

## Streszczenie pracy doktorskiej mgr Eweliny Józefczuk

Promotor: dr hab. Mateusz Siedliński

Temat pracy doktorskiej: „*The role of sphingosine kinase-1 in the pathophysiology of angiotensin II-induced arterial hypertension in mice*”

(„*Rola kinazy sfingozyny 1 w patofizjologii nadciśnienia tętniczego indukowanego angiotensyną II u myszy*”) – cykl publikacji

Kinaza sfingozyny 1 (Sphk1) jest enzymem odpowiedzialnym za syntezę fosforanu sfingozyny (S1P), który działając poprzez mechanizmy zależne od specyficznych receptorów błonowych (S1pr), a także jako wewnątrzkomórkowy lipid sygnalizacyjny wpływa na homeostazę układu sercowo-naczyniowego. Brak równowagi w syntezie oraz przekazywanie z udziałem S1P może prowadzić do rozwoju licznych patologii sercowo-naczyniowych, w tym do rozwoju nadciśnienia tętniczego. S1P w zależności od lokalizacji oraz aktywowanego szlaku sygnałowego może działać zarówno jako czynnik kurczący, jak i rozkurczający naczynia krwionośne, stąd dotychczasowe badania wskazują na dwojaki wpływ modulacji szlaku Sphk1/S1P na rozwój nadciśnienia tętniczego. Niezależne badania potwierdziły jednak, że myszy z globalnie wyciętym genem *Sphk1* rozwijają znacząco niższe HT w odpowiedzi na angiotensynę II (AngII) w porównaniu do myszy szczepu dzikiego.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu podaży farmakologicznego, selektywnego inhibitora Sphk1, PF543 na rozwój nadciśnienia tętniczego oraz towarzyszącego mu przerostu lewej komory serca u myszy w celu weryfikacji możliwości terapeutycznych tego inhibitora.

W toku badań wykazano, że chroniczne podawanie PF543 myszom, u których jednocześnie indukowane jest HT, znacząco poprawia zdolność rozkurczową naczyń krezkowych. Polepszenie funkcji śródbłonna nie wpływało jednak na poziom ciśnienia skurczowego krwi u myszy. Badanie dowiodły także, że podawanie PF543 myszom nadciśnieniowym częściowo zapobiega patologicznemu przerostowi lewej komory serca w odpowiedzi na AngII. Analizy transkryptomyczne ujawniły znaczący spadek ekspresji charakterystycznych dla przerostu serca markerów w odpowiedzi na PF543, natomiast analizy histologiczne dowiodły, że PF543 zapobiega zwiększeniu rozmiaru kardiomiocytów w sercach myszy nadciśnieniowych, nie wpływając przy tym na stopień zwłóknienia tkanki. Mechanizm działania PF543 może wynikać z obniżenia ekspresji receptora S1pr1 oraz zwiększonego poziomu prekursorów dla S1P w sercu, czemu towarzyszy hamowanie ścieżek sygnalizacyjnych z udziałem białek Rock1, PKC, Erk1/2 oraz Stat3.

Kolejnym celem pracy było zbadanie efektów niedoboru *Sphk1* indukowanego siRNA na przerost mysich noworodkowych kardiomiocytów *in vitro*. Co ciekawe, niedobór *Sphk1* nie wpływał istotnie na szlaki biologiczne związane z patologicznym typem hipertrofii, indukował natomiast molekularne szlaki promujące ostateczne różnicowanie kardiomiocytów w okresie

noworodkowym. Promowanie szlaków charakterystycznych dla dojrzewania kardiomiocytów przez niedobór *Sphk1* związane było z aktywacją i zwiększeniem ekspresji odpowiednio kinaz Akt oraz Mkk4.

Podsumowując, badania wykazały potencjał inhibitora PF543 jako czynnika częściowo zapobiegającego przerostowi serca oraz polepszającego funkcję śródbłonna naczyniowego w nadciśnieniu indukowanym AngII u myszy. Dodatkowo, ujawniona została dotychczas nieznaną rolę *Sphk1* w regulacji molekularnych szlaków charakterystycznych dla procesu dojrzewania mysich kardiomiocytów w okresie pourodzeniowym.

### **Streszczenie w języku angielskim**

Sphingosine kinase 1 (Sphk1) is an enzyme responsible for the synthesis of sphingosine-1-phosphate (S1P), which acts through mechanisms dependent on specific membrane receptors (S1prs) or as an intracellular messenger and affects cardiovascular homeostasis. Imbalance in S1P synthesis and signaling may lead to the development of several cardiovascular pathologies including arterial hypertension. Depending on its localisation and induced signalling cascade, S1P acts as a vasoconstrictor or as a vasodilator, hence previous studies indicate an ambiguous role of Sphk1/S1P axis modulation in the development of arterial hypertension. However, several independent studies have clearly demonstrated that mice with global deletion of *Sphk1* develop less severe hypertension in response to angiotensin II (AngII) infusion compared to wild type mice.

The aim of this thesis was to investigate the effects of administration of a pharmacological selective Sphk1 inhibitor, PF543, on the development of hypertension and associated left ventricular hypertrophy, to assess therapeutic potential of this inhibitor.

Studies revealed that chronic administration of PF543 significantly improves the vasodilatory capacity of mesenteric arteries in hypertensive mice. However, this improvement of endothelial function had no significant effect on systolic blood pressure level in mice. Studies also demonstrated that PF543 administration partially protected against left ventricular hypertrophy in response to AngII treatment. PF543 significantly downregulated the expression of hypertrophy markers as examined by transcriptomic analysis, whereas histological analysis revealed that the inhibitor prevented cardiomyocyte enlargement, while it had no effect on cardiac fibrosis in hypertensive animals. The mechanism of PF543 action could be mediated by decreased S1pr1 expression, as well as by upregulated levels of S1P precursors, and this was accompanied by the inhibition of signaling pathways involving Rock1, PKC, Erk1/2 and Stat3.

The thesis also aimed to assess the effects of siRNA-induced *Sphk1* deficiency on the development of hypertrophy in mouse neonatal cardiomyocytes *in vitro*. Interestingly, downregulation of *Sphk1* did not affect biological pathways related to the pathological type of hypertrophy, while it induced molecular pathways promoting final differentiation of cardiomyocytes at postnatal stage. Promotion of pathways characteristic for cardiomyocyte maturation was associated with the activation or upregulated expression of Akt and Mkk4 kinases, respectively.

In summary, the studies described in this thesis found that PF543 inhibitor acted as an agent partially preventing cardiac hypertrophy and improving endothelial function in AngII-induced hypertension in mice. Additionally, the studies revealed a heretofore unknown role of *Sphk1* in the regulation of molecular pathways characteristic for postnatal cardiomyocyte maturation.