

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Marija Z. Dulović

**ULOGA KINAZE AKTIVIRANE  
ADENOZIN MONOFOSFATOM U  
NEUROTOKSIČNOM DELOVANJU  
ALFA-SINUKLEINA *IN VITRO***

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF MEDICINE

Marija Z. Dulović

**THE ROLE OF ADENOSINE  
MONOPHOSPHATE-ACTIVATED  
PROTEIN KINASE IN THE NEUROTOXIC  
EFFECT OF ALPHA-SYNUCLEIN *IN  
VITRO***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

MENTOR:

dr Ivanka Marković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu,  
Medicinski fakultet

KOMENTOR:

dr Vladimir Kostić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski  
fakultet

KOMISIJA U SASTAVU:

dr Aleksandra Isaković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu,  
Medicinski fakultet

dr Vladimir Trajković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu,  
Medicinski fakultet

dr Silvana Andrić, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-  
matematički fakultet

DATUM ODBRANE: \_\_\_\_\_

Ova doktorska teza je urađena u Laboratoriji Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Ivanke Marković. Doktorska teza je realizovana u okviru projekta Ministarstva nauke Republike Srbije br III 41025: „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetske balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“, čiji je rukovodilac prof. dr Vladimir Trajković; i projekta Ministarstva nauke Republike Srbije br III 175090: „Motorni i nemotorni simptomi parkinsonizma – kliničke, morfološke i molekularno-genetičke korelacije“, čiji je rukovodilac akademik prof. dr Vladimir Kostić.

Izradi ove doktorske teze su svojim znanjem, podrškom, razumevanjem, strpljenjem i ljubavlju doprineli moji učitelji, saradnici, prijatelji i moja porodica.

Posebnu zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. dr Ivanki Marković na ukazanom poverenju, ličnoj i profesionalnoj podršci, i velikoj pomoći i strpljenju tokom svih faza izrade ove teze. Korisni saveti, veliki entuzijazam i posvećenost mentora, učinili su da rad na tezi bude znatno lakši i da budemo tim koji jako dobro funkcioniše.

Zahvaljujem se komentoru, akademiku prof. dr Vladimiru Kostiću na korisnim savetima i sugestijama koji su se odnosili na neurološki aspekt ove priče; kao i na podršci i pomoći, bez kojih teza ne bi imala ovakav oblik i kvalitet.

Zahvaljujem se prof. dr Aleksandri Isaković na saradnji i pomoći još od studentskih dana; na efikasnosti, nizu korisnih primedbi i sugestija tokom izrade teze; kao i na uvek pozitivnom i vedrom duhu.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Vladimiru Trajkoviću na izuzetnoj pomoći u svim fazama izrade teze, kao i na velikom angažmanu oko oblikovanja eksperimentalnih rezultata i publikacije koja je proizašla iz ove teze. Privilegija je biti u prilici da se radi i uči od njega.

Zahvaljujem se prof. dr Silvani Andrić na korisnim savetima i ukazanom poverenju i strpljenju u završnoj fazi izrade ove teze.

Zahvaljujem prof. dr Leonidas Stefanis i njegovim saradnicima sa Medicinskog fakulteta u Atini, na donaciji transfekovanih ćelija i na angažmanu oko oblikovanja publikacije koja je proizašla iz ove teze.

Zahvaljujem se akademiku prof. dr Vladimiru Bumbašireviću i doc. dr Tamari Kravić-Stevović na izradi preparata i tumačenju rezultata elektronske mikroskopije.

Zahvaljujem se dr Ljubici Harhaji Trajković i dr Verici Punović na pomoći u izradi eksperimenata koji se odnose na transfekciju ćelija i gensku ekspresiju.

Zahvaljujem se prof. dr Omar El-Agnaf na donaciji modifikovanih oblika rekombinantnog alfa-sinukleina.

Zahvaljujem se dr Andrijani Klajn na donaciji ćelija feohromocitoma pacova.

Zahvaljujem se prof. dr Zoranu Vujičić i prof. dr Miroslavi Vujičić na pomoći u izradi eksperimenata za koje je bila neophodna procedura liofilizacije.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojim najbližim saradnicima i drugarima: MSc Maji Jovanović, koja je učestvovala u svim segmentima izrade teze i pružala podršku i pomoć u svakom smislu; dr Anđelki Isaković na dragocenoj saradnji, pomoći i tehničkoj podršci u svakom trenutku; doc. dr Sonji Misirlić Denčić na podršci i uvođenju u eksperimentalni rad; i MSc Marjanu Popović koji je pružio podršku i razumevanje.

Zahvaljujem se celokupnom kolektivu Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu na svesrdnoj podršci i srdačnoj radnoj atmosferi. Posebnu zahvalnost dugujem tehničarima Sanji Čabarkapi i Nadi Bojović, koje su mi u mnogome olakšale laboratorijski rad.

Beskrajnu zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima na ljubavi, razumevanju i podršci u svakom trenutku.

## **Uloga kinaze aktivirane adenozin monofosfatom u neurotoksičnom delovanju alfa-sinukleina *in vitro***

### **REZIME**

Parkinsonova bolest (PB) se karakteriše progresivnom degeneracijom i izumiranjem dopaminergičkih neurona u *pars compacta substantiae nigrae* mezencefalona, a osnovni patološki supstrat bolesti je nakupljanje proteina alfa-sinukleina (ASYN) u zahvaćenim neuronima, i formiranje Levijevih tela. Cilj ovog istraživanja je bio da ispita uticaj najvažnijeg unutarćelijskog energetskeg senzora, protein kinaze aktivirane adenozin monofosfatom (AMPK) u neurotoksičnom delovanju ASYN. Istraživanje je sprovedeno na modelu *in vitro*, ćelijskoj liniji humanog neuroblastoma SH-SY5Y koja prekomerno eksprimira nemutirani (engl. *wild type*, *wt*) ASYN i koja je delovanjem retinoične kiseline diferentovana u neuronski fenotip.

Prekomerna ekspresija ASYN dovela smanjenog preživljavanja ćelija humanog neuroblastoma, što je bilo praćeno morfološkim i ultrastrukturnim promenama koje odgovaraju apoptozi, uz aktivaciju kaspaza i fragmentaciju DNK. Nakupljanje ASYN u ćelijama uzrokovalo je smanjenje aktivnosti AMPK i njenog najvažnijeg aktivatora, ushodne kinaze LKB1 (engl. *liver kinase B1*, *LKB1*), što je za posledicu imalo i smanjenje fosforilacije nishodne kinaze Raptor; kako u diferentovanim ćelijama humanog neuroblastoma, tako i u primarnim neuronima izolovanim iz kore velikog mozga pacova. Nije pokazana promena u ekspresiji informacionih RNK (iRNK) drugih regulatora aktivnosti AMPK: kalcijum/kalmodulin-zavisne kinaze, sestrina 1 i 2, i protein fosfataze 2A. Primena farmakoloških aktivatora AMPK, 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonukleotida (AICAR) i N,N-dimetilimidodikarbonimidičnog diamid hidrohlorida (metformin), dovela je do značajnog poboljšanja preživljavanja ćelija u uslovima prekomerne ekspresije ASYN, što je bilo praćeno porastom aktivnosti signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor, bez uticaja na smanjenje nivoa ASYN u ćelijama.

U ovoj studiji je pokazano i da prekomerna ekspresija ASYN smanjuje aktivnost signalnog puta protein kinaze B(Akt)/Src, kao i da u ćelijama humanog

neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanim u neuronski fenotip indukuje autofagiju, uz porast autofagnog fluksa u ćelijama. Međutim, neuroprotektivno delovanje aktivacije AMPK nije bilo udruženo sa aktivacijom signalnog puta protein kinaze B (Akt), niti sa indukcijom autofagije.

U ovoj studiji je pokazan i citotoksični efekat sekretovanog vanćelijskog ASYN, kako na diferentovanim ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y, tako i na ćelijama feohromocitoma pacova PC12. Dobijeni rezultati ukazuju da je citotoksično dejstvo vanćelijskog ASYN takođe praćeno smanjenjem aktivnosti signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor; kao i da aktivatori AMPK, AICAR i metformin, poboljšavaju preživljavanje ćelija. Smanjenje ekspresije gena koji kodira AMPK, primenom male ukosničaste RNK (engl. *short hairpin RNA*, *shRNA*), dodatno je povećalo osetljivost ćelija neuroblastoma na delovanje vanćelijskog ASYN, što je potvrdilo neuroprotektivnu ulogu signalnog puta AMPK. I u uslovima primene rekombinantnog humanog ASYN, i njegovih modifikovanih oblika (dopaminski modifikovan, kao i nitrozilirani oblik *wt* ASYN), neurotoksični efekat je bio udružen sa smanjenjem aktivnosti AMPK.

Iz svega navedenog, možemo zaključiti da prekomerno nakupljanje, kako unutarćelijskog, tako i vanćelijskog ASYN, dovodi do smanjenja aktivnosti signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor. Farmakološka aktivacija AMPK ima neuroprotektivno dejstvo, te bi stoga modulacija signalnog puta kinaze aktivirane adenzin monofosfatom (AMPK) mogla da bude jedna od strategija za postizanje neuroprotekcije kod Parkinsonove bolesti.

**Ključne reči:** Parkinsonova bolest, alfa-sinuklein, AMPK, Akt, apoptoza, autofagija, neuroprotekcija

**Naučna oblast:** molekularna medicina

**Uža naučna oblast:** ćelijska biologija

**UDK broj:**

## **The role of adenosine monophosphate-activated protein kinase in alpha-synuclein neurotoxicity *in vitro***

### **ABSTRACT**

In the present study, we investigated the role of the main intracellular energy sensor, adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), in the neurotoxicity of alpha-synuclein (ASYN), one of the key culprits in the pathogenesis of Parkinson's disease. All experiments were conducted in retinoic acid-differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells stably expressing wild type (*wt*) ASYN, as the *in vitro* model of Parkinson's disease.

The overexpression of ASYN caused loss of viability in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cells accompanied by caspase activation, DNA fragmentation, and the morphological and ultrastructural changes characteristic for the apoptotic cell death.

The mechanisms underlying the pro-apoptotic action of ASYN was associated with the reduced activity of both AMPK and its activator LKB1 (liver kinase B1), resulting in reduced phosphorylation of the downstream kinase Raptor. ASYN-overexpressing rat primary neurons also displayed decreased activity of LKB1/AMPK/Raptor pathway. However, mRNA expression of the upstream AMPK regulators CaMKK $\beta$  (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase), PP2A (protein phosphatase 2A), sestrin 1 and sestrin 2 was not significantly altered in ASYN-overexpressing cells. Restoration of AMPK activity by pharmacological AMPK activators, metformin (N, N-dimethylimidodicarbonimidic diamide) or AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide), reduced the *in vitro* neurotoxicity of ASYN overexpression. Of note, the pharmacological AMPK activators were apparently more efficient in improving the viability of ASYN-overexpressing cells than known neuroprotective agents, tyrosine hydroxylase inhibitor or antioxidant ascorbic acid. The pharmacological activation of AMPK was not accompanied by changes in ASYN levels in human neuroblastoma cells.

The overproduction of ASYN diminished activation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K)-activated Src/Akt signalling pathway, and resulted

in autophagy induction and increased autophagic flux. However, neuroprotective effect of AMPK activation was independent of the prosurvival kinase Akt or the induction of autophagic response.

The conditioned medium from ASYN-overexpressing cells, containing secreted ASYN, as well as recombinant dopamine-modified (DA-ASYN) or nitrated ASYN (n-ASYN), all reduced viability in differentiated SH-SY5Y cells, but not in the presence of metformin or AICAR. The extracellularly secreted ASYN, as well as the modified recombinant forms of ASYN, reduced AMPK and Raptor phosphorylation in differentiated SH-SY5Y cells, and this effect was counteracted by AMPK activators AICAR and metformin. In addition, the RNA interference-mediated knockdown of AMPK increased the sensitivity of SH-SY5Y cells to the harmful effects of extracellular ASYN. AMPK-dependent protection from extracellular ASYN was also observed in rat neuron-like pheochromocytoma cell line PC12.

These data demonstrate the protective role of AMPK against the toxicity of both intracellular and extracellular ASYN, suggesting that modulation of AMPK activity may be a promising therapeutic strategy in Parkinson's disease.

**Keywords:** Parkinson's disease, alpha-synuclein, AMPK, Akt, apoptosis, autophagy, neuroprotection

**Research area:** Molecular medicine

**Research field:** Cell biology

**UDC number:**

# SADRŽAJ

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD.....                                                                                                               | 1  |
| 1.1. Parkinsonova bolest .....                                                                                             | 1  |
| 1.1.1. Molekularne osnove Parkinsonove bolesti.....                                                                        | 2  |
| 1.1.2. Alfa-sinuklein u Parkinsonovoj bolesti .....                                                                        | 6  |
| 1.1.3. Apoptoza i autofagija u Parkinsonovoj bolesti .....                                                                 | 12 |
| 1.2. Protein kinaze .....                                                                                                  | 17 |
| 1.2.1. Protein kinaza aktivirana adenzin monofosfatom (AMPK) .....                                                         | 18 |
| 1.2.2. Dosadašnja saznanja o ulozi AMPK u Parkinsonovoj bolesti.....                                                       | 22 |
| 2. CILJEVI .....                                                                                                           | 25 |
| 3. MATERIJAL I METODE .....                                                                                                | 26 |
| 3.1. REAGENCI I RASTVORI .....                                                                                             | 26 |
| 3.2. ĆELIJSKE KULTURE I TRETMANI.....                                                                                      | 27 |
| 3.2.1. Transfekovane ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y koje prekomerno sintetišu alfa-sinuklein .....                   | 28 |
| 3.2.2. Tansfekovani primarni neuroni izolovani iz kore velikog mozga pacova koji prekomerno sintetišu alfa-sinuklein ..... | 29 |
| 3.2.3. Ćelije feohromocitoma pacova PC12.....                                                                              | 30 |
| 3.2.4. Vanćelijski alfa-sinuklein.....                                                                                     | 31 |
| 3.2.5. Modifikovani oblici rekombiantnog alfa-sinukleina.....                                                              | 31 |
| 3.3. ODREĐIVANJE BROJA I VIJABILNOSTI ĆELIJA.....                                                                          | 32 |
| 3.3.1. Kristal violet test .....                                                                                           | 33 |
| 3.3.2. Tripin plavo test.....                                                                                              | 33 |
| 3.4. ISPITIVANJE MORFOLOŠKIH KARAKTERISTIKA ĆELIJA.....                                                                    | 34 |
| 3.4.1. Fazno kontrastna mikroskopija .....                                                                                 | 34 |

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5. ANALIZA PARAMETARA ĆELIJSKE SMRTI METODOM PROTOČNE CITOFLUORIMETRIJE .....                                                                              | 34 |
| 3.5.1. Detekcija faza ćelijskog ciklusa i fragmentacije DNK. ....                                                                                            | 34 |
| 3.5.2. Detekcija aktivacije kaspaza .....                                                                                                                    | 35 |
| 3.5.3. Detekcija autofagije u ćelijama obojenim akridin oranžom .....                                                                                        | 36 |
| 3.6. IMUNOBLOT ANALIZE .....                                                                                                                                 | 37 |
| 3.6.1. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima.....                                                                                                    | 37 |
| 3.6.2. Elektroforeza i transfer.....                                                                                                                         | 38 |
| 3.6.3. Imunoblot i detekcija proteina .....                                                                                                                  | 39 |
| 3.7. ULTRASTRUKTURNA ANALIZA ĆELIJA .....                                                                                                                    | 40 |
| 3.7.1. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM) .....                                                                                                     | 40 |
| 3.8. ANALIZA EKSPRESIJE GENA .....                                                                                                                           | 41 |
| 3.8.1. Izolacija iRNK .....                                                                                                                                  | 41 |
| 3.8.2. Reverzna transkripcija.....                                                                                                                           | 41 |
| 3.8.3. Reakcija lančanog umnožavanja sa detekcijom produkata u realnom vremenu ( <i>real time polymerase chain reaction, qRT-PCR</i> ).....                  | 42 |
| 3.9. ODREĐIVANJE UNUTARĆELIJSKOG SADRŽAJA ADENOSIN TRIFOSFATA (ATP) .....                                                                                    | 43 |
| 3.10. TRANSFEKCIJA ĆELIJA POMOĆU MALE UKOSNIČASTE RNK ( <i>short hairpin RNA, shRNA</i> ).....                                                               | 43 |
| 3.11. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA .....                                                                                                                     | 45 |
| 4. REZULTATI .....                                                                                                                                           | 46 |
| 4.1. UTICAJ PREKOMERNE SINTEZE ALFA-SINUKLEINA NA PREŽIVLJAVANJE ĆELIJA U KULTURI HUMANOG NEUROBLASTOMA SH-SY5Y .....                                        | 46 |
| 4.1.1. Sinteza proteina alfa-sinukleina u kulturi transfekovanih ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y ( $\alpha$ -syn-, $\alpha$ -syn+ i $\beta$ -gal) ..... | 46 |
| 4.1.2. Prekomerno nagomilavanje alfa-sinukleina u diferentovanim ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y dovodi do povećane citotoksičnosti .....             | 48 |

|                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.3. Prekomerna sinteza alfa-sinukleina u diferentovanim ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y dovodi do fragmentacije DNK, aktivacije kaspaza i ultrastrukturnih promena u ćelijama .....       | 51 |
| 4.2. ULOGA PROTEIN KINAZE AKTIVIRANE ADENOSIN MONOFOSFATOM (AMPK) U KULTURI ĆELIJA HUMANOG NEUROBLASTOMA SH-SY5Y U USLOVIMA PREKOMERNOG NAKUPLJANJA ALFA-SINUKLEINA.....                            | 55 |
| 4.2.1. Alfa-sinuklein dovodi do smanjene aktivacije AMPK u kulturi diferentovanih ćelija humanog neuroblasoma SH-SY5Y .....                                                                         | 55 |
| 4.2.2. Sadržaj unutarćelijskog adenosin trifosfata (ATP) je ostao nepromenjen u uslovima prekomerne sinteze alfa-sinukleina u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y .....                    | 58 |
| 4.2.3. Farmakološka aktivacija AMPK dovodi do većeg preživljavanja diferentovanih ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y u uslovima prekomernog nagomilavanja alfa-sinukleina .....                   | 59 |
| 4.2.4. Alfa-sinuklein dovodi do smanjene aktivacije protein kinaze B (Akt) u ćelijama humanog neuroblasoma SH-SY5Y diferentovanim u neuronski fenotip .                                             | 61 |
| 4.2.5. Protektivni mehanizam delovanja AMPK ne zavisi od aktivacije protein kinaze B (Akt) u diferentovanim ćelijama humanog neuroblasoma SH-SY5Y .....                                             | 63 |
| 4.2.6. Farmakološka aktivacija AMPK ne utiče na nivo alfa-sinukleina u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y .....                                                                           | 64 |
| 4.2.7. Farmakološka aktivacija AMPK pokazuje veći protektivni potencijal od inhibitora tirozin hidroksilaze i antioksidansa askorbinske kiseline u uslovima prekomerne sinteze alfa-sinukleina..... | 65 |
| 4.2.8. Alfa-sinuklein ne dovodi do promene u ekspresiji ushodnih regulatora AMPK-signalnog puta u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y .....                                                | 66 |
| 4.3. ULOGA AUTOFAGIJE U NEUROPROTEKTIVNOM DELOVANJU PROTEIN KINAZE AKTIVIRANE ADENOSIN MONOFOSFATOM (AMPK) U USLOVIMA PREKOMERNE SINTEZE ALFA-SINUKLEINA .....                                      | 68 |
| 4.3.1. Alfa-sinuklein dovodi do indukcije autofagije u diferentovanim ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y .....                                                                                  | 68 |
| 4.3.2. Citoprotektivni efekat aktivacije AMPK nije povezan sa indukcijom autofagije u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y .....                                                            | 72 |

|                                                                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.4. ALFA-SINUKLEIN DOVODI DO SMANJENE AKTIVACIJE AMPK U PRIMARNIM NEURONIMA IZOLOVANIM IZ KORE VELIKOG MOZGA PACOVA.....                                                                                  | 73 |
| 4.5. ULOGA PROTEIN KINAZE AKTIVIRANE ADENOSIN MONOFOSFATOM (AMPK) U USLOVIMA NAGOMILAVANJA VANĆELIJSKOG ALFA-SINUKLEINA KOD ĆELIJA HUMANOG NEUROBLASTOMA SH-SY5Y .....                                     | 74 |
| 4.5.1. Transfekovane ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y sekreću alfa-sinuklein u vanćelijski medijum.....                                                                                                | 74 |
| 4.5.2. Vanćelijski alfa-sinuklein dovodi do smanjenog preživljavanja diferentovanih ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y .....                                                                             | 75 |
| 4.5.3. Farmakološka aktivacija AMPK poboljšava preživljavanje ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y u uslovima prekomernog nagomilavanja vanćelijskog alfa-sinukleina .....                                 | 76 |
| 4.5.4. Smanjena ekspresija gena za AMPK dovodi do povećane osetljivosti ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y na delovanje vanćelijskog alfa-sinukleina.....                                                | 79 |
| 4.6. ULOGA PROTEIN KINAZE AKTIVIRANE ADENOSIN MONOFOSFATOM (AMPK) U USLOVIMA NAGOMILAVANJA VANĆELIJSKOG ALFA-SINUKLEINA KOD ĆELIJA FEHROMOCITOMA PACOVA PC12.....                                          | 80 |
| 4.6.1. Vanćelijski alfa-sinuklein dovodi do smanjenog preživljavanja ćelija feohromocitoma pacova PC12 .....                                                                                               | 81 |
| 4.6.2. Farmakološka aktivacija AMPK poboljšava preživljavanje ćelija feohromocitoma pacova PC12 u uslovima prekomernog nagomilavanja vanćelijskog alfa-sinukleina.....                                     | 82 |
| 4.7. ULOGA PROTEIN KINAZE AKTIVIRANE ADENOSIN MONOFOSFATOM (AMPK) U USLOVIMA VANĆELIJSKOG NAGOMILAVANJA MODIFIKOVANIH OBLIKA REKOMBINANTNOG ALFA-SINUKLEINA KOD ĆELIJA HUMANOG NEUROBLASTOMA SH-SY5Y ..... | 84 |
| 5. DISKUSIJA .....                                                                                                                                                                                         | 87 |
| 5.1. PREKOMERNA SINTEZA ALFA-SINUKLEINA DOVODI DO SMRTI ĆELIJA HUMANOG NEUROBLASTOMA SH-SY5Y DIFERENTOVANIH U NEURONSKI FENOTIP .....                                                                      | 88 |
| 5.2. AKTIVACIJA AMPK DELUJE NEUROPROTEKTIVNO U USLOVIMA PREKOMERNOG NAGOMILAVANJA ALFA-SINUKLEINA .....                                                                                                    | 91 |

|                                                                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.3. PREKOMERNO NAGOMILAVANJE ALFA-SINUKLEINA U<br>VANĀELIJSKOM PROSTORU IMA NEUROTOKSIĀNI EFEKAT<br>MEHANIZMOM KOJI JE VEZAN ZA SMANJENU AKTIVACIJU AMPK<br>SIGNALNOG PUTA..... | 99  |
| 6. ZAKLJUĀCI .....                                                                                                                                                               | 103 |
| 7. LITERATURA .....                                                                                                                                                              | 105 |

# UVOD

## 1.1. Parkinsonova bolest

Parkinsonova bolest (PB) je hronična neurodegenerativna bolest koja pripada grupi hipokinetičkih motornih poremećaja. Karakteriše se progresivnom degeneracijom i izumiranjem dopaminergičkih neurona u *pars compacta substantiae nigrae mesencephalon-a* (Spillantini i sar., 1997). Prvi put je opisana u monografiji engleskog lekara Džejmisa Parkinsona kao drhtava paraliza zbog osnovnih simptoma koji je prate (*James Parkinson, „An essay on shaking palsy”, 1817*) (Shulman i sar., 2011), dok je današnji naziv bolesti nastao tek 60 godina kasnije (*J. M. Charcot, „Parkinson’s disease”*) (Ghavami i sar., 2014).

PB je drugo po učestalosti neurodegenerativno oboljenje, odmah iza Alchajmerove bolesti, sa oko 7 miliona obolelih širom sveta, što predstavlja 0.3 % celokupne populacije (de Lau i sar., 2006; Samii i sar., 2004). Javlja se u oko 2 % populacije starije od 60 godina, i u 4 % populacije starije od 80 godina (Dexter i sar., 2013). Iako učestalost pojave PB raste sa starošću, treba imati u vidu da se kod oko 5% obolelih dijagnoza postavi pre 50. godine života (Samii i sar., 2004).

Tačan uzrok degeneracije i smrti dopaminergičkih neurona još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Pretpostavlja se da je patološki proces posledica interakcije određenih naslednih činilaca (starenje, muški pol, bela rasa, pozitivna porodična anamneza Parkinsonove bolesti) i činilaca okoline (trauma, antipsihotici, antiemetici, metanol) (de Lau i sar., 2006). Takođe, novije epidemiološke studije govore o povećanom riziku za razvoj PB usled dugoročnog izlaganja pesticidima, herbicidima i različitim industrijskim hemikalijama (Ascherio i sar., 2006; Schapira i sar., 2006). Za dijagnozu PB neophodno je uraditi detaljan neurološki pregled, a ukoliko je potrebno, i test odgovora na L-DOPU. Konačno, da bi se postavila dijagnoza, u kliničkoj slici bi trebalo ustanoviti tri glavna simptoma bolesti: tremor,

rigor i/ili bradikineziju. Pronalaženje specifičnog biomarkera bi u mnogome olakšalo postavljanje definitivne dijagnoze PB.

Imajući u vidu da je PB progresivna onesposobljavajuća bolest (Habibi i sar., 2011), razjašnjavanje mehanizama koji leže u osnovi nastanka i razvoja bolesti doprinelo bi razvoju strategija za prevenciju, raniju dijagnostiku i kauzalnu terapiju.

### **1.1.1. Molekularne osnove Parkinsonove bolesti**

Uprkos porastu incidence PB i velikim naporima lekara i naučnika, molekularni mehanizam degeneracije i smrti dopaminergičkih neurona još uvek nije pouzdano utvrđen (de Lau i sar., 2006). Samo kod malog broja pacijenata (oko 5 %) u ovom trenutku se može utvrditi nasledni poremećaj, odnosno mutacija u nekom od gena od značaja ili njihovim promotornim regionima (Ali i sar., 2011).

Kada su u pitanju pacijenti kod kojih nije pokazano prisustvo mutacija opisano je nekoliko fenomena značajnih za razvoj PB: oksidativni stres, izmenjena funkcija mitohondrija i nakupljanje nemutiranih (engl. *wild type*, *wt*) ili izmenjenih oblika proteina u nervnim ćelijama (proteini izmenjene primarne strukture kao posledica mutacije, proteini narušene konformacije, zatim fosforilisane, nitrozilirane forme, forme proteina izmenjene usled delovanja metabolita dopamina itd.), zbog čega se danas PB ubraja u grupu oboljenja nazvanih „proteinopatije“ (Dauer i sar., 2003). Do nakupljanja proteina može da dođe usled pojave različitih genskih mutacija ili polimorfizama i/ili usled poremećene funkcije ćelijskih sistema za uklanjanje i razgradnju neadekvatno sintetisanih, ostarelih, oštećenih ili izmenjenih proteina. Pored ovoga, kao još jedan od činilaca koji doprinosi razvoju PB, navodi se i narušena homeostaza metala prelazne valence (npr. gvožđa), koji mogu doprineti povećanom nastanku slobodnih radikala (u Fentonovoj reakciji) (Sayre i sar., 2008); a takođe i neuroinflamacija, kao jedan od najranijih znakova ćelija mikroglije na patološke promene dopaminergičkih neurona (Qin i sar., 2007). Ovi procesi nisu međusobno nezavisni i smatra se da njihova međusobna interakcija pokreće

mehanizam koji liči na „začarani krug”, čiji krajnji ishod predstavlja oštećenje i smrt dopaminergičkih neurona.

U studijama koje su rađene obdukcionim analizama tkiva mozga osoba obolelih od PB, pokazano je da oksidativni stres igra važnu ulogu u nastanku i razvoju PB. Određivanje koncentracije proizvoda lipidne peroksidacije, oksidacije proteina i oštećenja DNK molekula u neuronima nigrostrijatne regije kod pacijenata obolelih od PB je ukazalo na visoke koncentracije reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. *reactive oxygen species, ROS*) (Yoritaka i sar., 1996; Alam i sar., 1997; Zhang i sar., 1999). Poznato je da jedan od najznačajnijih većih izvora reaktivnih kiseoničnih vrsta u dopaminergičkim neuronima mogu biti biohemijske reakcije uključene u metabolizam dopamina (Cohen i sar., 1984). Smatra se da je upravo to uzrok povećane vulnerabilnosti dopaminergičkih neurona, koji, osim izloženosti visokom nivou oksidativnog stresa usled metabolizma dopamina, poseduju i manjak neuroprotektivnih činilaca koji služe kao antioksidativna zaštita, kao što je glutation (Siegel i sar., 2005). Sam dopamin nema direktan neurotoksičan efekat u fiziološkim koncentracijama, ali intermedijeri metabolizma dopamina mogu da ispolje značajnu toksičnost. Naime, autooksidacija dopamina vodi nastanku semihinona, koji mogu generisati reaktivne kiseonične vrste, dok monoamino oksidaza B (MAO B), enzim koji ima značajnu ulogu u enzimskom katabolizmu dopamina, svojom aktivnošću dovodi do nastanka vodonik peroksida ( $H_2O_2$ ) kao proizvoda reakcije. Sa druge strane, razvoj PB prati i poremećaj regulacije sistema antioksidativne zaštite (Keeney i sar., 2006). Pokazano je da je kod pacijenata obolelih od PB nivo glutationa u *substantia nigra* i *corpus striatum-u* snižen (Pearce i sar., 1997), što može biti posledica kako visoke koncentracije ROS, koji dovode do oksidacije glutationa u glutation disulfid, tako i rana patogenetska promena koja doprinosi osetljivosti dopaminergičkih neurona na oksidativni stres.

Kod obolelih od Parkinsonove bolesti je pokazana degeneracija mitohondrija i smanjena aktivnost kompleksa I (Schapira i sar., 1990, 2012; Parker i sar., 2008), što doprinosi oštećenju neurona usled smanjenja energetskog naboja ćelije tj. smanjenog kapaciteta mitohondrija za sintezu adenosin trifosfata (engl. *adenosine triphosphate*,

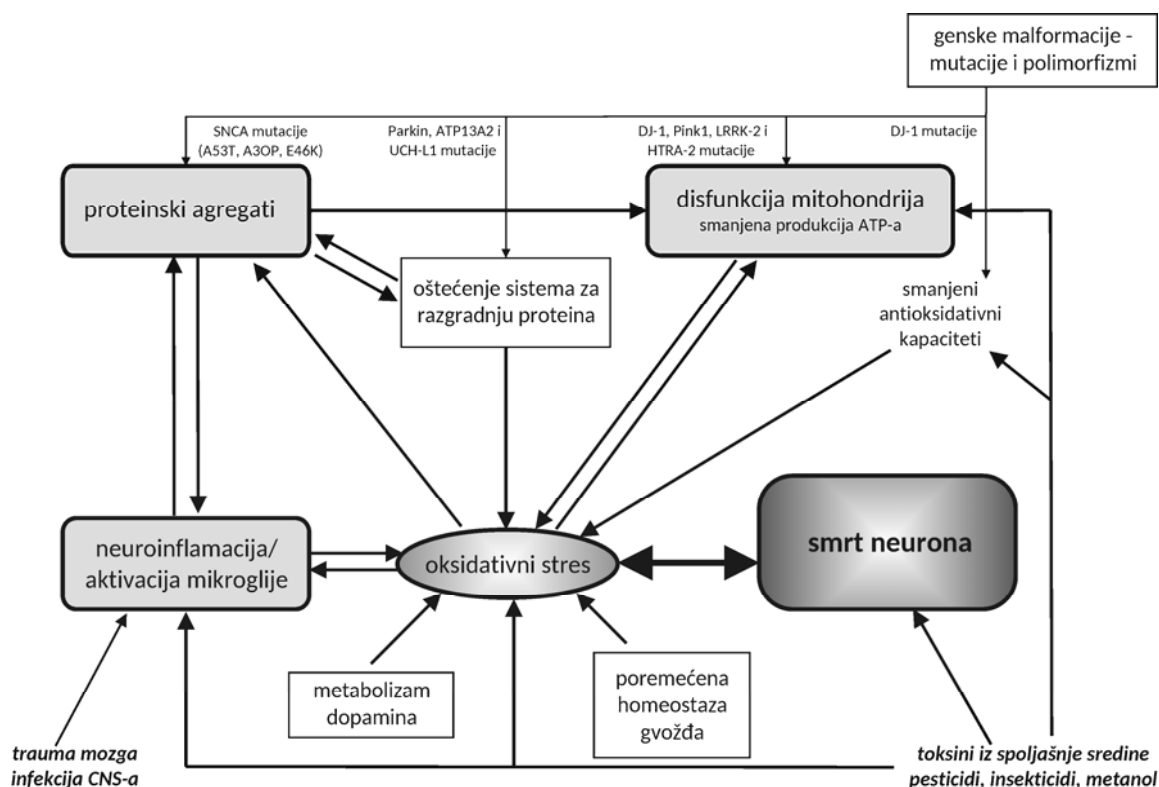
*ATP*) (Gispert i sar., 2009). Osim toga, oštećenje mitohondrija doprinosi oksidativnom stresu (Przedborski i sar., 1992), koji može prouzrokovati pogrešno uvijanje proteina (Gille i sar., 2011). Oksidovane forme proteina, koje nastaju kao posledica oksidativnog stresa u PB, pokazuju znatno veću sklonost ka agregaciji od neizmenjenih formi proteina (Giasson i sar., 2000). Ono što takode treba napomenuti je da se tokom života povećava zastupljenost proteina koji su izmenjeni nefiziološkom oksidacijom, a koji su najčešće pogrešno uvijeni. Ovaj fenomen je posebno izražen u neuronima kao postmitotičnom ćelijama (Beckman i sar., 1998). Pogrešno uvijeni proteini mogu dovesti do disfunkcije proteazoma i/ili lizozoma, usled čega se onemogućava razgradnja proteina, što vodi sve većoj akumulaciji proteina i daljem oštećenju ćelija (Obeso i sar., 2010).

Za patogenezu PB su od izuzetnog značaja i genske mutacije (Houlden i sar., 2012). Geni koji su do sada povezani s Parkinsonovom bolesti su: alfa-sinuklein (SNCA, PARK1/PARK4), UCH-L1 (engl. *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1*/PARK5) i LRRK2 (engl. *leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2*/PARK8) koji se nasleđuju autozomno dominantno; kao i: Parkin (engl. *E3 ubiquitin protein ligase parkin*/PARK2), PINK1 (engl. *PTEN-induced putative Kinase 1*/PARK6), DJ-1 (PARK7), ATP13A2 (PARK9) i HTRA2 (engl. *High temperature requirement protein A2*/PARK 13), koji se nasleđuju autozomno recesivno (Houlden i sar., 2012). Neke od ovih mutacija direktno dovode do izmenjene konformacije proteina, kao što je slučaj sa SNCA genom za alfa-sinuklein, o čemu će više biti reč u daljem tekstu. Druga grupa mutacija dovodi do oštećenja ćelijske mašinerije koja služi za prepoznavanje i razgradnju izmenjenih i/ili loše uvijenih proteina (Parkin, ATP13A2, UCH-L1) (Dauer i sar., 2003; Ghavami i sar., 2014). Takode, u razvoju PB imaju značaj i geni, čije mutacije dovode do oštećenja mitohondrija (PINK1, DJ-1, LRRK2, HTRA-2), posledičnog razvoja oksidativnog stresa, kao i do smanjenja kapaciteta antioksidativne zaštite u ćeliji (DJ-1). Naime, protein Parkin (PARK 2) je ubikvitin ligaza E3, koja predstavlja deo ubikvitin proteazomnog sistema za obeležavanje proteina koji treba da uđu u proces razgradnje. Mutacija Parkin-a je prvi put identifikovana kod juvenilnog oblika PB koji se nasleđuje autozomno recesivno (Kitada i sar., 1998).

Takođe, na fibroblastima pacijenata koji nose mutaciju u genu koji kodira Parkin, pokazana je smanjena aktivnost kompleksa I u respiratornom lancu mitohondrija, kao i smanjen kapacitet mitohondrija za sintezu ATP-a (Mortiboys i sar., 2008; Grunewald i sar., 2010). Još jedna česta mutacija u PB, a vezana za ubikvitin proteazomni sistem, je mutacija gena za enzim UCH-L1 (PARK 5), čija je funkcija hidroliza veza u poliubikvitinskom lancu i oslobađanje monomernih molekula ubikvitina kako bi, vezujući se za neki drugi protein u ćeliji, mogli da ostvare ponovo svoju funkciju. Mutacija u lizosomalnoj ATP-azi (ATP13A2/PARK 9) dovodi do poremećene lizosomalne razgradnje proteina i dolazi do razvoja retkog familijarnog oblika PB praćenog demencijom. PINK1 (PARK 6) je mitohondrijalna serin/treonin protein kinaza, koja je uključena u kontrolu kvaliteta mitohondrija, gde zajedno sa ubikvitin ligazom Parkin obeležava oštećene mitohondrije koje bi trebalo da budu razgrađene autofagijom (mitofagija), procesom koji zavisi od funkcije lizozoma (Youle i sar., 2012). Gubitak funkcije ovog enzima se povezuje sa smanjenom aktivnošću kompleksa I u respiratornom lancu, kao i sa povećanom zastupljenošću oksidativnog stresa (Stefanoni i sar., 2011). LRRK2 (PARK 8) je kinaza uglavnom lokalizovana u citosolu, ali se frakcija enzima može naći i na spoljašnjoj membrani mitohondrija. Pokazana je povezanost delovanja ovog enzima sa Parkin-om, kao i da mutirana forma LRRK2 dovodi do apoptoze primarnih neurona u kulturi (Dawson i sar., 2007; Gupta i sar., 2008). HTRA2 (Omi/PARK13) je mitohondrijalna proteaza, čiji gubitak dovodi do oštećenja i degeneracije mitohondrija (Stefanoni i sar., 2011). Mutacije u genu za DJ-1 (PARK7) su retke, a vezuju se za pojavu oksidativnog stresa, pojavu nepravilnog savijanja proteina i stvaranje proteinskih agregata (Guzman i sar., 2010; Batelli i sar., 2008). Osim što igra važnu ulogu u zaštiti ćelije tokom oksidativnog stresa, gubitak proteina DJ-1 je povezan sa depolarizacijom i fragmentacijom mitohondrija (Stefanoni i sar., 2011).

Sve navedeno ukazuje da su u molekularni mehanizam nastanka i razvoja Parkinsonove bolesti uključeni različiti mehanizmi i oštećenja ćelijskih komponenata, od kojih su najvažniji: disfunkcija mitohondrija, oksidativni stres, formiranje proteinskih agregata (posledica genskih mutacija i/ili oštećenja ćelijskih sistema za razgradnju proteina), neuroinflamacija (reakcija ćelija mikroglije na

oštećenje neurona) i promene na genima (mutacije i polimorfizmi, koje mogu dovesti do bilo kog od pomenutih oštećenja). Ovi procesi nisu međusobno nezavisni i sve zajedno vodi smrti i gubitku dopaminergičkih neurona, što leži u osnovi patogeneze PB (Shema 1).



**Shema 1. Molekularne osnove Parkinsonove bolesti.** U molekularni mehanizam nastanka i razvoja Parkinsonove bolesti uključeni su različiti mehanizmi i oštećenja ćelijskih komponenti, od kojih su najvažniji: disfunkcija mitohondrija, oksidativni stres, formiranje proteinskih agregata (posledica genskih malformacija i/ili oštećenja za razgradnju proteina), neuroinflamacija (reakcija ćelija mikroglije na oštećenje neurona) i promene na genima (mutacije i polimorfizmi, koje mogu dovesti do bilo kog od pomenutih oštećenja). Ovi procesi nisu međusobno nezavisni, već zajedno dovode do oštećenja i smrti dopaminergičkih neurona mehanizmom koji liči na „začarani krug“.

### 1.1.2. Alfa-sinuklein u Parkinsonovoj bolesti

Najvažniji patohistološki korelat Parkinsonove bolesti (PB) je nakupljanje proteina alfa-sinukleina (engl. *alpha-synuclein*, *ASYN*) u zahvaćenim neuronima, i formiranje Levijevih tela (Dauer i sar., 2003). Levijeva tela su sferični eozinofilni citoplazmatski proteinski agregati, u čiji sastav ulazi više vrsta proteina, uključujući

komponentne ubikvitin-proteazomne mašinerije za razgradnju proteina (parkin, ubikvitin), neurofilamente, šaperone, alfa-tubulin, sinfilin-1, gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu, ali kvantitativno najzastupljeniji je ASYN (Spillantini i sar., 1997; Stefanoni i sar., 2011). Uz to, pokazano je da težina bolesti korelira sa koncentracijom ASYN u zahvaćenim neuronima (Ross i sar., 2008).

Naime, 1997. godine se po prvi put dovodi u vezu mutacija u genu za ASYN sa familijarnom formom PB (Polymeropoulos i sar., 1997). Sprovedenjem velike genetske studije, identifikovan je lokus SNCA na hromozomu 4q21, koji kodira presinaptički protein od 144 aminokiseline (ASYN), kao lokus koji je nosilac rizika za nastanak i razvoj PB (Satake i sar., 2009; Simon-Sanchez i sar., 2009). Besmislena mutacija (engl. *missense mutation*) na SNCA genu (Ala53Thr) prvi put je ustanovljena kod velike italijanske porodice („*Contursi kindred*”, po nazivu grada) sa familijarnom formom PB (Polymeropoulos i sar., 1997). Takođe, identifikovane su još dve besmislene mutacije SNCA gena: Ala30Pro i Glu46Lys. Tačkasta mutacija E46K je potvrđena u familiji u kojoj je utvrđena pojava Parkinsonove bolesti, ali i demencije sa Levijevim telima (Zarranz i sar., 2004). Sve pomenute varijante su lokalizovane na N-terminalnom kraju proteina i povezane su sa autozomno dominantnom formom bolesti (Stefanoni i sar., 2011). Osim toga, treba napomenuti da su multiplikacije SNCA gena mnogo češće promene od mutacija ovog gena. Pokazano je da produženje sekvence sa dinukleotidnim ponovcima (engl. *dinucleotide repeat sequence*, *REP1*) na promotoru SNCA gena povećava rizik za nastanak sporadične forme PB (Maraganore i sar., 2006; Brighina i sar., 2008). Tako, u familijarnoj formi bolesti, usled mutacija u SNCA genu, u Levijevim telima dolazi do nagomilavanja izmenjenog (mutiranog) oblika ASYN, u kojem je jedna aminokiselina zamenjena drugom (A30P, A53T, E46K); dok je kod nekih pacijenata, kod kojih nije pokazano prisustvo mutacija u SNCA genu, pokazano da dolazi do nakupljanja normalnog, neizmenjenog (engl. *wild type*, *wt* ASYN) proteina, bilo usled multiplikacije genskih lokusa gena za ASYN (SNCA), ili polimorfizama njegovog promotora (Chartier-Harlin i sar., 2004; Maraganore i sar., 2006).

Pored prekomerne sinteze, do nakupljanja ovog proteina u ćelijama može doći i usled smanjenog kapaciteta za uklanjanje i razgradnju. Iako se isprva smatralo da je ubikvitin proteazomni sistem, smešten u citosolu, osnovni mehanizam razgradnje ASYN, novije studije su pokazale da se ASYN razgrađuje prevashodno lizozomalnim mehanizmima - autofagijom posredovanom šaperonima (engl. *chaperone-mediated autophagy*, CMA) i makroautofagijom. Pokazano je da prekomerna količina ASYN nepovoljno utiče na pomenute lizozomalne sisteme razgradnje proteina, kao i da smanjenje funkcije bilo kog od lizozomalnih sistema za razgradnju proteina može doprineti nakupljanju ASYN u ćeliji (Lee i sar., 2004).

Brojni podaci ukazuju na to da prisustvo nefiziološki visoke koncentracije ASYN, nastale usled povećane produkcije i/ili usled oštećenih sistema razgradnje proteina, imaju značajnu ulogu u patogenezi kako familijarnog, tako i sporadičnog oblika PB. Međutim, još uvek nije poznat tačan mehanizam toksičnog dejstva ASYN na ćelije, ali nema sumnje da, kod pacijenata obolelih od PB, usled nagomilavanja ASYN u neuronima, dolazi do njihove degeneracije i smrti (Vekrellis i sar., 2009).

Naime, poznato je da je ASYN lokalizovan u citoplazmi, prevashodno u presinaptičkim nervnim završecima ili pridružen ćelijskoj membrani neurona. Pretpostavlja se da igra ulogu u oslobađanju neurotransmitera, vezikularnom transportu, stabilizaciji ćelijske membrane i plastičnosti neurona (Stefanoni i sar., 2011). Pokazano je da ASYN može formirati pore u membrani, nalik jonskim kanalima, ili može dovesti do oštećenja voltažno-zavisnih receptora na presinaptičkoj membrani, čime se narušava sinaptička transmisija i dolazi do ulaska kalcijuma u neurone (Volles i sar., 2001). Jedna od manifestacija toksičnog efekta ASYN jeste i fragmentacija Goldži aparata, kao i poremećen vezikularni transport između endoplazmatičnog retikuluma (ER) i Goldži aparata, što uzrokuje oštećenja ER (Cooper i sar., 2006; Smith i sar., 2005; Vekrellis i sar., 2004; Quist i sar., 2005). Takođe, ASYN može uzrokovati oštećenje citoskeleta koje vodi aksonalnoj degeneraciji, kao i oštećenje lizozoma i ubikvitin proteazomnog sistema za razgradnju proteina; a ono što je primećeno u velikom broju modela PB je oštećenje

mitohondrija uz smanjenje njihovog broja u ćeliji (Devi i sar., 2008; Stefanis i sar., 2012).

Kada govorimo o ulozi ASYN u nastanku i razvoju PB, nastanak agregata ASYN ima nesumnjivo presudan značaj u oštećenju dopaminergičkih neurona. Naime, toksični efekat obe forme ASYN (mutirani oblik i nemutirana, normalna forma proteina) zasniva se na nepravilnom uvijanju proteina i onemogućavanju njegove razgradnje, čime se favorizuje stvaranje najpre oligomera i protofibrila, a potom fibrilarnih agregata ASYN. ASYN karakteriše nestabilna osnovna struktura, tako da lako zadobija različite konformacije, pri čemu su nosioci toksičnosti verovatno određene vrste oligomera, u kojima je veoma zastupljena struktura beta-nabrane ploče (Stefanis i sar., 2012). Ustanovljeno je da su mehanizmi toksičnog delovanja oligomera ASYN različiti, i da mogu direktno da budu odgovorni za degeneraciju i smrt neurona (Vekrellis i sar., 2004). Ti mehanizmi uključuju smanjenje stabilnosti citoskeleta usled vezivanja oligomera ASYN za alfa-tubulin mikrotubula, i za tau protein koji stabilizuje mikrotubule; oštećenje ćelijske membrane i mitohondrija; interakcija sa drugim proteinima i modulacija njihove aktivnosti; vezivanje za subjedince proteazoma (Stefanoni i sar., 2011). Cremades i saradnici su pokazali da dolazi do konformacionih promena ASYN od početno nastalih oligomera u stabilne, kompaktnije oligomere, koji su otporni na hidrolizu proteinazom K, što je verovatno kritičan korak u konačnom formiranju fibrilarnih struktura, odgovornih za formiranje Levijevih tela i nerodegeneraciju (Cremades i sar., 2012). Pokazano je i da fibrilarni agregati u sastavu Levijevih tela nemaju direktan toksičan uticaj, pa se uzima u obzir mogućnost da su Levijeva tela strukture koje štite dopaminergičke neurone od toksičnih solubilnih oligomera. Takođe, bitan činilac koji pospešuje agregaciju ASYN su i posttranslacione modifikacije ovog proteina (fosforilacija, oksidacija, glikozilacija, nitrozilacija) (Stefanis i sar., 2012). Pokazano je da oksidovana forma ASYN, koja može nastati kao posledica oksidativnog stresa i/ili usled metabolizma dopamina, kao i uticaja jona gvožđa, u uslovima *in vitro* pokazuje znatno veću sklonost ka agregaciji od neizmenjene forme proteina (Giasson i sar., 2000) (Shema 2).

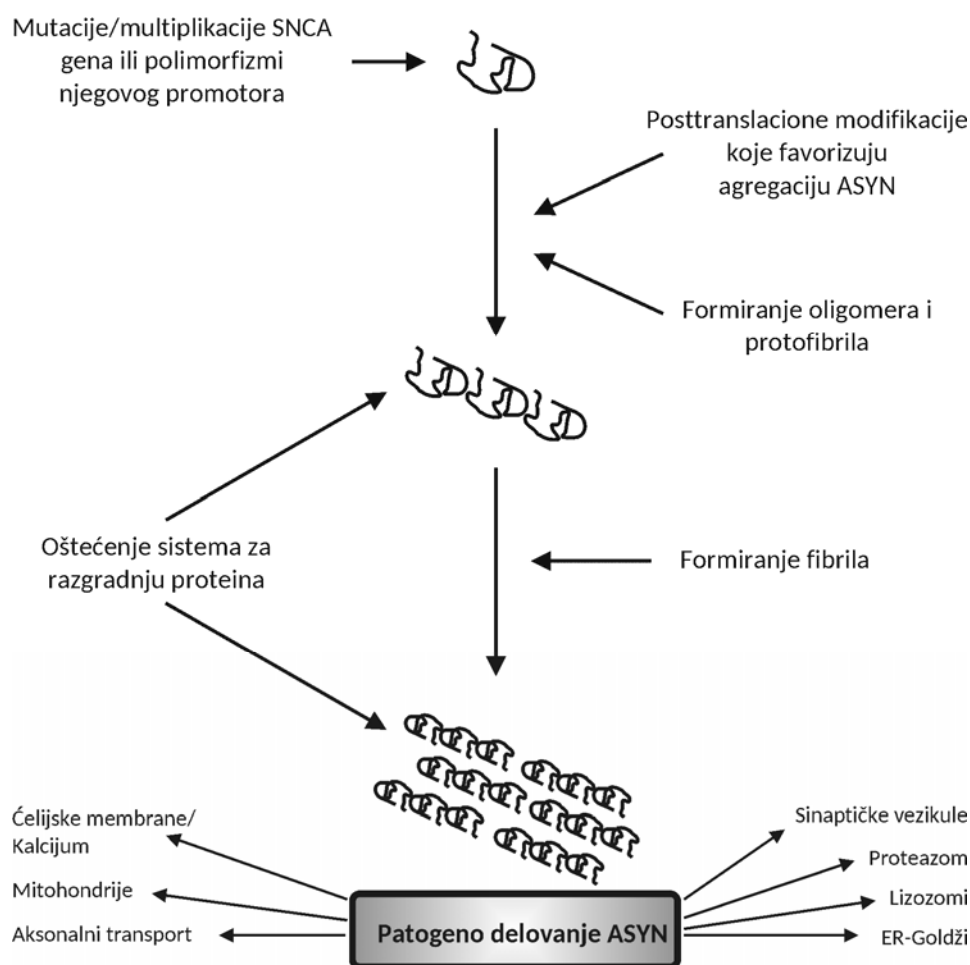
Iako je ASYN rasprostanjen širom centralnog nervnog sistema, Levijeva tela, unutarćelijske inkluzije u čiji sastav ulaze fibrilarni agregati ASYN, tipično se nalaze u dopaminergičkim neuronima *mesencephalon*-a zahvaćenim neurodegeneracijom u PB (Spillantini i sar., 1997). Nakupljanje različitih formi ASYN, kao i interakcija ovog proteina sa metabolizmom dopamina, čini dopaminergičke neurone posebno osetljivim na toksično delovanje ASYN. U skladu sa tim, smatra se da su dopaminergički neuroni u *substantia nigra* najvulnerabilnije moždane ćelije, izuzetno osetljive na patofiziološke procese koji se dešavaju tokom razvoja PB (Siegel i sar., 2005). Naime, pokazano je da, tokom metabolizma dopamina, dolazi do oslobađanja slobodnih kiseoničkih radikala, koji dovode do oksidacije ASYN i pospešuju agregaciju ASYN u obliku protofibrila i fibrila *in vitro* (Stanley i sar., 2000; Williamson i sar., 1999). Promene u strukturi ASYN su pokazane u uzorcima uzetim iz nigrostrijatnih delova mozгова nakon smrti obolelih od PB (Giasson i sar., 2000), kao i kod životinja koje su razvile PB (Gao i sar., 2008). I sam dopamin stabilizuje protofibrilarnu formu ASYN (Siegel i sar., 2005; Stefanoni i sar., 2011). Takođe, u strukturi ASYN se nalazi sekvenca amino kiselina koja predstavlja signal za ulazak u mitohondrije, pa samim tim prekomerna sinteza ovog proteina uzrokuje porast njegove translokacije u mitohondrije. Oštećenje mitohondrija, i sledstveno povećanje nivoa ROS-a, smatra se jednim od mehanizama kojima ASYN oligomeri ostvaruju svoje toksično delovanje (Stefanoni i sar., 2011, Glinka i sar., 1997; Giasson i sar., 2000). Porast u nivou ASYN korelira sa smanjenom sintezom dopamina u neuronima *substantia nigra*-e kod pacijenata obolelih od sporadične forme PB (Chu i sar., 2007).

Pored dopaminergičkih neurona, Levijeva tela se mogu naći i u neuronima olfaktornog bulbusa, neokorteksa i kičmene moždine. Takođe, mogu biti i šire rasprostranjena, u neuronima kože, srčanog mišića i autonomnog nervnog sistema (Davie i sar., 2008; Schulz-Schaeffer i sar., 2010). Braak i saradnici (2003) su na osnovu imunohistohemijske analize prisustva ASYN na velikom broju patohistoloških uzoraka mozgov obolelih od PB, napravili šemu za šest stadijuma PB. Pojava Levijevih tela u neuronima olfaktornog bulbusa predstavlja prvi stadijum u razvoju bolesti, dok je zahvaćenost *substantia nigra*-e tek u 3. stadijumu PB

(Braak i sar., 2003). Međutim, ono što ostaje nepoznanica je način na koji se ASYN prenosi i raspoređuje duž nervnog sistema, kao i da li je prisutan u vanćelijskom prostoru. Obdukcionim analizama tkiva mozga pacijenata obolelih od PB, kojima su zaživotno transplantirani fetalni mezencefalični dopaminergički neuroni, uočeno je prisustvo Levijevih tela i u neuronima grafta, što ukazuje na širenje bolesti od neurona domaćina na neurone grafta (Kordower i sar., 2008). Takođe je pokazano da se fibrilarni ASYN može preneti sa neurona na neuron (Desplats i sar., 2009), kao i da se iz ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y koje prekomerno proizvode ASYN, ovaj protein oslobađa pomoću specifičnih vezikula, egzozoma (Emmanouilidou i sar., 2010; Alvarez-Erviti i sar., 2011), i da na taj način ASYN može preći u zdrave ćelije. Sve više istraživanja govori o tome da je mogući mehanizam propagacije PB prelazak ASYN sa neurona na neuron i indukcije promene konformacije ASYN u primajućem neuronu sličan patogenetskom mehanizmu širenja prionskih proteina (Olanow i sar., 2013; Sato i sar., 2014).

Uz sve navedeno, najnovija istraživanja pokazuju da ASYN nije isključivo unutarćelijski protein, već da se promene u koncentraciji ovog proteina mogu detektovati i u cerebrospinalnoj tečnosti obolelih od PB, što otvara mogućnost korišćenja ASYN kao specifičnog biomarkera u dijagnozi i praćenju PB (Gao i sar., 2014).

Značaj nakupljanja ASYN u patogenezi PB dodatno potvrđuje i činjenica da je uložena namera da se sintetiše vakcina (PD01A, proizvedena od Affiris, Austrija) koja podstiče imunski sistem na povećanu razgradnju ASYN, koja je već ušla u klinička ispitivanja (New Scientist, 2012).



**Shema 2. Neurotoksično delovanje alfa-sinukleina (ASYN).** Do nakupljanja ASYN može doći usled mutacije/multiplikacije genskih lokusa gena za ASYN (SNCA), ili polimorfizama njegovog promotora; posttranslacionih modifikacija proteina; i/ili oštećenja sistema za razgradnju proteina. Usled nagomilavanja ASYN dolazi do formiranja oligomera i protofibrila, a potom i fibrilarnih agregata, koji ulaze u sastav Levijevih tela. Patogeno delovanje ASYN se odnosi na različite ćelijske strukture: oštećenje ćelijske membrane, poremećaj aksonalnog transporta, oštećenje funkcije mitohondrija, proteazoma, lizozoma, endoplazmatičnog retikuluma (ER) i Goldži aparata.

### 1.1.3. Apoptoza i autofagija u Parkinsonovoj bolesti

Molekularni mehanizam smrti dopaminergičkih neurona u PB i dalje nije rasvetljen i predmet je brojnih istraživanja (Wu i sar., 2011). Smatra se da je dominantan oblik ćelijske smrti, kao i u ostalim hroničnim neurodegenerativnim oboljenjima, apoptoza (tip I programirane ćelijske smrti) (Friedlander i sar., 2003). Pored mogućeg mehanizma smrti neurona aktivacijom apoptoze posredovane

kaspazama, navodi se i mehanizam oštećenja neurona inhibicijom ili indukcijom makroautofagije, mehanizma koji, iako može služiti održanju homeostaze, pod određenim okolnostima može doprineti smrti ćelija (Xilouri i sar., 2010).

Apoptoza, ili programirana ćelijska smrt tip I, je evolutivno konzerviran i genetski determinisan proces. Ima važnu ulogu u održavanju homeostaze tkiva i odbrambenu funkciju u uklanjanju ćelija oštećenih toksičnim agensima ili patološkim stanjima (Norbury i sar., 2001; Yuan i sar., 2010). Apoptoza je energetski zavisna i podrazumeva kontrolisanu, kaskadnu aktivaciju kaspaza, proteolitičkih enzima iz klase cistein proteaza, koje zatim razgrađuju osnovne ćelijske strukture uključujući i genetski materijal (Cohen i sar., 1997). Postoje dva glavna apoptotska puta: unutrašnji ili mitohondrijalni, i spoljašnji ili receptorski put. Spoljašnji put aktivacije kaspaza podrazumeva vezivanje odgovarajućih liganada za transmembranske proteine što dovodi do aktiviranja kaspaze 8 (preko domena smrti) koja potom dovodi do aktivacije kaspaze 3 i 7 (Stennicke i sar., 1998). Unutrašnji ili mitohondrijalni put apoptoze je najčešće iniciran činiocima koji izazivaju oštećenja DNK ili nekih drugih struktura u ćeliji, ili pak odsustvom faktora rasta, hormona i citokina koji su neophodni za preživljavanje ćelija. Svi ovi stimulusi izazivaju depolarizaciju i promenu propustljivosti spoljašnje mitohondrijalne membrane i oslobađanje u citoplazmu proapoptotskih proteina kao što su: citohrom *c*, faktor pokretanja apoptoze (engl. *apoptosis inducing factor*, *AIF*), Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 i endonukleaza G (Saelens i sar., 2004). Oslobađanje citohroma *c* iz mitohondrija vodi daljoj aktivaciji kaspaze 9, koja potom aktivira kaspaze 3 i 7 (Stennicke i sar., 1998; Cohen i sar., 1997). Otvaranje mitohondrijalnih pora je proces koji regulišu pro- i anti-apoptotski proteini koji pripadaju Bcl 2 (engl. *B cell lymphoma*, *Bcl 2*) familiji proteina (Gross i sar., 1999). Ćelije koje umiru apoptozom pokazuju specifične morfološke promene, kao što su smanjivanje zapremine ćelije, kondenzacija hromatina (piknoza), intenzivno pupljenje plazma membrane, stvaranje apoptotskih tela, a jedna od osnovnih karakteristika apoptoze je proces fragmentacije molekula DNK (Schulze-Osthoff i sar., 1994; Williams i sar., 1974).

Apoptoza posredovana kaspazama zabeležena je u obdukcionim analizama tkiva

mozga obolelih od PB (Hartmann i sar., 2000; Tatton i sar., 2000). Takođe, u toksičnom modelu PB, pokazano je da je delovanje neurotoksina MPP<sup>+</sup> (engl. *1-methyl-4-phenylpyridine*, MPP) u kulturi dopaminergičkih neurona iz *mesencephalon*-a, povezano sa aktivacijom kaspaza (Bilsland i sar., 2002). Pored toga, pokazano je da povećana koncentracija ASYN dovodi do oslobađanja citohroma *c* iz mitohondrija, što predstavlja inicijalni korak u unutrašnjem putu aktivacije procesa apoptoze; što je praćeno i aktivacijom kaspaze 9 (Vekrellis i sar., 2009). Kao dodatak ovome, inhibitor oslobađanja citohroma *c* iz mitohondrija, minociklin, je pokazao značajne neuroprotektivne efekte na mišjim modelima PB (Chen i sar., 2000), i već su pokrenuta klinička ispitivanja efikasnosti minociklina u PB (Kim i sar., 2009). Sa druge strane, pokazano da usled nagomilavanja ASYN u zahvaćenim dopaminergičkim neuronima, dolazi do njihove postepene degeneracije i smrti, ali da je mehanizam smrti različit od klasičnog procesa apoptoze sa aktivacijom kaspaza (Vekrellis i sar., 2009).

Makroautofagija, za koju se često koristi sinonim autofagija, je proces razgradnje proteina/ćelijskog sadržaja posredovan lizozomima, pomoću kog se uklanjaju različite ćelijske komponente. U fiziološkim uslovima autofagijom se uklanjaju dugoživeći proteini i oštećene organele; međutim, u uslovima ćelijskog stresa, ili u periodima nedovoljne dostupnosti hranljivih materija, proces autofagije omogućava preživljavanje ćelije, tako što razgradnjom organela i molekula obezbeđuje energiju i neophodne supstrate za održavanje metaboličkih procesa. Pored toga što pomaže u održavanju homeostaze i preživljavanju, u slučaju da oštećenja ćelije prevladaju ćelijske odbrambene mehanizme, autofagija može biti alternativni put ćelijske smrti (progamirana ćelijska smrt tip II) (Maiuri i sar., 2007). U fiziološkim uslovima, u ćeliji se može detektovati bazalni nivo autofagije.

Morfološki, autofagija je proces koji karakteriše formiranje vezikula sa dvostrukom membranom (fagofora, a potom autofagozom) u kojoj je smešten „materijal“ za razgradnju (proteini ili organele). Autofagozom se kreće duž mikrotubula i odlazi do centra za organizaciju mikrotubula, gde se spaja sa lizozomom i formira autofagolizozom (autolizozom), strukturu u kojoj dolazi do

hidrolize ćelijskog sadržaja, delovanjem enzima kiselih hidrolaza u uslovima kiselog pH u lizozomima. Autofagozomi mogu da se formiraju u bilo kom delu ćelije, što je posebno važno za neurone, u kojima proces autofagije može započeti bilo gde u dendritima/aksonu, čak i dosta udaljeno u odnosu na perinuklearno postavljene lizosome (Hollenbeck i sar., 1993).

Imajući u vidu veoma važnu ulogu autofagije u uklanjanju proteina i proteinskih agregata, jasna je veza autofagije sa procesima u toku kojih dolazi do nakupljanja pogrešno uvijenih proteina, kao što je neurodegeneracija. Stoga, povećan broj autofagnih vakuola može biti odbrambeni mehanizam, kojim se ćelija trudi da ukloni „loše“ proteine. Istovremeno je pokazano da je izražena akumulacija nerazgrađenih autofagnih vakuola štetna za neurone (Uchiyama i sar., 2009) i da preterana aktivacija autofagije može dovesti do daljih oštećenja koja se završavaju smrću ćelije.

Kao što je ranije pomenuto, i ASYN se uklanja pomoću dva osnovna mehanizma za razgradnju proteina za koje je neophodna aktivacija lizozoma - autofagija posredovanom šaperonima (CMA) i makroautofagija (Xilouri i sar., 2011). Na osnovu saznanja o vezi između ASYN sa jedne, i CMA i makroautofagije sa druge strane, može se postaviti hipoteza, da smanjenje funkcije nekog od ova dva sistema može doprineti nakupljanju ASYN koje vodi razvoju PB. U prilog ovoj hipotezi govore saznanja da se dva genetska oštećenja koja dovode do disfunkcije lizozoma povezuju sa PB. Mutacije u lizozomalnoj ATP-azi (ATP13A2) imaju za posledicu pojavu retkog familijarnog oblika PB praćenog demencijom. Takođe, pokazano je da je kod osoba sa mutacijom u genu za lizozomalni enzim glukocerebrozidazu povećan rizik za razvoj PB. Brojne studije su ukazale da prekomerna količina ASYN nepovoljno utiče na pomenute lizozomalne sisteme razgradnje proteina, što za posledicu može imati prekomerno nakupljanje ASYN i, vremenom, uzrokovati stvaranje osnovnog patohistološkog supstrata PB, Levijevih tela (Di Fonzo i sar., 2007; Ramirez i sar., 2006; Sidransky i sar., 2009).

Ispitivanja *in vitro* su pokazala da je ASYN dobar supstrat za CMA, jer sadrži pentapeptidni niz odogovoran za ulazak proteina u lizosome i pokretanje CMA.

Mutirani oblici ASYN, A30P i A53T, vezuju se direktno za LAMP-2A (engl. *lysosomal-associated membrane protein 2, LAMP 2*), transmembranski protein koji se nalazi na membrani lizozoma i učestvuje u transportu proteina u unutrašnjost lizozoma. Usled promenjene strukture, mutirane forme ASYN ne mogu da uđu u lizosome i izostaje njihova razgradnja, pri čemu istovremeno blokiraju CMA i za unos drugih supstrata u lizosome (Cuervo i sar., 2004; Webb i sar., 2003; Lee i sar., 2004). Uz to, pokazano je i da posttranslacione modifikacije ASYN mogu da utiču na sposobnost CMA da efikasno razgrađuje proteine, odnosno da oligomeri, oksidovane i nitrozilirane forme ASYN delimično inhibiraju, a fosforilisane forme i dopaminske modifikacije ASYN skoro u potpunosti blokiraju funkciju CMA. Pokazano je da CMA ima važnu ulogu u razgradnji normalnog, nemutiranog oblika ASYN (*wt* ASYN) (Cuervo i sar., 2004). Iako se smatra da CMA predstavlja glavni mehanizam za uklanjanje *wt* ASYN, pokazano je da inhibicija makroautofagije primenom farmakološkog inhibitora 3-metiladenina (3-MA) dovodi do nakupljanja nemutiranog tipa ASYN, što ukazuje na činjenicu da i ovaj tip autofagije igra značajnu ulogu u metabolizmu *wt* ASYN (Winslow i sar., 2010). ASYN može da blokira i proces makroautofagije, tako što inhibira formiranje autofagozoma u samom početku tog procesa, preko interakcije sa Rab1a (GTP-aza koja igra značajnu ulogu u vezikularnom transportu) (Alvarez-Erviti i sar., 2010; Winslow i sar., 2010). Svi podaci ukazuju na to da oba lizosomalna sistema razgradnje proteina imaju veliku ulogu kako u familijarnoj, tako i u sporadičnoj formi PB.

Međutim, ono što ostaje nedovoljno razjašnjeno je pitanje uloge makroautofagije – da li ima protektivnu ulogu ili pak doprinosi oštećenju neurona. Naime, Wu i saradnici su pokazali da razgradnja ASYN, usled indukcije autofagije, dovodi do poboljšanja preživljavanja neurona (Wu i sar., 2011) mehanizmom koji uključuje protein kinazu aktiviranu AMP-om (engl. *adenosine monophosphate activated kinase, AMPK*). Sa druge strane, u različitim *in vitro* modelima PB pokazano je da indukcija autofagije, pospešuje degeneraciju neurona i dovodi do smrti zahvaćenih ćelija (Arsikin i sar., 2012; Choubey i sar., 2011; Vogiatzi i sar., 2008). Ova kontradiktornost se može objasniti činjenicom da, iako autofagija može da bude protektivna i korisna u smislu mehanizma kojim se uklanja višak proteina u

ranoj fazi procesa neurodegeneracije, njena prekomerna aktivacija može pospešiti oštećenja ćelija i dovesti do njihove smrti u sklopu progresije patološkog procesa (Xilouri i sar., 2011).

## 1.2. Protein kinaze

Kao što je ranije pomenuto, posttranslacione modifikacije su od velikog značaja za stvaranje proteinskih agregata koji prate neurodegeneraciju. Jedna od najčešćih tipova modifikacija je fosforilacija usled aktivacije protein kinaza, tako da u Alchajmerovoj bolesti dolazi do hiperfosforilacije tau proteina, dok je kod PB supstrat za fosforilaciju ASYN (Goedert i sar., 1992; Fujiwara i sar., 2002). Naime, ustanovljeno je da je najčešća modifikaciju ASYN identifikovanu u Levijevim telima fosforilacija serinskog ostatka u položaju 129 u molekulu ASYN (engl. *phospho-Serine129*, p-Ser129) (Fujiwara i sar., 2002; Anderson i sar., 2006). Stoga, se formiranje i nakupljanje p-Ser129 ASYN smatra značajnim patogenetskim činiocem u nastanku PB (Oueslati i sar., 2010). Za neke kinaze je već pokazano da dovode do fosforilacije ASYN na pomenutoj poziciji: kazein kinaze (Okochi i sar., 2000), kinaza 5 vezana za receptor udružen sa G-proteinom (Arawaka i sar., 2006), kinaze slične Polo-kinazama (Mbefo i sar., 2010). S druge strane, pokazano je da protein fosfataza 2A (engl. *protein phosphatase 2A*, PP2A) predstavlja enzim koji ima najbitniju ulogu u defosforilaciji p-Ser129 ASYN (Lee i sar., 2011). U skladu s tim, pokazano je da farmakološki aktivator protein kinaze aktivirane adenozin monofosfatom (AMPK), metformin, dovodi do aktivacije PP2A, što, zajedno sa inhibicijom mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*, mTOR), dovodi do smanjenje nivoa p-Ser129 ASYN u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y, kao i u kulturi primarnih neurona dobijenih iz moždane kore pacova (Perez-Revuelta i sar., 2014).

Imajući u vidu činjenicu da je fosforilacija ASYN značajan patogenetski činilac u nastanku PB; da je metformin pokazao svoje protektivno delovanje snižavajući nivo fosforilisane forme ASYN; kao i da energetska status ćelije i

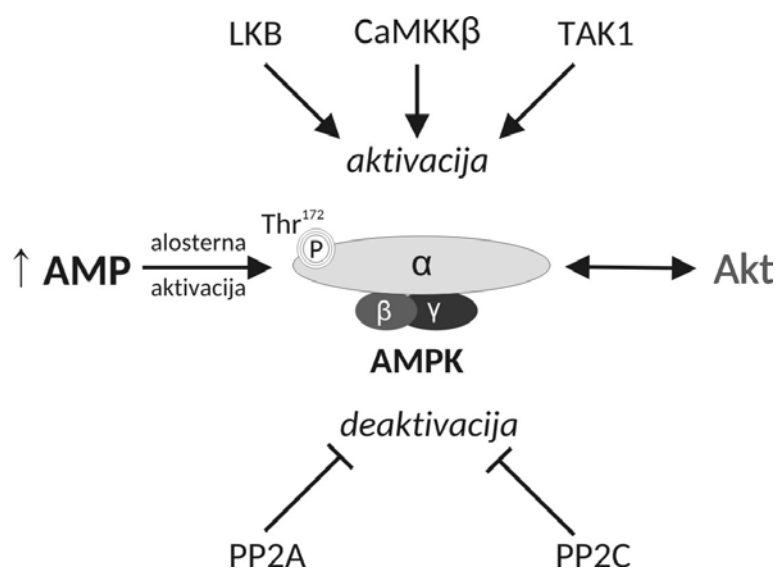
signalni putevi i molekuli koji učestvuju u održavanju energetske ravnoteže u neuronima imaju izuzetan značaj; nametnula se ideja uloge glavnog energetskog senzora u ćeliji, protein kinaze aktivirane AMP-om (AMPK) u neurotoksičnosti nemutirane forme ASYN.

### 1.2.1. Protein kinaza aktivirana adenozin monofosfatom (AMPK)

Protein kinaza aktivirana adenozin monofosfatom (engl. *AMP-activated protein kinase, AMPK*) je serin/treonin kinaza, koja, kao najvažniji unutarćelijski energetski senzor, ima centralnu ulogu u regulaciji unutarćelijske energetske homeostaze i kontroliše metabolizam i energetski balans na nivou celog organizma. AMPK je heterotrimerni kompleks koga čine jedna katalitička subjedinica ( $\alpha$ ) i dve regulatorne subjednice ( $\beta$  i  $\gamma$ ). Kontrola aktivnosti AMPK je kompleksan proces. Aktivacija AMPK podrazumeva fosforilaciju treonina (Thr 172) na katalitičkoj subjednici  $\alpha$  delovanjem ushodnih kinaza, ili alosternu aktivaciju usled porasta odnosa AMP/ATP. Do danas su definisane tri ushodne kinaze koje mogu da aktiviraju AMPK: LKB1 (engl. *liver kinase B1, LKB1*), CaMKK $\beta$  (Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-zavisna kinaza  $\beta$ ) i TAK1 (engl. *transforming growth factor-activated kinase-1, TAK1*). Alosterna aktivacija AMPK podrazumeva vezivanje molekula AMP za regulatornu  $\gamma$  subjedinicu (Xiao i sar., 2011; Oakhill i sar., 2012). Sa druge strane, inhibicija enzima uključuje aktivnost serin/treonin fosfataza, koje vrše defosforilaciju enzima. Najznačajniji enzim koji katališe direktnu negativnu regulaciju aktivnosti AMPK je PP2A (Wu i sar., 2007), za koju se zna da je uključena i u interakciju između  $\alpha$  i  $\gamma$  subjednice AMPK (Davies i sar., 1995). Druga fosfataza za koju postoje podaci da inhibira aktivnost AMPK je Mn<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-zavisna protein fosfataza C (engl. *protein phosphatase 2C, PP2C*) (Ingebritsen i sar., 1983) (Shema 2).

Iako postoje brojni mehanizmi koji mogu dovesti do aktivacije AMPK, najznačajniji stimulus za aktivaciju ovog enzima su uslovi niskog energetskog naboja u ćeliji, kada je povećan odnos AMP/ATP (adenozin monofosfata/adenozin

trifosfata) (Witczak i sar., 2008). Nakon delovanja stimulusa kao što su hipoksija, nedostatak nutrijenata i dejstvo pojedinih hormona, aktivacija AMPK pokreće kataboličke procese (preuzimanje glukoze, glikoliza, oksidacija glukoze i masnih kiselina), a inhibira anaboličke procese u ćeliji (glukoneogeneza, sinteza glikogena, masnih kiselina, holesterola, kao i sinteza proteina) sa ciljem obezbeđenja energije (Hardie i sar., 2011). Takođe, postoje podaci da AMPK mogu da aktiviraju i citokini i ćelijski stresori, koji ne utiču na nivo ATP-a u ćeliji (Ronnett i sar., 2009).



**Shema 2. Regulacija aktivnosti protein kinaze aktivirane adenozin monofosfatom (AMPK).** Aktivacija AMPK podrazumeva fosforilaciju treonina (Thr 172) na katalitičkoj subjedinici  $\alpha$  pomoću ushodnih kinaza: LKB1 (engl. *liver kinase B1*), CaMKK $\beta$  (Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-zavisna kinaza  $\beta$ ) i TAK1 (engl. *transforming growth factor-activated kinase-1*). Alosterna aktivacija podrazumeva vezivanje AMP (adenozin monofosfat) molekula za regulatornu subjedinicu AMPK. Enzim se inhibira defosforilacijom pomoću: PP2A (protein fosfataza 2A) i PP2C (protein fosfataza C). Za međusobni uticaj Akt-a (protein kinaza B) i AMPK se navode kontradiktorni podaci u literaturi.

Svoje efekte AMPK ostvaruje direktno, fosforilacijom određenih enzima uključenih u metaboličke procese, ali i indirektno, delovanjem na ekspresiju gena (Hardie i sar., 2011; Mihaylova i sar., 2011). U odgovoru na ćelijski stres, aktivacija AMPK dovodi do preusmerenja ćelijskog metabolizma, zaustavljanja ćelijskog ciklusa preko mTOR, p53 i drugih modulatora ćelijskog rasta i preživljavanja, i indukcije autofagije i/ili apoptoze (Luo i sar., 2010). Naime, mTOR je serin-treonin kinaza koja je najznačajniji inhibitor inicijacije autofagije. mTOR put uključuje dva

funkcionalna kompleksa, Raptor-mTOR kompleks koji je regulisan rapamicinom (mTORC1) i inhibira autofagiju, i Rictor-mTOR kompleks (mTORC2) koji nije direktan regulator autofagije (Yang i sar., 2007). mTORC1 kompleks integriše brojne signale koji utiču na autofagiju, kao što su faktori rasta, nutritijenti, različiti stresori i energetska status ćelije. Pokazano je da su dva glavna signalna puta koja regulišu aktivnost mTOR1 u sisarskim ćelijama upravo AMPK/mTOR i PI3K/Akt signalni put (Jung i sar., 2010; Ravikumar i sar., 2010). Naime, AMPK predstavlja najvažniji inhibitor mTOR1 (Kimura i sar., 2003). U uslovima gladovanja, hipoksije i u uslovima oksidativnog stresa (Kroemer i sar., 2010), usled pojačanih energetskih potreba ćelije, stimuliše se aktivacija AMPK, koja zatim fosforilacijom TSC1/TSC2 kompleksa (engl. *tuberosus sclerosis complex*, *TSC*) i Raptor-a, inhibira mTOR1 i indukuje autofagiju (Meley i sar., 2006). Pored obezbeđenja energije i preživljavanja ćelija u stresnim uslovima, inhibicija aktivnosti mTOR-a može imati i negativne posledice po ćeliju. S tim u vezi, pokazano je da apoptoza izazvana oksidativnim stresom u kulturi PC12 ćelija pacovskog feohromocitoma i primarnih mišjih neurona uključuje aktivaciju AMPK i inhibiciju mTOR-a (Chen i sar., 2010). Iako mTOR1 ima ključnu ulogu u regulaciji autofagije u ćelijama sisara, autofagija takođe može biti aktivirana i nezavisno od mTOR1 puta.

AMPK intereaguje i sa drugim signalnim putevima u ćeliji, a novije studije govore o povezanosti i uticaju AMPK i Akt signalnog puta, značajnog za preživljavanje ćelija. Za međusobni uticaj Akt (protein kinaza B) i AMPK navode se kontradiktorni podaci u literaturi. Naime, postoje podaci koji govore u prilog tome da AMPK može da aktivira Akt (Levine i sar., 2007), a zabeležena je i inhibicija AMPK pod dejstvom Akt na različitim tipovima ćelija u kulturi (Kovacic i sar., 2003; Hahn-Windgassen i sar., 2005).

Protein kinaza B, PKB (engl. *Protein Kinase-B*, *PKB*) ili Akt (engl. *v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene*) učestvuje u regulaciji metaboličkih procesa, sinteze proteina, apoptoze i ćelijskog ciklusa (Brazil i sar., 2004). Aktivacija Akt signalnog puta, koja se odigrava posredstvom fosfoinozitol-3-kinaze (PI3K), uvodi ćeliju u proliferaciju i ima anti-apoptotske efekte. Naime, Akt može da inhibira

apoptozu direktno, putem fosforilacije i inaktivacije nekoliko pro-apoptotskih molekula, uključujući Bad (član Bcl familije proteina), c-Raf i kaspazu 9 (Datta i sar., 1997; Brunet i sar., 1999; Zimmermann i sar., 1999; Zhou i sar., 2000) ili indirektno, preko aktivacije NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, *NF-kB*) i posledične transkripcije gena za preživljavanje ćelija (Brunet i sar., 2001).

Pored negativne regulacije apoptoze, Akt deluje i na mTOR i p70S6 proteine, glavne aktivatore sinteze proteina u ćeliji, što za posledicu ima podsticanje rasta (Scott i sar., 1998; Kenessey i sar., 2006). Vezivanje faktora rasta, kao što je IGF (engl. *insulin growth factor*, *IGF*), za svoj receptor aktivira PI3K, koja zatim fosforiliše i aktivira Akt (mesta fosforilacije su Thr308 i Ser473), koji dalje aktivira mTOR preko TSC1/TSC2 kompleksa i inhibira autofagiju (Inoki i sar., 2002).

Poremećaj u regulaciji aktivnosti protein kinaze B (Akt) pokazan je u brojnim neurodegenerativnim bolestima, uključujući Alchajmerovu (Rickle i sar., 2004; Ryder i sar., 2004), Parkinsonovu (Hashimoto i sar., 2004) i Huntingtonovu bolest (Humbert i sar., 2002). Pretpostavka da prekid prenosa signala preko Akt signalnog puta leži u osnovi degeneracije neurona u PB izvedena je na osnovu rezultata brojnih studija koje govore o mehanizmima neurotoksičnosti ASYN, a koje su izvedene kako na kulturi tkiva (Kao i sar., 2009), tako i na animalnim modelima (Malagelada i sar., 2008; Malagelada i sar., 2010) i genetskim modelima PB (Aleyasin i sar., 2010; Rieker i sar., 2011). Prema podacima iz literature, SH-SY5Y ćelije dvostruko transfekovane, za prekomernu produkciju ASYN i konstitutivno aktiviran Akt, pokazale su snižen nivo poli-ADP ribozomske polimeraze (PARP), markera apoptoze (Kao i sar., 2009). Obdukcioni nalazi, odnosno analize moždanog tkiva umrlih od PB, pokazuju smanjenu aktivnost Akt, što za posledicu ima prekid prenosa signala preko PI3K/Akt signalnog puta (Malagelada i sar., 2008; Timmons i sar., 2009). Takođe, različita istraživanja ukazuju na to da Akt ima značajnu ulogu i u neurotoksičnim modelima PB. Naime, pokazano je da konstitutivno aktivna forma Akt spašava dopaminergičke neurone u *substantia nigra mesencephalon-a*, kao i aksonske nastavke ovih neurona u *corpus striatum-u* nakon ubrizgavanja

neurotoksina 6-hidroksidopamina (6 OHDA) u mozak miševa (Ries i sar., 2006). Pored toga, podaci ukazuju na to da je protektivna uloga  $\beta$ -sinukleina protiv PB indukovane rotenonom u kulturi ćelija neuroblastoma posredovana aktivacijom Akt kinaze (Hashimoto i sar., 2004). Aktivacija/fosforilacija Akt može biti izmenjena i delovanjem nekih drugih faktora značajnih za patogenezu PB, kao npr. indukcijom proteina stresa RTP801, koja je dokumentovana u *in vitro* modelima PB, kao i u dopaminergičkim neuronima pacijenata obolelih od PB (Malagelada i sar., 2006). Naime, povećana zastupljenost proteina RTP801 korelira sa aktivacijom mTOR proteina i posledičnom inhibicijom fosforilacije Akt (Malagelada i sar., 2008). Iz svega navedenog možemo zaključiti da je protektivna uloga Akt proteina pokazana u toksičnim modelima PB (Steidinger i sar., 2011), ali nije nedvosmisleno potvrđena kod prekomernog nagomilavanja nemutiranog tipa ASYN.

### **1.2.2. Dosadašnja saznanja o ulozi AMPK u Parkinsonovoj bolesti**

Kao što je prethodno navedeno, jedan od glavnih mehanizama u patogenezi PB jeste oštećenje mitohondrija. Kao rezultat degeneracije mitohondrija, jedna od mogućih posledica je smanjenja kapaciteta za sintezu adenozin trifosfata (ATP), sa sledstvenim padom unutarćelijske koncentracije ATP-a i porasta unutarćelijske koncentracije adenozin monofosfata (AMP), što može da uzrokuje aktivaciju AMPK pomoću ushodne kinaze LKB1 (Abou-Sleiman i sar., 2006; Hardie i sar., 2012).

Kao i u ostalim ćelijama našeg organizma, i u neuronima AMPK ima značajnu funkciju u održavanju energetskog statusa ćelija kao i njihovog preživljavanja u uslovima stresa (Poels i sar., 2009; Spasic i sar., 2008; Spasic i sar., 2009). Naime, AMPK je visoko eksprimirana u neuronima i brzo se aktivira u uslovima hipoksije, gladovanja i ishemijske povrede mozga (Ramamurthy i sar., 2006). Sa druge strane, farmakološki aktivator AMPK, AICAR, pospešuje apoptozu u toku oksidativnog stresa u kulturi mišjih Neuro 2a neuroblastoma (Jung i sar., 2004).

Promene u aktivnosti AMPK signalnog puta su pokazane u nekoliko modela neurodegeneracije, uključujući Alchajmerovu i Hantingtonovu bolest. Pokazano je da aktivacija AMPK u *in vitro* modelu Alchajmerove bolesti smanjuje stepen nastajanja beta amiloida u neuronima u kulturi, kao i da pospešuje uklanjanje prisutnog beta amiloida i inhibira nastajanje amiloidnih plakova (Vingtdeux i sar., 2011; Vingtdeux i sar., 2010). Međutim, iako je pokazano da aktivacija AMPK poboljšava preživljavanje u modelu Hantingtonove bolesti kod miša, druge studije su pokazale da je njena aktivacija doprinosila smrti neurona i formiranju agregata (Ma i sar., 2007; Ju i sar., 2012). Dosadašnji podaci na modelu neurodegeneracije izazvane ishemijom na miševima su takođe kontroverzni. Tako akutna farmakološka inhibicija AMPK smanjuje veličinu pogođenog područja (McCullough i sar., 2005), dok rezultati novije studije na istom *in vivo* modelu govore u prilog neuroprotektivnoj ulozi hroničnog tronedelnog pretretmana farmakološkim aktivatorom AMPK metforminom (Li i sar., 2010).

Istraživanja sprovedena na *in vitro* modelu PB su pokazala da se ASYN vezuje za mitohondrije i da u ćelijama koje prekomerno proizvode ASYN dolazi do disfunkcije mitohondrija (Devi i sar., 2008; Marongiu i sar., 2009; Nakamura i sar., 2011), što bi za posledicu moglo da ima aktivaciju AMPK. U modelu PB izazvanom delovanjem neurotoksina MPP<sup>+</sup> pokazano je da aktivacija AMPK ima neuroprotektivnu ulogu (Choi i sar., 2010). Takođe je pokazano da farmakološki aktivator AMPK/SIRT signalnog puta, resveratrol, dovodi do povećanja razgradnje nemutirane forme ASYN (*wt* ASYN) lizosomalnim mehanizmima razgradnje proteina, što potvrđuje neuroprotektivni efekat aktivacije AMPK (Wu i sar., 2011). Nasuprot tome, postoje i podaci da aktivacija AMPK pomoću laktata pospešuje fosforilaciju ASYN, što dovodi do skraćivanja dužine aksona, ali bez direktnog neurotoksičnog efekta na preživljavanje neurona (Jiang i sar., 2013).

Iz navedenog vidimo da je u različitim modelima neurodegeneracije pokazano da AMPK može imati protektivnu ulogu, ali i pospešiti proces degeneracije. Sa druge strane, vrlo se malo zna o ulozi AMPK u PB, a do sada ne postoje podaci o ulozi AMPK u neurotoksičnom delovanju ASYN. Utvrđivanje

mehanizama kojim ASYN utiče na aktivnost signalnog puta AMPK (promena eneretskog statusa i/ili promena aktivnosti kinaza/fosfataza koje regulišu aktivnost AMPK) kao i mogućih neuroprotektivnih efekata njegove modulacije bi, stoga, mogle imati izuzetno veliki (pato)fiziološki značaj.

## 2. CILJEVI

U skladu sa hipotezom da postoji povezanost između citotoksičnog delovanja ASYN i promene aktivnosti signalnog puta AMPK u ćelijama humanog neuroblastoma diferentovanim u neuronski fenotip u *in vitro* uslovima, postavljeni su sledeći ciljevi ovog rada:

- Ispitati citotoksično delovanje unutarćelijskog ASYN na ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanim u neuronski fenotip
- Ispitati citotoksično delovanje vanćelijskog ASYN na ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanim u neuronski fenotip i ćelijama feohromocitoma pacova PC12
- Ispitati uticaj unutarćelijskog i vanćelijskog ASYN na aktivnost signalnog puta AMPK
- Ispitati uticaj modulacije aktivnosti AMPK na neurotoksično dejstvo unutarćelijskog i vanćelijskog ASYN

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. REAGENSI I RASTVORI

U ovom istraživanju korišćeni su sledeći reagensi: goveđi serum (engl. *fetal bovine serum, FBS*), medijumi za kultivaciju ćelija – RPMI-1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute Medium, RPMI*), MEM (engl. *Modified Eagle Medium, MEM*), Ham F12, DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM*; GIBCO, Paisley, Velika Britanija), Neurobazalni medijum sa B27 suplementom (Invitrogen, Carlsbad, CA), MEM neesencijalne aminokiseline, 10 % konjski serum, 5 % *FetalClone III serum* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), rastvor antibiotika i antimikotika (PAA, Linz, Austrija), tripsin (Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), *all-trans* retinoična kiselina (RA), doxiciklin (DOX), geneticin (G418), higromicin B (oba od Calbiochem, San Diego, CA), Lipofektamin 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA), etilendiamino-tetrasirćetna kiselina (EDTA), Tris, Tween 20, akrilamid/bisakrilamid (30% w/v), N,N,N',N'-tetrametiletlen-1,2-diamin (TEMED) (SERVA, Heidelberg, Nemačka), akridin oranž (Sigma-Aldrich), propidijum jodid (PI; BD Pharmingen, San Diego, SAD), ApoStat (R&D Systems, Minneapolis, SAD), albumin iz seruma govečeta (engl. *bovine serum albumin, BSA*), RNaza, dimetilsulfoksid (DMSO), kristal violet, etanol, glicerol (Zorka, Šabac, Srbija), tertrabutil amonijum hidrogen fosfat, fenil-metil-sulfonil-fluorid (PMSF), natrijum ortovanadat, natrijum fluorid, koktel inhibitora proteaza, NP-40, natrijum dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate, SDS*), bromfenol plavo, amonijumpersulfat, glicin, *Coomassie Brilliant Blue G-250*, odmašćeno mleko u prahu (Carl Roth, Karlsruhe, Nemačka), farmakološki aktivatori AMPK: 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonukleotid (AICAR) ili N,N-dimetilimidodikarbonimidični diamid hidrohlorid (metformin) (oba od Tocris Bioscience, Bristol, Velika Britanija), inhibitor autofagije bafilomicin A1, oligomicin A,  $\alpha$ -metil-DL-tirozin i askorbinska kiselina (sve od Sigma, St. Louis, MO), zečja antitela protiv fosforilisanih i totalnih formi Src, Akt, AMPK, LKB1, Raptor, LC3,  $\beta$ -aktina, alfa-sinukleina (ASYN) (sve od Cell Signaling Technology, Danvers, SAD), kozji anti-zečji IgG konjugovan sa

peroksidazom rena (Jackson IP Laboratories, West Grove, PA) i komercijalni kit za određivanje unutarćelijskog ATP-a (ATP Bioluminescence Assay Kit HS II) (Roche Applied Science, Penzberg, Nemačka).

Za odlepljivanje adherentnih ćelija od podloge je korišćen 0.25 % rastvor tripsina u PBS-u (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4), uz dodatak 0.02 % EDTA. Za brojanje ćelija je korišćen 0.1 % rastvor boje Tripan plavog u PBS-u.

Vreme inkubacije i koncentracije navedenih agenasa je napomenuto na slikama ili legendama slika.

### 3.2. ĆELIJSKE KULTURE I TRETMANI

Za potrebe ovog istraživanja, korišćena je komercijalna SH-SY5Y ćelijska linija humanog neuroblastoma nabavljena od Evropske kolekcije ćelijskih kultura (*European Collection of Animal Cells (ECACC)*, Velika Britanija). Izabrana ćelijska linija pokazuje veliku sličnost sa dopaminergičkim neuronima – eksprimiraju brojne neuronske markere (tirozin-hidroksilaza, dopamin-β hidroksilaza, dopaminski transporter i dopaminski D2 receptori) karakteristične za dopaminske neurone (Xie i sar., 2010; Ciccarone i sar., 1989; Deslauriers i sar., 2011), ali i neurofilamentne proteine, opioidne, muskarinske i receptore za faktore rasta nerava (Ciccarone i sar., 1989), zbog čega se smatra odgovarajućim modelom za PB *in vitro*. Šta više, tretiranje SH-SY5Y ćelija *all trans* retinoičnom kiselinom (RA) može dovesti do diferencijacije ćelija u holinergički neuronski fenotip i povećati osetljivost ćelija na neurotoksine i neuroprotektivne agense (Xie i sar., 2010).

Medijum za gajenje SH-SY5Y ćelija je bio kombinovani MEM/Ham F12 (1:1) obogaćen sa 10 % FCS, 2 mM L-glutaminom, rastvorom neesencijalnih aminokiselina i 0.25 µg/ml amfotericina B. Po dostizanju konfluentnosti od 80 %, SH-SY5Y ćelije su blago tripsinizirane, centrifugirane i korišćene za eksperimente.

### **3.2.1. Transfekovane ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y koje prekomerno sintetišu alfa-sinuklein**

Originalne SH-SY5Y ćelije, dobijene od profesora *Darryl Yamashiro* (Department of Pediatrics, Columbia University, New York), korišćene su za dobijanje stabilne ćelijske linije koja kontrolisano prekomerno produkuje ASYN. Ove ćelije su transfekovane plazmidskom DNK koja kodira nemutiranu formu ASYN (*wild type*, *wt* ASYN) ( $\alpha$ -syn ćelije), dok su, kao kontrola, SH-SY5Y ćelije transfekovane genom koji kodira beta-galaktozidazu ( $\beta$ -gal ćelije). Beta-galaktozidaza je “indiferentan” protein za humane ćelije, pa njegovo nagomilavanje ne bi trebalo da bude citotoksično, stoga su ćelije koje prekomerno produkuju beta-galaktozidazu smatrane kontrolno transfekovanim ćelijama. Transfekcija je vršena pomoću Lipofektamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA), po protokolu koji je ranije opisan (Vekrellis i sar., 2009). Selekcija transfekovanih ćelija vršena je dodavanjem antibiotika geneticina (G418, 250  $\mu$ g/mL) i higromicina B (50  $\mu$ g/mL) jednom u sedam dana (oba od Calbiochem, San Diego, CA). Ćelije su gajene i zamrzavane u prisustvu doksiciklina (DOX, 1  $\mu$ g/ml). Prekomerna ekspresija alfa-sinukleina (ASYN) je kontrolisana kultivisanjem ćelija u prisustvu ( $\alpha$ -syn+ ćelije) ili odsustvu ( $\alpha$ -syn- ćelije) doksiciklina (DOX, 1  $\mu$ g/ml), u trajanju od 7 dana. Ovako pripremljene ćelije su dobijene ljubaznošću profesora Leonidas Stefanis, Medicinski fakultet Univerziteta u Atini, Grčka.

Ćelije su gajene u inkubatoru u vlažnoj atmosferi sa 5 % CO<sub>2</sub>, na temperaturi od 37 °C, u HEPES-om (20 mM) puferizovanom medijumu RPMI 1640 sa 10 % fetalnog goveđeg seruma, 2 mM L-glutamina i 1 % rastvora antibiotik/antimikotik (sve od PAA, Pasching, Austrija).

Po odmrzavanju iz tečnog azota, ćelije su zasejane u Petrijevим šoljama 100 x 20 mm. Po dostizanju konfluentnosti od 70-80 %, ćelije su odlepljivane pipetiranjem i korišćene u eksperimentima. Za potrebe eksperimenata ćelije su kultivisane: u pločama sa 96 bunara (2 x 10<sup>4</sup> ćelija po bunaru), u cilju ispitivanja vijabiliteta; u pločama sa 6 bunara (15 x 10<sup>4</sup> ćelija po bunaru) za ispitivanje broja

živih/mrtvih ćelija Tripan plavim, za analize na protočnom citofluorimetru, za određivanje sadržaja unutarćelijskog ATP i za transfekciju ćelija malom ukosničastom RNK (engl. *short hairpin RNA*, *shRNA*); u Petrijevim šoljama ( $1 \times 10^6$  ćelija po šolji) za imunoblot analize, ispitivanje genske ekspresije i transmisionu elektronsku mikroskopiju. Ćelije humanog neuroblastoma (SH-SY5Y) su diferentovane u neuronski fenotip pomoću *all trans* retinoične kiseline (RA) u koncentraciji 20  $\mu\text{M}$  u trajanju od 2, 4 i 6 dana. Svakih 48 sati ćelijama je zamenjen medijum sa ili bez RA-e. Nakon zasejavanja, ćelije su sledećeg dana tretirane farmakološkim aktivatorima AMPK: 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonukleotid (AICAR) ili N,N-dimetilimidodikarbonimid diamid hidrohlorid (metformin) (oba od Tocris Bioscience, Bristol, Velika Britanija), kao što je opisano u rezultatima i legendama grafikona. Na isti način su ćelije tretirane i ostalim jedinjenjima korišćenim za potrebe istraživanja: oligomicin A,  $\alpha$ -metil-DL-tirozin i askorbinska kiselina (sve od Sigma, St. Louis, MO). Štok rastvori ovih jedinjenja su pravljani prema uputstvu proizvođača. Ploče sa bunarima i Petrijeve šolje su nabavljene od Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka.

### **3.2.2. Tansfekovani primarni neuroni izolovani iz kore velikog mozga pacova koji prekomerno sintetišu alfa-sinuklein**

Ćelijska kultura pacovskih kortikalnih neurona E18 je dobijena i kultivisana na način kako je ranije opisano (Vogiatzi i sar., 2008). Ćelije su gajene u Petrijevim šoljama presvučenim poli-D-lizinom prosečne gustine od  $1.5 - 2 \times 10^5$  ćelija po  $\text{cm}^2$ , u inkubatoru u vlažnoj atmosferi sa 5 %  $\text{CO}_2$ , na temperaturi od 37 °C. Za kultivaciju ćelija korišćen je Neurobazalni medijum sa B27 suplementom (Invitrogen, Carlsbad, CA), sa 0.5 mM L-glutaminom i 1 % rastvora antibiotik/antimikotik (penicilin/streptomycin) (sve od PAA, Pasching, Austrija).

cDNK koja kodira nemutirani tip alfa-sinukleina (*wt* ASYN) i protein koji fluorescira zeleno (engl. *Enhanced Green Fluorescent Protein*, *EGFP*) su klonirane u modifikovanu verziju PENTR.GD vektora i ubačene u pAd/PL-DEST *Gateway*

vektor (Invitrogen, Carlsbad, CA). Druge generacije E1, E3, i E2a izbrisanog rekombinantnog humanog serotipa 5 adenovirusa (rAd) su dobijene na način kako je ranije opisano (Xilouri i sar., 2012). Dobijeni su sledeći titri virusa, izraženi kao viralne čestice (vč)/ $\mu\text{L}$ :  $2.8 \times 10^8$  vč/ $\mu\text{L}$  za rAd-ASYN i  $1.43 \times 10^9$  vč/ $\mu\text{L}$  za rAd-EGFP. Za virusnu transfekciju, adenovirusi su dodati primarnim kortikalnim neuronima u kulturi (MOI 100) 5-tog dana od zasejavanja. Lizati transfekovanih primarnih kortikalnih neurona pacova koji prekomerno produkuju ASYN su dobijeni ljubaznošću profesora Leonidas Stefanis, Medicinski fakultet Univerziteta u Atini, Grčka.

### 3.2.3. Čelije feohromocitoma pacova PC12

Za potrebe ovog istraživanja korišćena je i ćelijska linija feohromocitoma pacova PC12, koja se takođe često koristi kao *in vitro* model PB. Naime, PC12 ćelije poseduju vezikule bogate kateholamina, posebno dopaminom, sposobnost sekrecije ovih vezikula, aktivan enzim tirozin hidroksilazu i mogućnost diferencijacije u dopaminergičke neurone (Greene i sar., 1977).

Ćelije pacovskog feohromocitoma PC12 su gajene u inkubatoru u vlažnoj atmosferi sa 5 %  $\text{CO}_2$ , na temperaturi od 37 °C, u DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; GIBCO, Paisley, Velika Britanija) medijumu obogaćenom glukozom u visokim koncentracijama, a kom su dodati 10 % konjski serum i 5 % FetalClone III serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), kao i 1 % rastvor antibiotik/antimikotik (penicilin/streptomycin) (sve od PAA, Pasching, Austrija).

Po odmrzavanju ćelije su iz tečnog azota propagirane u Petrijevim šoljama 100 x 20 mm. Po dostizanju konfluentnosti, ćelije su odlepljivane pipetiranjem i korišćene u eksperimentima. Za potrebe eksperimenata ćelije su kultivisane: u ploče sa 96 bunara ( $2 \times 10^4$  ćelija po bunaru), u cilju ispitivanja vijabiliteta; ćelije su sadene u gustini od  $2 \times 10^6$  ćelija u Petrijeve šolje od 60 mm, za imunoblot analize i tretirane kao što je opisano u Rezultatima i legendama grafikona. Čelije feohromocitoma pacova PC12 su dobijene ljubaznošću dr Andrijane Klajn, Institut za molekularnu genetiku i genetski inženjering, Univerzitet u Beogradu.

### 3.2.4. Vanćelijski alfa-sinuklein

Ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y koje prekomerno proizvode ASYN ( $\alpha$ -syn ćelije), su gajene u Petrijevim šoljama od 60 mm, u standardnom RPMI 1640 medijumu sa 10 % fetalnog seruma govečeta (engl. *fetal bovine serum*, *FBS*), u prisustvu ( $\alpha$ -syn<sup>+</sup> ćelije) i odsustvu ( $\alpha$ -syn<sup>-</sup> ćelije) doksiciklina (DOX). Taj medijum je zamenjen svežim medijumom koji je sadržao 10 % ili 2 % FBS (tzv. “gladni” medijum). Nakon 48 sati, medijumi su sakupljeni (engl. *conditioned medium*, *CM*), centrifugirani na 4000 g, u trajanju od 10 min, na 4 °C, da bi se otklonio ćelijski debris kao što je ranije opisano (Emmanouilidou i sar., 2010). “Gladni” medijum, koji je sadržao 2 % FBS je vraćen na 10 % FBS i dalje korišćen u eksperimentima kao izvor vanćelijskog ASYN. Da bi se potvrdilo prisustvo sekretovanog ASYN u medijumu, korišćena je metoda liofilizacije medijuma do suve mase (CHRIST, Alpha 2-4 LD plus, pritisak 0.0089 mbar, temperatura 65 °C), i imunoblot analiza dobijenog liofilizata.

### 3.2.5. Modifikovani oblici rekombinantnog alfa-sinukleina

S obzirom da se zna da su u uzorcima mozgova dobijenim nakon smrti obolelih od PB detektovani proteinski agregati u kojima se nalaze modifikovane forme ASYN (fosforilisane, oksidovane, nitrozilirane i dopaminom izmenjene forme ASYN) (Volles i sar., 2003; Paxinou i sar., 2001; Smith i sar., 2005; McFarlane i sar., 2005), za potrebe ovog istraživanja korišćene su modifikovane forme rekombinantnog ASYN: monomerni ASYN (m-ASYN), oligomerni ASYN (o-ASYN), nitrozilirani ASYN (n-ASYN) i dopaminom izmenjen oblik rekombinantnog *wt* ASYN (DA-ASYN).

Naime, m-ASYN rekombinantni *wt* ASYN je dobijen fuzijom GST-ASYN konstrukta sa pGEX-4T1 vektorom, a potom je taj vektor inkorporiran u bakteriju *E.coli* BL21. Transfekovane bakterije su gajene u medijumu sa 0.1 mg/ml ampicilina na 37 °C na šejkeru. Nakon protokola koji je detaljno opisan ranije (Conway i sar., 2001), rekombinantni ASYN je sakupljen centrifugiranjem na 500 g

tokom 8 minuta na 4 °C. Čistoća proteina (> 95 %) je proveravana pomoću HPLC-a. Oligomerni oblik ASYN (o-ASYN) je dobijen agregacijom m-ASYN *in vitro*. Naime, u uzorak od 100 µM ASYN je dodato nekoliko kapi mineralnog ulja, da bi se sprečilo isparavanje uzorka, a potom su polipropilenske epruvete zaštićene parafilmom i inkubirane na 37 °C tokom 5 dana na šejkeru (800 rpm). Provera je vršena Tioflavin-S testom. Dopaminom izmenjen ASYN (DA-ASYN) je dobijen kao što je ranije opisano (Conway i sar., 2001). Najpre je ASYN inkubiran sa dopaminom u molarnom odnosu 1:7, nakon čega je usledila agregacija u trajanju od 24 sata na 37 °C. Nitrozilirani ASYN (n-ASYN) je dobijen 50 µl tetranitrometana (1 %) sa 500 µl rastvora ASYN u PBS (1 mg/ml), na način kako je ranije opisano (Cassina i sar., 2000). Nakon 10 minuta, dodato je još 50 µl 1 % tetranitrometana. Potom je posle 10 minuta dodata i urea (2 M), a zatim je vršena dijaliza cele smeše na pH 7.8 da bi se odstranili urea i tetranitrometan koji nisu stupili u reakciju. Uzorci su prikupljeni i stavljeni na -80 °C.

Formiranje dopaminski izmenjenih alfa-sinukleinskih protofibrila i nitroziliranog ASYN je potvrđeno pomoću oligomernog ASYN ELISA testa i imunoblotom. Modifikovani oblici rekombinantnih ASYN su dobijeni ljubaznošću dr Omar M.A. El-Agnaf, Medicinski fakultet, Univerzitet King Abdel Aziz, Jeddah, Saudijska Arabija.

### **3.3. ODREĐIVANJE BROJA I VIJABILNOSTI ĆELIJA**

Citotoksični uticaj ASYN na vijabilitet ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanih u neuronski fenotip određivan je kolorimetrijskom metodom zasnovanom na određivanju količine proteina živih adherentnih ćelija kristal violet testom. Za određivanje broja živih/mrtvih ćelija korišćeno je supravitalno bojenje Tripkan plavim, koja se zasniva na intaktnosti ćelijske membrane.

### 3.3.1. Kristal violet test

Kristal violet test omogućava određivanje relativnog broja adherentnih ćelija (Kaludjerovic i sar., 2005). Princip metode je da boja (kristal violet) vezuje za proteine živih ćelija, tako da intenzitet dobijene plave boje korelira sa brojem živih ćelija.

Nakon odgovarajućeg tretmana ćelije u kulturi su ispirane sa PBS da bi se odstranile ćelije koje se nisu zalepile za podlogu. Preostale žive adherentne ćelije su fiksirane metanolom 10 minuta na sobnoj temperaturi (50  $\mu$ L metanola po svakom bunaru, u mikrotitarskim pločama sa 96 bunara), a potom i bojenje tako fiksiranih ćelija rastvorom kristal violet boje (1 % u PBS-u) u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi (50  $\mu$ L rastvora boje po svakom bunaru, u mikrotitarskim pločama sa 96 bunara). Nakon toga bunari su intenzivno ispirani vodom, da bi se odstranila boja koju nisu primile fiksirane ćelije. Boja ugrađena u ćelije koja je zaostajala nakon ovakvog pranja rastvarana je 33 % rastvorom sirćetne kiseline (50  $\mu$ L rastvora sirćetne kiseline po svakom bunaru, u mikrotitarskim pločama sa 96 bunara), a intenzitet nastale boje određivan je merenjem apsorbance svetlosti od 570 nm na automatskom čitaču mikrotitarskih ploča. Izmerene apsorbance odgovarale su intenzitetu boje, a intenzitet boje broju adherentnih ćelija. Rezultati kristal violet testa su predstavljeni kao % vijabiliteta u odnosu na kontrolne kulture (vijabilitet arbitrarno postavljen na 100 %).

### 3.3.2. Tripan plavo test

Za određivanje broja živih/mrtvih ćelija korišćena je metoda bojenja Tripan plavim. Žive ćelije imaju intaktnu ćelijsku membranu zbog čega ova boja neće ući u njih pa će one ostati nebojene, dok će boja ući u mrtve ćelije sa izgubljenim integritetom ćelijske membrane.

Nakon kultivacije i tretmana ćelija, ukupan broj živih ćelija određivan je brojanjem pod mikroskopom u komori po *Bürker Türk*-u nakon bojenja sa

rastvorom boje tripan plavo (0.1 % rastvor boje u PBS-u). S obzirom se mrtve ćelije zbog narušene strukture membrane boje plavo, bilo ih je jednostavno razlikovati od živih, nebojenih ćelija. Rezultati su predstavljeni kao broj mrtvih ćelija (%) u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

### **3.4. ISPITIVANJE MORFOLOŠKIH KARAKTERISTIKA ĆELIJA**

#### **3.4.1. Fazno kontrastna mikroskopija**

Morfološke promene ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y koje prekomerno proizvode ASYN ( $\alpha$ -syn-), kao i kontrolno transfekovanih ćelija ( $\beta$ -gal i  $\alpha$ -syn+), analizirane su na Leica DCF320 mikroskopu pri čemu je izabrano uveličanje od 20x.

### **3.5. ANALIZA PARAMETARA ĆELIJSKE SMRTI METODOM PROTOČNE CITOFUORIMETRIJE**

Parametri ćelijske smrti su analizirani metodom protočne citofluorimetrije na aparatu FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Nemačka). Svaka analiza je obuhvatila 10 000 događaja tj. ćelija po pojedinačnom uzorku za tretmane koji su rađeni u duplikatu ili triplicatu. Dobijeni podaci su analizirani korišćenjem kompjuterskog programa BD Cell Quest Pro.

#### **3.5.1. Detekcija faza ćelijskog ciklusa i fragmentacije DNK**

Količina DNK u ćelijama je ispitivana protočnom citofluorimetrijom nakon fiksacije ćelija u etanolu i bojenja propidijum jodidom, po prethodno opisanom protokolu (Kludjeric i sar., 2005). Princip ove metode zasniva se na osobini PI da se umeće u dvolančani molekul nukleinskih kiselina i proizvodi crvenu fluorescenciju proporcionalnu sadržaju DNK u ćeliji. Ova metoda omogućava

razlikovanje faza ćelijskog ciklusa, G0/G1 faza rasta ćelija, S faza replikacije DNK, G2/M faza ćelijske deobe, a može se koristiti i za određivanje broja ćelija sa hipodiploidnim sadržajem DNK, odnosno fragmentisanom DNK u sub-G0 fazi, kao parametrom apoptoze. Naime, u kasnoj fazi apoptoze endonukleaze razgrađuju DNK u male fragmente veličine oko 180 baznih parova, koji se nakupljaju u ćeliji. Ovi oligomeri se mogu ukloniti fiksiranjem ćelija pomoću etanola i ispiranjem PBS-om, čime se smanjuje sadržaj DNK u ćeliji. S obzirom na sadržaj fragmentisane DNK, apoptotične ćelije se nakon bojenja sa PI i očitavanja crvene fluorescence na protočnom citofluorimetru distribuiraju ispred vijabilnih ćelija na histogramu formirajući zonu specifičnu za apoptozu koja se naziva sub-G0/G1 ili hipodiploidni region. Pošto se PI vezuje i za RNK neophodno je, tokom pripreme i bojenja ćelija, razgraditi RNK prisutnu u uzorku primenom RNAze.

Ukratko, po isteku tretmana, ćelije su skupljene i 2 puta oprane u 1 ml PBS i finalno resuspendovane u 300 µl PBS i 700 µl hladnog apsolutnog etanola. Sadržaj svake epruvete je zatim pažljivo resuspendovan, a epruvete ostavljene na +4 °C preko noći. Zatim su ćelije centrifugirane (800 g/5 minuta/22 °C), oprane 1x1 ml PBS, a talog ćelija je finalno resuspendovan u 300 µl PBS uz dodatak 0,1 % Triton X-100 i 1 mg/ml RNA-ze (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Po isteku 15 minuta inkubacije na 37 °C, u svaku epruvetu je dodavano 0.05 mg/ml PI. Nakon 30 minuta inkubacije na 37 °C, usledila je analiza na protočnom citometru. Ćelije sa hipodiploidnim sadržajem se na histogramu distribucije intenziteta FL2 fluorescence vide u sub-G0 segmentu, koji prethodi G0/G1 fazi ćelijskog ciklusa. Rezultati su izraženi kao % ćelija u sub-G0 fazi u odnosu na ukupan broj analiziranih ćelija.

### **3.5.2. Detekcija aktivacije kaspaza**

Aktivacija kaspaza, enzima odgovornih za pokretanje i izvršavanje apoptotskog mehanizma ćelijske smrti, ispitivana je na protočnom citofluorimetru nakon bojenja ćelija fluorescentno obeleženim pankaspaznim inhibitorom, koji se

specifično vezuje za aktivirane kaspaze, prema instrukcijama proizvođača (ApoStat; R&D Systems, Minneapolis, MN).

Nakon odgovarajućih tretmana ćelije su sakupljene, centrifugirane (500 g/5 minuta/22 °C) i oprane u PBS. Zatim je talog ćelija resuspendovan u 300 µl medijuma koji je sadržao 3 µl fluorescentno obeleženog (FITC) pan-kaspaznog inhibitora (finalna koncentracija 0.5 µg/ml, čitanje u FL1). Po isteku 30 minuta inkubacije na 37 °C, ćelije su oprane i finalno resuspendovane u 500 µl PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani u obliku histograma raspodele intenziteta FL1 fluorescence, i prikazani su kao % ćelija u kojima su aktivirane kaspaze.

### **3.5.3. Detekcija autofagije u ćelijama obojenim akridin oranžom**

Zakišeljavanje citoplazme kao pokazatelj porasta broja ili zapremine kiselih vezikula autofagolizozoma, analizirano je protočnom citofluorimetrijom nakon bojenja ćelija pH senzitivnom bojom akridin oranžom. Akridin oranž emituje narandžasto-crvenu fluorescencu (FL3) u kontaktu sa kiselim autofagolizozomima, dok na neutralnom pH kakav je u citoplazmi fluorescira zeleno (FL1).

Po isteku tretmana ćelije su oprane u PBS, i zatim inkubirane 30 min na 37 °C sa 1 µM bojom akridin-oranž (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Po isteku inkubacije ćelije su sakupljene, centrifugirane (500 g/5 min/22 °C), i talog ćelija je zatim resuspendovan u 500 µl PBS. Izračunavanjem relativnog odnosa intenziteta narandžasto-crvene i zelene fluorescence (FL3/FL1) prema njihovom odnosu u kontrolnim ćelijama (arbitrarno uzet za jedan) procenjuje se, primenom protočne citofluorimetrije, da li je došlo do zakišeljavanja citoplazme, odnosno autofagije.

### 3.6. IMUNOBLOT ANALIZE

Tehnika imunoblota (Western blot) je metoda koja služi za analizu aktivnosti i ekspresije proteina u uzorku, a zasniva se na elektroforetskom razdvajanju proteina i njihovoj detekciji zasnovanoj na antigen-antitelo reakciji.

Neposredno po završetku inkubacije ćelije su lizirane na ledu u sveže pripremljenom puferu za lizu ćelija uz dodatak inhibitora proteaza i fosfataza (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1mM PMSF, 20 µl/ml koktela proteaznih inhibitora, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> i 50 mM NaF). Potpuno razaranje ćelija je postignuto inkubacijom ćelijske suspenzije 15 minuta na ledu, uz povremeno snažno mešanje na vorteksu. Lizati su zatim centrifugirani na 14000 g, 20 minuta (4 °C), a supernatanti, koji su predstavljali ukupan ćelijski ekstrakt, su čuvani na -20 °C do upotrebe.

#### 3.6.1. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima

Koncentracija ukupnih proteina u lizatima ćelija koje su pripremane za imunoblot analizu određivana je metodom po *Bradford*-u (Bradford i sar., 1976). Princip ove metode je da se proteini u kiseloj sredini vezuju za boju Coomassie Brilliant Blue G-250 i prevode je u anjonski oblik, tako da se pomera apsorbanca boje iz crvene u plavu oblast vidljivog spektra. Intenzitet dobijene plave boje je direktno proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku.

Test je izvođen mešanjem 2 ml Bradfordovog reagensa (0.1 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G-250, 5 % etanol, 10 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> u vodi) sa 2 µl uzorka (1:1000 razblaženje proteina). Apsorbanca je očitavana na čitaču za mikrotitarske ploče na 570 nm. Intenzitet dobijene plave boje je proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku, pri čemu je koncentracija proteina u uzorcima određena na osnovu standardne krive. Standardna kriva je konstruisana nakon očitavanja apsorbanca standardnih rastvora albumina iz seruma govečeta (engl. *bovine serum albumin*, *BSA*) u koncentracijama: 5, 10, 15 i 20 mg/ml sa bojom.

### 3.6.2. Elektroforeza i transfer

Uzorci za elektroforezu su pripremljeni kuvanjem (5 min, 100 °C) određene zapremine ukupnog ćelijskog ekstrakta sa odgovarajućom zapreminom redukujućeg pufera za pripremu uzorka (finalne koncentracije sastojaka pufera nakon kuvanja uzorka su bile: 2 % SDS, 10 % glicerol, 2 mM 2-merkaptoetanol, 0.002 % bromfenol plavo, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8). U ovom koraku proteini su denaturisani i obloženi negativno naelektrisanim SDS molekulima. Dodatkom 2-merkaptoetanela u pufer sprečeno je formiranje disulfidnih veza u denaturisanim proteinima. Zahvaljujući SDS-u svi proteini u uzorku postali su negativno naelektrisani i razlikovali su se međusobno samo po molekulskim masama.

Proteini iz skuvanih uzoraka su zatim razdvojeni na osnovu razlika u molekulskim masama elektroforezom u 10 % (za analizu Akt, Src, LKB1, AMPK, Raptor proteina i  $\beta$ -aktina) ili 12 % (za analizu ASYN i LC3 proteina) poliakrilamidnom gelu. U bunare su sipane jednake količine proteina (od 5  $\mu$ g do 20  $\mu$ g, zavisno od analiziranog proteina). Uzorci su nanošeni na gel za sabijanje proteina (4 % akrilamid/0.14 % bisakrilamid, 0.1 % SDS, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8), koji je prethodno naslojen na gel za razdvajanje proteina (10 % akrilamid/0.34 % bisakrilamid ili 12 % akrilamid/0.41 % bisakrilamid, 0.1 % SDS, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8). Kao katalizatori polimerizacije gelova korišćeni su 0.05 % amonijumpersulfat i 0.033 % TEMED. Pufer za rezervoare u kojem je tekla elektroforeza se sastojao od 192 mM glicina, 0.1 % SDS i 25 mM Tris-HCl, pH 8.3. Elektroforetsko razdvajanje je trajalo oko 90 min pri konstantnom naponu. Prvih 20 minuta primenjivan je konstantni napon od 100 V, a nakon prolaska uzoraka kroz gel za sabijanje proteina, napon je povećan na 150 V. Uzorci su putovali kroz gel do izlaska fronta boje bromfenol plavo sa gela. U cilju određivanja molekulskih težina na svaki gel je naneta i smeša referentnih proteina poznatih molekulskih masa (10 - 250 kDa, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; BioRad, Marnes-la-Coquette, Francuska).

Po završetku elektroforeze izvršen je transfer proteina sa gela na nitrocelulozne membrane (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francuska) pomoću

aparature za polusubi transfer (TE 70 Semi-dry transfer unit, Amersham Biosciences). Nitrocelulozne membrane su inkubirane 1-2 minuta u puferu za transfer (192 mM glicin, 20 % metanol i 25 mM Tris-HCl, pH 8.3) i postavljene u aparaturu na visoko adsorbujući filter papir, koji je prethodno natopljen transfer puferom. Gelovi su isprani malom količinom istog pufera i postavljeni pažljivo na membrane, a preko gela je smešten još jedan sloj visoko adsorbujućeg filter papira natopljenog puferom. Membrana je bila okrenuta ka pozitivnoj, a gel ka negativnoj elektrodi čime je omogućeno da pod dejstvom struje konstantne jačine ( $0.8 \text{ mA/cm}^2$  membrane) negativno naelektrisani proteini putuju sa gela ka pozitivnoj elektrodi. Na putu ka anodi proteini su zaustavljani od strane membrane, koja ih je vezivala za sebe. Transfer se odvijao na sobnoj temperaturi i trajao je ukupno 90 minuta.

### **3.6.3. Imunoblot i detekcija proteina**

Po završetku transfera delovi membrane sa proteinima od interesa su inkubirani 60 min na sobnoj temperaturi u 5 % rastvoru odmašćenog mleka u Tris puferu (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.6) sa 0.05 % Tween 20 deterdženta (u kasnijem tekstu TBST). Na taj način su blokirana nespecifična mesta vezivanja proteina na membranama. Nakon blokiranja preko noći membrane su inkubirane na  $+4^\circ\text{C}$  uz blago mešanje sa primarnim zečjim antitelima na ASYN (1:2000), LC3-II (1:900), fosfo-Src (pSrc, 1:1000), Src (1:1000), fosfo-Akt (pAkt, 1:1000), Akt (1:1000), fosfo-AMPK (pAMPK, 1:1000), AMPK (1:1000), fosfo-Raptor (p-Raptor, 1:1000), Raptor (1:1000), fosfo-LKB1 (pLKB1, 1:1000), LKB1 (1:1000),  $\beta$ -aktin (1:2000) (sve od Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Nakon 3 ispiranja u TBST-u, membrane su inkubirane na sobnoj temperaturi 75 minuta sa HRP obeleženim anti-zečjim IgG antitelom (1:5000; od Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, SAD). Po isteku inkubacije membrane su ponovo isprane 3 puta u TBST-u i prelivane 3 minuta sa supstratom za peroksidazu rena (ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). U ovom koraku peroksidaza, koja je vezana za sekundarno antitelo, je razgrađivala  $\text{H}_2\text{O}_2$  iz supstrata do kiseonika i vode. Kiseonik je reagovao sa luminolom iz supstrata uz nastanak 3-aminoftalata,

koji je emitovao foton. Nastala svetlost je zabeležena na rendgenskom filmu (Hyperfilm™ ECL; GE Healthcare), a intenzitet hemiluminiscence je bio direktno proporcionalan količini proteina vezanog za membranu. Nakon razvijanja filma, ekspresija proteina kvantifikovana je denzitometrijom pomoću ImageJ softvera i izražena relativno deljenjem gustine trake fosforilisane forme u odnosu na gustinu trake  $\beta$ -aktina (ASYN i LC3-II) ili u odnosu na odgovarajuću gustinu trake totalne forme proteina (AMPK, Raptor, LKB1, Src, Akt). Rezultati su predstavljeni u odnosu na kontrolu kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost jedinice.

### **3.7. ULTRASTRUKTURNA ANALIZA ĆELIJA**

#### **3.7.1. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)**

Cilj analize ćelija transmisionom elektronskom mikroskopijom bio je da se pokažu eventualne ultrastrukturne promene i prisustvo vakuola, koje nastaju usled toksičnog dejstva ASYN tj. njegovog nagomilavanja u ćelijama sa neuronskim fenotipom.

Ćelije su sađene u Petrijeve šolje i diferentovane u neuronski fenotip pomoću RA u trajanju od 2, 4 i 6 dana. Po isteku inkubacije ćelije su sakupljene, prebačene u odgovarajuće epruvete i centrifugirane (500 g/10 minuta/22 °C), a zatim oprane sa 1 ml PBS 3 puta. Poslednje pranje ćelija bilo je na manjoj brzini (200 g/10 minuta/22 °C) i nakon toga su fiksirane 2.5 % glutaraldehidom. Zatim su ispirane u kakodilatnom puferu 30 minuta. Sledeći korak u obradi ćelija je fiksiranje u 1 %-om rastvoru osmijum-tetroksida sat vremena. Ćelije se opet ispiraju kakodilatnim puferom, a potom se vrši kontrastiranje u 0.5 % vodenom rastvoru uranil-acetata, preko noći, na 4 °C. Nakon toga je vršena dehidratacija taloga kroz seriju rastućih koncentracija alkohola (etanol – 50 %, 70 %, 90 %, 100 %). Talozi u uzorcima su potom prožimani smolom na sobnoj temperaturi kroz dve različite mešavine propilen-oksida i EPON 812 smole (1:1, 1:3). Nakon kalupljenja u plastične kalupe, materijal je sušen 24 h u sušnici na 60 °C. Kada je kalup bio gotov, izvadio se iz ependorfice, i sekao se na ultramikrotomu. Prvo se pravi semi-tanki isečak koji se

boji toluidin-plavim i na njemu se bira deo koji će biti sečen za ultratanke isečke. Zatim se ultratanki isečki hvataju na bakarne mrežice i kontrastiraju uranil acetatom i olovo citratom, i analiziraju elektronskim mikroskopom (Morgagni 268D, FEI, Hillsboro, SAD).

### **3.8. ANALIZA EKSPRESIJE GENA**

#### **3.8.1. Izolacija iRNK**

Da bi se iz ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y koje prekomerno produkuju ASYN ( $\alpha$ -syn- ćelije) izolovala RNK tumorske ćelije su lizirane RNA Isolator-om (Invitrogen, Paisley, Velika Britanija). Iz kultura je odlivan supernatant, a ćelije prelivane sa 250  $\mu$ L izolatora u kome su resuspendovane provlačenjem nekoliko puta kroz nastavak pipete. Dobijeni ćelijski lizati skupljani su u plastične epruvete (1.5 ml), a nakon 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi dodavano im je po 50  $\mu$ L hloroforma. Nakon intenzivnog vorteksiranja uzorci su inkubirani 10 minuta na +4 °C, a zatim centrifugirani 15 minuta na 12000 g na + 4 °C. Nakon centrifugiranja jasno su se izdvajale gornja vodena faza koja je sadržavala RNK, donja hloroformska faza sa proteinima i lipidima, i intermedijarna faza sa DNK. Vodena faza je skupljana u plastične epruvete, a zatim joj je dodat izopropanol u odnosu 1:1. Nakon mešanja sadržaja epruveta, ćelije su inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirane 15 minuta na 12000 g na + 4 °C. Posle centrifugiranja na dnu epruveta izdvojio se talog RNK. Supernatant je odlivan, a talog opran dva puta po 5 minuta na 7500 g u 1 ml 70 % etanola. Nakon odlivanja etanola, pipetom je skupljan preostali etanol. Talog RNK sušen je oko 5 minuta (dok ne ispari sav etanol), i konačno rastvaran u 20  $\mu$ L destilovane vode.

#### **3.8.2. Reverzna transkripcija**

Nakon merenja RNK koncentracije na Gene Quant kolorimetru 1  $\mu$ g RNK rastvaran je u 15  $\mu$ L vode sa 0.2  $\mu$ g nasumičnih prajmera (Fermentas, Vilnius, Litvanija) i dNTP (Fermentas, Vilnius, Litvanija) u finalnoj koncentraciji 1 mM. Kao

kontrola za eventualnu kontaminaciju umesto RNK korišćena je voda. Rastvori su inkubirani 10 minuta na 70 °C pri čemu su se heksameri nasumično vezivali za RNK, posle čega su uzorci stavljeni 5 minuta na led. Nakon toga u uzorke je dodavano po 4 µl pufera za reverznu transkripciju (5 x First Strand Buffer, Fermentas, Vilnius, Litvanija) i 1 µl (200 U/µl, Fermentas, Vilnius, Litvanija) M-MuLV reverzne transkriptaze, a zatim su uzorci inkubirani 10 minuta na 25 °C, pa 60 minuta na temperaturi 42 °C na kojoj se odigravala reakcija reverzne transkripcije. Reakcija je prekinuta inkubacijom uzoraka na 70 °C u trajanju od 10 minuta. Na ovaj način dobijana je cDNK koja je u rastvorenom stanju čuvana na + 4 °C do upotrebe u reakciji lančanog umnožavanja.

### **3.8.3. Reakcija lančanog umnožavanja sa detekcijom produkata u realnom vremenu (*real time polymerase chain reaction, qRT-PCR*)**

*Real-time* RT-PCR je rađen na aparatu ABI Prism 7500 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). Reakcije su pripremane prema standardnom protokolu za Realplex<sup>2</sup>Mastercycler u jednom koraku (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) koristeći TaqMan Master Mix, kao i komercijalno dostupne prajmere i probe (TaqMan) za Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-zavisnu protein kinazu-β (CaMKKβ), protein fosfatazu 2A (PP2A), sestrin 1, sestrin 2 i β2 mikroglobulin (Invitrogen, Carlsbad, CA). Inicijalni korak qRT-PCR je podrazumevao inkubaciju uzorka tokom 2 minuta na 50 °C i bio je praćen zadržavanjem uzorka na 9 °C u trajanju od 10 minuta. Celokupnu reakciju je činilo 40 ciklusa od kojih se svaki sastojao od 15 sekundi topljenja na 95 °C, za kojim je sledio 1 minut vezivanja prajmera za DNK i sinteze DNK lanaca na 60 °C. Završni korak predstavljala je inkubacija uzorka na 60 °C u trajanju od 1 minuta. Sve reakcije su rađene u triplicatu. Prag analize ciklusa (engl. *cycle of threshold, Ct*) je bio podešen na 0.1 relativnih fluorescentnih jedinica. Prosečne Ct vrednosti kontrolnih triplikata (β2 mikroglobulin) su oduzete od prosečnih Ct vrednosti triplikata gena od interesa i na taj način je dobijen ΔCt, dok je relativna ekspresija gena izražena kao 2-ΔCt. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti ΔCt u odnosu na kontrolu, koja je arbitrarno podešena na 1.

### 3.9. ODREĐIVANJE UNUTARĆELIJSKOG SADRŽAJA ADENOZIN TRIFOSFATA (ATP)

Određivanje sadržaja unutarćelijskog ATP u uslovima prekomerne produkcije ASYN vršeno je korišćenjem komercijalnog seta reagenasa (ATP Bioluminescence Assay Kit HS II) (Roche Applied Science, Penzberg, Nemačka), detekcijom promene hemiluminiscence, a po uputstvima proizvođača. Princip testa se zasniva na reakciji D-luciferina sa ATP, u prisustvu kiseonika ( $O_2$ ), koju katališe enzim luciferaza (izolovana iz *Photinus pyralis* / Američkog svica), gde kao proizvodi nastaju oksiluciferin, AMP, ugljen dioksid ( $CO_2$ ) i svetlost ( $h\nu$ ). Maksimum emisije nastale zelene svetlosti se detektuje na 562 nm, i direktno je proporcionalan koncentraciji ATP u uzorku. Luminiscenca je merena pomoću automatskog čitača mikrotitarskih ploča (*Chameleon microplate reader*) (Hidex, Turku, Finland).

Ukratko, uzorci su pripremani u pločama sa 6 bunara ( $15 \times 10^4$  ćelija po bunaru) i ćelije su lizirane na ledu nakon 5-dnevne diferencijacije retinoičnom kiselinom. Koncentracija ATP-a u ćelijama je merena metodom hemiluminiscence, a izražen kao odnos koncentracije ATP-a u odnosu na koncentraciju proteina u ćelijama ( $[ATP]/[proteini]$ ). Koncentracija proteina određivana je metodom po *Bradford*-u, kao što je ranije opisano. Kao kontrola su korišćeni tretmani inhibitorima sinteze ATP, oligomicinom A ( $5 \mu M$ ) i rotenonom ( $0.2 \mu M$ ), u trajanju od 48 sati.

### 3.10. TRANSFEKCIJA ĆELIJA POMOĆU MALE UKOSNIČASTE RNK (*short hairpin RNA, shRNA*)

Da bi se smanjila ekspresija AMPK enzima u ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y primenjena je transfekcija primenom male ukosničaste RNK (engl. *small hairpin RNA, shRNA*).

SH-SY5Y ćelije su gajene u pločama sa 6 bunara u kombinovanom medijumu MEM/Ham F12 (1:1) obogaćenom sa 10 % FBS, 2 mM L-glutaminom, rastvorom neesencijalnih aminokiselina, bez antibiotika. Nakon 24 sata kada su ćelije bile 60 % konfluentne transfektovane su sa AMPK shRNA i kontrolnom shRNA koristeći reagens za transfekciju plazmidom i odgovarajući medijum (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), po uputstvima proizvođača.

Ukratko, 1  $\mu$ l shRNA plazmidske DNK je najpre razblaženo u 90  $\mu$ l medijuma za transfekciju sa redukovanim serumom, u odsustvu antibiotika (Rastvor A). Istovremeno je 1  $\mu$ l shRNA reagensa za transfekciju razblaženo sa medijumom za transfekciju sa redukovanim serumom u odsustvu antibiotika do finalne koncentracije 100  $\mu$ l (rastvor B). Zatim su rastvor A i rastvor B pažljivo pomešani u odnosu 1  $\mu$ l : 2  $\mu$ l, smeša je laganim pokretima pipetom resuspendovana, a potom inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi radi formiranja kompleksa između shRNA plazmidske DNK i shRNA reagensa za transfekciju. Ćelije su kultivisane u pločama sa 6 bunara ( $15 \times 10^4$  ćelija po bunaru), isprane su 2 puta sa 2ml medijuma za transfekciju (0.8 ml u svaki bunar), a potom je, u svaki bunar, sipano po 200  $\mu$ l smeše plazmidska DNK-reagens za transfekciju, kako je preporučeno od strane proizvođača. Ćelije su inkubirane 8 sati u inkubatoru u vlažnoj atmosferi sa 5 % CO<sub>2</sub>, na temperaturi od 37 °C, i nakon toga je medijum zamenjen sa regularnim medijumom za kultivaciju ćelija MEM/Ham F12 (1:1), koji je sadržao 10 % goveđeg seruma i 1 % rastvora antibiotik/antimikotik. Selekcija stabilno transfekovanih ćelija vršena je kultivisanjem ćelija u preporučenom medijumu koji je sadržao puromicin (10  $\mu$ g/ml).

Po isteku 24 sata od početka transfekcije ćelije su presađene u ploče sa 96 bunara, kao i u 60 mm Petrijeve šolje i ostavljene još 24 sata. Nakon toga ćelije su diferentovane pomoću RA (10  $\mu$ M) u trajanju od 6 dana, a potom je određivana ekspresija AMPK proteina (ukupne i fosforilisane forme proteina) imunoblot analizom, kao i vijabilitet tj. broj ćelija kristal violet testom.

### **3.11. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA**

Svi tretmani su urađeni u triplikatu. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti sa standardnim devijacijama ( $\pm$  SD) triplikata čeliskih kultura reprezentativnog eksperimenta. Za analizu statističke značajnosti razlike između rezultata dobijenih različitim tretmanima triplikata kultura korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) za više nezavisnih uzoraka, praćena Student-Newman-Keuls-ovim testom, uz odgovarajući post-hoc test za poređenje između grupa, odnosno Studentovim t-testom za dva nezavisna uzorka. Vrednost parametra p manja od 0.05 smatrana je statistički značajnom ( $p < 0.05$ ).

## 4. REZULTATI

### 4.1. UTICAJ PREKOMERNE SINTEZE ALFA-SINUKLEINA NA PREŽIVLJAVANJE ĆELIJA U KULTURI HUMANOG NEUROBLASTOMA SH-SY5Y

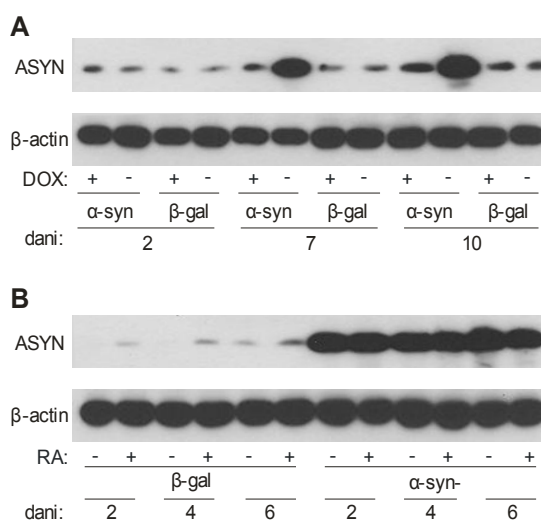
#### 4.1.1. Sinteza proteina alfa-sinukleina u kulturi transfekovanih ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y ( $\alpha$ -syn-, $\alpha$ -syn+ i $\beta$ -gal)

Za potrebe ovog istraživanja, korišćen je prethodno ustanovljen *in vitro* model sporadične forme PB (Vekrellis i sar., 2009), koji karakteriše prekomerna sinteza normalnog alfa-sinukleina (engl. *wild type*, wt ASYN). Naime, korišćena je komercijalna ćelijska linija humanog neuroblastoma SH-SY5Y, u koju je genetskom manipulacijom (transfekcijom) ubačen gen koji kodira alfa-sinuklein (ASYN), čiji je promotor pod kontrolom doksiciklina (DOX). Ekspresija gena koji kodira ASYN se ostvaruje uklanjanjem DOX iz medijuma u kojem ćelije rastu (u prisustvu DOX nema prekomerne ekspresije ASYN). Iako SH-SY5Y ćelije pokazuju brojne sličnosti sa dopaminergičkim neuronima, ćelije su diferentovane u neuronski fenotip pomoću *all trans* retinoične kiseline (RA), radi postizanja verodostojnosti modela.

U cilju potvrde uspešne transfekcije gena za ASYN kod SH-SY5Y neuroblastomskih ćelija, koje su gajene u vremenskom periodu od 2, 7 i 10 dana, u prisustvu i odsustvu DOX u medijumu, i povećana sinteza ASYN je potvrđena tehnikom imunoblota. Uočeno je vremenski zavisno povećanje produkcije ASYN kod  $\alpha$ -syn- ćelija, gajenih u odsustvu DOX. Naime, nakon 7 dana od uklanjanja DOX iz medijuma uočava se izrazit porast sinteze ASYN u odnosu na uslove kada gen nije aktivan (u prisustvu DOX), dok se nakon 10 dana nastavlja dalji trend povećanja u sintezi ASYN kod  $\alpha$ -syn- ćelija. Sa druge strane, kod ćelija gajenih u prisustvu DOX ( $\alpha$ -syn+), kao i kod kontrolno transfekovanih  $\beta$ -gal ćelija, ekspresija ASYN ostaje na bazalnom nivou, nezavisno od prisustva DOX (Slika 1 A). U skladu

sa dobijenim rezultatima, za dalja istraživanja su korišćene  $\alpha$ -syn- ćelije kao ćelije od interesa, kao i dve kontrolne grupe ćelija,  $\alpha$ -syn+ (gen za ASYN se ne eksprimira) i  $\beta$ -gal ćelije (transfekovane genom koji kodira protein koji nije od značaja).

Obrazac sinteze ASYN se nije značajno menjao ni nakon diferencijacije ćelija u neuronski fenotip primenom *all trans* retinoične kiseline (RA) u trajanju od 2, 4 i 6 dana, kako kod  $\alpha$ -syn- ćelija tako i kod kontrolnih  $\beta$ -gal ćelija (Slika 1 B). Ekspresija ASYN kod ćelija gajenih u prisustvu DOX ( $\alpha$ -syn+) tokom diferencijacije je bila slična kao kod kontrolnih  $\beta$ -gal ćelija (rezultati nisu prikazani zbog preglednosti). Kao kontrola ukupne koncentracije protein u uzorku, korišćen je  $\beta$ -aktin čiji jednaki nivoi u različitim uzorcima pokazuju da je na gelove nanošena jednaka količina proteina (Slika 1).

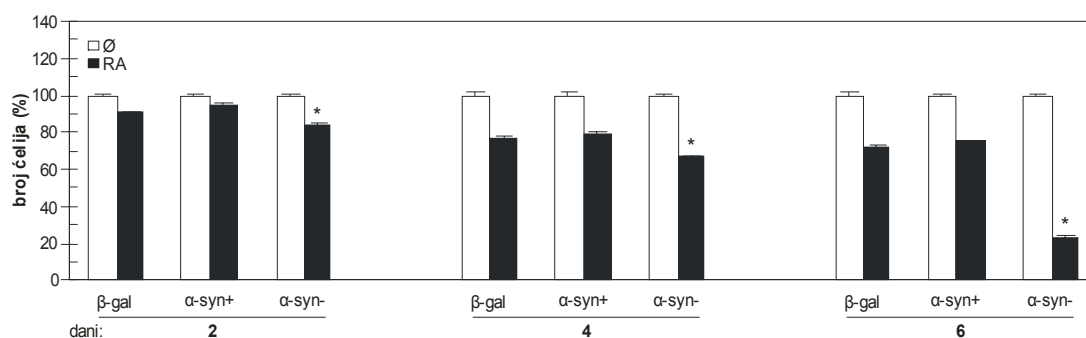


**Slika 1. Sinteza alfa-sinukleina (ASYN) kod  $\beta$ -gal,  $\alpha$ -syn+ i  $\alpha$ -syn- ćelija.** Transfekovane  $\alpha$ -syn i  $\beta$ -gal SH-SY5Y ćelije humanog neuroblastoma kultivisane su u prisustvu (+) ili odsustvu (-) doksiciklina (DOX) (1  $\mu$ g/ml), a imunoblot tehnikom je merena promena ekspresije gena za ASYN u različitim vremenskim intervalima (A). Potom su  $\beta$ -gal i  $\alpha$ -syn- ćelije tretirane *all trans* retinoičnom kiselinom RA (20  $\mu$ M) u različitim vremenskim intervalima, a imunoblotom je verifikovana promena ekspresije gena za ASYN (B).

#### **4.1.2. Prekomerna sinteza alfa-sinukleina u diferentovanim ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y dovodi do povećane citotoksičnosti**

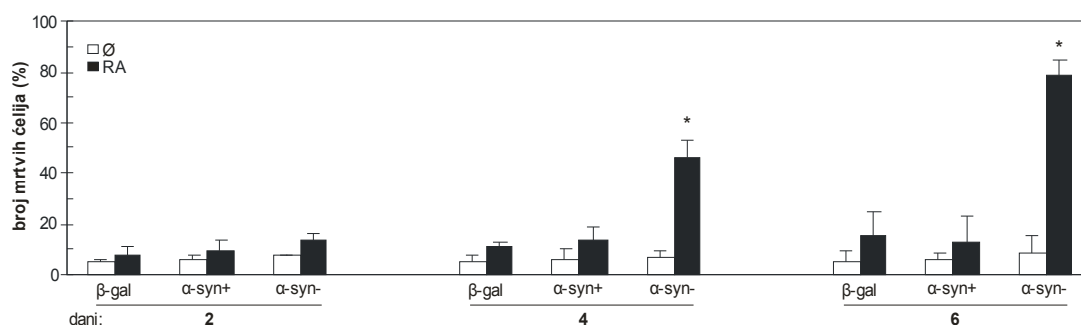
Na ovom eksperimentalnom modelu, prethodno je pokazano neurotoksično delovanje prekomernog nagomilavanja ASYN, gde se uočava da nakon diferencijacije ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y u neuronski fenotip pomoću RA, dolazi do porasta ćelijske smrti kod ćelija transfekovanih genom za ASYN (Vekrellis i sar., 2009).

Za potrebe ovog istraživanja, ćelije su, nakon uklanjanja DOX iz medijuma, kultivisane 7 dana, kako bi gen za ASYN postigao željenu ekspresiju. Potom su ćelije diferentovane pomoću RA, a nakon perioda od 2, 4 i 6 dana od početka diferencijacije, vršena je analiza ćelijskog vijabiliteta. S obzirom da je nivo proliferacije bio različit kod različitih grupa transfekovanih ćelija ( $\beta$ -gal >  $\alpha$ -syn+ >  $\alpha$ -syn-), radi boljeg poređenja, rezultati vijabiliteta su predstavljeni relativno u odnosu na odgovarajuće kontrolne (nediferentovane) ćelije, za koje se arbitrarno uzima da je vijabilitet 100 %. U skladu sa prethodnim rezultatima koji pokazuju da RA usporava rast i proliferaciju ćelija (Joshi i sar., 2006), pokazano je da postoji vremenski zavistan pad u broju diferentovanih ćelija, kako onih koje prekomerno proizvode ASYN ( $\alpha$ -syn-), tako i kontrolno transfekovanih ćelija ( $\alpha$ -syn+ i  $\beta$ -gal), u poređenju sa odgovarajućim nediferentovanim ćelijama primenom Kristal violet testa (Slika 2). Međutim, kod diferentovanih  $\alpha$ -syn- ćelija, vijabilitet je bio statistički značajno niži u poređenju sa diferentovanim kontrolnim ćelijama ( $\alpha$ -syn+ i  $\beta$ -gal ćelije) (Slika 2), što može biti posledica prekomerne sinteze i toksičnog delovanja ASYN. Naime, nakon 2 dana diferencijacije, vijabilitet  $\alpha$ -syn- ćelija iznosio je  $83.7 \pm 0.6 \%$ , posle 4 dana diferencijacije  $66.7 \pm 0.7 \%$ , a posle 6 dana diferencijacije svega  $23.2 \pm 0.3 \%$  ( $p < 0.05$ , u odnosu na nediferentovane ćelije za koje se arbitrarno uzima da im je vijabilitet 100 %).



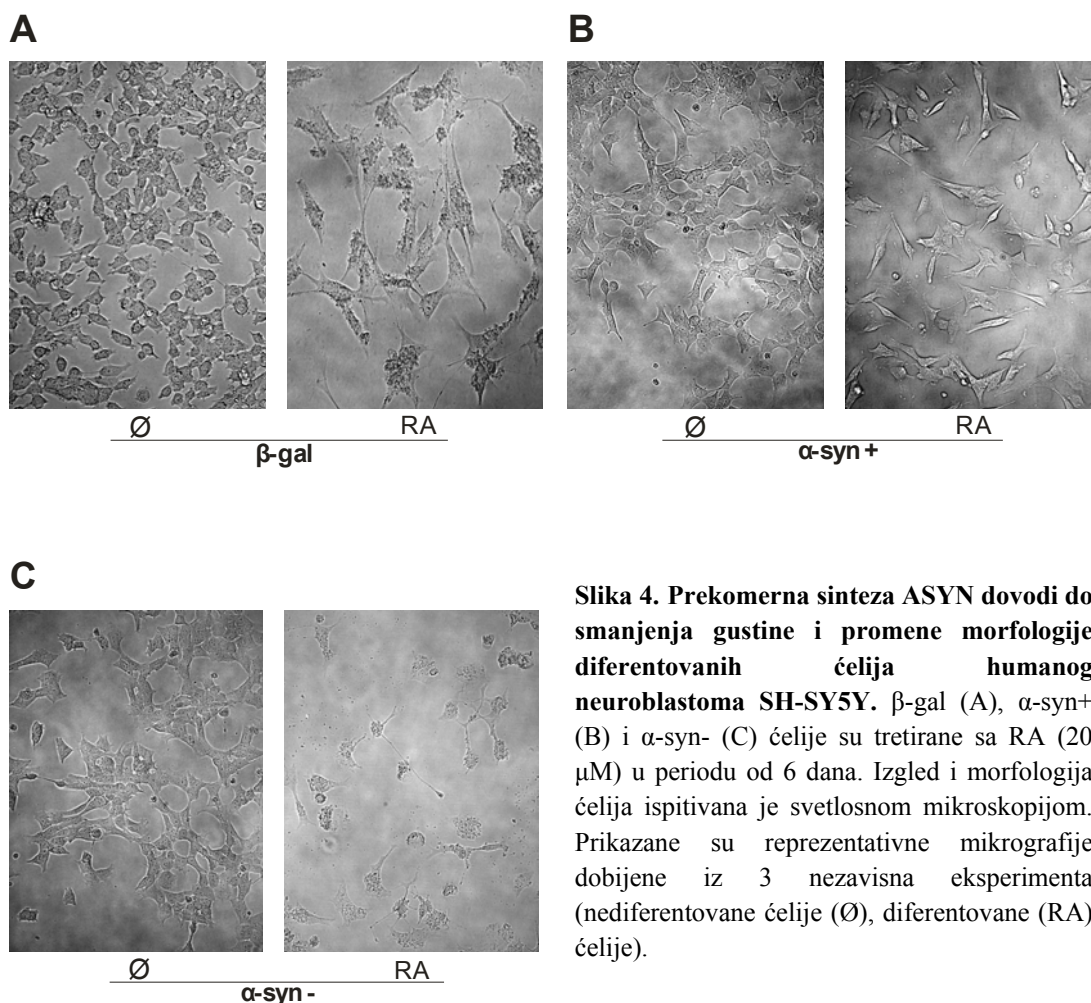
**Slika 2. Prekomerna sinteza ASYN dovodi do smanjenja broja ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanih u neuronski fenotip.** β-gal, α-syn+ i α-syn- ćelije su tretirane sa RA (20 μM) u periodu od 2, 4 i 6 dana. Ćelijski vijabilitet je ispitivan kristal violet testom. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost triplicate iz 3 reprezentativna uzorka ± S.D. (\*p < 0.05, nediferentovane ćelije (Ø) u poređenju sa diferentovanim (RA) ćelijama).

Da bi se utvrdilo da li je pad ćelijskog vijabiliteta posledica smanjene proliferacije ćelija usled delovanja RA ili je rezultat smrti ćelija zbog toksičnog delovanja ASYN, korišćen je test bojenja Tripjan plavim koji omogućava razlikovanje živih od mrtvih ćelija. Kod diferentovanih α-syn- ćelija uočen je vremenski zavistan porast u broju ćelija obojenih Tripjan plavim tj. mrtvih ćelija, kako u odnosu kako na nediferentovane ćelije sa povećanom produkcijom ASYN, tako i u poređenju sa diferentovanim kontrolnim ćelijama (α-syn+ i β-gal ćelije). Ovaj fenomen je bio najviše izražen šestog dana od početka diferencijacije ( $46 \pm 7.21$  % mrtvih ćelija nakon 4 dana diferencijacije, a  $79.12 \pm 8.57$  % mrtvih ćelija nakon 6 dana diferencijacije α-syn- ćelija koje prekomerno proizvode ASYN;  $p < 0.05$ ) (Slika 3). Dobijeni rezultati ukazuju da je pad vijabiliteta ćelija koje prekomerno proizvode ASYN posledica toksičnog delovanja ovog proteina tokom procesa diferencijacije, što dovodi do smrti ćelija.



**Slika 3. Prekomerna sinteza ASYN dovodi smrti ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanih u neuronski fenotip.** β-gal, α-syn+ i α-syn- ćelije su tretirane sa RA (20 μM) u periodu od 2, 4 i 6 dana. Za utvrđivanje broja mrtvih ćelija korišćeno je bojenje Tripan plavim. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost triplikata iz 3 reprezentativna uzorka ± S.D. (\*p < 0.05, nediferentovane ćelije (Ø) u poređenju sa odgovarajućim diferentovanim (RA) ćelijama).

U cilju ispitivanja uticaja prekomerne sinteze ASYN na gustinu i morfologiju ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y, ćelije su nakon 6 dana diferencijacije analizirane svetlosnom mikroskopijom uz primenu faznog kontrasta. Uočena je manja gustina diferentovanih α-syn- ćelija, kao i znaci izmenjene morfologije ćelija. Tako su nediferentovane α-syn- ćelije, koje su formirale konfluentne kulture, imale tipičan poligonalni oblik, dok su diferentovane α-syn- ćelije izgubile svoj poligonalni oblik, nastavci su se povukli, a ćelije zaokruglile. U skladu sa indukcijom ćelijske smrti, zaokrugljene ćelije smanjenog volumena su se odlepljivale od površine suda u kom su kultivisane (Slika 4 C). U isto vreme, kod obe kontrolne grupe ćelija (α-syn+ i β-gal) zabeležena je smanjena gustina ćelija, kao znak da su ćelije ušle u post-mitotičnu fazu, a takođe se zapaža i proces razvoja dendrita i aksona kao uobičajen znak diferencijacije ćelija pomoću RA, bez uočljivih promena karakterističnih za degeneraciju i smrt ćelija (Slika 4 A, B).



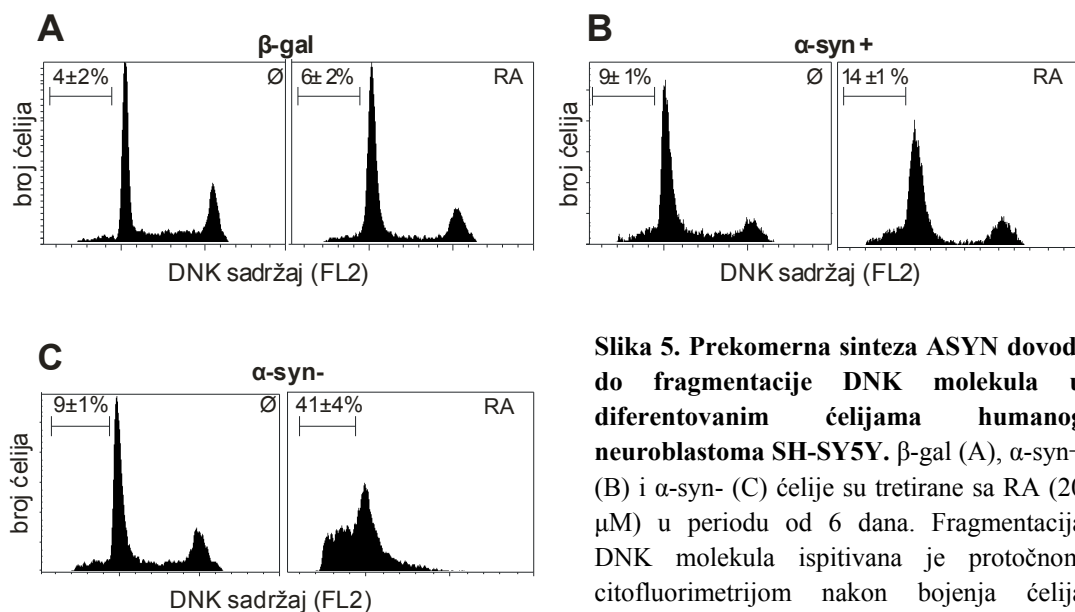
**Slika 4. Prekomerna sinteza ASYN dovodi do smanjenja gustine i promene morfologije diferentovanih ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y.** β-gal (A), α-syn+ (B) i α-syn- (C) ćelije su tretirane sa RA (20 μM) u periodu od 6 dana. Izgled i morfologija ćelija ispitivana je svetlosnom mikroskopijom. Prikazane su reprezentativne mikrografije dobijene iz 3 nezavisna eksperimenta (nediferentovane ćelije (Ø), diferentovane (RA) ćelije).

#### **4.1.3. Prekomerna sinteza alfa-sinukleina u diferentovanim ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y dovodi do fragmentacije DNK, aktivacije kaspaza i ultrastrukturnih promena u ćelijama**

U skladu sa smanjenjem vijabiliteta i opisanim morfološkim promenama ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y, nastalim pod uticajem prekomernog nagomilavanja ASYN, a u cilju boljeg definisanja mehanizma toksičnog delovanja ASYN, dalje je ispitivan uticaj ovog proteina na ćelijski ciklus, aktivaciju kaspaza i smrt ćelija.

Određivanje karakteristika faza ćelijskog ciklusa vršeno je bojenjem ćelija propidijum jodidom (boja koja se vezuje za DNK nakon permeabilizacije ćelijske i jedarne membrane) i analizom na protočnom citofluorimetru. Nakon 6-dnevne

diferencijacije, uočava se značajan porast u broju  $\alpha$ -syn- ćelija koje se nalaze u sub- $G_0/G_1$  fazi ćelijskog ciklusa ( $41 \pm 4$  %) (Slika 5 A), u odnosu na kontrolne ćelije ( $14 \pm 1$  % za  $\alpha$ -syn+;  $6 \pm 2$  % za  $\beta$ -gal ćelije) (Slika 5 B, C), kao i u odnosu na nediferentovane  $\alpha$ -syn- ćelije ( $9 \pm 1$  %) (Slika 5 A). Ovaj podatak ukazuje na to da je u grupi ćelija koje prekomerno sintetišu ASYN povećan procenat ćelija u kojima je došlo do fragmentacije molekula DNK.

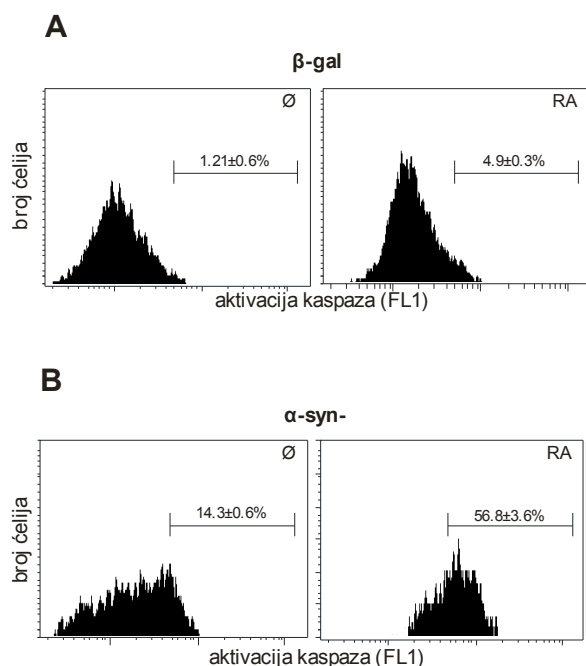


**Slika 5. Prekomerna sinteza ASYN dovodi do fragmentacije DNK molekula u diferentovanim ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y.**  $\beta$ -gal (A),  $\alpha$ -syn+ (B) i  $\alpha$ -syn- (C) ćelije su tretirane sa RA ( $20 \mu\text{M}$ ) u periodu od 6 dana. Fragmentacija DNK molekula ispitivana je protočnom citofluorimetrijom nakon bojenja ćelija propidijum jodidom (PI). Prikazani su

reprezentativni histogrami dobijeni iz 3 nezavisna eksperimenta (nediferentovane ćelije (Ø), diferentovane (RA) ćelije). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost iz 3 različita eksperimenta  $\pm$  S.D.

Imajući u vidu da fragmentacija DNK karakteriše ćelijsku smrt tipa apoptoze, dalje je ispitivana aktivacija kaspaza, enzima iz familije cistein proteaza, koji predstavljaju ključne izvršioce apoptotskog procesa. U cilju određivanja aktivacije kaspaza, korišćen je fluorescentno obeleženi pan-kaspazni inhibitor (Apostat), a ćelije su analizirane primenom protočne citofluorimetrije. Nakon 6-dnevne diferencijacije ćelija pomoću RA, uočeno je da kod  $\alpha$ -syn- ćelija koje prekomerno sintetišu ASYN, dolazi do značajnog porasta u procentu ćelija kod kojih se javlja porast intenziteta zelene fluorescence ( $56.8 \pm 3.6$  %) (Slika 6 A), u odnosu na kontrolne  $\beta$ -gal ćelije ( $4.9 \pm 0.3$  %) (Slika 6B), kao i u odnosu na nediferentovane  $\alpha$ -syn- ćelije ( $14.3 \pm 0.6$  %), što je pokazatelj aktivacije kaspaza u  $\alpha$ -syn- ćelijama

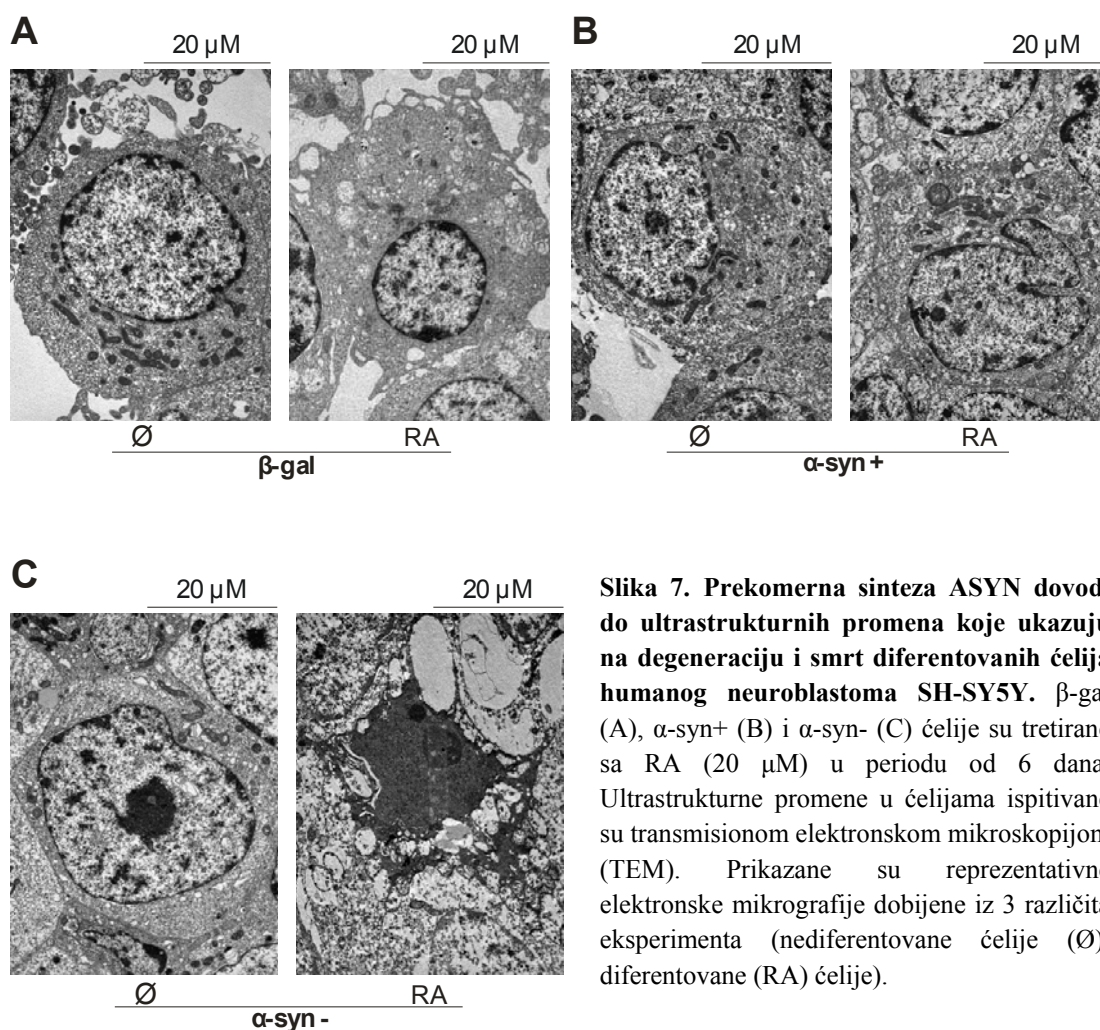
(Slika 6 A). Kod druge grupe kontrolnih ćelija, gajenih u prisustvu DOX ( $\alpha$ -syn<sup>+</sup>), tokom diferencijacije nije došlo do promene u intenzitetu zelene fluorescence ( $13.75 \pm 1.6 \%$ ), slično kao kod kontrolnih  $\beta$ -gal ćelija (rezultati nisu prikazani zbog preglednosti). Ovi podaci nesumnjivo pokazuju da u uslovima prekomerne sinteze ASYN dolazi do aktivacije kaspaza, što zajedno sa fragmentacijom DNK, ukazuje na to da je mehanizam umiranja diferentovanih  $\alpha$ -syn- ćelija apoptoza.



**Slika 6. Prekomerna sinteza ASYN dovodi do aktivacije kaspaza u diferentovanim ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y.**  $\beta$ -gal (A) i  $\alpha$ -syn- (B) ćelije su diferentovane pomoću RA (20  $\mu$ M) u periodu od 6 dana. Aktivacija kaspaza ispitivana je protočnom citofluorimetrijom nakon bojenja ćelija fluorescentno obojenim pan-kaspaznim inhibitorom (Apostat). Prikazani su reprezentativni histogrami dobijeni iz 3 nezavisna eksperimenta (nediferentovane ćelije (Ø), diferentovane (RA) ćelije). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost iz 3 različita eksperimenta  $\pm$  S.D.

Kako bi se analizirale ultrastrukturalne promene koje nastaju usled toksičnog delovanja ASYN, odnosno njegovog nakupljanja u ćelijama, korišćena je transmisijna elektronska mikroskopija. Analizirane su  $\alpha$ -syn-, kao i  $\alpha$ -syn<sup>+</sup> i  $\beta$ -gal ćelije, pre diferencijacije, a potom i 6 dana nakon diferencijacije sa RA. Kod diferentovanih  $\alpha$ -syn- ćelija koje prekomerno sintetišu ASYN, uočava se gubitak tipičnih morfoloških karakteristika, kondenzacija hromatina i fragmentacija jedra, kondenzacija citoplazme, kao i brojne vakuole (Slika 7 C). Sa druge strane, kod obe kontrolne grupe ćelija ( $\alpha$ -syn<sup>+</sup> i  $\beta$ -gal), nakon diferencijacije se uočava normalna građa i morfologija, sa promenom oblika ćelija koji odgovara diferencijaciji, uz povećan broj mitohondrija, kao i hipertrofisan ER (Slika 7 A, B). U skladu sa prethodnim rezultatima, ultrastrukturalne promene u diferentovanim  $\alpha$ -syn- ćelijama, a posebno fragmentacija jedra, potvrđuju pretpostavku da bi jedan od mogućih

mehanizama citotoksičnosti ASYN mogao biti indukcija programirane ćelijske smrti tip I, apoptoze. Iako gubitak morfologije i dezintegracija ćelijske membrane ne isključuju nekrozu kao tip ćelijske smrti, kondenzacija hromatina i citoplazme, podaci o fragmentaciji DNK i aktivacija kaspaza govore u prilog apoptoze kao tipa ćelijske smrti u uslovima prekomerne sinteze ASYN.



**Slika 7. Prekomerna sinteza ASYN dovodi do ultrastrukturnih promena koje ukazuju na degeneraciju i smrt diferentovanih ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y.** β-gal (A), α-syn+ (B) i α-syn- (C) ćelije su tretirane sa RA (20 μM) u periodu od 6 dana. Ultrastrukturne promene u ćelijama ispitivane su transmisijom elektronskom mikroskopijom (TEM). Prikazane su reprezentativne elektronske mikrografije dobijene iz 3 različita eksperimenta (nediferentovane ćelije (Ø), diferentovane (RA) ćelije).

#### **4.2. ULOGA PROTEIN KINAZE AKTIVIRANE ADENOZIN MONOFOSFATOM (AMPK) U KULTURI ĆELIJA HUMANOG NEUROBLASTOMA SH-SY5Y U USLOVIMA PREKOMERNOG NAKUPLJANJA ALFA-SINUKLEINA**

Kao što je ranije pomenuto, oštećenje mitohondrija predstavlja jedan od glavih mehanizama značajnih za patogenezu PB. Takođe, pokazano je da nakupljanje ASYN u ćeliji štetno deluje na aktivnost mitohondrija (Dauer i sar., 2003). Kao posledica toga, kapacitet ćelija za sintezu adenozin trifosfata (ATP) se značajno snižava, dolazi do porasta unutarćelijske koncentracije adenozin monofosfata (AMP), što dovodi do aktivacije AMPK (Abou-Sleiman i sar., 2006; Hardie i sar., 2012). Pored toga što je LKB1/AMPK/Raptor signalni put uključen u regulaciju energetskog balansa u ćeliji, važna je uloga ovog signalnog puta i u dugim procesima ćeliji kao što su regulacija sinteze i razgradnje proteina, apoptoza i autofagija (Hardie i sar., 2011; 2012).

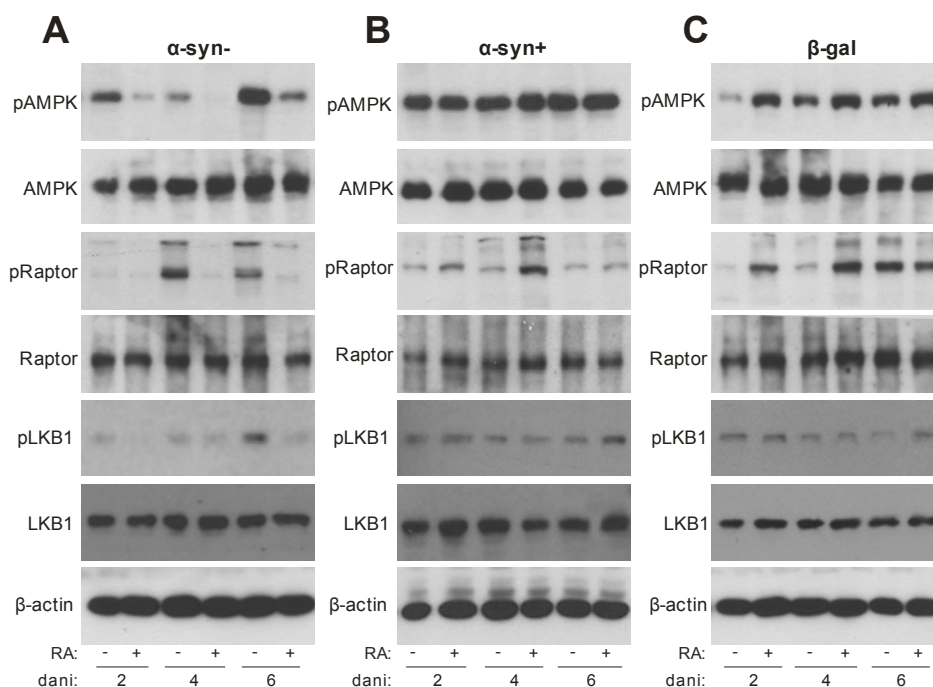
S obzirom da su prethodni rezultati nedvosmisleno pokazali neurotoksični uticaj unutarćelijskog nakupljanja ASYN, dalje istraživanje je bilo usmereno na ispitivanje mehanizama toksičnog delovanja i moguće uloge LKB1/AMPK/Raptor signalnog puta u neukotoksičnosti ovog proteina.

##### **4.2.1. Alfa-sinuklein dovodi do smanjene aktivacije AMPK u diferentovanim ćelijama humanog neuroblasoma SH-SY5Y**

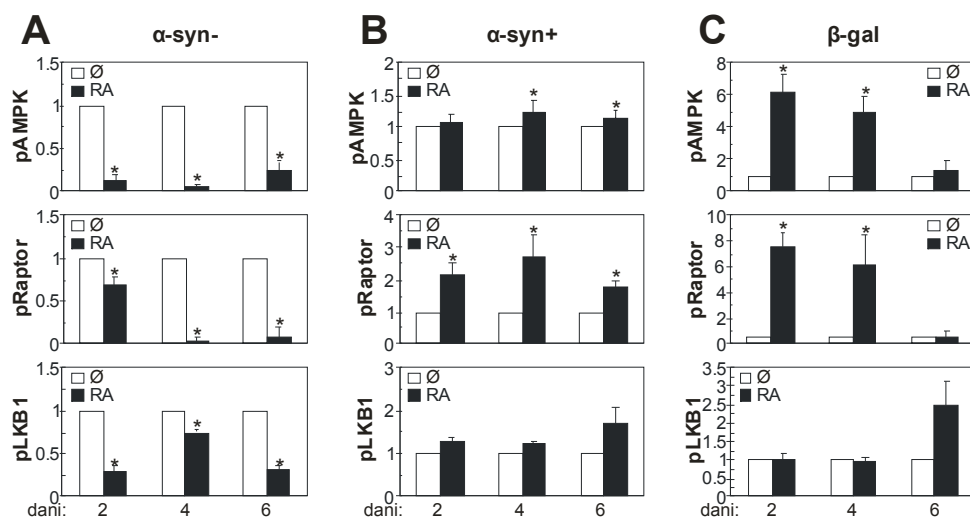
Ranija istraživanja su pokazala da ASYN dovodi do oksidativnog stresa, oštećenja mitohondrija i smanjene sinteze ATP, što može da pokrene mehanizme programirane ćelijske smrti u dopaminergičkim neuronima (Dauer i sar., 2003). Imajući u vidu da poremećaj energetskog balansa ćelije, može dovesti do promena u signalnom putu najvažnijeg unutarćelijskog energetskog senzora, AMPK (Hardie i sar. 2011), dalje je ispitivana uloga AMPK u neurotoksičnom delovanju ASYN.

U skladu sa prethodnim istraživanjima, imunoblot analize kontrolnih grupa ćelija ( $\alpha$ -syn<sup>+</sup> i  $\beta$ -gal) su pokazale da tokom diferencijacije ćelija u vremenskim intervalima od 2, 4 i 6 dana dolazi do porasta zastupljenosti fosforilisane/aktivne forme AMPK (pAMPK), što je bila praćeno i porastom u fosforilaciji njenog supstrata Raptor (pRaptor). Nivo ekspresije kinaze koja uzrokuje fosforilaciju, a samim tim i aktivaciju AMPK, LKB1 (engl. *liver kinase B1*, *LKB1*), nije bio značajno promenjen (Slika 8 B, C). Pokazano je da sama diferencijacija ćelija neuroblastoma (Neuro-2a) može dovesti do aktivacije AMPK tj. njene fosforilacije na treoninu-172, čime se AMPK aktivira (Wang i sar., 2010). Nasuprot aktivacije AMPK u kontrolnim ćelijama, diferencijacija  $\alpha$ -syn- ćelija dovela je do značajnog smanjenja zastupljenosti aktivnih/fosforilisanih formi AMPK, Raptor, kao i ushodne (aktivirajuće) kinaze LKB1 (pAMPK, pRaptor, pLKB1) (Slika 8 A). Diferencijacija nije dovela do promene sveukupne ekspresije navedenih kinaza (fosforilisanih i nefosforilisanih formi proteina) kod sve 3 grupe ispitivanih ćelija (Slika 8 A-C). Denzitometrijskom analizom potvrđene su razlike u stepenu aktivacije ispitivanih proteina (Slika 9 A-C). Naime, nakon 6 dana diferencijacije, pokazano je statistički značajno smanjenje nivoa aktivne forme AMPK (pAMPK) u diferentovanim ćelijama koje prekomerno sekretuju ASYN ( $\alpha$ -syn-) ( $0.2 \pm 0.1$ ) u odnosu na odgovarajuće nediferentovane ćelije (ekspresija proteina arbitrarno svedena na 1). Takođe, nivo aktivne forme ushodne kinaze LKB1 (pLKB1) je bio značajno niži kod diferentovanih (RA;  $0.31 \pm 0.04$ ) u odnosu na nediferentovane  $\alpha$ -syn- ćelije ( $\emptyset$ ; 1). Shodno tome i aktivna forma nishodne kinaze Raptor (pRaptor) je takođe imala nižu ekspresiju kod diferentovanih (RA;  $0.09 \pm 0.13$ ) u odnosu na nediferentovane  $\alpha$ -syn- ćelije ( $\emptyset$ ; 1) ( $p < 0.05$ ) (Slika 9 A).

Nasuprot očekivanjima, dobijeni rezultati su pokazali da u uslovima prekomerne ekspresije ASYN dolazi do smanjene aktivacije signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor u kulturi ćelija humanog neuroblasoma SH-SY5Y diferentovanih u neuronski fenotip.



**Slika 8. Prekomerna sinteza ASYN dovodi do smanjene aktivacije LKB1/AMPK/Raptor signalnog puta u kulturi diferentovanih ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y.** Analiza fosforilacije/aktivacije enzima AMPK, Raptor i LKB1 u α-syn- (A), α-syn+ (B) i β-gal (C) ćelijama je vršena imunoblot tehnikom u različitim vremenskim intervalima (2, 4 i 6 dana) tokom diferencijacije pomoću RA (20 μM). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi, dobijeni iz 3 nezavisna eksperimenta.



**Slika 9. Densitometrijska analiza ekspresije ukupnih i fosforilisanih oblika proteina AMPK, Raptor i LKB1 u kulturi ćelija humanog neuroblastoma α-syn- (A), α-syn+ (B) i β-gal (C).** Rezultati densitometrijske analize, predstavljaju srednje vrednosti iz tri nezavisna eksperimenta ± S.D. (\*p < 0.05, nediferentovane ćelije (Ø) u poređenju sa odgovarajućim diferentovanim (RA) ćelijama).

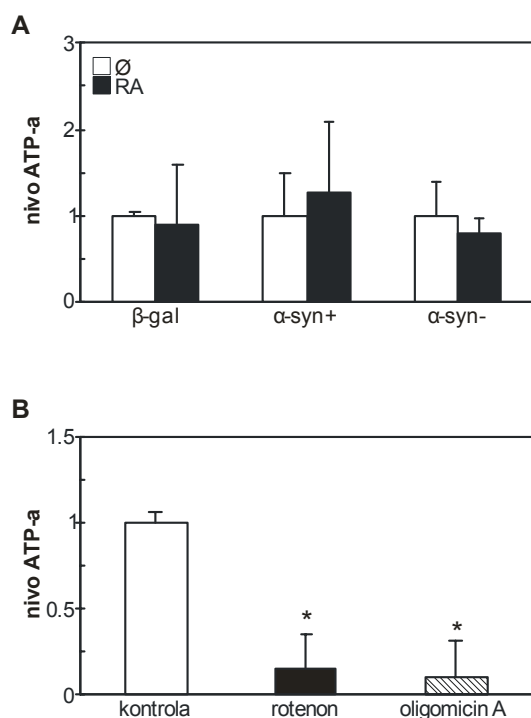
#### **4.2.2. Sadržaj unutarćelijskog adenzin trifosfata (ATP) je ostao nepromenjen u uslovima prekomerne sinteze alfa-sinukleina u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y**

Imajući u vidu da je prekomerna ekspresija ASYN uzrokovala smanjenje aktivacije signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor, kao i činjenicu da ASYN može nepovoljno uticati na mitohondrije, dalje je ispitivano da li suprafiziološka koncentracija ASYN dovodi do smanjenja energetskog naboja (odnosno koncentracije ATP) u diferentovanim ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y, kako onim koje prekomerno ekspimiraju ASYN ( $\alpha$ -syn<sup>-</sup>), tako i u kontrolno transfekovanim ćelijama ( $\beta$ -gal,  $\alpha$ -syn<sup>+</sup>).

Detekcijom novog ATP u ćeliji pomoću hemiluminiscence, pokazano je da prekomerna produkcija ASYN nije dovela do statistički značajnog smanjenja koncentracije ATP u  $\alpha$ -syn<sup>-</sup> ćelijama, nakon četvorodnevne diferencijacije retinoičnom kiselinom (Slika 10 A). Kao pozitivna kontrola ovog eksperimenta korišćen je tretman oligomicinom A (5  $\mu$ M) i rotenonom (0.2  $\mu$ M) u trajanju od 48 sati, toksinima koji sprečavaju oksidativnu fosforilaciju i sintezu ATP u mitohondrijama. Naime, oligomicin A blokira F<sub>0</sub> subjedinicu V kompleksa (ATP sintaza) u elektron-transportnom lancu na unutrašnjoj strani mitohondrija; dok rotenon inhibira kompleks I (NADH dehidrogenazu).

U skladu sa očekivanjima, oba toksina su dovela do statistički značajnog pada nivoa ATP kod tretiranih diferentovanih ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y, u odnosu na diferentovane kontrolne ćelije koje nisu tretirane pomenutim toksinima ( $p < 0.05$ ) (Slika 10 B).

Imajući u vidu navedene rezultate, može se zaključiti da se smanjenje aktivnosti AMPK u ćelijama koje prekomerno sintetišu ASYN ne može objasniti promenom energetskog statusa ćelije, odnosno koncentracije ATP.



**Slika 10. Prekomerna sinteza ASYN nije uticala na promenu nivoa ATP-a u ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y.** Kod transfekovanih  $\beta$ -gal,  $\alpha$ -syn<sup>+</sup> i  $\alpha$ -syn<sup>-</sup> ćelija diferentovanih pomoću RA (20  $\mu$ M) u trajanju od 4 dana nema značajne promene u unutarćelijskom nivou ATP-a u odnosu na nediferentovane ćelije (Ø). Nivo ATP-a u ćelijama je meren metodom hemiluminiscence, a izražen kao odnos koncentracije ATP-a u odnosu na koncentraciju proteina u ćelijama ([ATP]/[proteini]) (A). Tretman oligomicinom A (5  $\mu$ M) i rotenonom (0.2  $\mu$ M) u trajanju od 48h doveo je do statistički značajnog smanjenja nivoa ATP-a u diferentovanim SH-SY5Y ćelijama (\* $p < 0.05$ , tretirane ćelije u poređenju sa kontrolnim netretiranim ćelijama) (B). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost uzeta iz 3 nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D.

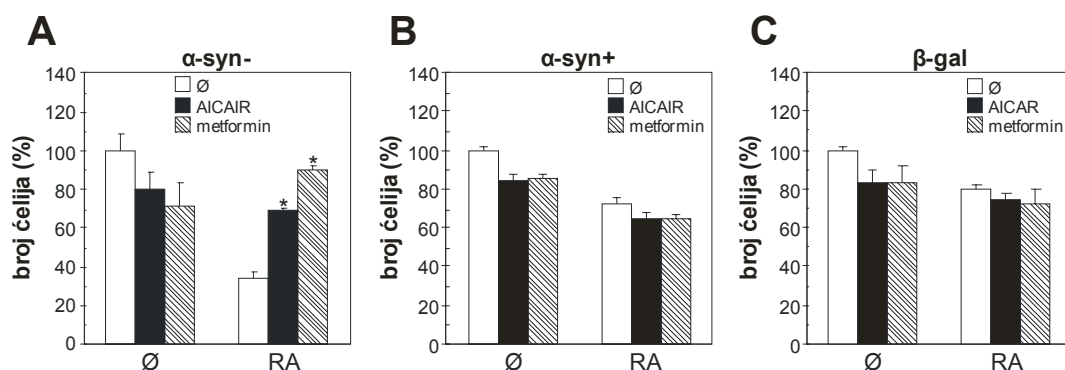
#### 4.2.3. Farmakološka aktivacija AMPK poboljšava preživljavanje diferentovanih ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y u uslovima prekomerne sinteze alfa-sinukleina

S obzirom da su prethodni rezultati pokazali da prekomerna sinteza ASYN dovodi do smanjene aktivacije AMPK signalnog puta, dalje je ispitivano kako farmakološki aktivatori AMPK: AICAR (nukleozid koji se u ćeliji prevodi u analog AMP, i tako stimuliše aktivaciju AMPK) (Sakoda i sar., 2002) i metformin (jedinjenje koje spada u klasu bigvanida i koristi se u terapiji *diabetes mellitus* tipa 2) (Dunn i sar., 1995), utiču na preživljavanje ćelija humanog neuroblastoma u uslovima suprafiziološke koncentracije ASYN.

Ispitivanjem vijabiliteta, kako ćelija koje prekomerno eksprimiraju ASYN ( $\alpha$ -syn<sup>-</sup>), tako i kontrolno transfekovanih ( $\beta$ -gal,  $\alpha$ -syn<sup>+</sup>), u uslovima delovanja farmakoloških aktivatora AMPK, pokazano je da su oba aktivatora AMPK (AICAR i metformin) dovela do poboljšanja preživljavanja  $\alpha$ -syn<sup>-</sup> ćelija. Nakon šestodnevne

diferencijacije  $\alpha$ -syn- ćelija pomoću RA u uslovima primene AICAR-a (0.125 mM), vijabilitet ćelija je bio  $71.72 \pm 0.8 \%$ , dok je nakon tretmana metforminom (4 mM) iznosio čak  $97.1 \pm 1.6 \%$ . Primena AICAR-a i metofrmina dovela je da statistički značajnog porasta u procentu živih diferentovanih  $\alpha$ -syn- ćelija u odnosu uslove bez aktivatora AMPK (vijabilitet  $54.9 \pm 5.4 \%$ ;  $p < 0.05$ ) (Slika 11 A). Nasuprot ovome, vijabilitet diferentovanih kontrolnih ćelija ( $\alpha$ -syn+ i  $\beta$ -gal) je ostao nepromenjen nakon tretmana farmakološkim aktivatorima AMPK (Slika 11 B, C). Treba napomenuti da je tretman aktivatorima AMPK doveo do promene u vijabilitetu kod sve tri grupe nediferentovanih ćelija ( $\alpha$ -syn-,  $\alpha$ -syn+ i  $\beta$ -gal) koji nije bio statistički značajan (Slika 11).

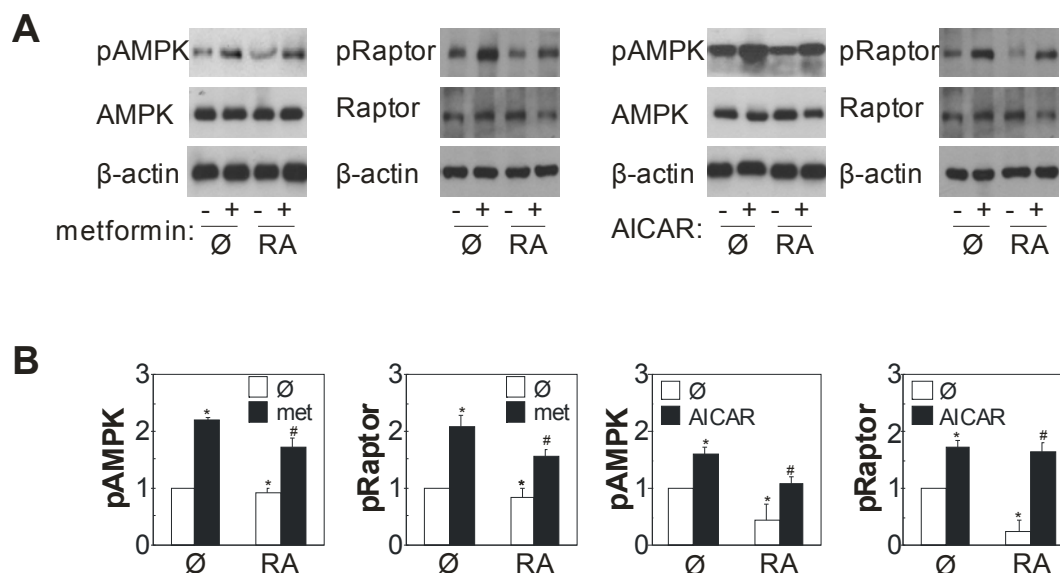
Dobijeni rezultati ukazuju na moguću neuroprotektivnu ulogu aktivacije AMPK u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y u uslovima prekomerne sinteze ASYN.



**Slika 11. Farmakološka aktivacija AMPK dovodi do poboljšanja preživljavanja ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y u uslovima prekomerne produkcije ASYN.**  $\alpha$ -syn- (A),  $\alpha$ -syn+ (B) i  $\beta$ -gal (C) ćelije su diferentovane pomoću RA (20  $\mu$ M) u periodu od 6 dana, u odsustvu i prisustvu farmakoloških aktivatora AMPK: AICAR (0.125 mM) i metformina (4 mM). Vijabilitet ćelija u kulturi je određivan Kristal violet metodom (\* $p < 0.05$ , tretirane ćelije u poređenju sa kontrolom (Ø), ćelijama koje nisu tretirane AICAR-om i metforminom). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost uzeta iz triplikata iz 3 različita eksperimenta  $\pm$  S.D.

Citoprotektivno delovanje AICAR-a i metformina je potvrđeno imunoblot tehnikom, gde se jasno vidi da oba aktivatora dovode do porasta unutarćelijske zastupljenosti fosforilisane/aktivne forme AMPK (pAMPK), kao i njenog supstrata, nishodne kinaze Raptor (pRaptor) u diferentovanim neuroblastomskim ćelijama koje prekomerno proizvode ASYN ( $\alpha$ -syn- ćelije) (Slika 12 A). Denzitometrijskom

analizom dobijenih imunoblotova utvrđeno je da AICAR i metformin dovode do statistički značajnog porasta u nivou aktivne forme AMPK (pAMPK;  $p < 0,05$ ) (Slika 12 B).



**Slika 12.** AICAR i metformin dovode do povećane zastupljenosti fosforilisane/aktivne forme AMPK (pAMPK), kao i nishodne kinaze Raptor (pRaptor) u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y u uslovima prekomerne produkcije ASYN.  $\alpha$ -syn- ćelije su diferentovane pomoću RA (20  $\mu$ M) u periodu od 6 dana, u odsustvu i prisustvu farmakoloških aktivatora AMPK: AICAR (0.125 mM) i metformina (4 mM). Nivoi fosforilisanih/aktivnih formi enzima AMPK (pAMPK) i Raptor (pRaptor) su verifikovani imunoblot tehnikom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz 3 nezavisna eksperimenta (A), kao i njihove densitometrijske analize merene ImageJ programom (B) (\* $p < 0.05$ , ćelije tretirane AICAR-om ili metforminom (met) u odnosu na netretirane kontrole; # $p < 0.05$ , diferentovane ćelije tretirane AICAR-om ili metforminom (RA+AICAR; RA+met) u odnosu na netretirane diferentovane (RA) ćelije)

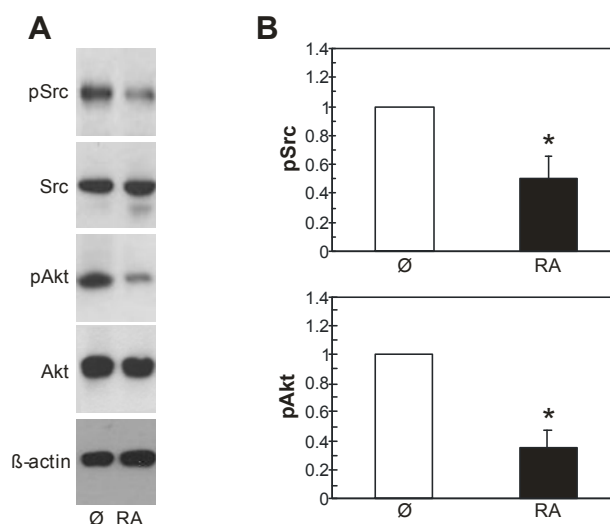
#### 4.2.4. Alfa-sinuklein dovodi do smanjene aktivacije protein kinaze B (Akt) u ćelijama humanog neuroblasoma SH-SY5Y diferentovanim u neuronski fenotip

Na osnovu rezultata da se u uslovima prekomerna sinteze ASYN smanjuje aktivacija signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor, kao i činjenice da aktivatori AMPK poboljšavaju preživljavanje ćelija, može se pretpostaviti da je citotoksični efekat ASYN bar delimično posredovan inhibicijom AMPK. Da bi se ova hipoteza ispitala, dalje je analizirano da li dolazi do promena u aktivaciji enzima uključenih u drugi

veoma važan signalni put u ćeliji, Src/Akt signalni put, za koji se zna da pospešuje preživljavanje ćelija u uslovima nakupljanja ASYN (Kao i sar., 2009), kao i da ima brojna zajednička raskršća sa signalnim putem AMPK.

Za potrebe ovog dela istraživanja, SH-SY5Y ćelije su ispitivane nakon 6 dana diferencijacije retinoičnom kiselinom. Tehnikom imunoblota pokazano je da se kod  $\alpha$ -syn- ćelija uočava smanjen nivo aktivne/fosforilisane forme protein kinaze B/Akt (pAkt), kao i njoj ushodne kinaze Src (pSrc), dok je ukupna ekspresija Src i Akt proteina ostala je nepromenjena (Slika 13 A). Denzitometrijskom analizom rezultata pokazano je da postoji statistički značajno smanjenje nivoa aktivne forme Akt (pAkt) kod diferentovanih  $\alpha$ -syn- ćelija ( $0.35 \pm 0.12$ ) u odnosu na nediferentovane ćelije (ekspresija proteina arbitrarno svedena na 1). U skladu sa ovim, nivo aktivne forme Src kinaze (pSrc) je takođe bio značajno niži kod diferentovanih (RA;  $0.51 \pm 0.15$ ) u odnosu na nediferentovane  $\alpha$ -syn- ćelije ( $\emptyset$ ; 1) ( $p < 0,05$ ) (Slika 13 B).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da prekomerno nagomilavanje ASYN pored inhibitornog efekta na AMPK, indukuje i inhibiciju Src/Akt signalnog puta.



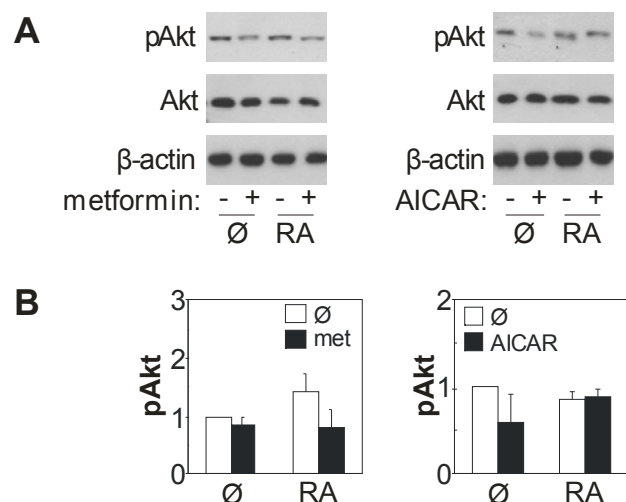
**Slika 13. Prekomerna sinteza ASYN dovodi do smanjene aktivacije Src/Akt signalnog puta u kulturi diferentovanih ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y.**  $\alpha$ -syn- ćelije su diferentovane pomoću RA (20  $\mu$ M), a potom je vršena analiza fosforilacije/aktivacije enzima Src i Akt tehnikom imunoblota. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi, dobijeni iz 3 različita eksperimenta (A). Rezultati denzitometrijske analize, dobijeni korišćenjem ImageJ programa, predstavljaju srednje vrednosti iz tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  S.D. (\* $p < 0,05$ , nediferentovane ćelije ( $\emptyset$ ) u poređenju sa odgovarajućim diferentovanim (RA) ćelijama) (B).

#### 4.2.5. Protektivno delovanje AMPK ne zavisi od aktivacije protein kinaze B (Akt) u diferentovanim ćelijama humanog neuroblasoma SH-SY5Y

Imajući u vidu da prekomerno nagomilavanje ASYN dovodi do smanjene aktivacije obeju ispitivanih kinaza (AMPK i Akt), dalje je ispitano da li aktivacija Akt signalnog puta ima ulogu u ostvarivanju protektivnog delovanja farmakoloških aktivatora AMPK, AICAR-a i metformina. Naime, iako se ranije smatralo da su aktivnost AMPK i Akt regulisane nezavisno (Sarbasov i sar., 2005; Memmott i sar., 2009), noviji podaci ukazuju da AMPK, u zavisnosti od uslova, može stimulisati (Levine i sar., 2007) ili inhibirati (Kim i sar., 2009) aktivnost protein kinaze B/Akt.

Za potrebe ovog eksperimenta,  $\alpha$ -syn- ćelije su ispitivane nakon 6 dana diferencijacije u prisustvu i odsustvu AICAR (0.125 mM) ili metformina 4 (mM). Tehnikom imunoblota pokazano je da, kod diferentovanih  $\alpha$ -syn- ćelija, tretman aktivatorima AMPK nije doveo do modulacije Akt signalnog puta, pošto primena aktivatora AMPK, metformina i AICAR-a koja je dovela do porasta aktivnosti AMPK, nije rezultirala u porastu nivoa fosforilacije Akt (pAkt) (Slika 14 A). Denzitometrijskom analizom dobijenih imunoblotova je potvrđeno je da nema razlike u stepenu aktivacije proteina (Slika 14 B). Sveukupni nivo ekspresije kinaze Akt je ostao nepromenjen.

Ovi rezultati ukazuju aktivacija AMPK može dovesti do smanjenja citotoksičnog delovanja ASYN mehanizmom koji je ne uključuje aktivaciju protein kinaze B/Akt.



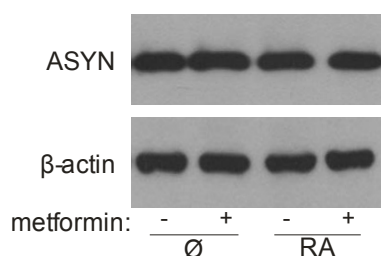
**Slika 14. Farmakološka aktivacija AMPK ne dovodi do povećane zastupljenosti fosforilisane forme Akt (pAkt) u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y u uslovima prekomerne sinteze ASYN.**  $\alpha$ -syn- ćelije su diferentovane pomoću RA (20  $\mu$ M) u periodu od 6 dana, u odsustvu i prisustvu farmakoloških aktivatora AMPK: AICAR-a (AICAR, 0.125 mM) i metformina (met, 4 mM). Nivoi fosforilisane/aktivne forme enzima AMPK i Raptor su određeni tehnikom imunoblota. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz 3 nezavisna eksperimenta (A), kao i njihove denzitometrijske analize (B).

#### 4.2.6. Farmakološka aktivacija AMPK ne utiče na nivo alfa-sinukleina u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y

Bitan faktor koji favorizuje nastanak proteinskih agregata ASYN jesu i posttranslacione modifikacije ovog proteina, kao npr. fosforilacija (Stefanis i sar., 2012). Naime, pokazano je da fosforilacija ASYN može da pospeši nepravilno savijanje i nastajanje agregata ovog proteina, što vodi neurotoksičnom efektu koji je u osnovi patogeneze PB (Taymans i sar., 2014). Najnovija istraživanja na kulturama ćelija kao i na animalniom modelima ukazuju na značaj fosforilacije ASYN na poziciji Ser129 delovanjem enzima PLK2 (engl. *Polo-like kinase 2*, *PLK2*), koji se razmatra kao jedan od važnih činilaca u etiopatogenezi Parkinsonove bolesti i ostalih sinukleinopatija (Franchin i sar., 2014). Imajući u vidu da je enzim od interesa u ovom istraživanju iz familije protein kinaza, dalje je ispitivano da li farmakološka aktivacija AMPK utiče na nivo ASYN u ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanim u neuronski fenotip.

Nakon diferencijacije  $\alpha$ -syn- ćelija pomoću RA u trajanju od 6 dana, u prisustvu metformina (4 mM), imunoblot metodom je pokazano da tretman farmakološkim aktivatorom AMPK ne utiče na unutarćelijski nivo ASYN (Slika 15). Slično je potvrđeno i nakon tretmana ćelija drugim farmakološkim aktivatorom AMPK, AICAR-om (rezultati nisu prikazani zbog preglednosti).

Dobijeni rezultati ukazuju na to da neuroprotektivni efekat aktivacije AMPK ne utiče na nivo ASYN u ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanim u neuronski fenotip.

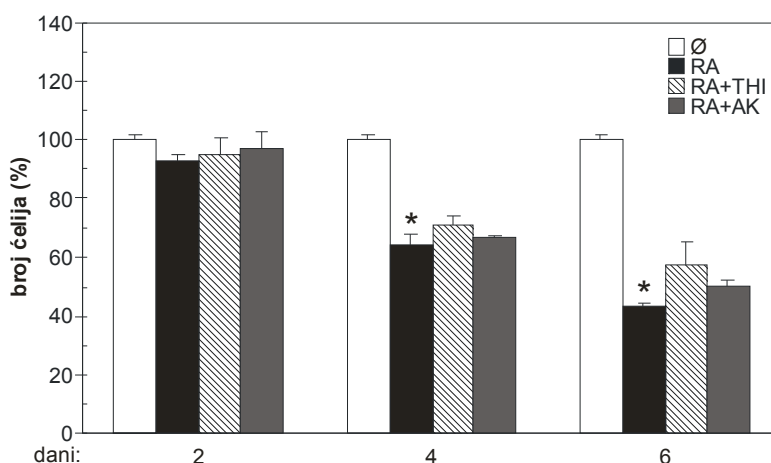


**Slika 15. Farmakološka aktivacija AMPK nije uticala na nivo ASYN u diferentovanim  $\alpha$ -syn-ćelijama.** Imunoblot metodom je ispitivana ekspresija ASYN u  $\alpha$ -syn- ćelijama koje su diferentovane u neuronski fenotip pomoću RA (20  $\mu$ M) u periodu od 6 dana, u odsustvu i prisustvu metformina (4 mM). Prezentovani su reprezentativni imunoblotovi iz 3 različita eksperimenta.

#### **4.2.7. Farmakološka aktivacija AMPK ima bolje neuroprotektivno dejstvo od inhibitora tirozin hidroksilaze i antioksidansa askorbinske kiseline u uslovima prekomerne sinteze alfa-sinukleina**

Do sada je poznato nekoliko agenasa za koje je pokazano da imaju neuroprotektivno dejstvo u različitim modelima PB, kao što su inhibitori tirozin-hidroksilaze (npr.  $\alpha$ -metiltirozin), ili antioksidansi (npr. askorbinska kiselina) (Gomez-Santos i sar., 2003; Ito i sar., 2010). Za askorbinsku kiselinu je pokazano da deluje neuroprotektivno i u *in vivo* modelu PB, jer je ovaj tretman odložio pojavu motornih disfunkcija (Khan i sar., 2012). Takođe, pokazano je da askorbinska kiselina u kulturi ćelija dovodi do značajnog smanjenja agregacije ASYN i broja ćelija koje sadrže inkluzije ASYN (Fernandes i sar., 2014). Pokazano je i da inhibicija tirozin hidroksilaze (primenom  $\alpha$ -metil-DL-tirozina) štiti dopaminergičke neurone od toksičnosti izazvane glutamatom (Izumi i sar., 2009), kao i da spašava dopaminergičke ćelije MN9D u kulturi, u uslovima prekomerne ekspresije i sinteze *wt* ASYN, što je u ovim neuronima uzrokovalo pokretanje procesa apoptoze (Zhou i sar., 2006).

U cilju evaluacije protektivnog dejstva farmakoloških aktivatora AMPK u zaštiti od toksičnog efekta ASYN, ispitivan je zaštitni efekat poznatih neuroprotektivnih agenasa u našem modelu. Ćelije koje prekomerno proizvode ASYN ( $\alpha$ -syn-) su diferencirane u neuronski fenotip u periodu od 2, 4 i 6 dana, u prisustvu i odsustvu  $\alpha$ -metil-DL-tirozina (1 mM) ili askorbinske kiseline (25  $\mu$ M), a njihov vijabilitet je određivan Kristal violet metodom. Dobijeni rezultati su pokazali da  $\alpha$ -metil-DL-tirozin i askorbinska kiselina doveli do poboljšanja preživljavanja diferenciranih  $\alpha$ -syn- ćelija, ali je ovaj efekat bio slabiji u poređenju sa neuroprotektivnim efektom farmakoloških aktivatora AMPK (Slika 16).



**Slika 16. Protektivni efekat inhibitora tirozin-hidroksilaze (THI) i askorbinske kiseline (AK) u kulturi humanog neuroblastoma SH-SY5Y u uslovima prekomerne sinteze ASYN.**  $\alpha$ -syn- ćelije su diferentovane u neuronski fenotip pomoću RA u vremenskim intervalima od 2, 4 i 6 dana, u prisustvu i odsustvu  $\alpha$ -metil-DL-tirozina (1 mM) ili askorbinske kiseline (25  $\mu$ M). Vijabilitet ćelija je meren Kristal violet metodom, a rezultati su uzeti iz triplikata iz 3 nezavisna eksperimenta i predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.D. (\* $p < 0.05$ , netretirane diferentovane ćelije (RA) u poređenju sa netretiranim nediferentovanim (Ø) ćelijama).

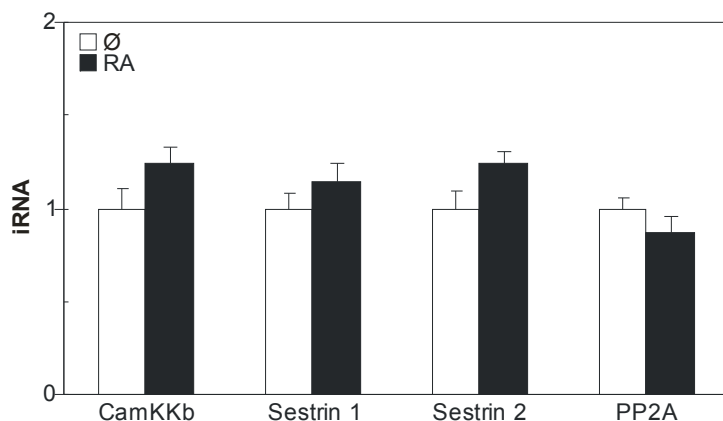
#### 4.2.8. Alfa-sinuklein ne dovodi do promene u ekspresiji ushodnih regulatora AMPK-signalnog puta u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y

Imajući u vidu da je neurotoksično delovanje ASYN na diferentovane ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y praćeno smanjenom aktivacijom AMPK, postavilo se pitanje kojim mehanizmom prekomerna sinteza ASYN uzorokuje smanjenje aktivnosti AMPK, odnosno da li ASYN utiče na ekspresiju ili aktivnost enzima koji regulišu aktivnost AMPK: kalcijum/kalmodulin zavisne kinaze- $\beta$  (CaMKK $\beta$ ), protein fosfataze 2A (PP2A), sestrina 1 i sestrina 2.

Naime, CaMKK $\beta$  je kinaza čija aktivnost zavisi od koncentracije kalcijuma u citosolu, a dovodi do aktivacije AMPK preko njene regulatorne subjediniće, fosforilacijom treonina u položaju 172 (Hurley i sar., 2005). Drugi mehanizam aktivacije AMPK uključuje sestrin 1 i 2, proizvode gena SESN 1-3, koji pripadaju familiji gena koji se aktiviraju u uslovima stresa (engl. *stress-responsive genes*). Sestrin 1 i 2 se aktiviraju u uslovima oštećenja DNK i/ili oksidativnog stresa, i mogu da dovedu do snažne aktivacije AMPK, i da preko AMPK $\alpha$ 1 utiču na aktivnost

kinaze mTOR, najvažnijeg regulatora autofagije u ćeliji (Budanov i sar., 2008). Uz navedene aktivatore AMPK, ispitivana je ekspresija i negativnog regulatora AMPK, serin/treonin fosfataze PP2A, koja reguliše mnogobrojne signalne puteve u ćelijama sisara. PP2A defosforilacijom regulatorne subjediniice AMPK dovodi do posledične deaktivacije enzima (Mumby i sar., 1993), a pokazano je da ASYN može da aktivira PP2A (Lou i sar., 2010; Peng i sar., 2005).

Reakcijom lančanog umnožavanja DNK molekula u realnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR*) nakon izolacije RNK i reverzne transkripcije analizirana je ekspresija ovih gena u diferentovanim  $\alpha$ -syn- ćelijama. Rezultati qPCR analize su pokazali da se ekspresija informacionih RNK (iRNK) nije značajno menjala u  $\alpha$ -syn- ćelijama tokom diferencijacije ni za jedan od 4 gena koji učestvuju u regulaciji aktivnosti AMPK (Slika 17).



**Slika 17. Prekomerna produkcija ASYN nije uticala na ekspresiju informacione RNK (iRNK) za proteine koji regulišu aktivnost AMPK u diferentovanim ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y.** Ekspresija iRNK za CaMKK $\beta$ , PP2A, sestrin 1 i sestrin 2 je određivana *real-time* RT-PCR metodom u  $\alpha$ -syn- ćelijama tokom diferencijacije pomoću RA (20  $\mu$ M) u trajanju od 24 sata. Predstavljeni rezultati ( $2^{-\Delta\text{Ct}}$ ) iz reprezentativnog eksperimenta su izraženi kao relativna vrednost dobijena iz diferentovanih ćelija (RA) u odnosu na vrednost odgovarajuće kontrole (nediferentovane ćelije, Ø) za koju se uzima arbitrarno da je vrednost 1.

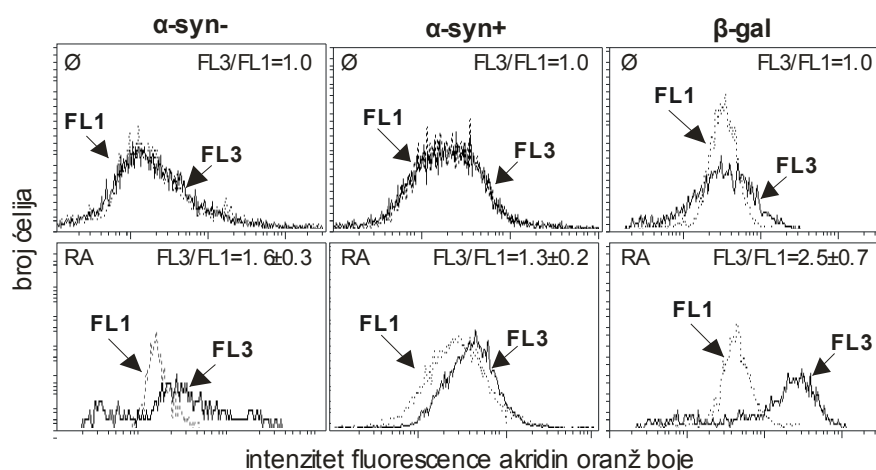
#### **4.3. ULOGA AUTOFAGIJE U NEUROPROTEKTIVNOM DELOVANJU PROTEIN KINAZE AKTIVIRANE ADENOZIN MONOFOSFATOM (AMPK) U USLOVIMA PREKOMERNE SINTEZE ALFA-SINUKLEINA**

Prethodni rezultati su pokazali da prekomerno nakupljanje ASYN dovodi do ultrastrukturnih promena ćelija karakterističnih za apoptozu, što je praćeno i povećanjem sveukupne aktivnosti kaspaza i fragmentacijom DNK molekula. Takođe, pokazano je da ASYN u ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y dovodi do inhibicije signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor, nezavisno od aktivacije protein kinaze B/Akt. Imajući u vidu da je jedan od supstrata AMPK i kinaza mTOR, i da inhibicija mTOR delovanjem AMPK dovodi do indukcije procesa makroautofagije (Vucicevic i sar., 2011), u daljem nizu eksperimenata ispitivano je da li je u mehanizmu protektivnog delovanja AMPK, u uslovima prekomerne ekspresije ASYN, prisutna indukcija autofagije.

##### **4.3.1. Alfa-sinuklein dovodi do indukcije autofagije u diferentovanim ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y**

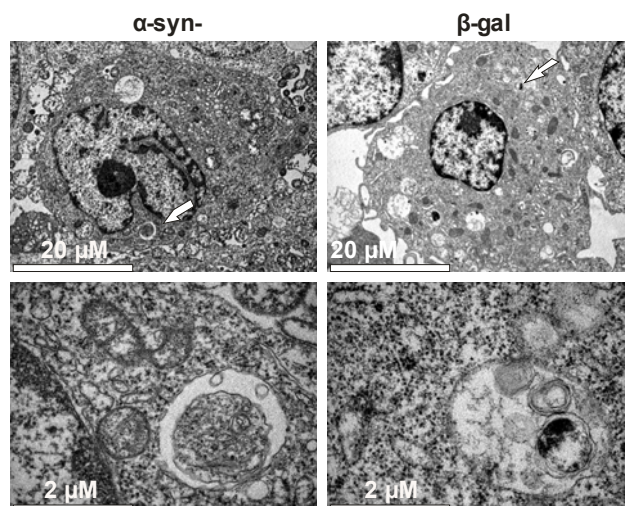
Makroautofagija je proces u kome se proteinski agregati i oštećene organele razgrađuju u autofagolizozomima (Mizushima i sar., 2007). Formiranje autofagolizozoma može se pratiti protočnom citofluorimetrijom nakon bojenja ćelija akridin oranžom, pH-zavisnom fluorescentnom bojom koja, u uslovima kiselog pH kakav je u autofagolizozomima, menja zelenu fluorescencu u crvenu.

Nakon diferencijacije ćelija u trajanju od 6 dana, protočnom citofluorimetrijom pokazano je da dolazi do porasta odnosa crvene i zelene fluorescence (FL3/FL1) kako u diferentovanim  $\alpha$ -syn- ćelijama koje prekomerno sintetišu ASYN, tako i u kontrolnim ćelijama ( $\alpha$ -syn<sup>+</sup> and  $\beta$ -gal), u odnosu na odgovarajuće nediferentovane ćelije (Slika 18). Naime, kod  $\alpha$ -syn- ćelija nakon diferencijacije (RA) uočava se porast odnosa FL3/FL1 na vrednost  $1.6 \pm 0.3$ , u odnosu na nediferentovane ćelije ( $\emptyset$ ) kod kojih odnos FL3/FL1 iznosi 1. Porast odnosa FL3/FL1 ukazuje na pojavu kiselih vezikula, što najverovatnije ukazuje na pojavu autofagolizozoma u citoplazmi ispitivanih ćelija, tj. indukciju autofagije.



**Slika 18. Prekomerna sinteza ASYN dovodi do indukcije autofagije u diferentovanim ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y.**  $\alpha$ -syn-,  $\alpha$ -syn+ i  $\beta$ -gal ćelije su diferentovane pomoću RA (20  $\mu$ M) u periodu od 6 dana. Prisustvo unutarćelijskih kiselih vezikula obojenih akridin oranž bojom ispitivana je protočnom citofluorimetrijom. Prikazani su reprezentativni histogrami dobijeni iz 3 nezavisna eksperimenta (nediferentovane ćelije (Ø), diferentovane (RA) ćelije). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost iz 3 različita eksperimenta  $\pm$  S.D.

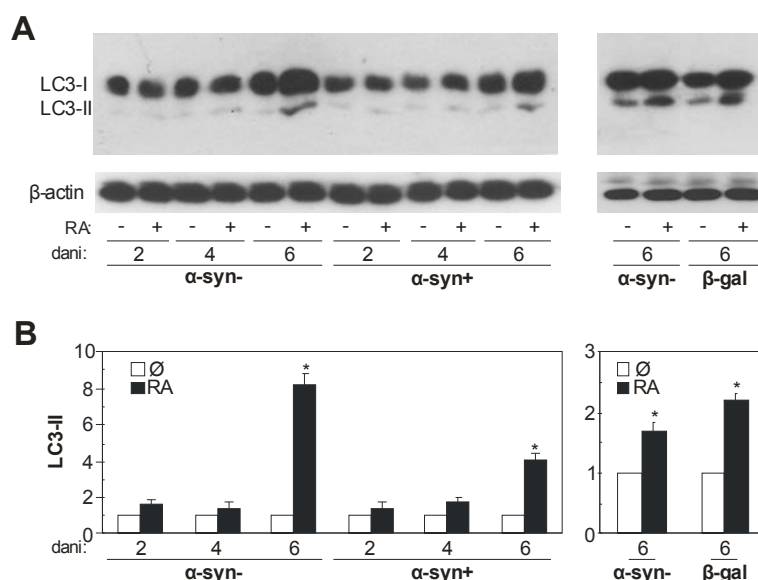
Pored ovoga, prisustvo autofagije u diferentovanim  $\alpha$ -syn- i  $\beta$ -gal ćelijama je potvrđeno i primenom transmisione elektronske mikroskopije (TEM). Naime, ultrastrukturne promene u ćelijama ukazuju na prisustvo tipičnih citoplazmatskih vezikula sa jednostrukom i dvostrukom membranom, koje sadrže delimično razgrađene komponente ćelija i ćelijskih organela, što je morfološka karakteristika autofagolizozoma (Slika 19).



**Slika 19. Prekomerna ekspresija ASYN indukuje pojavu vezikula sa delimično razgrađenim ćelijskim sadržajem.** TEM analiza (20  $\mu$ M; 2  $\mu$ M) ćelija humanog neuroblastoma nakon šestodnevne diferencijacije (RA, 20  $\mu$ M) pokazala je intenzivnu vakuolizaciju (slike gore) i vezikule koje liče na autofagolizozome u kojima je ćelijski sadržaj degradiran (slike dole).

Kako bi se potvrdila indukcija procesa autofagije, tehnikom imunoblota ispitivan je jedan od najčešće korišćenih markera za dokazivanje prisustva autofagije, protein LC3 (engl. *microtubule associated protein 1 light chain 3*, LC3). Naime, protein Atg 4 proteolitički deluje na karboksi-terminalni kraj LC3 prevodeći ga u LC3-I. Potom se LC3-I kovalentno konjuguje sa fosfatidil-etanolaminom gradeći LC3-II, koji se specifično inkorporira u fagoforu i ostaje vezan za membranu autofagozoma i autofagolizozoma (Rubinsztein i sar., 2009). Zato se smatra da nivo LC3-II korelira sa brojem zrelih autofagozoma (Kabeya i sar., 2000).

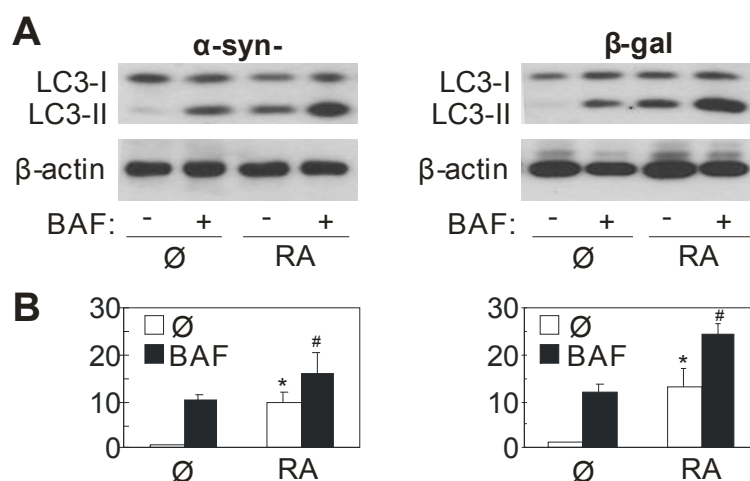
Za potrebe ovog eksperimenta, ćelije su diferentovane pomoću RA u vremenskim intervalima od 2, 4 i 6 dana, a značajan porast nivoa LC3-II proteinske frakcije je pokazan nakon 6 dana diferencijacije ćelija neuroblastoma koje prekomerno produkuju ASYN ( $\alpha$ -syn-), ali i u kontrolnim ćelijama ( $\alpha$ -syn+ i  $\beta$ -gal). Kod diferentovanih  $\alpha$ -syn- ćelija (RA) se uočava porast u konverziji LC3-I u LC3-II u odnosu na nediferentovane ćelije ( $\emptyset$ ) (Slika 20 A), što je potvrđeno denzitometrijskom analizom, koja je pokazala da je povećanje u nivou LC3-II oblika proteina kod diferentovanih  $\alpha$ -syn- ćelija statistički značajno ( $8.9 \pm 0.47$ ) u odnosu na nediferentovane ćelije za koje je nivo LC3-II arbitrarno sveden na 1 ( $p < 0.05$ ) (Slika 20 B).



**Slika 20. Prekomerna sinteza ASYN dovodi do konverzije LC3-I u LC3-II, markera autofagije, u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y.**  $\alpha$ -syn-,  $\alpha$ -syn+ i  $\beta$ -gal ćelije su diferentovane pomoću RA (20  $\mu$ M) u periodu od 2, 4 i 6 dana. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz 3 nezavisna eksperimenta (A), kao i njihove denzitometrijske analize (B) (\* $p < 0.05$ , diferentovane ćelije (RA) u odnosu na nediferentovane ( $\emptyset$ ) ćelije).

Kao što je ranije pomenuto, porast nivoa LC3-II u ćeliji može biti uzrokovan formiranjem autofagozoma. Međutim, može ukazati i na smanjenje autofagne proteolize tj. zastoja u razgradnji LC3-II u autofagolizozomima. Naime, LC3-II se nalazi sa obe strane membrane autofagozoma, tako da se, nakon fuzije sa lizozomima, LC3-II prisutan na luminalnoj strani autofagozoma razgrađuje. U slučaju smanjene ili spore fuzije autofagozoma i lizozoma, ili u slučaju smanjene proteolitičke sposobnosti lizozoma, može doći do zastoja u razgradnji LC3-II (Rubinshtein i sar., 2009). Da bismo ispitali koji je od ova dva mehanizma doveo do porasta nivoa LC3-II u našem modelu, dalje je analiziran nivo LC3-II frakcije proteina u prisustvu inhibitora proteolize bafilomicina A1, inhibitora protonske pumpe koji dovodi do smanjene acidifikacije lizozoma i posledične blokade u proteolizi.

Imunoblot analizom je pokazano da nakon 8-časovnog tretmana bafilomicinom A1 (2 nM), u  $\alpha$ -syn- i  $\beta$ -gal ćelijama dolazi do očekivanog povećavanja nivoa LC3-II frakcije proteina, dok je u uslovima diferencijacije pomoću RA dodatno intenzivirana konverzija iz LC3-I u LC3-II oblik (Slika 21 A). Dobijeni rezultati su potvrđeni denzitometrijskom analizom imunoblotova (Slika 21 B).



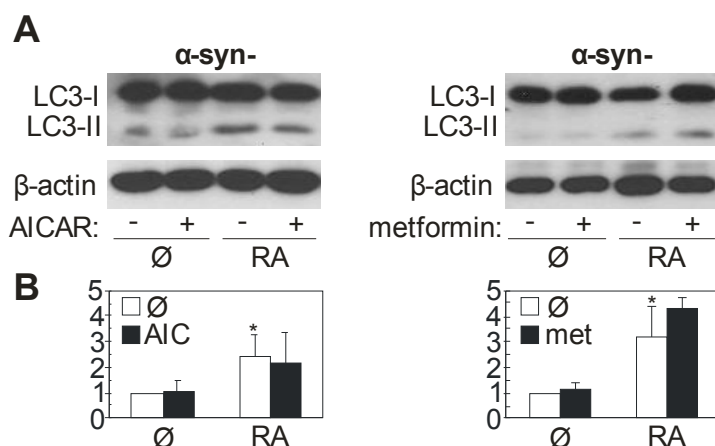
**Slika 21. Prekomerna sinteza ASYN dovodi do povećanja autofagnog fluksa u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y.**  $\alpha$ -syn- i  $\beta$ -gal ćelije su diferentovane pomoću RA (20  $\mu$ M) u periodu od 6 dana. Ćelije su gajene u prisustvu bafilomicina A1 (2 nM) poslednjih 8 sati. Nivo konverzije LC3-I u LC3-II verifikovan je imunoblot tehnikom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz 3 nezavisna eksperimenta (A), kao i njihove denzitometrijske analize merene ImageJ programom (B) (\* $p < 0.05$ , diferentovane (RA) ćelije u odnosu na nediferentovane (Ø) kontrole; # $p < 0.05$ , diferentovane ćelije tretirane sa BAF (RA + BAF) u odnosu na netretirane diferentovane (RA) ćelije).

Ovaj rezultat ukazuje da prekomerna sinteza ASYN u diferentovanim  $\alpha$ -syn-ćelijama povećava autofagni fluks, odnosno da je povećanje zastupljenosti LC3-II oblika proteina posledica indukcije procesa autofagije, a ne nakupljanja autofagolizozoma usled neefikasne i/ili nekompletne razgradnje proteina.

#### 4.3.2. Citoprotektivni efekat aktivacije AMPK nije povezan sa indukcijom autofagije u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y

Prethodnim eksperimentima je pokazano da prekomerna sinteza ASYN dovodi do indukcije autofagije, a da, sa druge strane, farmakološka aktivacija AMPK ima neuroprotektivni efekat na ćelije humanog neuroblastoma koje prekomerno eksprimiraju ASYN. Imajući u vidu da aktivacija AMPK dovodi do indukcije procesa autofagije (Vucicevic i sar., 2011), dalje je ispitivano da li je indukcije autofagije jedan od mehanizama zaštite ćelija od štetnog uticaja nagomilavanja ASYN.

Indukcija autofagije je ispitivana u diferentovanim ćelijama koje prekomerno sintetišu ASYN ( $\alpha$ -syn-) imunoblot tehnikom, u uslovima delovanja AMPK aktivatora, AICAR-a (0.125 mM) i metformina (4 mM). Nasuprot očekivanjima, delovanje farmakoloških aktivatora AMPK nije dovelo do povećanog pretvaranja LC3-I u LC3-II u diferentovanim  $\alpha$ -syn- ćelijama (Slika 22 A), što je potvrđeno denzitometrijskm analizom (Slika 22 B).



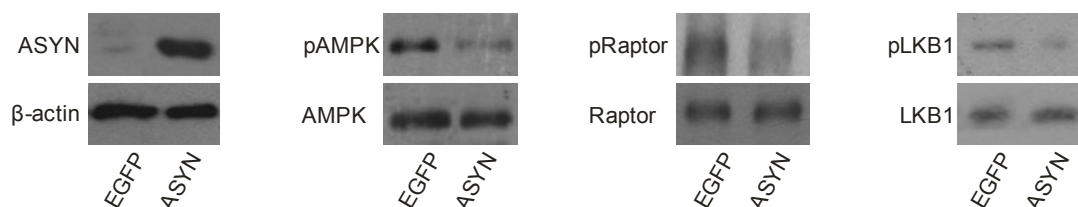
**Slika 22. Protektivni efekat aktivacije AMPK je nezavisan od indukcije autofagije.**  $\alpha$ -syn- ćelije su diferentovane pomoću RA (20  $\mu$ M) u periodu od 6 dana u prisustvu ili odsustvu AICAR-a (0.125 mM) ili metformina (met, 4 mM). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz 3 nezavisna eksperimenta (A), kao i njihove denzitometrijske analize (B) (\* $p < 0.05$ , diferentovane (RA) ćelije u odnosu na nediferentovane (Ø) kontrole).

Ovi rezultati ukazuju da je neuroprotektivno delovanje aktivacije AMPK nezavisno od indukcije autofagije u uslovima prekomerne ekspresije ASYN.

#### 4.4. ALFA-SINUKLEIN DOVODI DO SMANJENE AKTIVACIJE AMPK U PRIMARNIM NEURONIMA IZOLOVANIM IZ KORE VELIKOG MOZGA PACOVA

Za primarne neurone izolovane iz moždane kore pacova je pokazano da umiru usled toksičnog delovanja prekomernog nagomilavanja ASYN (Vekrellis i sar., 2009), kao što je to slučaj i sa ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanim u neuronski fenotip. Međutim, ono što do sada nije poznato je kako ASYN deluje na LKB1/AMPK/Raptor signalni put u ovim ćelijama.

Slično kao kod diferentovanih neuroblastomskih ćelija SH-SY5Y, imunoblot metodom je pokazano smanjenje u ekspresiji aktivnih/fosforilisanih formi sve tri kinaze (pLKB1, pAMPK i pRaptor) na primarnim neuronima izolovanim iz kore velikog mozga pacova, koji su transfekovani plazmidskom DNK kako bi prekomerno ekspimirali ASYN, u odnosu na kontrolno transfekovane neurone (koji ekspimiraju zeleni fluorescentni protein, EGFP) (Slika 23). Sveukupni nivo proteina je bio ujednačen, a potvrđena je i prekomerna produkcija ASYN nakon isključivanja doksiciklina (potvrda uspešne transfekcije). Dobijeni rezultati su potvrdili da i u drugom *in vitro* modelu, u uslovima prekomerne ekspresije ASYN nedvosmisleno dolazi do smanjenja aktivnosti signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor.



**Slika 23. Prekomerna ekspresija ASYN dovodi do smanjene aktivacije LKB1/AMPK/Raptor signalnog puta u primarnim neuronima izolovanim iz kore velikog mozga pacova.** Imunoblot tehnikom je detektovana ekspresija *wt* ASYN i fosforilacija/aktivacija proteina AMPK, Raptor i LKB1, kako u kontrolnim (EGFP) tako i u transfekovanim kortikalnim neuronima pacova (ASYN). Prezentovani su reprezentativni blotovi iz 3 nezavisna eksperimenta (transfekcije).

#### **4.5. ULOGA PROTEIN KINAZE AKTIVIRANE ADENOZIN MONOFOSFATOM (AMPK) U USLOVIMA NAGOMILAVANJA VANĆELIJSKOG ALFA-SINUKLEINA KOD ĆELIJA HUMANOG NEUROBLASTOMA SH-SY5Y**

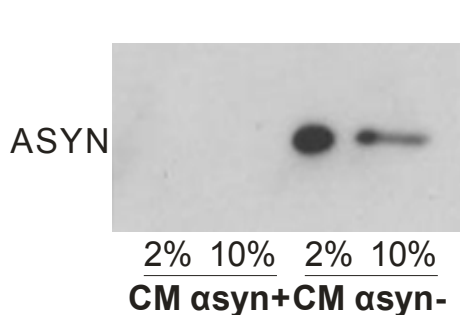
Sve donedavno, ASYN je smatran unutarćelijskim proteinom, koji svoje patogenetske efekte ispoljava isključivo unutar zahvaćenih neurona. Međutim, El-Agnaf i saradnici (2003; 2006) su pokazali da se u humanoj plazmi i cerebrospinalnoj tečnosti mogu detektovati kako monomerne, tako i oligomerne forme ovog proteina, i da bi se, u tom kontekstu, ASYN mogao posmatrati kao mogući biomarker Parkinsonove bolesti (PB) (El Agnaf i sar., 2006). Pored ovoga, pokazano je da neuroni gajeni u kulturi ćelija, kao i ćelije humanog neuroblastoma diferentovane u neuronski fenotip, mogu sekretovati ASYN u medijum u kom su kultivisane (Emmanouilidou i sar., 2010; Lee i sar., 2005). Ovo ukazuje na mogućnost sekrecije nagomilanog ASYN u vanćelijski prostor, kao i njegovo prenošenje na susedne ćelije, što bi mogao biti jedan od mehanizam širenja patološkog procesa u PB. S tim u vezi, sledeći segment ovog istraživanja se odnosio na ispitivanje toksičnog delovanja sekretovanog ASYN.

##### **4.5.1. Transfekovane ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y sekretuju alfa-sinuklein u vanćelijski medijum**

Ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y transfekovane plazmidskom DNK za prekomernu sintezu ASYN, kultivisane su 48 sati u medijumima sa 2 %, odnosno 10 % FBS, sa ili bez DOX. Sakupljen je medijum (engl. *conditioned medium*, CM) u kom su gajene  $\alpha$ -syn<sup>+</sup> (CM  $\alpha$ syn<sup>+</sup>) i  $\alpha$ -syn<sup>-</sup> (CM  $\alpha$ syn<sup>-</sup>) ćelije, a zatim je medijum sa 2 % FBS-a zamenjen uobičajenim medijumom koji sadrži 10 % FBS-a. Nakon liofilizacije pomenutih medijuma prisustvo ASYN u liofilizatima je analizirano primenom imunoblota. Može se zapaziti povećanje sekrecije ASYN kod ćelija koje su gajene u odsustvu DOX (aktivna je transkripcija gena koji kodira ASYN), međutim, uočava se i značajan porast nivoa ASYN u uslovima kultivisanja ćelija u

medijumu koji sadrži sniženu koncentraciju FBS (2 % FBS), u odnosu na standardni medijum sa 10 % FBS (Slika 24).

Stoga možemo zaključiti da se ASYN sekretuje u vanćelijsku tečnost, što je posebno izraženo u uslovima smanjenog sadržaja hranljivih materija, tj. niže koncentracije FBS, kao što je ranije opisano (Emmanouilidou i sar., 2010).



**Slika 24. Sekretija ASYN kod  $\alpha$ -syn+ i  $\alpha$ -syn- ćelija.**  $\alpha$ -syn+ i  $\alpha$ -syn- ćelije su gajene 48 sati u originalnim medijumima za ćelijske kulture koji su sadržali FBS u različitim koncentracijama (2 % i 10 %). Medijumi su sakupljeni (engl. *conditioned medium*, CM) od  $\alpha$ -syn+ (CM  $\alpha$ syn+) i  $\alpha$ -syn- (CM  $\alpha$ syn-) ćelija, a medijum sa 2 % FBS-a je vraćen na 10 % FBS-a. Vršena je liofilizacija medijuma do suve mase, a prisustvo vanćelijski sekretovanog ASYN u liofilizatima analizirano je imunoblot tehnikom.

#### 4.5.2. Vanćelijski alfa-sinuklein dovodi do smanjenog preživljavanja diferentovanih ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y

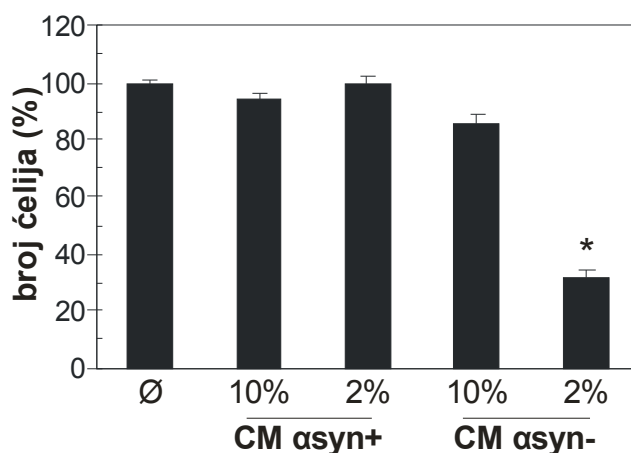
Imajući u vidu da je ranije pokazano da sekretovani ASYN može narušiti homeostazu neurona i uzrokovati njihovu smrt (Emmanouilidou i sar., 2010), dalje je ispitivano citotoksično delovanje vanćelijskog ASYN u našem modelu.

Nakon 6 dana diferencijacije sa RA, SH-SY5Y ćelije su tretirane različitim medijumima koji su sakupljeni od  $\alpha$ -syn+ (CM  $\alpha$ syn+) i  $\alpha$ -syn- (CM  $\alpha$ syn-) ćelija gajenih u uslovima sa 2 % i 10 % FBS. Nakon inkubacije od 48 sati, broj živih ćelija u uslovima povećane koncentracije vanćelijskog ASYN, određivan je kristal violet metodom. Vijabilitet SH-SY5Y ćelija tretiranih medijumom koji je sadržao 2 %, odnosno 10 % FBS, sakupljenim od  $\alpha$ -syn+ ćelija, iznosio je  $94.4 \pm 1.6\%$ , odnosno  $99.1 \pm 3.2\%$ , u odnosu na vijabilitet netretiranih ćelija, za koje smo arbitrarno uzeli da im je vijabilitet 100 %. U uslovima tretmana medijumom koji je sakupljen od  $\alpha$ -syn- ćelija koje prekomerno proizvode ASYN, vijabilitet SH-SY5Y ćelija tretiranih

medijumom sa 10 % FBS, iznosio je  $85.4 \pm 3.4$  %, dok je vijabilitet ćelija tretiranih medijumom sa 2 % FBS, iznosio svega  $31.1 \pm 3.4$  % (Slika 25).

Iz navedenog se vidi da značajno prisustvo ASYN u vanćelijskoj tečnosti dovodi do smanjenog preživljavanja diferentovanih neuroblastomskih ćelija ( $p < 0,05$ ) (Slika 25). Bitno je naglasiti da citotoksični efekat nije posledica smanjene koncentracije FBS, s obzirom da je medijumu, pre tretmana SH-SY5Y ćelija, koncentracija FBS vraćena na vrednost od 10 %.

Za dalje eksperimente korišćen je medijum koji je pokazao najveću koncentraciju sekretovanog ASYN i ujedno najveću citotoksičnost, dobijen kultivisanjem ćelija koje prekomerno proizvode ASYN u medijumu sa 2 % FBS.



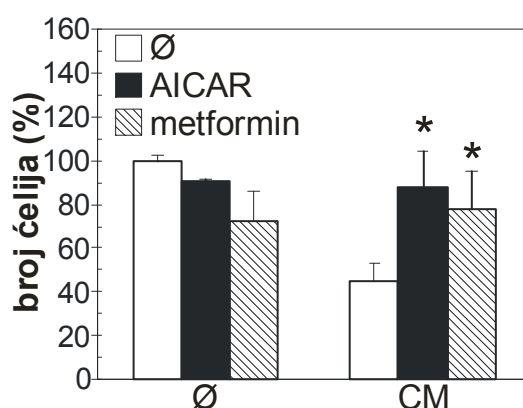
**Slika 25. Vanćelijski ASYN dovodi do smanjenja broja ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanih u neuronski fenotip.** SH-SY5Y ćelije su diferentovane pomoću RA ( $20 \mu\text{M}$ ) u periodu od 6 dana. Po završetku diferencijacije ćelije su tretirane medijuma sakupljenih od  $\alpha\text{-syn}^+$  (CM  $\alpha\text{syn}^+$ ) i  $\alpha\text{-syn}^-$  (CM  $\alpha\text{syn}^-$ ) ćelija gajenih u uslovima sa 2 % i 10 % FBS. Nakon 48 sati, ćelijski vijabilitet je ispitivan kristal violet testom. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost triplikata iz 3 reprezentativna uzorka  $\pm$  S.D. (\* $p < 0.05$ , tretirane ćelije (CM  $\alpha\text{syn}^-$ , 2 % FBS) u odnosu na netretiranu (Ø) kontrolu).

#### 4.5.3. Farmakološka aktivacija AMPK poboljšava preživljavanje ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y u uslovima prekomernog nagomilavanja vanćelijskog alfa-sinukleina

S obzirom da je aktivacija AMPK imala neuroprotektivno dejstvo u slučaju prekomerne sinteze unutarćelijskog ASYN, dalje je analiziran efekat primene

farmakoloških aktivatora AMPK, AICAR-a i metformina, u uslovima nagomilavanja vanćelijskog ASYN.

Nakon 6 dana diferencijacije sa RA, SH-SY5Y ćelije su tretirane medijumom koji sadrži sekretovan ASYN (CM) i gajene 48 sati u prisustvu i odsustvu AICAR-a (0.125 mM) ili metformina (4 mM). Najpre je ispitivan ćelijski vijabilitet kristal violet metodom, gde se može zapaziti da oba aktivatora dovode do značajnog porasta vijabiliteta ćelija, čime se skoro neutrališe štetni efekat vanćelijskog ASYN (Slika 26). Naime, vijabilitet diferentovanih ćelija tretiranih medijumom u kom se nalazi povećana koncentracija ASYN, iznosio je  $45.14 \pm 8.39 \%$ , u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu ćelija ( $\emptyset$ ), za koju se arbitrarno uzima da je vijabilitet 100 %. Primena AICAR-a dovela je do porasta broja ćelija na  $87.81 \pm 18.2 \%$ , dok je metformin povećao vijabilitet ćelija na  $77.95 \pm 17.9 \%$  u odnosu na netretirane ćelije ( $p < 0,05$ ) (Slika 26).

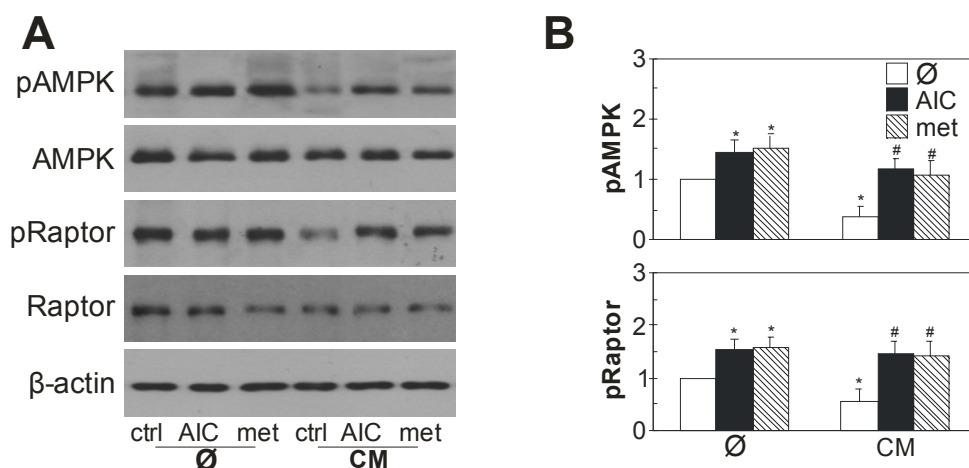


**Slika 26. AICAR i metformin dovode do povećanja broja ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanih u neuronski fenotip u uslovima povećane koncentracije vanćelijskog ASYN.** SH-SY5Y ćelije su diferentovane pomoću RA (20  $\mu$ M) u periodu od 6 dana. Po završetku diferencijacije ćelije su tretirane medijumom sa povećanom koncentracijom sekretovanog ASYN (CM) u prisustvu ili odsustvu AICAR-a (0.125 mM) ili metformina (4 mM). Nakon 48 sati, ćelijski vijabilitet je ispitivan kristal violet testom. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tripplikata iz 3 reprezentativna uzorka  $\pm$  S.D. (\* $p < 0.05$ , ćelije tretirane sa CM i AICAR-om ili metforminom, u odnosu na ćelije koje su tretirane samo sa CM).

Rezultati dobijeni ispitivanjem ćelijskog vijabiliteta su potvrđeni imunoblot tehnikom. Naime, pokazano je da se kod diferentovanih SH-SY5Y uočava smanjenje zastupljenosti aktivnih/fosforilisanih formi kinaza AMPK (pAMPK) i

Raptor (pRaptor) nakon tretiranja medijumom koji sadrži vanćelijski ASYN (CM). Takođe, imunoblot analize jasno pokazuju povećanje nivoa pAMPK i pRaptor nakon samostalne primene farmakoloških aktivatora AMPK (AICAR, metformin), kao i nakon primene ovih agenasa zajedno sa primenom medijuma koji sadrži povećanu koncentraciju vanćelijskog ASYN (CM). Zastupljenost ukupnih formi proteina ostala je nepromenjena (Slika 27 A). Denzitometrijskim analizama dobijenih imunoblotova potvrđena je značajnost u promeni nivoa ispitivanih proteina (Slika 27 B).

Ovi rezultati ukazuju na to da je mogući mehanizam citotoksičnosti vanćelijski sekretovanog ASYN preko kompromitovanja fosforilacije i aktivacije AMPK/Raptor signalnog puta; kao i uticajem na protektivni efekat farmakoloških aktivatora AMPK, što odgovara rezultatima dobijenim u slučaju prekomernog nakupljanja unutarćelijskog ASYN.



**Slika 27. AICAR i metformin dovode do povećane zastupljenosti fosforilisane/aktivne forme AMPK (pAMPK), kao i nishodne kinaze Raptor (pRaptor) u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y u uslovima povećane koncentracije vanćelijskog ASYN.** SH-SY5Y ćelije su diferentovane pomoću RA (20  $\mu$ M) u periodu od 6 dana. Po završetku diferencijacije, ćelije su tretirane medijumom sa povećanom koncentracijom vanćelijskog ASYN (CM) u prisustvu ili odsustvu AICAR-a (AIC, 0.125 mM) ili metformina (met, 4 mM). Nakon 48 sati, nivoi aktivnih formi enzima AMPK (pAMPK) i Raptor (pRaptor) su verifikovani imunoblot tehnikom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz 3 nezavisna eksperimenta (A), kao i njihove denzitometrijske analize merene ImageJ programom (B) (\* $p < 0.05$ , ćelije tretirane AICAR-om (AIC) ili metforminom (met) u odnosu na netretirane kontrole; # $p < 0.05$ , ćelije tretirane AICAR-om ili metforminom (CM + AIC; CM + met) u odnosu na ćelije koje su tretirane sam medijumom (CM) sa vanćelijskim ASYN).

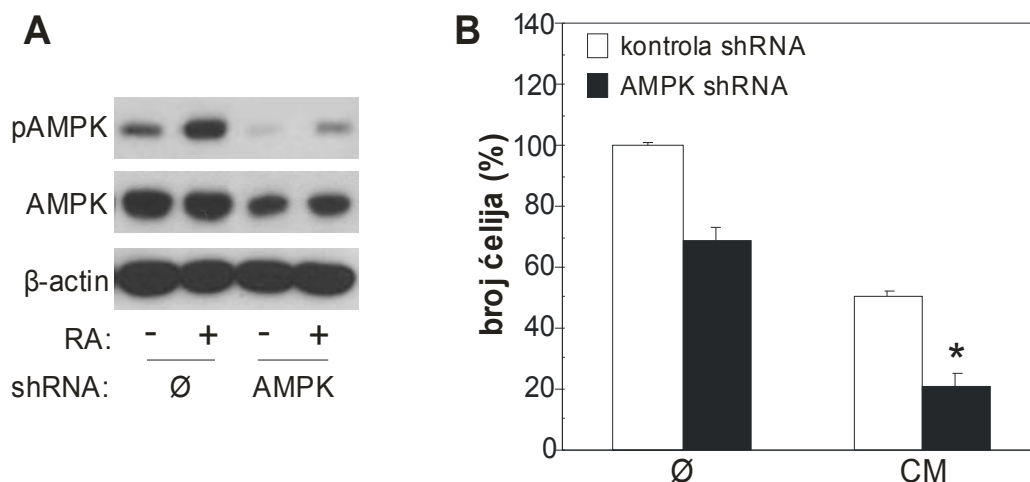
#### **4.5.4. Smanjena ekspresija gena za AMPK dovodi do povećane osetljivosti ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y na delovanje vanćelijskog alfa-sinukleina**

Da bi se dalje potvrdilo neuroprotektivno delovanje aktivacije AMPK korišćene su ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y kojima je utišan gen (smanjena ekspresija gena) za AMPK pomoću male ukosničaste RNK (engl. *short herpain RNA, shRNA*).

Naime, SH-SY5Y ćelije sa utišanim genom za AMPK (AMPK shRNA) su diferentovane u neuronski fenotip pomoću RA tokom 6 dana, a potom je tehnikom imunoblota proveravana ekspresija gena. Dobijeni imunoblotovi jasno pokazuju smanjene nivoe aktivne/fosforilisane i totalne forme AMPK kod ćelija sa utišanim genom za AMPK (AMPK shRNA) u odnosu da kontrolno transfekovane ćelije (kontrola shRNA). Takođe se zapaža povećanje nivoa aktivne/fosforilisane AMPK (pAMPK) tokom diferencijacije pomoću RA (Slika 28 A).

Da bismo ispitali kako vanćelijski ASYN deluje na vijabilitet SH-SY5Y ćelija kod kojih je smanjena ekspresija gena za AMPK, korišćena je kristal violet metoda. Ukratko, ćelije su nakon transfekcije diferentovane pomoću RA u periodu od 6 dana, a potom 48 sati kultivisane u medijumu sa povećanom koncentracijom vanćelijskog ASYN, nakon čega je određivan vijabilitet ćelija. Dobijeni rezultati su pokazali da je utišavanje gena za AMPK dovelo je do smanjenja broja diferentovanih SH-SY5Y, a dalje smanjenje ćelijskog vijabiliteta se zapaža usled citotoksičnog efekta vanćelijskog ASYN kod ćelija koje su tretirane medijumom sa visokim sadržajem ASYN (CM) (Slika 28 B). Naime, vijabilitet diferentovanih ćelija koje su kontrolno transfekovane malom ukosničastom RNK, a koje su tretirane medijumom u kom se nalazi povećana koncentracija ASYN (CM; kontrola shRNA), iznosio je  $50.3 \pm 1.4$  %, u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu ćelija (Ø; kontrola shRNA), za koju se arbitrarno uzima da je vijabilitet 100 %. Smanjena ekspresija gena za AMPK u uslovima povećane koncentracije vanćelijskog ASYN (CM; AMPK shRNA) dovela je do značajnog pada vijabiliteta transfekovanih SH-SY5Y ćelija na  $21.12 \pm 4.36$  % ( $p < 0,05$ ) (Slika 28 B).

Zajedno, ovi podaci potvrđuju toksičnost vanćelijskog ASYN, kao i uticaj ovog proteina na kompromitovanje signalnog puta AMPK u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y.



**Slika 28.** Utišavanje gena za AMPK dovodi do smanjenog vijabiliteta ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y u uslovima prekomernog nagomilavanja vanćelijskog ASYN. SH-SY5Y ćelije su transfekovane sa kontrolnom ili AMPK shRNA, a smanjena ekspresija gena za AMPK je potvrđena imunolot trhnikom, nakon diferencijacije ćelija sa RA (20  $\mu$ M) (A). Uspešno transfekovane SH-SY5Y ćelije su diferentovane 6 dana pomoću RA (20  $\mu$ M) u standardnom (Ø) medijumu, ili medijumu sa povećanom koncentracijom sekretovanog ASYN (CM). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tripplikata iz 3 reprezentativna uzorka  $\pm$  S.D. (\*p < 0.05, tretirane ćelije (CM) u odnosu na netretiranu (Ø) kontrolu).

#### 4.6. ULOGA PROTEIN KINAZE AKTIVIRANE ADENOSIN MONOFOSFATOM (AMPK) U USLOVIMA NAGOMILAVANJA VANĆELIJSKOG ALFA-SINUKLEINA KOD ĆELIJA FEOHROMOCITOMA PACOVA PC12

Ćelije feohromocitoma pacova PC12 u mnogome podsećaju na dopaminergičke neurone, te se smatraju dobrim *in vitro* modelom PB. Naime, kao hromafine ćelije srži nadbubrega, one imaju sposobnost sinteze i akumulacije dopamina u svojim vezikulama, kao i mogućnost njegove sekrecije mehanizmom koji zavisi od jona kalcijuma ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Greene i sar., 1977).

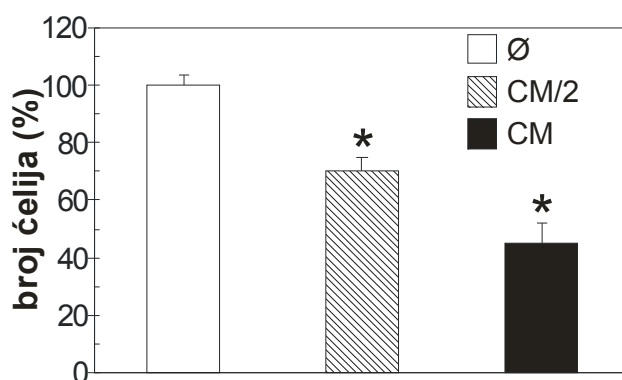
Radi dalje potvrde neurotoksičnog efekta vanćelijskog ASYN, kao i potencijalne protektivne uloge aktivacije AMPK, ispitivano je delovanje medijuma koji sadrži visoku koncentraciju sekretovanog ASYN (CM) na ćelije feohromocitoma pacova PC12.

#### **4.6.1. Vanćelijski alfa-sinuklein dovodi do smanjenog preživljavanja ćelija feohromocitoma pacova PC12**

Ranije je pokazano da izlaganje PC12 ćelija vanćelijskom ASYN dovodi do smrti ćelija mehanizmom u koji je uključena ciklin-zavisna kinaza 5 (Cdk5) (Czapski i sar., 2013), a najnovije studije pokazuju da vanćelijski ASYN dovodi do povećane fosforilacije Tau proteina i posledične smrti ovih ćelija (Gassowska i sar., 2014). U skladu sa tim, dalje smo ispitivali preživljavanje PC12 ćelija u uslovima povećane koncentracije vanćelijskog ASYN.

Ukratko, nakon zasejavanja, PC12 ćelije su tretirane medijumom koji sadrži sekretovan ASYN (CM), kao i medijumom koji predstavlja dvostruko razblaženje CM standardnim medijumom (CM/2), gde bi trebalo da je i koncentracija vanćelijskog ASYN duplo manja. Nakon inkubacije od 48 sati, broj živih ćelija u uslovima povećane koncentracije vanćelijskog ASYN, određivan je kristal violet metodom. Vijabilitet PC12 ćelija tretiranih medijumom sa dvostruko manjim sadržajem vanćelijskog ASYN (CM/2), iznosio je  $70 \pm 4.5 \%$  u odnosu na vijabilitet netretiranih ćelija, za koje smo arbitrarno uzeli da im je vijabilitet 100 % ( $\emptyset$ ). U skladu sa tim, vijabilitet PC12 ćelija tretiranih medijumom koji je standardno korišćen kao izvor sekretovanog ASYN (CM) bio je značajno niži i iznosio je  $45.2 \pm 7.1 \%$  ( $p < 0,05$ ) (Slika 29).

Iz ovoga možemo zaključiti da prekomerno nagomilavanje ASYN u vanćelijskom prostoru, dovodi do značajnog pada vijabiliteta ne samo SH-SY5Y neuroblastomskih ćelija diferentovanih u neuronski fenotip, nego i ćelija feohromocitoma pacova PC12, sličnih neuronima. Takođe, pad vijabiliteta PC12 ćelija korelira sa povećanim sadržajem vanćelijskog ASYN.



**Slika 29. Vanćelijski ASYN dovodi do smanjenja broja ćelija feohromocitoma pacova PC12.** PC12 ćelije su tretirane medijumom koji sadrži sekretovan ASYN (CM), kao i njegovim dvostrukim razblaženjem sa standardnim medijumom (CM/2). Nakon 48 sati, ćelijski vijabilitet je ispitivan kristal violet testom. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost triplikata iz 3 reprezentativna uzorka  $\pm$  S.D. (\* $p < 0.05$ , tretirane ćelije (CM; CM/2) u odnosu na netretiranu (Ø) kontrolu).

#### **4.6.2. Farmakološka aktivacija AMPK poboljšava preživljavanje ćelija feohromocitoma pacova PC12 u uslovima prekomernog nagomilavanja vanćelijskog alfa-sinukleina**

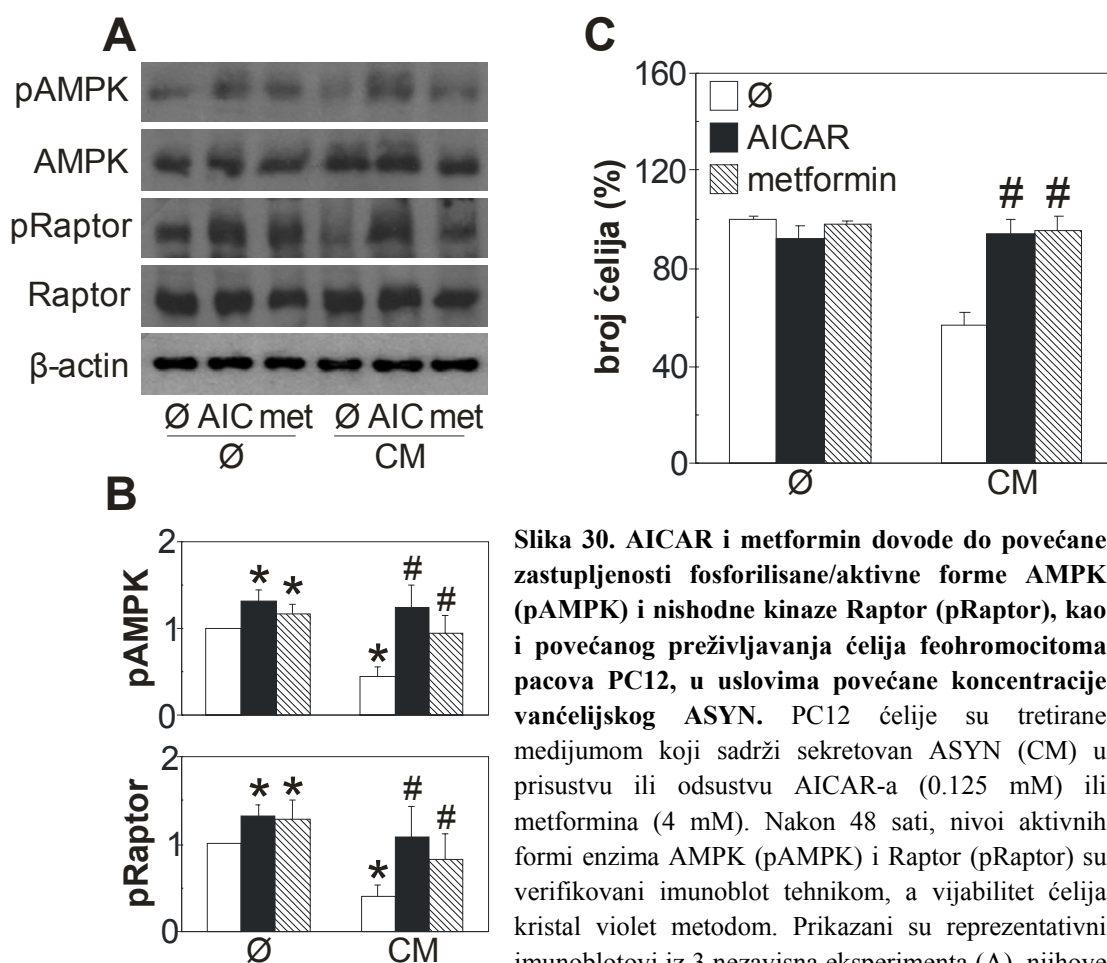
Imajući u vidu da je aktivacija AMPK imala neuroprotektivno dejstvo u slučaju prekomernog nagomilavanja vanćelijskog ASYN kod SH-SY5Y ćelija, dalje je analiziran efekat primene farmakoloških aktivatora AMPK, AICAR i metformina, na PC12 ćelije, u uslovima nagomilavanja vanćelijskog ASYN.

Ukratko, PC12 ćelije su tretirane medijumom koji sadrži sekretovan ASYN (CM) u trajanju od 48 sati, u prisustvu ili odsustvu AICAR-a (0.125 mM) ili metformina (4 mM). Posmatrajući rezultate dobijene ispitivanjem ćelijskog vijabiliteta kristal violet metodom, može se zapaziti da oba aktivatora AMPK dovode do značajnog povećanja vijabiliteta PC12 ćelija u uslovima prekomernog nagomilavanja vanćelijskog ASYN (Slika 30 C).

Rezultati dobijeni ispitivanjem ćelijskog vijabiliteta su potvrđeni imunoblot tehnikom. Naime, imunoblot analize jasno pokazuju da kod ćelija feohromocitoma pacova PC12 dolazi do smanjenja zastupljenosti aktivnih/fosforilisanih formi kinaza AMPK (pAMPK) i Raptor (pRaptor) nakon tretiranja medijumom koji sadrži vanćelijski ASYN (CM). Takođe, imunoblot analize pokazuju očekivano povećanje

nivoa pAMPK i pRaptor nakon primene farmakoloških aktivatora AMPK (AICAR, metformin) u prisustvu ili odsustvu medijuma koji sadrži povećanu koncentraciju vanćelijskog ASYN (CM). Zastupljenost ukupnih formi proteina ostala je nepromenjena (Slika 30 A). Denzitometrijskim analizama dobijenih imunoblotova potvrđena je značajnost u promeni nivoa ispitivanih proteina (Slika 30 B).

Dobijeni rezultati potvrđuju neuroprotektivni efekat farmakološke aktivacije AMPK u uslovima prekomernog nagomilavanja vanćelijskog ASYN.



**Slika 30. AICAR i metformin dovode do povećane zastupljenosti fosforilisane/aktivne forme AMPK (pAMPK) i nishodne kinaze Raptor (pRaptor), kao i povećanog preživljavanja ćelija feohromocitoma pacova PC12, u uslovima povećane koncentracije vanćelijskog ASYN.** PC12 ćelije su tretirane medijumom koji sadrži sekretovan ASYN (CM) u prisustvu ili odsustvu AICAR-a (0.125 mM) ili metformina (4 mM). Nakon 48 sati, nivoi aktivnih formi enzima AMPK (pAMPK) i Raptor (pRaptor) su verifikovani imunoblot tehnikom, a vijabilitet ćelija kristal violet metodom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz 3 nezavisna eksperimenta (A), njihove denzitometrijske analize merene ImageJ programom (B), kao i srednje vrednosti triplikata iz 3

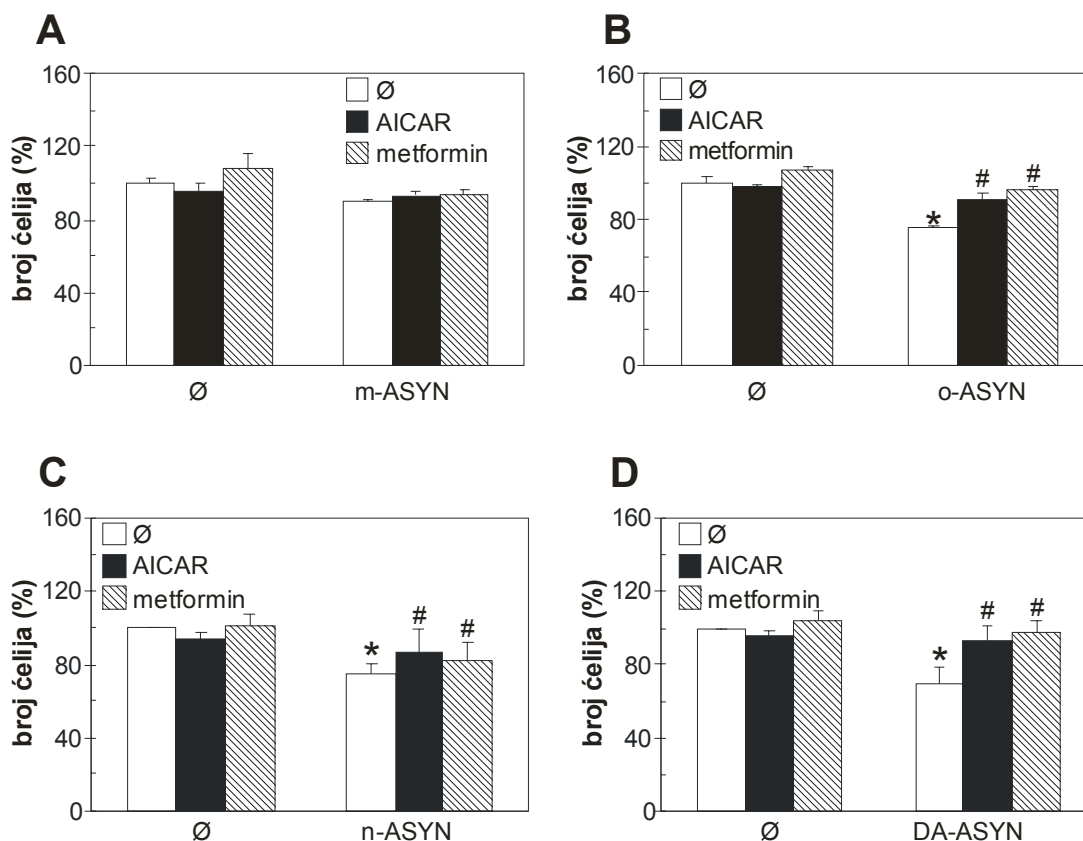
reprezentativna uzorka  $\pm$  S.D. (C) (\* $p < 0.05$ , ćelije tretirane AICAR-om ili metforminom (met) u odnosu na netretirane kontrole; # $p < 0.05$ , ćelije tretirane AICAR-om ili metforminom (CM + AICAR; CM + met) u odnosu na ćelije koje su tretirane samo medijumom (CM) sa vanćelijskim ASYN).

#### **4.7. ULOGA PROTEIN KINAZE AKTIVIRANE ADENOZIN MONOFOSFATOM (AMPK) U USLOVIMA DELOVANJA REKOMBINANTNOG ALFA-SINUKLEINA I NJEGOVIH MODIFIKOVANIH OBLIKA**

Prethodnim istraživanjima je pokazano da rekombinantno sintetisan ASYN može biti unet u ćelije ako se doda u medijum u kom se ćelije kultiviraju (Luk i sar., 2009). Šta više, ako se koriste dovoljno visoke koncentracije rekombinantnog ASYN (mnogo veće od fiziološke vrednosti), ćelije koje su endocitozom unele ASYN, podležu smrti (Sung i sar., 2001). Uzevši to u obzir, korišćeni su monomerni (m-ASYN), oligomerni (o-ASYN), dopaminski modifikovan (DA-ASYN) i nitrozilirani (n-ASYN) rekombinantni *wt* ASYN da bi se ispitala njihova toksičnost i uticaj na AMPK signalni put u ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanim u neuronski fenotip.

Naime, SH-SY5Y ćelije su diferentovane pomoću RA tokom 6 dana, a potom su inkubirane sa monomernom (m-ASYN; 5  $\mu$ M), oligomernim (o-ASYN; 5  $\mu$ M), dopaminski modifikovanim (DA-ASYN; 5  $\mu$ M) i nitroziliranim (n-ASYN; 5  $\mu$ M) oblikom rekombinantnog *wt* ASYN, u prisustvu ili odsustvu AICAR-a (0.125 mM) ili metformina (4 mM). Ispitivanjem ćelijskog vijabiliteta kristal violet metodom, pokazano je da o-ASYN, DA-ASYN i n-ASYN dovode do značajnog smanjenja broja SH-SY5Y ćelija u kulturi (Slika 31 B-D), dok m-ASYN nije značajno uticao na vijabilitet ćelija (Slika 31 A). Naime, vijabilitet diferentovanih ćelija tretiranih sa o-ASYN iznosio je  $75.55 \pm 0.68$  %; vijabilitet ćelija nakon tretmana sa n-ASYN bio je nešto niži ( $74.1 \pm 2.23$  %); dok se DA-ASYN pokazao kao najtoksičniji oblik rekombinantnog *wt* ASYN dovodeći do pada vijabiliteta tretiranih ćelija na  $69.23 \pm 2.23$  %; a sve u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu ćelija ( $\emptyset$ ), za koju se arbitrarno uzima da je vijabilitet 100 %. Oba aktivatora AMPK (AICAR i metformin) dovode do značajno povećanog preživljavanja ćelija, kako onih gajenih u uslovima vanćelijskog nagomilavanja oligomernog oblika ASYN (o-ASYN) (Slika 31 B), tako i onih gajenih u uslovima vanćelijskog nagomilavanja

nitroziliranog oblika ASYN (n-ASYN) (Slika 31 C) i dopaminski modifikovanog oblika ASYN (DA-ASYN) (Slika 31 D).

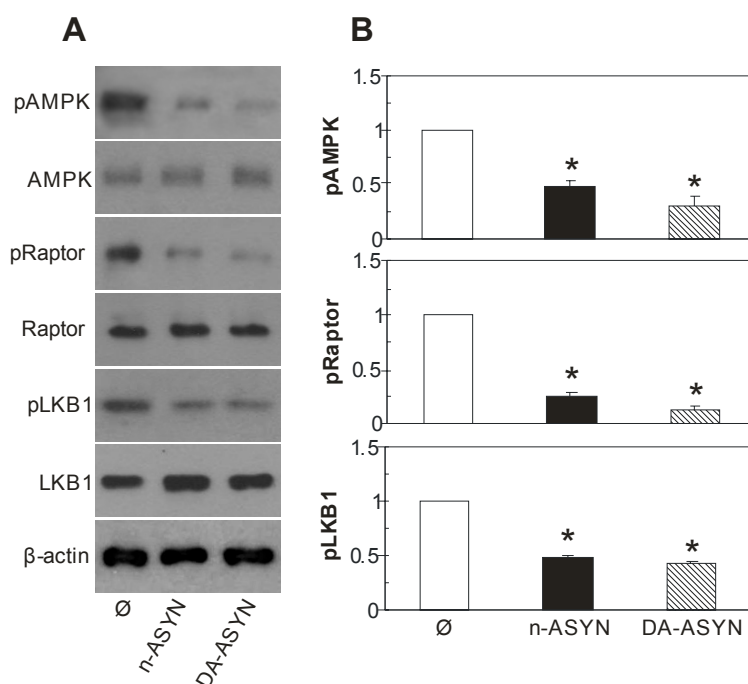


**Slika 31.** AICAR i metformin dovode do povećanog preživljavanja ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanih u neuronski fenotip u uslovima vanćelijskog nagomilavanja modifikovanih oblika rekombinantnog wt ASYN. SH-SY5Y ćelije su diferentovane pomoću RA (20  $\mu$ M) u periodu od 6 dana. Po završetku diferencijacije, ćelije su tretirane monomernim (m-ASYN; 5  $\mu$ M) (A), oligomernim (o-ASYN; 5  $\mu$ M), nitroziliranim (n-ASYN; 5  $\mu$ M) (C) i dopaminski modifikovanim (DA-ASYN; 5  $\mu$ M) (D) oblikom rekombinantnog wt ASYN u prisustvu ili odsustvu AICAR-a (0.125 mM) ili metformina (4 mM). Nakon 48 sati, ćelijski vijabilitet je ispitivan kristal violet testom. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost triplikata iz 3 reprezentativna uzorka  $\pm$  S.D. (\* $p$  < 0.05, ćelije tretirane sa o-ASYN, n-ASYN ili DA-ASYN, u odnosu na netretiranu kontrolnu (Ø) grupu ćelija; # $p$  < 0.05, ćelije tretirane AICAR-om ili metforminom (o-ASYN/n-ASYN/DA-ASYN + AICAR; o-ASYN/n-ASYN/DA-ASYN + metformin), u odnosu na ćelije koje su tretirane samo modifikovanim (o-ASYN; n-ASYN; DA-ASYN) rekombinantnim ASYN).

Imajući u vidu da su n-ASYN i DA-ASYN pokazali veću toksičnost, dalje je ispitivana aktivnost LKB1/AMPK/Raptor signalnog puta tehnikom imunoblota u uslovima vanćelijskog nagomilavanja n-ASYN i DA-ASYN (Slika 32 A, B). Dobijeni imunoblotovi jasno pokazuju da obe forme rekombinantnog wt ASYN,

uzrokuju smanjenje nivoa fosforilisanih/aktivnih formi enzima AMPK (pAMPK), Raptor (pRaptor) i LKB1 (pLKB1) kod SH-SY5Y ćelija diferentovanim u neuronski fenotip. Ukupne forme proteina su ostale nepromenjene tokom tretmana (Slika 32 A). Denzitometrijskim analizama dobijenih imunoblotova potvrđena je statistička značajnost u promenama nivoa pomenutih proteina (Slika 32 B).

Uzimajući u obzir sve navedeno, rezultati ukazuju na neurotoksično delovanje modifikovanih oblika ASYN prisutnih u vanćelijskoj tečnosti na diferentovane ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y; kao i da je mogući mehanizam te citotoksičnosti povezan sa smanjenjem aktivacije signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor.



**Slika 32. Modifikovani oblici vanćelijskog ASYN dovode do smanjene aktivacije LKB1/AMPK/Raptor signalnog puta kod ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanih u neuronski fenotip.** SH-SY5Y ćelije su diferentovane pomoću RA (20  $\mu$ M) u periodu od 6 dana, a potom tretirane nitroziliranim (n-ASYN; 5  $\mu$ M) i dopaminski modifikovanim (DA-ASYN; 5  $\mu$ M) oblikom rekombinantnog *wt* ASYN. Nakon 48 sati, nivoi aktivnih formi enzima AMPK (pAMPK), Raptor (pRaptor) i LKB1 (pLKB1) su verifikovani imunoblot tehnikom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz 3 nezavisna eksperimenta (A), njihove denzitometrijske analize merene ImageJ programom (B) (\* $p < 0.05$ , ćelije tretirane sa n-ASYN ili DA-ASYN, u odnosu na netretiranu kontrolnu (Ø) grupu ćelija).

## 5. DISKUSIJA

U ovom istraživanju se po prvi put opisuje da aktivacija protein kinaze aktivirane adenozim monofosfatom (AMPK) ima neuroprotektivnu ulogu u uslovima prekomernog nakupljanja kako unutarćelijskog, tako i vanćelijskog alfa-sinukleina, kao i njegovih modifikovanih formi u *in vitro* uslovima, ukazujući da bi jedan od mogućih pristupa za postizanje neuroprotektivnih efekata u Parkinsonovoj bolesti mogao biti modulacija aktivnosti signalnog puta AMPK.

Naime, pokazano je da prekomerna sinteza ASYN unutar ćelija, kao i vanćelijsko nagomilavanje sekretovanog ASYN, dovodi do smrti ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanih u neuronski fenotip, što je praćeno morfološkim i ultrastrukturnim promenama ćelija, aktivacijom kaspaza i fragmentacijom DNK, i ukazuje da je mogući mehanizam umiranja ćelija programirana ćelijska smrt tip I, apoptoza. Mogući mehanizam neurotoksičnog delovanja ASYN je preko smanjenja aktivnosti signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor, što je pokazano i na primarnim neuronima izolovanim iz kore velikog mozga pacova. Farmakološki aktivatori AMPK, 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleotida (AICAR) i N, N-dimetilimidodikarbonimidičnog diamid hidrohlorida (metformin), koji su uzrokovali delimičan oporavak aktivnosti signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor značajno su poboljšali preživljavanje ćelija u uslovima prekomerne ekspresije unutarćelijskog i nakupljanja vanćelijskog ASYN. Iako je ASYN doveo do smanjenja aktivacije PI3K-zavisnog signalnog puta Src/Akt i indukcije autofagije, neuroprotektivno delovanje farmakoloških aktivatora AMPK, bilo je nezavisno od ovih mehanizama. Smanjenje aktivnosti signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor je potvrđen i u uslovima delovanja vanćelijskog ASYN ćelije feohromocitoma pacova PC12, kao i primenom rekombinantnog ASYN i njegovih modifikovanih oblika (dopaminski modifikovan ASYN, DA-ASYN, i nitrozilirani oblik ASYN, n-ASYN) na ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovane u neuronski fenotip.

Za potrebe ovog istraživanja, korišćen je *in vitro* model Parkinsonove bolesti, tj. ćelije humanog neuroblastoma koje kontrolisano prekomerno sintetišu normalan (nemutiran) oblik *wt* ASYN, a koje su diferentovane u neuronski fenotip pomoću *all trans* retinoične kiseline. Model je originalno nastao laboratoriji profesora Leonidas Stefanis, Medicinski fakultet, Univerzitet u Atini, Grčka (Vekrellis i sar., 2009), usled potrebe za otkrivanje mehanizma delovanja ASYN i eventualnog pronalaženja efikasnog tretmana koji bi umanjio štetne efekte ovog neurotoksičnog proteina i ublažio patološke procese koji prate PB.

### **5.1. PREKOMERNA SINTEZA ALFA-SINUKLEINA DOVODI DO SMRTI ĆELIJA HUMANOG NEUROBLASTOMA SH-SY5Y DIFERENTOVANIH U NEURONSKI FENOTIP**

Kao što je prethodno navedeno, jedan od karakterističnih fenomena koji prate nastanak i razvoj Parkinsonove bolesti (PB) je nakupljanje alfa-sinukleina (ASYN) i nastanak njegovih agregata. U skladu s tim, najvažniji patohistološki nalaz u PB su Levijeva tela, koja se većinski sastoje od različitih formi ASYN (Dauer i sar., 2003). Naime, pokazano je da su tačkaste mutacije u genu koji kodira ASYN (SNCA) (Polymeropoulos i sar., 1997), kao i duplikacije (Farrer i sar., 2004) i triplikacije pomenutog gena (Singleton i sar. 2003) u direktnoj vezi kako sa familijarnom, tako i sa sporadičnom formom bolesti, a dovode i do pojave bolesti u ranijem životnom dobu. Štaviše, pokazano je da polimorfizmi nukleotida u promotornom regionu na 3' kraju SNCA gena doprinose povećanju rizika za nastanak bolesti (Stefanoni i sar., 2011).

Iako do danas postoje podaci iz brojnih studija koje su se bavile ispitivanjem mehanizma smrti dopaminergičkih neurona koja je posledica delovanja mutirane i/ili nemutirane forme ASYN (*wt* ASYN), još uvek se ne može sa sigurnošću govoriti o mehanizmu neurotoksičnosti ASYN.

Podaci iz literature govore o više različitih mehanizama umiranja neurona zahvaćenih neurodegeneracijom u PB (Perier i sar., 2012). U različitim *in vitro*

modelima je pokazano da povećanje nivoa *wt* ASYN korelira sa pojavom markera apoptoze, kako u neuronima u kulturi (Saha i sar., 2000), tako i u mikroglijalnim ćelijama koje prekomerno sintetišu ASYN (Stefanova i sar., 2001), kao i u perifernim limfocitima dobijenim iz krvi pacijenata kojima je postavljena dijagnoza PB (Kim i sar., 2004). Uobičajeni pokazatelji apoptoze, kao što su kondenzacija hromatina, fragmentacija DNK molekula i oslobađanje citohroma *c* iz mitohondrija uočeni su i u modelu kvasca sa prekomernom ekspresijom *wt* ASYN (Flower i sar., 2005). U skladu sa tim, u *in vitro* modelu PB sa prekomernom ekspresijom ASYN, pokazano je da dolazi do inhibicije kompleksa I, oštećenja mitohondrija, i posledičnog oslobađanja citohroma *c* u citosol, što zajedno dovodi do apoptotske smrti ćelija mehanizmom koji ne uključuje aktivaciju kaspaza (Kountouras i sar., 2012; Vekrellis i sar., 2009). Takođe, u uslovima postojanja mutacije u genu koji kodira LRRK2 (PARK8), što je jedna od česće prisutnih mutacija koja se vezuje za nastanak PB, pokazano je da se mutirani protein LRRK2 vezuje za adaptor za unutarćelijski domen smrti, adaptorski protein FADD (engl. *Fas-associated protein with death domain*, *FADD*), i ta interakcija dovodi do aktivacije spoljašnjeg puta apoptoze preko kaspaze 8 (Ho i sar., 2009). Postoje podaci i da druge mutacije, čije je prisustvo ustanovljeno u familijarnoj formi PB (Parkin, PINK1, DJ-1), doprinose oštećenju mitohondrija i sledstvenom oksidativnom stresu, i pokreću apoptotski mehanizam smrti neurona. Međutim, ukoliko oštećenje mitohondrija nije takvog stepena da se pokrene apoptotska kaskada, u mitohondrijama se aktivira molekulski senzor oštećenja mitohondrija, kinaza indukovana PTEN-om (PINK1), koji na spoljašnjoj membrani mitohondrija za sebe vezuje Parkin, ubikvitin E3 ligazu (Youle i sar., 2012). Parkin dovodi do ubikvitinacije mnogih proteina spoljašnje membrane mitohondrija i tako mitohondrije postaju supstrat za autofagiju, tačnije, mitofagiju, čime se, u tom trenutku, sprečava pokretanje procesa apoptoze (Schapira 2012, Youle i sar., 2012). Mutacija PARK2 gena, koji kodira protein Parkin, a čiji je supstrat ASYN, dovodi do pojave nagomilavanja ASYN (Kitada i sar., 1998; Yamamoto i sar., 2005; Zou i sar., 2012). Brojne studije su pokazale da ASYN, vezujući se za dopaminske transportere (DAT), tirozin hidroksilazu i druge

intermedijere metabolizma dopamina, menja njihovu funkciju, i dovodi do posledične smrti neurona u PB (Ostrerova i sar., 1999; da Costa i sar., 2000).

U skladu sa navedenim podacima iz literature, rezultati ove studije su pokazali da u uslovima prekomerne sinteze ASYN dolazi do umiranja ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanih u neuronski fenotip. Naime, nagomilavanje ASYN je nakon šestodnevne diferencijacije ćelija u neuronski fenotip dovelo do smanjenja broja ćelija na 23 % u odnosu na ćelije kod kojih nije indukovana ekspresija gena za ASYN. Ispitivanje odnosa živih i mrtvih ćelija je pokazalo da je smanjenje broja ćelija bilo posledica ćelijske smrti, a ne usporavanja proliferacije usled diferentovanja ćelija u post-mitotične neurone. S obzirom da je na ovom *in vitro* modelu prethodno pokazano da prekomerna ekspresija nemutirane forme (*wt* ASYN) dovodi do smrti ćelija (Vekrellis i sar., 2009), dalje je ispitivan tip ćelijske smrti SH-SY5Y ćelija koje prekomerno sintetišu ASYN. Naime, kao što je ranije pomenuto, apoptoza, programirana ćelijska smrt, se karakteriše kondenzacijom hromatina (piknoza) što je praćeno fragmentacijom hromatina (karioreksa) sa intenzivnim pupljenjem ćelijske membrane i pojavom apoptotskih tela, pri čemu integritet membrane ostaje očuvan (Edinger i sar., 2004; Elmore i sar., 2007). Ovaj proces je najčešće praćen aktivacijom kaspaza, koje su odgovorne za aktivaciju endonukleaza i proteaza, što ima za posledicu internukleozomalnu fragmentaciju DNK i hidrolizu proteina citoskeleta i nukleusa, stvarajući citomorfološke promene karakteristične za apoptozu (Slee i sar., 2001). U skladu s tim, i rezultati ove studije govore da promene na ćelijama kao što su: aktivacija kaspaza, fragmentacija jedarne DNK, morfološke i ultrastrukturne promene ćelija (smanjivanje ćelijskog volumena, zaokrugljivanje ćelija i gubitak ćelijskih produžetaka, vakuolarna degeneracija, kondenzacija citoplazme i hromatina u jedru uz oštećenje mitohondrija), upućuju na neke od karakteristika apoptoze nastale kao rezultat delovanja ASYN. Dobijeni rezultati su u skladu sa dosadašnjim podacima iz literature, koji pokazuju da akumulacija ASYN dovodi do smrti neurona kod transgenih miševa (Giasson i sar., 2002), kao i da pan-kaspazni inhibitor z-VAD dovodi do spašavanja ćelija od toksičnog uticaja ASYN (Cappai i sar., 2005).

## 5.2. AKTIVACIJA AMPK DELUJE NEUROPROTEKTIVNO U USLOVIMA PREKOMERNOG NAKUPLJANJA ALFA-SINUKLEINA

Pokazano je da kod obolelih od Parkinsonove bolesti postoji smanjena aktivnost kompleksa I i degeneracija mitohondrija, kako u *substantia nigra mesencephalon*-a (Schapira i sar., 2012), tako i u frontalnom kotreksu (Parker i sar., 2008). Smanjena aktivnost mitohondrija doprinosi oštećenju neurona snižavajući energetske naboj ćelije (kapacitet mitohondrija za sintezu ATP-a) (Gispert i sar., 2009), dok oštećenje mitohondrija doprinosi oksidativnom stresu (Przedborski 1992), narušavajući homeostazu kalcijuma (Gandhi i sar., 2009; Marongiu i sar., 2009). Geni u kojima su identifikovane mutacije koje su karakteristične za PB (PINK1, DJ-1, LRRK-2, HTRA-2) kodiraju proteine koji svoju funkciju obavljaju u mitohondrijama, te stoga ove mutacije utiču na metabolizam i smanjenu aktivnost mitohondrija. Limfociti i fibroblasti dobijeni od pacijenata sa mutacijom u genu koji kodira Parkin (PARK2) pokazuju sniženu aktivnost kompleksa I, kao i smanjenu sintezu ATP-a (Muftuoglu i sar., 2004; Mortiboys i sar., 2008). U uzorcima ćelija sa mutacijom u genu koji kodira PINK1 (PARK 6) pokazano je smanjenje u broju mitohondrija (Gautier i sar., 2008) i poremećaj u oksidativnoj fosforilaciji (Gegg i sar., 2009), dok je kod ćelija sa mutacijom u genu za DJ-1 (PARK 7) pokazan porast oksidativnog stresa i posledično oštećenje mitohondrija (Guzman i sar., 2010). Takođe, protein DJ-1, koji ima ulogu proteina nadzornika (šaperona), štiti od pogrešnog uvijanja proteina i njihove agregacije, što je pokazano protektivnim delovanjem DJ-1 na smanjenu agregaciju ASYN (Batelli i sar., 2008).

Kod transgenih miševa je pokazano da prekomerno nakupljanje ASYN dovodi do gubitka morfologije i oštećenja funkcije mitohondrija (Martin i sar., 2006). Takođe, vezivanje ASYN za unutrašnju membranu mitohondrija, može da dovede do inhibicije kompleksa I lanca prenosilaca elektrona, što za posledicu ima gubitak membranskog potencijala mitohondrija i smanjenje kapaciteta za sintezu ATP-a (Banerjee i sar., 2010). Pokazano je da prekomerna sinteza ASYN, posebno mutirane forme ovog proteina, dovodi i do fragmentacije mitohondrija, što pokreće masivnu

mitofagiju, uklanjanje oštećenih mitohondrija i posledične smrti neurona (Choubey i sar., 2011).

Kao što je ranije pomenuto, značajan patogenetski činilac u nastanku PB predstavlja smanjenje kapaciteta za uklanjanje i razgradnju ASYN. Naime, ASYN razgrađuje prevashodno lizosomalnim mehanizmima - makroautofagijom i autofagijom posredovanom šaperonima (engl. *chaperone-mediated autophagy*, *CMA*). Osim toga što u osnovi formiranja agregata ASYN može da stoji disfunkcija sistema za razgradnju proteina, prekomerna sinteza ASYN može dodatno da kompromituje aktivnost ovih sistema. Naime, pokazano je da oligomeri ASYN mogu da dovedu do inhibicije mašinerije ubikvitin-proteaznog sistema za razgradnju proteina (Lindersson i sar., 2004; Emmanouilidou i sar., 2010a), dok mutirani oblici ASYN oštećuju funkciju lizozoma i time onemogućavaju funkcionisanje procesa autofagije posredovane šaperonima (Cuervo i sar., 2004; Xilouri i sar., 2009). Takođe, postoje podaci da nemutirana forma ASYN (*wt* ASYN) dovodi do inhibicije makroautofagije u njenom ranom stadijumu, onemogućavajući formiranje prve autofagne vezikule - fagofore (Winslow i sar., 2010).

Uz sve navedeno, ASYN zbog svoje nestabilne osnovne strukture, lako gradi lipofilne oligomere, koji mogu formirati pore u membrani presinaptičkih završetaka, dovesti do oštećenja voltažno-zavisnih jonskih kanala na presinaptičkoj membrani, što dovodi do ulaska kalcijuma u neurone, narušavajući njihovu homeostazu (Volles i sar., 2001; Danzer i sar., 2007). Po sličnom principu, oligomerni oblici ASYN mogu da se ugrade u sinaptičke vezikule i da dovedu do oslobađanja neurotransmitera dopamina u citosol, što može uzrokovati oksidativni stres i posledičnu smrt neurona. S obzirom da povećana koncentracija jona kalcijuma može takođe da dovede do oslobađanja dopamina iz vezikula, smatra se da ova tri faktora zajedno (povećanja koncentracija ASYN, kalcijuma i dopamina u citosolu) dovode do kaskadne reakcije koja vodi smrti neurona (Mosharov i sar., 2006; 2009).

Nema sumnje da usled nagomilavanja ASYN u neuronima pacijenata obolelih od PB, dolazi do degeneracije i smrti dopaminergičkih neurona, ali još uvek nije u potpunosti razjašnjen tačan mehanizam neurotoksičnog delovanja ASYN. Svi ranije

pomenuti procesi kojima ASYN može dovesti do oštećenja i smrti neurona, mogu se dovesti u vezu sa molekulom koji predstavlja najvažniji unutarćelijski energetska sensor, AMPK. Međutim, ovaj enzim, pored navedene uloge u regulisanju unutarćelijskog energetska balansa, ima brojne druge važne uloge u ćeliji, o čemu svedoče brojni signalni putevi u koje je uključen.

Pokazano je da je AMPK široko rasprostranjen enzim u svim delovima nervnog sistema, i da ima značajnu ulogu u razvoju i diferencijaciji neurona (Vingtdeux i sar., 2011a; Turnley i sar., 1999), kao i da je konstantno eksprimiran i funkcionalno aktivan, što je pokazano imunohistohemijskim analizama neurona (Salminen i sar., 2011). Takođe, pokazano je da aktivacija AMPK stimuliše biogenezu mitohondrija i dovodi do povećanja njihove aktivnosti u neuronima (Dasgupta i sar., 2007). Imajući u vidu da enzim AMPK može biti alosterno aktiviran u slučaju oštećenja mitohondrija i smanjenog generisanja energije (aktivacija regulatorne  $\gamma$  subjedinice pomoću AMP-a); da može biti aktiviran u slučaju porasta koncentracije kalcijuma u citosolu (fosforilacijom pomoću kalcijum/kalmodulin-zavisne kinaze  $\beta$ , CaMKK $\beta$ ) (Hawley i sar., 2005); kao i da je aktivacija AMPK blisko povezana sa indukcijom autofagije; mehanizam delovanja prekomerne ekspresije ASYN bi se mogao dovesti u vezu sa promenama u aktivaciji AMPK signalnog puta.

Rezultati dobijeni na ovom eksperimentalnom *in vitro* modelu sa prekomernom sintezom *wt* ASYN ukazuju na to da ASYN dovodi do smanjenja aktivnosti AMPK, tačnije utiče na smanjenu fosforilaciju/aktivaciju enzima uključenih u LKB1/AMPK/Raptor signalni put u ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanim u neuronski fenotip pomoću retinoične kiseline (RA). Smanjena aktivnost AMPK signalnog puta u uslovima prekomerne sinteze ASYN nedvosmisleno je pokazana i na primarnim kortikalnim neuronima izolovanim iz mozga pacova. Dodatnu potvrdu uloge AMPK u ovom modelu je predstavljala činjenica da je farmakološka aktivacija AMPK, pomoću AICAR i metformina, dovela do poboljšanja preživljavanja diferentovanih SH-SY5Y ćelija koje prekomerno produkuju ASYN. Naime, delovanjem AICAR preživljavanje ćelija se

povećalo na 71.72 %, dok je metformin doveo do povećanja vijabiliteta ćelija na čak 97.1 %, u odnosu na vijabilitet ćelija na koje je toksično delovao ASYN (54.9 %). Takođe, AICAR i metformin su uzrokovali ne samo povećanje aktivnosti AMPK, nego i njene nishodne kinaze Raptor. Ovi rezultati ukazuju na protektivnu ulogu AMPK u uslovima neurotoksičnog delovanja ASYN. Zaštitna uloga AMPK je pokazana i u drugim modelima PB, kao na primer u *in vitro* modelu neurotoksičnog oštećenja izazvanom delovanjem 1-metil-4-fenilpiridina (MPP+) (Choi i sar., 2010), odnosno rotenona (Wu i sar., 2011). Takođe, u modelu Huntingtonove bolesti kod miša pokazano je da farmakološki aktivator AMPK, metformin, pospešuje preživljavanje neurona (Ma i sar., 2007). Slično tome, aktivacija AMPK drugim farmakološkim aktivatorom korišćenim u ovom istraživanju (AICAR), kao i rezveratrolom (aktivator AMPK/SIRT signalnog puta), dovela je do smanjenja produkcije amiloida  $\beta$  u kulturi primarnih neurona *in vitro* (Won i sar., 2010) usled indukcije autofagije i sledstvene razgradnje amiloida  $\beta$ , čime se smanjila mogućnost stvaranja amiloidnih plakova (Vingtdeux i sar., 2010; 2011a). Ipak, istraživanja uloge AMPK u modelu oštećenja neurona u uslovima nakupljanja ASYN dala su dvosmislene rezultate. Tako je pokazano da rezveratrol, zahvaljujući aktivaciji lizosomalnih sistema razgradnje ASYN pospešuje razgradnju *wt* ASYN u kulturi ćelija (Wu i sar., 2011). Nasuprot ovome, skorašnja istraživanja su pokazala da aktivacija AMPK indukovana laktatom može da dovede do povećanog nivoa ASYN u kulturi primarnih neurona, što ima za posledicu smanjenje dužine aksona, ali bez neposrednog uticaja na umiranje ćelija (Jiang i sar., 2013). Sve ovo ukazuje na kompleksan mehanizam delovanja AMPK u neurotoksičnom oštećenju izazvanim nagomilavanjem ASYN. Može se pretpostaviti da ključnu ulogu ima ravnoteža dva međusobno suprotstavljena mehanizma, neurotoksičnog efekta ASYN i protektivnog delovanja aktivacije AMPK, od koje verovatno zavisi da li će doći do smrti zahvaćenih ćelija. Treba, međutim, naglasiti da su farmakološki aktivatori AMPK pokazali bolje zaštitno delovanje u odnosu na druge agense za koji je poznato da mogu imati neuroprotektivni efekat, kao što su inhibitor tirozin hidroksilaze ( $\alpha$ -metil-DL-tirozin) i antioksidans askorbinska kiselina.

Imajući u vidu da posttranslaciona modifikacija proteina tj. fosforilacija serinskog ostatka ASYN na poziciji 129 (p-Ser129) predstavlja najčešću modifikaciju ASYN identifikovanu u Levijevim telima (Fujiwara i sar., 2002; Anderson i sar., 2006); kao i da je za neke kinaze pokazano da fosforilišu ASYN na pomenutoj poziciji (Okochi i sar., 2000; Arawaka i sar., 2006; Mbefo i sar., 2010); izuzetno je značajno da farmakološka aktivacija AMPK ne dovodi do promena u ekspresiji i količini ASYN u ćelijama. Ovo je u skladu sa podacima iz literature koji se odnose na Alchajmerovu bolest, gde farmakološki aktivator AMPK, AICAR, čak dovodi do smanjene zastupljenosti i fosforilacije tau proteina (Greco i sar., 2009). Takođe, za metformin je pokazano da dovodi do smanjene zastupljenosti tau proteina preko aktivacije protein fosfataza 2A (PP2A) (Kickstein i sar., 2010), enzima koji je bitan negativan regulator AMPK, a za koji je pokazano da predstavlja enzim koji ima najbitniju ulogu u defosforilaciji p-Ser129 ASYN (Lee i sar., 2011).

Kao što je ranije pomenuto, AMPK je najznačajniji unutarćelijski senzor koji se shodno tome aktivira pri povišenoj koncentraciji adenzin monofosfata (AMP), što za posledicu ima aktivaciju signalnih puteva u ćeliji koji će regulisati energetske balans vraćajući odnos AMP/ATP na normalan nivo (aktivacija kataboličkih puteva, inhibicija anaboličkih puteva u ćeliji). Pored toga, AMPK preko mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*, *mTOR*) utiče na veoma bitne signalne puteve značajne za funkciju ćelije, kao što su regulacija ćelijskog ciklusa, transkripcija, translacija, metabolizam ćelije, kao i preživljavanje ćelije u uslovima stresa (Mihaylova i sar., 2011). Naime, signalni put mTOR inhibira apoptozu delujući preko proteina koje kodiraju tumor supresorski geni p53 (Jones i sar., 2005) i p27 (Liang i sar., 2007). Uz to, mTOR predstavlja glavni inhibitor autofagije negativno regulišući enzim ULK1 (engl. *UNC-51-like kinase 1*, *ULK1*) i ULK2 (Kamada i sar., 2000). AMPK deluje kao inhibitor mTOR signalnog puta i na taj način može da utiče na regulaciju procesa apoptoze i autofagije. Pored ovoga, AMPK može i nezavisno od mTOR signalnog puta da fosforiliše i aktivira enzime ULK1 i ULK2, i na taj način dovede do aktivacije autofagije nezavisno od mTOR signalnog puta. Ono što je takođe bitna uloga AMPK je skorašnje otkriće da ova kinaza aktivira protein kinazu B (PKB/Akt) koja je jedan od najbitnijih signalnih mehanizama koji

obezbeđuju preživljavanje različitih tipova ćelija u kulturi (Leclerc i sar., 2010; Levine i sar., 2007; Lieberthal i sar., 2011; Pantovic i sar., 2013). Štaviše, tretman farmakološkim aktivatorom AMPK, AICAR, dovodi do značajnog povećanja aktivacije fosfoinozitol-3-kinaze (PI3K)/Akt signalnog puta u kulturi primarnih hipokampalnih neurona pacova, kao i u isečcima moždanog tkiva (Amato i sar., 2011).

Sveukupno, ovi podaci su ukazali na mogućnost da bi protektivni mehanizam delovanja AMPK u ovom eksperimentalnom modelu mogao da se ostvaruje preko aktivacije Akt i/ili regulacije procesa autofagije.

Iako su rezultati dobijeni u ovoj studiji pokazali da prekomerna ekspresija ASYN dovodi do inhibicije signalnog puta PI3K/Src/Akt, farmakološka aktivacija AMPK, AICAR ili metforminom, nije rezultirala promenom aktivnosti Akt signalnog puta. Iz ovoga možemo zaključiti da je neuroprotektivni efekat aktivacije AMPK ne zavisi od promena u Akt signalnom putu. Jedno od mogućih objašnjenja bi mogla biti složena međuzavisnost ova dva signalna puta. Naime, brojne studije govore o tome da aktivacija AMPK može dovesti do aktivacije (Levine i sar., 2007) ili inhibicije (Kim i sar., 2009) protein kinaze B (Akt). Uz to, pokazano je i da, pod dejstvom Akt može doći i do inhibicije AMPK u različitim tipovima ćelija (Kovacic i sar. 2003; Hahn-Windgassen i sar. 2005). Mehanizmi inhibicije AMPK posredovane kinazom Akt još uvek nisu potpuno rasjašnjeni, ali postoje podaci da aktivirana forma Akt dovodi do snižavanja odnosa AMP/ATP u ćeliji što predstavlja signal za deaktivaciju AMPK (Hahn-Windgassen i sar., 2005).

Pored toga što aktivacija Akt nije odgovorna za protektivnu ulogu AMPK u neurotoksičnosti izazvanoj prekomernom sintezom ASYN, indukcija autofagije se takodje nije pokazala kao mehanizam odgovoran za neuroprotektivni efekat AMPK.

Naime, prekomerna produkcija ASYN je dovela do indukcije autofagije u ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanim u neuronski fenotip pomoću RA. Dobijeni rezultati su u skladu sa očekivanjima, imajući u vidu ulogu autofagije u razgradnji ASYN. Indukcija autofagije u ćelijama detektovana je

fluorescentnim bojenjem unutarćelijskih kiselih vezikula akridin oranžom, konverzijom citosolnog LC3-I u oblik koji je udružen sa autofagozomima, LC3-II, povećanjem autofagnog fluksa u ćelijama, kao i ultrastrukturnim promenama ćelija, koje podrazumevaju prisustvo vezikula sličnih autofagozomima, karakterističnih za proces autofagije. Imajući u vidu da AMPK deluje kao aktivator autofagije, dalje je ispitivano da li farmakološka aktivacija AMPK, pomoću AICAR ili metformina, dovodi do spašavanja ćelija koje prekomerno produkuju ASYN, preko indukcije procesa koji bi trebalo da razgradi višak nagomilanog ASYN. Podaci iz literature ukazuju na to da autofagija predstavlja mogući mehanizam protektivnog delovanja AMPK. Naime, pokazano je da farmakološki aktivator AMPK, rezveratrol, dovodi do indukcije autofagije i razgradnje nagomilanog ASYN, što za posledicu ima poboljšanje preživljavanja neurona u kulturi (Wu i sar., 2011). Sa druge strane, u različitim neurotoksičnim modelima PB, kao i u modelima prekomerne ekspresije različitih formi ASYN, indukcija autofagije je doprinela povećanom umiranju ćelija (Arsikin i sar., 2012; Choubey i sar., 2011; Vogiatzi i sar., 2008). Ova kontradiktornost se može objasniti činjenicom da, iako autofagija može imati zaštitnu ulogu, u smislu povećane razgradnje nagomilanih proteina u ranoj fazi neurodegeneracije zahvaćenih neurona, produžena aktivacija ovog procesa može biti i način uvođenja ćelija u smrt (Xilouri i sar., 2011). U ovom istraživanju, nasuprot očekivanjima, farmakološka aktivacija AMPK nije dovela do povećanja autofagnog fluksa (povećanja nivoa pokazatelja autofagije, tj. konverzije LC3-I u LC3-II). Ovo saznanje, zajedno sa rezultatima koji govore u prilog povećanja indukcije autofagije, kako u ćelijama koje prekomerno sintetišu ASYN, tako i u kontrolno transfekovanim ćelijama, ukazuje na to da je neuroprotektivna uloga aktivacije AMPK u uslovima nagomilavanja ASYN, nezavisna od indukcije autofagije. Rezultati dobijeni u ovoj studiji bi se možda mogli objasniti povezanošću autofagije i signalnog puta PI3K/Src/Akt, koji je bitan za preživljavanje ćelija (Sarbasov i sar., 2005). Naime, u brojnim studijama je pokazano da autofagija može biti indukovana inhibicijom kinaze Akt (Fujiwara i sar., 2007; Degtyarev i sar., 2009), a u ovom istraživanju je upravo pokazano da prekomerna produkcija ASYN dovodi do deaktivacije Akt signalnog puta.

U originalnoj studiji u kojoj je prvi put korišćen ovaj ekperimentalni model, pokazano je da ćelije umiru mehanizmom koji ima elemente programirane ćelijske smrti tip I, apoptoze, kao i da je prekomerna ekspresija ASYN povezana sa gubitkom membranskog potencijala mitohondrija i posledičnim oslobađanjem citohroma *c* iz oštećenih mitohondrija u citosol (Vekrellis i sar., 2009). S tim u vezi, inhibitorni efekat unutarćelijskog nagomilavanja ASYN na AMPK signalni put, bi mogao biti iznenađujući, imajući u vidu da bi oštećenje mitohondrija koje je uzrokovano toksičnošću ASYN trebalo da dovede do gubitka energije u ćeliji, tj. smanjenja nivoa ATP-a (porasta odnosa AMP/ATP), što bi direktno dovelo do aktivacije AMPK. Međutim, rezultati ove studije pokazuju da u ćelijama koje prekomerno ekspimiraju ASYN nema značajne promene u unutarćelijskoj koncentraciji ATP-a, kao i da dolazi do smanjene aktivacije AMPK. Dobijeni rezultati bi se mogli objasniti činjenicom da i pored toksičnog oštećenja mitohondrija usled delovanja ASYN, glikoliza koja se odvija isključivo u citosolu verovatno glavni izvor energije u ovim ćelijama čime se neutrališe potencijalni pad u koncentraciji ATP-a usled smanjenje aktivnosti lanca prenosilaca elektrona u mitohondrijama.

Iako se na ovaj način može objasniti izostanak aktivacije AMPK, i dalje ostaje pitanje kojim mehanizmom ASYN dovodi do inhibicije AMPK signalnog puta. Kao što je ranije pomenuto, delovanje AMPK je kompleksno regulisano pomoću nekoliko ushodnih signanih puteva, uključujući aktivatore AMPK: 2 ushodne kinaze LKB1 i CaMKK $\beta$ , sestrin 1 i 2; kao i inhibitornu fosfatazu PP2A (Budanov i sar., 2008; Carling i sar., 2008; Park i sar., 2013; Yu i sar., 2013). Rezultati ove studije pokazuju da je fosforilacija LKB1 na serinu 428, koja je neophodna da bi došlo do fosforilacije AMPK na treoninu 172 (Xie i sar., 2006), bila smanjena u ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y koje prekomerno proizvode ASYN a diferencijovane su u neuronski fenotip. Sa druge strane, ekspresija informacionih RNK za CaMKK $\beta$ , PP2A i sestrin 1 i 2, nije bila značajno promenjena. Iako ovo ukazuje na direktan uticaj smanjene aktivacije LKB1 na pad u aktivnosti AMPK, za razliku od ostalih ispitivanih modulatora, ne možemo sa sigurnošću isključiti mogućnost da ASYN deluje na enzimsku aktivnost CaMKK $\beta$  ili PP2A. Ovo se

posebno odnosi na fosfatazu PP2A, za koju je pokazano da defosforiliše i inhibira AMPK u neuronima (Magnaudeix i sar., 2013). Šta više, pokazano je da ASYN dovodi do aktivacije upravo ovog enzima u neuronima (Lou i sar., 2010; Peng i sar., 2005).

Rezultati ove studije nedvosmisleno ukazuju na to da LKB1/AMPK/Raptor signalni put igra značajnu ulogu u neurotoksičnosti izazvanoj prekomernom produkcijom ASYN, ali mehanizam neuroprotektivnog delovanja AMPK zahteva dalja ispitivanja.

### **5.3. PREKOMERNO NAGOMILAVANJE ALFA-SINUKLEINA U VANĆELIJSKOM PROSTORU IMA NEUROTOKSIČNI EFEKAT MEHANIZMOM KOJI JE VEZAN ZA SMANJENU AKTIVACIJU AMPK SIGNALNOG PUTA**

Godinama se smatralo da je ASYN isključivo unutarćelijski protein i da ne postoje mehanizmi kojima bi ASYN prelazio u vanćelijsku tečnost ili druge neurone. O mogućem prenosu ASYN sa neurona na neuron govore i rezultati dobijeni na obdukcionim analizama mozgova pacijenata obolelih od PB, kojima su za života transplantirani fetalni mezencefalični dopaminergički neuroni, gde se vidi da se Levijeva tela nalaze i u preživlom graftu, što ukazuje na prenošenje bolesti sa domaćina na graft (Kordower i sar., 2008). Najnovija istraživanja pak pokazuju da se ASYN može biti naći kako u vanćelijskim tečnostima (plazma i cerebrospinalna tečnost), tako i u medijumu u kom su kultivisani neuroni ili ćelije slične neuronima (El-Agnaf i sar., 2003; Lee i sar., 2005). Prisustvo vanćelijskog ASYN u intersticijalnoj tečnosti je potvrđeno mikrodijalizom, kako kod glodara, tako i kod pacijenata sa traumama moždanih struktura (Emmanouilidou i sar., 2011). Uz to, kod obolelih od PB je pokazano da je koncentracija oligomernih oblika ASYN u cerebrospinalnoj tečnosti veća u odnosu na zdrave ispitanike, primenom specifičnog ELISA testa (Tokuda i sar., 2010). Takođe, pokazano je da sekretovani ASYN može narušiti homeostazu neurona i uzrokovati njihovu smrt, čak i u niskim

koncentracijama, koje odgovaraju koncentraciji izmerenoj u telesnim tečnostima (Emmanouilidou i sar., 2010). Ovo bi moglo da ukaže na novi pristup u razmatranju mehanizma neurotoksičnosti ASYN (Danzer i sar., 2011a). U prilog tome idu i podaci iz istraživanja sprovedenog na ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y koje prekomerno proizvode ASYN, koji jasno pokazuju da ćelije sekreću ASYN u medijum, da bi potom sekretovani ASYN delovao toksično na susedne ćelije (Emmanouilidou i sar., 2010). Preuzimanje ASYN u okolne ćelije nije isto za sve tipove ćelija, a takođe je specifično i za različite forme ASYN. Međutim, pokazano je da se oligomerni oblici ASYN najlakše unose u ćelije ili prenose iz jedne ćelije u drugu, što ima poseban značaj za propagaciju oštećenja neurona jer se smatra da su upravo oligomerni oblici ASYN nosioci toksičnosti ASYN u PB (Danzer i sar., 2011b; 2007; 2009).

Rezultati dobijeni u ovoj studiji su u saglasnosti sa podacima iz literature. Naime, pokazano je da se medijumu u kom su gajene ćelije koje prekomerno proizvode ASYN, nalazi značajno viši nivo ASYN, kao i da taj vanćelijski ASYN ima neurotoksično delovanje na ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferencirane u neuronski fenotip. Ono što je interesantno u rezultatima dobijenim ovom studijom jeste da je neurotoksično dejstvo sekretovanog ASYN praćeno smanjenjem aktivnosti signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor, slično kao i u uslovima prekomerne produkcije unutarćelijskog ASYN. Uz to, pokazano je da sekretovani vanćelijski ASYN ima citotoksični efekat, kako na ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferencirane u neuronski fenotip, tako i na ćelije feohromocitoma pacova PC12. Dobijeni rezultati su pokazali da je jedan od mogućih mehanizama toksičnog delovanja vanćelijskog ASYN smanjenje aktivnosti signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor; kao i da aktivatori AMPK, AICAR i metformin, deluju protektivno, vraćajući nivoe aktivnih formi enzima na normalu i poboljšavajući preživljavanje ćelija u kulturi. Primena shRNA koja sprečava ekspresiju humanog AMPK enzima, dovela je do daljeg smanjenja vijabilnosti SH-SY5Y ćelija diferenciranih u neuronski fenotip a gajenih u prisustvu vanćelijskog ASYN, što je potvrdilo značaj aktivacije AMPK signalnog puta u odbrani od neurotoksičnog delovanja povećane koncentracije vanćelijskog ASYN.

Pored prekomerne sinteze, sekrecije i nagomilavanja *wt* ASYN, različite modifikacije ili interakcije, uključujući i nitraciju tirozinskih ostataka, i formiranje dopaminskih formi ASYN, mogu da se dese u dopaminergičkim neuronima i da doprinesu oligomerizaciji, agregaciji i povećanoj toksičnosti ASYN (Stefanis i sar., 2012). U prilog ovome govore podaci iz studija koje su rađene na eksperimentalnim modelima PB, kao i na isečcima moždanog tkiva obolelih od PB, gde su ustanovljeni citosolni agregati različitih formi ASYN: nitrozilirane, fosforilisane, forme proteina obeležene ubikvitinom, kao forme ASYN dobijene nekovalentnom interakcijom ASYN i oksidovanog dopamina (Volles i sar., 2003; Paxinou i sar., 2001; Smith i sar., 2005; McFarlane i sar., 2005; Norris i sar., 2005).

U skladu sa tim, a kako bi toksičnost vanćelijskog ASYN bila dalje ispitana, u ovoj studiji su primenjeni različiti oblici rekombinantnog *wt* ASYN (monomerni, m-ASYN, oligomerni, o-ASYN, dopaminski modifikovan, DA-ASYN, i nitrozilirani oblik alfa-sinukleina, n-ASYN). Prethodna istraživanja su pokazala da se o-ASYN najlakše unosi u ćelije ili prenosi iz jedne ćelije u drugu (Danyer i sar., 2011), kao i da od početno nastalih oligomera nastaju stabilni oligomeri, otporni na hidrolizu proteinazom K (Cremades i sar., 2012), što ima poseban značaj za formiranje Levijevih tela i propagaciju oštećenja neurona. Za n-ASYN je ranije pokazano da dovodi do smrti ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y na dozno- i vremenski zavistan način, i da je u pitanju pro-apoptotski mehanizam, pri čemu dolazi do aktivacije kaspaze 3 (Liu i sar., 2011). Sa druge strane, pokazano je da mehanizam delovanja DA-ASYN uključuje inhibiciju autofagije posredovane šaperonima i na taj način dovodi do vulnerabilnosti i posledične smrti ćelija, kako neuroblastomskih ćelija SH-SY5Y, tako i primarnih neurona u kulturi (Martinez-Vicente i sar., 2008). Rezultati dobijeni ovom studijom su potvrdili neurotoksični efekat vanćelijski primenjenih modifikovanih oblika *wt* ASYN (oligomernog, nitroziliranog i dopaminski izmenjenog ASYN) na ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovane u neuronski fenotip, dok je primenom monomerne forme rekombinantnog *wt* ASYN očekivano izostao ovaj efekat. Međutim, ono što je po prvi put pokazano ovim istraživanjem je da se mehanizam delovanja nitroziliranog i dopaminski modifikovanog *wt* ASYN ostvaruje preko smanjene aktivacije

LKB1/AMPK/Raptor signalnog puta; kao i da farmakološka aktivacija AMPK ispoljava neuroprotektivni efekat u uslovima delovanja oligomernog, nitroziliranog i dopaminski modifikovanog *wt* ASYN.

Uzevši sve u obzir, rezultati ove studije ukazuju da AMPK igra značajnu ulogu u neurotoksičnosti izazvanoj, kako unutarćelijskim, tako i vanćelijskim nagomilavanjem ASYN. Iako mehanizam neuroprotektivnog efekta AMPK ostaje tema narednih istraživanja, modulacija AMPK bi se mogla uzeti u razmatranje kao moguća terapijska strategija u protekciji i lečenju Parkinsonove bolesti.

## 6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske teze, a na osnovu dobijenih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Prekomerna ekspresija nemutiranog alfa-sinukleina (*wt* ASYN) dovodi do smrti ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanih u neuronski fenotip, što je praćeno morfološkim i ultrastrukturnim promenama ćelija, koje odgovaraju apoptozi, kao i aktivacijom kaspaza i fragmentacijom DNK.
- Neurotoksično delovanje nakupljanja unutarćelijskog ASYN uključuje smanjenje aktivnosti signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor, kako u ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanim u neuronski fenotip, tako i u primarnim neuronima izolovanim iz kore velikog mozga pacova.
- Sekretovani vanćelijski *wt* ASYN dovodi do smanjenja broja ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanih u neuronski fenotip, kao i ćelija feohromocitoma pacova PC12. Primena rekombinantnog oligomernog *wt* ASYN, kao i njegovih modifikovanih oblika (ASYN modifikovan dopaminom, i nitrozilirani oblik ASYN), takođe je dovela do smanjenog preživljavanja ćelija neuroblastoma. Neurotoksično delovanje vanćelijskog ASYN je uzrokovalo pad aktivnosti signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor. Smanjenje ekspresije AMPK je dodatno povećalo osetljivost ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y prema štetnom delovanju vanćelijskog ASYN.
- Primena farmakoloških aktivatora AMPK, AICAR-a i metformina, dovela je do značajnog porasta preživljavanja ćelija u uslovima prekomerne sinteze unutarćelijskog ASYN, ali i nakupljanja vanćelijskog ASYN. Ovaj

neuroprotektivni efekat je uzrokovan porastom aktivnosti LKB1/AMPK/Raptor signalnog puta.

Iz svega navedenog može se zaključiti da rezultati ovog istraživanja doprinose razjašnjavanju mehanizama koji se nalaze u osnovi oštećenja i smrti dopaminergičkih neurona, i dodatno ukazuju na moguće pravce za ostvarivanje neuroprotekcije, što bi moglo doprineti razvoju novih terapijskih strategija u Parkinsonovoj bolesti.

## 7. LITERATURA

Abou-Sleiman P. M., et al. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7:207-19.

Alam Z. I., Daniel S. E., Lees A. J., Marsden D. C., Jenner P., Halliwell B. A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *Journal of Neurochemistry*. 1997; 69(3):1326-9.

Aleyasin H., Rousseaux M. W., et al. DJ-1 protects the nigrostriatal axis from the neurotoxin MPTP by modulation of the AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:3186–3191.

Ali S. F., Binienda Z. K., Imam, S. Z. Molecular aspects of dopaminergic neurodegeneration: gene–environment interaction in parkin dysfunction. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2011; 8:4702–4713.

Alvarez-Erviti L., et al. Chaperone-Mediated Autophagy Markers in Parkinson Disease Brains. *Archives of Neurology* 2010; 67:1464-1472.

Alvarez-Erviti L., Seow Y., Schapira A. H., Gardiner C., Sargent I. L., Wood M. J., Cooper J. M. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol Dis.* 2011; 42(3):360-7.

Amato S., et al. AMP-activated protein kinase regulates neuronal polarization by interfering with PI 3-kinase localization. *Science* 2011; 332:247-51.

Anderson J. P., Walker D. E., Goldstein J. M., de Laat R., Balducci K., Caccavello R. J., et al. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J Biol Chem* 2006; 281:29739–29752.

Arawaka S., Wada M., Goto S., Karube H., Sakamoto M., Ren C. H., et al. The role of G-protein-coupled receptor kinase 5 in pathogenesis of sporadic Parkinson's disease. *J Neurosci* 2006; 26:9227–9238.

Arsikin K., et al. Autophagy-dependent and -independent involvement of AMP-activated protein kinase in 6-hydroxydopamine toxicity to SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1822:1826-36.

Ascherio A., Chen H., Weisskopf M. G., O'Reilly E., McCullough M. L., Calle E. E., Schwarzschild M. A., Thun M. J. Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 2006; 60:197–203.

Banerjee K., Sinha M., Pham C. L. L., et al.  $\alpha$ -synuclein induced membrane depolarization and loss of phosphorylation capacity of isolated rat brain mitochondria: implications in Parkinson's disease. *FEBS Letters.* 2010; 584(8):1571–1576.

Batelli S., Albani D., Rametta R., et al. DJ-1 modulates alpha-synuclein aggregation state in a cellular model of oxidative stress: relevance for Parkinson's Disease and involvement of HSP70. *Plos One* 2008; 9(5):e1884.

Beckman K. B., Ames B. N. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 1998; 78:547-581.

Bilsland J., Roy S., Xanthoudakis S., Nicholson D. W., Han Y., Grimm E., Hefti F., Harper S. J. Caspase inhibitors attenuate 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in primary cultures of mesencephalic dopaminergic neurons. *J Neurosci.* 2002; 22(7):2637-49.

Braak H., Del Tredici K., Ru'b U., de Vos R. A., Jansen Steur E. N., Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24:197–211.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.

Brazil D. P., Yang Z. Z., Hemmings B. A. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci.* 2004; 29(5):233-42.

Brighina L., Frigerio R., Schneider N. K., Lesnick T. G., de Andrade M., Cunningham J. M., Farrer M. J., Lincoln S. J., Checkoway H., Rocca W. A., Maraganore D. M. Alpha-synuclein, pesticides, and Parkinson disease: a case-control study. *Neurology* 2008; 70(16):1461-9.

Brunet A., Bonni A., et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96:857-868.

Brunet A., Datta S. R., Greenberg M. E. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11:297-305.

Budanov A. V., Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* 2008; 134:451-60.

Cappai R., Leck S. L., Tew D. J., Williamson, N. A., Smith, D. P., Galatis, D., Sharples, R. A., Curtain C. C., Ali F. E., Cherny R. A., Culvenor J. G., Bottomley S. P., Masters C. L., Barnham K. J., Hill A. F. Dopamine promotes alpha-synuclein aggregation into SDS-resistant soluble oligomers via a distinct folding pathway. *FASEB J.* 2005; 19:1377-1379.

Carling D., et al. The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32(Suppl 4):S55-9.

Cassina A. M., et al. Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *J Biol Chem* 2000; 275:21409-15.

Chartier-Harlin M. C., et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004; 364:1167-9.

Chen L., Xu B., Liu L., Luo Y., Yin J., Zhou H., Chen W., Shen T., Han X, Huang S. Hydrogen peroxide inhibits mTOR signaling by activation of AMPKalpha leading to apoptosis of neuronal cells. *Lab Invest.* 2010; 90(5):762-73.

Chen M., Ona V. O., Li M., Ferrante R. J., Fink K. B., Zhu S., Bian J., Guo L., Farrell L. A., Hersch S. M., Hobbs W., Vonsattel J. P., Cha J. H., Friedlander R. M. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med.* 2000; 6(7):797-801.

Chen Y., et al. Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:3907-12.

Choi J. S., et al. AMP-activated protein kinase is activated in Parkinson's disease models mediated by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 391:147-51.

Choubey V., Safiulina D., Vaarmann A., Cagalinec M., Wareski P., Kuom M., Zharkovsky A., Kaasik A. Mutant A53T alpha-synuclein induces neuronal death

by increasing mitochondrial autophagy. *J Biol Chem* 2011; 286:10814–10824.

Chu Y., Kordower J. H. Age-associated increases of alpha-synuclein in monkeys and humans are associated with nigrostriatal dopamine depletion: Is this the target for Parkinson's disease? *Neurobiology of Disease* 2007; 25(1):134-49.

Ciccarone V., Spengler B. A., Meyers M. B., Biedler J. L., Ross R. A. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res.* 1989; 49(1):219-25.

Cohen G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326(Pt 1):1-16.

Cohen G. Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology* 1984; 5:77-82.

Conway K. A., et al. Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science* 2001; 294:1346-9.

Cooper A. A., Gitler A. D., et al. Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* 2006; 21:324–328.

Cremades N., et al. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of  $\alpha$ -synuclein. *Cell* 2012; 149(5):1048-59.

Cuervo AM., et al. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 2004; 305:1292-1295.

Czapski G. A., Gąssowska M., Wilkaniec A., Cieřlik M., Adamczyk A. Extracellular alpha-synuclein induces calpain-dependent overactivation of cyclin-dependent kinase 5 in vitro. *FEBS Lett.* 2013; 587(18):3135-41.

Da Costa C. A., Ancolio K., Checler F. Wild-type but not Parkinson's disease-related ala-53-Thr mutant alpha-synuclein protects neuronal cells from apoptotic stimuli. *J Biol Chem* 2000; 275:24065–24069.

Danyer K. M., Ruf W. P., Putcha P., et al. Heat-shock protein 70 modulates toxic extracellular  $\alpha$ -synuclein oligomers and rescues trans-synaptic toxicity. *The FASEB Journal* 2011; 25(1):326-336.

Danzer K. M., Haasen D., Karow A. R., Moussaud S., Habeck M., Giese A., Kretzschmar H., Hengerer B., Kostka M. Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J Neurosci* 2007; 27:9220–9232.

Danzer K. M., Krebs S. K., Wolff M., Birk G., Hengerer B. Seeding induced by  $\alpha$ -synuclein oligomers provides evidence for spreading of  $\alpha$ -synuclein pathology. *J Neurochem* 2009; 111:192–203.

Danzer K. M., McLean P. J. Drug targets from genetics:  $\alpha$ -synuclein. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2011a; 10:712-23.

Danzer K. M., Ruf W. P., Putcha P., Joyner D., Hashimoto T., Glabe C., Hyman B. T., McLean P. J. Heat-shock protein 70 modulates toxic extracellular  $\alpha$ -synuclein oligomers and rescues trans-synaptic toxicity. *FASEB J* 2011b; 25:326–336.

Dasgupta B., Milbrandt J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104:7217–7222.

Datta S. R., Dudek H., et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91:231-241.

Dauer W., Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003; 39:889-909.

Davie C. A. A review of Parkinson's disease. *Br. Med. Bull.* 2008; 86(1):109–27.

Davies S. P., Helps N. R., Cohen P. T., Hardie, D. G. *FEBS Lett.* 1995; 377:421–425.

Dawson T. M. Unraveling the role of defective genes in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord* 2007; 13(Suppl. 3):S248–S249.

De Lau L. M., Breteler M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2006; 5(6):525–35.

Degtyarev M., De Maziere A., et al. Autophagy, an Achilles' heel AKTing against cancer? *Autophagy* 2009; 5(3):415-418.

Deslauriers J., Lefrançois M., Larouche A., Sarret P., Grignon S. Antipsychotic-induced DRD2 upregulation and its prevention by  $\alpha$ -lipoic acid in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Synapse.* 2011; 65(4):321-31.

Desplats P., Lee H. J., Bae E. J., Patrick C., Rockenstein E., Crews L., Spencer B., Masliah E., Lee S. J. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of  $\alpha$ -synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S*

A. 2009; 106(31):13010-5.

Devi L., et al. Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem.* 2008; 283:9089-100.

Dexter D. T., Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine* 2013; 62:132–144.

Di Fonzo A., et al. ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology* 2007; 68:1557-1562.

Dunn C. J., Peters D. H. Metformin. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Drugs* 1995; 49(5):721-749.

Edinger A. L., Thompson C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2004; 16(6):663-9.

El-Agnaf O. M., et al. Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J.* 2003; 17:1945-7.

El-Agnaf O. M., Salem S. A., et al. Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 2006; 20:419–425.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4):495-516.

Emmanouilidou E., Elenis D., Papasilekas T., Stranjalis G., Gerozissis K., Ioannou P., Vekrellis K. In vivo assessment of alpha-synuclein secretion. *PLoS One* 2011; 6:e22225.

Emmanouilidou E., Stefanis L., Vekrellis K. Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. *Neurobiol Aging* 2010a; 31(6):953-68.

Emmanouilidou E., Melachroinou K., Roumeliotis T., Garbis S. D., Ntzouni M., Margaritis L. H., Stefanis L., Vekrellis K. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J Neurosci.* 2010; 30:6838–6851.

Farrer M., Kachergus J., Fronto L., et al. Comparison of kindreds with Parkinsonism and  $\alpha$ -synuclein genomic multiplications. *Annals of Neurology* 2004; 55(2):174-179.

Fernandes J. T., Tenreiro S., Gameiro A., Chu V., Outeiro T. F., Conde J. P. Modulation of alpha-synuclein toxicity in yeast using a novel microfluidic-based gradient generator. *Lab Chip*. 2014; 14(20):3949-57.

Flower T. R., Chesnokova L. S., Froelich C. A., Dixon C., Witt S. N. Heat shock prevents alpha-synuclein-induced apoptosis in a yeast model of Parkinson's disease. *J. Mol. Biol.* 2005; 351:1081–1100.

Franchin C., Cesaro L., Pinna L. A., Arrigoni G., Salvi M. Identification of the PLK2-dependent phosphopeptidome by quantitative proteomics. *PLoS One*. 2014; 9(10):e111018.

Friedlander R. M. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med*. 2003; 348(14):1365-75.

Fujiwara H., Hasegawa M., Dohmae N., Kawashima A., Masliah E., Goldberg M. S. et al. Alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 2002; 4:160-164.

Fujiwara K., Iwado E., et al. Akt inhibitor shows anticancer and radiosensitizing effects in malignant glioma cells by inducing autophagy. *Int J Oncol* 2007; 31(4):753-760.

Gandhi S., et al. PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol. Cell* 2009; 33:627–638.

Gao H. M., Kotzbauer P. T., Uryu K., Leight S., Trojanowski J. Q., Lee V. M. Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience* 2008; 28(30):7687-98.

Gao L., Tang H., Nie K., Wang L., Zhao J., Gan R., Huang J., Zhu R., Feng S., Duan Z., Zhang Y., Wang L. Cerebrospinal fluid Alpha-synuclein as A Biomarker for Parkinson's disease Diagnosis: A Systematic review and Meta-analysis. *Int J Neurosci*. 2014; 9:1-26.

Gąssowska M., Czapski G. A., Pająk B., Cieřlik M., Lenkiewicz A. M.,

Adamczyk A. Extracellular  $\alpha$ -synuclein leads to microtubule destabilization via GSK-3 $\beta$ -dependent Tau phosphorylation in PC12 cells. PLoS One 2014; 9(4):e94259.

Gautier C. A., Kitada T., Shen J. Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2008; 32(105):11364-11369.

Gegg M. E., Cooper J. M., Schapira A. H. V., Taanman J. W.. Silencing of PINK1 expression affects mitochondrial DNA and oxidative phosphorylation in dopaminergic cells. Plos One 2009; 3(4):e4756.

Ghavami S., Shojaei S., Yeganeh B., Ande S. R., Jangamreddy J. R., Mehrpour M., Christoffersson J., Chaabane W., Moghadam A. R., Kashani H. H., Hashemi M., Owji A. A., Łos M. J. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. Progress in Neurobiology 2014; 112:24–49.

Giasson B. I., Duda J. E., Murray I. V., Chen, Q., Souza, J. M., Hurtig H. I., Ischiropoulos H., Trojanowski J. Q., Lee V. M. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. Science 2000; 290:985–989.

Giasson B. I., Duda J. E., Quinn S. M., Zhang B., Trojanowski J. Q., Lee V. M. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. Neuron 2002; 34(4):521-33.

Gille G., Reichmann H. Iron-dependent functions of mitochondria--relation to neurodegeneration. J Neural Transm. 2011; 118(3):349-59.

Gispert S., et al. Parkinson phenotype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration. PLoS ONE 2009; 4:e5777.

Glinka Y., Gassen M., Youdim M. B. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. J. Neural Transm. 1997; 50:55–66.

Goedert M., Spillantini M. G., Cairns N. J., Crowther R. A. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. Neuron 1992; 8:159–168.

Gomez-Santos C., et al. Dopamine induces autophagic cell death and alpha-synuclein increase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurosci Res*. 2003; 73:341-50.

Greco S. J., Sarkar S., Johnston J. M., Tezapsidis N. Leptin regulates tau phosphorylation and amyloid through AMPK in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 380(1):98-104.

Greene L. A., Rein G. Release, storage and uptake of catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor (NGF) responsive phaeochromocytoma cells. *Brain Res* 1977; 129:247–263.

Gross A., McDonnell J. M., Korsmeyer S. J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 1999; 13(15):1899-911.

Grunewald A., Voges L., Rakovic A., Kasten M., Vandebona H., Hemmelmann C. Mutant parkin impairs mitochondrial function and morphology in human fibroblasts. *PLoS ONE* 2010; 5(9):e12962.

Gupta A., Dawson V. L., Dawson T. M. What causes cell death in Parkinson's disease? *Ann. Neurol*. 2008; 64(Suppl. 2):S3–15.

Guzman J. N., Sanchez-Padilla J., Wokosin D., et al. Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* 2010; 468(7324):696–700.

Habibi E., Masoudi-Nejad A., Abdolmaleky H. M., Haggarty S. J. Emerging roles of epigenetic mechanisms in Parkinson's disease. *Funct. Integr. Genomics* 2011; 11:523–537.

Hahn-Windgassen A., Nogueira V., Chen C. C., Skeen J. E., Sonenberg N., Hay N. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem*. 2005; 280(37):32081-9.

Hardie D. G. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev* 2011; 25(18):1895-1908.

Hardie D. G., et al. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012; 13:251-62.

Hartmann A., Hunot S., Michel P. P., Muriel M. P., Vyas S., Faucheux B. A., Mouatt-Prigent A., Turmel H., Srinivasan A., Ruberg M., Evan G. I., Agid Y.,

Hirsch E. C. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(6):2875-80.

Hashimoto M., Bar-On P., et al. Beta-synuclein regulates Akt activity in neuronal cells. A possible mechanism for neuroprotection in Parkinson's disease. *J Biol Chem* 2004; 279:23622-23629.

Hawley S. A., Pan D. A., Mustard K. J., Ross L., Bain J., Edelman A. M., Frenguelli B. G., Hardie DG. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* 2005; 2(1):9-19.

Ho C. C., Rideout H. J., Ribe E., Troy C. M., Dauer W. T. The Parkinson disease protein leucine-rich repeat kinase 2 transduces death signals via Fas-associated protein with death domain and caspase-8 in a cellular model of neurodegeneration. *J. Neurosci.* 2009; 29:1011-1016.

Hollenbeck P. J. Products of endocytosis and autophagy are retrieved from axons by regulated retrograde organelle transport. *Journal of Cell Biology* 1993; 121:305-315.

Houlden H., Singleton A. B. The genetics and neuropathology of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2012; 124:325–338.

Humbert S., Bryson E. A., et al. The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt *Dev Cell* 2002; 2:831-837.

Hurley R. L., Anderson K. A., Franzone J. M., Kemp B. E., Means A. R., Witters L. A. The  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinases Are AMP-activated Protein Kinase Kinases. *J. Biol. Chem.* 2005; 280:29060–29066.

Ingebritsen T. S., Stewart A. A., Cohen P. *Eur. J. Biochem.* 1983; 132:297–307.

Inoki K., Li Y., et al. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 2002; 4(9):648-657.

Ito S., et al. Endogenous catecholamine enhances the dysfunction of unfolded protein response and alpha-synuclein oligomerization in PC12 cells overexpressing human alpha-synuclein. *Neurosci Res.* 2010; 66:124-30.

Izumi Y., Yamamoto N., Matsuo T., Wakita S., Takeuchi H., Kume T., Katsuki H., Sawada H., Akaike A. Vulnerability to glutamate toxicity of dopaminergic neurons is dependent on endogenous dopamine and MAPK activation. *J Neurochem.* 2009; 110(2):745-55.

Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 2008; 79 (4):368–376.

Jiang P., et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase overactivation leads to accumulation of alpha-synuclein oligomers and decrease of neurites. *Neurobiol Aging* 2013; 34:1504-15.

Jones R. G., et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2005; 18:283–93.

Joshi S., et al. Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Oncogene* 2006; 25:240-7.

Ju T. C., et al. Energy dysfunction in Huntington's disease: insights from PGC-1alpha, AMPK, and CKB. *Cell Mol Life Sci.* 2012; 69:4107-20.

Jung C. H., Ro S. H., et al. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 2010; 584(7):1287-1295.

Jung J. E., Lee J., Ha J., Kim S. S., Cho Y. H., Baik H. H., Kang I. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-ribonucleoside enhances oxidative stress-induced apoptosis through activation of nuclear factor-kappaB in mouse Neuro2a neuroblastoma cells. *Neurosci Lett.* 2004; 354(3):197-200.

Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19:5720-8.

Kaludjerovic G. N., et al. Novel platinum (IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro. *Int J Cancer* 2005; 116:479-86.

Kamada Y., Funakoshi T., Shintani T., Nagano K., Ohsumi M., Ohsumi Y.

Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 2000; 150:1507–13.

Kao S. Y. Rescue of  $\alpha$ -synuclein cytotoxicity by insulin-like growth factors. *Biochem Biophys Res Comm* 2009; 385:434-438.

Keeney P. M., Xie J., Capaldi R. A., Bennett J. P. Jr. Parkinson's disease mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *The Journal of Neuroscience* 2006; 26(19):5256-64.

Kenessey A., Ojamaa K. Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways. *J Biol Chem*. 2006; 281(30):20666-72.

Khan S., Jyoti S., Naz F., Shakya B., Rahul, Afzal M., Siddique Y. H. Effect of L-ascorbic Acid on the climbing ability and protein levels in the brain of *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Int J Neurosci*. 2012; 122(12):704-9.

Kickstein E., Krauss S., Thornhill P., Rutschow D., Zeller R., Sharkey J., Williamson R., Fuchs M., Köhler A., Glossmann H., Schneider R., Sutherland C., Schweiger S. Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(50):21830-5.

Kim H. S., Suh Y. H. Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav Brain Res*. 2009; 196(2):168-79.

Kim K. Y., Baek A., et al. Adiponectin-activated AMPK stimulates dephosphorylation of AKT through protein phosphatase 2A activation. *Cancer Res* 2009; 69(9):4018-4026.

Kim S., Jeon B. S., Heo C., Im P. S., Ahn T. B., Seo J. H., Kim H. S., Park C. H., Choi S. H., Cho S. H., Lee W. J., Suh Y. H. Alpha-Synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocyte in Parkinson's disease. *FASEB J*. 2004; 18:1615–1617.

Kimura N., Tokunaga C., et al. A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes Cells* 2003; 8(1):65-79.

Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima

S., Yokochi M., Mizuno Y., Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392 (6676):605–608.

Kordower J. H., Chu Y., Hauser R. A., Freeman T. B., Olanow C. W. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med*. 2008; 14(5):504-6.

Kountouras J., Zavos C., Polyzos S. A., Deretzi G., Vardaka E., Giartza-Taxidou E., Kastinelos P., Rapti E., Chatzopoulos D., Tzilves D., Stergiopoulos C., Christodoulou K. *Helicobacter pylori* infection and Parkinson's disease: apoptosis as an underlying common contributor. *Eur. J. Neurol*. 2012; 19:e56.

Kovacic S., Soltys C. L., Barr A. J., Shiojima I., Walsh K., Dyck J. R. Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *J Biol Chem*. 2003; 278(41):39422-7.

Kroemer G., Mariño G., Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*. 2010; 40(2):280-93.

Leclerc G. M., et al. AMPK-induced activation of Akt by AICAR is mediated by IGF-1R dependent and independent mechanisms in acute lymphoblastic leukemia. *J Mol Signal*. 2010; 5:15.

Lee H. J., et al. Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway. *Journal of Neuroscience* 2004; 24:1888-1896.

Lee H. J., et al. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J Neurosci*. 2005; 25:6016-24.

Lee H. J., Shin S. Y., Choi C., Lee Y. H., Lee S. J. Formation and removal of alpha-synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors. *J. Biol. Chem*. 2002; 277:5411–5417.

Lee K. W., Chen W., Junn E., Im J. Y., Grosso H., Sonsalla P. K., et al. Enhanced phosphatase activity attenuates a-synucleinopathy in a mouse model. *J Neurosci* 2011; 31:6963–6971.

Levine B., Klionsky D. J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; 6(4):463-477.

Levine Y.C., et al. Agonist-modulated regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in endothelial cells. Evidence for an AMPK -> Rac1 -> Akt -> endothelial nitric-oxide synthase pathway. *J Biol Chem.* 2007; 282:20351-64.

Li J., Benashski S. E., Venna V. R., McCullough L. D. Effects of metformin in experimental stroke. *Stroke* 2010; 41(11):2645-52.

Li Y., Sun L. G., Cai T. J., Zhang Y., Lv S. J., Wang Y., Ye L. P. Alpha-Synuclein overexpression during manganese-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res. Bull.* 2010; 81:428–433.

Liang J., Shao S. H., Xu Z. X., Hennessy B., Ding Z., Larrea M., et al. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2007; 9:218–24.

Lieberthal W., et al. AMPK protects proximal tubular cells from stress-induced apoptosis by an ATP-independent mechanism: potential role of Akt activation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011; 301:F1177-92.

Lindersson E., Beedholm R., Højrup P., Moos T., Gai W., Hendil K. B., Jensen P. H. Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. *J Biol Chem.* 2004; 279(13):12924-34.

Liu Y., Qiang M., Wei Y., He R. A novel molecular mechanism for nitrated alpha-synuclein-induced cell death. *Journal of Molecular Cell Biology* 2011; doi:10.1093/jmcb/mjr011.

Lou H., et al. Serine 129 phosphorylation reduces the ability of alpha-synuclein to regulate tyrosine hydroxylase and protein phosphatase 2A in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2010; 285:17648-61.

Luk K. C., Song C., O'Brien P., Stieber A., Branch J. R., Brunden K. R., Trojanowski J. Q., Lee V. M. Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(47):20051-6.

Luo Z., Zang M., et al. AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. *Future Oncol* 2010; 6(3):457-470.

Ma T.C., et al. Metformin therapy in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurosci Lett*. 2007; 411:98-103.

Magnaudeix A., et al. PP2A blockade inhibits autophagy and causes intraneuronal accumulation of ubiquitinated proteins. *Neurobiol Aging*. 2013; 34:770-90.

Maiuri M. C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(9):741-52.

Malagelada C., Jin Z. H., Greene L. A. RTP801 is induced in Parkinson's disease and mediates neuron death by inhibiting Akt phosphorylation/activation. *J Neurosci* 2008; 28:14363–14371.

Malagelada C., Jin Z. H., Jackson-Lewis V., Przedborski S., Greene L. A. Rapamycin protects against neuron death in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2010; 30:1166–1175.

Malagelada C., Ryu E. J., Biswas S. C., Jackson-Lewis V. Greene LA RTP801 is elevated in Parkinson brain substantia nigral neurons and mediates death in cellular models of Parkinson's disease by a mechanism involving mammalian target of rapamycin inactivation. *J Neurosci* 2006; 26:9996–10005.

Malkus K.A., Ischiropoulos H. Regional deficiencies in chaperone-mediated autophagy underlie alpha-synuclein aggregation and neurodegeneration. *Neurobiol Dis*. 2012; 46:732-44.

Maraganore D. M., et al. Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* 2006; 296:661-70.

Marongiu R., et al. Mutant Pink1 induces mitochondrial dysfunction in a neuronal cell model of Parkinson's disease by disturbing calcium flux. *J. Neurochem* 2009; 108:1561–1574.

Martin L. J., Pan Y., Price A. C., Sterling W., Copeland N. G., Jenkins N. A., Price D. L., Lee M. K. Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death. *J Neurosci*. 2006; 26(1):41-50.

Martinez-Vicente M., Talloczy Z., Kaushik S., Massey A. C., Mazzulli J., Mosharov E. V., Hodara R., Fredenburg R., Wu DC., Follenzi A., Dauer W.,

Przedborski S., Ischiropoulos H., Lansbury P. T., Sulzer D., Cuervo AM.. Dopamine-modified  $\alpha$ -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *The Journal of Clinical Investigation*, 2008; 2(118):777-788.

Mbefo M. K., Paleologou K. E., Boucharaba A., Oueslati A., Schell H., Fournier M., et al. Phosphorylation of synucleins by members of the Polo-like kinase family. *J Biol Chem* 2010; 285:2807–2822.

McCullough L. D., Zeng Z., Li H., Landree L. E., McFadden J., Ronnett G. V. Pharmacological inhibition of AMP-activated protein kinase provides neuroprotection in stroke. *J Biol Chem* 2005; 280(21):20493-502.

McFarlane D., Dybdal N., Donaldson M., Miller L., Cribb, A. Nitration and increased  $\alpha$ -synuclein expression associated with dopaminergic neurodegeneration in equine pituitary pars intermedia dysfunction. *J. Neuroendocrinol* 2005; 17:73–80.

Meley D., Bauvy C., et al. AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *J Biol Chem* 2006; 281(46):34870-34879.

Memmott R. M., Dennis P. A. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cell Signal* 2009; 21(5):656-664.

Mihaylova M. M., Shaw R. J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*. 2011; 13(9):1016–23.

Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 2007; 21(22):2861-2873.

Mortiboys H., Thomas K. J., Koopman W. J. H., et al. Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts. *Annals of Neurology* 2008; 5(64):555-565.

Mosharov E. V., Larsen K. E., Kanter E., Phillips K. A., Wilson K., Schmitz Y., Krantz D. E., Kobayashi K., Edwards R. H., Sulzer D. Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and  $\alpha$ -synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. *Neuron* 2009; 62:218–229.

Mosharov E. V., Staal R. G., Bove' J., Prou D., Hananiya A., Markov D., Poulsen N., Larsen K. E., Moore C. M., Troyer M. D., et al. Alpha-Synuclein overexpression increases cytosolic catecholamine concentration. *J Neurosci* 2006;

26:9304–9311.

Muftuoglu M., Elibol B., Dalmizrak O., et al. Mitochondrial complex I and IV activity in leukocytes from patients with parkin mutations. *Movement Disorders* 2004; 5(19):544-548.

Mumby M. C., Walter G. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev* 1993; 73:673–699.

Nakamura K., et al. Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein alpha-synuclein. *J Biol Chem*. 2011; 286:20710-26.

Norbury C. J., Hickson I. D. Cellular responses to DNA damage. *UAnnu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:367-401.

Norris E., et al. Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminochromemediated conformational alterations. *J. Biol. Chem* 2005; 280:21212–21219.

Oakhill J. S., Scott J. W., et al. AMPK functions as an adenylate charge-regulated protein kinase. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23(3):125-132.

Obeso J. A., Rodriguez-Oroz M. C., Goetz C. G., Marin C., Kordower J. H., Rodriguez M., Hirsch E. C., Farrer M., Schapira A. H., Halliday G. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med*. 2010; 16(6):653-61.

Okochi M., Walter J., Koyama A., Nakajo S., Baba M., Iwatsubo T., et al. Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated a-synuclein. *J Biol Chem* 2000; 275:390–397.

Olanow C. W., Brundin P. Parkinson's disease and alpha synuclein: is Parkinson's disease a prion-like disorder? *Mov Disord*. 2013; 28(1):31-40.

Ostrerova N., Petrucelli L., Farrer M., Mehta N., Choi P., Hardy J., Wolozin B. Alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14–3–3 proteins. *J Neurosci* 1999; 19:5782–5791.

Oueslati A., Fournier M., Lashuel H. A. Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of a-synuclein: implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies. *Prog Brain Res* 2010; 183:115–145.

Pantovic A., et al. Coordinated time-dependent modulation of AMPK/Akt/mTOR signaling and autophagy controls osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone* 2013; 52:524-31.

Park S., et al. AMPK activity is regulated by calcium-mediated protein phosphatase 2A activity. *Cell Calcium* 2013; 53:217-23.

Parker W. D. Jr., Parks J. K., Swerdlow R. H. Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain Research* 2008; 1(1189):215-218.

Paxinou E., et al. Induction of alpha-synuclein aggregation by intracellular nitrate insult. *J. Neurosci* 2001; 21:8053–8061.

Pearce R. K., Owen A., Daniel S., Jenner P., Marsden C. D. Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* 1997; 104(6-7):661-77.

Peng X., et al. Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *J Cell Sci.* 2005; 118:3523-30.

Perez-Revuelta B. I., Hettich M. M., Ciociaro A., Rotermund C., Kahle P. J., Krauss S., Di Monte D. A. Metformin lowers Ser-129 phosphorylated  $\alpha$ -synuclein levels via mTOR-dependent protein phosphatase 2A activation. *Cell Death and Disease* 2014; 5:e1209.

Perier C., Bove J., Vila M. Mitochondria and programmed cell death in Parkinson's disease: apoptosis and beyond. *Antioxid. Redox Signal.* 2012; 16:883-895.

Poels J., et al. Expanding roles for AMP-activated protein kinase in neuronal survival and autophagy. *Bioessays.* 2009; 31:944-52.

Polymeropoulos M. H., Lavedan C., Leroy E., et al. Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276(5321):2054-2047.

Przedborski S., et al. Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *J. Neurosci* 1992; 12:1658–1667.

Qin L., Wu X., Block M. L., Liu Y., Breese G. R., Hong J. S., Knapp D. J., Crews F. T., Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 2007; 55:453–462.

Quist A., Doudevski I., et al. Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:10427–10432.

Ramamurthy S., Ronnett G. V. Developing a head for energy sensing: AMP-activated protein kinase as a multifunctional metabolic sensor in the brain. *J Physiol.* 2006; 574(Pt 1):85-93.

Ramirez A., et al. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-typeATPase. *Nature Genetics* 2006; 38:1184-1191.

Ravikumar B., Sarkar S., et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2010; 90(4):1383-1435.

Rickle A., Bogdanovic N., Volkman I., Winblad B., Ravid R., Cowburn R. F. Akt activity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Neuroreport* 2004; 15:955-959.

Rieker C., Engblom D., et al. Nucleolar disruption in dopaminergic neurons leads to oxidative damage and parkinsonism through repression of mammalian target of rapamycin signaling. *J Neurosci* 2011; 31:453–460.

Ries V., Henschcliff C., Kareva T., Rzhetskaya M., Bland R., During M. J., Kholodilov N., Burke R. E. Oncoprotein Akt/PKB induces trophic effects in murine models of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(49):18757-62.

Ronnett G. V., Ramamurthy S., Kleman A. M., Landree L. E., Aja S. AMPK in the brain: its roles in energy balance and neuroprotection. *J Neurochem.* 2009; 109(Suppl 1):17-23.

Ross O. A., et al. Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism. *Ann Neurol.* 2008; 63:743-50.

Rubinsztein D. C., et al. In search of an "autophagometer". *Autophagy* 2009; 5:585-9.

Ryder J., Su Y., Ni B. Akt/GSK3 $\beta$  serine/threonine kinases: evidence for a signalling pathway mediated by familial Alzheimer's disease mutations. *Cell signal* 2004; 16:187-200.

Saelens X., Festjens N., et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004; 23(16):2861-2874.

Saha A. R., Ninkina N. N., Hanger D. P., Anderton B. H., Davies A. M., Buchman V. L. Induction of neuronal death by alpha-synuclein. *Eur. J. Neurosci.* 2000; 12:3073–3077.

Sakoda H., Ogihara T., et al. Activation of AMPK is essential for AICAR induced glucose uptake by skeletal muscle but not adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282(6):E1239-1244.

Salminen A., Kaarniranta K., Haapasalo A., Soininen H., Hiltunen M. AMP-activated protein kinase: a potential player in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2011; 118(4):460-74.

Samii A, Nutt J. G., Ransom B. R. Parkinson's disease. *Lancet.* 2004; 363(9423):1783–1193.

Sarbassov D. D., Ali S. M., et al. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17(6):596-603.

Satake W., et al. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet.* 2009; 41:1303-7.

Sato H., Kato T., Arawaka S. Potential of Cellular and Animal Models Based on a Prion-Like Propagation of  $\alpha$ -Synuclein for Assessing Antiparkinson Agents. *Mol Neurobiol.* 2014; [Epub ahead of print]

Sayre L. M., Perry G., Smith M. A. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol.* 2008; 21(1):172-88.

Schapira A. H. Etiology of Parkinson's disease. *Neurology* 2006; 66:S10–S23.

Schapira A. H. V. Mitochondrial diseases. *Lancet* 2012; 379:1825–1834.

Schapira A. H. V., Mann V. P., Cooper J. M., et al. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease.

Journal of Neurochemistry 1990; 6(55):2142-2145.

Schulze-Osthoff K., Walczak H., Droge W., Krammer P. H. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J. Cell Biol.* 1994; 127:15–20.

Schulz-Schaeffer W. J. The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathol* 2010; 120(2):131–43.

Scott P. H., Brunn G. J., Kohn A. D., Roth R. A., Lawrence J. C. Jr. Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(13):7772-7.

Shaw R.J. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol (Oxf).* 2009; 196:65-80.

Shulman J. M., De Jager P. L., Feany M. B. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annual review of pathology.* 2011; 6:193–222.

Sidransky E., et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine* 2009; 361:1651-1661.

Siegel G., Alberts Wayne R., Brady S., Price D. Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular, and Medical Aspects. Seventh Edition. 2005.

Simon-Sanchez J., et al. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet.* 2009; 41:1308-12.

Singleton A. B., Farrer M., Johnson J., et al.  $\alpha$ -synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302(5646):841.

Slee E. A., Adrain C., et al. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276(10):7320-7326.

Smith W. W., Jiang H., et al. Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Hum Mol Genet* 2005; 14:3801–3811.

Smith W., et al. Alpha-synuclein phosphorylation enhances eosinophilic cytoplasmic inclusion formation in SH-SY5Y cells. *J. Neurosci.* 2005; 25:5544–5552.

Spasic M. R., et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) molecular crossroad for metabolic control and survival of neurons. *Neuroscientist* 2009; 15:309-16.

Spasic M. R., et al. *Drosophila* alicorn is a neuronal maintenance factor protecting against activity-induced retinal degeneration. *J Neurosci* 2008; 28:6419-29.

Spillantini M. G., et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997; 388:839-40.

Stanley J. A., Pettegrew J. W., Keshavan M. S. Magnetic resonance spectroscopy in schizophrenia: methodological issues and findings — part I. *Biol. Psychiat.* 2000; 48:357–368.

Stefanis L. Alpha-Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2:a009399.

Stefanoni G., Sala G., Brighina L., Tremolizzo L., Ferrarese C. Alpha-Synuclein, Oxidative Stress and Autophagy Failure: Dangerous Liaisons in Dopaminergic Neurodegeneration. Etiology and Pathophysiology of Parkinson's Disease, Prof. Abdul Qayyum Rana (Ed.). InTech, 2011.

Stefanova N., Klimaschewski L., Poewe W., Wenning G. K., Reindl M. Glial cell death induced by overexpression of alpha-synuclein. *J. Neurosci. Res.* 2001; 65:432–438.

Steidinger U. T., Standaert G. D., Yacoubian A. T. A neuroprotective role for angiogenin in models of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 2011; 116:334-341.

Stennicke H. R., et al. Pro caspase 3 is a major physiologic target of caspase-8. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:27084–27090.

Sung J. Y., Kim J., Paik S. R., Park J. H., Ahn Y. S., Chung K. C. Induction of neuronal cell death by Rab5A-dependent endocytosis of alpha-synuclein. *J Biol Chem.* 2001; 276(29):27441-8.

Tatton N. A. Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2000; 166(1):29-43.

Taymans J. M., Baekelandt V. Phosphatases of  $\alpha$ -synuclein, LRRK2, and tau: important players in the phosphorylation-dependent pathology of Parkinsonism. *Front Genet.* 2014; 5:382.

Timmons S., Coakley M. F., Moloney A. M., O'Neill C. Akt signal transduction dysfunction in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2009; 467:30–35.

Tokuda T., Qureshi M. M., Ardah M. T., Varghese S., Shehab S. A., Kasai T., Ishigami N., Tamaoka A., Nakagawa M., El-Agnaf O. M. Detection of elevated levels of alpha-synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology* 2010; 75:1766–1772.

Turnley A. M., Stapleton D., Mann R. J., Witters L. A., Kemp B. E., Bartlett P. F. Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *J Neurochem.* 1999; 72(4):1707-16.

Uchiyama Y., Koike M., Shibata M., Sasaki M. Autophagic neuron death. *Methods Enzymol.* 2009; 453:33-51.

Uversky V. N., Li J., Fink A. L. Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 2001; 500:105–108.

Valente E. M., Abou-Sleiman P. M., Caputo V., et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004; 304(5674):1158–1160.

Valente E. M., et al. Molecular pathways in sporadic PD. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012; 18(Suppl 1):S71-3.

Vekrellis K., et al. Inducible over-expression of wild type alpha-synuclein in human neuronal cells leads to caspase-dependent non-apoptotic death. *J Neurochem.* 2009; 109:1348-62.

Vekrellis K., Rideout H. J., Stefanis L. Neurobiology of alpha-synuclein. *Mol Neurobiol* 2004; 30:1–21.

Vingtdeux V., et al. AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. *J Biol Chem.* 2010; 285:9100-13.

Vingtdeux V., et al. AMPK is abnormally activated in tangle- and pre-tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Acta Neuropathol.* 2011b; 121:337-49.

Vingtdeux V., et al. Novel synthetic small-molecule activators of AMPK as enhancers of autophagy and amyloid-beta peptide degradation. *FASEB J* 2011a; 25:219-31.

Vogiatzi T., et al. Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem.* 2008; 283:23542-56.

Volles M. J, Lee S. J., et al. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry* 2001; 40:7812–7819.

Volles M., Lansbury P. J. Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry* 2003; 42:7871–7878.

Vucicevic L., et al. Compound C induces protective autophagy in cancer cells through AMPK inhibition-independent blockade of Akt/mTOR pathway. *Autophagy* 2011; 7:40-50.

Wang X., Meng D., Chang Q., Pan J., Zhang Z., Chen G., Ke Z., Luo J., Shi X. Arsenic inhibits neurite outgrowth by inhibiting the LKB1-AMPK signaling pathway. *Environ Health Perspect.* 2010; 118(5):627-34.

Webb J. L., et al. Alpha-synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278:25009-25013.

Williams J. R., Little J. B., Shipley W. U. Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA. *Nature* 1974; 252:754–755.

Williamson P. C., Drost D. J. P MRS in the assessment of brain phospholipid metabolism in schizophrenia. In: *Phospholipid Spectrum Disorder in Psychiatry*. Eds Peet, M., Glen, I., Horrobin, D. F. UK: Marius Press, 1999; 45–55.

Winslow A. R., et al. Alpha-Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *Journal of Cell Biology* 2010; 190:1023-1037.

Witczak C. A., Sharoff C. G., et al. AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: from structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(23):3737-3755.

Won J. S., et al. Involvement of AMP-activated-protein-kinase (AMPK) in neuronal amyloidogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 399:487-91.

World's first Parkinson's vaccine is trialled. *New Scientist.* 2012.

Wu Y., et al. Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease. *Neurosignals.* 2011; 19:163-74.

Wu Y., Song P., Xu J., Zhang M., Zou MH. Activation of Protein Phosphatase 2A by Palmitate Inhibits AMP-activated Protein Kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(13):9777–9788.

Xiao B., Sanders M. J., et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 2011; 472(7342):230-233.

Xie H. R., Hu L. S., Li G. Y. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl).* 2010; 123(8):1086-92.

Xie Z., et al. Activation of protein kinase C zeta by peroxynitrite regulates LKB1-dependent AMP-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *J Biol Chem.* 2006; 281:6366-75.

Xilouri M., et al. Selective neuroprotective effects of the S18Y polymorphic variant of UCH-L1 in the dopaminergic system. *Hum Mol Genet.* 2012; 21:874-89.

Xilouri M., Stefanis L. Autophagy in the central nervous system: implications for neurodegenerative disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010; 9(6):701-19.

Xilouri M., Stefanis, L. Autophagic pathways in Parkinson disease and related disorders. *Expert Rev Mol Med.* 2011; 13:e8.

Xilouri M., Vogiatzi T., Vekrellis K., Park D., Stefanis L. Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PLoS One* 2009; 4(5):e5515.

Yamamoto A., Friedlein A., Imai Y., Takahashi R., Kahle P. J., Haass C. Parkin phosphorylation and modulation of its E3 ubiquitin ligase activity. *J. Biol.*

Chem. 2005; 280:3390–3399.

Yang Q., Guan K. L. Expanding mTOR signaling. *Cell Res* 2007; 17(8):666-681.

Yoritaka A., et al. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93(7):2696-701.

Youle R. J., van der Bliek, A.M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 2012; 337(6098):1062–1065.

Yu H. C., et al. Nilotinib induces autophagy in hepatocellular carcinoma through AMPK activation. *J Biol Chem*. 2013; 288:18249-59.

Yuan J., Kroemer G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev* 2010; 24(23):2592-2602.

Zarranz J. J., Alegre J., Gomez-Esteban J. C., et al. The new mutation, E46K, of  $\alpha$ -synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of Neurology* 2004; 55(2):164-173.

Zhang J., Perry G., Smith M. A., Robertson D., Olson S. J., Graham D. G., Montine T. J. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *The American Journal of Pathology* 1999; 154(5):1423-9.

Zhou H., Li X. M., Meinkoth J., Pittman R. N. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol*. 2000; 151(3):483-94.

Zhou Z. D., Yap B. P., Gung A. Y., Leong S. M., Ang S. T., Lim T. M. Dopamine-related and caspase-independent apoptosis in dopaminergic neurons induced by overexpression of human wild type or mutant alpha-synuclein. *Exp Cell Res*. 2006; 312(2):156-70.

Zimmermann S., Moelling K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* 1999; 286:1741-1744.

Zou T., Xiao B., Tang J., Zhang H., Tang X. Downregulation of Pael-Rexpression in a Parkinson's disease cell model reduces apoptosis. *J. Clin. Neurosci*. 2012; 19:1433–1436.

## BIOGRAFIJA

Dr Marija Dulović je rođena 24.11.1981. godine u Šapcu. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu u Beogradu 2009. godine sa prosečnom ocenom 9.06. Doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu u Beogradu, studijski program Molekularna medicina, upisala je školske 2009/2010. godine, a prosečna ocena tokom studija joj je bila 9.60. Od februara do decembra 2010. godine je bila zaposlena kao istraživač pripravnik na projektu MNTR br. 145058, pod nazivom „Molekularni mehanizmi regulacije ćelijske smrti u fiziološkim i patološkim uslovima“, čiji je rukovodilac bio akademik prof. dr Vladimir Bumbaširević. Od januara 2011. godine je saradnik na integrativnom projektu MNTR br. 41025 : „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetske balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“, rukovodioca prof. dr Trajković Vladimira. Na Medicinskom fakultetu u Beogradu je zaposlena u aprilu 2011. godine u zvanju saradnik u nastavi, a od jula 2013. godine u zvanju asistenta za užu naučnu oblast medicinska i klinička biohemija. Bila je mentor na 7 radova na domaćim, i 8 radova na međunarodnim kongresima studenata medicine, od kojih je jedan osvojio nagradu za najbolji rad u sesiji na 23-ćem Evropskom studentskom kongresu u Berlinu 2012. godine. Takođe, mentor je jednog diplomskog rada i 1 studentskog rada koji je štampan u časopisu „Medicinski podmladak“. Koautor je na 2 rada koji nisu i 8 radova koji su štampani u časopisima indeksiranim u Current Contents-u (CC) ili Science Citation Index-u (SCI). Takođe, koautor je na 18 izvoda u zbornicima nacionalnih, i na 31 izvodu u zbornicima međunarodnih skupova. Dobitnik je nagrade za najbolju poster prezentaciju u sesiji na V kongresu Društva za neuronauke Srbije 2011. godine, a dobitnik je i stipendije „Fondacije Risto Bokonjić“ za šestomesečno stručno usavršavanje na Institutu za neurogenetiku u Libeku. Član je Srpskog lekarskog društva, Lekarske Komore Srbije, Biohemijskog društva Srbije, Društva za mitohondrijalnu i slobodnoradikalnu fiziologiju, Društva Neuronauka Srbije, Evropske federacije neuronauka, i Evropskog društva za Neurohemiju.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisana Marija Dulović

broj upisa \_\_\_\_\_

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

**Uloga kinaze aktivirane adenozin monofosfatom u neurotoksičnom delovanju alfa-sinukleina *in vitro***

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 05.05. 2015.

Potpis doktoranta

Marije Dulović

**Prilog 2.**

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada**

Ime i prezime autora Marija Dulović

Broj upisa \_\_\_\_\_

Studijski program Molekularna medicina

Naslov rada **Uloga kinaze aktivirane adenozin monofosfatom u neurotoksičnom delovanju alfa-sinukleina *in vitro***

Mentor prof. dr Ivanka Marković

Komentor akademik prof. dr Vladimir Kostić

Potpisani Marija Dulović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranta**

U Beogradu, 05.05.2015.

Marija Dulović

**Prilog 3.**

## **Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**Uloga kinaze aktivirane adenozin monofosfatom u neurotoksičnom delovanju alfa-sinukleina *in vitro***

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
- ☒ 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

**Potpis doktoranta**

U Beogradu, 05.05.2015.

Marije Bulović