

Oksydacyjne uszkodzenia DNA w chorobie Alzheimer'a i Creutzfeldta-Jakoba

DNA oxidative damage in Alzheimer's and Creutzfeldt-Jakob disease

Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Adres do korespondencji: Dr Sylwia M. Grešner, Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii, Uniwersytet Medyczny, ul. Czechosłowacka 8/10, 92-216 Łódź, tel.: 42 675 76 11, faks: 42 679 14 77, e-mail: sylwiagresner@yahoo.com

Autorzy dedykują sympozjum pamięci Prof. Huberta Kwiecińskiego

Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi z pracy własnej nr 502-11-864 i z grantu MNiSW nr N/N402/471940

Streszczenie

Wspólną cechą choroby Alzheimer'a (AD) i Creutzfeldta-Jakoba (CJD) jest utrata komórek nerwowych oraz gromadzenie się w mózgu złożeń nieprawidłowo zwiniętych białek. Pomimo coraz szerszej wiedzy na temat patogenezы chorób neurodegeneracyjnych precyzyjne mechanizmy molekularne procesów patologicznych w tej grupie chorób wciąż nie zostały jednoznacznie wyjaśnione. W ostatnich latach wzrosła liczba dowodów na to, że stres oksydacyjny odgrywa ważną rolę w rozwoju tych chorób neurodegeneracyjnych. Proponuje się związek pomiędzy odkładaniem nieprawidłowych form białek a wzrostem produkcji reaktywnych form tlenu, zarówno w przypadku AD, jak i CJD. W świetle licznych dowodów występowania uszkodzeń DNA wywołanych działaniem stresu oksydacyjnego postuluje się zaangażowanie genów naprawy DNA w patogenezę tych chorób. Produkty genów naprawy *OGG1*, *APE1*, *XRCC1* są zaangażowane w usuwanie oksydacyjnych uszkodzeń DNA i ochronę komórki przed zgubnymi skutkami stresu oksydacyjnego, włącznie ze śmiercią komórkową. Enzymy systemu naprawy uszkodzeń DNA odgrywają istotną rolę w utrzymaniu integracji genomu. W przypadku ich całkowitego braku lub uszkodzeń w komórkach dochodzi do gromadzenia błędów, które prowadzą do śmierci komórki.

Słowa kluczowe: stres oksydacyjny, uszkodzenia DNA, geny naprawy DNA, choroba Alzheimer'a, choroba Creutzfeldta-Jakoba

Summary

The loss of nerve cells and the accumulation of pathological protein deposits comprise the common features of Alzheimer's disease (AD) and Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). Despite our constantly broadening knowledge of the pathogenesis of neurodegenerative diseases, the precise molecular mechanisms of the pathological processes underlying this group of diseases still remain to be unambiguously elucidated. Recently, evidence suggesting a crucial role for the oxidation stress in the development of these neurodegenerative diseases has significantly increased. An association between the accumulation of pathological protein deposits and increased generation of reactive oxygen species has been proposed in both AD and CJD. In the light of increasing evidence documenting the occurrence of DNA damage as a consequence of oxidative stress, involvement of DNA repair genes in the pathogenesis of these diseases was implicated. The product of *OGG1*, *APE1* and *XRCC1* genes play various roles in the removal of oxidative-stress-induced DNA damage, and in the protection of cells against the consequences of oxidative stress, including cell death. The enzymes comprising the DNA repair system play a significant role in maintaining an intact genome. Therefore, the dysfunction of this system or its partial impairment may lead to an accumulation of errors which ultimately lead to cell death.

Key words: oxidative stress, DNA damage, DNA repair genes, Alzheimer's disease, Creutzfeldt-Jakob disease

WSTĘP

Choroby neurodegeneracyjne, a wśród nich choroba Creutzfeldta-Jakoba (CJD) i choroba Alzheimera (AD), stanowią poważny problem medyczny i społeczny. Ich wspólną cechą jest utrata komórek nerwowych oraz gromadzenie się w mózgu złożeń nieprawidłowych białek. CJD należy do chorób wywoływanych przez priony, u podstaw których leży konwersja prawidłowego białka PrP^c w nieprawidłową izofর্মę PrP^{Sc} o zmienionej strukturze przestrzennej. Sporadyczna CJD (sCJD) stanowi około 90% wszystkich przypadków choroby Creutzfeldta-Jakoba. Częstość występowania sCJD na świecie szacuje się na 0,5-1 na milion osób w populacji na rok, natomiast w Polsce na 0,25-0,9 na milion, co może wynikać z faktu, iż nie wszystkie przypadki są właściwie rozpoznawane. CJD charakteryzuje się szybkim przebiegiem, postępujący deficyt neurologiczny kończy się śmiercią w ciągu 1 roku u 90% chorych⁽¹⁾. Klasykne objawy kliniczne to szybko postępujące otępienie, mioklonie i charakterystyczny zapis EEG⁽²⁾. Chociaż choroba ta jest stosunkowo rzadka, stanowi zagrożenie epidemiologiczne, ponieważ czynnik zakaźny nie poddaje się standardowym metodom sterylizacji.

Choroba Alzheimera związana z odkładaniem w mózgu β -amyloidu stanowi 50% wszystkich przypadków otępienia, charakteryzuje się zaburzeniami funkcji poznawczych, zwłaszcza zaś postępującym zanikiem pamięci czy utratą zdolności do myślenia abstrakcyjnego. Najważniejszym czynnikiem ryzyka wystąpienia choroby Alzheimera jest wiek. Szacuje się, iż choroba ta dotyczy w przybliżeniu 7% osób, które ukończyły 65. rok życia. W Polsce na chorobę Alzheimera choruje około 200 000 osób⁽³⁾.

W ostatnich latach pojawiają się ciągle nowe dowody na to, że stres oksydacyjny ma kluczowe znaczenie w procesie starzenia się mózgu oraz w patogenezie i progresji chorób zwyrodnieniowych OUN. Wiadomo, że mózg jest szczególnie wrażliwy na uszkodzenia oksydacyjne z uwagi na wysoką konsumpcję tlenu przy jednocześnie relatywnie niskim poziomie enzymów usuwających reaktywne formy tlenu. Te ostatnie wchodzą w reakcje z różnymi cząsteczkami, tj. białkami, lipidami, DNA oraz RNA, prowadząc do dysfunkcji komórki, a nawet do jej śmierci, co w przypadku niedzielałych się neuronów powoduje nieodwracalne uszkodzenia mózgu⁽⁴⁾. Precyzyjny mechanizm, w wyniku którego dochodzi do wzrostu stresu oksydacyjnego w chorobach neurodegeneracyjnych, jest dotąd nieznan. Postuluje się związek pomiędzy odkładaniem nieprawidłowych form białek a wzrostem stresu oksydacyjnego zarówno w przypadku choroby Alzheimera, jak i Creutzfeldta-Jakoba⁽⁵⁾.

Wiele eksperymentów sugeruje związek pomiędzy toksycznością β -amyloidu a generowaniem wolnych rodników w przypadku AD. Wzrost utleniania i nitracji białek, a także peroksydacji lipidów stwierdza się w obszarach mózgu, w których występują blaszki amyloidowe oraz zwyrodnienie neurofibrilarnie. Utlenianie białek w mózgu chorych z AD stwierdzane jest w regionach z wysoką zawartością β -amyloidu (płat ciemieniowy, kora i hipokamp), ale nie w mózdzku, gdzie poziom β -amyloidu jest nieznaczny⁽⁶⁾. Istotne znaczenie dla badań nad podłożem choroby Alzheimera wydaje się mieć fakt, iż uszkodzenia mózgu

spowodowane działaniem reaktywnych form tlenu u osób z AD mają związek z genotypem APOE. Apolipoproteina E jest białkowym składnikiem licznych lipoprotein osocza, jest także obecna w płynie mózgowo-rdzeniowym. Odgrywa ważną rolę w regulowaniu metabolizmu lipidów osocza, ale także w modulowaniu odpowiedzi zapalnej, w zjawisku apoptozy czy też stresu oksydacyjnego. APOE występuje w trzech izoformach: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$. APOE $\epsilon 4$ jest głównym czynnikiem genetycznym związanym z występowaniem sporadycznej i rodzinnej postaci choroby Alzheimera. Istnieje dobrze udokumentowany związek rodzinnej postaci AD o późnym początku z genotypem APOE $\epsilon 4$. Posiadanie tego allelu obniża w sposób statystycznie istotny wiek, w którym może pojawić się choroba⁽⁷⁾. W tkankach osób z AD, homozygotycznych pod względem allelu $\epsilon 4$, stwierdza się wyższy poziom peroksydacji lipidów w porównaniu z chorymi heterozygotycznymi pod względem allelu $\epsilon 3$, jak również w porównaniu z osobami zdrowymi. Przepuszcza się zatem, iż APOE posiada właściwości antyoksydacyjne, przy czym najbardziej efektywnym utleniaczem byłaby izoforma $\epsilon 2$, z kolei $\epsilon 4$ – najsłabszym⁽⁸⁾.

Wiele badań potwierdza również rolę reaktywnych form tlenu w chorobach wywoływanych przez priony. Istnieją doniesienia postulujące zaangażowanie stresu oksydacyjnego w śmierć neuronów w chorobie Creutzfeldta-Jakoba⁽⁹⁾. Uważa się, że prawidłowe białko PrP^c pełni funkcję neuroprotekcijną, odgrywa kluczową rolę w ochronie komórki przed uszkodzeniami DNA wywołanymi działaniem reaktywnych form tlenu⁽⁹⁾. Utrata właściwości antyoksydacyjnych następuje podczas transformacji prawidłowego PrP^c do PrP^{Sc}. Odkładaniu depozytów PrP^{Sc} towarzyszy jednoczesny wzrost wrażliwości neuronów na egzogenne czynniki stresujące, a w konsekwencji ich śmierć. Postuluje się, iż zjawisko utraty właściwości antyoksydacyjnych przez PrP może odgrywać kluczową rolę w patogenezie chorób prionowych⁽¹⁰⁾. Dowodów na to dostarczają między innymi badania zespołu Watta i wsp. (2007 r.) z wykorzystaniem linii komórkowych. Autorzy udowodnili, iż PrP^c chroni DNA przed uszkodzeniami w komórkach nerwowych, w tym i tych generowanych w wyniku stresu oksydacyjnego. Wzrost uszkodzeń DNA zaobserwowali w komórkach ze zmutowanym białkiem PrP^c, a także w komórkach zarażonych PrP^{Sc}⁽⁹⁾. Ponadto wydaje się istotne, iż poziom uszkodzeń kwasów nukleinowych (8-hydroksyguanozyny) korelował z odkładaniem depozytów PrP^{Sc}⁽⁵⁾. Zaobserwowano także oksydacyjne uszkodzenia białek, powstałe w wyniku stresu oksydacyjnego w korze mózgowej osób chorych na sCJD⁽¹¹⁾. Zarówno w przebiegu AD, jak i CJD w wyniku stresu oksydacyjnego dochodzi do wzrostu uszkodzeń DNA znajdujących w tkance nerwowej. Uszkodzenia te są usuwane przez szereg enzymów naprawczych, między innymi na drodze szlaku BER (*base excision repair*, usuwanie zmodyfikowanych zasad). Enzymy systemu naprawy uszkodzeń DNA odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu integracji genomu. W przypadku ich całkowitego braku lub uszkodzeń w komórkach dochodziłoby do gromadzenia błędów, które w krótkim czasie uniemożliwiłyby przeżycie komórki.

Gen *OGG1* koduje glikozylazę 8-oksoguaniny (*8-oxoguanine glycosylase*), białka uczestniczącego w szlaku naprawy DNA – BER. Enzym ten jest zaangażowany w usuwanie uszkodzeń DNA

powstałych na skutek działania stresu oksydacyjnego, również w neuronach. Jest on odpowiedzialny za usuwanie z DNA 8-OHG (8-hydroksyguanozyny). Podwyższony poziom 8-OHG stwierdza się w przypadku sporadycznej choroby Creutzfeldta-Jakoba⁽¹²⁾. Fakt, iż w mózgach osób chorych na CJD obserwuje się wzrost poziomu 8-OHG, mógłby świadczyć, iż stres oksydacyjny może przyczyniać się do śmierci neuronów w przypadku tej choroby. Z kolei obniżony poziom jądrowej frakcji OGG1 obserwowano u pacjentów z chorobą Alzheimera w późnym stadium w porównaniu ze zdrowymi kontrolami. Obniżony poziom aktywności OGG1 w mózgach osób z AD dotyczy rejonów podatnych na uszkodzenia: hipokampu, zakrętów skroniowych (ale nie mózdzku)⁽¹³⁾. Stwierdzono również obniżenie ekspresji mitochondrialnej frakcji OGG1 w neuronach pochodzących od osób z AD (kora czołowa)⁽¹⁴⁾. Jednocześnie obserwuje się podniesiony poziom 8-hydroksyguanozyny, który towarzyszy obniżonej aktywności OGG1. Statystycznie istotny wzrost 8-OHG (ale również 8-OHA i 8-OHU) stwierdzono w płatach czołowych i ciemieniowych u osób z AD⁽¹⁵⁾. Przypuszcza się zatem, iż ograniczone usuwanie 8-OHG przez OGG1, które ma miejsce w rozwoju AD, może przyczyniać się do akumulacji uszkodzeń DNA i degeneracji neuronów w tej chorobie. Badania grupy Mao (2007 r.) zaowocowały znalezieniem u chorych z AD mutacji w genie *OGG1*. Dwie z tych mutacji to delekcje obejmujące cytozynę w pozycji 796 i zmieniające sekwencję C-terminalnego fragmentu białka, dwie pozostałe dotyczyły zmian nukleotydów i prowadziły do substytucji pojedynczych aminokwasów⁽¹⁶⁾. Ponadto udokumentowano możliwy związek polimorfizmu Ser326Cys z obniżonym poziomem uszkodzeń 8-oxo-2dG, a także wykazano, iż izoformy OGG1 mogą być związane z progresją AD⁽¹⁷⁾. Przypuszcza się, że obserwowane oksydacyjne uszkodzenia DNA typu 8-oxoG mogą być również wynikiem obniżenia poziomu innego enzymu znanego pod nazwą APE1 lub Ref1. APE1 pełni ważną rolę w odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny, wykazując aktywność naprawczą DNA, ale także dzięki zdolności do regulacji redoks, wpływając na ekspresję genów regulowanych przez takie czynniki transkrypcyjne, jak: NF-κB, p53, Egr-1 i in. APE1 jest kluczowym enzymem naprawczym szlaku BER u ssaków, o aktywności endonukleazy oraz 3' fosfodiesterazy, 3'-5' egzonukleazy i 3' fosfatazy, bierze udział w naprawie różnorodnych uszkodzeń DNA (np. uracyl, alkilowane i utlenione zasady oraz miejsca pozbawione zasad), ale również pojedynczych pęknięć⁽¹⁸⁻¹⁹⁾. Aktywność redoks jest związana z fragmentem sygnałowym NLS (*nuclear localization signal*), zlokalizowanym w N-terminalnym fragmencie białka, z kolei enzymatyczna aktywność naprawcza jest związana z fragmentem C-terminalnym. Vasco i wsp. (2005 r.), demonstrując związek pomiędzy APE1 i przeżywalnością neuronów, zasugerowali neuroprotektyną rolę białka przy jednoczesnym założeniu, że do przetrwania neuronów wymagana jest zarówno aktywność redoks, jak i aktywność naprawcza. Wykazali oni, iż obniżenie ekspresji APE1 skutkuje wzrostem toksyczności H₂O₂. Redukcja poziomu APE1 korelowała ze wzrostem aktywności kaspazy-3 oraz wzrostem ilości podwójnych pęknięć DNA, co może sugerować ochronną rolę APE1 przed apoptozą neuronów⁽¹⁸⁾. Białkiem pełniącym funkcję koordynującą kolejne etapy szlaku BER, które oddziałuje

z innymi białkami tego szlaku: OGG1, APE1, β-polimerazą DNA, ligazą IIIα oraz polimerazą ADP-rybozy (PARP), jest XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing 1*). Dzięki tym interakcjom możliwa jest naprawa między innymi oksydacyjnych uszkodzeń DNA. XRCC1 jest werbowany do miejsc naprawy aż do ostatniego etapu – ligacji, regulując i koordynując przebieg całego procesu naprawy. Stymuluje powstawanie półproduktu OGG1-DNA, zwiększając nawet 3-krotnie usuwanie 8-oxoG. Ponadto XRCC1 ułatwia zamianę glikozylazy DNA z APE1 w zniszczonym substracie, podnosząc wydajność usuwania zmodyfikowanych zasad⁽²⁰⁾. W cząsteczce XRCC1 możemy wyróżnić N-terminalną domenę (NTD), która jest niezbędna do interakcji z β-polimerazą⁽²¹⁾, z kolei domena BRCT (*BRCA1 carboxyl terminus*) zlokalizowana w C-terminalnym fragmencie białka umożliwia interakcje z ligazą IIIα oraz PARP⁽²²⁾. Spośród niewielkiej liczby prac poświęconych XRCC1 w kontekście chorób neurodegeneracyjnych na uwagę zasługuje praca Dođru-Abbasođlu i wsp. (2007 r.), w której autorzy opisują związek polimorfizmu Arg194Trp z ryzykiem wystąpienia sporadycznej choroby Alzheimera. Jakkolwiek autorzy nie stwierdzili statystycznie istotnego związku badanego polimorfizmu z AD, to jednak zaobserwowali, że allel dla tryptofanu występował częściej wśród osób chorych (11,2%) w porównaniu ze zdrowymi kontrolami (5,8%). Ponadto wariant homozygotyczny Trp/Trp występował tylko u osób chorych⁽²³⁾. Pomimo gwałtownego rozwoju biologii molekularnej obecny stan wiedzy wciąż nie pozwala na precyzyjne wyjaśnienie mechanizmu procesu patologicznego opisywanych chorób. Poznanie przyczyny śmierci neuronów jest o tyle istotne, że wciąż nie potrafimy zapobiegać uszkodzeniom neuronów, co jest niewątpliwie wielkim problemem współczesnej medycyny. Być może niepowodzenia na tym polu można tłumaczyć niedostatecznym zrozumieniem między innymi mechanizmów aktywacji endogennych czynników neuroprotektynnych, w tym enzymów naprawczych DNA.

PIŚMIENNICTWO:

BIBLIOGRAPHY:

1. Liberski P.: Choroba Creutzfeldta-Jakoba i inne choroby wywołane przez priony – pasażowalne encefalopatie gąbczaste człowieka. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2003.
2. World Health Organization. Global surveillance, diagnosis and therapy of human Transmissible Spongiform Encephalopathies: report of a WHO consultation. Geneva 1998. Adres: http://www.who.int/csr/resources/publications/bse/WHO_EM_C_ZDI_98_9/en/
3. Gabryelewicz T.: Epidemiologia otępień i choroby Alzheimera na świecie i w Polsce. Nowe Perspektywy w Leczeniu Choroby Alzheimera 1998, 2-3.
4. Bartosz G.: Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006.
5. Van Everbroeck B., Dobbelaire I., De Waele M. i wsp.: Extracellular protein deposition correlates with glial activation and oxidative stress in Creutzfeldt-Jakob and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2004; 108: 194-200.
6. Balcerzyk A., Żak I.: Apolipoproteina E – rola polimorfizmu w patogenezie licznych chorób. *Postępy Biochemii* 2004; 50: 344-352.
7. Poirier J., Delisle M., Quirion R. i wsp.: Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment out-

- come in Alzheimer's disease. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1995; 92: 12260-12264.
8. Pamplona R., Naudí A., Gavín R. i wsp.: Increased oxidation, glycooxidation, and lipoxidation of brain proteins in prion disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2008; 45: 1159-1166.
 9. Watt N., Routledge M., Wild C., Hooper N.: Cellular prion protein protects against reactive-oxygen-species-induced DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 43: 959-967.
 10. Guentchev M., Siedlak S., Jarius C. i wsp.: Oxidative damage to nucleic acids in human prion disease. *Neurobiol. Dis.* 2002; 9: 275-281.
 11. Freixes M., Rodríguez A., Dalfó E., Ferrer I.: Oxidation, glycooxidation, lipoxidation, nitration, and responses to oxidative stress in the cerebral cortex in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol. Aging* 2006; 27: 1807-1815.
 12. Petersen R., Siedlak S., Lee H. i wsp.: Redox metals and oxidative abnormalities in human prion diseases. *Acta Neuropathol.* 2005; 110: 232-238.
 13. Lovell M., Markesbery W.: Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: 7497-7504.
 14. Lida T., Furuta A., Nishioka K. i wsp.: Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol.* 2002; 103: 20-25.
 15. Gabbita S., Lovell M., Markesbery W.R.: Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 1998; 71: 2034-2040.
 16. Mao G., Pan X., Zhu B. i wsp.: Identification and characterization of OGG1 mutations in patients with Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: 2759-2766.
 17. Doroszewska J., Kempisty B., Jaroszewska-Kolecka J. i wsp.: Expression and polymorphism of gene 8-Oxoguanine glycosylase 1 and the level of oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *DNA and Cell Biology* 2009; 28: 579-588.
 18. Vasko M., Guo C., Kelley M.: The multifunctional DNA repair/redox enzyme Ape1/Ref-1 promotes survival of neurons after oxidative stress. *DNA Repair (Amst.)*. 2005; 4: 367-379.
 19. Dyrkheeva N., Khodyreva S., Lavrik O.: Multifunctional human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1: the role of additional functions. *Mol. Biol. (Mosk.)* 2007; 41: 450-466.
 20. Parildar-Karpuzoğlu H., Dođru-Abbasođlu S., Hanagasi H. i wsp.: Single nucleotide polymorphisms in base-excision repair genes hOGG1, APE1 and XRCC1 do not alter risk of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 2008; 442: 287-291.
 21. Marintchev A., Robertson A., Dimitriadis E. i wsp.: Domain specific interaction in the XRCC1-DNA polymerase beta complex. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28: 2049-2059.
 22. Thornton K., Forstner M., Shen M.R. i wsp.: Purification, characterization, and crystallization of the distal BRCT domain of the human XRCC1 DNA repair protein. *Protein Expr. Purif.* 1999; 16: 236-242.
 23. Dođru-Abbasođlu S., Aykaç-Toker G., Hanagasi H. i wsp.: The Arg194Trp polymorphism in DNA repair gene XRCC1 and the risk for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Neurol. Sci.* 2007; 28: 31-34.