



**UNIwersYTET MEDYCZNY**  
**IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU**

**WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY**

Anna Rorbach-Dolata

**Badania modelowe szlaków ekscytotoksyczności  
w warunkach zaburzeń metabolizmu węglowodanów**

*Streszczenie*

Promotor rozprawy

*Prof. dr hab. Agnieszka Piwowar,*

*Kierownik Katedry i Zakładu Toksykologii,*

*Wydział Farmaceutyczny*

*Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu*

*Wrocław 2021*

## STRESZCZENIE

Rosnąca liczba doniesień naukowych dotyczących zwiększonej zapadalności chorych na cukrzycę typu 2 (*ang. type 2 diabetes mellitus; T2DM*) na choroby neurodegeneracyjne, w tym szczególnie chorobę Alzheimera (*ang. Alzheimer's disease; AD*), skłania naukowców do interdyscyplinarnych badań nad powiązaniem potencjalnych zaburzeń charakterystycznych dla chorób neurodegeneracyjnych związanych z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej, zwłaszcza mechanizmami ich powstawania, potencjalnymi wskaźnikami diagnostycznymi, czy też lekami stosowanymi prewencyjnie. Jest to szczególnie istotne z uwagi na wysoką zachorowalność na cukrzycę, która została uznana za epidemię XXI, zaś choroby neurodegeneracyjne cechuje brak możliwości regeneracji neuronów i ich samopowielania, co czyni niemożliwym cofnięcie zmian które już powstały w obrębie mózgu. Wskazywany związek między występowaniem T2DM, towarzyszącej jej insulinooporności, a chorobą Alzheimera, zdefiniowano jako odrębne zaburzenie określane mianem cukrzycy typu 3 (*ang. type 3 diabetes mellitus; T3DM*), co zaproponowano po raz pierwszy w 2008 roku. Coraz więcej uwagi poświęca się również procesowi ekscytotoksyczności indukowanej glutaminianem, której to przypisuje się rolę łącznika między przewlekłą hiperglikemią towarzyszącą cukrzycy typu 2, a patogenezą chorób neurodegeneracyjnych. Interesującym stało się więc poznanie szlaków łączących te dwa procesy na poziomie komórkowym.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było:

- a) zebranie i przeanalizowanie najnowszych danych literaturowych dotyczących związku cukrzycy typu 2 z chorobami neurodegeneracyjnymi, w tym szczególnie choroby Alzheimera;
- b) opracowanie w badaniach *in vitro* na modelu komórkowym, warunków przewlekłej hiperglikemii, hiperinsulinemii oraz ekscytotoksyczności dla stworzenia warunków odzwierciedlających zaburzenia charakterystyczne dla chorób neurodegeneracyjnych związanych z zaburzeniami gospodarki węglowodanów;
- c) analiza wybranych szlaków oraz białek sygnałowych, najbardziej reprezentatywnych dla zaburzeń indukowanych hiperglikemią, hiperinsulinemią oraz ekscytotoksycznością w modelu komórkowym;
- d) ocena stopnia fosforylacji reszt aminokwasowych wybranych białek i kinaz białkowych uczestniczących w przekazywaniu sygnałów w procesie ekscytotoksyczności indukowanej glutaminianem, jak i hiperglikemii oraz hiperinsulinemii, takich jak:

- izomery pozakomórkowej kinazy regulowanej sygnałem 1/2 (*ang. extracellular signal-regulated kinases*; ERK) na resztach Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> oraz Thr<sup>182</sup>/Tyr<sup>187</sup>;
- izomery kinazy białkowej Akt 1/2/3, inaczej zwana kinazą białkową B (*ang. protein kinase B*; PKB) na reszcie Ser<sup>473</sup>;
- białko p70S6K (*ang. p70 ribosomal protein S6 kinase*) na reszcie Thr<sup>389</sup>;
- czynnik transkrypcyjny CREB (*ang. cyclic AMP-responsive element binding*) na reszcie Ser<sup>133</sup>;
- β-*katenu*ina na reszcie Ser<sup>45</sup>;
- białko p38 (*ang. 38-kDa protein*) na resztach Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>;
- izomery kinazy N-końcowej kinazy białka c-Jun 1/2 (*ang. c-Jun N-terminal kinases*; JNK) na resztach Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>.

Eksperymenty przeprowadzono na niezróżnicowanej linii komórkowej PC12, powszechnie stosowanej w badaniach modelowych szlaków sygnałowych na poziomie komórkowym, co pozwoliło na ustalenie warunków doświadczalnych w oparciu również o dostępne doniesienia literaturowe. Po raz pierwszy dokonano oceny jednoczesnego wpływu wybranych substancji mających znaczenie w zaburzeniach charakterystycznych dla chorób neurodegeneracyjnych związanych z zaburzeniami gospodarki, takich jak glukoza (G), insulina (I) i L-glutaminian (L) na komórki PC12 po 48 h ekspozycji. Każdą z substancji badano w dwóch różnych stężeniach (G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub>, I<sub>1</sub> i I<sub>2</sub>, L<sub>1</sub> i L<sub>2</sub>). Dokonano oceny stopnia fosforylacji wybranych białek i kinaz białkowych uczestniczących w szlakach sygnałowych w procesie ekscytotoksyczności, hiperglikemii oraz hiperinsulinemii w układach jedno-, dwu- i trzyczynnikowych badanych substancji poprzez zastosowanie adekwatnych testów immunoenzymatycznych.

W układach jednoczynnikowych zawierających glukozę (G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub>), stwierdzono istotny statystycznie wzrost fosforylacji w porównaniu do próby kontrolnej dla: p38 (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>) i JNK 1/2 (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>), a w przypadku β-*katenu*iny (Ser<sup>45</sup>) oraz ERK 1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>, Thr<sup>182</sup>/Tyr<sup>187</sup>), jedynie dla prób inkubowanych z niższym stężeniem glukozy (G<sub>1</sub>). W przypadku komórek PC12 eksponowanych na roztwory insuliny (I<sub>1</sub> i I<sub>2</sub>) zaobserwowano istotny statystycznie wzrost fosforylacji p38 (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>) i JNK 1/2 (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>) dla obu stężeń badanego czynnika, natomiast w przypadku L-glutaminianu (L<sub>1</sub> i L<sub>2</sub>) stwierdzono istotny statystycznie wzrost fosforylacji dla β-*katenu*iny (Ser<sup>45</sup>), p38 (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>) oraz JNK 1/2 (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>) w przypadku inkubacji jedynie roztworem o niższym L-glutaminianu (L<sub>1</sub>). W układach dwuczynnikowych uwzględniających oba stężenia glukozy w kombinacji z insuliną

oraz L-glutaminianem zaobserwowano istotne statystycznie zmiany dla wzrostu fosforylacji białka p38 (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>) oraz JNK 1/2 (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>) dla układów: G<sub>1</sub>I<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>I<sub>2</sub>, G<sub>2</sub>I<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>I<sub>2</sub>, oraz G<sub>2</sub>L<sub>1</sub>. Dodatkowo dla JNK 1/2 wykryto wzrost fosforylacji przy resztach Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup> również w układzie z niższym stężeniem glukozy oraz L-glutaminianu (G<sub>1</sub>L<sub>1</sub>), natomiast dla układu z wyższym stężeniem glukozy, ale niższym L-glutaminianu (G<sub>2</sub>L<sub>1</sub>) zaobserwowano wzrost fosforylacji na resztach Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> oraz Thr<sup>182</sup>/Tyr<sup>187</sup> ERK 1/2. W układach dwuczynnikowych bez glukozy, uwzględniających jedynie oba stężenia insuliny oraz L-glutaminianu, zaobserwowano istotny statystycznie wzrost fosforylacji dla wybranych reszt aminokwasowych białek i kinaz białkowych: ERK 1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>, Thr<sup>182</sup>/Tyr<sup>187</sup>), JNK 1/2 (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>), p38 (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>), β-kateniny (Ser<sup>45</sup>) oraz p70s6k dla układu z wyższymi stężeniami insuliny oraz L-glutaminianu (I<sub>2</sub>L<sub>2</sub>). Dodatkowo w przypadku β-kateniny oraz JNK 1/2 istotność statystyczną dla wzrostu fosforylacji wybranych reszt aminokwasowych potwierdzono w układzie I<sub>1</sub>L<sub>2</sub>, a w układzie I<sub>1</sub>L<sub>1</sub> oraz I<sub>2</sub>L<sub>1</sub> tylko dla β-kateniny (Ser<sup>45</sup>).

W przypadku układów wieloczynnikowych, uwzględniających kombinacje wszystkich trzech badanych substancji, zaobserwowano liczne, istotne statystycznie zmiany, wskazujące zarówno na wzrost fosforylacji jak i defosforylacji wybranych białek i kinaz białkowych. Przede wszystkim stwierdzono defosforylację białka p70S6K na reszcie aminokwasowej Thr<sup>389</sup> oraz wzrost fosforylacji β-kateniny (Ser<sup>45</sup>), p38 (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>) i JNK 1/2 (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>) dla trzyskładnikowego układu z wyższym stężeniem glukozy i L-glutaminianu, oraz niższym stężeniem insuliny (G<sub>2</sub>I<sub>1</sub>L<sub>2</sub>). W przypadku czynnika CREB, zaobserwowano istotny statystycznie wzrost fosforylacji jedynie dla układów trzyczynnikowych z wyższym stężeniem L-glutaminianu (G<sub>1</sub>I<sub>1</sub>L<sub>2</sub>, G<sub>2</sub>I<sub>1</sub>L<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>I<sub>2</sub>L<sub>2</sub> i G<sub>2</sub>I<sub>2</sub>L<sub>2</sub>).

Na podstawie przeprowadzonych badań, po raz pierwszy doniesiono o jednoczesnej defosforylacji białka p70s6k oraz wzroście fosforylacji β-kateniny (Ser<sup>45</sup>), p38 (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>) i JNK 1/2 (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>) w warunkach ekscytotoksyczności indukowanej glutaminianem oraz współistniejącej hiperglikemii i hiperinsulinemii o charakterze istotnym statystycznie (układ G<sub>2</sub>I<sub>1</sub>L<sub>2</sub>), co wskazuje na ich kluczową rolę w regulacji szlaku sygnałowego w ekscytotoksyczności związanej z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej i sugeruje potencjalną rolę czynników predykcyjnych potencjalnych zaburzeń charakterystycznych dla chorób neurodegeneracyjnych związanych z zaburzeniami gospodarki węglowodanów. Przeprowadzone badania oraz ich wyniki są szczególnie istotne wobec nasilonego wzrostu zachorowań na cukrzycę typu 2, oraz obserwowanego wzrostu zachorowalności na choroby neurodegeneracyjne, zwłaszcza AD. Wielopłaszczyznowa analiza szlaków sygnałowych we współistniejących zaburzeniach ekscytotoksyczności oraz hiperglikemii i hiperinsulinemii,

daje możliwość wykrycia białek i kinaz białkowych, które potencjalnie mogłyby stanowić wskaźniki diagnostyczne, a ich rutynowe oznaczanie dałoby możliwość stosowania profilaktyki neurodegeneracyjnej zaburzeń charakterystycznych dla chorób neurodegeneracyjnych związanych z zaburzeniami gospodarki węglowodanów albo też mogłyby się one stać celem działań terapeutycznych.

## SUMMARY

The growing number of scientific reports on the increased incidence of neurodegenerative diseases, especially Alzheimer's disease (AD) in type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients, prompts scientists to interdisciplinary research on the link between potential characteristic disorders for neurodegenerative diseases related to carbohydrate disorders, especially the mechanisms of their formation, potential diagnostic indicators, or preventive drugs. This is particularly important due to the high incidence of diabetes, which has been recognized as the epidemic of the 21st century, and neurodegenerative diseases are characterized by the inability to regenerate neurons and their self-replication, which makes it impossible to undo changes that have already occurred in the brain. The indicated relationship between the incidence of T2DM, associated insulin resistance, and Alzheimer's disease was defined as a separate disorder called type 3 diabetes mellitus (T3DM), which was first proposed in 2008. Increasing attention is also paid to the process of glutamate-induced excitotoxicity, which is attributed to the role of a link between chronic hyperglycemia associated with type 2 diabetes and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. So it has become interesting to understand the pathways connecting these two processes at the cellular level.

The purpose of this doctoral dissertation was:

- a) collecting and analyzing the latest literature data on the relationship between type 2 diabetes and neurodegenerative diseases, in particular Alzheimer's disease;
- b) to develop, in in vitro cell model studies, the conditions of chronic hyperglycemia, hyperinsulinemia and excitotoxicity to create conditions reflecting disorders characteristic of neurodegenerative diseases associated with disorders of carbohydrate metabolism;
- c) analysis of selected pathways and signaling proteins most representative of the disorders induced by hyperglycemia, hyperinsulinemia and excitotoxicity in a cellular model;
- d) assessment of the degree of phosphorylation of amino acid residues of selected proteins and protein kinases involved in signaling in the process of glutamate-induced excitotoxicity, as well as hyperglycemia and hyperinsulinemia, such as:
  - extracellular signal-regulated kinases (ERK) isomers 1/2 at residues Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> and Thr<sup>182</sup>/Tyr<sup>187</sup>;
  - Akt protein kinase isomers 1/2/3, called protein kinase B (PKB), on residue Ser<sup>473</sup>;
  - p70S6K (p70 ribosomal protein S6 kinase) protein on the Thr<sup>389</sup> residue;

- CREB transcription factor (cyclic AMP-responsive element binding) on the rest of Ser<sup>133</sup>;
- $\beta$ -catenin on a Ser<sup>45</sup> residue;
- p38 protein (38-kDa protein) at residues Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>;
- c-Jun N-terminal kinases (JNK) isomers 1/2 at residues Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>.

The experiments were carried out on the undifferentiated PC12 cell line, commonly used in the study of model signaling pathways at the cellular level, which allowed to establish the experimental conditions based also on the available literature data. For the first time, the simultaneous effect of selected substances important in disorders characteristic of neurodegenerative diseases related to disorders of carbohydrate metabolism, such as glucose (G), insulin (I) and L-glutamate (L) on PC12 cells after 48 h of exposure, was assessed. Each substance was tested at two different concentrations (G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>, I<sub>1</sub> and I<sub>2</sub>, L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub>). The degree of phosphorylation of selected proteins and protein kinases participating in signaling pathways in the process of excitotoxicity, hyperglycemia and hyperinsulinemia in the single-, two- and three-factors combination of the studied substances was assessed by the use of adequate enzyme immunoassays.

In single-factor combination containing glucose (G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>), a statistically significant increase in phosphorylation was found compared to the control sample for: p38 (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>) and JNK 1/2 (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>), and in the case of  $\beta$ -catenin (Ser<sup>45</sup>) and ERK 1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>, Thr<sup>182</sup>/Tyr<sup>187</sup>), only for samples incubated with lower glucose concentration (G<sub>1</sub>). In the case of PC12 cells exposed to insulin solutions (I<sub>1</sub> and I<sub>2</sub>), a statistically significant increase in the phosphorylation of p38 (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>) and JNK 1/2 (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>) was observed for both concentrations of the tested substances, while in the case of L-glutamate (L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub>), a statistically significant increase in phosphorylation was found for  $\beta$ -catenin (Ser<sup>45</sup>), p38 (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>) and JNK 1/2 (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>) when incubated only with the lower L-glutamate (L<sub>1</sub>) solution. In two-factors combinations without glucose, taking into account only both concentrations of insulin and L-glutamate concentrations, a statistically significant increase in phosphorylation was observed for selected amino acid residues of proteins and protein kinases: ERK 1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>, Thr<sup>182</sup>/Tyr<sup>187</sup>), JNK 1/2 (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>), p38 (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>),  $\beta$ -catenin (Ser<sup>45</sup>) and p70s6k for the combination with higher concentrations of insulin and L-glutamate (I<sub>2</sub>L<sub>2</sub>). Additionally, in the case of  $\beta$ -catenin and JNK 1/2, the statistical significance for the increase in phosphorylation of selected amino acid residues was confirmed in the I<sub>1</sub>L<sub>2</sub> combination, and in the I<sub>1</sub>L<sub>1</sub> and I<sub>2</sub>L<sub>1</sub> combinations only for  $\beta$ -catenin (Ser<sup>45</sup>).

In the case of multifactorial combinations, taking into account the combinations of all three tested substances, numerous statistically significant changes were observed, indicating both an increase in phosphorylation and dephosphorylation of selected proteins and protein kinases. First of all, the dephosphorylation of the p70S6K protein at the amino acid residue of Thr<sup>389</sup> and an increase in the phosphorylation of  $\beta$ -catenin (Ser<sup>45</sup>), p38 (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>) and JNK 1/2 (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>) for a three-factors combinations with a higher concentration of glucose and L-glutamate and insulin in lower concentration (G<sub>2</sub>I<sub>1</sub>L<sub>2</sub>). In the case of CREB, a statistically significant increase in phosphorylation was observed only for three-factors combinations with a higher concentration of L-glutamate (G<sub>1</sub>I<sub>1</sub>L<sub>2</sub>, G<sub>2</sub>I<sub>1</sub>L<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>I<sub>2</sub>L<sub>2</sub> and G<sub>2</sub>I<sub>2</sub>L<sub>2</sub>).

On the basis of the conducted research, for the first time it was reported the dephosphorylation of p70s6k protein and increased phosphorylation of  $\beta$ -catenin (Ser<sup>45</sup>), p38 (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>) and JNK 1/2 (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>) in conditions of glutamate-induced excitotoxicity and coexisting hyperglycemia and hyperinsulinemia (G<sub>2</sub>I<sub>1</sub>L<sub>2</sub>), which is statistically significant and indicates their key role in the regulation of the signaling pathway in excitotoxicity related to carbohydrate metabolism disorders and suggests the potential role of predictors of potential disorders characteristic of neurodegenerative diseases associated with carbohydrate metabolism disorders. The conducted studies and their results are particularly important in view of the increased incidence of type 2 diabetes and the observed increase in the incidence of neurodegenerative diseases, especially AD. The multifaceted analysis of signaling pathways in concomitant excitotoxicity disorders as well as hyperglycemia and hyperinsulinemia makes it possible to detect proteins and protein kinases that could potentially be diagnostic indicators, and their routine determination would enable the use of neurodegenerative prevention of disorders characteristic of neurodegenerative diseases associated with carbohydrate metabolism disorders, or they could be the target of therapeutic action.