

I. STRESZCZENIE

Według jednej z hipotez przyczyną choroby Alzheimera jest wejście neuronów na szlak cyklu komórkowego. Zdrowe neurony są terminalnie zróżnicowane i znajdują się w fazie G0 cyklu komórkowego. Konsekwencją aktywacji cyklu komórkowego w komórkach nieprzystosowanych do podziałów jest ich wprowadzenie na szlak apoptozy. Celem badań niniejszej rozprawy doktorskiej było sprawdzenie słuszności koncepcji, według której wyciszenie (metodą interferencji RNA) genów kinaz cyklino-zależnych *cdk2*, *cdk4* i *cdk6*, ulegających ekspresji podczas podziału komórek, mogłoby zapobiegać indukcji apoptozy i mieć działanie neuroprotekcyjne.

Zaprojektowano 21 cząsteczek siRNA skierowanych na ludzkie, mysie i szczurze geny kinaz cyklino-zależnych *cdk2*, *cdk4* i *cdk6* i sprawdzono ich aktywność interferencyjną w wybranych liniach komórkowych (HeLa, SH-SY5Y, Neuro2a, PC12). Metodami *real-time* RT-PCR, RT-PCR i Western blot oznaczono poziom wyciszenia badanych genów i dla każdego z nich wyselekcjonowano najbardziej aktywne cząsteczki siRNA. Następnie, w oparciu o sekwencje siRNA specyficzne dla genów *cdk4* i *cdk6* zaprojektowano 9 wstawek shRNA, które wklonowano do plazmidu ekspresyjnego pSilencer 2.0-U6. Zbadano aktywność wyciszającą tak przygotowanych plazmidów i stwierdzono, że cząsteczki shRNA wykazują słabszą aktywność interferencyjną wobec badanych genów niż odpowiadające im cząsteczki siRNA.

Sprawdzono, czy w komórkach HeLa i SH-SY5Y z obniżoną ekspresją genu *CDK4*, następuje również zmiana poziomu ekspresji białek pojawiających się w późniejszych etapach cyklu komórkowego, tj. cykliny A, cykliny E i PCNA. Wykazano, że poziom mRNA każdego z tych białek uległ obniżeniu zarówno w komórkach HeLa, jak i SH-SY5Y. Dla tych samych modeli komórkowych przeprowadzono także analizę ekspresji genów *APP*, *PS1* oraz *BACE1*, zaangażowanych w wytwarzanie β amyloidu. Badanie to wykazało, że komórki z obniżoną ekspresją genu *CDK4* wykazują także obniżoną ekspresję genów *BACE1* i *PS1*, natomiast poziom ekspresji genu *APP* pozostał niezmienny.

Następne badania miały na celu sprawdzenie koncepcji, czy wyciszenie genów kinaz cyklino-zależnych *cdk2*, *cdk4* i *cdk6* ma wpływ na zahamowanie cyklu komórkowego. Na przykładzie populacji komórek HeLa i SH-SY5Y z obniżoną ekspresją genu *CDK4* oceniono ilość komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (za pomocą cytometru przepływowego) i wykazano, że więcej komórek znajdowało się w fazie G0/G1, a mniej przechodziło do fazy S i G2/M w porównaniu z komórkami kontrolnymi (z niezmiennym poziomem ekspresji *CDK4*).

Kolejnym etapem badań było opracowanie warunków hodowli komórek HeLa i SH-SY5Y w warunkach stresu oksydacyjnego. Do badania zastosowano nadtlenek wodoru (H_2O_2) wywołujący stres oksydacyjny poprzez generowanie reaktywnych form tlenu (RFT). Stężenie H_2O_2 było tak dobrane, aby nie powodowało śmierci komórek, a stymulowało je do proliferacji. Po optymalizacji warunków hodowli z nadtlenkiem wodoru sprawdzono, czy komórki z wyciszoną ekspresją genu *CDK4* są tak samo podatne na stres oksydacyjny jak komórki kontrolne. Komórki HeLa i SH-SY5Y z interferencją genu *CDK4* poddano stymulacji H_2O_2 i oceniono (za pomocą cytometru przepływowego) ilość komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Zaobserwowano zmniejszoną ilość

komórek w fazie S i G2/M, i zwiększoną ilość komórek w fazie G0/G1, w porównaniu z kontrolą. Ponadto, nieznacznie zmniejszyła się ilość komórek apoptotycznych.

Przeprowadzono ocenę stopnia indukcji apoptozy wywołanej działaniem nadtlenu wodoru w komórkach Neuro2a z obniżoną ekspresją genu *cdk4* lub równocześnie trzech genów *cdk2*, *cdk4* i *cdk6*. W badaniach tych określono aktywność kaspazy 3 i 7, która okazała się niższa w komórkach badanych niż w komórkach transfekowanych kontrolnym siRNA. Wynik ten wskazuje, że wyciszenie genów kinaz cyklino-zależnych, a w szczególności kinazy *cdk4*, działa ochronnie na komórki w przypadku zaistnienia stresu oksydacyjnego.

W kolejnym etapie badań w komórkach HeLa i SH-SY5Y uzyskano nadekspresję inhibitorów kinaz cyklino-zależnych p16(INK4a), p18(INK4c), p21(CDKN1A, WAF1) z plazmidów ekspresyjnych pVax1 i pEGFP-C1 z wklonowanymi wstawkami kodującymi pożądaną transgeny. Analiza zmian faz cyklu komórkowego (za pomocą cytometru przepływowego) wykazała, że nadekspresja inhibitorów kinaz cyklino-zależnych z użyciem pVax1 nieznacznie wpływa na zmiany w populacji komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego, aczkolwiek w zdecydowanej większości zmiany te wskazywały zwiększony procent populacji komórek w fazie G0/G1, a zmniejszony w fazach S i G2/M, w porównaniu do komórek kontrolnych, transfekowanych pustym plazmidem. Nadekspresja inhibitorów kinaz cyklino-zależnych w plazmidzie pEGFP-C1 tylko nieznacznie wpływała na zmiany w populacji komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego.

W ostatniej części pracy porównano właściwości dwóch dokomórkowych nośników kwasów nukleinowych, neurospecyficznego peptydu RVG-9R i nośnika lipidowego Lipofectamine 2000. Stwierdzono, iż peptyd RVG-9R wydajnie wprowadza siRNA do komórek neuronalnych, czego dowodem było wyciszenie docelowego genu *cdk4*. Peptyd ten, jak wcześniej wykazano, specyficznie łączy się receptorami nikotynowymi obecnymi w błonie komórek o charakterze neuronalnym, takich jak komórki Neuro2a. W nieneuronalnych komórkach HeLa, w których receptory nikotynowe nie występują, peptyd RVG-9R nie wprowadzał siRNA, czego wynikiem był brak wyciszenia genu *cdk4*. Drugi badany nośnik kwasów nukleinowych, Lipofectamine 2000, nie działał neuroselektywnie i wydajnie wprowadzał siRNA do obu typów komórek, czego wynikiem było wyciszenie ekspresji docelowego genu *cdk4*.