaptycznych receptorów NMDA do synaps w hipokampie (co może przyczynić się do zmniejszenia wrażliwości komórki na napływ jonów Ca<sup>2+</sup> wywołany toksycznością peptydu A $\beta$ ) (Joshi *i wsp.*, 2017). Ostatnie badania prowadzone na szczurzym modelu ChA

wykazały, że FTY720 działa z podobną efektywnością na ekspresję genów kodujących receptory NMDA (GLUN2B), co ich antagonistą – memantyna (Hemmati *i wsp.*, 2013). Wykazano również, że FTY720 może powodować zmniejszenie się ilości peptydu A $\beta$  poprzez hamowanie aktywności  $\gamma$ -sekretazy zarówno w zwierzęcych, jak i komórkowych modelach ChA (Takasugi *i wsp.*, 2013). Fingolimod wpływał także na wzrost aktywności lokomotorycznej, wzrost poziomu białka SPHK1, zwiększenie poziomu pro-życiowego białka Bcl-2 oraz zmniejszenie poziomu kaspazy-3 w zwierzęcym modelu ChP (Motyl *i wsp.*, 2018a, Zhao *i wsp.*, 2017).

Pomimo wieloletnich badań nad znaczeniem peptydów A $\beta$  oraz nad sekwencją procesów molekularnych w patologii ChA, patogeneza choroby nie jest do końca wyjaśniona, a dotychczas stosowane terapie nie przynoszą zadowalających rezultatów. Wobec powyższego, niezwykle ważnym jest prowadzenie dalszych badań zmierzających do lepszego zrozumienia zaburzeń molekularnych leżących u podstaw tej choroby oraz weryfikacja działania wybranych związków neuroprotektoryjnych.

## 2. Cele pracy

### 2.1. Cel ogólny

Celem pracy było zbadanie poziomu mRNA genów kodujących enzymy metabolizmu APP, enzymy NAD<sup>+</sup>-zależne (PARPy i SIRTy), enzymy metabolizmu bioaktywnych sfingolipidów oraz wybrane białka pro- i anty-apoptotyczne w doświadczalnych modelach choroby Alzheimera z uwzględnieniem działania inhibitora polimerazy poli(ADP-rybozy) 1 (PARP1) oraz modulatora receptorów sfingozyno-1-fosforanu (S1P).

### 2.2. Cele szczegółowe

Poszczególne etapy realizacji badań obejmowały:

- Zbadanie żywotności komórek linii PC12 poddanych toksycznemu działaniu egzogennych oligomerów peptydu A $\beta$ 1-42 (A $\beta$ o).
- Ocena wpływu A $\beta$ o oraz inhibitora PARP1 (PJ-34) na poziom mRNA genów kodujących enzymy odpowiadające za metabolizm APP oraz enzymy NAD<sup>+</sup>-zależne (PARPy i SIRTy) w komórkach PC12.
- Ocena wpływu endogennych peptydów A $\beta$  na poziom mRNA genów kodujących PARPy i SIRTy oraz sekretazy APP w komórkach PC12 transfekowanych wektorem kodującym APPwt oraz APPsw.
- Zbadanie wpływu toksyczności oligomerów ASN (ASNo) na poziom mRNA genów kodujących enzymy metabolizmu APP, PARPy i SIRTy oraz na aktywność kinazy sfingozyny (Sphk1/2) w komórkach PC12.
- Zbadanie poziomu mRNA genów kodujących enzymy metabolizmu bioaktywnych sfingolipidów oraz enzymów NAD<sup>+</sup>-zależnych (PARPy i SIRTy) w korze mózgowej i hipokampie myszy z mutacją genu APP (FVB/APP<sup>+</sup>).
- Zbadanie wpływu modulatora receptorów S1P (FTY720, fingolimod) na poziom mRNA genów kodujących enzymy metabolizmu bioaktywnych sfingolipidów oraz enzymy NAD<sup>+</sup>-zależne (PARPy i SIRTy) w korze mózgowej i hipokampie myszy transgenicznym (FVB/APP<sup>+/-</sup>).

## 3. Materiały i metody

### 3.1. Modele badawcze

#### 3.1.1. Badania *in vitro*

Do badań wykonanych w niniejszej pracy wykorzystano komórki guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy szczura (*Pheochromocytoma*, PC12), które 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. Ponadto, komórki PC12 wykazują cechy komórek dopaminergicznych. W badaniach wykorzystano również komórki PC12 APPwt, które były stabilnie transfekowane wektorem ekspresyjnym zawierającym ludzki gen APP typu „dzikiego” oraz komórki PC12 APPsw, transfekowane wektorem zawierającym ludzki gen APP z mutacją typu szwedzkiego (KM670/671NL). Kontrolę dla obu modeli stanowiły komórki PC12 transfekowane pustym wektorem. Transfekcję wykonano przy użyciu techniki FUGENE (Roche Diagnostics GmbH). Gen kodujący APP znajdował się pod kontrolą promotora CMV. Użyty do transfekcji wektor zawierał geny oporności na gentamycynę. Komórki hodowano w standardowej pożywce DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*, Merck) z dodatkiem inaktywowanej w 56°C płodowej surowicy cielęcej (*Fetal Bovine Serum*, FBS, 10%) oraz surowicy końskiej (*Horse Serum*, HS, 5%), 2 mM glutaminy, 50 jednostek/ml penicyliny oraz 50µg/ml streptomycyny w inkubatorze w temperaturze 37°C oraz atmosferze nasyconej parą wodną zawierającej 5% CO<sub>2</sub>. Komórki PC12 ze stabilną transfekcją genu APP oraz komórki zawierające pusty wektor hodowano w w/w pożywce wraz z dodatkiem G-418 (400µg/ml). Komórki pasażowano co 3-4 dni z użyciem 0,25% roztworu trypsyny z 0,02% EDTA (Merck). Morfologię komórek w trakcie hodowli, jak i podczas eksperymentu obserwowano w mikroskopie świetlnym Olympus CKX41.

### 3.1.1.1. Przygotowanie oligomerów peptydu A $\beta$ 1-42 i traktowanie nimi nietransfekowanych komórek PC12

A $\beta$ 1-42 przygotowano według metody opisanej przez (Stine *i wsp.*, 2003). Peptyd A $\beta$ 1-42 (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 stężenia 100 $\mu$ M. Po 30 sek. worteksowania, A $\beta$ 1-42 inkubowano w temperaturze 4°C przez 24-godz.. W podobny sposób przygotowano peptyd kontrolny (A $\beta$ scr), to jest peptyd o takim samym składzie aminokwasowym co A $\beta$  ale w zmienionej kolejności. W celu oceny procesu oligomeryzacji A $\beta$  wykonano test Tioflawinowy (Th-T), jak również zobrazowano A $\beta$ 1-42 za pomocą SDS-PAGE z barwieniem srebrem (rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym zawierającym SDS, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*).

Komórki 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 w celu późniejszej analizy poziomu mRNA. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę Neurobasal z dodatkiem suplementu B27 (Thermo Fisher Scientific Inc.) i dodawano badane związki i oligomery (A $\beta$ 1-42 1 $\mu$ M, PJ-34 20 $\mu$ M). Następnie komórki inkubowano ze związkami i oligomerami przez 24 godz.. Po 24 godz. komórki przepłukano dwukrotnie buforem PBS o temp. 4-8°C i następnie zawieszano w 1ml odczynnika TRI-reagent.

Do hamowania aktywności PARP1 użyto wodnego roztworu PJ-34 ( $\geq$ 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).

### 3.1.1.2. Przygotowanie oligomerów ASN i traktowanie nimi nietransfekowanych komórek PC12

Frację monomeryczno-oligomeryczną ASN (ASNo) przygotowywano według metody Danzer *i wsp.* z modyfikacjami (Danzer *i wsp.*, 2007). Ludzką, rekombinowaną ASN (100 $\mu$ M) rozcieńczono do końcowego stężenia 7  $\mu$ M w 50mM buforze fosforanowym (pH=7,0) zawierającym 20% etanolu. Następnie przygotowany roztwór ASN wytrząsano (1000 rpm, Thermomixer C, Eppendorf) przez 4 godz. w temperaturze pokojowej (RT) i liofilizowano przez całą noc.



W kolejnym etapie ASN rozpuszczano w połowie początkowej objętości w 50 mM buforze fosforanowym (pH=7,0) zawierającym 10% etanol i mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego (500 rpm, WIGO ES21) w komorze laminarnej przez 24 godz. w probówce z otwartym wieczkiem. Stężenie monomerów oraz uzyskanych oligomerów ASN oznaczono przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). W celu oceny procesu oligomeryzacji ASN wykonano test Tioflawinowy, jak również zobrazowano ASNo za pomocą SDS-PAGE z barwieniem srebrem.

Komórki wysiewano z gęstością:  $1-1,5 \times 10^6$  komórek na szalki o średnicy 10 cm lub  $1 \times 10^6$  komórek na szalki o średnicy 6 cm w celu późniejszej analizy poziomu mRNA. Następnego dnia pożywkę wymieniało na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy (2% FBS) i dodano oligomery (ASN  $0,5\mu\text{M}$ ). Następnie komórki inkubowano z oligomerami przez 24 godz.. Komórki po traktowaniu ASNo płukano dwukrotnie zimnym buforem PBS i następnie zawieszano w 1ml odczynnika TRI-reagent.

### **3.1.1.3. Analiza żywotności komórek za pomocą testu MTT**

Żywotność traktowanych komórek badano przy użyciu testu MTT (bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowego - MTT). Test ten polega na reakcji przekształcenia soli tetrazoliowych (o żółtym zabarwieniu) do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu (o zabarwieniu fioletowym) w aktywnych metabolicznie komórkach. Kryształy formazanu rozpuszczano w DMSO, w którym intensywność zabarwienia roztworu jest proporcjonalna do ilości wytworzonego formazanu oraz ilości żywych i aktywnych metabolicznie komórek w badanym materiale.

Komórki PC12 wysiewano na pokryte kolagenem płytki 96-dołkowe. Następnego dnia pożywkę wymieniało na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy (2% FBS) i dodawano badane związki i oligomery ( $\text{A}\beta_{1-42}$   $1\mu\text{M}$ , ASN  $0,5\mu\text{M}$ , PJ-34  $20\mu\text{M}$ ). Następnie komórki inkubowano ze związkami lub oligomerami przez 24 godz.. W przypadku eksperymentów z  $\text{A}\beta_{1-42}$ , do traktowania komórek związkami użyto pożywki Neurobasal z dodatkiem suplementu B27 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Po 24 godz. do pożywki dodawano MTT ( $0,25\text{mg/ml}$ ) i inkubowano przez 2 godz. w  $37^\circ\text{C}$ . Następnie usuwano pożywkę i dodawano DMSO. Absorbancję badano spektrofotometrycznie za pomocą czytnika do mikropłytek BioRad przy długości fali  $\lambda=595\text{nm}$ .

#### **3.1.1.4. Analiza poziomu wolnych rodników przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF**

Analizę poziomu wolnych rodników w komórkach PC12 po traktowaniu ASN badano z użyciem sondy fluorescencyjnej DCF. Test ten polega na przekształceniu dwuoctanu 2',7-dichlorofluoresceiny (H<sub>2</sub>DCF-DA), na skutek wewnątrzkomórkowej deacetylacji, do 2',7'- dichlorodihydrofluoresceiny (H<sub>2</sub>DCF). H<sub>2</sub>DCF następnie jest utleniana przez wolne rodniki do fluorescencyjnej 2',7-dichlorofluoresceiny (DCF). Test ten pozwala oznaczyć wewnątrzkomórkowy poziom wolnych rodników tlenowych (Royall i Ischiropoulos, 1993).

Komórki PC12 wysiewano na pokryte kolagenem płytki 96-dółkowe w gęstości  $1 \times 10^5$  komórek na dółek. Następnego dnia medium wymieniano na medium z niską zawartością surowicy (2% FBS), a komórki traktowano ASN<sub>0</sub>. Po 24 godz. pożywkę wymieniano na bufor Hank's (Sigma – Aldrich), o składzie CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O – 0,185g/l, MgSO<sub>4</sub> (bezwodny) – 0,09767g/l, KCl – 0,4g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (bezwodny) – 0,06g/l, NaHCO<sub>3</sub> – 0,35g/l, NaCl – 8,0g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (bezwodny) – 0,04788g/l, D-Glukozę – 1,0g/l. Następnie dodano H<sub>2</sub>DCF-DA (10μM; Merck) i przez 50 min inkubowano komórki z tym związkiem w 37°C bez dostępu światła. Następnie komórki płukano trzykrotnie buforem PBS. Fluorescencję DCF mierzono przy użyciu spektrofotometru FLUOstar Omega (BMG LABTECH) przy długości fali pobudzenia  $\lambda=488\text{nm}$  i emisji  $\lambda=530\text{nm}$ . Wynik wyrażono jako intensywność fluorescencji z użyciem jednostek umownych.

#### **3.1.1.5. Ocena procesu oligomeryzacji za pomocą testu tioflawinowego**

W celu oceny procesu oligomeryzacji A $\beta$  i ASN przeprowadzono półilościową analizę w oparciu o reakcję barwnika Tioflawiny-T (*Thioflavin T*, Th-T). Intensywność fluorescencji Th-T wzrasta po związaniu się ze strukturami  $\beta$ -kartki białek amyloidogennych (Bourhim *i wsp.*, 2007).

Roztwory A $\beta$ scr, A $\beta$ o1-42 oraz ASN (10μl) mieszano z Th-T (3μM) w 50mM buforze fosforanowym (pH=6,0) w końcowej objętości 100μl w przypadku ASN oraz w medium F12 w przypadku A $\beta$ . Następnie próbki inkubowano przez 5 min w RT chroniąc przed światłem. Fluorescencję Th-T zbadano przy użyciu spektrofotometru FLUOstar Omega (BMG LABTECH) przy długości fali pobudzenia  $\lambda=450\text{nm}$  i emisji  $\lambda=482\text{nm}$ .

### 3.1.1.6. Rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE z barwieniem srebrem

Rozdział elektroforetyczny A $\beta$ 01-42 oraz ASNo wykonano w 15% żelu poliakrylamidowym, używając aparatu do elektroforezy firmy BIO-RAD. Próby przed nałożeniem na żel zawieszono w buforze Laemmli o składzie: 62,5mM Tris-HCl pH = 6,8, 2% SDS, 100mM DTT, 20% glicerol i 0,2% błękit bromofenolowy. Następnie próbki umieszczano na 5 min w bloku grzejnym, w temperaturze 95°C. Po schłodzeniu, nakładano na żel 2 $\mu$ g peptydu/białka. Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 80V. Po wykonanym rozdziale żele barwiono srebrem. Żel utrwalano przez 20 min w 50% roztworze metanolu (50% metanol, 5% kwas octowy, woda). Następnie żel przemywano 50% roztworem metanolu (50% metanol, woda) przez 10 min, usunięto roztwór metanolu i przez kolejne 10 min płukano żele wodą. Po płukaniu wodą, dodano do żeli 0,02% roztwór tiosiarczanu sodu (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) na 1 min. Następnie żele płukano dwukrotnie po 1 min w wodzie i wybarwiano w azotanie srebra (0,1% AgNO<sub>3</sub>) przez 20 min w ciemnym pomieszczeniu. Po zakończonym wybarwieniu żele przemywano dwukrotnie po 1 min wodą, po czym wywoływano roztworem wywoływacza (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0,4% formaldehyd) do momentu pojawienia się i uzyskania odpowiedniej intensywności prążków białek. Wywoływanie zostało przerwane poprzez dwukrotne płukanie żeli po 3 min w 5% wodnym roztworze kwasu octowego.

### 3.1.1.7. Oznaczenie aktywności kinaz sfingozyny w komórkach traktowanych ASN

Aktywność Sphk1/2 zbadano z wykorzystaniem metody spektrofluorymetrycznej, z użyciem substratu fluorescencyjnego – NBD-sfingozyny. Metoda ta została opracowana i opisana przez Don i wsp. oraz Takasugi i wsp. jak również została ona wykorzystana w pracach Czubowicz i wsp. oraz Motyl i wsp. (Czubowicz *i wsp.*, 2015, Don *i wsp.*, 2007, Motyl *i wsp.*, 2018a, Motyl *i wsp.*, 2018b, Takasugi *i wsp.*, 2011).

Komórki wysiewano z gęstością: 1-1,5 x 10<sup>6</sup> na szalki o średnicy 10 cm, następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy (2% FBS) i dodano oligomery (ASN 0,5 $\mu$ M). Po 24 godz. inkubacji komórki przemywano PBS i zawieszano w buforze o składzie: 50mM HEPES, pH=7,4, 10mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton X-100, 20% glicerol, 2mM ortowanadian, 2mM DTT, 10mM NaF, 1mM deoksyperydoksyna i inhibitory proteaz Complete (Roche). Następnie, komórki homogenizowano w temperaturze 4°C za pomocą strzykawki insulinowej, przeciągając tłok strzykawki

12 razy, a następnie lizat wirowano przy 15 000 x g przez 15 min. Po odrzuceniu osadu oznaczano białko w nadsączu metodą Lowry'ego. Do reakcji pobrano 100µg białka z nadsączu i dodano NBD-sfingozynę (10µM w mieszaninie reakcyjnej, Avanti Polar Lipids) i następnie całość zmieszano z buforem reakcyjnym zawierającym: 50mM Hepes, pH=7,4, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% Triton X-100, 10% glicerol, 2mM ATP. Całość inkubowano przez 30 min w temperaturze 30°C (objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 100µl). Reakcja została zatrzymana przez dodanie 100µl 1M fosforanu potasu o pH=8,5, a następnie przez dodanie 250µl mieszaniny zawierającej chloroform/metanol w proporcji (2:1). Kolejno, mieszaninę wirowano przy 15 000 x g przez 1 min. Po przeprowadzonej ekstrakcji pobierano tylko fazę górną (wodną), gdyż to właśnie w niej znajduje się NBD-S1P i przenoszono na czarną płytkę 96-dółkową z przezroczystym dnem. Po dodaniu równej objętości dimetyloformamidu mierzono fluorescencję przy użyciu czytnika FLUOstar Omega przy długości fali pobudzenia  $\lambda=485\text{nm}$  i emisji  $\lambda=538\text{nm}$ .

### 3.1.2. Badania *in vivo*

Do badań na zwierzętach użyto myszy szczepu FVB-Tg (APP LD2/B6) pochodzących ze zwierzętarni IMDiK PAN. Myszy te charakteryzują się zaburzeniami procesu proteolizy APP oraz zwiększonym stężeniem i akumulacją A $\beta$  w mózgu (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 (<sup>Val</sup>APP<sup>Ile</sup>). 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 3Mc, 6Mc, 12Mc - myszy 3-, 6- i 12-miesięczne) otrzymywały dootrzewnowo przez okres 2 tygodni FTY720 (1mg/kg m.c.). Dawka FTY720 (Cayman) została wybrana na podstawie analizy danych z wcześniejszych badań (Becker-Krail *i wsp.*, 2017, Gol *i wsp.*, 2017, Potenza *i wsp.*, 2016). Kontrolę dla grupy otrzymującej FTY720 stanowiły myszy otrzymujące 0,9% NaCl, natomiast kontrolę dla myszy APP<sup>+</sup> stanowiły myszy bez mutacji (APP<sup>-</sup>). Po przeprowadzonych doświadczeniach myszy uśmiercano, a wybrane struktury mózgu myszy: korę i hipokamp pobierano na lodzie do dalszych badań.

### **3.1.3. Analiza poziomu mRNA**

#### **Izolowanie RNA**

Opisana procedura była podobna, w przypadku materiału wyizolowanego ze zwierząt, jak i z komórek. Całkowite RNA z komórek PC12 lub kory mózgowej i hipokampa myszy izolowano w warunkach sterylnych, używając odczynnika TRI-Reagent, zgodnie z protokołem producenta (Sigma – Aldrich). Komórki lub próbki tkanki (o masie do 100mg) zawieszano w 1ml odczynnika TRI-reagent w probówkach wolnych od RNAz i DNAz. Zawieszone próbki zhomogenizowano na lodzie. Następnie do 1ml zawiesiny dodano 200µl chloroformu i energicznie mieszano przez 15 sek., pozostawiano na 15 min w temperaturze pokojowej i wirowano przy obrotach 12 000x g przez 10 min w temperaturze 4°C. Po zwirowaniu próbek, górną fazę (wodną) zawierającą RNA przenoszono do nowych probówek, dodawano 0,5ml izopropanolu w temperaturze 4-6°C, delikatnie mieszano i pozostawiano na 5 min w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę wirowano przez 10 min przy obrotach 12 000x g w temperaturze 4°C. Osad przemywano trzykrotnie 1ml 75% etanolu po czym pozostawiono probówki otwarte celem odparowania etanolu. RNA zawieszano w 20µl wody wolnej od RNAz (*RNAse-free water*, Sigma-Aldrich). Następnie, mierzono ilość otrzymanego RNA metodą spektrofotometryczną za pomocą aparatu NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc.) przy długości fali  $\lambda = 260\text{nm}$ , natomiast zanieczyszczenie białkami i DNA mierzono 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 probówek przenoszono objętość zawierającą 1µg czystego RNA i uzupełniano odczynnikiem do trawienia DNA (Merck) do objętości 10µl. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 15 min w temperaturze 25°C. Następnie dodano 1µl odczynnika zatrzymującego reakcję (*Stop solution*) i dalej inkubowano przez 10 min w temperaturze 70°C. Po zakończeniu reakcji próbki przenoszono do lodu.

#### **Reakcja odwrotnej transkrypcji**

Całkowite wyizolowane RNA (1µg) było matrycą do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji przy udziale odwrotnej transkryptazy, której produktem jest komplementarne DNA (cDNA). Reakcję odwrotnej transkrypcji (25°C - 10 min; 37°C – 120 min; 85°C – 5 min) przeprowadzano z użyciem zestawu odczynników firmy Applied Biosystems w końcowej objętości 20µl.

## Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

Poziom mRNA genów kodujących wybrane białka, analizowano za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy – qPCR (*quantitative PCR*; nazywana też: PCR w czasie rzeczywistym). Na matrycy cDNA uzyskanej z 1 µg RNA przeprowadzono reakcję qPCR przy użyciu odpowiednich sond Taq-Man (Thermo Fisher Scientific Inc.). Spis użytych w doświadczeniach sond zawarto w poniższych tabelach:

Materiał komórkowy:

| Gen           | Taqman        | Długość amplikonu | Max Ct |
|---------------|---------------|-------------------|--------|
| <i>Actb</i>   | Rn00667869_m1 | 115               | 19,98  |
| <i>Adam10</i> | Rn01530753_m1 | 94                | 28,79  |
| <i>Bace1</i>  | Rn00569988_m1 | 127               | 31,96  |
| <i>Bcl2</i>   | Rn99999125_m1 | 104               | 38,22  |
| <i>Cerk</i>   | Rn01505585_m1 | 63                | 23,79  |
| <i>Mmp2</i>   | Rn01538170_m1 | 63                | 31,52  |
| <i>Mmp9</i>   | Rn00579162_m1 | 72                | 30,73  |
| <i>Mmp10</i>  | Rn00591678_m1 | 79                | 34,03  |
| <i>Mmp11</i>  | Rn01428817_m1 | 62                | 26,65  |
| <i>Parp1</i>  | Rn00565018_m1 | 70                | 24,93  |
| <i>Parp2</i>  | Rn01414610_m1 | 112               | 25,21  |

| Gen          | Taqman        | Długość amplikonu | Max Ct |
|--------------|---------------|-------------------|--------|
| <i>Parp3</i> | Rn01447502_m1 | 84                | 27,03  |
| <i>S1pr1</i> | Rn02758712_s1 | 74                | 34,13  |
| <i>S1pr5</i> | Rn00572952_s1 | 106               | 25,33  |
| <i>Psen1</i> | Rn00569763_m1 | 101               | 23,97  |
| <i>Psen2</i> | Rn00579412_m1 | 70                | 26,14  |
| <i>Sirt1</i> | Rn01428096_m1 | 65                | 25,66  |
| <i>Sirt3</i> | Rn01501410_m1 | 76                | 27,71  |
| <i>Sirt4</i> | Rn01481485_m1 | 109               | 28,14  |
| <i>Sirt5</i> | Rn01450559_m1 | 66                | 23,89  |
| <i>Sphk1</i> | Rn00591307_m1 | 77                | 31,91  |
| <i>Sphk2</i> | Rn01457923_g1 | 72                | 25,70  |

Max Ct – Największa wartość Ct dla wybranej kontroli

Materiał zwierzęcy:

| Gen           | Taqman        | Długość amplikonu | Max Ct |
|---------------|---------------|-------------------|--------|
| <i>Actb</i>   | Mm00607939_s1 | 115               | 19,59  |
| <i>Adam10</i> | Mm00545742_m1 | 109               | 25,21  |
| <i>Bace1</i>  | Mm00478664_m1 | 124               | 25,38  |
| <i>Bax</i>    | Mm00432051_m1 | 84                | 24,82  |
| <i>Bcl2</i>   | Mm00477631_m1 | 85                | 26,26  |
| <i>Cerk</i>   | Mm00461054_m1 | 86                | 25,98  |
| <i>Parp1</i>  | Mm01321084_m1 | 69                | 24,31  |
| <i>Psen1</i>  | Mm00501184_m1 | 86                | 28,07  |
| <i>Psen2</i>  | Mm00448413_m1 | 80                | 26,34  |

| Gen          | Taqman        | Długość amplikonu | Max Ct |
|--------------|---------------|-------------------|--------|
| <i>S1pr1</i> | Mm02619656_s1 | 154               | 30,26  |
| <i>S1pr3</i> | Mm02620181_s1 | 105               | 31,79  |
| <i>Sirt1</i> | Mm00490762_m1 | 119               | 28,07  |
| <i>Sirt3</i> | Mm00452131_m1 | 68                | 23,73  |
| <i>Sirt4</i> | Mm01201915_m1 | 99                | 26,31  |
| <i>Sirt5</i> | Mm01351576_m1 | 54                | 25,32  |
| <i>Sphk1</i> | Mm00448841_g1 | 65                | 29,87  |
| <i>Sphk2</i> | Mm00445021_m1 | 113               | 28,91  |

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 wartości uzyskanych dla próbki badanej do próbki referencyjnej

(kalibratora), po uprzedniej normalizacji obydwu względem genu referencyjnego (*Actb*). Względny poziom mRNA (RQ) obliczono metodą  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Reakcję q-PCR wykonywano za pomocą aparatu Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

#### **3.1.4. Statystyczne opracowanie wyników**

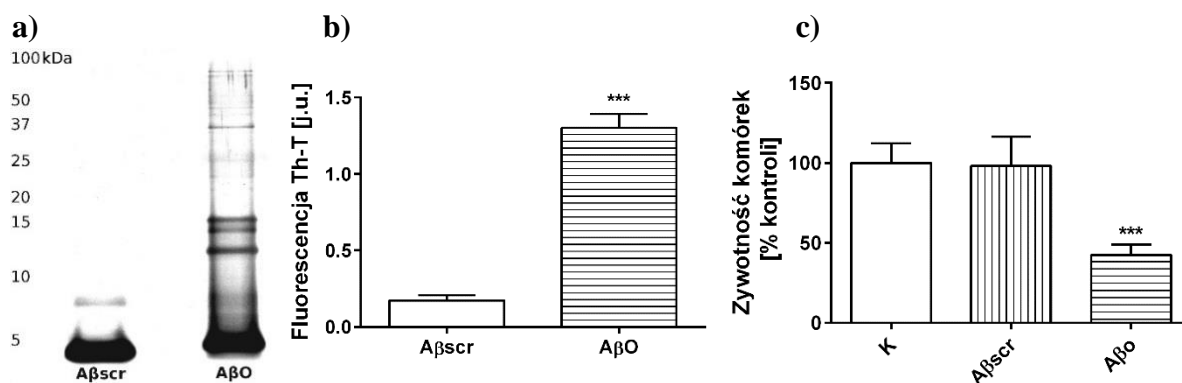
Każde oznaczenie wykonywano w co najmniej trzech powtórzeniach. Wyniki wyrażano jako wartość średnią arytmetyczną  $\pm$  błąd standardowy średniej (SEM) obliczone z indywidualnych pomiarów (średnich z powtórzeń). Istotność różnic badano z zastosowaniem testu *t*-Studenta (dwie grupy eksperymentalne) bądź z zastosowaniem jednoczynnikowej lub wieloczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z użyciem testu *post-hoc* Newman-Keulsa (analiza jednoczynnikowa) lub Tukeya (analiza wieloczynnikowa). Wyniki uznawano za znamienne statystycznie przy poziomie istotności  $p < 0,05$ . Analizę statystyczną wykonano za pomocą programu GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## **4. Wyniki**

### **4.1. Badania *in vitro***

#### **4.1.1. Charakterystyka oligomerów A $\beta$ i ich wpływ na żywotność komórek linii PC12**

W pierwszym etapie badań *in vitro* scharakteryzowano uzyskane w procesie oligomeryzacji oligomery A $\beta$ . Rozdział elektroforetyczny A $\beta$ o za pomocą techniki SDS-PAGE z barwieniem srebrem wykazał obecność oligomerów peptydu A $\beta$ . Zaobserwowano zarówno krótkie postacie/formy oligomerów, takie jak: dimery, trimery, tetramery, jak również długie formy oligomerów (Ryc.8a). W celu określenia stopnia agregacji peptydu A $\beta$ 1-42 zastosowano test tioflawinowy, w którym Th-T wykazuje zwiększoną fluorescencję i charakterystyczne czerwone przesunięcie widma emisyjnego na skutek wiązania się z białkami przyjmującymi strukturę  $\beta$ -kardki (do których zaliczamy m.in. oligomery i włókna białek amyloidogennych). Stwierdzono około 6-krotny wzrost fluorescencji Th-T w porównaniu do kontroli (A $\beta$ scr) - peptydu złożonego z tych samych aminokwasów, lecz w zmienionej kolejności (Ryc.8b). W kolejnym etapie zbadano wpływ A $\beta$ o na żywotność komórek linii PC12. Zaobserwowano, że A $\beta$ o (1 $\mu$ M) wpłynęły na obniżenie żywotności komórek PC12 o ok. 50% zarówno w porównaniu do kontroli, jak i do peptydu A $\beta$ scr 1-42 (Ryc.8c).



**Rycina 8. Charakterystyka oligomerów Aβ i ich wpływ na żywotność komórek PC12.** a) Rozdział elektroforetyczny z barwieniem srebrem peptydu Aβ1-42 i Aβscr. b) Agregacja Aβ mierzona przy użyciu barwnika Tioflawiny-T. c) Żywotność komórek PC12 w warunkach toksyczności wywołanej działaniem Aβ. \*\*\* $p < 0,001$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli (K, Aβscr) ( $n = 4-8$ , jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Newmana-Keuls (żywotność), test t-Studenta (agregacja, Th-T)), AβO (1 μM), Aβscr (1 μM).

#### 4.1.2. Zbadanie wpływu toksyczności Aβ oraz zahamowania aktywności PARP na poziom mRNA enzymów metabolizujących APP oraz PARPów i SIRTuin

W niniejszym podrozdziale przedstawiono wpływ Aβ oraz inhibitora PARP1 (PJ-34), jak również endogennego peptydu Aβ na poziom mRNA genów kodujących enzymy odpowiadające za metabolizm APP, takich jak α-, β-sekretaza, podjednostki γ-sekretazy oraz enzymy NAD<sup>+</sup>-zależne takie jak PARPy i SIRTy.

Wcześniejsze badania wykazały, że w komórkach transfekowanych ludzkim genem APP dochodzi do wzrostu ekspresji ludzkiego białka prekursorowego APP oraz do zwiększonej produkcji Aβ, którego poziom jest podwyższony ok. 3-krotnie w komórkach APPwt i ok. 5-krotnie w komórkach APPsw (Chalimoniuk *i wsp.*, 2007). Dlatego też w komórkach PC12 transfekowanych w/w genami zbadano poziom mRNA genów kodujących PARPy i SIRTy.

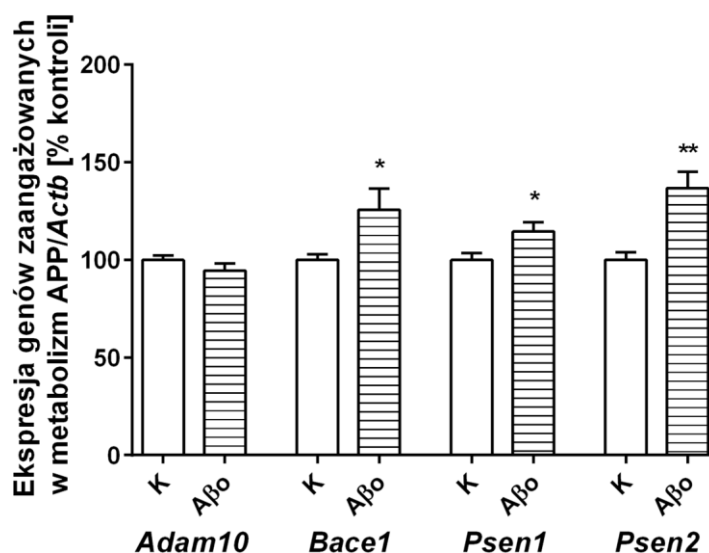
Zarówno PARPy, jak i SIRTy odgrywają niezwykle ważną rolę podczas toksyczności Aβ poprzez oddziaływanie na czynniki transkrypcyjne. Ponadto, same SIRTy (a dokładniej SIRT1) mogą promować ścieżkę nieamyloidogenną metabolizmu białka APP poprzez aktywację α-sekretazy. Niestety, podczas stresu oksydacyjnego aktywność SIRT1 może być limitowana przez enzym PARP1, który może z nią konkurować o substrat, którym jest NAD<sup>+</sup>, jak również wiązać się z rejonami promotora dla SIRT1.



Dlatego w modelu toksyczności A $\beta$  sprawdzono jaki wpływ ma zahamowanie aktywności PARP1 na poziom mRNA w/w genów.

#### 4.1.2.1. Wpływ A $\beta$ na poziom mRNA białek związanych z metabolizmem APP

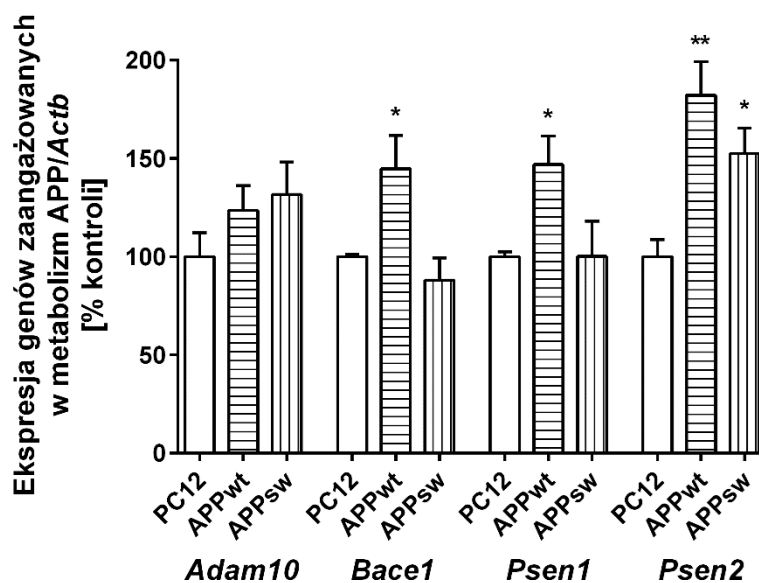
Sekretazy należą do grupy enzymów biorących udział w enzymatycznym trawieniu białka APP. W przypadku ścieżki amyloidogennej, w której biorą udział:  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretyza następuje wytwarzanie peptydu A $\beta$ , które może ulec nasileniu na skutek mutacji genu, bądź innych czynników takich jak: toksyczność ceramidu czy ASN. Do genów które biorą udział w ścieżce amyloidogennej można zaliczyć *Bace1* oraz *Psen1* i 2, gdzie *Bace1* koduje  $\beta$ -sekretezę, natomiast *Psen1* i 2 kodują podjednostki  $\gamma$ -sekretyazy. Do enzymów, które uczestniczą w ścieżce nieamyloidogennej białka APP można zaliczyć podjednostki  $\gamma$ -sekretyazy oraz białko ADAM10, które wykazuje aktywność  $\alpha$ -sekretyazy i jest kodowane przez gen *Adam10*. Dlatego też przeanalizowano na materiale komórkowym wpływ egzogennie podanego A $\beta$  na poziom mRNA genów kodujących enzymy ścieżki amyloidogennej oraz nieamyloidogennej. W przebadanym materiale zaobserwowano istotny wzrost poziomu mRNA *Bace1*, który koduje  $\beta$ -sekretezę oraz genów kodujących podjednostki kompleksu  $\gamma$ -sekretyazy, takich jak *Psen1* i *Psen2* po podaniu A $\beta$  (Ryc.9). W przypadku genu kodującego  $\alpha$ -sekretezę (*Adam10*) nie zaobserwowano istotnych zmian po podaniu amyloidu (Ryc.9).



**Rycina 9. Poziom mRNA genów kodujących sekretazy i ich podjednostki w komórkach PC12 traktowanych A $\beta$ .** \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej (K) (n=7-14, test t-Studenta). A $\beta$  (1  $\mu$ M). Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (*Actb*).

#### 4.1.2.2. Wpływ endogennego peptydu A $\beta$ na poziom mRNA białek związanych z metabolizmem APP

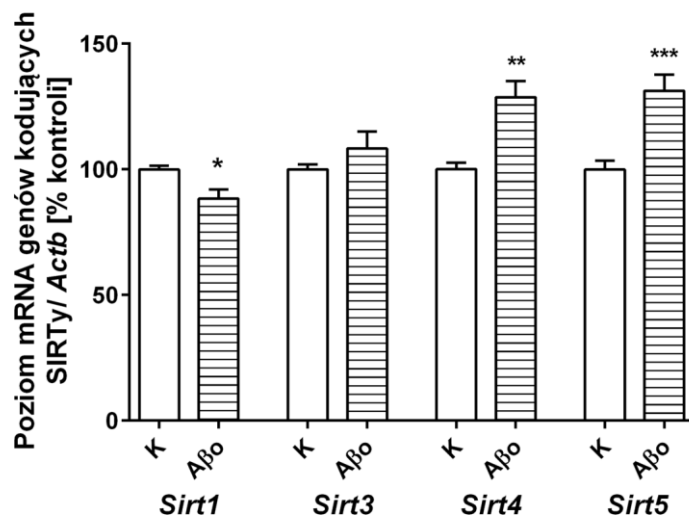
Analiza poziomu mRNA genów kodujących sekretazy w komórkach PC12 transfekowanych genem APPwt wykazała istotny wzrost poziomu mRNA genów kodujących amyloidogenną ścieżkę metabolizmu APP, to jest: *Bace1*, *Psen1*, *Psen2*, w porównaniu do grupy kontrolnej transfekowanej pustym wektorem (Ryc.10). Ponadto, w linii transfekowanej genem APP z mutacją szwedzką zaobserwowano wzrost poziomu mRNA *Psen2* (Ryc.10).



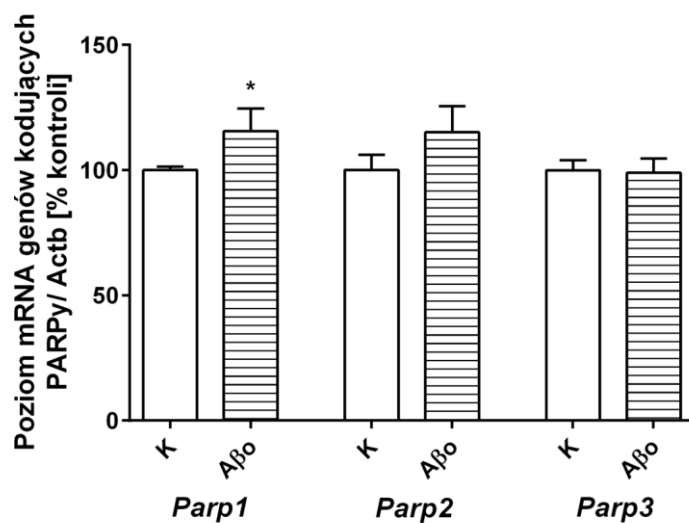
**Rycina 10. Poziom mRNA genów kodujących sekretazy i ich podjednostki w komórkach PC12 transfekowanych APPwt oraz APPsw.** \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej (PC12) ( $n=3-4$ , jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Newmana-Keulsa). Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (*Actb*).

#### 4.1.2.3. Wpływ A $\beta$ na poziom mRNA PARPów i SIRTuin

W niniejszym rozdziale ukazano wpływ A $\beta$  na poziom mRNA SIRTuin, które w większości wykazują działanie antyoksydacyjne i pro-życiowe oraz na poziom mRNA PARPów, które mogą brać udział w naprawie DNA lub prowadzić do wzrostu śmiertelności komórek. Przeprowadzone badania wykazały, że podanie A $\beta$  istotnie obniżyło poziom mRNA *Sirt1* (Ryc.11) oraz zwiększyło poziom mRNA dla sirtuin mitochondrialnych SIRT4 i SIRT5 (Ryc.11). Ponadto, A $\beta$  zwiększały poziom mRNA dla genu kodującego PARP1. W przypadku genu *Parp2* oraz *Parp3* nie zaobserwowano istotnych zmian po podaniu A $\beta$  (Ryc.12).



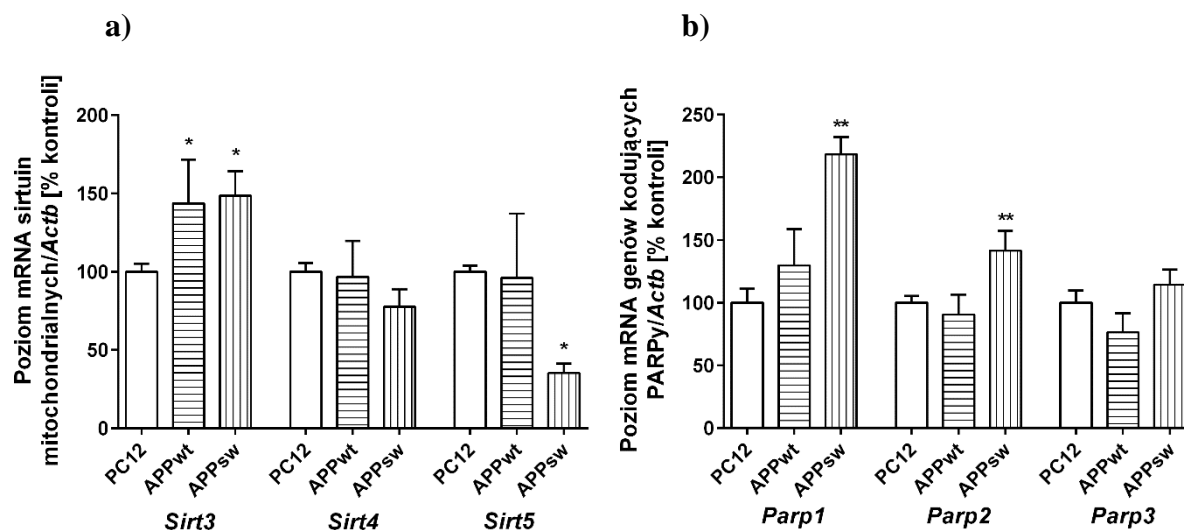
**Rycina 11. Poziom mRNA genów kodujących sirtuiny jądrowe i mitochondrialne w komórkach PC12 traktowanych Aβ<sub>0</sub>.** \*\*\* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej (K) ( $n = 6-15$ , test *t*-Studenta), Aβ<sub>0</sub> (1μM). Wyniki normalizowano względem genu kodującego β-aktynę (*Actb*).



**Rycina 12. Poziom mRNA genów kodujących polimerazy poli(ADP-rybozy): PARP1, PARP2 i PARP3 w komórkach PC12 traktowanych Aβ<sub>0</sub>.** \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli (K) ( $n = 4-6$ , test *t*-Studenta), Aβ<sub>0</sub> (1μM). Wyniki normalizowano względem genu kodującego β-aktynę (*Actb*).

#### 4.1.2.4. Wpływ endogennego peptydu A $\beta$ na poziom mRNA PARPów i SIRTuin

Następnie zbadano wpływ endogennego peptydu A $\beta$  na poziom mRNA enzymów NAD<sup>+</sup>- zależnych w linii komórkowej PC12wt. Zaobserwowano jedynie wzrost poziomu mRNA genu kodującego sirtuinę mitochondrialną SIRT3 (Ryc.13a). W przypadku pozostałych genów kodujących sirtuiny mitochondrialne (SIRT4, 5) oraz PARP1, 2 i 3, nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie mRNA, aczkolwiek w komórkach APPwt zauważalna była tendencja wzrostowa w przypadku genu *Parp1* (Ryc.13b). Podobnie jak w przypadku linii transfekowanej genem APPwt, w linii APPsw zaobserwowano wzrost poziomu mRNA *Sirt3* oraz brak zmian w poziomie mRNA *Sirt4*. Obniżeniu uległ natomiast poziom mRNA *Sirt5* (Ryc.13a). Dodatkowo, w odróżnieniu od linii APPwt w komórkach APPsw zaobserwowano wzrost poziomu mRNA dla genów kodujących PARP1 i 2 (Ryc.13b).

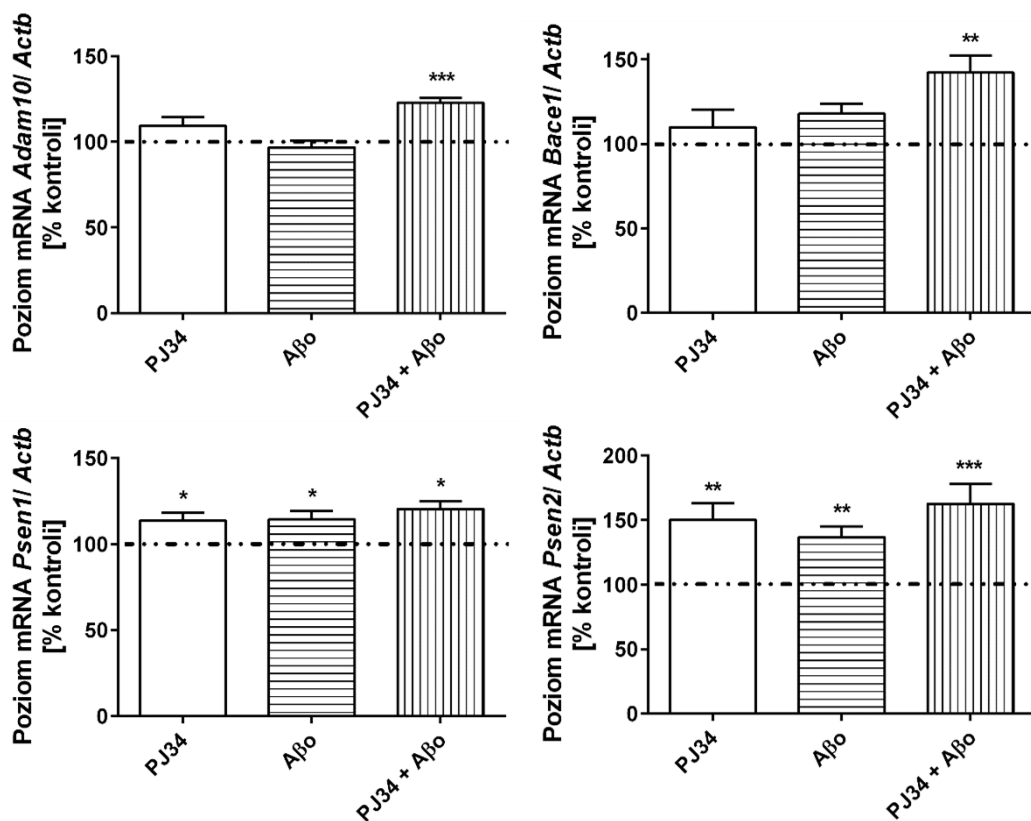


**Rycina 13. Poziom mRNA genów kodujących enzymy NAD<sup>+</sup>- zależne w komórkach PC12 transfekowanych APPwt oraz APPsw.** \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej (PC12) ( $n=3-5$ , jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Newmana-Keulsa). Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (*Actb*).

#### 4.1.2.5. Wpływ A $\beta$ o oraz inhibitora PARP1 na poziom mRNA białek związanych z metabolizmem APP

PARP1 należy do jednych z białek, którego aktywność ulega nadmiernemu wzrostowi podczas stresu oksydacyjnego wywołanego toksycznością peptydu A $\beta$ . Nadmierna aktywacja PARP1 może doprowadzić do zwiększenia stanu zapalnego (w wyniku aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B), jak również do śmierci neuronów

w wyniku aktywacji białek pro-apoptycznych oraz czynnika indukującego apoptozę AIF. Dlatego też zbadano w materiale komórkowym wpływ inhibitora PARP1 na poziom mRNA genów kodujących enzymy ścieżki amyloidogennej oraz nieamyloidogennej podczas toksyczności A $\beta$ . PJ-34 dodany do komórek PC12 podczas toksyczności A $\beta$  spowodował wzrost poziomu mRNA wszystkich przebadanych genów odpowiedzialnych za metabolizm APP (Ryc.14).

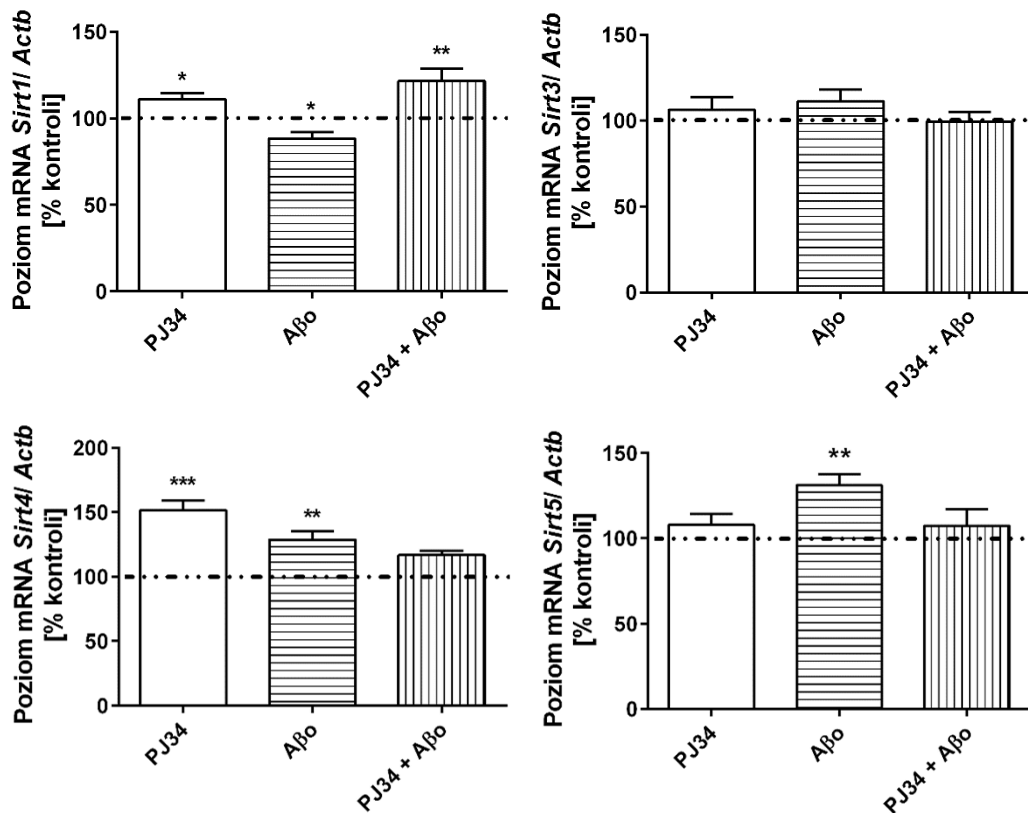


**Rycina 14. Poziom mRNA sekretaz i ich podjednostek w komórkach PC12 traktowanych A $\beta$  i PJ-34.** \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej, którą stanowiły komórki nietraktowane żadnym związkiem ( $n = 5-11$ , jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Newmana-Keulsa). A $\beta$  ( $1 \mu M$ ), PJ-34 ( $20 \mu M$ ). Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (Actb).

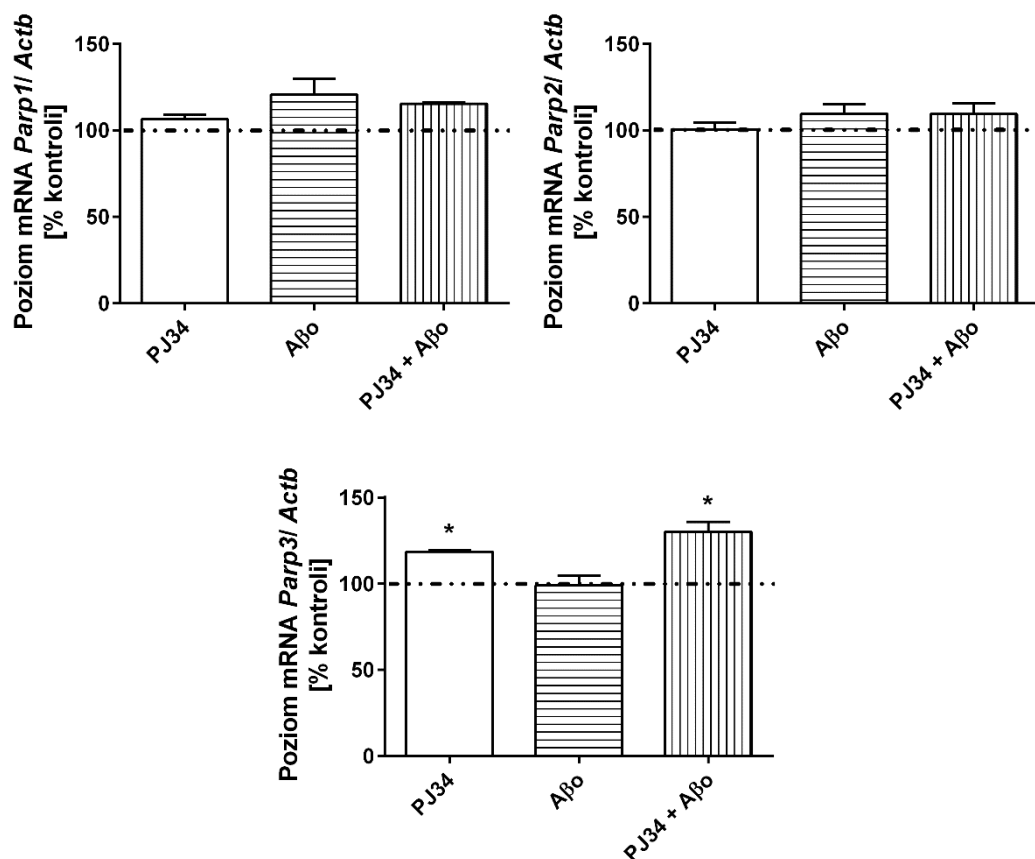
#### 4.1.2.6. Wpływ A $\beta$ oraz inhibitora PARP1 na poziom mRNA PARPów i SIRTuin

Farmakologiczne zahamowanie aktywności PARP1 przy użyciu PJ-34 istotnie zwiększyło poziom mRNA dla sirtuiny jądrowej SIRT1. Wzrost ten był również obserwowany po podaniu PJ-34 w warunkach toksyczności A $\beta$  (Ryc.15). Ponadto, zaobserwowano istotny wzrost poziomu mRNA dla sirtuiny mitochondrialnej SIRT4 w wyniku działania PJ-34 (Ryc.15). Następnie zbadano wpływ PJ-34 na poziom mRNA PARPów odpowiedzialnych za naprawę DNA (PARP1-3). Wykazano, że zahamowanie aktywności PARP1 wywołało istotny wzrost poziomu mRNA *Parp3* zarówno po podaniu

samego PJ-34, jak również w obecności PJ-34 i A $\beta$  (Ryc.16). W przypadku genu *Parp1* oraz *Parp2* nie zaobserwowano istotnych zmian zarówno po podaniu PJ-34, jak i po użyciu PJ-34 i A $\beta$  (Ryc.16).



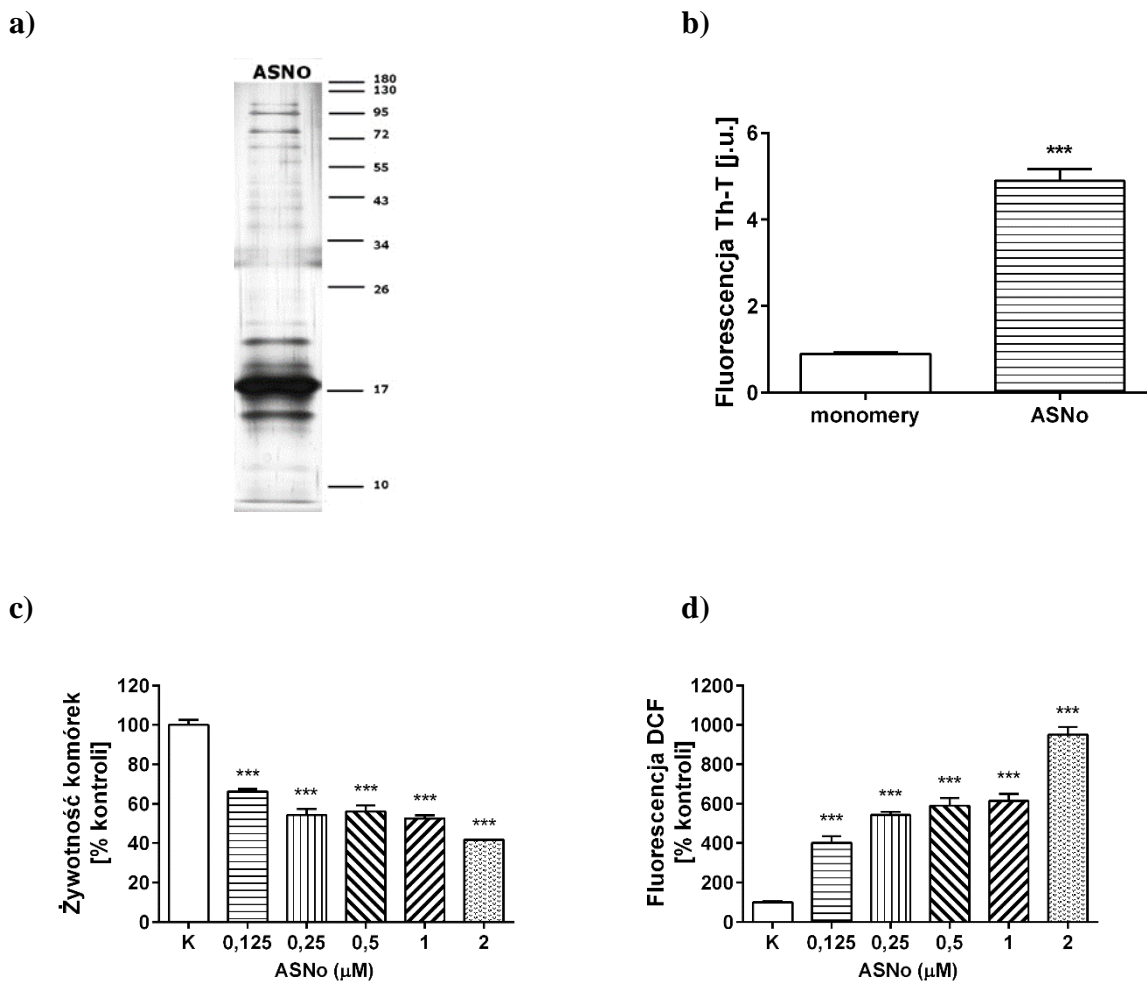
**Rycina 15. Wpływ PJ-34 na poziom mRNA sirtuin w warunkach toksyczności wywołanej działaniem A $\beta$  w komórkach PC12.** \*\*\* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej, którą stanowiły komórki nietraktowane żadnym związkiem ( $n=4-14$ , jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Newmana-Keulsa), A $\beta$  ( $1\mu M$ ), PJ-34 ( $20\mu M$ ). Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (*Actb*).



**Rycina 16. Wpływ PJ-34 na poziom mRNA PARPów w warunkach toksyczności wywołanej działaniem Aβ0 w komórkach PC12.** \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej, którą stanowiły komórki nietraktowane żadnym związkiem ( $n=3-6$ , jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Newmana-Keulsa), Aβ0 (1μM), PJ-34 (20μM). Wyniki normalizowano względem genu kodującego β-aktynę (Actb).

#### 4.1.3. Charakterystyka oligomerów ASN i ich wpływ na żywotność komórek linii PC12

W kolejnym etapie zbadano wpływ oligomerów białka ASN na żywotność komórek linii PC12 oraz ilość powstających wolnych rodników. Wykonany rozdział elektroforetyczny białka ASN, wykazał obecność oligomerów (Ryc.17a). Ponadto, zaobserwowano ok. 5-krotny wzrost fluorescencji Th-T ASNo w porównaniu do ASN w postaci monomerów (Ryc.17b). Wykazano również, że ASNo, użyte w stężeniach 0,25-1μM powodują obniżenie żywotności komórek PC12 o ok. 50% (Ryc.17c). Dodatkowo, zaobserwowano, że ASNo podane w stężeniu 0,5μM wpływają na około 6-krotny wzrost poziomu wolnych rodników w linii komórkowej PC12 (Ryc.17d).



**Rycina 17. Charakterystyka oligomerów ASN.** *a)* Rozdział elektroforetyczny ASNo z barwieniem srebrem. *b)* Agregacja ASNo mierzona przy użyciu barwnika Tioflawiny T. *c)* Żywotność komórek PC12 w warunkach toksyczności wywołanej działaniem ASNo. *d)* Pomiar poziomu wolnych rodników tlenowych w komórkach PC12 poddanych działaniu ASNo. \*\*\* $p < 0,001$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli (K) lub do monomerów ASN ( $n=4-6$ , jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Newman-Keulsa, test *t*-Studenta (Th-T)).

#### 4.1.4. Zbadanie wpływu ASNo na poziom mRNA białek metabolizmu APP i A $\beta$ oraz PARPów i SIRTuin

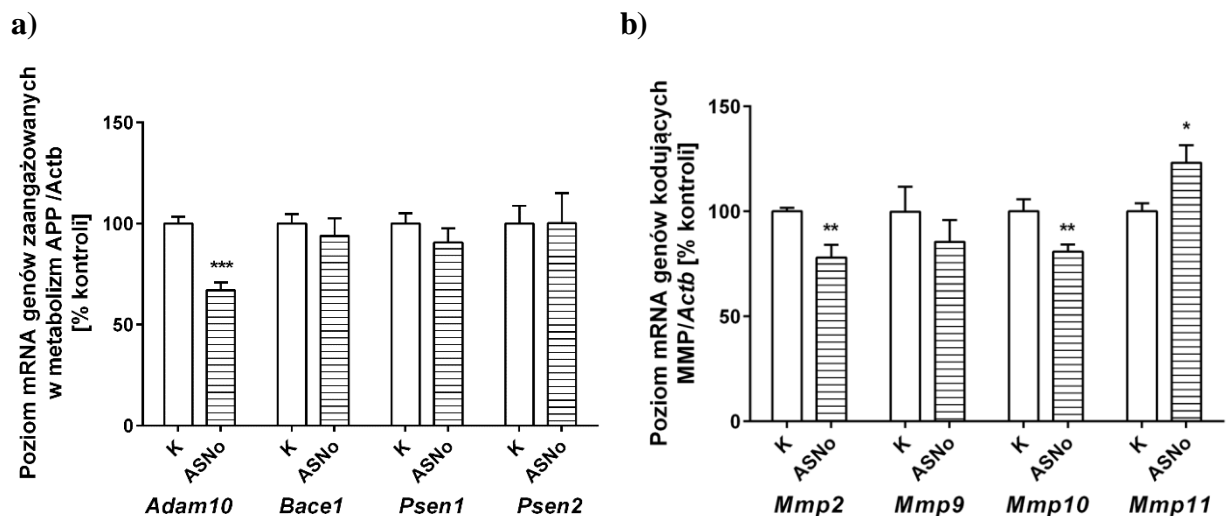
Jedną ze zmian obserwowanych w ChA oraz w otępieniu z ciałami Lewy'ego, jest obecność ASN, która wchodzi w skład ciał Lewy'ego. Zarówno A $\beta$ , jak i ASN wykazują wiele wspólnych cech, mogą one: przybierać nieprawidłową konformację (taką jak strukturę  $\beta$ -kartki czy kłęбка statystycznego), ulegać agregacji oraz brać udział w wywoływaniu stresu oksydacyjnego. Ponadto, ASNo mogą wpływać na wzrost ilości peptydu A $\beta$  oraz na zwiększenie jego toksyczności. Dlatego też w niniejszym podrozdziale



przedstawiono jak egzogenne ASNo wpływają na poziom mRNA genów kodujących enzymy metabolizujące APP (sekretazy i ich podjednostki) oraz enzymy metabolizujące peptydy A $\beta$  (metaloproteinazy). Dodatkowo zbadano wpływ ASNo na poziom mRNA genów kodujących białka, które mogą brać udział w modyfikacji toksyczności peptydu A $\beta$ , czyli PARPy i SIRTy.

#### 4.1.4.1. Wpływ ASNo na poziom mRNA białek metabolizmu APP

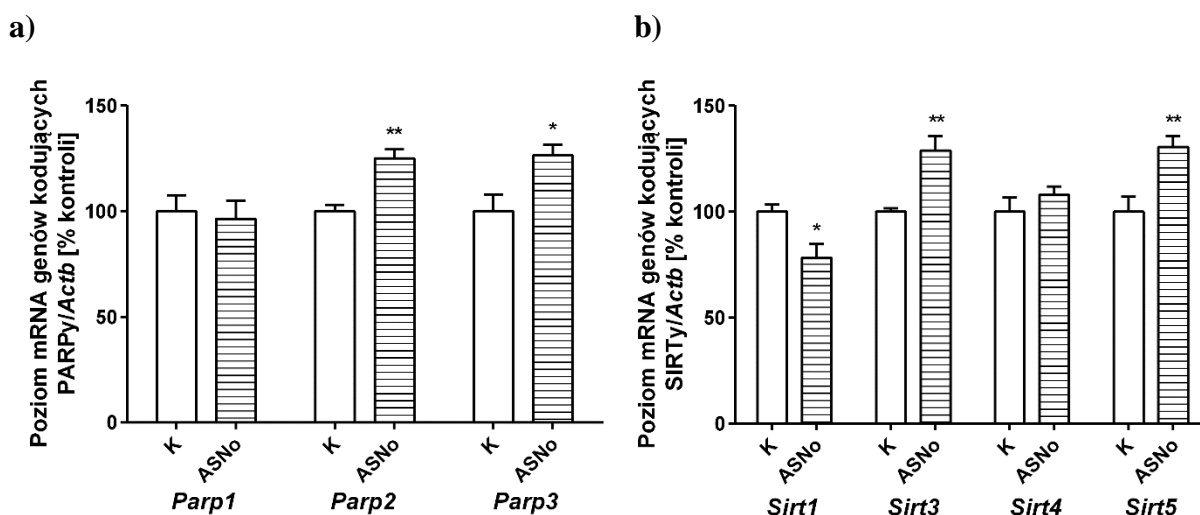
ASN jest jednym z białek, które mogą wchodzić we wzajemną interakcję z peptydem A $\beta$  oraz wpływać na zwiększenie powstawania tego peptydu. Dlatego też zbadano wpływ ASNo na poziom mRNA białek związanych z uwalnianiem i degradacją peptydu A $\beta$ . W komórkach PC12 traktowanych ASNo zaobserwowano istotne obniżenie poziomu mRNA *Adam10* (Ryc.18a), kodującego  $\alpha$ -sekretazę biorącą udział w ścieżce nieamyloidogennej i mającą istotne znaczenie w regulacji ilości powstającego peptydu A $\beta$ . Ponadto, zauważono obniżenie poziomu mRNA genów *Mmp2*, *Mmp10*, kodujących metaloproteinazy oraz wzrost poziomu mRNA *Mmp11* (Ryc.18b) w wyniku działania ASN.



**Rycina 18. Poziom mRNA genów kodujących:** a) enzymy metabolizmu APP oraz b) metaloproteinazy w komórkach PC12 traktowanych oligomerami ASN. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej (K) ( $n = 5-14$ , test *t*-Studenta). Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (*Actb*).

#### 4.1.4.2. Wpływ egzogennych oligomerów ASN na poziom mRNA PARPów i SIRTuin

ASN może wpływać na zmiany w poziomie peptydu A $\beta$  podobnie jak SIRT1 z tym, że SIRT1 wpływa na promowanie ścieżki nieamyloidogennej, natomiast ASN może aktywować powstawanie peptydu A $\beta$  i jego sekrecję oraz brać udział w zwiększeniu jego toksyczności. Powstało więc pytanie, jak oligomery ASN wpływają na poziom mRNA genów kodujących PARPy i SIRTy. W przypadku PARPów odpowiedzialnych, podobnie jak sirtuiny za regulację licznych czynników transkrypcyjnych i naprawę uszkodzeń DNA, oligomery ASN spowodowały wzrost poziomu mRNA *Parp2* i *Parp3* (Ryc.19a). Natomiast w przypadku sirtuin zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA dla jądrowej sirtuiny 1 (SIRT1) na skutek działania ASNo oraz wzrost poziomu mRNA dla dwóch sirtuin mitochondrialnych (SIRT3 i SIRT5) (Ryc.19b).



**Rycina 19. Poziom mRNA genów kodujących a) PARPy i b) SIRTy w komórkach PC12 traktowanych oligomerami ASN. \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej (K) ( $n=4-10$ , test *t*-Studenta). Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (*Actb*).**

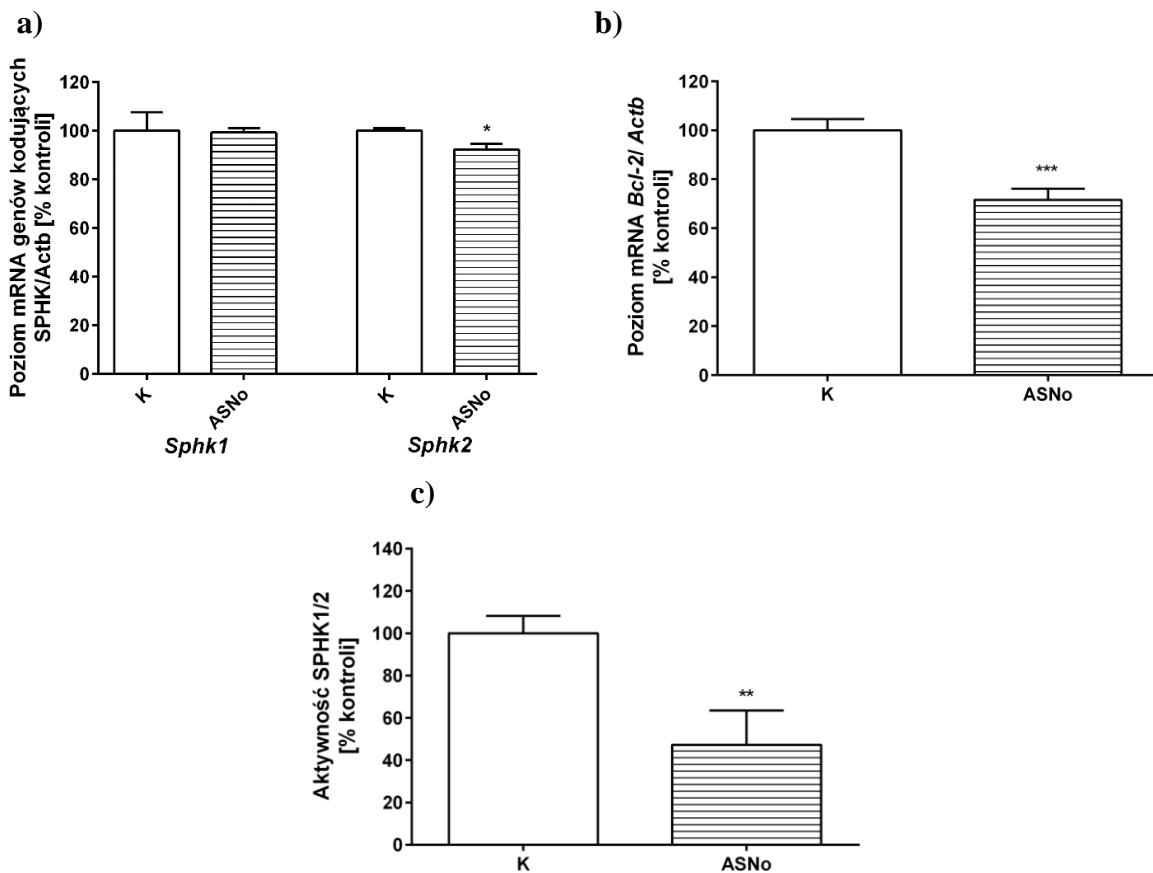
#### 4.1.5. Zbadanie wpływu endogennego peptydu A $\beta$ oraz ASNo na poziom mRNA enzymów metabolizmu bioaktywnych sfingolipidów oraz receptorów dla S1P

Badania ostatnich lat wskazują na istotną rolę zaburzeń ścieżek sygnałowych zależnych od bioaktywnych sfingolipidów do których należą pro-apoptyczny ceramid i pro-życiowy C1P oraz S1P. Zaburzenia te obserwowane są w wielu schorzeniach o podłożu neurodegeneracyjnym. C1P, jak i S1P powstają w wyniku reakcji fosforylacji przy udziale kinazy ceramidu (CERK) lub kinaz sfingozyno-1-fosforanu (SPHK1 i 2) i oddziałują za pomocą swoich receptorów S1PR1-5 na liczne szlaki sygnałowe związane z procesami przeżycia komórki. Zarówno SPHK1, jak i SPHK2 są enzymami których aktywność w dużej

mierze jest zależna od stresu oksydacyjnego. Wzrost stresu wywołany toksycznością zagregowanych białek lub peptydów o nieprawidłowej strukturze może prowadzić do obniżenia aktywności tychże kinaz. Dlatego też zbadano w jakim stopniu białka lub peptydy, które mogą ulegać agregacji i oligomeryzacji wpływają na poziom mRNA kinaz sfingozyny, kinazy ceramidu oraz białka anty-apoptotycznego Bcl-2.

#### **4.1.5.1. Wpływ egzogennych oligomerów ASN na poziom mRNA i aktywność SPHK1/2 oraz poziom mRNA białka anty-apoptotycznego Bcl-2**

W kolejnym etapie zbadano wpływ oddziaływania egzogennych oligomerów ASN na poziom mRNA genów kodujących kinazy sfingozyny oraz na aktywność SPHK1/2. Poziom mRNA *Sphk2* uległ obniżeniu na skutek działania ASNo (Ryc.20a). Nie zaobserwowano zmian poziomu mRNA w przypadku *Sphk1*. Zaobserwowano natomiast, że ASNo wpływa na obniżenie aktywności kinazy sfingozyny (SPHK1/2) (Ryc.20c). Zbadano również wpływ ASNo na poziom mRNA białka anty-apoptotycznego Bcl-2. Wykazano, że oligomery ASN istotnie obniżają poziom mRNA genu *Bcl-2* kodującego pro-życiową formę białka z rodziny Bcl-2 (Ryc.20b).

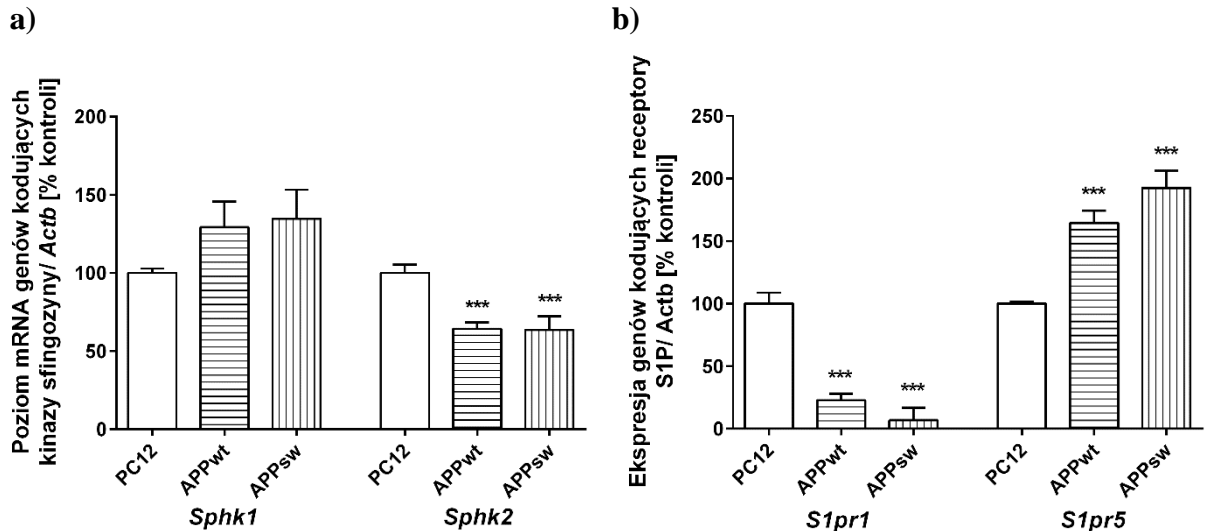


**Rycina 20.** Wpływ egzogennych oligomerów ASN na poziom mRNA i aktywność SPHK1/2 oraz poziom mRNA białka anty-apoptycznego Bcl-2 a) Poziom mRNA genów kodujących kinazy sfingozyny oraz b) białko Bcl-2; c) Aktywność SPHK1/2; \*\*\* $p < 0,001$  w komórkach PC12, \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej (K) ( $n=3-4$ , test *t*-Studenta). Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (*Actb*).

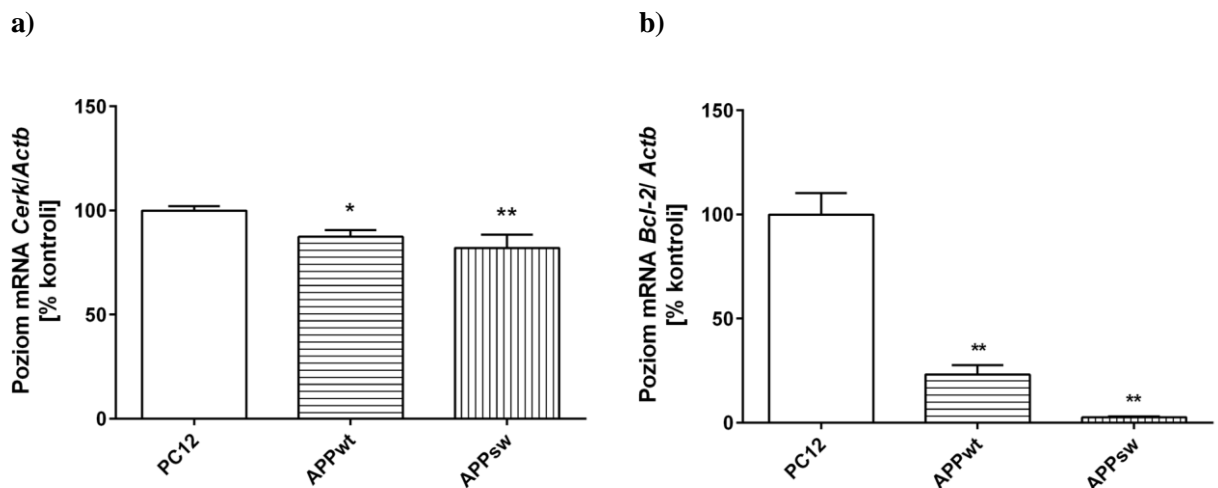
#### 4.1.5.2. Wpływ działania endogennego peptydu A $\beta$ na poziom mRNA kinaz sfingozyny, receptorów S1P, kinazy ceramidu oraz białka Bcl-2

Jak wspomniano wcześniej SPHK1 i 2 są odpowiedzialne za powstawanie S1P, a ich aktywność jest zależna od potencjału redox komórki. Analiza poziomu mRNA genów kodujących kinazy sfingozyny wykazała, że transfekcja genem APP wpływa istotnie na spadek poziomu mRNA genu *Sphk2*, kodującego kinazę sfingozyny 2 w komórkach APPwt (Ryc.21a). Zmiana ta była również obserwowana w przypadku linii APPsw. Następnie w komórkach APPwt i APPsw, które charakteryzują się zwiększonymi ilościami powstającego peptydu A $\beta$  zauważono istotne obniżenie poziomu mRNA dla genu *Slpr1*, kodującego receptor 1 dla S1P oraz wzrost poziomu mRNA dla genu *Slpr5* kodującego receptor 5 dla S1P (Ryc.21b). Dodatkowo, w komórkach APPwt zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA *Cerk*, kodującego kinazę ceramidu, która bierze udział w przekształcaniu ceramidu do jego ufosforylowanej, pro-życiowej formy (Ryc.22a).

Trend ten zaobserwowano również w komórkach APPsw (Ryc.22a). Następnie zbadano wpływ transfekcji komórek PC12 genem APPwt i APPsw na poziom mRNA białka z rodziny Bcl-2 i zaobserwowano istotne obniżenie poziomu mRNA dla pro-życiowej formy tego białka w przypadku obu linii komórkowych (Ryc.22b).



**Rycina 21. Poziom mRNA genów kodujących a) kinazy sfingozyny oraz b) receptory SIP w komórkach PC12 APPwt i APPsw. \*\*\* $p < 0,001$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej (PC12) ( $n=3-4$ , jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Newmana-Keulsa). Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (Actb).**



**Rycina 22. Poziom mRNA genów kodujących a) kinazę ceramidu, b) białko Bcl-2 w komórkach PC12 APPwt oraz APPsw. \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej (PC12) ( $n=3-4$ , jednoczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Newmana-Keulsa). Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (Actb).**

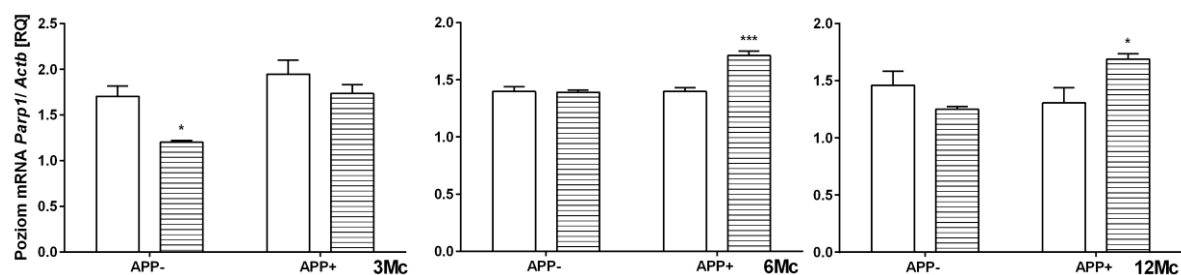
## 4.2. Badania *in vivo*

### 4.2.1. Zbadanie wpływu mutacji genu APP oraz modulatora receptorów sfingozyno-1-fosforanu (FTY720) na poziom mRNA PARPów i SIRTuin

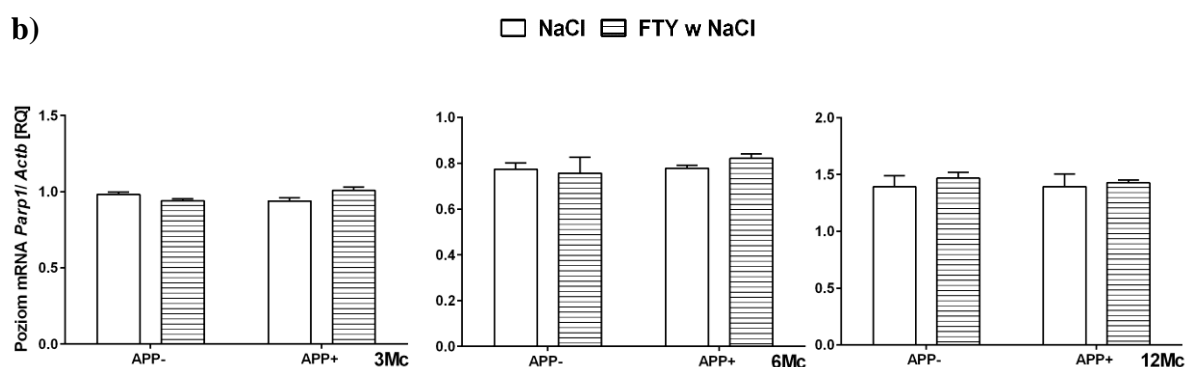
U myszy transgenicznych z mutacją genu APP<sup>+</sup> nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie mRNA *Parp1* w porównaniu do myszy bez mutacji APP<sup>-</sup> (Ryc. 23). W korze mózgowej 3-miesięcznych myszy APP<sup>+</sup> zaobserwowano jedynie obniżenie poziomu mRNA dla genu kodującego sirtuinę jądrową SIRT1 w porównaniu do myszy APP<sup>-</sup> (Ryc.24a). Poziom mRNA pozostałych przebadanych genów kodujących enzymy NAD<sup>+</sup>-zależne pozostawał bez zmian, aczkolwiek zaobserwowano tendencję do obniżenia się poziomu mRNA genu *Sirt4* w korze mózgowej myszy 6-miesięcznych APP<sup>+</sup> (Ryc.24c). W hipokampie 12-miesięcznych myszy APP<sup>+</sup> zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA *Sirt1* w porównaniu do myszy kontrolnych APP<sup>-</sup> (Ryc.25a).

Podanie dootrzewnowe FTY720 spowodowało istotny wzrost poziomu mRNA *Parp1* w korze mózgowej myszy APP<sup>+</sup> 6- i 12-miesięcznych (Ryc. 23a). FTY720 powodował również wzrost poziomu mRNA *Sirt1* w korze mózgowej myszy 3-miesięcznych APP<sup>+</sup> oraz wzrost poziomu mRNA *Sirt1*, *Sirt3*, *Sirt5* w korze mózgowej myszy 6-miesięcznych i 12-miesięcznych APP<sup>+</sup> (Ryc.24a, b, d). Podanie FTY720 wpłynęło jedynie na wzrost poziomu mRNA *Sirt1* i *4* (Ryc.25a, c) w hipokampie myszy 12-miesięcznych APP<sup>+</sup>. Zaobserwowano również tendencję do wzrostu poziomu mRNA *Sirt4* i *5* u myszy 6-miesięcznych APP<sup>+</sup> oraz *Sirt3* i *5* u myszy 12-miesięcznych APP<sup>+</sup> (Ryc.25b, c, d).

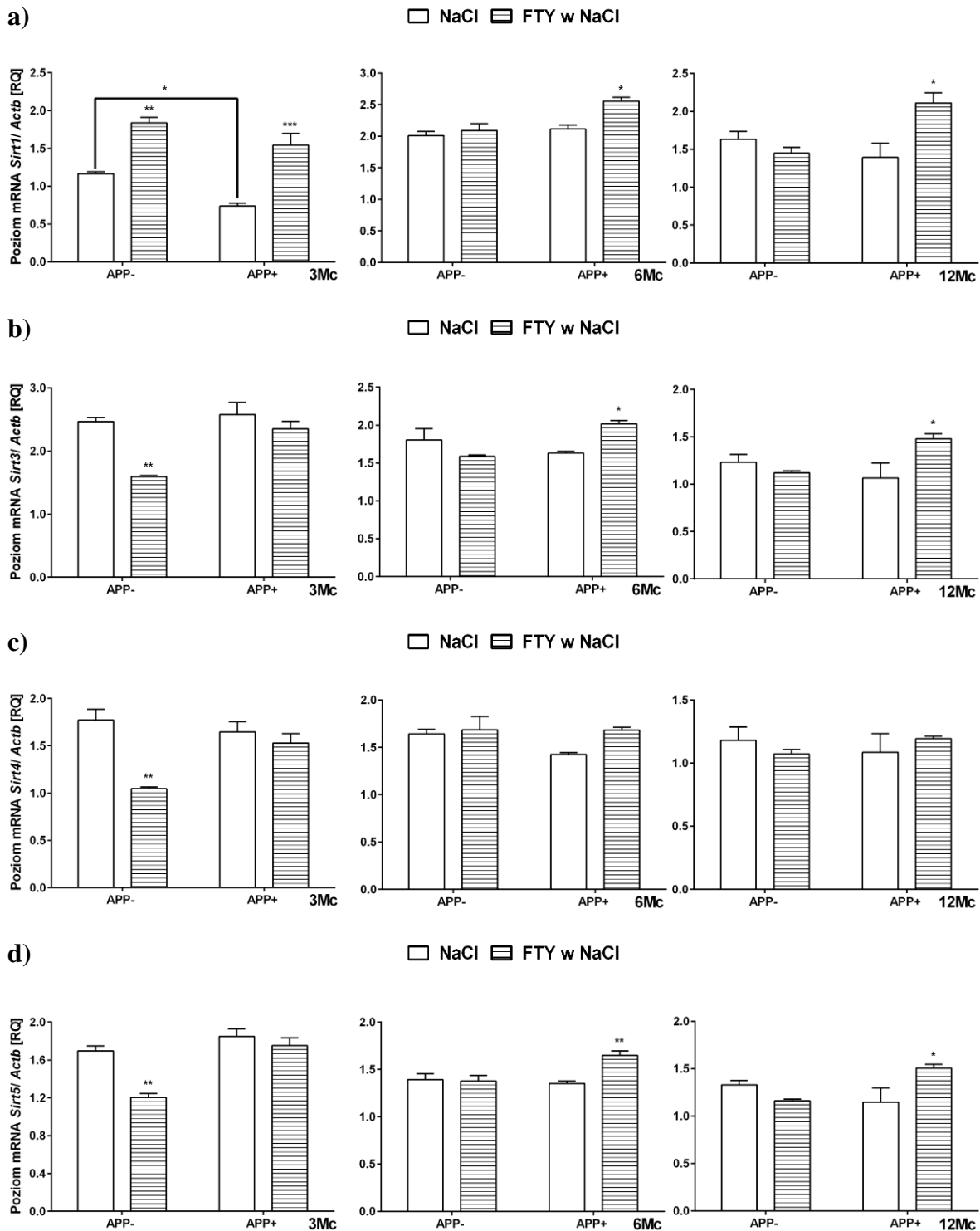
a)



b)

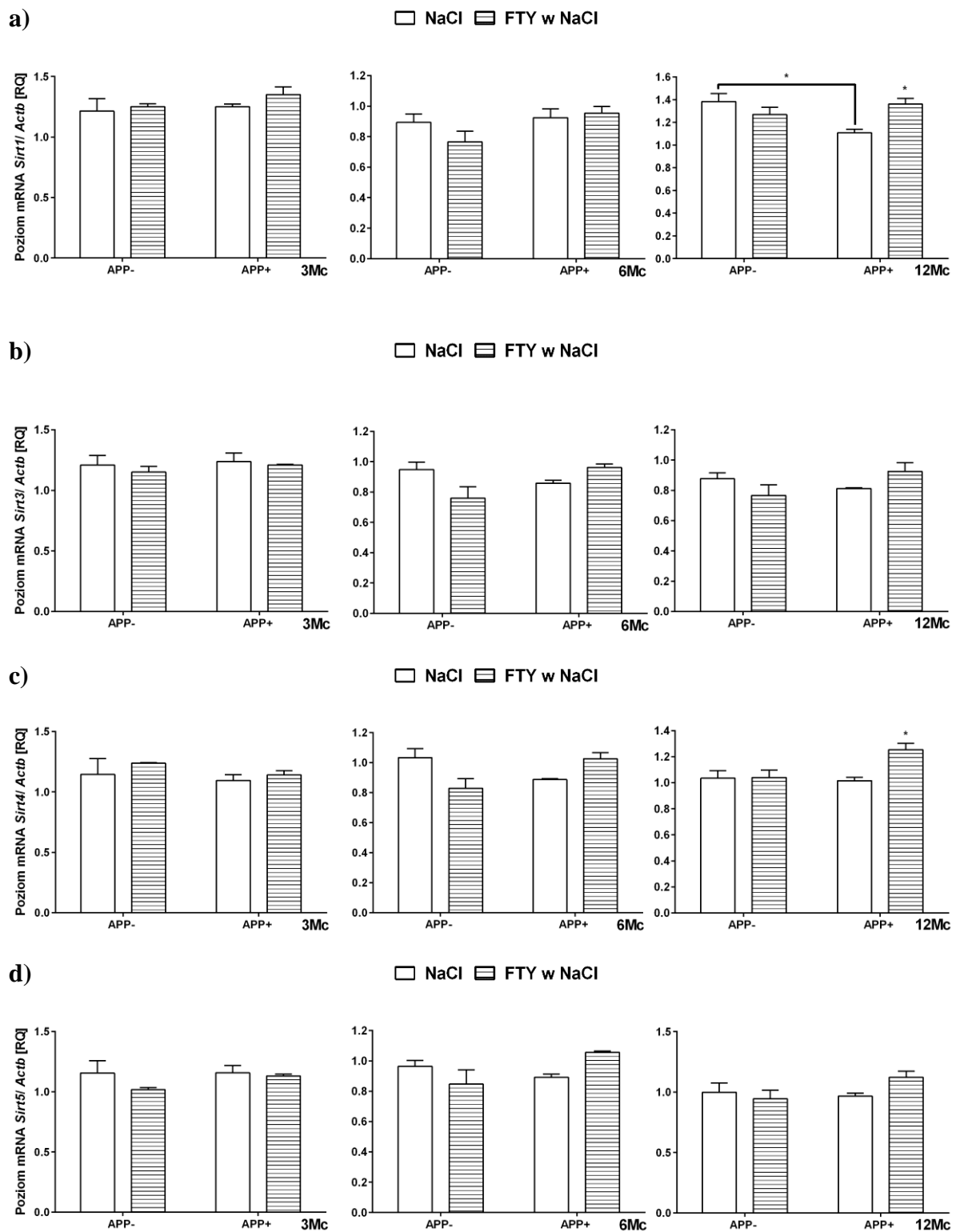


**Rycina 23. Poziom mRNA genu kodującego białko PARP1 w: a) korze mózgowej, b) hipokampie myszy  $APP^-$  i  $APP^+$  w trzech grupach wiekowych (3Mc, 6Mc, 12Mc). \*\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli (NaCl) w obrębie grupy ( $APP^-$  lub  $APP^+$ ) ( $n=3-5$ , dwu-czynnikowa ANOVA z testem post-hoc Tukeya). Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (Actb).**



**Rycina 24. Poziom mRNA genów kodujących SIRTy: a) SIRT1, b) SIRT3, c) SIRT4, d) SIRT5 w korze mózgu myszy APP<sup>-</sup> i APP<sup>+</sup> w trzech grupach wiekowych (3Mc, 6Mc, 12Mc). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli (NaCl) w obrębie grupy (APP<sup>-</sup> lub APP<sup>+</sup>) lub  $\Pi$  - pomiędzy grupami APP<sup>-</sup> vs. APP<sup>+</sup> (n=3-5, dwu-czynnikowa ANOVA z testem post-hoc Tukeya). Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (Actb).**





**Rycina 25. Poziom mRNA genów kodujących SIRTy: a) SIRT1, b) SIRT3, c) SIRT4, d) SIRT5 w hipokampie myszy APP<sup>-</sup> i APP<sup>+</sup> w trzech grupach wiekowych (3Mc, 6Mc, 12Mc). \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli (NaCl) w obrębie grupy (APP<sup>-</sup> lub APP<sup>+</sup>) lub  $\Pi$  - pomiędzy grupami APP<sup>-</sup> vs. APP<sup>+</sup> ( $n=3-5$ , dwu-czynnikowa ANOVA z testem post-hoc Tukeya). Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (Actb).**

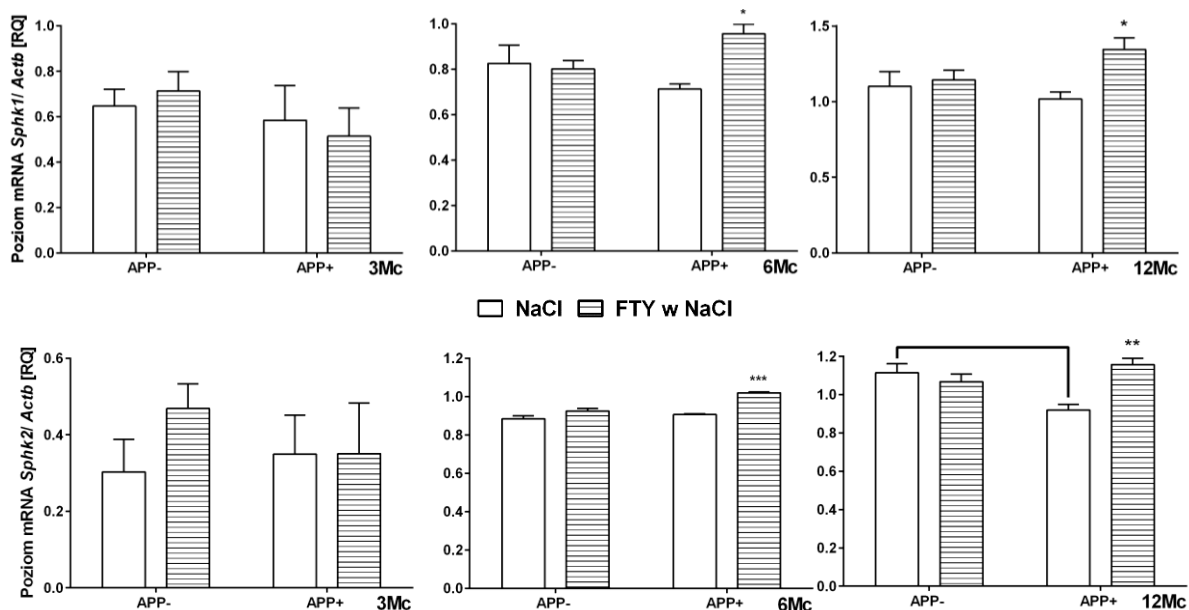
#### 4.2.2. Wpływ mutacji genu APP oraz FTY720 na poziom mRNA kinaz sfingozyny oraz receptorów dla S1P

W celu potwierdzenia zmian w poziomie mRNA genów zaangażowanych w powstawanie S1P oraz przekazanie sygnału zależne od tego fosfolipidu zaobserwowanych w modelu komórkowym, zbadano poziom mRNA na materiale wyizolowanym od myszy FVB/APP<sup>+/-</sup>. Ponadto, zbadano w jaki sposób FTY720 wpływa na poziom mRNA receptorów dla S1P oraz na poziom mRNA kinaz, które biorą udział w powstawaniu S1P.

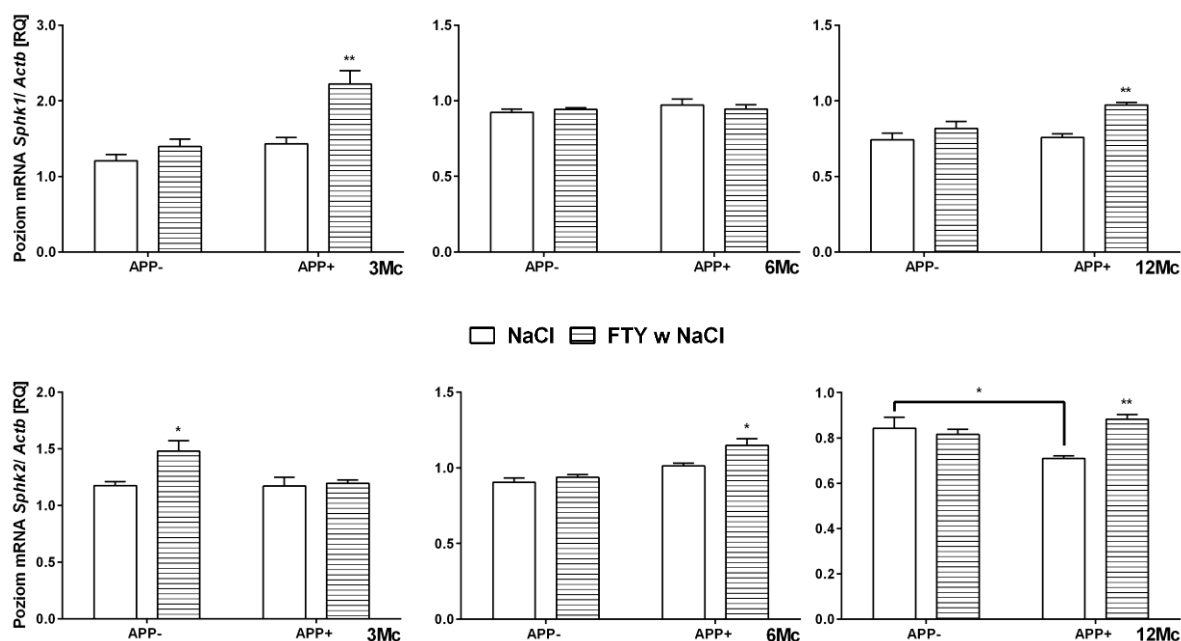
W korze mózgowej myszy 12-miesięcznych APP<sup>+</sup> NaCl zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA dla genu kodującego kinazę sfingozyny 2 (SPHK2) w porównaniu do grupy kontrolnej – myszy APP<sup>-</sup> otrzymujących NaCl (Ryc.26). W przypadku pozostałych grup wiekowych, zaobserwowano tendencję do obniżenia poziomu mRNA *Sphk1* u myszy 3- i 6-miesięcznych z mutacją genu APP (Ryc.26). Analiza poziomu mRNA w hipokampie wykazała podobnie jak w korze mózgowej znamienne obniżenie poziomu mRNA *Sphk2* u myszy 12-miesięcznych APP<sup>+</sup> (Ryc.27).

Następnie zbadano poziom mRNA receptorów dla S1P. Wykazano, że mutacja genu APP istotnie obniża poziom mRNA *Slpr1*, genu kodującego receptor 1 dla S1P w korze mózgowej myszy 12-miesięcznych APP<sup>+</sup> (Ryc.28). Natomiast w przypadku receptora 3 w korze mózgowej wykazano wzrost poziomu mRNA *Slpr3* u myszy APP<sup>+</sup> 3- i 6-miesięcznych (Ryc.28). Ponadto, w hipokampie myszy 6- i 12-miesięcznych APP<sup>+</sup> stwierdzono istotne obniżenie poziomu mRNA *Slpr3* w porównaniu do myszy kontrolnych APP<sup>-</sup> (Ryc.29).

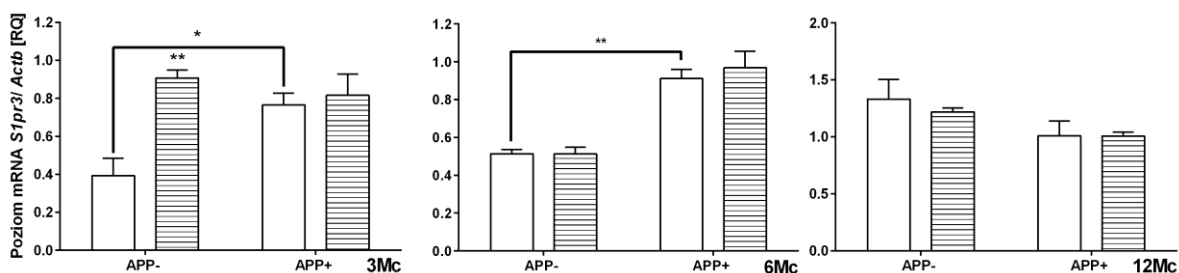
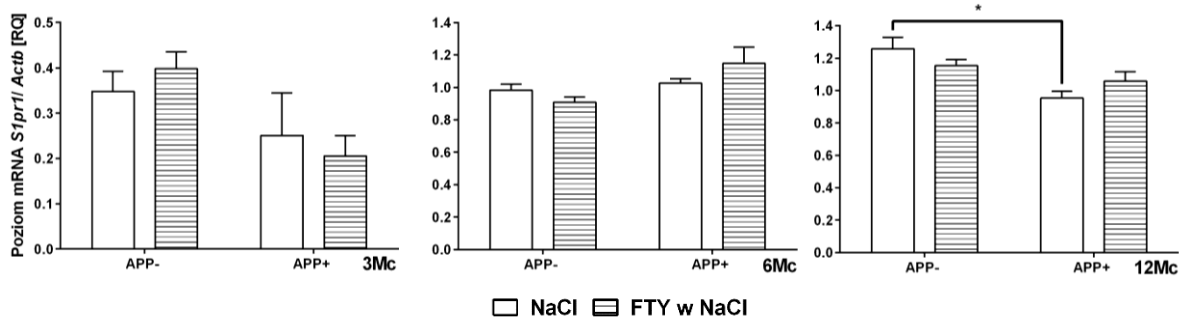
Dootrzewnowe podanie FTY720/fingolimodu spowodowało znamienne wzrost poziomu mRNA dla kinazy SPHK1 i 2 w korze mózgowej zwierząt 6- i 12-miesięcznych APP<sup>+</sup> w porównaniu do kontroli – APP<sup>+</sup> NaCl (Ryc.26). Ponadto, wzrost poziomu mRNA po FTY720 był obserwowany dla obu tych genów w hipokampie myszy 12 -miesięcznych (Ryc.27). Dodatkowo wykazano wzrost poziomu mRNA *Sphk2* w hipokampie myszy 6-miesięcznych po podaniu FTY720 (Ryc.27). Nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie mRNA *Slpr1* na skutek podania FTY720 zarówno w korze mózgowej, jak i w hipokampie myszy APP<sup>+</sup> (Ryc.28 i 29). Podanie fingolimodu spowodowało przejściowy wzrost poziomu mRNA *Slpr3* w hipokampie myszy 6-miesięcznych APP<sup>+</sup> (Ryc.29).



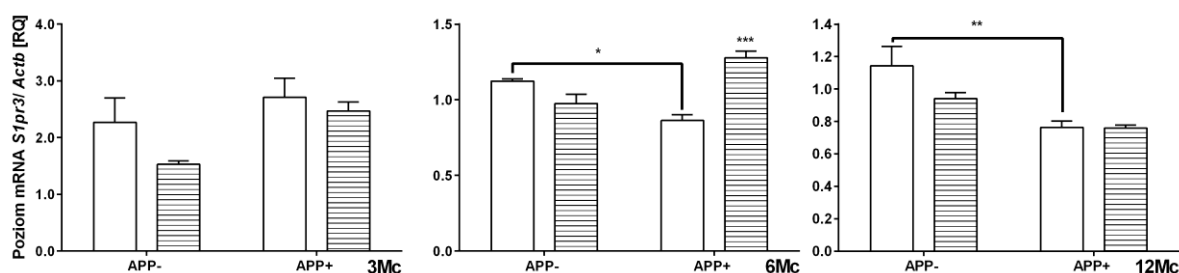
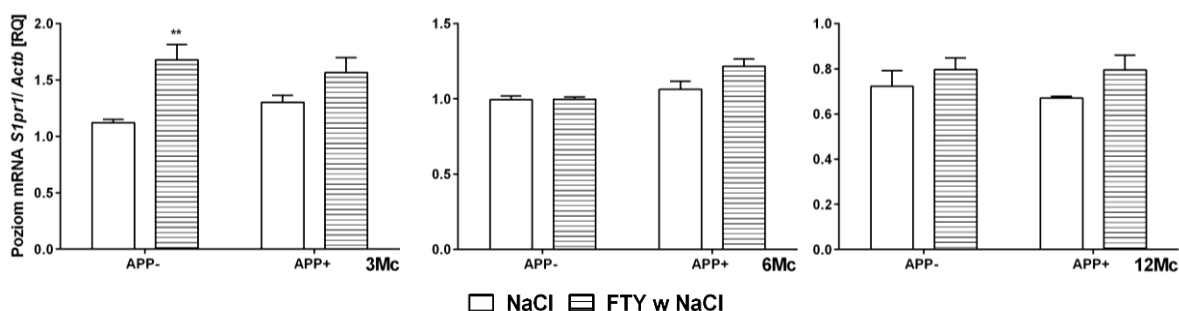
**Rycina 26. Poziom mRNA genu kodującego kinazę sfingozyny: SPHK1 oraz SPHK2 w korze mózgowej myszy APP<sup>-</sup> i APP<sup>+</sup> w trzech grupach wiekowych (3Mc, 6Mc, 12Mc). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli (NaCl) w obrębie grupy (APP<sup>-</sup> lub APP<sup>+</sup>) lub  $\Pi$  - pomiędzy grupami APP<sup>-</sup> vs. APP<sup>+</sup> ( $n=3-5$ , dwu-czynnikowa ANOVA z testem post-hoc Tukeya). Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (Actb).**



**Rycina 27. Poziom mRNA genu kodującego kinazę sfingozyny: SPHK1 oraz SPHK2 w hipokampie myszy APP<sup>-</sup> i APP<sup>+</sup> w trzech grupach wiekowych (3Mc, 6Mc, 12Mc). \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli (NaCl) w obrębie grupy (APP<sup>-</sup> lub APP<sup>+</sup>) lub  $\Pi$  - pomiędzy grupami APP<sup>-</sup> vs. APP<sup>+</sup> ( $n=3-6$ , dwu-czynnikowa ANOVA z testem post-hoc Tukeya). Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (Actb).**



**Rycina 28. Poziom mRNA genów kodujących receptory dla SIP: S1PR1 i S1PR3 w korze mózgowej myszy APP<sup>-</sup> i APP<sup>+</sup> w trzech grupach wiekowych (3Mc, 6Mc, 12Mc). \*\*p < 0,01, \*p < 0,05 – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej (NaCl) w obrębie grupy (APP<sup>-</sup> lub APP<sup>+</sup>) lub Π - pomiędzy grupami APP<sup>-</sup> vs. APP<sup>+</sup> (n=3-5, dwuczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Tukeya). Wyniki normalizowano względem genu kodującego β-aktynę (Actb).**

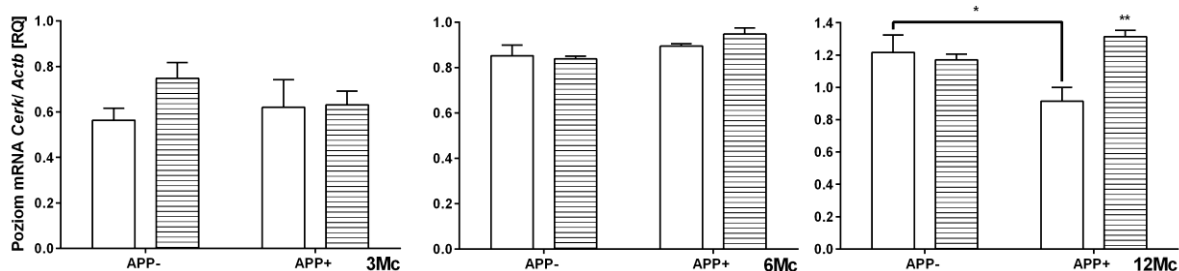


**Rycina 29. Poziom mRNA genów kodujących receptory dla SIP: S1PR1 i S1PR3 w hipokampie myszy APP<sup>-</sup> i APP<sup>+</sup> w trzech grupach wiekowych (3Mc, 6Mc, 12Mc). \*\*\*p < 0,01, \*\*p < 0,01, \*p < 0,05 – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej (NaCl) w obrębie grupy (APP<sup>-</sup> lub APP<sup>+</sup>) lub Π - pomiędzy grupami APP<sup>-</sup> vs. APP<sup>+</sup> (n=3-6, dwuczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Tukeya). Wyniki normalizowano względem genu kodującego β-aktynę (Actb).**

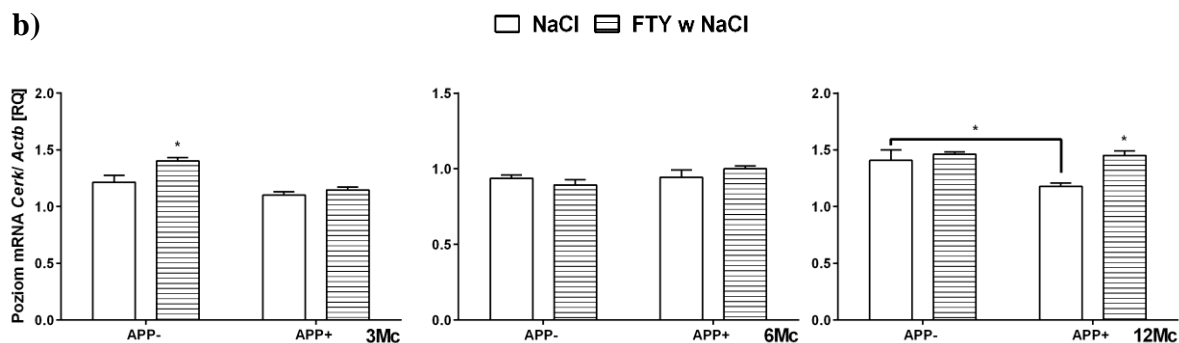
### 4.2.3. Zbadanie wpływu mutacji genu APP oraz FTY720 na poziom mRNA kinazy ceramidu oraz białek pro- i anty-apoptotycznych

Kinaza ceramidu, jest jednym z kluczowych enzymów szlaku metabolizmu bioaktywnych sfingolipidów. Bierze ona udział w przekształcaniu pro-apoptotycznego ceramidu do pro-życiowego ceramido-1-fosforanu. Dlatego też zbadano w mysim modelu ChA w jakim stopniu mutacja genu APP wpływa na poziom mRNA kinazy ceramidu oraz jaki wpływ na poziom mRNA tego genu ma działanie FTY720. Zarówno w korze mózgowej, jak i hipokampie 12-miesięcznych myszy APP<sup>+</sup> zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA *Cerk* (Ryc.30a, b). Podanie dootrzewnowe FTY720 wpłynęło istotnie na wzrost poziomu mRNA *Cerk* zarówno w korze jak i hipokampie myszy 12-miesięcznych APP<sup>+</sup> (Ryc.30a, b).

a)



b)

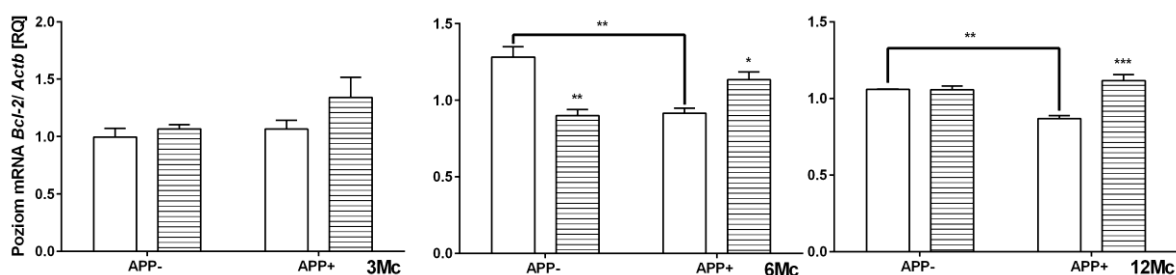


**Rycina 30. Poziom mRNA genu kodującego kinazę ceramidu (CERK) w: a) korze mózgowej, b) hipokampie myszy APP<sup>-</sup> i APP<sup>+</sup> w trzech grupach wiekowych (3Mc, 6Mc, 12Mc). \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli (NaCl) w obrębie grupy (APP<sup>-</sup> lub APP<sup>+</sup>) lub  $\Pi$  - pomiędzy grupami APP<sup>-</sup> vs. APP<sup>+</sup> ( $n=3-6$ , dwu-czynnikowa ANOVA z testem post-hoc Tukeya). Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (Actb).**

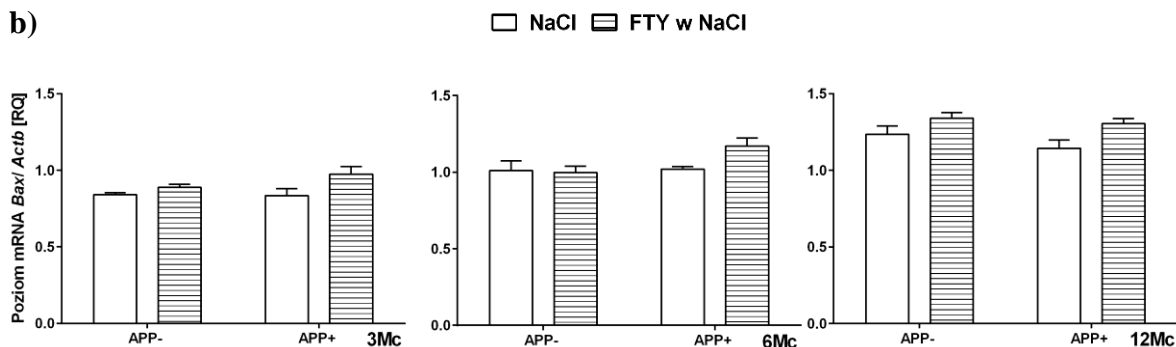
W kolejnym etapie zbadano poziom mRNA dla białek pro- i anty-apoptotycznych z rodziny Bcl-2. W korze mózgowej myszy APP<sup>+</sup> 6- i 12- miesięcznych zaobserwowano istotne obniżenie poziomu mRNA *Bcl-2* kodującego pro-życiowe białko Bcl-2 (Ryc.31a).

Podobną zmianę zaobserwowano w hipokampie myszy 12-miesięcznych APP<sup>+</sup> (Ryc.32a). Ponadto zauważono wzrost poziomu mRNA genu kodującego pro-apoptotyczne białko BAX w hipokampie myszy 3-miesięcznych APP<sup>+</sup> w porównaniu do myszy bez mutacji genu APP<sup>-</sup> (Ryc.32b). W wyniku podania FTY720 stwierdzono istotny wzrost poziomu mRNA *Bcl-2* w korze mózgowej myszy 6- i 12-miesięcznych oraz wzrost poziomu mRNA tego genu w hipokampie myszy 12-miesięcznych APP<sup>+</sup> (Ryc.31a, 32a). FTY720 spowodował również wzrost poziomu mRNA *Bax* w hipokampie myszy APP<sup>+</sup> 12-miesięcznych (Ryc.32b).

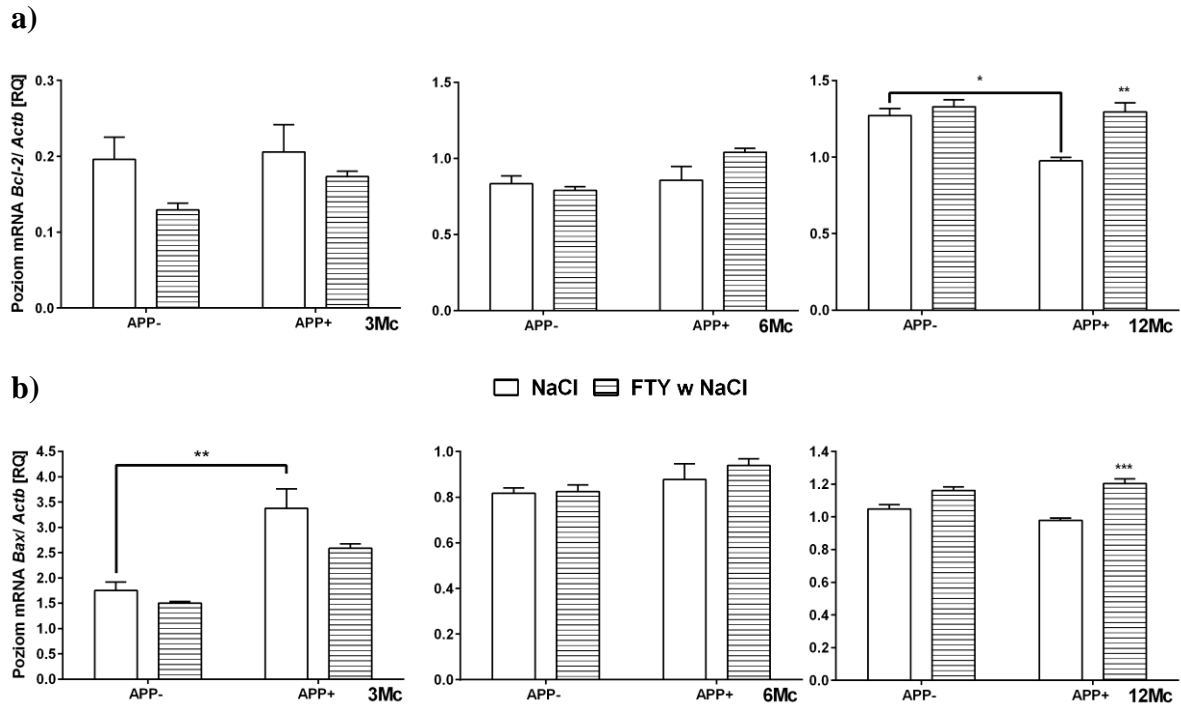
a)



b)



**Rycina 31. Poziom mRNA genów kodujących białka pro- i anty-apoptotyczne: a) Bcl-2; b) BAX w korze mózgowej myszy APP<sup>-</sup> i APP<sup>+</sup> w trzech grupach wiekowych (3Mc, 6Mc, 12Mc). \*\*\* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej (NaCl) w obrębie grupy (APP lub APP<sup>+</sup>) lub  $\Pi$  - pomiędzy grupami APP<sup>-</sup> vs. APP<sup>+</sup> ( $n=3-5$ , dwuczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Tukeya). Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (Actb).**



**Rycina 32. Poziom mRNA genów kodujących białka pro- i anti-apoptotyczne: a) Bcl-2; b) BAX w hipokampie myszy APP<sup>-</sup> i APP<sup>+</sup> w trzech grupach wiekowych (3Mc, 6Mc, 12Mc). \*\*\* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  – różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej (NaCl) w obrębie grupy (APP<sup>-</sup> lub APP<sup>+</sup>) lub  $\Pi$  - pomiędzy grupami APP<sup>-</sup> vs. APP<sup>+</sup> ( $n=3-5$ , dwuczynnikowa ANOVA z testem post-hoc Tukeya). Wyniki normalizowano względem genu kodującego  $\beta$ -aktynę (Actb).**

## 5. Dyskusja

Do głównych zmian neuropatologicznych charakteryzujących chorobę Alzheimera zalicza się sploty neurofibrylarne powstałe w wyniku nadmiernego ufosforylowania białka tau oraz obecność złogów peptydu A $\beta$ . Ostatnie doniesienia naukowe podkreślają istotne znaczenie oligomerów peptydu A $\beta$  w wywoływaniu toksyczności w ChA (podrozdział 1.1). W wyniku nadmiernego odkładania się peptydu A $\beta$  oraz hiperfosforylacji białka tau dochodzi do obumierania neuronów oraz zaniku połączeń synaptycznych, co skutkuje obniżeniem się poziomu neuroprzebieżników, z których największe znaczenie dla układu pamięci ma acetylocholina (Masliah *i wsp.*, 1992). Białkiem mającym również znaczenie w ChA jest  $\alpha$ -synukleina. Białko to ulega nagromadzeniu oraz agregacji/oligomeryzacji, co zaobserwowano *post-mortem* w mózgach osób chorych na ChA (Larson *i wsp.*, 2017). Podczas ChA, ASN może wchodzić we wzajemną interakcję z peptydem A $\beta$  powodując nasilenie swojej agregacji oraz podobnie jak A $\beta$  przyczyniać się do powstania stresu oksydacyjnego. Stres oksydacyjny jest jednym z istotnych zjawisk towarzyszących

chorobom neurodegeneracyjnym, odgrywającym niezwykle ważną rolę w patomechanizmie i patogenezie tych chorób. Jest on następstwem zachwiania równowagi pomiędzy produkcją, a usuwaniem wolnych rodników i może powodować zaburzenia funkcji mitochondriów, enzymów antyoksydacyjnych oraz enzymów uczestniczących w naprawie DNA. Sam mechanizm powstawania stresu wynika ze zdolności A $\beta$  i ASN do oddziaływania z błoną komórkową neuronów, co prowadzi do tworzenia się w niej kanałów jonowych doprowadzając do zaburzenia potencjału błonowego. Powoduje to napływ jonów Ca<sup>2+</sup> do komórki oraz stymulację aktywności NOS m. in. w mitochondriach (Drews *i wsp.*, 2016, Lieberman *i wsp.*, 2017, Parihar *i wsp.*, 2008, Serra-Batiste *i wsp.*, 2016, Wilkaniec *i wsp.*, 2013). Podczas stresu oksydacyjnego wywołanego toksycznością peptydu A $\beta$  może dochodzić do nadmiernego wzrostu aktywności enzymu jądrowego PARP1. Strosznajder *i wsp.* wykazali wyraźnie znamienne wzrost aktywności PARP1 w hipokampie starych szczurów, do którego dochodziło na skutek toksycznego działania egzogenego peptydu A $\beta$ . Badania przeprowadzone przez Kauppinen *i wsp.* na komórkach mikrogleju wykazały, że aktywność PARP1 jest niezbędna do wywoływanej przez A $\beta$  aktywacji pro-zapalnego czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, uwalniania się NO oraz TNF $\alpha$  (Kauppinen *i wsp.*, 2011). Ponadto, długotrwały stres może doprowadzić do aktywacji szlaków śmierci komórki, z których część odbywa się przy udziale enzymu PARP1 (Ba i Garg, 2011, Basello i Scovassi, 2015). PARPy mogą również wpływać na obniżenie aktywności innych enzymów NAD<sup>+</sup>-zależnych – sirtuin, które w większości wykazują działanie neuroprotektoryjne podczas przebiegu chorób neurodegeneracyjnych (Choi i Mostoslavsky, 2014, Julien *i wsp.*, 2009, Min *i wsp.*, 2018, Takayama *i wsp.*, 2009). Zarówno PARPy, jak i SIRTy są ważnymi regulatorami czynników transkrypcyjnych. Do takich czynników można zaliczyć: NF- $\kappa$ B, FoxO, Ku70. W mózgach osób chorych na ChA zaobserwowano zarówno wzrost aktywności PARP1, jak również obniżenie poziomu SIRT1 (Julien *i wsp.*, 2009, Love *i wsp.*, 1999). Do dnia dzisiejszego powstało niewiele prac opisujących interakcję pomiędzy PARPami a SIRTami, jak również obserwuje się wiele rozbieżności w danych dotyczących zmian w poziomie sirtuin mitochondrialnych w mózgach osób chorych na ChA, dlatego należy w dalszym ciągu poszukiwać molekularnych przyczyn ich oddziaływania w patologii ChA (Jęsko *i wsp.*, 2017, Sidorova-Darmos *i wsp.*, 2018).



Jedną z najbardziej toksycznych form peptydu A $\beta$  jest A $\beta$ 1-42 oraz jego oligomery (wstęp - podrozdział 1.1.). Dlatego też, w niniejszej rozprawie, w doświadczeniach użyto A $\beta$ 1-42 w formie oligomerycznej. Wstępna charakterystyka oligomerów potwierdziła ich toksyczność w modelu komórkowym z wykorzystaniem linii komórkowej PC12. Wyniki uzyskane podczas rozdziału elektroforetycznego, jak i testu tioflawinowego, potwierdziły obecność oligomerów, co było zgodne z charakterystyką przeprowadzoną przez inne zespoły badawcze (Cieślik *i wsp.*, 2015, Stine *i wsp.*, 2003, Wilkaniec *i wsp.*, 2018). Użyte w niniejszej dysertacji A $\beta$ 1-42 powodowały obniżenie żywotności komórek o ok. 50%. Obniżenie żywotności komórek PC12 po A $\beta$ 1-42 zaobserwowano również w innych pracach badawczych (Cieślik *i wsp.*, 2015, Czapski *i wsp.*, 2018). Ponadto, w tych samych pracach zaobserwowano ok. 250% wzrost poziomu wolnych rodników po użyciu A $\beta$ 1-42, którym towarzyszyło obniżenie poziomu ekspresji genów kodujących białka antyoksydacyjne, takich jak *Sod1*, *Sod2*, *Gsr*, *Gpx1* i *Gpx4* (Cieślik *i wsp.*, 2015, Czapski *i wsp.*, 2018). Zjawisko to może tłumaczyć przyczynę obniżenia żywotności komórek po zastosowaniu A $\beta$ 1-42, do którego może dochodzić na skutek stresu oksydacyjnego.

Sam peptyd A $\beta$ , zanim ulegnie oligomeryzacji musi powstać w komórkach na drodze amyloidogennej przy udziale dwóch sekretaz:  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretazy. Wykazano, że endogenne peptydy A $\beta$  powodują wzrost poziomu mRNA *Bace1*, kodującego  $\beta$ -sekretazę oraz genów *Psen1* i *Psen2*, kodujących podjednostki  $\gamma$ -sekretazy w przypadku linii APPwt. Wykazano również wzrost poziomu mRNA *Psen2* w komórkach APPsw. W komórkowym modelu toksyczności A $\beta$ 1-42 zaobserwowano podobnie jak w linii transfekowanej wzrost poziomu mRNA *Bace1* oraz *Psen1* i *Psen2*. Wiele prac wskazuje na zaburzenia w działaniu oraz wzrost poziomu ekspresji i aktywności  $\beta$ -sekretazy podczas ChA (Li *i wsp.*, 2004, Yang *i wsp.*, 2003). Li *i wsp.* zaobserwowali w korze mózgowej pacjentów z SAD podwyższony poziom mRNA genu kodującego białko BACE1 (Li *i wsp.*, 2004). Ten sam zespół zaobserwował, że w komórkach linii HEK293 transfekowanych genem APP z podwójną mutacją szwedzką dochodzi do wzrostu aktywności białka BACE1 przy jednoczesnym braku zmian w poziomie mRNA genu kodującego to białko. Brak zmian w poziomie mRNA *Bace1* w linii APPsw, został również zaobserwowany w niniejszej rozprawie doktorskiej. Dodatkowo zespół Li *i wsp.* wykazał wzrost poziomu aktywności BACE1 w komórkach APPwt. Do ciekawych obserwacji w przypadku poziomu i aktywności białka BACE1 doszedł zespół Stokley'a *i wsp.* Wykazali oni, że poziom białka BACE1 ulega zmniejszeniu

w korze mózgu osób chorych na ChA, z tym że zjawisko to obserwowane jest dopiero w późnych stadiach choroby (V i VII wg. Braaka) i jest ono skorelowane ze zmianami neurofibrylarnymi zachodzącymi w mózgu (Stockley *i wsp.*, 2006). Sytuacja ta może doprowadzić do wzrostu ilości splotów neurofibrylarnych oraz do zmniejszenia się ilości synaps, co można wiązać ze spadkiem poziomu BACE1, ponieważ synapsy stanowią ważne miejsce dla powstawania peptydu A $\beta$  (Cirrito *i wsp.*, 2005, Kamenetz *i wsp.*, 2003). Tamagano *i wsp.* zaobserwowali, że w wyniku stresu oksydacyjnego wywołanego przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lub 4-hydroksynonenal może dochodzić do wzrostu aktywności  $\gamma$ -sekreazy, jak również do wzrostu poziomu mRNA genów *Psen1* i *Psen2*, w konsekwencji doprowadzając do zwiększenia się powstawania A $\beta$ <sub>40</sub> i A $\beta$ <sub>42</sub> (Tamagno *i wsp.*, 2008). Zmiany w poziomie mRNA genów *Psen1* i *Psen2*, które zaobserwowano w niniejszej rozprawie mogą sugerować, że zarówno egzogenne A $\beta$ <sub>1-42</sub> jak i endogenne peptydy A $\beta$  mogą brać udział w procesach powstawania dodatkowych ilości peptydu A $\beta$ .

W dalszej części pracy zbadano wpływ ASNo na poziom mRNA genów związanych z metabolizmem białka APP. Zarówno A $\beta$ , jak i ASNo wykazują pomiędzy sobą wiele podobieństw i mogą występować zarówno w otępieniu z ciałami Lewy'go, jak i ChA (patrz podrozdział 1.1.). Zauważono, że 24-godzinna inkubacja komórek PC12 z ASNo powodowała obniżenie poziomu mRNA genu kodującego  $\alpha$ -sekreazę (ADAM10). Białko ADAM10 zaangażowane jest w ścieżkę nieamyloidogenną metabolizmu APP przez co przyczynia się do zmniejszenia powstawania peptydu A $\beta$  (Yuan *i wsp.*, 2017). Abid *i wsp.* zaobserwował u myszy transgeniczných z mutacją szwedzką genu APP obniżenie ekspresji genu *Adam10*, które ulegało nasileniu wraz ze wzrostem wieku badanych myszy (Abid *i wsp.*, 2019). Najnowsze, aczkolwiek nieliczne badania wskazują na istotne obniżenie poziomu mRNA oraz białka w mózgu lub w płynie mózgowo-rdzeniowym osób chorych na ChA (Endres i Deller, 2017, Sogorb-Esteve *i wsp.*, 2018). Efekt ten nie został zaobserwowany w przypadku komórkowych modeli toksyczności A $\beta$ . Ponadto, ASN istotnie obniżała poziom mRNA genów kodujących metaloproteinazę 2 i 10. Obniżenie poziomu mRNA *Adam10*, jak również niektórych metaloproteinaz może przyczynić się do zwiększonej produkcji A $\beta$ . Roberts *i wsp.* udowodnili, że zahamowanie aktywności  $\alpha$ -sekreazy powoduje w komórkach transfekowanych genem ASN zwiększenie powstawania peptydu A $\beta$ <sub>40</sub> oraz A $\beta$ <sub>42</sub> (Roberts *i wsp.*, 2017). Ponadto, spadek ekspresji MMP zaangażowanych w degradację A $\beta$  może skutkować zwiększoną ilością powstałego

peptydu, zwłaszcza w sytuacji, kiedy toksyczność A $\beta$  oraz ASN może doprowadzać do zaburzenia funkcjonowania proteasomów (Lindersson *i wsp.*, 2004, Tseng *i wsp.*, 2008). Uzyskane wyniki mogą sugerować, że podczas toksycznego oddziaływania ASN może dochodzić w komórce do zmian molekularnych, które doprowadzają do zwiększenia powstawania peptydu A $\beta$ .

Zarówno wzrost poziomu A $\beta$ , jak też ASN może doprowadzić do powstania stresu oksydacyjnego, co z kolei może powodować liczne uszkodzenia białek oraz DNA i zaburzać pracę enzymów uczestniczących w naprawie DNA. Strosznajder i Banasik wykazali w modelu komórkowym linii PC12 wzrost aktywności enzymatycznej PARP1 na skutek działania egzogennej peptydu A $\beta$  (Strosznajder i Banasik, 2000). Aktywność enzymu PARP1 ulega również zwiększeniu w mózgu osób chorych na ChA w badaniach *post-mortem* (Love *i wsp.*, 1999). Podobne zmiany zostały również zaobserwowane w niniejszej pracy. Zarówno podane egzogenicznie A $\beta$ , jak i endogenne peptydy A $\beta$  w komórkach transfekowanych genem APP wpływały na zwiększenie się poziomu mRNA genu kodującego białko PARP1 oraz genu kodującego PARP2 w przypadku linii komórkowej APPsw. Wzrost poziomu mRNA *Parp1* nie był natomiast obserwowany w linii komórkowej traktowanej ASN, ale w porównaniu do modelu toksyczności A $\beta$  w tym przypadku zaobserwowano wzrost poziomu mRNA genów *Parp2* i *Parp3*, kodujących inne PARPy zaangażowane w naprawę DNA. Podobną obserwację opisano w pracy Adamczyk i Kaźmierczak, gdzie wykazano brak zmian w poziomie białka PARP1 po traktowaniu skrawków mózgu szczura egzogeniczną ASN. Autorki zaobserwowały również spadek aktywności tego enzymu po traktowaniu ASN, który został zniesiony po użyciu inhibitora konstytutywnych izoform NOS (Adamczyk i Kaźmierczak, 2009). Do innych obserwacji doszedł zespół Kam *i wsp.*, który zaobserwował zależny od uszkodzenia DNA wywołanego przez NO $^{\bullet}$  wzrost aktywacji enzymu PARP1 na skutek działania włókien ASN ( *$\alpha$ -syn pre-formed fibrils*) w pierwotnej hodowli neuronów oraz w mózgu myszy po dokomorowym podaniu ASN (Kam *i wsp.*, 2018). Ten sam zespół zaobserwował wzrost poziomu PAR w mózgu i płynie mózgowo-rdzeniowym u osób chorych na ChP. Na podstawie powyżej przedstawionych wyników wydaje się, że wpływ ASN na aktywność/ekspresję enzymu PARP1 jest zależny od formy ASN (monomery, oligomery, włókna).

W przebiegu ChA dochodzi do nadreaktywności PARP-1, co może powodować aktywację procesów zapalnych oraz śmierć komórki. Niektóre z badań wskazują

na protekcyjne działanie inhibitorów PARP podczas toksyczności peptydów A $\beta$  (Turunc Bayrakdar *i wsp.*, 2014). Dlatego też, w niniejszej rozprawie sprawdzono w modelu toksyczności A $\beta$ 1-42, jak na zmiany w poziomie mRNA genów kodujących enzymy zaangażowane w powstawanie peptydu A $\beta$  wpływa zahamowanie aktywności PARP1. Wykazano, że użycie samego inhibitora PJ-34 powoduje wzrost poziomu mRNA *Psen1* i *Psen2*. Natomiast użycie PJ-34 podczas toksyczności A $\beta$  wpływa na wzrost poziomu mRNA wszystkich przebadanych genów kodujących sekretazy oraz ich podjednostki. Uzyskane wyniki mogą sugerować wystąpienie mechanizmu błędnego koła pomiędzy metabolizmem A $\beta$  i APP, który może być odpowiedzialny za powstawanie dużych ilości peptydu A $\beta$  w komórce. Liczne badania wskazują, że podczas stresu oksydacyjnego wywołanego toksycznością peptydu A $\beta$  następuje aktywacja i wzrost ekspresji  $\beta$ -sekretazy (Borghini *i wsp.*, 2007, Mouton-Liger *i wsp.*, 2012, Tamagno *i wsp.*, 2002, Tong *i wsp.*, 2005). Przypuszcza się, że do aktywacji BACE1 dochodzi podczas procesów zapalnych na skutek wzrostu aktywności kinazy JNK oraz czynnika transkrypcyjnego AP-1 (Chami i Checler, 2012). Oprócz ChA, zjawisko to może być obserwowane w innych patologich, takich jak ostrym uszkodzeniu mózgu (*acute brain injury*), niedokrwieniu oraz ostrych urazach głowy (*acute head trauma*) (Tabaton *i wsp.*, 2010).

Jak uprzednio wspomniano, stres oksydacyjny wywołany toksycznością A $\beta$  może doprowadzić do zaburzeń funkcji mitochondriów, enzymów antyoksydacyjnych oraz enzymów uczestniczących w naprawie DNA. Dlatego też zbadano w modelach toksyczności peptydu A $\beta$  oraz białka ASN poziom mRNA genów kodujących enzymy NAD<sup>+</sup>- zależne: PARPy i SIRTy. W obu modelach wykazano istotne obniżenie poziomu mRNA *Sirt1*. Co więcej, w zwierzęcym modelu ChA, który charakteryzuje się zwiększonym poziomem peptydu A $\beta$  1-42 i zaburzonym stosunkiem A $\beta$  1-42/A $\beta$  1-40, zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA tego genu zarówno w korze mózgowej myszy 3-miesięcznych, jak i hipokampie myszy 12-miesięcznych. SIRT1 zaangażowana jest w wiele procesów, kluczowych z punktu widzenia prawidłowego funkcjonowania komórki, jak również może się ona przyczyniać do zmniejszenia ilości peptydu A $\beta$  (wstęp - podrozdział 1.2.2.). W związku z powyższym zaobserwowane w dysertacji obniżenie poziomu mRNA *Sirt1* w mózgu myszy APP<sup>+</sup> 3- i 12-miesięcznych może wskazywać na promowanie amyloidogennej ścieżki metabolizmu APP. Warto również podkreślić, że obniżenie poziomu ekspresji genu/białka SIRT1 oraz jej aktywności obserwowane jest w mózgu osób chorych na ChA i ChP (Cao *i wsp.*, 2018, Julien *i wsp.*, 2009, Singh *i wsp.*, 2017).

Oprócz SIRT1 w regulację biogenezy mitochondrialnej oraz ochrony antyoksydacyjnej mogą też być zaangażowane sirtuiny mitochondrialne (podrozdział 1.2.2). W niniejszej rozprawie doktorskiej zaobserwowano, że endogenne peptydy A $\beta$  powodują wzrost poziomu mRNA *Sirt3*. Zauważono również tendencję do zwiększenia się poziomu mRNA tego genu w komórkach traktowanych egzogennym peptydem A $\beta$ . Wzrost ten był również obserwowany w komórkach traktowanych ASN. Zjawisko to występujące w 3 użytych modelach może tłumaczyć podobny mechanizm (w tym przypadku wzrost stresu oksydacyjnego wywołany toksycznością zagregowanych peptydów), inicjujący ochronę antyoksydacyjną (z udziałem SIRT3), który jak widać po obniżonej żywotności komórek nie jest w stanie sobie poradzić z narastającą ilością wolnych rodników. Wzrost poziomu mRNA genu kodującego białko SIRT3 został również zaobserwowany przez Weir i wsp. w hipokampie myszy z mutacją typu Indiana (PDAPP) oraz w korze mózgu ludzi chorych na ChA (Weir *i wsp.*, 2012). Dodatkowo w niniejszej rozprawie zauważono, że zarówno w wyniku toksyczności ASNo, jak i A $\beta$  może dochodzić do wzrostu poziomu mRNA *Sirt5* oraz *Sirt4* w przypadku modelu A $\beta$ . Dane te korelują z wynikami uzyskanymi przez zespół Lutz i wsp. gdzie w hipokampach osób chorych na ChA obserwowano wzrost ekspresji białka SIRT5 wraz z postępem choroby (Lutz *i wsp.*, 2014). Co ciekawe, w niniejszej pracy doktorskiej poziom mRNA *Sirt5* uległ znacznemu obniżeniu w przypadku linii APPsw. Wydaje się, że zmiana ta może być zależna od analizowanego modelu toksyczności A $\beta$  (APPsw).

Podczas stresu oksydacyjnego/genotoksycznego może dochodzić do zahamowania aktywności sirtuin wynikającego z nadmiernego pobudzenia aktywności enzymu PARP1 (wstęp – podrozdział 1.2). Dane literaturowe pokazują również, że acetylacja PARP1 doprowadza do wzrostu jej aktywności, natomiast deacetylacja hamuje zależną od PARP1 aktywację genów odpowiedzialnych za procesy zapalne np. czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B i AP-1 (Hassa *i wsp.*, 2005, Mishra i Kowluru, 2017, Rajamohan *i wsp.*, 2009). Verdone i wsp. w badaniach z użyciem inhibitorów PARP zaobserwowali obniżenie ekspresji genów: *p300* i *Pcaf*, kodujących dwa kluczowe enzymy biorące udział w acetylacji histonów, co również skutkowało obniżeniem poziomu acetylacji lizyny na histonach H3 i H4. Dodatkowo, autorzy zauważyli globalny wzrost aktywności enzymatycznej deacetylaz po użyciu PJ-34 (Verdone *i wsp.*, 2015). Zaobserwowane zmiany mogą wskazywać na aktywny udział PARP1 w regulacji acetylaz, jak również enzymów deacetylujących histony, do których należą m. in. sirtuiny. Dlatego też w niniejszej pracy

doktorskiej zbadano w komórkowym modelu toksyczności A $\beta$  w jakim stopniu poziom mRNA PARPów i SIRTuin zależy od aktywności enzymu PARP. Zauważono, co ważne wzrost poziomu mRNA *Sirt1* po zahamowaniu aktywności enzymu PARP. Wzrost ten był obserwowany zarówno w warunkach toksyczności A $\beta$ , jak i po użyciu samego PJ-34. SIRT1, podobnie jak sirtuiny mitochondrialne może wpływać na biogenezę mitochondrialną, jak również na aktywację enzymów antyoksydacyjnych. Lai i wsp. wykazali zależną od nadmiernej aktywności PARP1 dysfunkcję mitochondriów do której dochodzi w mózgu podczas stanu padaczkowego (Lai i wsp., 2017). Udowodnili oni, że podanie PJ-34 szczurom po iniekcji kwasu kainowego pomogło w zwiększeniu wewnątrzkomórkowej puli NAD<sup>+</sup> jak również poprawiało zależną od NAD<sup>+</sup> mitochondrialną wydolność oddechową (RCR, *respiratory control ratio*), co powodowało wzrost przeżycia komórek neuronalnych w sektorze CA1 hipokampa (Lai i wsp., 2017). Mając na uwadze, że PARP1 jest również modulatorem aktywności sirtuin, można przypuszczać że poprawa funkcji mitochondriów może być również zależna od SIRT1, której wzrost poziomu mRNA na skutek działania PJ-34 zaobserwowano w niniejszej rozprawie. W przeprowadzonych badaniach nie zaobserwowano zmian w poziomie mRNA *Sirt3* zarówno po samym traktowaniu komórek PJ-34, jak i po traktowaniu PJ-34+A $\beta$ . Brak zmian w poziomie mRNA tego genu może wynikać z faktu, iż PARP1 może być zaangażowany w aktywację SIRT3 w warunkach stresu oksydacyjnego i deficytu NAD<sup>+</sup>, co zostało zaobserwowane w pracy Kim i wsp (Kim i wsp., 2011). Dodatkowo w niniejszej pracy zaobserwowano, że zahamowanie aktywności PARP wpłynęło również na wzrost poziomu mRNA *Sirt4*. SIRT4, podobnie jak PARP1, może brać udział w reakcji ADP-rybozylacji. Mogłoby to wskazywać na zastępowanie funkcji PARP1 podczas zahamowania jego aktywności przez inne PARPy, jak również sirtuiny zdolne do przeprowadzania tego typu reakcji, takie jak SIRT4 czy SIRT6 (Liszt i wsp., 2005, Tan i wsp., 2015). Kolejną zmianą wynikającą z użycia PJ-34 był wzrost poziomu mRNA *Parp3*, który był również obserwowany podczas toksyczności A $\beta$ . PARP3 podobnie jak PARP1 i PARP2 zaangażowany jest w mechanizmy naprawy DNA (Beck i wsp., 2014, Boehler i wsp., 2011). Zaobserwowane zmiany mogą wskazywać na tendencję do zastępowania funkcji PARP1 w naprawie DNA przez inne enzymy NAD<sup>+</sup>- zależne, takie jak SIRT1, czy PARP3, podczas gdy dochodzi do zahamowania aktywności PARP1.

Dane literaturowe wskazują na istotną rolę bioaktywnych sfingolipidów (m.in. ceramidu) w ChA. W stanach patologicznych ceramidy podobnie jak PARP1 mogą pełnić rolę przełącznika pomiędzy przeżyciem a śmiercią komórki. Ponadto oba te związki mogą doprowadzać do aktywacji licznych czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych m.in. za wzrost procesów zapalnych (podrozdział 1.2.1 oraz 1.3.1). Ceramidy mogą również wpływać na wzrost aktywności enzymu PARP1. Czubowicz i Strosznajder w swoich badaniach zaobserwowali, że podczas traktowania komórek SH-SY5Y ceramidem dochodzi do wzrostu aktywności PARP1 oraz do wzrostu immunoreaktywności białka poli(ADP-rybozy) (Czubowicz i Strosznajder, 2014). Obu tym obserwacjom towarzyszył wzrost poziomu wolnych rodników, wzrost poziomu mRNA genów kodujących białka proapoptotyczne oraz obniżenie poziomu mRNA *BCL-2*. Próba zahamowania aktywności PARP skutkowałą zbliżeniem się analizowanych parametrów do wartości wyjściowych oraz wzrostu żywotności komórek, co może sugerować wspólny udział obu tych związków w procesach związanych ze śmiercią komórki (Czubowicz i Strosznajder, 2014). Ayasolla i wsp. wykazali, że podczas toksyczności peptydu A $\beta$  może dojść do zależnego od ceramidów wzrostu poziomu białka iNOS, co doprowadziło do zwiększonej produkcji NO (Ayasolla i wsp., 2004). Zarówno wzrost poziomu ceramidów, jak również wzrost ekspresji enzymów zaangażowanych w jego powstawanie, obserwowany jest w mózgach osób chorych na ChA (Bandaru i wsp., 2009, Cutler i wsp., 2004, Czubowicz i wsp., 2019, He i wsp., 2010, Katsel i wsp., 2007). Dlatego też w ostatnich latach bioaktywne sfingolipidy zaczęły przyciągać uwagę badaczy zajmujących się poznawaniem przyczyn, które doprowadzają do rozwoju ChA.

Sfingolipidy stanowią ważny składnik strukturalny błony komórkowej a produkty powstałe w wyniku ich metabolizmu mają istotne znaczenie w regulacji procesów związanych z prawidłowym funkcjonowaniem komórki. Na uwagę zwraca fakt, iż są one również częścią składową tratw lipidowych. W tratwach tych zawarta jest część białka APP, która ulega proteolitycznemu cięciu z udziałem sekretaz amyloidogennych. Do grupy bioaktywnych sfingolipidów mogących mieć znaczenie w patomechanizmie ChA można zaliczyć oprócz uprzednio wymienionego ceramidu: ceramido-1-fosforan (C1P), sfingozynę oraz sfingozyno-1-fosforan (S1P). Liczne badania wskazują na zaangażowanie bioaktywnych sfingolipidów w metabolizm peptydu A $\beta$ , jak również na aktywną rolę w procesach związanych ze śmiercią lub przeżyciem komórki. Ponadto, w mózgach osób chorych na ChA zaobserwowano zaburzenia proporcji pomiędzy ceramidem a S1P (Couttas

*i wsp.*, 2018, He *i wsp.*, 2010). Couttas *i wsp.* zaobserwowali, że w ChA dochodzi do obniżenia się poziomu S1P oraz aktywności SPHK1 w hipokampie, które pogłębia się wraz ze wzrastającym stadium Braaka (Couttas *i wsp.*, 2014). Autorzy zwracają uwagę na fakt, że wzrost poziomu ceramidu oraz towarzyszące mu obniżenie poziomu S1P może się przyczyniać do pro-neurodegeneracyjnego fenotypu w mózgu, mającego istotne znaczenie m. in. w ChA. Badania przeprowadzone przez Cieślik *i wsp.* w 2015r. z użyciem komórek PC12 oraz A $\beta$ 1-42 wykazały wzrost aktywności kinazy sfingozyny po 24-godzinach traktowania. Po 96-godzinach wzrost ten ulegał znacznemu obniżeniu. Podobną zmianę zaobserwowano w przypadku poziomu mRNA genu kodującego kinazę SPHK1. Nie stwierdzono natomiast żadnych zmian w przypadku genu *Sphk2* (Cieślik *i wsp.*, 2015). Gomez-Brouchet *i wsp.* również zaobserwowali obniżenie się aktywności SPHK1 podczas traktowania komórek SH-SY5Y A $\beta$ 25-35. Ponadto, obniżeniu poziomu S1P towarzyszyło zwiększenie się proporcji ceramidu do S1P, co prowadziło do wzrostu obumierania komórek (Gomez-Brouchet *i wsp.*, 2007). Dane te mogą sugerować, że zahamowanie aktywności SPHK1 wywołane podaniem oligomerów A $\beta$  może być jednym z czynników związanych z jego toksycznością. Dlatego też w dalszej części pracy sprawdzono jaki wpływ na poziom mRNA kinazy sfingozyny mają endogenne peptydy A $\beta$  w komórkach PC12 transfekowanych genem APP. Zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA *Sphk2* oraz obniżenie poziomu mRNA genu kodującego receptor 1 S1P. Ponadto obniżeniu poziomu mRNA uległ gen *Cerk*, który koduje enzym biorący udział w fosforylacji ceramidu do C1P. Zaobserwowane obniżenie poziomu mRNA *Sphk2* oraz *Slpr1* było podobne do zmian zaobserwowanych w komórkach PC12 APPwt i APPsw kilka lat wcześniej w pracy Gąssowskiej *i wsp.*. Ponadto w tej samej pracy zaobserwowano obniżenie aktywności SPHK1/2 oraz poziomu białka SPHK1 (Gąssowska *i wsp.*, 2014a). Podobne zmiany zaobserwowano w niniejszej rozprawie w zwierzęcym modelu ChA, gdzie u myszy 12-miesięcznych APP<sup>+</sup> zauważono obniżenie się poziomu mRNA *Sphk2* oraz *Slpr1*. U zwierząt tych zaobserwowano również zależną od wieku oraz lokalizacji w mózgu zmianę poziomu mRNA *Slpr3*, który ulegał wzrostowi w korze mózgowej myszy 3- i 6-miesięcznych, a z kolei ulegał on obniżeniu w hipokampie myszy 6- i 12-miesięcznych. Oprócz obniżenia poziomu mRNA genów związanych z powstawaniem i działaniem S1P, zaobserwowano, co najważniejsze, obniżenie poziomu mRNA genu kodującego CERK u myszy 12-miesięcznych, które miało miejsce zarówno w korze mózgu jak i hipokampie. Wynik ten może wskazywać na zaburzenie równowagi pomiędzy ilością ceramidu, a jego pro-życiową formą C1P.



Aktywność metaboliczna bioaktywnych sfingolipidów wiąże się nieodłącznie z regulacją procesów przeżycia komórki. Dlatego też sprawdzono w jakim stopniu zmiany w poziomie ich mRNA są powiązane z genami kodującymi białka pro- i anty-apoptotyczne. U myszy APP<sup>+</sup> zaobserwowano istotne obniżenie poziomu mRNA genu kodującego białko Bcl-2. Spadek ten został również zaobserwowany w przypadku linii komórkowych transfekowanych genem APP, co może wskazywać na aktywną rolę peptydu A $\beta$  w obniżaniu przeżywalności komórek. Oprócz obniżenia poziomu mRNA dla pro-życiowego białka Bcl-2 w hipokampie myszy 3-miesięcznych zauważono wzrost poziomu mRNA dla genu kodującego pro-apoptotyczne białko BAX. Wyniki otrzymane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej ewidentnie wskazują na zaburzenia w poziomie mRNA genów kodujących enzymy metabolizmu bioaktywnych sfingolipidów w przebiegu ChA, jak również w przekazywaniu sygnału, w którym biorą udział receptory S1P. Ponadto, uzupełniają one dotychczasową wiedzę mówiącą o zmianach w poziomie białka i aktywności SPHK1/2 w mózgach osób chorych na ChA, wskazując dodatkowo na zmiany w poziomie mRNA (Ceccom *i wsp.*, 2014, Couttas *i wsp.*, 2014, Couttas *i wsp.*, 2018, Lee *i wsp.*, 2018b). Co najważniejsze, kierunek zmian poziomu mRNA *Sphk1*, *Sphk2*, *Cerk*, *Slpr1*, *Slpr3* oraz *Bcl-2* zaobserwowany zarówno w komórkowym (A $\beta$ , APPwt, APPsw), jak i zwierzęcym modelu ChA odpowiadał zmianom ekspresji genów zaobserwowanym u osób ze sporadyczną postacią ChA (Jeśko *i wsp.*, 2019).

Badania ostatnich lat wskazują na potencjalne wykorzystanie terapii z użyciem modulatorów receptorów dla S1P w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych (Asle-Rousta *i wsp.*, 2013, Motyl *i wsp.*, 2018a, Zhao *i wsp.*, 2017). W niniejszej pracy zaobserwowano w mózgach myszy APP<sup>+</sup> zależny od wieku efekt działania fingolimodu na poziom mRNA genów kodujących PARPy i SIRTy, enzymy syntezy bioaktywnych sfingolipidów, jak również receptory dla S1P oraz białka pro- i anty-apoptotyczne. Do dnia dzisiejszego ukazało się niewiele prac dotyczących wpływu FTY720 na zmiany w ekspresji/aktywności sirtuin. Wiadomo natomiast, że FTY720 wykazuje zdolność do zahamowania aktywności deacetylaz histonów klasy I, która może się wiązać z działaniem SPHK2 (Hait *i wsp.*, 2015, Spiegel *i wsp.*, 2012). W niniejszej rozprawie zaobserwowano po raz pierwszy wzrost poziomu mRNA *Sirt1*, *Sirt3*, *Sirt5* i *Parp1* w korze mózgowej oraz wzrost *Sirt1* i *Sirt4* w hipokampie myszy APP<sup>+</sup> po podaniu FTY720. Czubowicz *i wsp.* wykazali, że zastosowanie innego agonisty receptora dla S1P – SEW2871 (agonista receptora S1PR1)

powoduje wzrost poziomu mRNA *Sirt1* w linii PC12 transfekowanej genem APPwt i APPsw zarówno w warunkach kontrolnych, jak również w toksyczności wywołanej działaniem C2-ceramidu (Czubowicz *i wsp.*, 2018). Dodatkowo wykazano, że przebadany agonista powodował również wzrost żywotności komórek w przypadku obu linii transfekowanych genem APP (Czubowicz *i wsp.*, 2018). Uzyskane wyniki wskazują na aktywną rolę ścieżki sygnałowej z udziałem SPHK/S1P w regulacji poziomu mRNA *Sirt1*. Ponadto korelują one z najnowszymi wynikami otrzymanymi przez zespół Gao *i wsp.* gdzie zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA oraz białka sirtuiny 1 na skutek wyciszenia białka SPHK1. Co ciekawe suplementacja S1P powodowała powrót *Sirt1* do wyjściowych wartości (Gao *i wsp.*, 2016). Przypuszcza się, że również sirtuiny mogą oddziaływać na kinazy sfingozyny, co zostało zaobserwowane podczas użycia resweratrolu (niespecyficznego aktywatora sirtuin) zarówno w modelu zwierzęcym, jak i komórkowym i skutkowało zwiększeniem się poziomu S1P (Kurano *i wsp.*, 2016).

Fingolimod wywiera protekcyjne działanie poprzez oddziaływanie na receptory dla S1P. W przebiegu ChA obserwuje się, zjawisko obniżania się puli S1P w komórce, co może skutkować zwiększeniem się procesów apoptotycznych oraz obumieraniem komórek nerwowych. W niniejszej pracy zaobserwowano po podaniu FTY720 istotny wzrost poziomu mRNA dla genów kodujących kinazę ceramidu oraz kinazy sfingozyny w obu przebadanych strukturach mózgu myszy 12-miesięcznych APP<sup>+</sup>. Co ciekawe, użycie FTY720 u tych samych myszy pomogło w przywróceniu obniżonego poziomu mRNA *Sphk2* do wartości wyjściowych. Zaobserwowano również wzrost poziomu mRNA dla genów kodujących obie kinazy u myszy 6-miesięcznych APP<sup>+</sup>. Zaobserwowany wzrost poziomu mRNA może wynikać z faktu, iż obie te kinazy biorą udział w przekształcaniu FTY720 do jego ufosforylowanej formy. FTY720 zwiększał również poziom mRNA genu kodującego pro-życiowe białko Bcl-2 we wszystkich grupach wiekowych w korze mózgowej myszy APP<sup>+</sup> oraz powodował wzrost poziomu mRNA w hipokampie myszy 12-miesięcznych, który na skutek mutacji ulegał obniżeniu. Wynik ten pokrywa się z danymi uzyskanymi w innych chorobach, gdzie FTY720 działał protekcyjnie za pomocą modulacji ekspresji/aktywności kinaz sfingozyny oraz poprzez promowanie białek anty-apoptotycznych (Ahmed *i wsp.*, 2017, Motyl *i wsp.*, 2018a, Zhao *i wsp.*, 2017). Hasegawa *i wsp.* również wykazali aktywację białka Bcl-2 oraz obniżenie ekspresji kaspazy-3 po zastosowaniu FTY720 w mózgu szczura po udarze niedokrwiennym. Równocześnie wykazano, że użycie antagonisty receptora 1 i 3 S1P (VPC23019) powoduje

zniesienie tego efektu (Hasegawa *i wsp.*, 2010). Dane te mogą sugerować, że do pro-życiowego działania FTY720 potrzebny jest udział obu tych receptorów.

Biorąc pod uwagę fakt iż, sfingolipidy stanowią bardzo ważny składnik błony komórkowej poprzez kształtowanie jej właściwości fizykochemicznych, zadano sobie pytanie w jakim stopniu ASN oraz A $\beta$  mogą wpływać na zmiany w poziomie mRNA białek i receptorów związanych z metabolizmem i działaniem bioaktywnych sfingolipidów. Zauważono, że podobnie jak w przypadku A $\beta$ o jak i endogennych peptydów A $\beta$ , ASN<sub>o</sub> powodują obniżenie aktywności kinazy sfingozyny (SPHK1/2). Równocześnie ASN<sub>o</sub> wpłynęły na niewielkie obniżenie poziomu mRNA *Sphk2*. W dalszej części pracy zbadano wpływ endogennych peptydów A $\beta$ , jak również ASN<sub>o</sub> na poziom mRNA genu kodującego białko anti-apoptotyczne Bcl-2. Zarówno w przypadku modelu toksyczności endogennych peptydów A $\beta$ , jak i ASN<sub>o</sub>, zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA kodującego pro-życiowe białko Bcl-2. Obniżeniu poziomu mRNA *Bcl-2* towarzyszył również wzrost poziomu mRNA genu kodującego pro-apoptotyczne białko BAX, co zostało przedstawione w pracy Motyl *i wsp.* (Motyl *i wsp.*, 2018b). Podobne zmiany zostały zaobserwowane przez Cieślak *i wsp.*, gdzie A $\beta$ o powodował wzrost poziomu mRNA *Bax* oraz obniżenie poziomu mRNA innego anti-apoptotycznego białka z rodziny Bcl-2 – Bcl-xL. Liczne badania wskazują na istotną rolę SPHK oraz S1P w neuroprotekcji podczas ChA. He *i wsp.* wykazali, że w mózгах osób chorych na ChA dochodzi do zwiększenia aktywności kwaśnej ceramidazy i sfingomielinazy (He *i wsp.*, 2010). Doprowadza to do obniżania się ilości sfingomieliny oraz do wzrostu poziomu ceramidu przy jednoczesnym obniżeniu się poziomu S1P (He *i wsp.*, 2010). Dane uzyskane przez Czubowicz *i wsp.* wskazują na istotne obniżenie poziomu mRNA oraz białka BCL-2 wynikające z działania ceramidu (Czubowicz *i Strosznajder*, 2014). Co więcej, autorzy wykazali wzrost poziomu mRNA dla białek pro-apoptotycznych BAX i HRK, któremu towarzyszyło obniżenie żywotności komórek SH-SY5Y i wzrost poziomu apoptozy (Czubowicz *i Strosznajder*, 2014). W świetle wyżej opisanych wyników niezwykle istotnym wydaje się zachowanie równowagi pomiędzy S1P a ceramidem.

Dosyć kontrowersyjny wydaje się być udział kinaz sfingozyny w regulacji powstawania peptydu A $\beta$ . Takasugi *i wsp.* w swojej pracy udowodnili, że w mózгах osób chorych na ChA dochodzi do wzrostu aktywności SPHK2 na skutek toksyczności włókien peptydu A $\beta$ 1-42, co powoduje aktywację białka BACE1 (Takasugi *i wsp.*, 2011). Z kolei,

ten sam zespół kilka lat później opublikował informację, że FTY720, który jest przekształcany do swojej aktywnej postaci głównie poprzez SPHK2, bierze udział w zmniejszeniu się ilości peptydu A $\beta$  w neuronach (Takasugi *i wsp.*, 2013). Również w pracy Asle-Rousta *i wsp.* zaobserwowano protekcyjne działanie FTY720 w modelu toksyczności peptydu A $\beta$ 1-42, które objawiało się poprawą procesów pamięciowych (Asle-Rousta *i wsp.*, 2013). Przypuszcza się, że efekt działania SPHK2 w ChA jest zależny od jego lokalizacji w komórce. Zaburzenie w proporcji pomiędzy pulą jądrową a cytoplazmatyczną SPHK2 może skutkować zwiększeniem się ilości peptydu A $\beta$ , co zostało potwierdzone przez zespół Dominguez *i wsp.* (Dominguez *i wsp.*, 2018). Autorka w swojej pracy zwraca również uwagę na fakt, iż rola SPHK2 w komórce w dalszym ciągu nie jest do końca wyjaśniona i wymaga dalszych badań.

Zaobserwowane zmiany w poziomie ekspresji genów kodujących enzymy metabolizmu APP, PARPy i SIRTy, kinazy sfingozyny, kinazę ceramidu, receptory S1P oraz wybrane białka pro- i anty-apoptotyczne wskazują na istotną rolę A $\beta$ , A $\beta$ o i ASNo w ich regulacji. Farmakologiczne zahamowanie aktywności PARP1, jak również modulacja receptorów dla S1P może wykazywać działanie neuroprotekcyjne, poprzez regulację poziomu mRNA w/w białek i receptorów. Zastosowanie inhibitorów PARP lub modulatorów receptorów S1P może stanowić potencjalny punkt uchwytu w terapii ChA.

## 6. Podsumowanie i wnioski

### 6.1. Model *in vitro*

Na podstawie przeprowadzonych badań z wykorzystaniem modeli komórkowych wysunięto następujące wnioski:

1. Zarówno A $\beta$ , jak i ASNo powodują obniżenie żywotności komórek PC12 o około 40-50%, co świadczy o ich wysokiej toksyczności.
2. W komórkach PC12, egzogenne A $\beta$  powodowały wzrost poziomu mRNA *Bace1* oraz podjednostek  $\gamma$ -sekreazy *Psen1* i *2* odpowiedzialnych za uwalnianie c-końca APP oraz peptydów A $\beta$ . Endogenne peptydy A $\beta$  zwiększały w komórkach APPsw poziom mRNA *Psen2* oraz w przypadku APPwt poziom mRNA genów kodujących białka biorące udział w amyloidogennej ścieżce metabolizmu APP: *Bace1*, *Psen1* i *2*, co może skutkować zwiększeniem ilości peptydu A $\beta$ .
3. A $\beta$  wywołują zmiany w poziomie mRNA dla SIRTuin. Po podaniu A $\beta$  obniżeniu uległ poziom mRNA *Sirt1* – sirtuiny, która odpowiada za wiele procesów prożyciowych. Zaobserwowano również zwiększony poziom mRNA sirtuin mitochondrialnych (*Sirt4* i *Sirt5*). Ponadto, zaobserwowano wzrost poziomu mRNA *Sirt3* w komórkach APPwt i APPsw. Wyniki sugerują udział sirtuin w mechanizmach ochrony przeciwko toksyczności oligomerów A $\beta$ .
4. W komórkach traktowanych A $\beta$ 1-42 oraz w komórkach APPsw zaobserwowano podwyższony poziom mRNA *Parp1*, co może wskazywać na udział tego białka w stresie wywołanym toksycznością peptydu A $\beta$ .
5. Po raz pierwszy zaobserwowano, że zastosowanie inhibitora PARP1 powoduje wzrost poziomu mRNA sirtuiny jądrowej: *Sirt1* (zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w warunkach toksyczności oligomerów A $\beta$ 1-42) oraz sirtuiny mitochondrialnej *Sirt4* (w warunkach kontrolnych). Ponadto PJ-34 prowadzi do wzrostu poziomu mRNA *Parp3*, który podobnie jak PARP1 związany jest z procesami naprawy DNA. Wzrost poziomu mRNA *Sirt1* po podaniu PJ-34 może świadczyć o istotnej roli PARP1 w regulacji poziomu mRNA tego enzymu w warunkach toksyczności A $\beta$ .

6. ASNo poprzez oddziaływanie na transkrypcję genów mogą zmniejszać poziom mRNA kluczowych enzymów metabolizmu APP na szlaku nieamyloidogennym (ADAM10, SIRT1).
7. ASNo zwiększają poziom mRNA enzymów NAD<sup>+</sup>-zależnych, takich jak SIRTy (SIRT3, 5) oraz PARPy (PARP2, 3), biorące udział w regulacji stresu oksydacyjnego oraz naprawie uszkodzonego DNA. Zmiany w poziomie mRNA mogą świadczyć o aktywacji stresu oksydacyjnego wywołanego toksycznym działaniem ASNo.
8. Egzogenne ASNo obniżają aktywność kinazy SPHK1/2 oraz obniżają poziom mRNA genu kodującego białko pro-życiowe Bcl-2. Zmiany te mogą wskazywać na zaburzenie homeostazy bioaktywnych sfingolipidów podczas toksyczności wywołanej oligomerami ASNo w procesach regulujących śmierć komórki, który może wynikać ze zmiany proporcji pomiędzy ceramidem, a pro-życiowym S1P.
9. Endogenne peptydy A $\beta$  w komórkach APPwt i APPsw oddziałują na transkrypcję genów kodujących kinazy bioaktywnych sfingolipidów, takie jak CERK i SPHK2 oraz na receptory S1P. Dodatkowo mogą one powodować obniżenie poziomu mRNA genu kodującego białko o działaniu anty-apoptycznym Bcl-2. Wyniki wskazują na istotne znaczenie A $\beta$  jako molekularnego modulatora przekaznictwa sygnału zależnego od C1P i S1P.

## 6.2. Model *in vivo*

Na podstawie przeprowadzonych badań z wykorzystaniem modelu zwierzęcego ChA wysunięto następujące wnioski:

1. Mutacja londyńska genu APP powoduje u myszy zależne od wieku obniżenie poziomu mRNA *Sirt1*. Zaobserwowane obniżenie poziomu mRNA może doprowadzić do wzrostu stresu oksydacyjnego i obniżenia przeżywalności komórek. Natomiast podanie FTY720 myszom APP<sup>+</sup> zwiększało poziom mRNA PARPów i SIRTuin.
2. U myszy transgenicznych zaobserwowano zależną od wieku zmianę w poziomie mRNA genów biorących udział w fosforylacji ceramidu i sfingozyny oraz zmiany w poziomie mRNA receptorów dla S1P. Zaobserwowane zmiany mogą doprowadzić do zmniejszenia się poziomu pro-życiowego S1P i C1P oraz do zwiększenia się poziomu pro-apoptotycznego ceramidu.
3. Stwierdzony wzrost poziomu mRNA *Cerk* po zastosowaniu FTY720 może mieć działanie neuroprotekcyjne poprzez zwiększenie się ilości C1P i zmniejszenie poziomu ceramidu.
4. Podanie FTY720 zwiększa poziom mRNA dla: kinaz sfingozyny, jak również dla receptora S1PR3 i może działać neuroprotekcyjnie aktywując szlaki sygnałowe zależne od S1P.
5. FTY720 powoduje wzrost poziomu mRNA dla genu kodującego białko anty-apoptotyczne Bcl-2, co może mieć w konsekwencji efekt cytoprotekcyjny.

## 6.3. Wniosek końcowy

Farmakologiczne zahamowanie aktywności PARP1, jak również modulacja receptorów dla S1P może wykazywać działanie neuroprotekcyjne, poprzez wpływ na ekspresję genów kodujących enzymy metabolizmu APP, SIRTuiny, kinazy odpowiedzialne za powstawanie C1P i S1P oraz białka anty-apoptotyczne.

## 7. Streszczenie

Choroba Alzheimera (ChA) jest chorobą neurodegeneracyjną, powodującą nieodwracalne zmiany w mózgu, które w konsekwencji doprowadzają do ciężkiego otępienia. Pomimo wielomilionowych nakładów na badania i rozwój w dalszym ciągu nie wynaleziono skutecznej terapii, która mogłaby zahamować rozwój tej choroby. Do charakterystycznych cech neuropatologicznych ChA zalicza się nadmierne ufosforylowanie białka tau, które tworzy tzw. sploty neurofibrylarne oraz obecność złogów peptydu amyloidu beta ( $A\beta$ ), który powstaje z białka APP przy udziale enzymów nazywanych sekretazami na drodze amyloidogennej. Kolejną równie ważną cechą związaną z ChA jest obecność ciał Lewy'ego zawierających  $\alpha$ -synukleinę (ASN), które są obserwowane podczas autopsji aż u około 50-60% pacjentów z ChA. Zarówno peptyd  $A\beta$ , jak i ASN w warunkach patologicznych na skutek zmiany konformacji, agregacji oraz oligomeryzacji mogą przybierać formy toksyczne, z których to oligomery (dimery) wymieniane są jako jedne z najbardziej szkodliwych. W wyniku toksycznego oddziaływania peptydu  $A\beta$  oraz białka ASN może dochodzić do zaburzenia równowagi jonowej w neuronach, aktywacji procesów zapalnych, zaburzenia i uszkodzenia neuronów (synaps i neurytów), wzrostu stresu oksydacyjnego oraz zmian w aktywności kinaz i fosfataz, co w końcowym efekcie powoduje obumieranie komórek nerwowych.

Jednym z istotnych enzymów, do którego nadreaktywności dochodzi podczas stresu oksydacyjnego jest  $NAD^+$  zależna polimeraza poli(ADP-rybozy)-1 (PARP1). Wzrost jej aktywności zaobserwowano w mózgach osób chorych na ChA. Enzym ten podczas przebiegu ChA zostaje aktywowany w odpowiedzi na dużą liczbę uszkodzeń DNA wywołanych przez  $A\beta$ . Powoduje to obniżenie się puli  $NAD^+$  oraz ATP, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki. Dodatkowo, PARP1 poprzez regulację dostępności substratu, którym jest  $NAD^+$  może brać udział w modulacji aktywności innej grupy enzymów – deacetylaz histonów klasy III - sirtuin. Sirtuiny (SIRTy), podobnie jak PARPy mają istotne znaczenie w regulacji białek oraz czynników transkrypcyjnych, które są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórki. Jedną z najlepiej poznanych sirtuin jest SIRT1, która wykazuje działanie neuroprotektcyjne w wielu chorobach neurodegeneracyjnych poprzez regulację procesów zapalnych, enzymów antyoksydacyjnych, udział w naprawie DNA, regulację starzenia się oraz śmierci komórki. Sirtuina ta może również brać udział w promowaniu ścieżki nieamyloidogennej



metabolizmu APP poprzez aktywację białka ADAM10 wykazującego działanie  $\alpha$ -sekreazy. Niestety poziomy SIRT1 mogą ulegać znacznemu obniżeniu w ChA.

Badania ostatnich lat wykazały, że zarówno do wzrostu poziomu peptydu A $\beta$ , jak również do nadreaktywności enzymu PARP1 może przyczyniać się ceramid, należący do rodziny bioaktywnych sfingolipidów. Bioaktywne sfingolipidy stanowiące ważny składnik błony komórkowej są również molekułami sygnalizacyjnymi mającymi istotne znaczenie w regulacji procesów zachodzących w komórce, takich jak: przeżycie, różnicowanie, proliferacja czy programowana śmierć. Oprócz ceramidu, który w stanach patologicznych ma działanie pro-apoptyczne, do rodziny bioaktywnych sfingolipidów można zaliczyć pro-życiowy ceramido-1-fosforan (C1P) oraz sfingozyno-1-fosforan (S1P). Podczas przebiegu ChA w mózgach chorych obserwuje się wzrost poziomu niektórych ceramidów wraz z towarzyszącym mu obniżeniem się poziomu S1P. Sytuacja ta może doprowadzić do zaburzenia równowagi pomiędzy ceramidem a S1P, mającej istotne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórki.

Pomimo wieloletnich badań nad znaczeniem peptydów A $\beta$  oraz sekwencją procesów molekularnych w patologii ChA, patogeneza choroby nie jest do końca wyjaśniona, a dotychczas stosowana terapia nie przynosi satysfakcjonujących efektów. Wobec powyższego, niezwykle ważnym jest prowadzenie badań zmierzających do lepszego zrozumienia zaburzeń molekularnych leżących u podstaw tej choroby oraz weryfikacja działania wybranych związków neuroprotekcyjnych. Dlatego też, celem niniejszej pracy było zbadanie poziomu mRNA genów kodujących enzymy metabolizmu APP, enzymy NAD<sup>+</sup>-zależne (PARPy i SIRTy), enzymy metabolizmu bioaktywnych sfingolipidów oraz wybrane białka pro- i anty-apoptyczne w doświadczalnych modelach choroby Alzheimerera. Ponadto, uwzględniono działanie inhibitora polimerazy poli(ADP-rybozy) 1 (PARP1) oraz modulatora receptorów sfingozyno-1-fosforanu (S1P).

W niniejszych badaniach zastosowano komórkowy model toksyczności peptydów A $\beta$  (linia guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy szczura (*Pheochromocytoma*, PC12)) wywołany poprzez podanie zewnątrzkomórkowe oligomerów A $\beta$ 1-42, jak również użyto komórek PC12 transfekowanych genem APP, które charakteryzowały się zwiększoną produkcją peptydu A $\beta$ . Dodatkowo, w komórkach traktowanych A $\beta$ 1-42 sprawdzono działanie inhibitora polimerazy poli(ADP-rybozy) – PJ-34 na poziom mRNA genów kodujących enzymy metabolizmu APP oraz PARPy i SIRTy. Komórki PC12 traktowano

również egzogennymi oligomerami ASN. Wyniki dotyczące poziomu mRNA genów kodujących enzymy metabolizmu APP, PARPy i SIRTy, kinazy sfingozyny, kinazę ceramidu, receptory S1P oraz białko anty-apoptotyczne Bcl-2 po działaniu A $\beta$ , A $\beta$ o i ASNo porównywano z danymi uzyskanymi w modelu zwierzęcym – myszy FVB/APP<sup>+/-</sup> z mutacją londyńską genu APP<sup>Val717Ile</sup>, które stanowiły model rodzinnej postaci choroby Alzheimerera. Zwierzętom z mutacją genu APP podawany był również modulator receptorów dla S1P – fingolimod/FTY720. Badania prowadzono w oparciu o wybrane metody biologii molekularnej, spektrofotometryczne, spektrofluorymetryczne oraz mikroskopowe.

Przeprowadzone badania wykazały, że egzogenne A $\beta$  spowodował istotny wzrost poziomu mRNA sekretaz zaangażowanych w amyloidogenną ścieżkę metabolizmu APP (*Bace1*, *Psen1*, 2). Wzrosty te (*Bace1*, *Psen1* i 2), zostały również zaobserwowane w transfekowanych komórkach PC12 zawierających gen APP typu dzikiego (APPwt). Natomiast w komórkach zawierających mutację genu APP typu szwedzkiego (APPsw) wykazano wzrost poziomu mRNA *Psen2*. Ponadto, w komórkach traktowanych ASNo zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA *Adam10*. W modelu tym zaobserwowano też zmiany w poziomie mRNA genów kodujących metaloproteinazy - 2,10,11.

W przypadku genów kodujących PARPy i SIRTy zauważono co najważniejsze obniżenie poziomu mRNA *Sirt1* zarówno po traktowaniu A $\beta$ o1-42, jak i w mózgach myszy transgenicznym. Efekt ten zaobserwowano również w komórkach PC12 traktowanych egzogennymi ASNo. Ponadto, w modelu komórkowym toksyczności A $\beta$ o1-42 zaobserwowano istotny wzrost poziomu mRNA *Sirt4* i *Sirt5* oraz wzrost *Parp1*. Natomiast, endogenne peptydy A $\beta$  powodowały wzrost poziomu mRNA *Sirt3* w komórkach APPwt i APPsw oraz wzrost poziomu mRNA *Parp1* i 2 w linii APPsw. Wykazano również, że egzogenne ASNo wpłynęły na wzrost poziomu mRNA *Sirt3*, 5 oraz *Parp2* i 3. Badania z użyciem inhibitora PARP (PJ-34) po raz pierwszy wykazały jego znaczący udział w regulacji/wzroście transkrypcji genów *Sirt1* i 4, *Parp3*, jak również genów związanych z metabolizmem APP.

Analiza poziomu mRNA dla genów związanych z syntezą S1P wykazała istotne obniżenie poziomu mRNA dla kinazy sfingozyny 2 zarówno w obu liniach komórkowych transfekowanych genem APP, jak również w komórkach nietransfekowanych po podaniu ASNo. Obniżenie to zaobserwowano również w korze mózgowej i hipokampie myszy APP<sup>+</sup> 12-miesięcznych. Ponadto, zauważono istotne obniżenie się aktywności SPHK1/2 w warunkach toksyczności oligomerów ASN. Kolejną istotną zmianą było zaobserwowane

w przypadku komórek PC12 transfekowanych genem APP, jak i u zwierząt 12-miesięcznych APP<sup>+</sup> obniżenie poziomu mRNA *Slpr1*, kodującego receptor 1 dla S1P oraz co istotne obniżenie poziomu mRNA dla genu *Cerk*, kodującego kinazę ceramidu (która bierze udział w przekształcaniu ceramidu do jego pro-życiowej formy C1P). W badaniach zaobserwowano również istotne obniżenie poziomu mRNA genu kodującego pro-życiowe białko Bcl-2, zarówno w liniach transfekowanych genem APP, komórkach traktowanych ASNo, jak również u zwierząt transgenicznym. Podanie modulatora receptorów S1P - FTY720 myszom APP<sup>+</sup> wpłynęło na wzrost poziomu mRNA *Parp1*, *Sirt1*, *3*, *5* w korze mózgowej myszy 6- i 12-miesięcznych oraz na zależny od wieku wzrost poziomu mRNA *Sphk*. W niniejszej rozprawie wykazano po raz pierwszy wzrost poziomu mRNA genu kodującego kinazę ceramidu zaobserwowany po podaniu FTY720. Istotną zmianą był również wzrost poziomu mRNA genu kodującego pro-życiową formę białka Bcl-2 po podaniu FTY720 myszom FVB/APP<sup>+</sup>.

Zaobserwowane zmiany w poziomie ekspresji genów kodujących enzymy metabolizmu APP, PARPy i SIRTy, kinazy sfingozyny, kinazę ceramidu, receptory S1P oraz wybrane białka pro- i anty-apoptotyczne wskazują na istotną rolę A $\beta$ , A $\beta$ <sub>o</sub> i ASNo w ich regulacji. Farmakologiczne zahamowanie aktywności PARP1, jak również modulacja receptorów dla S1P może wykazywać działanie neuroprotekcjne, poprzez regulację poziomu mRNA w/w białek i receptorów. Zastosowanie inhibitorów PARP lub modulatorów receptorów S1P może stanowić potencjalny punkt uchwytu w terapii ChA.

## 8. Streszczenie w języku angielskim

Alzheimer's Disease (AD) is the most severe dementia that progressively and irreversibly impairs synaptic function and cognition of millions of people around the world. The pathogenesis of AD still remains unknown and therapy has proven to be unsuccessful. Amyloid plaques and hyperphosphorylated tau protein are the two pathological hallmarks that defines AD. The other important pathological hallmark that can be found in the majority of AD brain are  $\alpha$ -synuclein (ASN) aggregates.  $A\beta$  is the main component of amyloid plaques that is released in amyloidogenic pathway from  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) which is a membrane protein. Both  $A\beta$  and ASN are prone to aggregation and oligomerization as well as mutations. Its oligomers ( $A\beta_o$  and  $ASNo$ ) are recognized as the most toxic form that does severe damage to the neuronal cells. Oxidative stress is the main factor responsible for its toxic properties of  $A\beta_o$  as well as  $ASNo$  that may lead to disturbance of many key processes involved in regulation of cell viability and death.

Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) is a  $NAD^+$ -dependent enzyme that is responsible for more than 90% of protein poly(ADP-ribosylation) in the brain. Normally PARP1 is involved in DNA repair processes, however due to oxidative stress and massive DNA damage PARP1 can be overactivated and may lead to cell death. Its elevated levels are also observed in AD brains. Both PARPs and sirtuins (SIRT) are important regulators of many proteins and transcription factors that are necessary for the proper functioning of the living cell. SIRT are recognized as enzymes with deacetylase activity. It was proved, that overactivation of PARP1 may lead to the  $NAD^+$  depletion, followed by inhibition of SIRT1 activity. SIRT1 is the most recognized and examined sirtuin up to date. SIRT1 has been proven to be neuroprotective in many neurodegenerative diseases by regulation of inflammatory processes, antioxidant enzymes, DNA repair as well as by regulation of aging and cell death. SIRT1 may also be involved in non-amyloidogenic pathway of APP metabolism *via* activation of ADAM10 protein which has  $\alpha$ -secretase activity. Unfortunately, SIRT1 levels have been observed to be downregulated in AD.

Recent studies have shown that ceramides, which belong to the family of bioactive sphingolipids can be involved in generation of  $A\beta$  peptides as well as in the overactivation of the PARP1. Bioactive sphingolipids are important component of the cell membrane that

also act as a signaling molecules which are important in regulation of many processes, such as: cell survival, differentiation, proliferation or programmed death. The most important bioactive sphingolipids besides ceramide, which in the pathological states has mostly pro-apoptotic effect, include its pro-survival form - ceramide-1-phosphate (C1P) as well as sphingosine-1-phosphate (S1P). Disturbances in sphingolipid metabolism and alteration of the balance between ceramide and S1P have been suggested as important factor in pathogenesis/pathomechanism of AD.

Despite many years of research on A $\beta$  peptides toxicity as well as on molecular processes that are involved in AD pathology, the pathogenesis of the disease is still not fully elucidated, and the treatment that is used so far is not effective. Therefore, it is extremely important to conduct further research that aim for better understanding of molecular disturbances underlying this disease and seek for a new targets that can be used for its treatment. The aim of this thesis was to investigate mRNA levels of enzymes and proteins that are associated with the metabolism of APP, NAD<sup>+</sup>-dependent enzymes (PARPs and SIRTs), sphingosine metabolism enzymes as well as pro- and anti-apoptotic proteins in experimental models of AD. In addition, the effect of PARP1 inhibitor (PJ-34) and S1P receptors modulator (FTY720) on the mRNA levels of the above mentioned genes was investigated.

In present study the cellular model of A $\beta$  toxicity (*pheochromocytoma*, PC12) was used. The toxicity was evoked by extracellular oligomers of A $\beta$ 1-42 or by transfection of the above-mentioned cells with the APP gene. Additionally the effect of PARP1 inhibitor (PJ-34) on genes involved in APP metabolism as well as on PARPs and SIRTs mRNA levels was examined under A $\beta$ 1-42 toxicity. PC12 cells without transfection were also treated with exogenous ASNo. The mRNA levels of: PARPs, SIRTs, sphingosine kinases, ceramide kinase, S1P receptors as well as anti-apoptotic protein Bcl-2 were compared with data obtained in transgenic animals - FVB/APP<sup>+/-</sup> mice with the London (Val717Ile) mutation of the APP gene, which is a model of familial Alzheimer's disease. The effect of *intraperitoneal* administration of FTY720 on FVB/APP<sup>+</sup> brain mRNA levels of abovementioned genes was also examined. The spectrophotometric, spectrofluorimetric, microscopic and qPCR methods were applied.

The results of this thesis showed that exogenous A $\beta$ 1-42 as well as endogenous A $\beta$  peptide in APPwt (wild type) transfected cells elevated mRNA levels of enzymes involved in the amyloidogenic APP processing (*Bace1*, *Psen1*, 2). Moreover, increase of *Psen2*

mRNA levels was observed in transfected PC12 cells with Swedish mutation of the APP gene (APP<sup>sw</sup>). Decreased *Adam10* mRNA levels were observed in cells treated with ASNo. We have also observed changes in the mRNA levels of metalloproteinases - 2,10,11 in ASNo treated cells.

The studies have shown significant downregulation of *Sirt1* mRNA level after treatment with A $\beta$ 1-42 that was also observed in the brains of transgenic mice and in PC12 cells treated with ASNo. In addition, a significant increase of *Sirt4*, *Sirt5* and *Parp1* mRNA level was observed in the PC12 cells after A $\beta$ 1-42 treatment. Endogenously liberated peptides in cells transfected with the APP gene elevated the mRNA level of the *Sirt3* gene in the APP<sup>w</sup>t and APP<sup>sw</sup> cell lines as well as increased the mRNA level of *Parp1* and 2 in APP<sup>sw</sup> cell line. Moreover, exogenous ASNo increased mRNA level of *Sirt3*, 5 as well as *Parp2* and 3 in PC12 cells. For the first time, it was observed that PARP1 inhibition led to elevation of *Sirt1*, 4 and *Parp3* mRNA levels as well as to elevation of mRNA levels of proteins that are related to APP metabolism.

The expression of genes related to S1P generation was downregulated and decrease of the sphingosine 2 kinase (*Sphk2*) gene was observed after ASNo treatment as well as in both APP gene-transfected cell lines. This reduction was also present in 12-month APP<sup>+</sup> mice cortex and hippocampus. In addition, a significant reduction of SPHK1/2 activity was observed under the toxicity of the ASN oligomers. Moreover, significant decrease in the mRNA level of the S1P receptor (*SIpr1*) and most importantly, the decrease in the expression of the ceramide kinase encoding gene (*Cerk*) was observed in PC12 transfected cells with the APP gene as well as in 12-month APP<sup>+</sup> mice. It was also observed that the mRNA levels of the gene encoding the pro-survival Bcl-2 protein was downregulated in the cells transfected with the APP gene, ASNo treated cells as well as in transgenic animals.

The administration of FTY720 to APP<sup>+</sup> mice elevated mRNA levels of *Parp1*, *Sirt1*, 3, 5 in brain cortex of 6- and 12-month-old mice as well as exerted age-dependent increase of *Sphks* mRNA levels. It was also observed for the first time that modulation of S1P receptors by FTY720 can upregulate *Cerk* mRNA level and reverse the negative effect of APP mutation on its transcript levels. Finally the increase in the mRNA levels of *Bcl-2* gene was observed after FTY720 administration.

Observed changes in the expression of genes coding for APP metabolism enzymes, PARPs and SIRT6, sphingosine kinases, ceramide kinase, S1P receptors as well as pro- and anti-apoptotic proteins indicate the important role of A $\beta$ , A $\beta$ o and ASNo toxicity in the regulation of their mRNA levels. Pharmacological inhibition of PARP1 activity as well as modulation of S1P receptors may have neuroprotective effects by regulating the mRNA levels of the abovementioned proteins and receptors. Thus, the use of PARP inhibitors or S1P receptor modulators may offer a promising target for the treatment of AD.

## 9. Innowacyjność rozprawy

Przeprowadzone w ramach niniejszej dysertacji badania wyjaśniły niektóre mechanizmy molekularne leżące u podstaw toksyczności peptydu A $\beta$ , która należy do jednych z głównych czynników neuropatologicznych w chorobie Alzheimerera. W niniejszej rozprawie:

- wykazano istotną rolę enzymu jądrowego PARP1 w regulacji poziomu mRNA genów zaangażowanych w metabolizm białka APP podczas toksyczności wywołanej oligomerami peptydu A $\beta$ . Jednocześnie po raz pierwszy zaobserwowano neuroprotekcyny efekt zahamowania aktywności PARP1, który przekładał się na wzrost poziomu mRNA genu kodującego pro-życiową sirtuinę 1.

- po raz pierwszy wykazano, że zastosowanie modulatora receptorów S1P (FTY720, fingolimodu) zwiększa poziom mRNA kinazy ceramidu (enzymu odpowiedzialnego za ufosforylowanie ceramidu do jego pro-życiowej formy - ceramido-1-fosforanu).

- uzupełniono aktualną wiedzę na temat oddziaływania FTY720 na poziom mRNA genów kodujących sirtuiny jądrowe i mitochondrialne.

- wykazano, że FTY720 może działać neuroprotekcyny poprzez wzrost poziomu mRNA dla genu kodującego pro-życiowe białko Bcl-2, które jest regulatorem mitochondrialnego szlaku apoptozy.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy uzupełniają stan wiedzy dotyczący roli PARPów, SIRTuin oraz bioaktywnych sfingolipidów w patologii choroby Alzheimerera i mogą być pomocne w opracowaniu nowych strategii neuroprotekcyny.



## 10. Literatura

- Abid, N. B., Naseer, M. I. & Kim, M. O. 2019. Comparative Gene-Expression Analysis of Alzheimer's Disease Progression with Aging in Transgenic Mouse Model. *International Journal of Molecular Sciences* **20**:1219.
- Adamczyk, A., Czapski, G. A., Jesko, H. & Strosznajder, R. P. 2005. Non A beta component of Alzheimer's disease amyloid and amyloid beta peptides evoked poly(ADP-ribose) polymerase-dependent release of apoptosis-inducing factor from rat brain mitochondria. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **56 Suppl 2**:5-13.
- Adamczyk, A. & Kaźmierczak, A. 2009. Alpha-synuclein inhibits poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) activity via NO-dependent pathway. *Folia Neuropathologica* **47**:247-51.
- Adamczyk, A., Kaźmierczak, A. & Strosznajder, J. B. 2006.  $\alpha$ -Synuclein and its neurotoxic fragment inhibit dopamine uptake into rat striatal synaptosomes: Relationship to nitric oxide. *Neurochemistry International* **49**:407-12.
- Aguzzi, A. & O'Connor, T. 2010. Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov* **9**:237-48.
- Ahmed, N., Linardi, D., Muhammad, N., Chiamulera, C., Fumagalli, G., Biagio, L. S., Gebrie, M. A., Aslam, M., Luciani, G. B., Faggian, G. & Rungtatscher, A. 2017. Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulator Fingolimod (FTY720) Attenuates Myocardial Fibrosis in Post-heterotopic Heart Transplantation. *Frontiers in Pharmacology* **8**.
- Alano, C. C., Garnier, P., Ying, W., Higashi, Y., Kauppinen, T. M. & Swanson, R. A. 2010. NAD<sup>+</sup> depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death. *J Neurosci* **30**:2967-78.
- Alcendor Ralph, R., Kirshenbaum Lorrie, A., Imai, S.-i., Vatner Stephen, F. & Sadoshima, J. 2004. Silent Information Regulator 2 $\alpha$ , a Longevity Factor and Class III Histone Deacetylase, Is an Essential Endogenous Apoptosis Inhibitor in Cardiac Myocytes. *Circulation Research* **95**:971-80.
- Anastasiadou, S. & Knöll, B. 2016. The multiple sclerosis drug fingolimod (FTY720) stimulates neuronal gene expression, axonal growth and regeneration. *Experimental Neurology* **279**:243-60.
- Ancolio, K., Dumanchin, C., Barelli, H., Warter, J. M., Brice, A., Campion, D., Frébourg, T. & Checler, F. 1999. Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:4119-24.
- Arispe, N., Diaz, J. C. & Simakova, O. 2007. Abeta ion channels. Prospects for treating Alzheimer's disease with Abeta channel blockers. *Biochim Biophys Acta* **1768**:1952-65.
- Asle-Rousta, M., Kolahdooz, Z., Oryan, S., Ahmadiani, A. & Dargahi, L. 2013. FTY720 (fingolimod) attenuates beta-amyloid peptide (Abeta42)-induced impairment of spatial learning and memory in rats. *J Mol Neurosci* **50**.
- Ayasolla, K., Khan, M., Singh, A. K. & Singh, I. 2004. Inflammatory mediator and beta-amyloid (25-35)-induced ceramide generation and iNOS expression are inhibited by vitamin E. *Free radical biology & medicine* **37**:325-38.
- Ba, X. & Garg, N. J. 2011. Signaling mechanism of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in inflammatory diseases. *Am J Pathol* **178**:946-55.

- Bachurin, S. O., Bovina, E. V. & Ustyugov, A. A. 2017. Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease: The Major Trends. *Medicinal Research Reviews* **37**:1186-225.
- Backstrom, J. R., Lim, G. P., Cullen, M. J. & Tokes, Z. A. 1996. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J Neurosci* **16**:7910-9.
- Badiola, N., de Oliveira, R. M., Herrera, F., Guardia-Laguarta, C., Goncalves, S. A., Pera, M., Suarez-Calvet, M., Clarimon, J., Outeiro, T. F. & Lleo, A. 2011. Tau enhances alpha-synuclein aggregation and toxicity in cellular models of synucleinopathy. *PLoS One* **6**:e26609.
- Bai, P., Canto, C., Brunyánszki, A., Huber, A., Szántó, M., Cen, Y., Yamamoto, H., Houten, S. M., Kiss, B., Oudart, H., Gergely, P., Menissier-de Murcia, J., Schreiber, V., Sauve, A. A. & Auwerx, J. 2011. PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole body energy expenditure. *Cell metabolism* **13**:450-60.
- Banasik, M., Stedeford, T. & Strosznajder, R. P. 2012. Natural inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Mol Neurobiol* **46**:55-63.
- Bandaru, V. V., Troncoso, J. & Det, W. 2009. ApoE4 disrupts sterol and sphingolipid metabolism in Alzheimer's but not normal brain. *Neurobiol Aging* **30**.
- Banerjee, S., Sun, Z., Hayden, E. Y., Teplow, D. B. & Lyubchenko, Y. L. 2017. Nanoscale Dynamics of Amyloid  $\beta$ -42 Oligomers As Revealed by High-Speed Atomic Force Microscopy. *ACS Nano* **11**:12202-09.
- Basello, D. A. & Scovassi, A. I. 2015. Poly(ADP-ribosylation) and neurodegenerative disorders. *Mitochondrion* **24**:56-63.
- Bateman, R. J., Munsell, L. Y., Morris, J. C., Swarm, R., Yarasheski, K. E. & Holtzman, D. M. 2006. Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nature medicine* **12**:856-61.
- Bayrakdar, E. T., Armagan, G., Uyanikgil, Y., Kanit, L., Koylu, E. & Yalcin, A. 2014. Ex vivo protective effects of nicotinamide and 3-aminobenzamide on rat synaptosomes treated with A $\beta$ (1-42). *Cell Biochem Funct* **32**:557-64.
- Beck, C., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Schreiber, V. & Dantzer, F. 2014. Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: focus on PARP1, PARP2 and PARP3. *Exp Cell Res* **329**:18-25.
- Becker-Krail, D., Farrand, A. Q., Boger, H. A. & Lavin, A. 2017. Effects of fingolimod administration in a genetic model of cognitive deficits. *Journal of Neuroscience Research* **95**:1174-81.
- Bellani, S., Sousa, V. L., Ronzitti, G., Valtorta, F., Meldolesi, J. & Chieregatti, E. 2010. The regulation of synaptic function by alpha-synuclein. *Communicative & integrative biology* **3**:106-09.
- Berger, N. A., Besson, V. C., Boulares, A. H., Burkle, A., Chiarugi, A., Clark, R. S., Curtin, N. J., Cuzzocrea, S., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Hasko, G., Liaudet, L., Moroni, F., Pacher, P., Radermacher, P., Salzman, A. L., Snyder, S. H., Soriano, F. G., Strosznajder, R. P., Sumegi, B., Swanson, R. A. & Szabo, C. 2018. Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases. *Br J Pharmacol* **175**:192-222.
- Billich, A., Bornancin, F., Devay, P., Mechtcheriakova, D., Urtz, N. & Baumruker, T. 2003. Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases. *J Biol Chem* **278**:47408-15.
- Bode, D. C., Baker, M. D. & Viles, J. H. 2017. Ion Channel Formation by Amyloid- $\beta$ 42 Oligomers but Not Amyloid- $\beta$ 40 in Cellular Membranes. *The Journal of biological chemistry* **292**:1404-13.

- Boehler, C., Gauthier, L. R., Mortusewicz, O., Biard, D. S., Saliou, J.-M., Bresson, A., Sanglier-Cianferani, S., Smith, S., Schreiber, V., Boussin, F. & Dantzer, F. 2011. Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:2783-88.
- Boland, B., Kumar, A., Lee, S., Platt, F. M., Wegiel, J., Yu, W. H. & Nixon, R. A. 2008. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**:6926-37.
- Borghi, R., Patriarca, S., Traverso, N., Piccini, A., Storace, D., Garuti, A., Gabriella, C., Patrizio, O. & Massimo, T. 2007. The increased activity of BACE1 correlates with oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **28**:1009-14.
- Bourhim, M., Kruzel, M., Srikrishnan, T. & Nicotera, T. 2007. Linear quantitation of A $\beta$  aggregation using Thioflavin T: Reduction in fibril formation by colostrinin. *Journal of Neuroscience Methods* **160**:264-68.
- Brunkhorst, R., Vutukuri, R. & Pfeilschifter, W. 2014. Fingolimod for the treatment of neurological diseases-state of play and future perspectives. *Front Cell Neurosci* **8**:283.
- Buler, M., Aatsinki, S. M., Izzi, V., Uusimaa, J. & Hakkola, J. 2014. SIRT5 is under the control of PGC-1 $\alpha$  and AMPK and is involved in regulation of mitochondrial energy metabolism. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **28**:3225-37.
- Burré, J. 2015. The Synaptic Function of  $\alpha$ -Synuclein. *Journal of Parkinson's disease* **5**:699-713.
- Campbell, C. T., Kolesar, J. E. & Kaufman, B. A. 2012. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. *Biochim Biophys Acta* **1819**:921-9.
- Canto, C., Sauve, A. A. & Bai, P. 2013. Crosstalk between poly(ADP-ribose) polymerase and sirtuin enzymes. *Mol Aspects Med* **34**:1168-201.
- Cao, K., Dong, Y.-T., Xiang, J., Xu, Y., Hong, W., Song, H. & Guan, Z.-Z. 2018. Reduced expression of SIRT1 and SOD-1 and the correlation between these levels in various regions of the brains of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Pathology* **71**:1090-99.
- Carney, B., Kossatz, S., Lok, B. H., Schneeberger, V., Gangangari, K. K., Pillarsetty, N. V. K., Weber, W. A., Rudin, C. M., Poirier, J. T. & Reiner, T. 2018. Target engagement imaging of PARP inhibitors in small-cell lung cancer. *Nature Communications* **9**:176.
- Ceccom, J., Loukh, N., Lauwers-Cances, V., Touriol, C., Nicaise, Y., Gentil, C., Uro-Coste, E., Pitson, S., Maurage, C. A., Duyckaerts, C., Cuvillier, O. & Delisle, M.-B. 2014. Reduced sphingosine kinase-1 and enhanced sphingosine 1-phosphate lyase expression demonstrate deregulated sphingosine 1-phosphate signaling in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications* **2**:12.
- Chakrabarti, S. S., Bir, A., Poddar, J., Sinha, M., Ganguly, A. & Chakrabarti, S. 2016. Ceramide and Sphingosine-1-Phosphate in Cell Death Pathways : Relevance to the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research* **13**:1232-48.
- Chalimoniuk, M., Stolecka, A., Cakala, M., Hauptmann, S., Schulz, K., Lipka, U., Leuner, K., Eckert, A., Muller, W. E. & Strosznajder, J. B. 2007. Amyloid beta enhances cytosolic phospholipase A2 level and arachidonic acid release via nitric oxide in APP-transfected PC12 cells. *Acta biochimica Polonica* **54**:611-23.

- Chami, L. & Checler, F. 2012. BACE1 is at the crossroad of a toxic vicious cycle involving cellular stress and  $\beta$ -amyloid production in Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration* **7**:52-52.
- Chen, C. H., Zhou, W., Liu, S., Deng, Y., Cai, F., Tone, M., Tone, Y., Tong, Y. & Song, W. 2012. Increased NF-kappaB signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease. *The international journal of neuropsychopharmacology* **15**:77-90.
- Chen, J., Zhou, Y., Mueller-Steiner, S., Chen, L. F., Kwon, H., Yi, S., Mucke, L. & Gan, L. 2005. SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. *J Biol Chem* **280**:40364-74.
- Chen, T., Liu, J., Li, N., Wang, S., Liu, H., Li, J., Zhang, Y. & Bu, P. 2015. Mouse SIRT3 attenuates hypertrophy-related lipid accumulation in the heart through the deacetylation of LCAD. *PLoS One* **10**:e0118909.
- Choi, J.-E. & Mostoslavsky, R. 2014. Sirtuins, metabolism, and DNA repair. *Curr Opin Genet Dev* **26**:24-32.
- Choi, S. E., Kwon, S., Seok, S., Xiao, Z., Lee, K.-W., Kang, Y., Li, X., Shinoda, K., Kajimura, S., Kemper, B. & Kemper, J. K. 2017. Obesity-Linked Phosphorylation of SIRT1 by Casein Kinase 2 Inhibits Its Nuclear Localization and Promotes Fatty Liver. *Molecular and cellular biology* **37**:e00006-17.
- Chun, J. & Hartung, H.-P. 2010. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clinical neuropharmacology* **33**:91-101.
- Cieřlik, M., Czapski, G. A. & Strosznajder, J. B. 2015. The Molecular Mechanism of Amyloid beta42 Peptide Toxicity: The Role of Sphingosine Kinase-1 and Mitochondrial Sirtuins. *PLoS One* **10**:e0137193.
- Cirrito, J. R., Yamada, K. A., Finn, M. B., Sloviter, R. S., Bales, K. R., May, P. C., Schoepp, D. D., Paul, S. M., Mennerick, S. & Holtzman, D. M. 2005. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron* **48**:913-22.
- Couttas, T. A., Kain, N., Daniels, B., Lim, X. Y., Shepherd, C., Kril, J., Pickford, R., Li, H., Garner, B. & Don, A. S. 2014. Loss of the neuroprotective factor Sphingosine 1-phosphate early in Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathologica Communications* **2**:9.
- Couttas, T. A., Kain, N., Tran, C., Chatterton, Z., Kwok, J. B. & Don, A. S. 2018. Age-Dependent Changes to Sphingolipid Balance in the Human Hippocampus are Gender-Specific and May Sensitize to Neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* **63**:503-14.
- Credle, J. J., George, J. L., Wills, J., Duka, V., Shah, K., Lee, Y. C., Rodriguez, O., Simkins, T., Winter, M., Moechars, D., Steckler, T., Goudreau, J., Finkelstein, D. I. & Sidhu, A. 2014. GSK-3 $\beta$  dysregulation contributes to parkinson's-like pathophysiology with associated region-specific phosphorylation and accumulation of tau and  $\alpha$ -synuclein. *Cell Death And Differentiation* **22**:838.
- Cummings, J. L., Morstorf, T. & Zhong, K. 2014. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Research & Therapy* **6**:37.
- Cummings, J. L., Tong, G. & Ballard, C. 2019. Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **67**:779-94.
- Cutler, R. G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W. A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J. C. & Mattson, M. P. 2004. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**.

- Cuvillier, O., Pirianov, G. & Kleuser, B. 1996. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* **381**.
- Czapski, G. A., Cieřlik, M., Wencel, P. L., Wójtowicz, S., Strosznajder, R. P. & Strosznajder, J. B. 2018. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 alters expression of mitochondria-related genes in PC12 cells: relevance to mitochondrial homeostasis in neurodegenerative disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1865**:281-88.
- Czeczor, J. K. & McGee, S. L. 2017. Emerging roles for the amyloid precursor protein and derived peptides in the regulation of cellular and systemic metabolism. *Journal of neuroendocrinology* **29**.
- Czubowicz, K., Cieslik, M., Pyszko, J., Strosznajder, J. B. & Strosznajder, R. P. 2015. Sphingosine-1-phosphate and its effect on glucose deprivation/glucose reload stress: from gene expression to neuronal survival. *Mol Neurobiol* **51**:1300-8.
- Czubowicz, K., Jeřsko, H., Wencel, P., Lukiw, W. J. & Strosznajder, R. P. 2019. The Role of Ceramide and Sphingosine-1-Phosphate in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Molecular Neurobiology*.
- Czubowicz, K. & Strosznajder, R. 2014. Ceramide in the Molecular Mechanisms of Neuronal Cell Death. The Role of Sphingosine-1-Phosphate. *Molecular Neurobiology* **50**:26-37.
- Czubowicz, K., Wójtowicz, S., Wencel, P. L. & Strosznajder, R. P. 2018. The role of ceramide and SEW 2871 in the transcription of enzymes involved in amyloid b precursor protein metabolism in an experimental model of Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica* **56**:196-205.
- Dai, S. H., Chen, T., Wang, Y. H., Zhu, J., Luo, P., Rao, W., Yang, Y. F., Fei, Z. & Jiang, X. F. 2014. Sirt3 attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress through the preservation of mitochondrial function in HT22 cells. *International journal of molecular medicine* **34**:1159-68.
- Danzer, K. M., Haasen, D., Karow, A. R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretschmar, H., Hengerer, B. & Kostka, M. 2007. Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J Neurosci* **27**:9220-32.
- Di Pardo, A. & Maglione, V. 2018. Sphingolipid Metabolism: A New Therapeutic Opportunity for Brain Degenerative Disorders. *Frontiers in neuroscience* **12**:249-49.
- Dittenhafer-Reed, K. E., Richards, A. L., Fan, J., Smallegan, M. J., Fotuhi Siahpirani, A., Kemmerer, Z. A., Prolla, T. A., Roy, S., Coon, J. J. & Denu, J. M. 2015. SIRT3 mediates multi-tissue coupling for metabolic fuel switching. *Cell Metab* **21**:637-46.
- Dominguez, G., Maddelein, M.-L., Pucelle, M., Nicaise, Y., Maurage, C.-A., Duyckaerts, C., Cuvillier, O. & Delisle, M.-B. 2018. Neuronal sphingosine kinase 2 subcellular localization is altered in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathologica Communications* **6**:25.
- Don, A. S., Martinez-Lamenca, C., Webb, W. R., Proia, R. L., Roberts, E. & Rosen, H. 2007. Essential requirement for sphingosine kinase 2 in a sphingolipid apoptosis pathway activated by FTY720 analogues. *J Biol Chem* **282**.
- Donoviel, M. S., Hait, N. C., Ramachandran, S., Maceyka, M., Takabe, K., Milstien, S., Oravec, T. & Spiegel, S. 2015. Spinster 2, a sphingosine-1-phosphate transporter, plays a critical role in inflammatory and autoimmune diseases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **29**:5018-28.
- Dorszewska, J., Prendecki, M., Oczkowska, A., Dezor, M. & Kozubski, W. 2016. Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research* **13**:952-63.

- Drews, A., Flint, J., Shivji, N., Jönsson, P., Wirthensohn, D., De Genst, E., Vincke, C., Muyldermans, S., Dobson, C. & Klenerman, D. 2016. Individual aggregates of amyloid beta induce temporary calcium influx through the cell membrane of neuronal cells. *Scientific reports* **6**:31910-10.
- Du, J., Zhou, Y., Su, X., Yu, J. J., Khan, S., Jiang, H., Kim, J., Woo, J., Kim, J. H., Choi, B. H., He, B., Chen, W., Zhang, S., Cerione, R. A., Auwerx, J., Hao, Q. & Lin, H. 2011. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science* **334**:806-9.
- Duka, T., Duka, V., Joyce, J. N. & Sidhu, A. 2009.  $\alpha$ -Synuclein contributes to GSK-3 $\beta$ -catalyzed Tau phosphorylation in Parkinson's disease models. *The FASEB Journal* **23**:2820-30.
- Eckert, A., Hauptmann, S., Scherping, I., Meinhardt, J., Rhein, V., Drose, S., Brandt, U., Fandrich, M., Muller, W. E. & Gotz, J. 2008. Oligomeric and fibrillar species of beta-amyloid (A beta 42) both impair mitochondrial function in P301L tau transgenic mice. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **86**:1255-67.
- El Amki, M., Lerouet, D., Garraud, M., Teng, F., Beray-Berthat, V., Coqueran, B., Barsacq, B., Abbou, C., Palmier, B., Marchand-Leroux, C. & Margail, I. 2018. Improved Reperfusion and Vasculoprotection by the Poly(ADP-Ribose)Polymerase Inhibitor PJ34 After Stroke and Thrombolysis in Mice. *Molecular Neurobiology* **55**:9156-68.
- Ellis, B., Hye, A. & Snowden, S. G. 2015. Metabolic Modifications in Human Biofluids Suggest the Involvement of Sphingolipid, Antioxidant, and Glutamate Metabolism in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *J Alzheimers Dis* **46**:313-27.
- Endres, K. & Deller, T. 2017. Regulation of Alpha-Secretase ADAM10 In vitro and In vivo: Genetic, Epigenetic, and Protein-Based Mechanisms. *Front Mol Neurosci* **10**:56-56.
- Espaillat, M. P., Shamseddine, A. A., Adada, M. M., Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. 2015. Ceramide and sphingosine-1-phosphate in cancer, two faces of the sphinx. *Translational Cancer Research* **4**:484-99.
- Ferreira, S. T., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M. & De Felice, F. G. 2015. Soluble amyloid- $\beta$  oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Frontiers in cellular neuroscience* **9**:191-91.
- Filippov, V., Song, M. A., Zhang, K., Vinters, H. V., Tung, S., Kirsch, W. M., Yang, J. & Duerksen-Hughes, P. J. 2012. Increased ceramide in brains with Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's Disease* **29**:537-47.
- Finley, L. W., Haas, W., Desquret-Dumas, V., Wallace, D. C., Procaccio, V., Gygi, S. P. & Haigis, M. C. 2011. Succinate dehydrogenase is a direct target of sirtuin 3 deacetylase activity. *PLoS One* **6**:e23295.
- Folch, J., Petrov, D., Ettcheto, M., Abad, S., #xe1, nchez-L, #xf3, pez, E., Garc, #xed, a, M. L., Olloquequi, J., Beas-Zarate, C., Auladell, C. & Camins, A. 2016. Current Research Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Treatment. *Neural Plasticity* **2016**:15.
- Fortin, D. L., Troyer, M. D., Nakamura, K., Kubo, S., Anthony, M. D. & Edwards, R. H. 2004. Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *J Neurosci* **24**:6715-23.
- Fu, L., Sun, Y., Guo, Y., Chen, Y., Yu, B., Zhang, H., Wu, J., Yu, X., Kong, W. & Wu, H. 2017. Comparison of neurotoxicity of different aggregated forms of Abeta40, Abeta42 and Abeta43 in cell cultures. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **23**:245-51.
- Fu, P., Ebenezer, D. L., Ha, A. W., Suryadevara, V., Harijith, A. & Natarajan, V. 2018. Nuclear lipid mediators: Role of nuclear sphingolipids and sphingosine-1-phosphate

- signaling in epigenetic regulation of inflammation and gene expression. *Journal of Cellular Biochemistry* **119**:6337-53.
- Gao, Z., Wang, H., Xiao, F.-J., Shi, X.-F., Zhang, Y.-K., Xu, Q. Q., Zhang, X.-Y., Ha, X.-Q. & Wang, L.-S. 2016. SIRT1 mediates Sphk1/S1P-induced proliferation and migration of endothelial cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* **74**:152-60.
- Gatz, M., Reynolds, C. A., Fratiglioni, L., Johansson, B., Mortimer, J. A., Berg, S., Fiske, A. & Pedersen, N. L. 2006. Role of Genes and Environments for Explaining Alzheimer Disease. *JAMA Psychiatry* **63**:168-74.
- Gąssowska, M., Cieslik, M., Wilkaniec, A. & Strosznajder, J. B. 2014a. Sphingosine Kinases/Sphingosine-1-Phosphate and Death Signalling in APP-Transfected Cells. *Neurochemical Research* **39**:645-52.
- Gąssowska, M., Czapski, G., Pajak, B., Cieslik, M., Lenkiewicz, A. & Adamczyk, A. 2014b. *Extracellular  $\alpha$ -Synuclein Leads to Microtubule Destabilization via GSK-3 $\beta$ -Dependent Tau Phosphorylation in PC12 Cells.* e94259.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L. & et al. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**:704-6.
- Gol, M., Ghorbanian, D., Hassanzadeh, S., Javan, M., Mirnajafi-Zadeh, J. & Ghasemi-Kasman, M. 2017. Fingolimod enhances myelin repair of hippocampus in pentylenetetrazol-induced kindling model. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **96**:72-83.
- Gomez-Brouchet, A., Pchejetski, D. & Let, B. 2007. Critical role for sphingosine kinase-1 in regulating survival of neuroblastoma cells exposed to amyloid-beta peptide. *Mol Pharmacol* **72**.
- Gomez-Munoz, A., Kong, J. Y., Salh, B. & Steinbrecher, U. P. 2004. Ceramide-1-phosphate blocks apoptosis through inhibition of acid sphingomyelinase in macrophages. *J Lipid Res* **45**:99-105.
- Gómez-Muñoz, A., Kong, J. Y., Parhar, K., Wang, S. W., Gangoiti, P., González, M., Eivemark, S., Salh, B., Duronio, V. & Steinbrecher, U. P. 2005. Ceramide-1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *FEBS Letters* **579**:3744-50.
- Granado, M. H., Gangoiti, P., Ouro, A., Arana, L. & Gomez-Munoz, A. 2009. Ceramide 1-phosphate inhibits serine palmitoyltransferase and blocks apoptosis in alveolar macrophages. *Biochim Biophys Acta* **1791**:263-72.
- Grozeva, D., Saad, S., Menzies, G. E. & Sims, R. 2019. Benefits and Challenges of Rare Genetic Variation in Alzheimer's Disease. *Current Genetic Medicine Reports* **7**:53-62.
- Gu, L. & Guo, Z. 2013. Alzheimer's A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *Journal of neurochemistry* **126**:305-11.
- Guarente, L. 2011. Sirtuins, aging, and metabolism. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **76**:81-90.
- Hadar, A., Milanesi, E., Walczak, M., Puzianowska-Kuźnicka, M., Kuźnicki, J., Squassina, A., Niola, P., Chillotti, C., Attems, J., Gozes, I. & Gurwitz, D. 2018. SIRT1, miR-132 and miR-212 link human longevity to Alzheimer's Disease. *Scientific Reports* **8**:8465.
- Haigis, M. C. & Guarente, L. P. 2006. Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* **20**:2913-21.

- Haigis, M. C., Mostoslavsky, R., Haigis, K. M., Fahie, K., Christodoulou, D. C., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Karow, M., Blander, G., Wolberger, C., Prolla, T. A., Weindruch, R., Alt, F. W. & Guarente, L. 2006. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* **126**:941-54.
- Hait, N. C., Allegood, J., Maceyka, M., Strub, G. M., Harikumar, K. B., Singh, S. K., Luo, C., Marmorstein, R., Kordula, T., Milstien, S. & Spiegel, S. 2009. Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* **325**:1254-7.
- Hait, N. C., Avni, D., Yamada, A., Nagahashi, M., Aoyagi, T., Aoki, H., Dumur, C. I., Zelenko, Z., Gallagher, E. J., Leroith, D., Milstien, S., Takabe, K. & Spiegel, S. 2015. The phosphorylated prodrug FTY720 is a histone deacetylase inhibitor that reactivates ER $\alpha$  expression and enhances hormonal therapy for breast cancer. *Oncogenesis* **4**:e156.
- Hait, N. C. & Maiti, A. 2017. The Role of Sphingosine-1-Phosphate and Ceramide-1-Phosphate in Inflammation and Cancer. *Mediators of inflammation* **2017**:4806541.
- Hait, N. C., Wise, L. E., Allegood, J. C., O'Brien, M., Avni, D., Reeves, T. M., Knapp, P. E., Lu, J., Luo, C., Miles, M. F., Milstien, S., Lichtman, A. H. & Spiegel, S. 2014. Active, phosphorylated fingolimod inhibits histone deacetylases and facilitates fear extinction memory. *Nature neuroscience* **17**:971-80.
- Hamilton, R. L. 2000. Lewy bodies in Alzheimer's disease: a neuropathological review of 145 cases using alpha-synuclein immunohistochemistry. *Brain Pathol* **10**:378-84.
- Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**:139-50.
- Hardy, J. & Higgins, G. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**:184-85.
- Hasegawa, Y., Suzuki, H., Sozen, T., Rolland, W. & Zhang, J. H. 2010. Activation of Sphingosine 1-Phosphate Receptor-1 by FTY720 Is Neuroprotective After Ischemic Stroke in Rats. *Stroke* **41**:368-74.
- Hassa, P. O., Haenni, S. S., Buerki, C., Meier, N. I., Lane, W. S., Owen, H., Gersbach, M., Imhof, R. & Hottiger, M. O. 2005. Acetylation of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 by p300/CREB-binding Protein Regulates Coactivation of NF- $\kappa$ B-dependent Transcription. *Journal of Biological Chemistry* **280**:40450-64.
- Haughey, N. J., Bandaru, V. V., Bae, M. & Mattson, M. P. 2010. Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuropathogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1801**:878-86.
- Hayden, E. Y. & Teplow, D. B. 2013. Amyloid  $\beta$ -protein oligomers and Alzheimer's disease. *Alzheimer's research & therapy* **5**:60-60.
- He, X., Huang, Y., Li, B., Gong, C. X. & Schuchman, E. H. 2010. Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **31**:398-408.
- Hearps, A. C., Burrows, J., Connor, C. E., Woods, G. M., Lowenthal, R. M. & Ragg, S. J. 2002. Mitochondrial cytochrome c release precedes transmembrane depolarisation and caspase-3 activation during ceramide-induced apoptosis of Jurkat T cells. *Apoptosis* **7**:387-94.
- Hemmati, F., Dargahi, L., Nasoohi, S., Omidbakhsh, R., Mohamed, Z., Chik, Z., Naidu, M. & Ahmadiani, A. 2013. Neurorestorative effect of FTY720 in a rat model of Alzheimer's disease: Comparison with Memantine. *Behavioural Brain Research* **252**:415-21.
- Hernandez-Guillamon, M., Mawhirt, S., Blais, S., Montaner, J., Neubert, T. A., Rostagno, A. & Ghiso, J. 2015. Sequential Amyloid- $\beta$  Degradation by the Matrix



- Metalloproteases MMP-2 and MMP-9. *The Journal of biological chemistry* **290**:15078-91.
- Herskovits, A. Z. & Guarente, L. 2014. SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence. *Neuron* **81**:471-83.
- Hicks, D. A., Nalivaeva, N. N. & Turner, A. J. 2012. Lipid rafts and Alzheimer's disease: protein-lipid interactions and perturbation of signaling. *Frontiers in physiology* **3**:189.
- Hirschey, M. D., Shimazu, T., Capra, J. A., Pollard, K. S. & Verdin, E. 2011. SIRT1 and SIRT3 deacetylate homologous substrates: AceCS1,2 and HMGCS1,2. *Aging* **3**:635-42.
- Ho, L., Titus, A. S., Banerjee, K. K., George, S., Lin, W., Deota, S., Saha, A. K., Nakamura, K., Gut, P., Verdin, E. & Kolthur-Seetharam, U. 2013. SIRT4 regulates ATP homeostasis and mediates a retrograde signaling via AMPK. *Aging* **5**:835-49.
- Hoffmann, F. S., Hofreiter, J., Rüksamen, H., Melms, J., Schwarz, S., Faber, H., Weber, P., Pütz, B., Loleit, V., Weber, F., Hohlfeld, R., Meinl, E. & Krumbholz, M. 2015. Fingolimod induces neuroprotective factors in human astrocytes. *Journal of neuroinflammation* **12**:184-84.
- Hsu, C. P., Zhai, P., Yamamoto, T., Maejima, Y., Matsushima, S., Hariharan, N., Shao, D., Takagi, H., Oka, S. & Sadoshima, J. 2010. Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion. *Circulation* **122**:2170-82.
- Hu, X. M., Dong, W., Cui, Z. W., Gao, C. Z., Yu, Z. J., Yuan, Q. & Min, Z. L. 2018. In silico identification of AChE and PARP-1 dual-targeted inhibitors of Alzheimer's disease. *Journal of molecular modeling* **24**:151.
- Huang, K., Huang, J., Chen, C., Hao, J., Wang, S., Huang, J., Liu, P. & Huang, H. 2014. AP-1 regulates sphingosine kinase 1 expression in a positive feedback manner in glomerular mesangial cells exposed to high glucose. *Cell Signal* **26**:629-38.
- Irvine, G. B., El-Agnaf, O. M., Shankar, G. M. & Walsh, D. M. 2008. Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* **14**:451-64.
- Iwahara, T., Bonasio, R., Narendra, V. & Reinberg, D. 2012. SIRT3 functions in the nucleus in the control of stress-related gene expression. *Molecular and cellular biology* **32**:5022-34.
- Jana, A. & Pahan, K. 2010. Fibrillar amyloid- $\beta$ -activated human astroglia kill primary human neurons via neutral sphingomyelinase: implications for Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* **30**:12676-89.
- Javle, M. & Curtin, N. J. 2011. The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation. *Br J Cancer* **105**:1114-22.
- Jembrek, M. J., Babić, M., Pivac, N., Hof, P. R. & Šimić, G. 2013. Hyperphosphorylation of tau by GSK-3 $\beta$  in Alzheimer's disease: The interaction of A $\beta$  and sphingolipid mediators as a therapeutic target. *Translational Neuroscience* **4**:466-76.
- Jeong, J., Juhn, K., Lee, H., Kim, S.-H., Min, B.-H., Lee, K.-M., Cho, M.-H., Park, G.-H. & Lee, K.-H. 2007. SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. *Experimental & Molecular Medicine* **39**:8.
- Jęsko, H. & Strosznajder, R. P. 2016. Sirtuins and their interactions with transcription factors and poly(ADP-ribose) polymerases. *Folia Neuropathologica* **3**:212-33.
- Jęsko, H., Wencel, P., Strosznajder, R. P. & Strosznajder, J. B. 2017. Sirtuins and Their Roles in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders. *Neurochemical Research* **42**:876-90.

- Jęsko, H., Wencel, P. L., Lukiw, W. J. & Strosznajder, R. P. 2019. Modulatory Effects of Fingolimod (FTY720) on the Expression of Sphingolipid Metabolism-Related Genes in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology* **56**:174-85.
- Joshi, P., Gabrielli, M., Ponzoni, L., Pelucchi, S., Stravalaci, M., Beeg, M., Mazzitelli, S., Braida, D., Sala, M., Boda, E., Buffo, A., Gobbi, M., Gardoni, F., Matteoli, M., Marcello, E. & Verderio, C. 2017. Fingolimod Limits Acute A $\beta$  Neurotoxicity and Promotes Synaptic Versus Extrasynaptic NMDA Receptor Functionality in Hippocampal Neurons. *Scientific Reports* **7**:41734.
- Julien, C., Tremblay, C., Emond, V., Lebbadi, M., Salem, N., Jr., Bennett, D. A. & Calon, F. 2009. Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of tau in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**:48-58.
- Kam, T.-I., Mao, X., Park, H., Chou, S.-C., Karuppagounder, S. S., Umanah, G. E., Yun, S. P., Brahmachari, S., Panicker, N., Chen, R., Andrabi, S. A., Qi, C., Poirier, G. G., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Bekris, L. M., Leverenz, J. B., Pantelyat, A., Ko, H. S., Rosenthal, L. S., Dawson, T. M. & Dawson, V. L. 2018. Poly(ADP-ribose) drives pathologic  $\alpha$ -synuclein neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)* **362**:eaat8407.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S. & Malinow, R. 2003. APP processing and synaptic function. *Neuron* **37**:925-37.
- Kaminsky, Y. G., Tikhonova, L. A. & Kosenko, E. A. 2015. Critical analysis of Alzheimer's amyloid-beta toxicity to mitochondria. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* **20**:173-97.
- Katsel, P., Li, C. & Haroutunian, V. 2007. Gene expression alterations in the sphingolipid metabolism pathways during progression of dementia and Alzheimer's disease: a shift toward ceramide accumulation at the earliest recognizable stages of Alzheimer's disease? *Neurochem Res* **32**.
- Kauppinen, T. M., Gan, L. & Swanson, R. A. 2013. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-induced NAD(+) depletion promotes nuclear factor-kappaB transcriptional activity by preventing p65 de-acetylation. *Biochim Biophys Acta* **1833**:1985-91.
- Kauppinen, T. M., Suh, S. W., Higashi, Y., Berman, A. E., Escartin, C., Won, S. J., Wang, C., Cho, S. H., Gan, L. & Swanson, R. A. 2011. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 modulates microglial responses to amyloid beta. *J Neuroinflammation* **8**:152.
- Kayed, R. & Lasagna-Reeves, C. A. 2013. Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *Journal of Alzheimer's Disease* **33**:S67-S78.
- Kaźmierczak, A., Strosznajder, J. B. & Adamczyk, A. 2008. alpha-Synuclein enhances secretion and toxicity of amyloid beta peptides in PC12 cells. *Neurochem Int* **53**:263-9.
- Kim, H. S., Patel, K., Muldoon-Jacobs, K., Bisht, K. S., Aykin-Burns, N., Pennington, J. D., van der Meer, R., Nguyen, P., Savage, J., Owens, K. M., Vassilopoulos, A., Ozden, O., Park, S. H., Singh, K. K., Abdulkadir, S. A., Spitz, D. R., Deng, C. X. & Gius, D. 2010. SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer cell* **17**:41-52.
- Kim, S. H., Lu, H. F. & Alano, C. C. 2011. Neuronal Sirt3 protects against excitotoxic injury in mouse cortical neuron culture. *PLoS One* **6**:e14731.
- Kincaid, B. & Bossy-Wetzel, E. 2013. Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* **5**:48.
- Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J. & Hannun, Y. A. 2008. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal* **20**:1010-8.

- Kunkle, B. W., Grenier-Boley, B., Sims, R., Bis, J. C., Damotte, V., Naj, A. C., Boland, A., Vronskaya, M., van der Lee, S. J., Amlie-Wolf, A., Bellenguez, C., Frizatti, A., Chouraki, V., Martin, E. R., Sleegers, K., Badarinarayan, N., Jakobsdottir, J., Hamilton-Nelson, K. L., Moreno-Grau, S., Olaso, R., Raybould, R., Chen, Y., Kuzma, A. B., Hiltunen, M., Morgan, T., Ahmad, S., Vardarajan, B. N., Epelbaum, J., Hoffmann, P., Boada, M., Beecham, G. W., Garnier, J.-G., Harold, D., Fitzpatrick, A. L., Valladares, O., Moutet, M.-L., Gerrish, A., Smith, A. V., Qu, L., Bacq, D., Denning, N., Jian, X., Zhao, Y., Del Zompo, M., Fox, N. C., Choi, S.-H., Mateo, I., Hughes, J. T., Adams, H. H., Malamon, J., Sanchez-Garcia, F., Patel, Y., Brody, J. A., Dombroski, B. A., Naranjo, M. C. D., Daniilidou, M., Eiriksdottir, G., Mukherjee, S., Wallon, D., Uphill, J., Aspelund, T., Cantwell, L. B., Garzia, F., Galimberti, D., Hofer, E., Butkiewicz, M., Fin, B., Scarpini, E., Sarnowski, C., Bush, W. S., Meslage, S., Kornhuber, J., White, C. C., Song, Y., Barber, R. C., Engelborghs, S., Sordon, S., Voijnovic, D., Adams, P. M., Vandenberghe, R., Mayhaus, M., Cupples, L. A., Albert, M. S., De Deyn, P. P., Gu, W., Himali, J. J., Beekly, D., Squassina, A., Hartmann, A. M., Orellana, A., Blacker, D., Rodriguez-Rodriguez, E., Lovestone, S., Garcia, M. E., Doody, R. S., Munoz-Fernandez, C., Sussams, R., Lin, H., Fairchild, T. J., Benito, Y. A., et al. 2019. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A $\beta$ , tau, immunity and lipid processing. *Nature Genetics* **51**:414-30.
- Kurano, M., Hara, M., Nojiri, T., Ikeda, H., Tsukamoto, K. & Yatomi, Y. 2016. Resveratrol exerts a biphasic effect on apolipoprotein M. *British Journal of Pharmacology* **173**:222-33.
- Kwon, S., Seok, S., Yau, P., Li, X., Kemper, B. & Kemper, J. K. 2017. Obesity and aging diminish sirtuin 1 (SIRT1)-mediated deacetylation of SIRT3, leading to hyperacetylation and decreased activity and stability of SIRT3. *The Journal of biological chemistry* **292**:17312-23.
- Kwon, Y., Kim, J., Lee, C. Y. & Kim, H. 2015. Expression of SIRT1 and SIRT3 varies according to age in mice. *Anat Cell Biol* **48**:54-61.
- Lai, Y.-C., Baker, J. S., Donti, T., Graham, B. H., Craigen, W. J. & Anderson, A. E. 2017. Mitochondrial Dysfunction Mediated by Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Activation Contributes to Hippocampal Neuronal Damage Following Status Epilepticus. *International journal of molecular sciences* **18**:1502.
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A. & Klein, W. L. 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:6448-53.
- Lanoiselée, H.-M., Nicolas, G., Wallon, D., Rovelet-Lecrux, A., Lacour, M., Rousseau, S., Richard, A.-C., Pasquier, F., Rollin-Sillaire, A., Martinaud, O., Quillard-Muraine, M., de la Sayette, V., Boutoleau-Bretonniere, C., Etcharry-Bouyx, F., Chauviré, V., Sarazin, M., le Ber, I., Epelbaum, S., Jonveaux, T., Rouaud, O., Ceccaldi, M., Félician, O., Godefroy, O., Formaglio, M., Croisile, B., Auriacombe, S., Chamard, L., Vincent, J.-L., Sauvé, M., Marelli-Tosi, C., Gabelle, A., Ozsancak, C., Pariente, J., Paquet, C., Hannequin, D., Champion, D. & collaborators of the, C. N. R. M. A. J. p. 2017. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS medicine* **14**:e1002270-e70.

- 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**:932-40.
- Larson, M. E., Greimel, S. J., Amar, F., LaCroix, M., Boyle, G., Sherman, M. A., Schley, H., Miel, C., Schneider, J. A., Kaye, R., Benfenati, F., Lee, M. K., Bennett, D. A. & Lesné, S. E. 2017. Selective lowering of synapsins induced by oligomeric  $\alpha$ -synuclein exacerbates memory deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**:E4648-E57.
- Lee, H. R., Shin, H. K., Park, S. Y., Kim, H. Y., Lee, W. S., Rhim, B. Y., Hong, K. W. & Kim, C. D. 2014. Cilostazol suppresses beta-amyloid production by activating a disintegrin and metalloproteinase 10 via the upregulation of SIRT1-coupled retinoic acid receptor-beta. *J Neurosci Res* **92**:1581-90.
- Lee, J.-T., Xu, J., Lee, J.-M., Ku, G., Han, X., Yang, D.-I., Chen, S. & Hsu, C. Y. 2004. Amyloid- $\beta$  peptide induces oligodendrocyte death by activating the neutral sphingomyelinase-ceramide pathway. *The Journal of cell biology* **164**:123-31.
- Lee, J., Kim, Y., Liu, T., Hwang, Y. J., Hyeon, S. J., Im, H., Lee, K., Alvarez, V. E., McKee, A. C., Um, S. J., Hur, M., Mook-Jung, I., Kowall, N. W. & Ryu, H. 2018a. SIRT3 deregulation is linked to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Aging cell* **17**.
- Lee, J. Y., Han, S. H., Park, M. H., Baek, B., Song, I.-S., Choi, M.-K., Takuwa, Y., Ryu, H., Kim, S. H., He, X., Schuchman, E. H., Bae, J.-S. & Jin, H. K. 2018b. Neuronal SphK1 acetylates COX2 and contributes to pathogenesis in a model of Alzheimer's Disease. *Nature communications* **9**:1479-79.
- Li, H. T., Du, H. N., Tang, L., Hu, J. & Hu, H. Y. 2002. Structural transformation and aggregation of human alpha-synuclein in trifluoroethanol: non-amyloid component sequence is essential and beta-sheet formation is prerequisite to aggregation. *Biopolymers* **64**:221-6.
- Li, M.-Z., Zheng, L.-J., Shen, J., Li, X.-Y., Zhang, Q., Bai, X., Wang, Q.-S. & Ji, J.-G. 2018. SIRT1 facilitates amyloid beta peptide degradation by upregulating lysosome number in primary astrocytes. *Neural regeneration research* **13**:2005-13.
- Li, R., Lindholm, K., Yang, L.-B., Yue, X., Citron, M., Yan, R., Beach, T., Sue, L., Sabbagh, M., Cai, H., Wong, P., Price, D. & Shen, Y. 2004. Amyloid  $\beta$  peptide load is correlated with increased  $\beta$ -secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:3632-37.
- Liao, M.-C. & Van Nostrand, W. E. 2010. Degradation of soluble and fibrillar amyloid beta-protein by matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in vitro. *Biochemistry* **49**:1127-36.
- Lieberman, O. J., Choi, S. J., Kanter, E., Saverchenko, A., Frier, M. D., Fiore, G. M., Wu, M., Kondapalli, J., Zampese, E., Surmeier, D. J., Sulzer, D. & Mosharov, E. V. 2017.  $\alpha$ -Synuclein-Dependent Calcium Entry Underlies Differential Sensitivity of Cultured SN and VTA Dopaminergic Neurons to a Parkinsonian Neurotoxin. *eNeuro* **4**:ENEURO.0167-17.2017.
- Lindersson, E., Beedholm, R., Hojrup, P., Moos, T., Gai, W., Hendil, K. B. & Jensen, P. H. 2004. Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. *J Biol Chem* **279**:12924-34.
- Liszt, G., Ford, E., Kurtev, M. & Guarente, L. 2005. Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* **280**:21313-20.
- Liu, F., Li, X., Lu, C., Bai, A., Bielawski, J., Bielawska, A., Marshall, B., Schoenlein, P. V., Lebedeva, I. O. & Liu, K. 2016. Ceramide activates lysosomal cathepsin B and

- cathepsin D to attenuate autophagy and induces ER stress to suppress myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget* **7**:83907-25.
- Liu, M., Wang, Z., Ren, M., Yang, X., Liu, B., Qi, H., Yu, M., Song, S., Chen, S., Liu, L., Zhang, Y., Zou, J., Zhu, W. G., Yin, Y. & Luo, J. 2019. SIRT4 regulates PTEN stability through IDE in response to cellular stresses. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **33**:5535-47.
- Love, S., Barber, R. & Wilcock, G. K. 1999. Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain* **122 ( Pt 2)**:247-53.
- Lutz, M. I., Milenkovic, I., Regelsberger, G. & Kovacs, G. G. 2014. Distinct Patterns of Sirtuin Expression During Progression of Alzheimer's Disease. *NeuroMolecular Medicine* **16**:405-14.
- Maceyka, M., Harikumar, K. B., Milstien, S. & Spiegel, S. 2012. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol* **22**:50-60.
- Maceyka, M., Sankala, H., Hait, N. C., Le Stunff, H., Liu, H., Toman, R., Collier, C., Zhang, M., Satin, L. S., Merrill, A. H., Jr., Milstien, S. & Spiegel, S. 2005. SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem* **280**:37118-29.
- Mahlknecht, U. & Voelter-Mahlknecht, S. 2011. Genomic organization and localization of the NAD-dependent histone deacetylase gene sirtuin 3 (Sirt3) in the mouse. *Int J Oncol* **38**:813-22.
- Majbour, N. K., Chiasserini, D., Vaikath, N. N., Eusebi, P., Tokuda, T., van de Berg, W., Parnetti, L., Calabresi, P. & El-Agnaf, O. M. A. 2017. Increased levels of CSF total but not oligomeric or phosphorylated forms of alpha-synuclein in patients diagnosed with probable Alzheimer's disease. *Scientific Reports* **7**:40263.
- Mandal, P. K., Pettegrew, J. W., Masliah, E., Hamilton, R. L. & Mandal, R. 2006. Interaction between A $\beta$  Peptide and  $\alpha$  Synuclein: Molecular Mechanisms in Overlapping Pathology of Alzheimer's and Parkinson's in Dementia with Lewy Body Disease. *Neurochemical Research* **31**:1153-62.
- Marsh, S. E. & Blurton-Jones, M. 2012. Examining the mechanisms that link  $\beta$ -amyloid and  $\alpha$ -synuclein pathologies. *Alzheimer's research & therapy* **4**:11-11.
- Martin, R. & Sospedra, M. 2014. Sphingosine-1 Phosphate and Central Nervous System. In: Oldstone, M. B. A. & Rosen, H. [Eds.] *Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Immunology and Infectious Diseases*. Springer International Publishing, Cham, pp. 149-70.
- Martire, S., Fuso, A., Rotili, D., Tempera, I., Giordano, C., De Zottis, I., Muzi, A., Vernole, P., Graziani, G., Lococo, E., Faraldi, M., Maras, B., Scarpa, S., Mosca, L. & d'Erme, M. 2013. PARP-1 modulates amyloid beta peptide-induced neuronal damage. *PLoS One* **8**:e72169.
- Martire, S., Mosca, L. & d'Erme, M. 2015. PARP-1 involvement in neurodegeneration: A focus on Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mech Ageing Dev* **146-148**:53-64.
- Masliah, E., Ellisman, M., Carragher, B., Mallory, M., Young, S., Hansen, L., DeTeresa, R. & Terry, R. D. 1992. Three-dimensional analysis of the relationship between synaptic pathology and neuropil threads in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **51**:404-14.
- Masliah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Sagara, Y., Mallory, M., Hashimoto, M. & Mucke, L. 2001. beta-amyloid peptides enhance alpha-synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:12245-50.

- Matsushima, S. & Sadoshima, J. 2015. The role of sirtuins in cardiac disease. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **309**:H1375-89.
- Mehta, D., Jackson, R., Paul, G., Shi, J. & Sabbagh, M. 2017. Why do trials for Alzheimer's disease drugs keep failing? A discontinued drug perspective for 2010-2015. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **26**:735-39.
- Mei, Z., Zhang, X., Yi, J., Huang, J., He, J. & Tao, Y. 2016. Sirtuins in metabolism, DNA repair and cancer. *J Exp Clin Cancer Res* **35**:182-82.
- Mielke, M. M., Haughey, N. J., Bandaru, V. V. R., Zetterberg, H., Blennow, K., Andreasson, U., Johnson, S. C., Gleason, C. E., Blazel, H. M., Puglielli, L., Sager, M. A., Asthana, S. & Carlsson, C. M. 2014. Cerebrospinal fluid sphingolipids,  $\beta$ -amyloid, and tau in adults at risk for Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* **35**:2486-94.
- Miguez, A., García-Díaz Barriga, G., Brito, V., Straccia, M., Giralt, A., Ginés, S., Canals, J. M. & Alberch, J. 2015. Fingolimod (FTY720) enhances hippocampal synaptic plasticity and memory in Huntington's disease by preventing p75NTR up-regulation and astrocyte-mediated inflammation. *Human Molecular Genetics* **24**:4958-70.
- Min, S.-W., Sohn, P. D., Li, Y., Devidze, N., Johnson, J. R., Krogan, N. J., Masliah, E., Mok, S.-A., Gestwicki, J. E. & Gan, L. 2018. SIRT1 Deacetylates Tau and Reduces Pathogenic Tau Spread in a Mouse Model of Tauopathy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **38**:3680-88.
- Min, S. W., Sohn, P. D., Cho, S. H., Swanson, R. A. & Gan, L. 2013. Sirtuins in neurodegenerative diseases: an update on potential mechanisms. *Front Aging Neurosci* **5**:53.
- Miraglia, F., Ricci, A., Rota, L. & Colla, E. 2018. Subcellular localization of alpha-synuclein aggregates and their interaction with membranes. *Neural Regeneration Research* **13**:1136-44.
- Mishra, M. & Kowluru, R. A. 2017. Role of PARP-1 as a novel transcriptional regulator of MMP-9 in diabetic retinopathy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1863**:1761-69.
- Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., Reverse, D., Baekelandt, V., Naidu, A., Tesseur, I., Spittaels, K., Haute, C. V., Checler, F., Godaux, E., Cordell, B. & Van Leuven, F. 1999. Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem* **274**:6483-92.
- Morales, A., Lee, H., Goni, F. M., Kolesnick, R. & Fernandez-Checa, J. C. 2007. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis* **12**:923-39.
- Motyl, J., Przykaza, Ł., Boguszewski, P. M., Kosson, P. & Strosznajder, J. B. 2018a. Pramipexole and Fingolimod exert neuroprotection in a mouse model of Parkinson's disease by activation of sphingosine kinase 1 and Akt kinase. *Neuropharmacology* **135**:139-50.
- Motyl, J., Wencel, P. L., Cieslik, M., Strosznajder, R. P. & Strosznajder, J. B. 2018b. Alpha-synuclein alters differently gene expression of Sirts, PARPs and other stress response proteins: implications for neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol* **55**:727-40.
- Mouton-Liger, F., Paquet, C., Dumurgier, J., Bouras, C., Pradier, L., Gray, F. & Hugon, J. 2012. Oxidative stress increases BACE1 protein levels through activation of the PKR-eIF2 $\alpha$  pathway. *Biochim Biophys Acta* **1822**:885-96.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B. & Lannfelt, L. 1992. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* **1**:345-7.
- Mullershausen, F., Zecri, F., Cetin, C., Billich, A., Guerini, D. & Seuwen, K. 2009. Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors. *Nature chemical biology* **5**:428-34.

- Murrell, J., Farlow, M., Ghetti, B. & Benson, M. D. 1991. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* **254**:97-9.
- Nagahashi, M., Takabe, K., Terracina, K. P., Soma, D., Hirose, Y., Kobayashi, T., Matsuda, Y. & Wakai, T. 2014. Sphingosine-1-phosphate transporters as targets for cancer therapy. *BioMed research international* **2014**:651727-27.
- Nakanishi, H., Amano, T., Sastradipura, D. F., Yoshimine, Y., Tsukuba, T., Tanabe, K., Hirotsu, I., Ohono, T. & Yamamoto, K. 1997. Increased expression of cathepsins E and D in neurons of the aged rat brain and their colocalization with lipofuscin and carboxy-terminal fragments of Alzheimer amyloid precursor protein. *J Neurochem* **68**:739-49.
- Neubauer, H. A. & Pitson, S. M. 2013. Roles, regulation and inhibitors of sphingosine kinase 2. *The FEBS journal* **280**:5317-36.
- Neubauer, H. A., Tea, M. N., Zebol, J. R., Gliddon, B. L., Stefanidis, C., Moretti, P. A. B., Pitman, M. R., Costabile, M., Kular, J., Stringer, B. W., Day, B. W., Samuel, M. S., Bonder, C. S., Powell, J. A. & Pitson, S. M. 2019. Cytoplasmic dynein regulates the subcellular localization of sphingosine kinase 2 to elicit tumor-suppressive functions in glioblastoma. *Oncogene* **38**:1151-65.
- Novak, P., Schmidt, R., Kontsekova, E., Zilka, N., Kovacech, B., Skrabana, R., Vince-Kazmerova, Z., Katina, S., Fialova, L., Prcina, M., Parrak, V., Dal-Bianco, P., Brunner, M., Staffen, W., Rainer, M., Ondrus, M., Ropele, S., Smisek, M., Sivak, R., Winblad, B. & Novak, M. 2017. Safety and immunogenicity of the tau vaccine AADvac1 in patients with Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *The Lancet. Neurology* **16**:123-34.
- Novgorodov, S. A. & Gudz, T. I. 2009. Ceramide and mitochondria in ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* **53**:198-208.
- O'Sullivan, S. & Dev, K. K. 2017. Sphingosine-1-phosphate receptor therapies: Advances in clinical trials for CNS-related diseases. *Neuropharmacology* **113**:597-607.
- Olsen, A. L. & Feany, M. B. 2019. PARP Inhibitors and Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine* **380**:492-94.
- Pacella-Ince, L., Zander-Fox, D. L. & Lan, M. 2014. Mitochondrial SIRT3 and its target glutamate dehydrogenase are altered in follicular cells of women with reduced ovarian reserve or advanced maternal age. *Human reproduction (Oxford, England)* **29**:1490-9.
- Parihar, M. S., Parihar, A., Fujita, M., Hashimoto, M. & Ghafourifar, P. 2008. Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**:1272-84.
- Park, S.-J. & Im, D.-S. 2017. Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulators and Drug Discovery. *Biomolecules & Therapeutics* **25**:80-90.
- Patwardhan, G. A., Beverly, L. J. & Siskind, L. J. 2016. Sphingolipids and mitochondrial apoptosis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **48**:153-68.
- Paugh, S. W., Payne, S. G., Barbour, S. E., Milstien, S. & Spiegel, S. 2003. The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2. *FEBS Letters* **554**:189-93.
- Pineda, A. & Burré, J. 2017. Modulating membrane binding of  $\alpha$ -synuclein as a therapeutic strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**:1223-25.
- Potenza, R. L., De Simone, R., Armida, M., Mazziotti, V., Pèzzola, A., Popoli, P. & Minghetti, L. 2016. Fingolimod: A Disease-Modifier Drug in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **13**:918-27.

- Puglielli, L., Ellis, B. C., Saunders, A. J. & Kovacs, D. M. 2003. Ceramide stabilizes beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and promotes amyloid beta-peptide biogenesis. *J Biol Chem* **278**:19777-83.
- Qu, Z.-S., Li, L., Sun, X.-J., Zhao, Y.-W., Zhang, J., Geng, Z., Fu, J.-L. & Ren, Q.-G. 2014. Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Production of Amyloid- $\beta$ ; Peptides and Tau Phosphorylation in Diabetic Rat Brain. *The Scientific World Journal* **2014**:8.
- Rahman, M., Nirala, N. K., Singh, A., Zhu, L. J., Taguchi, K., Bamba, T., Fukusaki, E., Shaw, L. M., Lambright, D. G., Acharya, J. K. & Acharya, U. R. 2014. Drosophila Sirt2/mammalian SIRT3 deacetylates ATP synthase beta and regulates complex V activity. *J Cell Biol* **206**:289-305.
- Rajamohan, S. B., Pillai, V. B., Gupta, M., Sundaresan, N. R., Birukov, K. G., Samant, S., Hottiger, M. O. & Gupta, M. P. 2009. SIRT1 promotes cell survival under stress by deacetylation-dependent deactivation of poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Mol Cell Biol* **29**:4116-29.
- Roberts, H. L., Schneider, B. L. & Brown, D. R. 2017. alpha-Synuclein increases beta-amyloid secretion by promoting beta-/gamma-secretase processing of APP. *PLoS One* **12**:e0171925.
- Roeters, S. J., Iyer, A., Pletikapić, G., Kogan, V., Subramaniam, V. & Woutersen, S. 2017. Evidence for Intramolecular Antiparallel Beta-Sheet Structure in Alpha-Synuclein Fibrils from a Combination of Two-Dimensional Infrared Spectroscopy and Atomic Force Microscopy. *Scientific reports* **7**:41051-51.
- Roher, A. E., Kasunic, T. C., Woods, A. S., Cotter, R. J., Ball, M. J. & Fridman, R. 1994. Proteolysis of A beta peptide from Alzheimer disease brain by gelatinase A. *Biochem Biophys Res Commun* **205**:1755-61.
- Royall, J. A. & Ischiropoulos, H. 1993. Evaluation of 2',7'-Dichlorofluorescein and Dihydrorhodamine 123 as Fluorescent Probes for Intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Cultured Endothelial Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **302**:348-55.
- Selkoe, D. J. 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* **6**:487-98.
- Selkoe, D. J. & Hardy, J. 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine* **8**:595-608.
- Serra-Batiste, M., Ninot-Pedrosa, M., Bayoumi, M., Gairí, M., Maglia, G. & Carulla, N. 2016. A $\beta$ 42 assembles into specific  $\beta$ -barrel pore-forming oligomers in membrane-mimicking environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**:10866-71.
- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., Brett, F. M., Farrell, M. A., Rowan, M. J., Lemere, C. A., Regan, C. M., Walsh, D. M., Sabatini, B. L. & Selkoe, D. J. 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* **14**:837-42.
- Shelat, P. B., Chalimoniuk, M., Wang, J. H., Strosznajder, J. B., Lee, J. C., Sun, A. Y., Simonyi, A. & Sun, G. Y. 2008. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. *J Neurochem* **106**:45-55.
- Sheng, S., Kang, Y., Guo, Y., Pu, Q., Cai, M. & Tu, Z. 2015. Overexpression of Sirt3 inhibits lipid accumulation in macrophages through mitochondrial IDH2 deacetylation. *International journal of clinical and experimental pathology* **8**:9196-201.
- Shi, M., Tang, L., Toledo, J. B., Ghingina, C., Wang, H., Aro, P., Jensen, P. H., Weintraub, D., Chen-Plotkin, A. S., Irwin, D. J., Grossman, M., McCluskey, L., Elman, L. B., Wolk, D. A., Lee, E. B., Shaw, L. M., Trojanowski, J. Q. & Zhang, J. 2018. Cerebrospinal fluid  $\alpha$ -synuclein contributes to the differential diagnosis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* **14**:1052-62.



- Sidhu, A., Wersinger, C. & Vernier, P. 2004.  $\alpha$ -Synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *FEBS Letters* **565**:1-5.
- Sidorova-Darmos, E., Sommer, R. & Eubanks, J. H. 2018. The Role of SIRT3 in the Brain Under Physiological and Pathological Conditions. *Frontiers in cellular neuroscience* **12**:196-96.
- Singh, P., Hanson, P. S. & Morris, C. M. 2017. SIRT1 ameliorates oxidative stress induced neural cell death and is down-regulated in Parkinson's disease. *BMC neuroscience* **18**:46-46.
- Sinha, S. & Lieberburg, I. 1999. Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:11049-53.
- Sloane, J. A., Pietropaolo, M. F., Rosene, D. L., Moss, M. B., Peters, A., Kemper, T. & Abraham, C. R. 1997. Lack of correlation between plaque burden and cognition in the aged monkey. *Acta Neuropathologica* **94**:471-78.
- Slowik, A., Schmidt, T., Beyer, C., Amor, S., Clarner, T. & Kipp, M. 2015. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 is neuroprotective after cuprizone-induced CNS demyelination. *British journal of pharmacology* **172**:80-92.
- Sogorb-Esteve, A., García-Ayllón, M.-S., Gobom, J., Alom, J., Zetterberg, H., Blennow, K. & Sáez-Valero, J. 2018. Levels of ADAM10 are reduced in Alzheimer's disease CSF. *Journal of neuroinflammation* **15**:213-13.
- Spiegel, S., Milstien, S. & Grant, S. 2012. Endogenous modulators and pharmacological inhibitors of histone deacetylases in cancer therapy. *Oncogene* **31**:537-51.
- Srivastava, S., Baxa, U., Niu, G., Chen, X. & Veech, R. L. 2013. A ketogenic diet increases brown adipose tissue mitochondrial proteins and UCP1 levels in mice. *IUBMB life* **65**:58-66.
- Stine, W. B., Jr., Dahlgren, K. N., Krafft, G. A. & LaDu, M. J. 2003. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem* **278**:11612-22.
- Stockley, J. H., Ravid, R. & O'Neill, C. 2006. Altered  $\beta$ -secretase enzyme kinetics and levels of both BACE1 and BACE2 in the Alzheimer's disease brain. *FEBS Letters* **580**:6550-60.
- Strosznajder, J. B., Jesko, H. & Strosznajder, R. P. 2000. Effect of amyloid beta peptide on poly(ADP-ribose) polymerase activity in adult and aged rat hippocampus. *Acta biochimica Polonica* **47**:847-54.
- Strosznajder, R. & Gajkowska, B. 2006. Effect of 3-aminobenzamide on Bcl-2, Bax and AIF localization in hippocampal neurons altered by ischemia-reperfusion injury. the immunocytochemical study. *Acta neurobiologiae experimentalis* **66**:15-22.
- Strosznajder, R. P. & Banasik, M. 2000. Amyloid beta protein affects poly(ADP-ribose) polymerase activity in PC-12 cells in culture. *Acta neurobiologiae experimentalis* **60**:215.
- Strosznajder, R. P., Czubowicz, K., Jesko, H. & Strosznajder, J. B. 2010. Poly(ADP-ribose) metabolism in brain and its role in ischemia pathology. *Mol Neurobiol* **41**:187-96.
- Tabaton, M., Zhu, X., Perry, G., Smith, M. A. & Giliberto, L. 2010. Signaling effect of amyloid-beta(42) on the processing of A $\beta$ PP. *Experimental neurology* **221**:18-25.
- Takasugi, N., Sasaki, T., Ebinuma, I., Osawa, S., Isshiki, H., Takeo, K., Tomita, T. & Iwatsubo, T. 2013. FTY720/fingolimod, a sphingosine analogue, reduces amyloid-beta production in neurons. *PLoS One* **8**:e64050.

- Takasugi, N., Sasaki, T., Shinohara, M., Iwatsubo, T. & Tomita, T. 2015. Synthetic ceramide analogues increase amyloid- $\beta$  42 production by modulating  $\gamma$ -secretase activity. *Biochemical and biophysical research communications* **457**:194-99.
- Takasugi, N., Sasaki, T., Suzuki, K., Osawa, S., Isshiki, H., Hori, Y., Shimada, N., Higo, T., Yokoshima, S., Fukuyama, T., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Tomita, T. & Iwatsubo, T. 2011. BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *J Neurosci* **31**:6850-7.
- Takayama, K., Ishida, K., Matsushita, T., Fujita, N., Hayashi, S., Sasaki, K., Tei, K., Kubo, S., Matsumoto, T., Fujioka, H., Kurosaka, M. & Kuroda, R. 2009. SIRT1 regulation of apoptosis of human chondrocytes. *Arthritis Rheum* **60**:2731-40.
- Tamagno, E., Bardini, P., Obbili, A., Vitali, A., Borghi, R., Zaccheo, D., Pronzato, M. A., Danni, O., Smith, M. A., Perry, G. & Tabaton, M. 2002. Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons. *Neurobiol Dis* **10**:279-88.
- Tamagno, E., Guglielmotto, M., Aragno, M., Borghi, R., Autelli, R., Giliberto, L., Muraca, G., Danni, O., Zhu, X., Smith, M. A., Perry, G., Jo, D.-G., Mattson, M. P. & Tabaton, M. 2008. Oxidative stress activates a positive feedback between the gamma- and beta-secretase cleavages of the beta-amyloid precursor protein. *Journal of neurochemistry* **104**:683-95.
- Tamaoka, A., Odaka, A., Ishibashi, Y., Usami, M., Sahara, N., Suzuki, N., Nukina, N., Mizusawa, H., Shoji, S., Kanazawa, I. & et al. 1994. APP717 missense mutation affects the ratio of amyloid beta protein species (A beta 1-42/43 and a beta 1-40) in familial Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* **269**:32721-4.
- Tan, Y., Xu, Z., Tao, J., Ni, J., Zhao, W., Lu, J. & Yao, Y.-F. 2015. A SIRT4-like auto ADP-ribosyltransferase is essential for the environmental growth of *Mycobacterium smegmatis*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **48**:145-52.
- Tang, B. L. 2016. Sirt1 and the Mitochondria. *Mol Cells* **39**:87-95.
- Toledo, J. B., Korff, A., Shaw, L. M., Trojanowski, J. Q. & Zhang, J. 2013. CSF  $\alpha$ -synuclein improves diagnostic and prognostic performance of CSF tau and A $\beta$  in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica* **126**:683-97.
- Tong, Y., Zhou, W., Fung, V., Christensen, M. A., Qing, H., Sun, X. & Song, W. 2005. Oxidative stress potentiates BACE1 gene expression and A $\beta$  generation. *Journal of Neural Transmission* **112**:455-69.
- Tseng, A. H., Wu, L. H., Shieh, S. S. & Wang, D. L. 2014. SIRT3 interactions with FOXO3 acetylation, phosphorylation and ubiquitinylation mediate endothelial cell responses to hypoxia. *Biochem J* **464**:157-68.
- Tseng, B. P., Green, K. N., Chan, J. L., Blurton-Jones, M. & LaFerla, F. M. 2008. Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiology of aging* **29**:1607-18.
- Tsigelny, I. F., Sharikov, Y., Kouznetsova, V. L., Greenberg, J. P., Wrasidlo, W., Gonzalez, T., Desplats, P., Michael, S. E., Trejo-Morales, M., Overk, C. R. & Masliah, E. 2014. Structural diversity of Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  dimers and their role in oligomerization and fibril formation. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **39**:583-600.
- Turunc Bayrakdar, E., Uyanikgil, Y., Kanit, L., Koylu, E. & Yalcin, A. 2014. Nicotinamide treatment reduces the levels of oxidative stress, apoptosis, and PARP-1 activity in Abeta(1-42)-induced rat model of Alzheimer's disease. *Free Radic Res* **48**:146-58.
- Ueda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D. A., Kondo, J., Ihara, Y. & Saitoh, T. 1993. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:11282-6.

- Van Dorpe, J., Smeijers, L., Dewachter, I., Nuyens, D., Spittaels, K., Van Den Haute, C., Mercken, M., Moechars, D., Laenen, I., Kuiperi, C., Bruynseels, K., Tesseur, I., Loos, R., Vanderstichele, H., Checler, F., Sciot, R. & Van Leuven, F. 2000. Prominent cerebral amyloid angiopathy in transgenic mice overexpressing the london mutant of human APP in neurons. *Am J Pathol* **157**:1283-98.
- Verdone, L., La Fortezza, M., Ciccarone, F., Caiafa, P., Zampieri, M. & Caserta, M. 2015. Poly(ADP-Ribosyl)ation Affects Histone Acetylation and Transcription. *PloS one* **10**:e0144287-e87.
- Verma, M., Vats, A. & Taneja, V. 2015. Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils. *Ann Indian Acad Neurol* **18**:138-45.
- Vidaurre, O. G., Haines, J. D., Katz Sand, I., Adula, K. P., Huynh, J. L., McGraw, C. A., Zhang, F., Varghese, M., Sotirchos, E., Bhargava, P., Bandaru, V. V. R., Pasinetti, G., Zhang, W., Inglese, M., Calabresi, P. A., Wu, G., Miller, A. E., Haughey, N. J., Lublin, F. D. & Casaccia, P. 2014. Cerebrospinal fluid ceramides from patients with multiple sclerosis impair neuronal bioenergetics. *Brain* **137**:2271-86.
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J. & Selkoe, D. J. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* **416**:535-9.
- Walsh, D. M., Tseng, B. P., Rydel, R. E., Podlisny, M. B. & Selkoe, D. J. 2000. The Oligomerization of Amyloid  $\beta$ -Protein Begins Intracellularly in Cells Derived from Human Brain. *Biochemistry* **39**:10831-39.
- Wang, J., Zhen, L., Klug, M. G., Wood, D., Wu, X. & Mizrahi, J. 2000. Involvement of caspase 3- and 8-like proteases in ceramide-induced apoptosis of cardiomyocytes. *Journal of cardiac failure* **6**:243-9.
- Wang, R., Li, J. J., Diao, S., Kwak, Y.-D., Liu, L., Zhi, L., Bueler, H., Bhat, N. R., Williams, R., Park, E. A. & Liao, F.-F. 2013. Metabolic stress modulates Alzheimer's  $\beta$ -secretase gene transcription via SIRT1-PPAR $\gamma$ -PGC-1 in neurons. *Cell metabolism* **17**:685-94.
- Weir, H. J., Murray, T. K., Kehoe, P. G., Love, S., Verdin, E. M., O'Neill, M. J., Lane, J. D. & Balthasar, N. 2012. CNS SIRT3 expression is altered by reactive oxygen species and in Alzheimer's disease. *PLoS One* **7**:e48225.
- Wesierska-Gadek, J. & Schmid, G. 2001. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the stability of the wild-type p53 protein. *Cellular & molecular biology letters* **6**:117-40.
- Wilkaniec, A., Gąssowska-Dobrowolska, M., Strawski, M., Adamczyk, A. & Czapski, G. A. 2018. Inhibition of cyclin-dependent kinase 5 affects early neuroinflammatory signalling in murine model of amyloid beta toxicity. *Journal of neuroinflammation* **15**:1-1.
- Wilkaniec, A., Strosznajder, J. B. & Adamczyk, A. 2013. Toxicity of extracellular secreted alpha-synuclein: Its role in nitrosative stress and neurodegeneration. *Neurochemistry International* **62**:776-83.
- Winblad, B., Amouyel, P., Andrieu, S., Ballard, C., Brayne, C., Brodaty, H., Cedazo-Minguez, A., Dubois, B., Edvardsson, D., Feldman, H., Fratiglioni, L., Frisoni, G. B., Gauthier, S., Georges, J., Graff, C., Iqbal, K., Jessen, F., Johansson, G., Jonsson, L., Kivipelto, M., Knapp, M., Mangialasche, F., Melis, R., Nordberg, A., Rikkert, M. O., Qiu, C., Sakmar, T. P., Scheltens, P., Schneider, L. S., Sperling, R., Tjernberg, L. O., Waldemar, G., Wimo, A. & Zetterberg, H. 2016. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *The Lancet. Neurology* **15**:455-532.
- Wiśnik, E., Ryksa, M. & Koter-Michalak, M. 2016. Inhibitory PARP1: współczesne próby zastosowania w terapii przeciwnowotworowej i perspektywy na przyszłość\*. *PARP1*

*inhibitors: contemporary attempts at their use in anticancer therapy and future perspective.* **70**:280-94.

- Yamamori, T., DeRicco, J., Naqvi, A., Hoffman, T. A., Mattagajasingh, I., Kasuno, K., Jung, S.-B., Kim, C.-S. & Irani, K. 2010. SIRT1 deacetylates APE1 and regulates cellular base excision repair. *Nucleic acids research* **38**:832-45.
- Yanagawa, Y., Sugahara, K., Kataoka, H., Kawaguchi, T., Masubuchi, Y. & Chiba, K. 1998. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. II. FTY720 prolongs skin allograft survival by decreasing T cell infiltration into grafts but not cytokine production in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **160**:5493-9.
- Yang, L.-B., Lindholm, K., Yan, R., Citron, M., Xia, W., Yang, X.-L., Beach, T., Sue, L., Wong, P., Price, D., Li, R. & Shen, Y. 2003. Elevated  $\beta$ -secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nature Medicine* **9**:3-4.
- Yang, T., Li, S., Xu, H., Walsh, D. M. & Selkoe, D. J. 2017. Large Soluble Oligomers of Amyloid  $\beta$ -Protein from Alzheimer Brain Are Far Less Neuroactive Than the Smaller Oligomers to Which They Dissociate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **37**:152-63.
- Yang, W., Zou, Y., Zhang, M., Zhao, N., Tian, Q., Gu, M., Liu, W., Shi, R., Lu, Y. & Yu, W. 2015a. Mitochondrial Sirt3 Expression is Decreased in APP/PS1 Double Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neurochem Res* **40**:1576-82.
- Yang, X., Liu, B., Zhu, W. & Luo, J. 2015b. SIRT5, functions in cellular metabolism with a multiple enzymatic activities. *Sci China Life Sci* **58**:912-4.
- Yuan, X. Z., Sun, S., Tan, C. C., Yu, J. T. & Tan, L. 2017. The Role of ADAM10 in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* **58**:303-22.
- Zhang, T., Chi, Y., Ren, Y., Du, C., Shi, Y. & Li, Y. 2019. Resveratrol Reduces Oxidative Stress and Apoptosis in Podocytes via Sir2-Related Enzymes, Sirtuins1 (SIRT1)/Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Co-Activator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) Axis. *Med Sci Monit* **25**:1220-31.
- Zhao, P., Yang, X., Yang, L., Li, M., Wood, K., Liu, Q. & Zhu, X. 2017. Neuroprotective effects of fingolimod in mouse models of Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **31**:172-79.