

RESUMEN

Candidato de tesis doctoral: Bioq. Abrahan Carolina Elizabeth

Director de tesis doctoral: Dra. Rotstein Nora P.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca-Argentina-CONICET

Rol de los esfingolípidos en los procesos activados por el estrés oxidativo en neuronas y células gliales de la retina.

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que participa en procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Muchas enfermedades neurodegenerativas de la retina involucran la muerte por apoptosis de las neuronales retinales, y tienen una característica en común, la presencia de daño oxidativo. Este estrés activa las vías que conducen a la apoptosis, y por lo tanto el conocimiento de los mecanismos por los cuales induce dicha activación es fundamental en el desarrollo de futuras estrategias terapéuticas.

Durante las últimas dos décadas los esfingolípidos han sido intensamente estudiados por su participación en la apoptosis y supervivencia celular. Esfingolípidos simples como la ceramida y el producto de su deacilación, la esfingosina, son segundos mensajeros proapoptóticos en muchos tipos celulares, mientras que la esfingosina-1-fosfato (S1P, por sphingosine-1-phosphate), que se sintetiza por fosforilación de esfingosina, tiene importantes funciones como promotor de la proliferación y supervivencia. Por lo tanto, la regulación del metabolismo de los esfingolípidos podría ser una herramienta importante para controlar la apoptosis durante las enfermedades neurodegenerativas.

Trabajos anteriores del laboratorio demuestran que el daño oxidativo induce apoptosis en cultivos primarios de neuronas retinales, fotorreceptoras y amacrinas, de rata.

Además establecimos que la ceramida es un mediador de la apoptosis por estrés oxidativo en fotorreceptores *in vitro*. La inducción de daño oxidativo con paraquat (PQ) incrementa los niveles de ceramida, a través de su síntesis de novo, y la inhibición de esta síntesis evita la apoptosis. Puesto que la ceramida puede degradarse a esfingosina, en esta tesis nos propusimos determinar si la esfingosina también es un mediador de la apoptosis en los fotorreceptores *in vitro*.

Realizando experimentos metabólicos en cultivos neuronales puros de retina de rata, tratados con [³H]palmitato, determinamos que el daño oxidativo aumenta los niveles de esfingosina en los fotorreceptores, antes de la activación de la apoptosis. Además, mediante el método de TUNEL y marcación con Anexina/ioduro de propidio establecimos que el agregado exógeno de esfingosina también indujo apoptosis en las neuronas de la retina *in vitro*, asociada a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la translocación del citocromo c de las mitocondrias al citosol. En diversos tipos celulares, la degradación de la ceramida a esfingosina, catalizada por ceramidasa, es necesaria para desencadenar la apoptosis. Para determinar si la apoptosis de los fotorreceptores, inducida por ceramida o por daño oxidativo, requiere de la síntesis de esfingosina, utilizamos un inhibidor de la ceramidasa alcalina. Demostramos que la inhibición de la ceramidasa alcalina bloquea la apoptosis activada por PQ o por ceramida exógena en los fotorreceptores.

Muchos factores tróficos modulan el metabolismo de los esfingolípidos. En nuestro laboratorio demostramos que el ácido docosahexaenoico (DHA, por docosahexaenoic acid), un factor trófico para los fotorreceptores, los protege del daño oxidativo y dicha protección requiere de la formación de glucosilceramida. Uno de los objetivos de esta tesis fue estudiar si el DHA regula otros pasos del metabolismo de los esfingolípidos. Investigamos si el DHA controla la síntesis de S1P que como ya mencionamos, es un esfingolípido con importantes propiedades anti-apoptóticas. La S1P es sintetizada por la fosforilación de esfingosina a

través de la actividad de esfingosinas quinasas, de las cuales se conocen dos isoformas, SphK1 y SphK2. Con diversas técnicas citoquímicas, determinamos que DHA protege a los fotorreceptores de la apoptosis por daño oxidativo o por agregado de ceramida o esfingosina, y que la inhibición de la formación de S1P, catalizada por la SphK1 bloquea el efecto protector del DHA. Además, incubando a cultivos neuronales con [3H]esfingosina, establecimos que el DHA promueve la metabolización de la esfingosina a S1P. Por lo tanto, uno de los mecanismos por los cuales el DHA tiene un efecto antiapoptótico en los fotorreceptores sería a través del incremento de la síntesis de S1P, un esfingolípido antiapoptótico, disminuyendo los niveles de esfingosina, uno antiapoptótico.

S1P también puede actuar extracelularmente a través de sus receptores de membrana. Existen 5 subtipos de estos últimos, denominados S1P1-5. En esta tesis, demostramos que la S1P exógena protege a los fotorreceptores de retina del daño oxidativo o de la apoptosis inducida por esfingosina a través de su receptor de membrana S1P3, puesto que el uso de un antagonista para éste bloquea el efecto protector de S1P. Debido a que luego de la síntesis de S1P, ésta puede ser transportada al medio extracelular, decidimos evaluar si DHA actúa a través de este mecanismo y la posterior activación del receptor S1P3. Demostramos que el bloqueo del receptor S1P3 no inhibe el efecto protector del DHA sobre los fotorreceptores de la apoptosis por daño oxidativo o esfingosina exógena. Por lo tanto, sugerimos que el DHA no requiere de la activación de S1P3 para proteger a los fotorreceptores del daño oxidativo; el DHA promovería la síntesis de S1P, que luego actuaría como mensajero intracelular o activaría a otros receptores distintos de S1P3.

Las células gliales de Müller tienen importantes funciones de sostén metabólico y tráfico para las neuronas de retina. Además, las células gliales podrían ser una fuente potencial de células madre. Por eso, el estudio de su capacidad para proteger a las neuronas así como de regenerarlas, podría hacer aportes al desarrollo de terapias para las enfermedades neurodegenerativas. Investigamos si las células de Müller son capaces de

posponer la apoptosis neuronal por daño oxidativo en cocultivos neurogliales. Utilizando técnicas citoquímicas demostramos que los oxidantes PQ y peróxido de hidrógeno no activan la apoptosis glial ni la neuronal en cultivos gliales puros y cocultivos neurogliales, respectivamente. Mediante técnicas inmunocitoquímicas y Western blot establecimos que el estrés oxidativo indujo la proliferación glial, la disminución de la expresión de marcadores de diferenciación glial *in vitro* y un incremento de aquellos que indican dediferenciación. Por esto, proponemos que el estrés oxidativo promueve la proliferación y dediferenciación de las células de Müller *in vitro* sugiriendo su capacidad para regenerar neuronas. A su vez, las células gliales protegen a las neuronas fotorreceptoras y amacrinas de la apoptosis inducida por estrés oxidativo.

Diversos factores tróficos y diferentes vías de transducción de señales participan en la interacción neurona-glía de Müller, pero no se conoce si los esfingolípidos están involucrados en dicha interacción. Cuando estudiamos el efecto de S1P sobre las células gliales de Müller de retina de rata, por captación de Br-deoxiuridina y de [3H]timidina, determinamos que este esfingolípido es un potente mitógeno, ya que estimula notablemente la proliferación glial. Investigamos también si S1P participa en los mecanismos desencadenados por las células de Müller para proteger a las neuronas retinales del daño oxidativo. Utilizando un inhibidor de la síntesis de S1P y un antagonista del receptor S1P3, determinamos que la formación de S1P y la activación de S1P3 son necesarias para que las células gliales de Müller promuevan la supervivencia de las neuronas de retina.

Los resultados más importantes de esta tesis son:

- El estrés oxidativo induce la síntesis de esfingosina en fotorreceptores de retina de rata *in vitro*.
- El estrés oxidativo requiere de la formación de esfingosina, catalizada por la ceramidasa alcalina, para activar la apoptosis en las neuronas de la retina.
- La esfingosina, junto con la ceramida, sería un mediador esencial para la activación de la apoptosis debida al daño oxidativo.
- El DHA estimula la fosforilación de esfingosina a S1P en fotorreceptores.
- El DHA requiere la formación de S1P para retrasar la apoptosis de las neuronas retinales por estrés oxidativo y el agregado de ceramida o esfingosina.
- La S1P protege a los fotorreceptores de la apoptosis inducida por daño oxidativo y por agregado de ceramida y esfingosina.
- La S1P protege a los fotorreceptores de la apoptosis inducida por daño oxidativo y esfingosina exógena a través de la activación del receptor de membrana S1P3.
- El DHA no requiere de la activación de S1P3 para posponer la apoptosis de los fotorreceptores por estrés oxidativo.
- La S1P sería un segundo mensajero cuya síntesis sería promovida por el DHA para ejercer sus efectos antiapoptóticos sobre los fotorreceptores de retina.
- El estrés oxidativo promueve la proliferación y dediferenciación de las células de Müller de rata *in vitro*, pero no su apoptosis.
- Las células gliales posponen la apoptosis de las neuronas por daño oxidativo.
- S1P es un potente inductor de la proliferación de las células de Müller.
- Las células de Müller requieren de la síntesis de S1P y la activación de S1P3 para proteger a las neuronas de la retina del daño oxidativo.

SUMMARY

PhD thesis candidate: Bioq. Abrahan Carolina Elizabeth

PhD thesis director: Dra. Rotstein Nora P.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca-Argentina-CONICET

Role of the sphingolipids on the processes activated by oxidative stress in retinal neurons and glial cells.

Apoptosis is a form of programmed cell death involved in many physiological and physiopathological processes. It is involved in retinal neuron death in many retinal neurodegenerative diseases. Oxidative damage is a common factor in these diseases and activates the pathways leading to apoptosis so elucidating the mechanisms that activate apoptotic death is crucial for developing therapeutic strategies for these diseases.

During the last two decades, sphingolipids have been intensively studied due to their participation in cell death and survival. Simple sphingolipids as ceramide and its deacylation product, sphingosine, are well-know second messengers of apoptosis in several cell types, whereas sphingosine-1-phosphate (S1P), synthesized by phosphorylation of sphingosine, has important functions as a positive modulator of proliferation and survival. Therefore, the regulation of sphingolipid metabolism may be an important tool to control apoptosis during neurodegenerative diseases.

Previous studies from our lab have shown that oxidative damage induces apoptosis in primary cultures of rat retinal neuron, mainly constituted by photoreceptors and amacrine

neurons. We also established that ceramide is a mediator of apoptosis induced by oxidative stress in photoreceptors *in vitro*. Oxidative damage induced by the oxidant paraquat (PQ) increases ceramide levels by stimulating its de novo biosynthesis. Since ceramide can be deacylated to sphingosine, in this thesis work we have investigated whether sphingosine is also a mediator of apoptosis in photoreceptors *in vitro*.

Incubating neuronal cultures with [³H]palmitate, we have demonstrated that oxidative stress augments sphingosine levels before the onset of apoptosis. Moreover, using TUNEL and Annexin/propidium iodide labeling, we established that addition of exogenous sphingosine induced apoptosis in retinal neurons *in vitro*. In several cell types, the metabolization of ceramide to sphingosine, catalysed by ceramidases, is necessary to trigger apoptosis. To determine whether ceramide or oxidative stress-induced apoptosis of photoreceptors requires sphingosine synthesis, we used an alkaline ceramidase inhibitor. By a combination of immunochemical techniques, we showed that the inhibition of alkaline ceramidase prevented ceramide or PQ-induced apoptosis in photoreceptors.

Many trophic factors modulate sphingolipid metabolism. We have established that docosahexaenoic acid (DHA), a trophic factor for photoreceptors, protects these cells from apoptosis induced by oxidative damage, and the synthesis of glucosylceramide is required for this protection. One of the purposes of this thesis work was to study whether DHA regulates other pathways of sphingolipid metabolism. We investigated whether DHA controls the synthesis of S1P, a sphingolipid with well-known anti-apoptotic properties. S1P is formed by phosphorylation of sphingosine through the activity of sphingosine kinases, of which two isoforms, SphK1 and SphK2, have been identified. We determined that DHA delayed photoreceptor apoptosis induced by oxidative damage and addition of ceramide or sphingosine. Furthermore, inhibition of S1P formation by SphK1 blocked the anti-apoptotic effect of DHA. Incubating neuronal cultures with [³H]sphingosine, we demonstrated that the addition of DHA promoted the synthesis of S1P. Therefore, we suggest that the anti-

apoptotic effect of DHA on photoreceptors is achieved through an increase of S1P synthesis, which simultaneously lowers sphingosine levels.

S1P can act extracellularly by activating its membrane receptors, which are constituted by 5 different subtypes called S1P1-5. By a combination of cytochemical techniques, we first showed that exogenous S1P protected photoreceptors apoptosis induced by oxidative damage or by addition of sphingosine and ceramide. Using an antagonist of S1P3 receptor, we demonstrated that S1P protection required the activation of S1P3. S1P might be released to the extracellular medium after its synthesis, to act in an autocrine/paracrine manner on its membrane receptors. Hence, we evaluated whether DHA acted through this mechanism, promoting S1P synthesis and its later release and activation of S1P3, to protect photoreceptors. We showed that an antagonist of S1P3 did not affect DHA prevention of photoreceptor apoptosis by oxidative damage or exogenous sphingosine. Therefore, we suggest that DHA does not need S1P3 activation to prevent photoreceptor apoptosis; DHA might promote intracellular S1P synthesis, and S1P would then act as a second messenger or activate S1P receptors other than S1P3.

Müller glial cells have important functions in metabolic and trophic support for retina neurons. Moreover, glial has been proposed as a potential source of stem cells. Therefore, they might be a useful tool to develop therapies for neurodegenerative diseases. We investigated whether Müller glial cells were able to protect neuronal apoptosis induced by oxidative damage in rat neuroglial cocultures. The incubation with oxidants PQ and hydrogen peroxide during twelve hours of incubation did not trigger apoptosis in glial cells or neurons in pure glial cultures and neuroglial cocultures, respectively. Instead, using immunocytochemistry and Western blot, we showed that oxidative stress induced glial proliferation, decrease of expression of glial markers and an increase of dedifferentiation markers. So, we propose that oxidative stress activated proliferation and dedifferentiation of

Müller cells *in vitro* suggesting their capacity to be stem cells. Glial cells also protected amacrine and photoreceptors from oxidative stress-induced apoptosis.

Many trophic factors and different signal transduction pathways are involved in Müller glial-neuron crosstalk but little is known concerning a role for sphingolipids in this interaction. We first investigated the effect of S1P in pure glial cultures and demonstrated, by Br-deoxyuridine and [3H]thymidine uptake that S1P is a potent mitogen for Müller cells, which markedly increased their proliferation. We also evaluated whether S1P participated in the mechanisms activated by Müller cells to protect neuronal apoptosis induced by oxidative stress. Using an inhibitor of SphK1 and an antagonist for S1P3 we showed that the synthesis of S1P and the activation of S1P3 are essential for Müller cells to promote the survival of retina neurons.

The major findings of this thesis work are:

- Oxidative stress induces synthesis of sphingosine in rat retina photoreceptors *in vitro*.
- Oxidative stress requires the synthesis of sphingosine, catalyzed by alkaline ceramidase, to activate apoptosis in photoreceptors.
- Sphingosine, together with ceramide, is a key mediator involved in the triggering of apoptosis induced by oxidative stress.

- DHA stimulates the synthesis of S1P.
- DHA requires of the synthesis of S1P to prevent neuronal apoptosis induced by oxidative stress and addition of ceramide or sphingosine.
- S1P protects photoreceptor from oxidative damage and exogenous sphingosine addition through activation of the S1P3 membrane receptor.

- DHA does not require S1P3 activation to delay apoptosis of photoreceptor by oxidative damage.
- S1P might be a second messenger, whose intracellular levels are increased by DHA, to promote photoreceptor survival upon oxidative stress, ceramide and sphingosine-induced apoptosis.
- Oxidative stress promotes the proliferation and dedifferentiation of rat Müller cells *in vitro*, but not their apoptosis.
- Müller glia prevents the apoptosis of retinal neurons by oxidative stress.
- S1P is a potent inductor of proliferation in Müller cells.
- Müller cells require S1P synthesis and S1P3 activation to protect retina neurons from oxidative damage.