



Dorota Dziuban-Lech

tytuł rozprawy w j. polskim:

Charakterystyka statusu redoks oraz profilu wybranych lipidów u myszy z deficytem białka naprawy DNA – ERCC1

tytuł rozprawy w j. angielskim:

Characterization of the redox status and selected lipid profile in mice deficient in DNA repair protein – ERCC1

Rozprawa doktorska wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej oraz w Zakładzie Biochemii Lipidów IBB PAN

Promotor: dr hab. Elżbieta Speina

Recenzenci: prof. dr hab. Anna Lankoff

dr hab. Anna Bielak-Żmijewska

Praca wykonana w ramach projektu badawczego nr N N303 819540: „Charakterystyka mysich tkanek i komórek *Erccl^{-/-}* jako modelu do badań nad wpływem stresu oksydacyjnego na procesy starzenia”

STRESZCZENIE

Starzenie jest skomplikowanym procesem biologicznym, na który składają się liczne mechanizmy o różnym poziomie regulacji. Pomimo wielu badań etiologia starzenia pozostaje wciąż słabo poznana. Ze starzeniem związane jest występowanie wielu schorzeń, m.in. neurodegeneracyjnych oraz rozwój nowotworów. Pogłębienie wiedzy na temat mechanizmów starzenia pozwoli lepiej zrozumieć zaburzenia, które pojawiają się wraz z wiekiem. Z powodu swojej skomplikowanej natury i czasu potrzebnego do rozwoju fenotypu, starzenie jest trudne do badania na ludziach. Alternatywą jest wykorzystanie modeli zwierzęcych takich jak np. myszy. Myszy *Erccl^{-/-}* z usuniętym pojedynczym genem kodującym białko zaangażowane w proces naprawy DNA przez wycinanie nukleotydów (ang. nucleotide excision repair, NER), które zostały wykorzystane do badań opisanych w niniejszej rozprawie, są jednym z takich modeli.

Kompleks ERCC1-XPF jest główną endonukleazą zaangażowaną w naprawę uszkodzeń zaburzających strukturę DNA poprzez szlak NER, niezbędną w usuwaniu z DNA dużych adduktów oraz wiązań krzyżowych pomiędzy nukleotydami (ang. interstrand crosslinks, ICLs). Brak naprawy ICLs prowadzi do zahamowania replikacji i transkrypcji. Dochodzi do zablokowania widełek replikacyjnych i gromadzenia w DNA dwuniciowych przerw, a w konsekwencji do zahamowania proliferacji komórek i wzrostu organizmu. Mutacje lub delekcje w *Ercc1* lub *Xpf* u myszy i mutacja ERCC1 u człowieka powodują schorzenia dające objawy przedwczesnego starzenia, zaburzenia wzrostu, neurodegeneracji i zwiększonej częstości pojawiania się nowotworów. Zmiany pojawiają się bardzo szybko po narodzinach, już w drugim tygodniu życia osobników. Co ciekawe, rozwój prenatalny myszy *Ercc1^{-/-}* jest prawidłowy. Obserwacje te doprowadziły do sformułowania hipotezy, iż głównym czynnikiem powodującym zmiany patologiczne u myszy *Ercc1^{-/-}* jest tlen w stężeniu atmosferycznym. Przed urodzeniem myszy znajdują się bowiem w środowisku, w którym występuje znacznie niższe stężenie tlenu niż atmosferyczne. Po narodzinach zwierzęta te zostają wystawione na działanie stresu oksydacyjnego, a ich systemy naprawy nie potrafią wydajnie usuwać uszkodzeń, co związane jest z brakiem funkcjonalnego białka ERCC1.

Niniejsza praca ma aspekt dwuwymiarowy. Po pierwsze, była próbą wyjaśnienia w jaki sposób stres oksydacyjny, a szczególnie związana z nim peroksydacja lipidów (ang. lipid peroxidation, LPO) i powstające endogenie uszkodzenia DNA i białek, przyczynia się do wystąpienia objawów przyspieszonego starzenia u myszy *Ercc1^{-/-}*. Po drugie, była pierwszą analizą składu wybranych lipidów zwierząt doświadczalnych z uszkodzonym systemem naprawy DNA. Ponadto, została zbadana ekspresja wybranych genów metabolizmu cholesterolu oraz poliprenoli.

Peroksydacja lipidów może być zarówno skutkiem, jak i przyczyną starzenia. W celu sprawdzenia czy do kształtowania fenotypu myszy *Ercc1^{-/-}* może przyczyniać się mniej efektywna ochrona przed reaktywnymi formami tlenu porównano aktywność enzymów antyoksydacyjnych w embrionalnych mysich fibroblastach (ang. mouse embryonic fibroblasts, MEFs) *Ercc1^{-/-}* oraz typu podstawowego (ang. wild type, WT). Wykazano, że MEFs *Ercc1^{-/-}* są nadwrażliwe na produkty LPO, co można tłumaczyć zmniejszoną aktywnością enzymów antyoksydacyjnych w tych komórkach. Obniżona aktywność

S-transferazy glutationowej stanowi element, który może pomóc w zrozumieniu zależności pomiędzy peroksydacją lipidów a starzeniem. Mianowicie, jeżeli aktywność tego enzymu jest zmniejszona, usuwanie z komórek jednego z głównych produktów peroksydacji lipidów, *trans*-4-hydroksy-2-nonenal (HNE) jest mało efektywne, co może prowadzić do akumulacji tego związku i uszkodzeń makromolekułów komórkowych. Ponadto wykazano, że w tkankach mysich HNE może przyłączać się do szeregu ważnych metabolicznie białek, tworząc addukty. A to może być jednym z kluczowych mechanizmów prowadzącym do wykształcenia fenotypu przyspieszonego starzenia u myszy *Ercc1^{-/-}*.

Produkty białek z reaktywnymi aldehydami wykazują działanie toksyczne, a ich nagromadzenie w komórkach prowadzi do powstawania stanów patologicznych, m.in. chorób neurodegeneracyjnych. W warunkach fizjologicznych ilość grup karbonylowych w białkach utrzymuje się na stałym, dość niskim poziomie. W przypadku stresu oksydacyjnego oraz starzenia poziom zawartości grup karbonylowych wzrasta w komórkach 2-8-krotnie, dlatego stanowi on marker oksydacyjnych uszkodzeń białek oraz starzenia. Uzyskane wyniki analizy poziomu grup karbonylowych w MEFs i tkankach mogą sugerować, że usuwanie uszkodzonych białek jest zaburzone w komórkach *Ercc1^{-/-}*. Może to dezorganizować funkcjonowanie tych komórek i przyczyniać się do przyspieszonego starzenia organizmu myszy z niedoborem ERCC1.

Coraz więcej danych sugeruje, że metabolizm lipidów odgrywa ważną rolę w procesie starzenia, jednak, jak dotąd, brak jest w literaturze naukowej danych na temat metabolizmu lipidów u organizmów z uszkodzonym kompleksem endonukleazy ERCC1-XPF. Biorąc to pod uwagę, kolejnym celem pracy było scharakteryzowanie profilu lipidowego w komórkach i tkankach myszy pozbawionych genu *Ercc1* i sprawdzenie czy ewentualne jego zmiany mogą przyczyniać się do przyspieszonego starzenia tych myszy. Badano profil lipidów – kwasów tłuszczyowych oraz wybranych metabolitów szlaku mewalonowego (skwalenu, cholesterolu oraz dolicholi) w unieśmiertelionych MEFs *Ercc1^{-/-}* i WT oraz w mózgu, wątrobie i nerkach myszy *Ercc1^{-/-}* i WT. Analiza profilu lipidowego unieśmiertelionych MEFs wykazała istotnie mniejszą całkowitą zawartość kwasów tłuszczyowych (FA), jednonienasyconych (MUFA) oraz wielonienasyconych (PUFA) w komórkach *Ercc1^{-/-}* w porównaniu do komórek WT. Chociaż nie wykazano statystycznie istotnych różnic w profilu kwasów tłuszczyowych pomiędzy mózgami oraz wątrobami myszy obu genotypów to obserwowane niewielkie zmiany mogą niekorzystnie wpływać na rozwój i funkcjonowanie osobników *Ercc1^{-/-}*. Obserwowany wzrost zawartości dolicholu w mózgach i wątrobach myszy *Ercc1^{-/-}* w stosunku do WT potwierdza rolę tego lipidu jako markera starzenia organizmów.

Podsumowując, przyczyną zaburzenia metabolizmu lipidów u myszy *Ercc1^{-/-}* może być wyższy poziom stresu oksydacyjnego i wynikająca z niego nasilona peroksydacja lipidów, co może prowadzić do uszkodzeń DNA, zmiany regulacji ekspresji genów, uszkodzenia białek enzymatycznych szlaku β-oksydacji, syntezy, elongacji i desaturacji kwasów tłuszczyowych. Zmiany te wraz ze zwiększoną stresem oksydacyjnym w komórkach oraz niedostateczną aktywnością antyoksydacyjną mogą prowadzić do neurodegeneracji oraz przyspieszonego starzenia myszy pozbawionych genu *Ercc1*.

Uzyskane wyniki przybliżyły rolę ERCC1-XPF w procesie starzenia, wskazały endogenne czynniki sprzyjające starzeniu organizmu i neurodegeneracji oraz będą mogły przyczynić się w przyszłości do opracowania nowych strategii terapeutycznych.

ABSTRACT

Aging is a complex biological process consisting of numerous mechanisms with different levels of regulation. Despite many studies, the etiology of aging remains poorly understood. Aging is associated with many diseases, including neurodegeneration and the development of cancer. Improving knowledge about the mechanisms of aging will help us better understand age-related disorders. Due to its complex nature and time required for phenotype development, aging is difficult to study in humans. An alternative is to use animal models such as mice. One of these models are *Ercc1^{-/-}* mice with a deleted gene coding for a single protein involved in the process of DNA repair by means of nucleotide excision repair (NER), which were used in the studies described in this dissertation.

The ERCC1-XPF complex is a major endonuclease involved in the repair of DNA lesions through the NER pathway, essential for removing large adducts and interstrand crosslinks (ICLs) from DNA. Failure to repair ICLs leads to inhibition of replication and transcription. Replication forks are blocked and double strand breaks accumulate in DNA, which consequently inhibits cell proliferation and body growth. Mutations or deletions in *Ercc1* or *Xpf* mice and ERCC1 mutation in humans cause diseases that show signs of premature aging, growth disorders, neurodegeneration, and an increased incidence of cancer. Changes occur very quickly after birth, in the second week of life of the individuals. Interestingly, the prenatal development of *Ercc1^{-/-}* mice is normal. These observations led to the hypothesis that the main factor causing pathological changes in *Ercc1^{-/-}* mice is oxygen at atmospheric concentration. Before birth, the mice are in an environment where there is a much lower concentration of oxygen. After birth, these animals are exposed to oxidative stress and their repair systems cannot efficiently remove damage due to the lack of functional ERCC1 protein.

This work has a two-dimensional aspect. First, it was an attempt to explain how oxidative stress, and in particular the associated lipid peroxidation (LPO) and endogenous DNA and protein damage, contribute to the appearance of accelerated aging symptoms in *Ercc1^{-/-}* mice. Secondly, it was the first analysis of the composition of selected lipids of experimental animals with a damaged DNA repair system. In addition, the expression of selected cholesterol and polyisoprenol metabolism genes was examined.

Lipid peroxidation can be both a result and a cause of aging. In order to check whether less effective protection against reactive oxygen species could contribute to the phenotype of *Ercc1^{-/-}* mice, the activity of antioxidant enzymes in *Ercc1^{-/-}* and the wild type (WT) mouse embryonic fibroblasts (MEFs) was compared. *Ercc1^{-/-}* MEFs were shown to be hypersensitive to LPO products, which can be explained by the reduced activity of antioxidant enzymes in these cells. Reduced glutathione S-transferase activity is an element that can help to understand the relationship between lipid peroxidation and aging. Namely, if the activity of this enzyme is reduced, the removal from the cells one of the major products of lipid peroxidation, trans-4-hydroxy-2-nonenal (HNE) is not very

effective, which can lead to the accumulation of this compound and damage to cellular macromolecules. In addition, HNE has been shown to bind to a number of metabolically important proteins in mouse tissues to form adducts. And this may be one of the key mechanisms leading to the development of the accelerated aging phenotype in *Ercc1*^{-/-} mice.

Protein products with reactive aldehydes are toxic and their accumulation in cells leads to pathological conditions, including neurodegenerative diseases. Under physiological conditions, the number of carbonyl groups in proteins remains constant, quite low. In the case of oxidative stress and aging, the level of carbonyl groups increases in cells by 2-8 times, which is why it is a marker of oxidative damage to proteins and aging. The obtained results from the analysis of carbonyl groups in MEFs and tissues may suggest that the removal of damaged proteins is disturbed in *Ercc1*^{-/-} cells. This can disorganize the functioning of these cells and contribute to accelerated aging of the ERCC1-deficient mouse.

Increasing data suggest that lipid metabolism plays an important role in the aging process, however, there is currently no data in the scientific literature on lipid metabolism in organisms with damaged ERCC1-XPF endonuclease complex. Considering this, another goal of the study was to characterize the lipid profile in cells and tissues of mice lacking the *Ercc1* gene and to check whether any changes may contribute to the accelerated aging of these mice. The lipid profile – fatty acids and selected metabolites of the mevalon pathway (squalene, cholesterol and dolichols) in the immortalized MEFs *Ercc1*^{-/-} and WT as well as in the brain, liver and kidneys of *Ercc1*^{-/-} and WT mice were studied. Analysis of the lipid profile of immortalized MEFs showed significantly lower total fatty acids (FA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) content in *Ercc1*^{-/-} cells compared to WT cells. Although no statistically significant differences in the fatty acid profile were found between brains and livers of mice of both genotypes, the observed small changes may adversely affect the development and functioning of *Ercc1*^{-/-} individuals. The observed increase in dolichol content in brains and livers of *Ercc1*^{-/-} mice relative to WT confirms the role of this lipid as a marker of body aging.

In summary, the cause of lipid metabolism disorders in *Ercc1*^{-/-} mice may be a higher level of oxidative stress and the resulting increase in lipid peroxidation, which may lead to DNA damage, changes in gene expression regulation, damage to the enzymes of the β-oxidation pathway, synthesis, elongation and fatty acid desaturation. These changes together with increased oxidative stress in cells and insufficient antioxidant activity may lead to neurodegeneration and accelerated aging of mice lacking the *Ercc1* gene.

The obtained results approximated the role of ERCC1-XPF in the aging process, indicated endogenous factors favoring the aging of the body and neurodegeneration, and will be able to contribute in the future to the development of new therapeutic strategies.

