Uloga protein kinaze aktivirane adenzin monofosfatom (AMPK) u dejstvu modifikovanih oblika rekombinantnog vanćelijskog α -sinukleina *in vitro*

The role of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) in the action of modified recombinant extracellular wt (wild-type) ASYN in vitro

Marija Jeremić¹, Ratko Radeta¹, Maja Jovanović¹, Marija Dulović^{1,2}

¹ Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

² Mentor: Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Univerzitet u Beogradu

Kontakt: marijaj26@yahoo.com

Sažetak

Uvod: Glavni patohistološki supstrat Parkinsonove bolesti (PB) predstavlja nagomilavanje proteina ASYN. Pokazano je da posttranslacione modifikacije (oksidacija, nitrozilacija) ASYN pospešuju njegovu agregaciju u neuronima. Promene u aktivnosti signalnog puta AMPK pokazane su u različitim modelima neurodegenerativnih bolesti, uključujući i PB.

Cilj: Cilj ovog rada je bio da se ispita uloga AMPK u dejstvu modifikovanih oblika rekombinantnog vanćelijskog wt (engl. wild-type) ASYN na diferencirane SH-SY5Y ćelije.

Materijal i metode: Svi eksperimenti su rađeni na SH-SY5Y ćelijskoj liniji humanog neuroblastoma, diferenciranoj u neuronski fenotip all-trans retinoičnom kiselinom. Ove ćelije su tretirane modifikovanim oblicima rekombinantnog vanćelijskog wt ASYN: oligomernim, nitrovanim i dopaminski izmenjenim oblikom. Za ispitivanje ćelijskog vijabiliteta korišćen je kristal violet test, dok je promena u aktivnosti enzima AMPK i Raptor, kao i konverzija proteina LC3-I u LC3-II formu praćena imunoblot tehnikom.

Rezultati: Analiza ćelijskog vijabiliteta je ukazala da sva tri oblika rekombinantnog vanćelijskog ASYN dovode do statistički značajnog pada vijabiliteta SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma diferenciranih u neuronski fenotip, što je bilo praćeno smanjenjem nivoa aktivne (fosforilane) forme AMPK i nishodne kinaze Raptor, kao i povećanim prelaskom proteina LC3-I u LC3-II oblik vezan za autofagosome. Primena farmakološkog aktivatora AMPK dovela je do značajnog porasta vijabiliteta ćelija koje su gajene u prisustvu pomenutih modifikovanih oblika rekombinantnog ASYN.

Zaključak: Oligomerni, nitrovani i dopaminski oblik rekombinantnog vanćelijskog α -sinukleina (ASYN) dovode do smanjenog preživljavanja ćelija humanog neuroblastoma, što je praćeno smanjenjem aktivnosti protein kinaze aktivirane adenzin monofosfatom (AMPK)/Raptor signalnog puta i indukcijom autofagije. Farmakološki aktivator AMPK (AICAR) dovodi do povećanog preživljavanja ćelija, što sve zajedno upućuje na neuroprotektivno dejstvo AMPK u neurotoksičnosti izazvanoj delovanjem modifikovanih oblika vanćelijskog wt ASYN.

Ključne reči: modifikovani oblici rekombinantnog vanćelijskog wt α -sinukleina, AMPK, autofagija

Abstract

Introduction: Alpha-synuclein (ASYN) accumulation is considered to be one of the key factors in Parkinson's disease (PD) pathogenesis. Posttranslational modifications, including oxidation and nitration, can increase aggregation of ASYN. Alterations of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) signaling have been shown in several neurodegeneration models, including PD.

Aim: The aim of this study was to investigate the role of AMPK in the action of modified recombinant wt (wild-type) ASYN on differentiated SH-SY5Y cells.

Materials and methods: All experiments were conducted in all-trans retinoic acid-differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells, treated with 3 different types of modified recombinant wt ASYN (oligomeric, nitrated and dopamine-modified ASYN). Activation of AMPK and Raptor, together with conversion of LC3-I to LC3-II, were monitored using immunoblotting. Cell viability was assessed using crystal violet assay.

Results: Treatment with modified recombinant wt ASYN (oligomeric, nitrated and dopamine-modified ASYN) led to substantial decrease in number of viable differentiated SH-SY5Y cells. Western blot analysis showed decreased levels of AMPK and its downstream kinase Raptor, together with an increase in the conversion of LC3-I to LC3-II, upon treatment with recombinant ASYN. Pharmacological activator of AMPK (AICAR) significantly increased the number of viable cell in the presence of all 3 types of modified recombinant wt ASYN.

Conclusion: Modified forms of recombinant wt (wild-type) ASYN (oligomeric, nitrated and dopamine-modified ASYN) induced decrease in number of viable differentiated SH-SY5Y cells, accompanied by inactivation of AMPK/Raptor signalling pathway and autophagy induction. Pharmacological activation of AMPK improved cell survival, indicating a protective role of AMPK in neurotoxicity of extracellular ASYN.

Key words: modified recombinant wt ASYN, AMPK, autophagy

Uvod

Parkinsonova bolest (PB) je drugo najučestalije neurodegenerativno oboljenje ljudi, odmah posle Alchajmerove bolesti (1). Rigiditet, tremor i bradikinezija su karakteristični simptomi neophodni za dijagnozu obolelih od PB, a posledica su odumiranja dopaminergičkih neurona u pars compacta substantiae nigrae mezencefalona (2). Etiologija i patogeneza bolesti još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni, ali se pretpostavlja da u nastanku bolesti učestvuju genetski činioci i faktori sredine (3).

Patološki supstrat Parkinsonove bolesti predstavlja citoplazmatsko nakupljanje proteina α -sinukleina (ASYN) unutar struktura nazvanih Levijeva tela (1, 2). Alfa sinuklein je protein koji ostvaruje svoju funkciju u dopaminergičkim neuronima u fiziološkim uslovima, ali njegovo nagomilavanje dovodi do degeneracije neurona i pojave PB (1, 4). Do povećanog nakupljanja ASYN u ćelijama može doći usled njegove prekomerne sinteze i/ili zbog smanjenog kapaciteta za razgradnju ovog proteina. Dva glavna proteolitička sistema u neuronima koja učestvuju u fiziološkoj razgradnji i uklanjanju proteina su ubikvitin -proteazni sistem i lizosomalna razgradnja – autofagija (5, 6). Studije pokazuju da za patološke događaje u PB može da bude odgovorna disfunkcija oba proteolitička sistema (6 - 8), iako noviji podaci daju prednost lizosomalnim mehanizmima (autofagija posredovana šaperonima i makroautofagija) (6, 9).

Pokazano je da ASYN ima nestabilnu osnovnu konformaciju usled čega lako dolazi do stvaranja različitih oblika ASYN kao što su: monomerni, oligomerni, protofibrilarni i fibrilarni (10). Takođe je pokazano da fibrilarni ASYN može da se prenese sa neurona na neuron (11), kao i da se iz ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y, koje prekomerno proizvode ASYN, ovaj protein oslobađa posredstvom egzozoma (12), i da na taj način ASYN može da pređe u zdrave ćelije. Iako je fibrilarni ASYN glavna komponenta Levijevih tela, istraživanja su pokazala da je oligomerni oblik toksičan za neurone (13). Pored ovoga, ASYN podleže različitim posttranslacionim modifikacijama, koje mogu da budu uzrok njegove povećane agregacije. Kao potvrda toga, u uzorcima tkiva mozga, dobijenim nakon smrti obolelih od PB, uočeni su proteinski agregati u kojima se nalaze modifikovani oblici ASYN nastali posttranslaciono (fosforilisani, oksidirani, nitrovani i oblici izmenjeni dopaminom) (5). Nakupljanje različitih oblika ASYN, kao i interakcija ovog proteina sa metabolizmom dopamina, čini dopaminergičke neurone posebno osetljivim na toksično delovanje ASYN (14). Dopamin stabilizuje protofibrilarnu formu ASYN, a kao posledica metabolizma dopamina može da nastane dopaminski izmenjen oblik ASYN, koji dovodi do oštećenja sistema za razgradnju proteina, čime se po-

spešuje agregacija (14, 15). Uz sve navedeno, najnovija istraživanja pokazuju da ASYN nije isključivo unutarćelijski protein, već da se promene u koncentraciji ovog proteina mogu otkriti i u cerebrospinalnoj tečnosti obolelih od PB, što otvara mogućnost korišćenja ASYN kao specifičnog biomarkera u dijagnozi i praćenju PB (12).

U patogenezi PB značajnu ulogu ima oštećenje mitohondrija. Kao rezultat degeneracije mitohondrija, glavnog energetskog generatora u ćeliji, dolazi do smanjenja kapaciteta za sintezu adenosin trifosfata (ATP), sa posledičnim padom unutarćelijske koncentracije ATP-a i porasta unutarćelijske koncentracije adenosin monofosfata (AMP), što može da uzrokuje aktivaciju AMPK (6). Protein kinaza aktivirana adenosin monofosfatom je glavni metabolički energetski senzor, koji se aktivira u uslovima povećanja AMP/ATP odnosa i reguliše metaboličku homeostazu kontrolom većeg broja mehanizama u ćeliji, uključujući i razgradnju proteina putem autofagije (7). Kao i u ostalim ćelijama našeg organizma, AMPK i u neuronima ima značajnu funkciju u održavanju energetskog statusa ćelija i njihovog preživljavanja u uslovima energetskog stresa (8).

Dosadašnja istraživanja ukazuju da su različite neurološke bolesti praćene promenama u aktivnosti AMPK. Pokazano je da aktivacija AMPK u in vitro modelu Alchajmerove bolesti inhibira nastajanje amiloidnih plakova (16), kao i da poboljšava preživljavanje ćelija u modelu Hantingtonove bolesti kod miša. O ulozi AMPK u Parkinsonovoj bolesti se malo zna. Neuroprotektivna uloga AMPK je pokazana na in vitro modelu PB izazvanom delovanjem neurotoksina MPP⁺ (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) (17), kao i na drugom neurotoksičnom modelu PB indukovanom rotenonom, gde je protektivna uloga rezveratrola posredovana signalnim putem AMPK-SIRT1 (engl. silent information regulator 2) preko aktivacije autofagije (8).

Imajući u vidu oskudne podatke o ulozi AMPK u dejstvu modifikovanih oblika ASYN, cilj ovog rada je bio da se ispita uloga AMPK u dejstvu modifikovanih oblika rekombinantnog vanćelijskog wt ASYN u kulturi diferenciranih ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y.

Materijal i metode

Kultura ćelija i reagensi

Za potrebe ovog istraživanja svi eksperimenti su rađeni na SH-SY5Y ćelijskoj liniji humanog neuroblastoma, nabavljenoj od Evropske kolekcije animalnih ćelijskih kultura (engl. *European collection of animal cell cultures*, ECACC, iz Velike Britanije). Ove ćelije poseduju karakteristike dopaminergičkih neurona, kao što je sposobnost sinteze dopamina i noradrenalina, zahvaljujući

ekspresiji tirozin hidroksilaze i dopamin β -hidroksilaze (18). Diferencijacija ćelija u neuronski fenotip vršena je pomoću „all-trans“ retinoične kiseline (RA), koncentracije 20 mM (17), u toku vremenskog intervala od 6 dana (19). Ćelije su gajene na 37°C u vlažnoj atmosferi koja sadrži 5% ugljen-dioksida (CO₂) u medijumu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640, obogaćenom fetalnim goveđim serumom (10%), L-glutaminom (2 mM) i smešom antibiotik/antimikotik (1%). U ovom radu je korišćen farmakološki aktivator AMPK: 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonukleotid (AICAR) (Tocris Bioscience, Bristol, Velika Britanija), rastvoren u medijumu u finalnoj koncentraciji 0,125 mM.

Vijabilitet ćelija je određivan kristal violetnom metodom nakon zasejavanja ćelija u ploče sa 96 bunara, 2 x 104 ćelija u svakom bunaru.

Modifikovani oblici rekombinantnog alfa-sinukleina

Za potrebe ovog istraživanja korišćene su modifikovane forme rekombinantnog wt ASYN: oligomerni oblik (o-ASYN), nitrovan (n-ASYN) i ASYN izmenjen dopaminom (DA-ASYN) (5).

Modifikovani oblici rekombinantnih wt ASYN su dobijeni ljubaznošću dr Omara M.A. El-Agnafa, sa Medicinskog fakulteta, Univerziteta King Abdel Aziz, Jeddah, Saudijska Arabija. Proces dobijanja i karakterizacije modifikovanih oblika ASYN opisan je u ranijim studijama (20, 21, 22).

Formiranje dopaminski izmenjenih alfa-sinukleinskih protofibrila, nitrovanog i oligomernog ASYN, potvrđeno je pomoću oligomernog ASYN ELISA testa i imunoblotom. Modifikovani oblici rekombinantnog wt ASYN su korišćeni u koncentraciji od 5 μ M u toku 48h, nakon čega je rađen test vijabiliteta.

Tehnika imunoblota (Western blot)

Imunoblot tehnika je metoda koja služi za otkrivanje proteina u uzorku, a zasniva se na reakciji antigen-antitelo (Ag-At), gde se koriste At specifična za uzorak koji je Ag. Ova metoda se koristi i za kvantifikaciju proteina u uzorku upotrebom odgovarajućih denzitometrijskih tehnika.

Imunoblot je korišćen za vizuelizovanje promene u aktivnosti AMPK i Raptor-a u SH-SY5Y ćelijama diferenciranim u neuronski fenotip. Kako bi se potvrdila indukcija procesa autofagije, tehnikom imunoblota je ispitivana konverzija solubilnog LC3-I (engl. *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) u LC3-II oblik proteina koji je konjugovan sa fosfatidil-etanolaminom, koji se specifično inkorporira u membranu autofagozoma i autofagolizozoma (23). Za ovu analizu, ćelije su li-

zirane na ledu 30 minuta puferom za liziranje (engl. lysis buffer) (30 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM fenilmetilsulfonilfluorid i inhibitori proteaza), centrifugirane su na 14000 g, 15 minuta na 4°C, a nakon čega je pokupljen supernatant.

Nakon liziranja ćelija određivana je koncentracija proteina u svakom uzorku metodom po Bradfordu. Koncentracije proteina u uzorcima se računaju u odnosu na standardnu krivu, koja se dobija pomoću goveđeg serumskog albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA) u koncentraciji od 5, 10, 15 i 20 mg/ml. Ovom prilikom je korišćena boja kumasi sjajnoplava (engl. *Coomesie Brilliant Blue*), koja menja intenzitet u prisustvu proteina (od braon do različitih nijansi plave boje). Intenzitet dobijene plave boje proporcionalan je koncentraciji proteina u uzorku. Apsorbanca je očitana na čitaču za mikrotitratske ploče (TECAN Sunrise, Velika Britanija) na 570 nm u prvih sat vremena. Nakon očitavanja apsorbanci napravljena je standardna kriva sa koje su očitane koncentracije proteina.

Jednake količine proteina iz svakog uzorka razdvojene su pomoću SDS-PAGE na 10% poliakrilamidnom gelu, a potom je izvršen transfer na nitrocelulozne membrane (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francuska). Kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela za membranu, membrana je inkubirana u 5% nemasnom mleku u prahu rastvorenom u Tris-puferovanom rastvoru (TBS) sa dodatkom 0,05% Tween 20 (TBS-T) (1 sat na sobnoj temperaturi). Membrane su stajale tokom noći potopljene u rastvor primarnog antitela za: p-AMPK (1:1000), AMPK (1:1000), p-Raptor (1:1000), Raptor (1:1000), LC3 (1:900) i β -actin (1:5000) (Cell Signaling Technology, SAD) u mleku (5% u rastvoru TBS-T). Nakon njegovog ispiranja dodato je sekundarno antitelo, koje se vezuje za peroksidazu (engl. *anti-rabbit IgG-HRP At*, 1:5000, Jackson IP Laboratories, SAD). Kao kontrolu dobijenih imunoblotova koristili smo određivanje nivoa proteina aktina, kako bismo utvrdili da je na gelove nanošena jednaka količina proteina za svaki uzorak. Nalivanjem hemiluminescentnog supstrata za peroksidazu (Amersham Pharmacia Biotech, SAD) na nitrocelulozne membrane i vizuelizacijom signala na rendgenskom filmu, dobijeni su kvalitativni podaci o prisustvu određenog proteina.

Test vijabiliteta

Kristal violet metoda je korišćena za ispitivanje ćelijskog vijabiliteta. Ova boja se vezuje za proteine u živim ćelijama, tako da je intenzitet plave boje proporcionalan broju živih ćelija. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost triplikata iz tri nezavisna eksperimenta i izraženi su kao procenat živih ćelija u tretmanu u odnosu na netretirane (kontrolne) diferencirane ćelije ($\emptyset$) za koje je vijabilitet arbitrarno postavljen na vrednost od 100%.

Nakon isteka inkubacije, ćelijama je odliven medijum, one su oprane su puferovanim fiziološkim rastvorom (PBS) i dodato je po 50 μ L metanola u svaki bunar. Ploče su potom 10 minuta stajale na sobnoj temperaturi, i na ovaj način je izvršena fiksacija ćelija. Odliven je metanol i dodat je rastvor boje kristal violet (1:10 u fosfatnom puferu (PBS-u)), po 50 μ L u svaki bunar. Posle 10 minuta odlivena je boja i ćelije su isprane u posudi sa vodom. U svaki bunar je dodato po 50 μ L 33% rastvora sirćetne kiseline. Kristal violet se pod dejstvom sirćetne kiseline rastvara i rastvor postaje plave boje. Apsorbanca je očitana na čitaču za mikrotitarske ploče (TECAN Sunrise, Velika Britanija) na 570 nm.

Statistička analiza

Za poređenje rezultata korišćen je Studentov t-test za dva mala nezavisna uzorka. Kao kriterijum značajnosti razlike uzeto je $p < 0,05$ (statistički značajno) i $p < 0,01$ (statistički veoma značajno).

Rezultati

Modifikovani oblici rekombinantnog vanćelijskog wt ASYN uzrokuju pad vijabiliteta ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y

Sva tri modifikovana oblika rekombinantnog vanćelijskog wt ASYN dovela su do statistički značajnog pada vijabiliteta ćelija humanog neuroblastoma diferenciranih

Grafikon 1. Uticaj modifikovanih oblika rekombinantnog vanćelijskog wt ASYN na vijabilitet SH-SY5Y ćelija. Diferencirane ćelije su gajene 48 sati u prisustvu modifikovanih oblika vanćelijskog ASYN (oligomernog, nitrovanog i dopaminski izmenjenog), nakon čega je kristal violet testom određen vijabilitet ćelija.

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tripplikata iz 3 reprezentativna uzorka $\pm$ SD (* $p < 0,05$ u poređenju sa netretiranim diferenciranim ćelijama (Ø))

u neuronski fenotip. Najtoksičniji je bio DA-ASYN, kod koga je vijabilitet ćelija pao na $58,55 \pm 1,12\%$, zatim o-ASYN koji je uzrokovao smanjenje vijabiliteta na $65,5 \pm 1,73\%$ dok je najmanje toksičan bio ASYN koji je doveo do pada vijabiliteta na $69,69 \pm 1,59\%$ (**Grafikon 1**), u odnosu na kontrolu, tj. netretirane diferencirane ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y.

Modifikovani oblici rekombinantnog vanćelijskog wt ASYN dovode do smanjene aktivacije AMPK/Raptor signalnog puta

Sva tri modifikovana oblika rekombinantnog vanćelijskog wt ASYN dovela su do smanjene zastupljenosti aktivnog (fosforilisanog) oblika AMPK (pAMPK), kao i aktivnog (fosforilisanog) oblika nishodne kinaze Raptor (pRaptor) kod diferenciranih SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma. Zastupljenost ukupnih formi proteina (AMPK, Raptor) u svim analiziranim uzorcima ostala je nepromenjena (**slika 1**).

Slika 1. Uticaj modifikovanih oblika rekombinantnog vanćelijskog wt ASYN na aktivnost AMPK/Raptor signalnog puta. Diferencirane ćelije su gajene 48 sati u prisustvu modifikovanih oblika vanćelijskog ASYN (oligomernog, nitrovanog i dopaminski izmenjenog), nakon čega je imunoblot analizom otkrivena aktivnost AMPK/Raptor signalnog puta. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tripplikata iz 3 reprezentativna uzorka $\pm$ S.D. (* $p < 0,05$ u poređenju sa netretiranim diferenciranim ćelijama (Ø))

Farmakološka aktivacija AMPK poboljšava preživljavanje diferenciranih ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y, gajenih u prisustvu modifikovanih oblika vanćelijskog ASYN

Farmakološki aktivator AMPK, AICAR, nije doveo do statistički značajnog smanjenja vijabiliteta diferenciranih SH-SY5Y ćelija, ali je poboljšao ($p < 0,05$) preživljavanje diferenciranih SH-SY5Y ćelija u dvostru-

Grafikon 2. Uticaj farmakološkog aktivatora AMPK (AICAR) na vijabilitet diferenciranih ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y gajenih u prisustvu a) oligo-mernog b) nitrovanog i c) dopaminski modificiranog oblika rekombinantnog vanćelijskog wt ASYN.

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost triplicate iz 3 reprezentativna uzorka $\pm$ S.D. (* $p < 0,05$; u poređenju sa kontrolnim netretiranim diferenciranim ćelijama ($\emptyset$) ** $p < 0,05$; u poređenju dvostruko ASYN+AICAR tretiranih diferenciranih ćelija sa ćelijama tretiranim samo modificovanim oblicima ASYN)

kom tretmanu sa svim ispitivanim oblicima modificovanog vanćelijskog ASYN koji su, primenjeni samostalno (u odsustvu AICAR), doveli do statistički značajnog ($p < 0,05$) smanjenja broja živih diferenciranih SH-SY5Y ćelija.

Modifikovani oblici rekombinantnog vanćelijskog ASYN dovode do povećane zastupljenosti markera autofagije u diferenciranim SH-SY5Y ćelijama humanog neuroblastoma

Modifikovani oblici rekombinantnog vanćelijskog ASYN u diferenciranim SH-SY5Y ćelijama humanog neuroblastoma dovode do porasta u prevođenju LC3-I u LC3-II oblik, svojstvenog autofagiji (27), što je posebno izraženo u tretmanu dopaminskim oblikom ASYN. Ovaj rezultat ukazuje na potencijalni značaj autofagije u dejstvu modificovanih oblika ASYN (slika 2).

Slika 2. Uticaj modificovanih oblika rekombinantnog vanćelijskog wt ASYN na prelazak LC3-I u LC3-II oblik proteina, markera autofagije, u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y. Ćelije su gajene 48 sati u prisustvu modificovanih oblika vanćelijskog ASYN (oligomernog, nitrovanog i dopaminski izmenjenog), nakon čega je imunoblot analizom detektovana konverzija LC3-I u LC3-II.

Diskusija

Alfa sinuklein je protein koji igra centralnu ulogu u funkciji dopaminergičkih neurona (3). Prekomerno nakupljanje ovog proteina u neuronima i njihovom okruženju je važan etiopatogenetski faktor u nastanku PB (1). Karakteriše ga nestabilna osnovna konformacija, tako da lako prelazi iz monomernog u različite oligomerne oblike, gde su određene vrste oligomera nosioci toksičnosti (10). Prethodna istraživanja su pokazala da od početno nastalih solubilnih nastaju stabilni oligomeri, otporni na hidrolizu proteinazom K, što je verovatno ključno za formiranje Levijevih tela i neurodegeneraciju (24). Pored toga što se za oligomerni oblik ASYN smatra da je nosilac

toksičnosti u PB, skorašnja istraživanja su pokazala da se on najlakše oslobađa iz ćelija i prenosi u susedne ćelije, što ima poseban značaj u širenju bolesti (25). Godinama se smatralo da je ASYN isključivo unutarćelijski protein i da ne postoje mehanizmi kojima bi prelazio u vanćelijsku tečnost ili druge neurone. Novija istraživanja, međutim, govore o mogućem prenosu ASYN iz jednog neurona u drugi neuron, gde su od posebnog značaja rezultati dobijeni na obdukcionim analizama tkiva mozga pacijenata obolelih od PB, kojima su tokom života transplantirani fetalni mezencefalični dopaminergički neuroni. Ovim analizama je pokazano da se Levijska tela nalaze i u preživlom graftu, što ukazuje na prenošenje bolesti sa došaćina na graft (26). Na isećima moždanog tkiva obolelih od PB pokazani su i citosolni agregati razlićitih oblika ASYN: nitrovanog, fosforilisnog, oblika, obeleženog ubikvitinom, kao i oksidovanog oblika ASYN dobijenog kao posledica metabolizma dopamina (5), što ukazuje na značaj posttraslacionih modifikacija ovog proteina u nastanku Levijskih tela.

U ovom istraživanju je korišćena ćelijska linija humanog neuroblastoma (SH-SY5Y), koja ima brojne karakteristike dopaminergičkih neurona i zbog toga se često koristi kao in vitro model Parkinsonove bolesti. Ove ćelije poseduju karakteristike dopaminergičkih neurona, kao što je sposobnost sinteze dopamina i noradrenalina, zahvaljujući ekspresiji tirozin hidroksilaze i dopamin β - hidroksilaze (18). Ćelijemogu da se diferenciraju i u dopaminergičke neurone pomoću all-trans retinoićne kiseline (19). Za potrebe ovog istraživanja, diferencirane SH-SY5Y ćelije tretirane su modifikovanim oblicima rekombinantnog wt ASYN: oligomernim, nitrovanim i dopaminski modifikovanim ASYN u cilju ispitivanja uloge AMPK u delovanju modifikovanih oblika vanćelijskog ASYN.

Rezultati dobijeni ovim istraživanjem ukazali su na neurotoksićni efekat vanćelijskih modifikovanih oblika wt ASYN na diferencirane ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y. Svi analizirani modifikovani oblici rekombinantnog vanćelijskog ASYN doveli su do statistićki znaćajnog smanjenja broja živih diferentovanih diferenciranih SH-SY5Y ćelija u odnosu na kontrolne netretirane ćelije, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima koja su ukazala da nitrovani oblik dovodi do smrti ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y apoptozom (27). Za oligomerni oblik ASYN je takođe pokazano da se najlakše unosi u ćelije ili prenosi iz jedne ćelije u drugu, što dovodi do oštećenja i smrti susednih zdravih neurona (25).

U ovom istraživanju je paćnja usmerena na ulogu AMPK i nishodne kinaze Raptor u dejstvu modifikovanih oblika wt ASYN na diferencirane ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y. Protein kinaza aktivirana adenozin monofosfatom je široko rasprostranjen enzim u svim de-

lovima nervnog sistema, i ima znaćajnu ulogu u razvoju i diferencijaciji neurona (28); konstantno je eksprimiran i funkcionalno aktivan, što je potvrćeno imunohistohemićkim analizama neurona (29). Zaštitna uloga AMPK je pokazana u slućaju neurotoksićnog oštećenja ćelija usled delovanja 1-metil-4-fenilpiridina (MPP+) (17), kao i u slućaju delovanja rotenona (7), često korišćenih in vitro modela PB. U modelu Hantingtonove bolesti kod miša pokazano je da farmakološka aktivacija AMPK pospešuje preživljavanje neurona (30). Rezultati dobijeni ovim istraživanjem odgovaraju podacima iz literature. Pokazali smo, naime, da svi ispitivani oblici ASYN umanjuju kolićinu aktivnih fosforilisanih formi AMPK i Raptor, ćime je nedvosmisleno ukazano na znaćaj deaktivacije AMPK u dejstvu modifikovanih oblika wt ASYN. Osim toga, primena farmakološkog aktivatora AMPK, AICAR, znaćajno je poboljšala preživljavanje diferenciranih SH-SY5Y ćelija, ćime je potvrćeno da smanjena aktivnost AMPK doprinosi neurotoksićnosti modifikovanih oblika vanćelijskog ASYN, što dalje sugeriše moguću protektivnu ulogu aktivacije AMPK, i u skladu je sa dosadašnjim podacima iz literature (7).

S druge strane, podaci iz literature ukazuju, da dopaminski modifikovan ASYN blokira autofagiju i na taj naćin dovodi do oštećenja i posledićne smrti ćelija, kako neuroblastomskih SH-SY5Y, tako i primarnih neurona u kulturi (31). Rezultati ovog istraživanja, međutim, ukazuju da tretman diferenciranih SH-SY5Y ćelija svim modifikovanim oblicima vanćelijskog wt ASYN, a posebno dopaminski modifikovanim, dovodi do, za autofagiju karakteristićnog, prelaska LC3-I u LC3-II oblik tipićan za autofagozome, što govori u prilog indukciji autofagije u ovim ćelijama.

Rezultati ovog istraživanja, dakle, ukazuju da oligomerni, nitrovani i dopaminski oblik rekombinantnog vanćelijskog wt ASYN dovode do smanjenog preživljavanja diferenciranih ćelija humanog neuroblastoma. Oni takođe sugerišu da je moguć i mehanizam neurotoksićnog delovanja svih ispitivanih modifikovanih oblika ASYN smanjenje aktivnosti AMPK/Raptor signalnog puta, i otvaraju mogućnost istraživanja detaljnog molekularnog mehanizma aktivacije ovog signalnog puta u prevazilaćenju neurotoksićnog dejstva modifikovanih oblika ASYN na diferencirane SH-SY5Y ćelije. Imajući u vidu da AMPK moće da indukovati indukuje proces autofagije (9), a da rezultati ovog istraživanja ukazuju da modifikovani oblici ASYN smanjuju aktivnost AMPK, a indukuju autofagiju, dalja istraživanja treba da rasvetle vezu izmeću AMPK i autofagije u mehanizmu dejstva modifikovanih oblika ASYN na diferentovane diferencirane ćelije humanog neuroblastoma.

Literatura

- Winslow AR., Rubinsztein DC. The Parkinson disease protein α -synuclein inhibits autophagy. *Autophagy* 2011; 7(4):429-431.
- Winslow AR., Chen CW, Corrochano S. et al. Alpha-Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *Journal of Cell Biology* 2010; 190:1023-1037.
- Kostić V. Neurologija za studente medicine, Beograd: CI-BID; 2010.
- Tofaris GK, Spillantini MG. Physiological and pathological properties of alpha-synuclein. *Cell Mol. Life Sci.* 2007; 64:2194-2201.
- Volles MJ, Lansbury PT Jr. Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry* 2003; 42(26):7871-8.
- Abou-Sleiman PM, Muqit MM, Wood NW. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7(3):207-19.
- Wu Y., Li X., Zhu JX et al. Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease. *Neurosignals* 2011; 19:163-74.
- Spasic MR, Callaerts P, Norga KK. AMP-activated protein kinase (AMPK) molecular crossroad for metabolic control and survival of neurons. *Neuroscientist* 2009; 15:309-16.
- Harhaji-Trajkovic L, Vilimanovich U, Kravic-Stevovic T et al. AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells. *J Cell Mol Med.* 2009; 13(9B):3644-54.
- Stefanis L. Alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2 2012; a009399.
- Desplats, P., Lee, H. J., Bae, E. J. et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009; 106: 13010-13015.
- Gao L., Tang H., Nie K. et al. Cerebrospinal fluid alpha-synuclein as a biomarker for Parkinson's disease diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Neuroscience* 2014; 645-654.
- Outeiro TF, Putcha P, Tetzlaff JE et al. Formation of Toxic Oligomeric α -Synuclein Species in Living Cells. *PLoS ONE* 2008; 3(4): e1867.
- Siegel G., Alberts Wayne R., Brady S., Price D. Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular, and Medical Aspects. Seventh Edition. 2005.
- 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.
- Vingtdeux V., Giliberto L., Zhao H. et al. AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. *J Biol Chem.* 2010; 285:9100-13.
- Choi JS, Park C, Jeong JW. 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(1):147-51.
- Oyarce AM, Fleming PJ. Multiple forms of human dopamine beta-hydroxylase in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys.* 1991; 290:503-510.
- Joshi, S., Guleria R., Pan J., DiPette D., Singh US. 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: 240-247.
- Cassina AM, Hodara R, Souza JM et al. Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:21409-21415.
- Omar MA, El-Agnaf OMA, Salem SA et al. Detection of oligomeric forms of α -synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *The FASEB Journal.* 2006; 20:3419-425.
- Jakes R., Spillantini MG, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett* 1994; 345:27-32.
- Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol.* 2008; 445: 77-88.
- Cremades N. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of alpha-synuclein. *Cell* 2012; 149:1048-1059.
- Danyer KM, Ruf WP, Putcha P. et al. Heat-shock protein 70 modulates toxic extracellular α -synuclein oligomers and rescues trans-synaptic toxicity. *The FASEB Journal* 2011; 25(1):326-336.
- 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.
- 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.
- Vingtdeux, V., Chandakkar P., Zhao H., D'Abramo C., Davies P, Marambaud P. Novel synthetic small-molecule activators of AMPK as enhancers of autophagy and amyloid-beta peptide degradation. *FASEB J.* 2011; 25: 219-231.
- 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.
- Ma, T.C., et al. Metformin therapy in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurosci.* 2007; Lett 411, 98-103.
- Martinez-Vicente M., Talloczy Z., Kaushik S. et al. Dopamine-modified α -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *The Journal of Clinical Investigation*