

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Maja Đ. Jovanović Tucović

Uloga kinaze aktivirane adenozin
monofosfatom i protein kinaze B (PKB) u
neurotoksičnom oštećenju izazvanom
1-metil-4-fenil piridinijumom u uslovima
in vitro

Doktorska disertacija

Beograd 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Maja Đ. Jovanović Tucović

Role of adenosine monophosphate-
activated protein kinase and protein kinase
B (PKB) in neurotoxic damage induced by
1-methyl-4-phenylpyridinium *in vitro*

Doctoral Dissertation

Belgrade 2020.

MENTOR: Prof. dr Ivanka Marković, Redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

KOMENTOR: Akademik prof. dr Vladimir Kostić, Redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr Vladimir Trajković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

2. Prof. dr Aleksandra Isaković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

3. Prof. dr Silvana Andrić, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodnomatematički fakultet

4. Prof. dr Sonja Misirlić Denčić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

5. Ljubica Vučićević, naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković, Univerzitet u Beogradu,

Datum odbrane doktorske disertacije:

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena u laboratoriji Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu u okviru projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije evidencioni broj projekta III 41025: „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetski balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“, čiji je rukovodilac prof. dr Vladimir Trajković i evidencioni broj projekta OI 175090: „Motorni i nemotorni simptomi parkinsonizma: kliničke, morfološke i molekularno-molekularno-genetičke korelacije“ čiji je rukovodilac akademik prof. dr Vladimir Kostić.

Svom mentoru, prof. dr Ivanki Marković se zahvaljujem na pruženoj prilici da odmah nakon fakulteta, postanem deo njenog istraživačkog tima, ukazanom poverenju, strpljenju, stručnim savetima, motivaciji, kao i na ličnoj i profesionalnoj podršci u svim usponima i padovima kroz koje smo zajedno prošle tokom izrade ove doktorske disertacije. Zahvaljujem joj se i na pruženim prilikama i odrešenim rukama za stručno usavršavanje koje su znatno doprinele mom sazrevanju kao istraživača.

Zahvaljujem se svom komentoru akademiku prof. dr Vladimiru Kostiću koji me je uveo u kompleksan svet neurodegeneracije, kao i na korisnim savetima koji su značajno doprineli realizaciji ove disertacije.

Zahvalna sam svom šefu, prof. dr Vladimiru Trajkoviću na nesebičnoj pomoći u kreiranju ideje i izradi ove doktorske teze, na angažmanu u oblikovanju rezultata iz koje je prizašla i publikacije iz ove teze, na ukazanom poverenju i pruženoj prilici da budem deo njegovog istraživačkog tima. Privilegija je učiti od Vas.

Zahvaljujem se prof. dr Aleksandri Isaković na saradnji, pomoći, na korisnim sugestijama i uloženom vremenu koje je posvetila ovoj disertaciji.

Prof. dr Sonji Misirlić Denčić sam zahvalna ne samo na svesrdnoj profesionalnoj podršci, dragocenim savetima, već i na toplini, pažnji i prijateljstvu koje prevazilazi okvire ovog Instituta. Ona nije samo moj prijatelj, već je postala i prijatelj moje porodice.

Zahvaljujem se prof. dr Silvani Andrić na korisnim savetima koji su značajno doprineli kvalitetu ove disertacije.

Zahvaljujem se dr Ljubici Vučićević na dragocenim savetima, sugestijama, strpljenju da sasluša sve moje ideje, na stručnoj i prijateljskoj podršci,

Posebnu zahvalnost dugujem dr Ljubici Harhaji Trajković, koja je bila tiha, ali uvek prisutna podrška i prijatelj, koja me je hrabrila, gurala napred i davala mi nadu da je moguće završiti ovu disertaciju u danima kada sam ja gubila veru.

Veliku zahvalnost dugujem svojoj dragoj kolegici i prijatelju dr Anđelki Isaković, na strpljenju, pomoći u svim fazama izrade ove disertacije i bezrezervnoj podršci.

Hvala dragim kolegama i prijateljima Željki, Maji, Milošu, Verici, Sašenki, Jeleni, Neveni, Goci, Kasji, Nini, Mariji i Milici, na koje sam mogla uvek da se oslonim kada je trebala pomoć oko nekog eksperimenta i koji su bili tu da me saslušaju i uteše kada je to trebalo. Uz njih sati provedeni u blot sobi u čekanju transfera, uz naučne rasprave lete!

Hvala Sanji Čabarkapi, specijalista strukovni medicinsko-laboratorijski tehnolog i Nadi Bojović, glavnom laborantu biohemije i hemije, na strpljenju, prijateljstvu, podršci i pomoći u svim fazama eksperimentalne izrade ove doktorske disertacije. Hvala vam na svemu što ste me naučile!

Ovom prilikom želim da se zahvalim i svim nastavnicima, saradnicima, laborantima i administrativnom osoblju Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju i Instituta za imunologiju i mikrobiologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, koji su mi pružili pomoć u izradi ove doktorske disertacije.

Hvala mojim dragim drugarima Jeremi, Jovani, Milici, Nataši, Tijani, Biljki, Triši i Ivanici. Hvala vam na ljubavi, prijateljstvu i što znam da ste uvek tu za mene, čak i kada ste hiljadama kilometara daleko!

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici, mami, Voji, Goranu i Nikoli. Bez vaše ljubavi, podrške, odricanja, vere, podstreka, razumevanja i velike pomoći tokom mog školovanja i izrade ove doktorske disertacije, sve ovo ne bi bilo moguće. Tata, mislim da bi bio ponosan.

Maja Jovanović Tucović

Posvećeno mojoj mami

Sažetak

Parkinsonova bolest (PB) je drugo po učestalosti neurodegenerativno oboljenje, koje karakteriše progresivna degeneracija i smrt dopaminergičkih (DA) neurona *substantiae nigrae* (SN) pars compacta, koji učestvuju u kontroli pokreta. Iako je etiologija PB u velikoj meri i dalje nedovoljno razjašnjena, rezultati brojnih eksperimentalnih studija, ukazali su da bi oksidativni stres, disfunkcija mitohondrija i ćelijskih sistema uključenih u homeostazu proteina, mogli biti odgovorni za degeneraciju i smrt DA neurona u SN. Ispitivanje uticaja neurotoksina MPP⁺ na neurone, je do danas ostao jedan od najznačajnijih modela za proučavanje molekularnih mehanizama oštećenja i smrti neurona. Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita uloga oksidativnog stresa, kao i signalnih puteva unutarćelijskog energetskeg senzora, adenozin monofosfatom aktivirane kinaze (AMPK), protein kinaze B/Akt - medijatora rasta i preživljavanja ćelija, autofagije, kao i njihovih interakcija, u modelu oštećenja neurona delovanjem MPP⁺. Istraživanje je sprovedeno na modelu ćelijske linije humanog neuroblastoma SH-SY5Y.

Primena MPP⁺ je dovela do dozno i vremenski-zavisnog pada vijabiliteta i fragmentacije DNK, kome su prethodili porast oslobađanja superoksidnog anjona i depolarizacija unutrašnje mitohondrijalne membrane, kao i rana aktivacija signalnih puteva AMPK i Akt kinaze. Primena antioksidanasa, N-acetil cisteina ili butiliranog hidroksianizola, dovela je do delimičnog smanjenja citotoksičnog delovanja MPP⁺, koji je bio praćen padom nivoa aktivacije AMPK i Akt kinaze. Genska ili farmakološka inhibicija AMPK kinaze rezultirala je povećanom osetljivošću ćelija na MPP⁺, uz smanjenje aktivacije Akt kinaze, dok je farmakološka aktivacija AMPK rezultirala poboljšanim preživljavanjem ćelija tretiranih MPP⁺ toksinom. U uslovima farmakološke ili genske inhibicije Akt kinaze, ćelije su ispoljavale veću osetljivost na štetno dejstvo MPP⁺ toksina, uz povećanu produkciju superoksidnog anjona. Imunoblot analiza uticaja MPP⁺ na aktivnost mTOR signalnog puta, najvažijeg regulatora autofagije u ćeliji, pokazala je da MPP⁺ indukuje kasnu inhibiciju mTOR kompleksa 1 (mTORC1), kao i porast prevođenja proteina LC3-I (engl. *Microtubule associated protein 1 light chain 3*, LC3) u oblik vezan za autofagozome, LC3-II, što ukazuje na

indukciju mTORC1-zavisne autofagije. Međutim, istovremeni porast koncentracije proteinskog supstrata autofagije, sekvestozoma-1/p62 kao i smanjenje u nivou proteina markera lizozoma (LAMP-1), i zastupljenosti vezikula kiselog sadržaja, ukazuju da je indukcija autofagije bila udružena sa smanjenjem autofagnog fluksa. Činjenica da je primena farmakoloških inhibitora autofagije dovela do povećanja štetnog efekta MPP+ toksina na ćelije neuroblastoma, ukazuje na protektivnu ulogu autofagije u ovom modelu.

Zaključak ovog istraživanja je da signalni put AMPK ima protektivnu ulogu u modelu oštećenja ćelija izazvanom MPP+, i da mehanizam neuroprotekcije uključuje ranu aktivaciju protein kinaze B/Akt i njenu ulogu u antioksidativnoj zaštiti, kao i kasno pokretanje mTORC1-zavisne citoprotektivne autofagije. Iz svega navedenog možemo zaključiti da bi modulacija aktivnosti AMPK/Akt signalnog puta i autofagije mogla biti potencijalna meta za postizanje neuroprotektivnih efekata, čijom aktivacijom bi se mogao smanjiti stepen oštećenja i smrti dopaminergičkih neurona u Parkinsonovoj bolesti.

Cljučne reči: Parkinsonova bolest, MPP+, AMPK, Akt, autofagija, oksidativni stres, mitohondrije

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK broj:

Summary

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease characterized by the progressive degeneration and demise of the dopaminergic (DA) neurons in the substantia nigra (SN) pars compacta, part of the midbrain. Even though the etiology of PD is still insufficiently elucidated, research results implicate that oxidative stress, mitochondrial dysfunction and impairment of protein homeostasis cellular play an important role in DA neurons' degeneration and cell death. The MPP⁺ neurotoxic model has been widely used in study of molecular mechanism of neuronal demise in PD. The aim of this study was to assess the interaction between the signaling pathways of the main intracellular energy sensor, adenosine monophosphate activated kinase (AMPK), prosurvival protein kinase B/Akt, oxidative stress and autophagy in the effect of parkinsonian neurotoxin 1-methyl-4-phenyl pyridinium (MPP⁺) The study was conducted on SH-SY5Y human neuroblastoma cell line.

MPP⁺ caused the dose- and time- dependent decrease in cell viability and DNA fragmentation, preceded by increase in superoxide production (2 h) and subsequent inner mitochondrial membrane depolarization (8 h), accompanied by early activation of AMPK and Akt signaling pathways. The reactive oxygen species (ROS) scavengers, N-acetyl-L-cysteine and butylated hydroxyanisole partially alleviated the MPP⁺-induced cell death, causing decrease in phosphorylation levels of both AMPK and protein kinase B/Akt. Pharmacological or genetic AMPK inhibition further potentiated MPP⁺-induced ROS production and cell death, and diminished Akt phosphorylation, whereas AMPK activation exerted protective effects against MPP⁺-induced toxicity. Nevertheless, pharmacological or genetic inactivation of Akt caused an increase in MPP⁺-initiated oxidative stress and neurotoxicity, but failed to affect AMPK activation. Furthermore, MPP⁺ treatment at later time-points (16-24 h) inhibited the main autophagy repressor, mammalian target of rapamycin (mTOR), which was accompanied by the increased levels of the autophagy marker, microtubule-associated protein 1 light-chain 3B. On the other hand, the concentration of a selective autophagic target, sequestosome-1/p62, were increased in MPP⁺-treated cells, while levels of lysosomal-associated membrane protein 1 and cytoplasmic acidification were reduced, which suggested that MPP⁺-

induced autophagy was associated with a decrease in autophagic flux. However, as further pharmacological inhibition of autophagy resulted in higher sensitivity of neuroblastoma cells towards MPP⁺-induced death, it can be concluded that autophagy plays a protective role in the MPP⁺ neurotoxicity.

In conclusion, the results of this study demonstrate that AMPK signaling pathway plays a protective role on MPP⁺-induced neuronal demise, and that this protective effect depends on the early activation of protein kinase B/Akt and its antioxidant activity, along with the late induction of cytoprotective autophagy. Taken together, these findings indicate that modulation of AMPK/Akt signaling pathway and autophagy could be potential target for neuroprotection, hopefully alleviating demise of SN dopaminergic neurons in Parkinson's disease

Keywords: Parkinson's disease, MPP⁺, AMPK, Akt, autophagy, oxidative stress, mitochondria

Research area: Medicine

Research field: Molecular medicine

UDC number:

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Parkinsonova bolest.....	2
1.1.1. Istorijat Parkinsonove bolesti	3
1.1.2. Etiologija PB	4
1.1.3. Molekularni mehanizmi uključeni u neurodegenerativne procese u PB	6
1.1.3.1. Uloga oksidativnog stresa u degeneraciji neurona u PB	7
1.1.3.2. Disfunkcija mitohondrija.....	11
1.1.3.3. Oštećenje sistema za razgradnju proteina.....	14
1.2. Modaliteti ćelijske smrti dopaminergičkih neurona	17
1.2.1. Uloga apoptoze u oštećenju i smrti dopaminergičkih neurona	17
1.2.2. Uloga neapoptotskih puteva u oštećenju i smrti dopaminergičkih neurona	19
1.3. Autofagija	21
1.4. Uloga protein kinaza u neurodegeneraciji u Parkinsonovoj bolesti	24
1.5. Eksperimentalni modeli PB	29
1.5.1. Neurotoksični (hemijski indukovani) modeli PB	29
1.5.2. MPTP/MPP+	30
2. CILJEVI.....	33
3. MATERIJAL I METODE.....	35
3.1. Rastvori i reagensi	36
3.2. Ćelijske kulture i tretmani.....	37
3.3. Određivanje vijabiliteta ćelija	38
3.4. Fazno kontrastna mikroskopija	38
3.5. Protočna citofluorimetrija	39
3.5.1. Analiza fragmentacije DNK	39
3.5.2. Određivanje produkcije slobodnih kiseoničnih radikala	40
3.5.3. Merenje potencijala membrane mitohondrija.....	40
3.5.4. Detekcija autofagije u ćelijama primenom LysoTracker Red DND-99 boje 41	

3.6. Imunoblot analiza	42
3.6.1. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima	42
3.6.2. Elektroforeza i transfer	43
3.6.3. Prenos proteina na nitroceluloznu membranu	44
3.6.4. Imunoblot i detekcija proteina	44
3.7. Ko-imunoprecipitacija	45
3.8. Nukleoporacija.....	46
3.9. Kultivacija i transformacija DH5α, umnožavanje i izolacija plazmida	47
3.10. Statistička analiza podataka	49
4. REZULTATI.....	50
4.1. Uticaj MPP+ na preživljavanje ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y u kulturi	51
4.1.1. MPP+ smanjuje vijabilitet SH-SY5Y ćelija	51
4.1.2. MPP+ menja morfologiju SH-SY5Y ćelija.....	52
4.1.3. MPP+ indukuje fragmentaciju DNK u SH-SY5Y ćelijama	53
4.1.4. Primena MPP+ stimuliše produkciju superoksidnog anjona u SH-SY5Y ćelijama.....	54
4.1.5. MPP+ indukuje pad potencijala unutrašnje mitohondrijalne membrane u SH-SY5Y ćelijama.....	55
4.2. Uloga oksidativnog stresa u MPP+ indukovanoj ćelijskoj smrti i aktivaciji protein kinaze aktivirane adenozin monofosfatom (AMPK) i protein kinaze B (PKB/Akt).....	57
4.2.1. Primena MPP+ u ćelijama neuroblastoma dovodi do aktivacije kinaza AMPK i Akt	57
4.2.2. Antioksidansi inhibiraju citotoksično dejstvo MPP+	58
4.2.3. Antioksidansi smanjuju aktivaciju AMPK i Akt signalnih puteva u SH-SY5Y ćelijama tretiranim MPP+.....	59
4.3. Uloga AMPK u aktivaciji Akt signalnog puta i oštećenju ćelija izazvanom MPP+ toksinom	60
4.3.1. AMPK stimuliše aktivaciju Akt u SH-SY5Y ćelijama tretiranim MPP+	61
4.3.2. Genska inhibicija AMPK dovodi do povećanja produkcije superoksidnog anjona u SH-SY5Y ćelijama tretiranim MPP+	62

4.3.3. Farmakološka modulacija AMPK signalnog puta ukazuje na protektivnu ulogu ovog signalnog puta u MPP+ tretmanu ćelija	64
4.4. Uloga protein kinaze B (PKB/Akt) u modulaciji AMPK signalnog puta i citotoksičnom dejstvu MPP+ izazvanim oksidativnim stresom	65
4.4.1. Farmakološka inhibicija Akt signalnog puta povećava osetljivost ćelija neuroblastoma na štetno dejstvo MPP+	66
4.4.2. Genska inhibicija aktivnosti Akt kinaze doprinosi oksidativnom stresu i osetljivosti ćelija neuroblastoma na oštećenje izazvano MPP+.....	67
4.4.3. Uloga Akt kinaze u modulaciji AMPK signalnog puta u MPP+ modelu PB	68
4.5. mTORC1-zavisna autofagija smanjuje toksično dejstvo u MPP+ modelu PB	70
4.5.1. MPP+ izaziva mTORC1-zavisnu autofagiju u SH-SY5Y ćelijama	70
4.5.2. MPP+ indukuje kasnu, citoprotektivnu autofagiju u SH-SY5Y ćelijama humanog neuroblastoma.....	73
4.6. Mehanizam autofagije indukovane MPP+ posredovan je porastom oksidativnog stresa i aktivacijom AMPK signalnog puta.....	74
5. DISKUSIJA	77
6. ZAKLJUČCI.....	92
7. LITERATURA	94

1. UVOD

1.1. Parkinsonova bolest

Parkinsonova bolest (PB) je drugo po učestalosti hronično, neurodegenerativno oboljenje, odmah posle Alchajmerove bolesti. Javlja se u oko 1-2% populacije starije od 60 godina (1). PB karakteriše progresivna degeneracija i smrt dopaminergičkih neurona *substantia nigra pars compacta* (SNpc), usled koje dolazi do pojave kardinalnih, motornih znakova PB – bradikinezije, rigora i tremora, dok se posturalna nestabilnost javlja u kasnijim fazama bolesti (2).

Vrlo brzo je postalo jasno da klinička slika PB prevazilazi prisustvo samo motornih simptoma i ekskluzivno oštećenje dopaminergičkog neurotransmiterskog sistema. Naime, danas je poznato da se u sklopu bolesti mogu javiti i brojni nemotorni fenomeni, kao i to da bolest zahvata i sve druge neurotransmiterske sisteme (serotonergički, holinergički, adrenergički itd.). Takođe, brojne studije su pokazale i to da nije reč o tihom izumiranju neurotransmiterskih struktura, već da poremećaji u funkciji ne-dopaminergičkih sistema imaju izvestan klinički doprinos u vidu duge, premotorne faze bolesti (2,3). Tokom premotorne faze bolesti, mogu se javiti i nespecifični poremećaji poput kognitivnih i psihijatrijskih, zatim poremećaj spavanja, autonomne disfunkcije, depresije, apatije, ahedonije (4,5). Ovi nespecifični poremećaji čine integralni deo PB, međutim, ukoliko se jave kao izolovani, samo na osnovu njih je nemoguće postaviti dijagnozu bolesti.

Na PB se danas više ne gleda kao na jedinstven neurološki entitet, već kao na najčešći uzrok kliničkog sindroma – parkinsonizma, u čijoj osnovi leži poremećaj nigrostrijatnih dopaminergičkih mehanizama, koji nastaju usled pojačanog, nefiziološkog pražnjenja dopaminergičkih sinapsi, blokade dopaminskih receptora u strijatumu, gubitka dopaminergičkih neurona, snižene koncentracije dopamina i degeneracije nervnih završetaka u strijatumu (2). Međutim, podaci u literaturi govore da više od 70% ukupnih slučajeva parkinsonizma zapravo predstavlja primarni parkinsonizam ili idiopatsku Parkinsonovu bolest (u daljem tekstu Parkinsonova bolest), dok oko 20% čine parkinsonizam-plus sindromi, parkinsonizam u okviru neke druge neurodegenerativne bolesti (poput Hantingtonove ili Alchajmerove bolesti), psihogeni

parkinsonizam i sekundarni, simptomatski ili stečeni parkinsonizam (medikamentozni, toksični, vaskularni i sl.) (2). Sa druge strane, kod oko 5 do 10% pacijenata je utvrđeno da postoji nasledna komponenta, odnosno da je reč o familijanom obliku PB (6).

Uprkos razvoju različitih dijagnostičkih metoda, dijagnoza PB je i dalje pre svega klinička. Najšire korišćeni kriterijumi za postavljanje dijagnoze PB, su prisustvo bradikinezije i barem još jednog od tri kardinalna znaka - rigora, tremora u miru i/ili posturalne nestabilnosti (7).

1.1.1. Istorijat Parkinsonove bolesti

PB je prvi opisao engleski lekar James Parkinson početkom XIX veka u svojoj monografiji "An Essay on the Shaking Palsy" (8). On je posmatrao mali broj pacijenata i opisao motorne simptome bolesti poput tremora, smanjenja mišićne snage i nagnutosti tela prema napred. Prvi naziv bolesti bio je *Paralysis agitans* koji se zadržao sve do kraja XIX veka, kada je, u čast Parkinsona, predloženo da bolest bude nazvana po njemu. U Srbiji je PB prvi put opisao Laza Lazarević 1887. u članku u Srpskom arhivu (2). Početkom XX veka, Friedrich Heinrich Lewy je opisao sferična, citoplazmatska, eozinofilna tela u histopatološkim preparatima tkiva mozga bolesnika sa simptomima PB. U njegovu čast, te inkluzije su nazvane Levijeva tela (u daljem tekstu LT). Danas, LT smatramo nalazom koji je karakterističan za PB, ali ne i patognomoničan. Krajem XX veka utvrđeno je da se LT dominantno sastoje od proteina α -sinukleina (α SYN) (9). Pored α SYN, u LT se mogu naći i drugi proteini poput ubikvitina, neurofilamenta, proteina toplotnog stresa (engl. *Heatshock protein, Hsp*), α -tubulina, GPR37 i drugih (9). Nekoliko godina nakon što su po prvi put opisana LT, Konstantin Tretiakoff je 1919. godine *post mortem* analizom tkiva mozga obolelih od PB, pokazao da dolazi do gubitka neurona u regionu SN (10). Dalja istraživanja tokom '50. i '60. godina XX veka, pokazala su da strijatum sadrži visoku koncentraciju dopamina, kao i da oboleli od PB imaju sniženu koncentraciju dopamina u kaudatusu i putamenu (11,12). Ova saznanja su bila osnova da se prekursor dopamina, levo-DOPA (L-DOPA), primeni kao terapija pacijenata obolelih od PB (13).

1.1.2. Etiologija PB

PB danas smatramo multifaktorijskim oboljenjem, u čijem nastanku ulogu imaju kompleksna interakcija genetičkih i sredinskih faktora (14). Uprkos brojnim metodološkim problemima, epidemiološke studije pokazale su se kao vrlo korisne u rasvetljavanju enigme etiologije PB. Starenje se smatra svakako najznačajnijim faktorom rizika za nastanak bolesti (15). Upravo iz toga razloga, Quinn i saradnici su predložili klasifikaciju bolesti prema starosnom uzrastu u kom se bolest javlja: (i) juvenilni parkinsonizam, ukoliko se znaci bolesti jave pre dvadesete godine života; (ii) PB sa ranim početkom (engl. *young onset*), ukoliko se prvi simptomi bolesti jave između dvadesete i četrdesete godine života; (iii) dok se klasična PB javlja posle četrdesete, a najčešće nakon pedesete godine života (16). Danas je poznato da fenomen starenja čini kompleksan niz događaja na svim nivoima, molekulskom, ćelijskom i tkivnom, usled čega dolazi do promena u ćelijskim procesima (15,17). Neuronsko tkivo je, u odnosu na druga tkiva, posebno osetljivo na promene izazvane starenjem (18). Još od pedesetih godina prošlog veka, kada je prvi put definisana slobodnoradikalna teorija starenja (19,20), postalo je jasno da bi uloga oksidativnog stresa mogla igrati jednu od ključnih uloga u neurodegenerativnim procesima koji se javljaju u starijoj životnoj dobi, i to iz više razloga. Naime neuroni su metabolički vrlo aktivne ćelije, sa malim energetske depozitima i visokim nivoom oksidativnih procesa tokom kojih se obezbeđuje energija neophodna za održavanje složenih metaboličkih procesa. Takođe, neurone karakteriše i niska aktivnost enzima antioksidativne zaštite i visoka koncentracija jona gvožđa. Upravo zbog takvih ćelijskih i metaboličkih karakteristika u neuronima tokom života može doći do akumulacije oksidativnih oštećenja biomakromolekula, kao i do oštećenja mehanizama reparacije. Kumulativni efekat ovakvih oštećenja u neuronima u kombinaciji sa sredinskim i naslednim faktorima, može predstavljati osnov za razvoj PB (15,17).

Drugi najznačajniji faktor rizika je postojanje pozitivne porodične anamneze. I pre nego što su bile moguće genetičke analize, kod jednog broja pacijenata primećeno je da se bolest javlja češće u porodici. Devedesetih godina prošlog veka istraživači su pokušali da identifikuju gene koji bi mogli biti odgovorni za nastanak PB (21,22). Da nasledni faktori, mogu predstavljati faktor rizika za PB, prvi put su pokazali

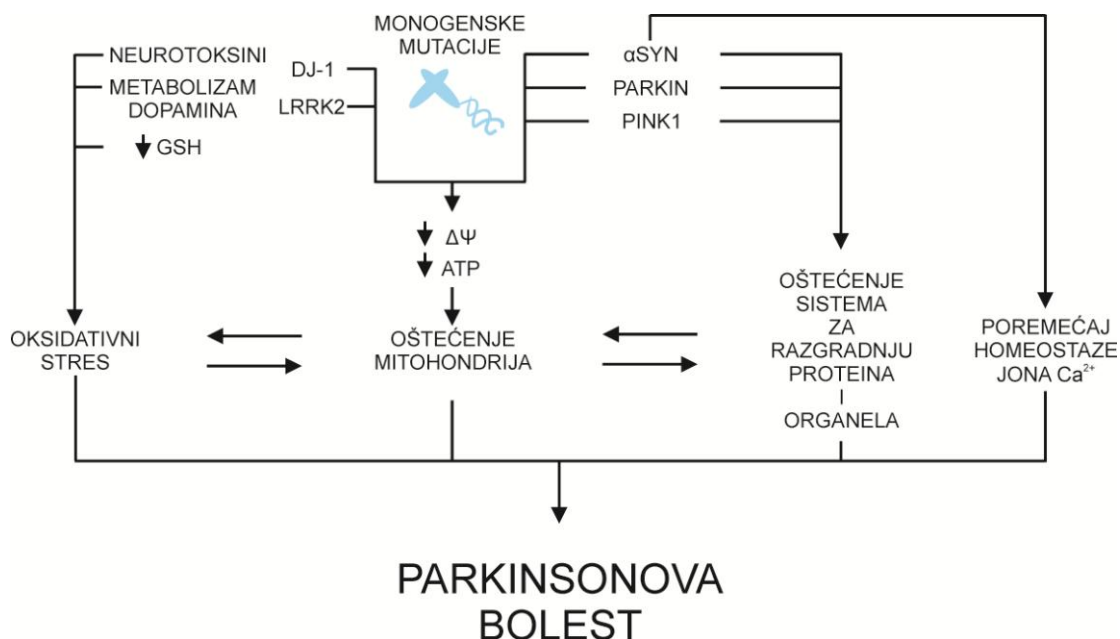
Polymeropoulos i saradnici 1997. genetičkom analizom jedne italijanske i tri grčke porodice koje nisu bile u srodstvu. Sve četiri porodice su imale veliki broj obolelih od PB, sa tipičnom patologijom i nalazom LT (22). Tada je analizom vezanosti čitavog genoma (engl. *Genome-wide linkage*), indentifikovana tačkasta mutacija u genu za α -sinuklein, gde je alanin na poziciji 53 zamenjen treoninom (A53T), a lokus u kom se nalazi gen za α -sinuklein, *SNCA*, označen je sa *PARK1*. Od otkrića gena za α -sinuklein, broj mapiranih *PARK* lokusa je nastavio da raste do danas (23). Tako su studije genetičke asocijacije u čitavom genomu (engl. *Genome-wide association studies* (GWAS)), otkrile čak 23 monogenske mutacije u porodicama kod kojih je parkinsonizam dominantan ili konzistentan znak (24). Međutim, kao što smo već pomenuli, jasna genetička povezanost između bolesti i mutacije u određenom *PARK* genu, koji se nasleđuje autozomalno dominantno ili recesivno, je pokazana u samo 5 do 10% ukupnih slučajeva klasične i PB sa ranim početkom (25). Danas se smatra da je genetička etiologija PB takođe multifaktorijalna, da se ogleda u složenoj interakciji uticaja različitih faktora sredine na ekspresiju pojedinih gena (25). Upravo iz tog razloga, kao i duge premotorne faze bolesti, etiologija PB je do danas ostala u velikoj meri nedovoljno razjašnjena.

Slučajno otkiće osamdesetih godina prošlog veka, kada je grupa mladih, intravenskih narkomana razvila tešku formu PB nakon zloupotrebe dezmetilprodina, navelo je istraživače da toksini, kao spoljašnji faktor, mogu dovesti do oštećenja DA neurona. Nakon tog otkrića, brojne analitičke epidemiološke studije pokazale da izloženost pojedinim pesticidima, herbicidima, različitim industrijskim hemikalijama i sintetičkim opijatima mogu biti faktor rizika za nastanak PB. Tako je meta-analiza 19 studija o povezanosti PB i pesticida, ukazala da ispitanici iz ruralnih, poljoprivrednih područja, koji konzumiraju bunarsku vodu i koji su bili izoženi pesticidima, imaju skoro 2 puta veći rizik da obole od PB u odnosu na ispitanike iz urbanih sredina, koji nisu bili izloženi pesticidima (26). Takođe, na animalnim modelima je primećeno da pojedini herbicidi, poput parakvata, ili pesticidi, poput rotenona, izazivaju oštećenje DA neurona koje je posredovano indukcijom oksidativnog stresa i disfunkcijom mitohondrija, baš kao što je bio slučaj i sa toksinom MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) (27,28). Ovi modeli su prvi ukazali da disfunkcija mitohondrija i oksidativni stres imaju značajnu ulogu u nastanku PB. Pored toga, brojne epidemiološke studije su pokazale da

kofein i nikotin, u izvesnoj meri smanjuju rizik od nastanka PB (29–33). Najpre je u britanskoj prospektivnoj kohortnoj studiji primećena negativna povezanost (34), koja je potvrđena i u drugim studijama na velikim kohortama (35,36). Ovakav rezultat bi se mogao objasniti na nekoliko načina: da nikotin iz cigareta kod pušača stimuliše lučenje dopamina, zatim da nikotin ima određena antioksidativna svojstva ili da utiče na aktivnost monoamin oksidaze B (MAO B) koja je uključena u katabolizam dopamina (37). Pored nikotina, nekoliko velikih prospektivnih kohortnih studija je utvrdilo da postoji takođe obrnuta veza između konzumacije kafe i nastanka PB, a da je za to najverovatnije odgovoran kofein, koji bi mogao imati antiapoptotsko dejstvo u DA neuronima (38). Na kraju, u ispitivanju etiologije PB ispitivan je i uticaj nutritivnih faktora. Tako je pokazano da vitamin B3 i B5, askorbinska kiselina, orašasto voće, mediteranska ishrana i zeleni čaj smanjuju rizik od nastanka PB (29–33).

1.1.3. Molekularni mehanizmi uključeni u neurodegenerativne procese u PB

Uprkos brojnim studijama sprovedenim u poslednjih 50 godina, rezultati istraživanja nisu uspeli da pruže nedvosmislen odgovor na pitanje koji procesi dovode do odumiranja dopaminergičkih neurona u SN (2). Pretpostavlja se da je u osnovi patološkog procesa u PB složena interakcija naslednih i sredinskih činilaca (39). Pored starenja, koje je najznačajniji faktor rizika za nastanak bolesti, otkriće neurotoksina i monogenских mutacija, doveli su do proboja u razumevanju molekularnih događaja koji prethode degeneraciji DA neurona u PB. Rezultati brojnih *in vitro*, *in vivo* i genetičkih studija, ukazali su da oksidativni stres, disfunkcija mitohondrija i oštećenje sistema za razgradnju (proteina i oštećenih organela) imaju značajnu ulogu u patogenezi PB (Slika 1).



Slika 1. Molekularni mehanizmi uključeni u neurodegenerativne procese u PB. Oštećenje sistema za razgradnju proteina, poremećaj homeostaze jona Ca²⁺, povećana produkcija ROS i mitohondrijalna disfunkcija predstavljaju ključne događaje koji indukuju degeneraciju DA neurona u PB. Utvrđeno je da su DA neuroni posebno osetljivi na oksidativna i mitohondrijalnim neurotoksinima-indukovana oštećenja zbog visokih energetske zahteva, metabolizama DA i sniženog nivoa enzima antioksidativne zaštite. Pored toga, genetičke studije su pokazale da u porodicama sa naslednim oblikom PB postoje čak 23 monogenske mutacije, i da se mnoge od njih mogu dovesti u direktnu vezu sa pravilnom funkcijom ili dinamikom mitohondrija i povećanim oksidativnim stresom. DJ-1 – PARK7 (engl. *Parkinson disease protein 7*); ΔΨ-potencijal mitohondrijalne membrane; LRRK2 (engl. *Leucine-rich repeat kinase 2*); αSYN (engl. *Alpha-synuclein*); PINK1 (engl. *PTEN-induced kinase 1*).

*Preuzeto i prilagođeno iz reference (40).

1.1.3.1. Uloga oksidativnog stresa u degeneraciji neurona u PB

Kao što smo već pomenuli, neuroni su izuzetno sintetski aktivne ćelije, koje po pravilu, usled nedostatka energetske depoa, energiju crpe iz oksidativnih procesa koji se odvijaju u mitohondrijama. Imajući u vidu da se u dopaminergičkim neuronima odvija metabolizam dopamina, koji sam po sebi može biti izvor slobodnih kiseoničnih radikala (ROS), u prisustvu visoke količine jona gvožđa i niskog nivoa enzima antioksidativne zaštite, ne iznenađuje činjenica da su DA neuroni posebno osetljivi na

oksidativna oštećenja. Pored toga, epidemiološkim studijama je utvrđeno da starenje predstavlja najveći faktor rizika za nastanak PB. Još od sedamdesetih godina prošlog veka, kada je revidirana slobodnoradikalska teorija starenja, smatra se da ROS i stepen oštećenja mitohondrija imaju veliku ulogu u procesu starenja (20). Takođe, poznato je da tokom starenja dolazi do nakupljenja različitih oksidativnih oštećenja na proteinima, DNK i lipidima, usled čega može doći i do oštećenja sistema za razgradnju proteina i organela. Pored toga, tokom procesa starenja dolazi i do oštećenja reparacionih mehanizama. Kao rezultat svega toga, na ćelijskom nivou dolazi do povećanog oksidativnog stresa i do promena u mitohondrijalnoj aktivnosti. DA neuroni su, upravo zbog svojih prethodno pomenutih metaboličkih i funkcionalnih karakteristika, posebno osetljivi na oksidativna oštećenja i disfunkciju mitohondrija, što čini region SN vulnerabilnim i može predstavljati osnov za razvoj PB.

Potvrda ovakve hipoteze usledila je najpre osamdesetih godina prošlog veka, otkrićem neurotoksina poput MPTP/MPP⁺, rotenona i parakvata. Njihovom primenom je na različitim eksperimentalnim modelima pokazano da oksidativni stres i disfunkcija mitohondrija mogu dovesti do degeneracije i smrti DA neurona. Kasnije, otkrićem različitih genskih lokusa koji se mogu dovesti u vezu sa nasledim oblicima PB, postalo je jasno da, pored disfunkcije mitohondrija, i poremećaj u funkcionisanju ćelijskih sistema za homeostazu i razgradnju proteina takođe mogu imati značajnu ulogu u nastanku PB.

Obdukcione analize tkiva mozga pacijenata obolelih od PB, pokazale su visok nivo oksidativnog stresa u DA neuronima usled povećane koncentracije slobodnih kiseoničnih radikala (engl. *Reactive oxygen species*, ROS) i kod sporadične i kod familijarne forme PB (41–43). ROS su slobodni radikali kiseonika, koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona, što ih čini vrlo reaktivnim. Javljaju kako u fiziološkim, tako i u patološkim stanjima i posebno su skloni reakcijama sa ćelijskim makromolekulima (44). U mitohondrijama, u lancu prenosilaca elektrona (LPE), može doći do “curenja” izvesne količine elektrona tokom reakcije redukcije molekulskog kiseonika do vode. Na ovaj način mogu da nastanu superoksidni radikal, H₂O₂ i hidroksilni radikal (OH[•]). Kako su ćelije konstantno izložene dejstvu slobodnih radikala poreklom iz metaboličkih procesa ali i iz spoljašnje sredine, tokom evolucije došlo je do razvoja efikasnih i složenih sistema antioksidativne zaštite. Pod pojmom sistema

antioksidativne zaštite smatraju se različiti egzogeni ili endogeni mehanizmi, kojima se sprečavaju ili popravljaju oštećenja izazvana oksidativnim stresom u ćeliji. Unutarćelijski, endogeni mehanizmi antioksidativne zaštite, mogu se podeliti na enzimске, poput superoksid dismutaze 1 i 2 (SOD1,2), katalaze, glutation peroksidaze, kao i na neenzimske mehanizme, poput glutationa (GSH), NADPH, koenzima Q-10 (CoQ₁₀) (45). Imajući u vidu da svaka biološka jedinka u sebi nosi visok stepen individualne fenotipske varijabilnosti, ne iznenađuje činjenica da među jedinkama postoji i fenotipska razlika u efikasnosti endogenih antioksidativnih mehanizama u odgovoru na oksidativni stres, što određuje i ukupan stepen nastalih oksidativnih oštećenja. Dakle, sposobnost nekog orgnizma da se izbori sa oksidativnim oštećenjem ne zavisi samo od količine ROS kojima je izložen, već i od sposobnosti sistema antioksidativne zaštite da spreči ili popravi oštećenja biomakromolekula. Efikasnost unutarćelijskih enzimskih i neenzimskih antioksidativnih sistema u PB, moguće je indirektno proceniti u *post mortem* uzorcima pacijenata, merenjem koncentracije proizvoda lipidne peroksidacije, oksidacije proteina i DNK (42,43,46–51).

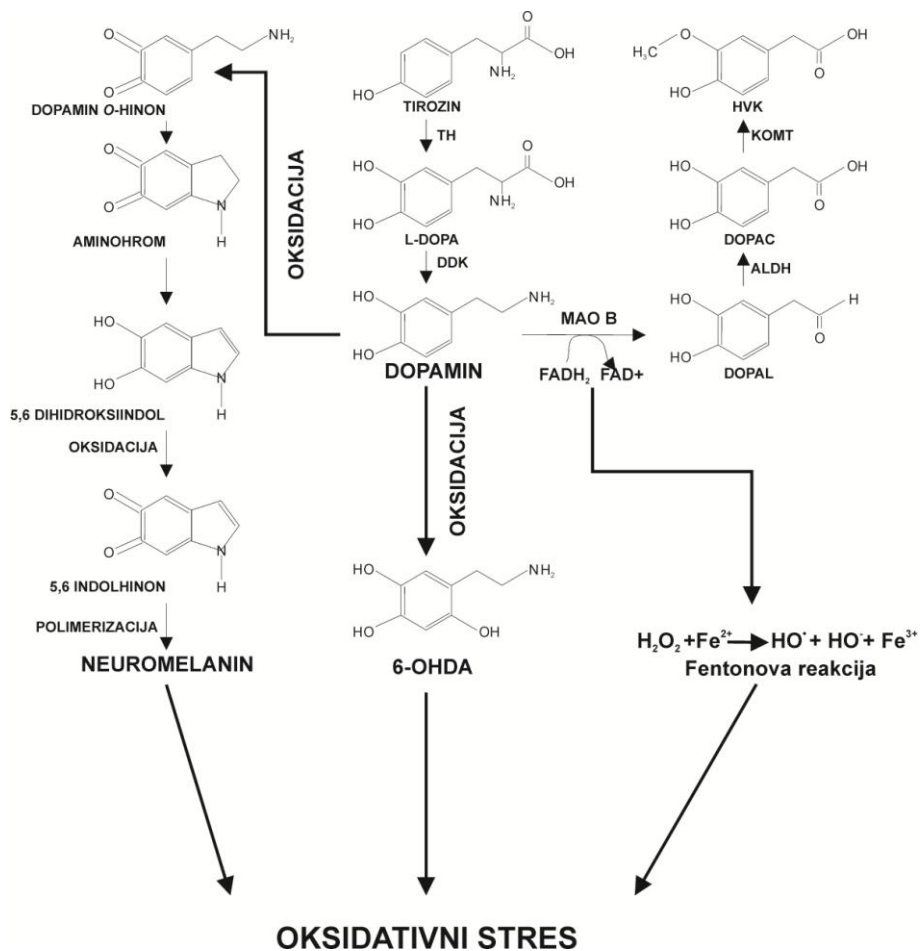
Oksidativni stres se definiše kao poremećaj ravnoteže u produkciji ROS i ćelijskog antioksidativnog kapaciteta (52). DA neuroni su posebno prijemčivi za oksidativna oštećenja zbog osobenosti metabolizma (sinteze i razgradnje) dopamina, niske koncentracije enzima antioksidativne zaštite i visokog sadržaja gvožđa u SN (44).

U procesu sinteze i razgradnje DA, ROS mogu nastati delovanjem enzimskih ili ne-enzimskih mehanizama. Obično se aminokiselina L tirozin (Tyr) smatra početnim supstratom u sintezi dopamina u dopaminergičkim neuronima. Uz pomoć molekuskog O₂ i u prisustvu kofaktora tetrahidrobiopterina, enzim tirozin hidrosilaza (TH), uvodi hidrosilnu grupu u fenolni prsten L tirozina u neuronima i prevodi ga u L-3,4-dihidroksi fenilalanin (levo-DOPA, L-DOPA). L-DOPA se potom, pod dejstvom citoplazmatskog enzima dekarboksilaze aromatičnih aminokiselina (engl. *Aromatic L-amino acid decarboxylase*, AACD) i u prusustvu kofaktora piridoksal fosfata, prevodi u dopamin (Slika 2). Svaka reakcija u kojoj učestvuje molekulski O₂ predstavlja potencijalno mesto rizika za nastanak ROS, pa tako i sama sinteza dopamina može biti izvor oksidativnog stresa. Nakon sinteze, DA se posredstvom vezikularnog monoaminskog transportera 2 (VMAT2) odlaže u sinaptičke vezikule do otpuštanja u sinaptičku pukotinu, iz koje se odstranjuje preko dopaminskog transportera (DAT),

nakon čega se DA ili ponovo skladišti u sinaptičke vezikule ili se razgrađuje do homovanilinske kiseline. Tokom katabolizma DA nastaje H_2O_2 kao nusproizvod, koji dalje može dovesti do oksidacije tiolnih grupa proteina i da na taj način uzrokuje oštećenje proteina u ćeliji (53).

Drugi razlog zbog kog su DA neuroni posebno osetljivi na oksidativni stres je nagomilavanje gvožđa u SN (54–58). Gvožđe se u tkivima nalazi uglavnom u formi Fe^{3+} , dok je vrlo reaktivno Fe^{2+} manje zastupljeno. U SN Fe^{3+} se visokim afinitetom vezuje za neuromelanin i redukuje do Fe^{2+} . Kod pacijenata obolelih od PB, pokazano je da izostaje kompenzatorni porast feritina koji bi trebao da veže višak Fe^{2+} (55,59). Fe^{2+} zajedno sa, već pomenutim nusproizvodom metabolizma dopamina, H_2O_2 može učiti u Fentonovu reakciju, tokom koje se stvara izuzetno toksičan hidroksilni radikal (60).

Takođe, slobodan DA u citoplazmi je sklon autooksidaciji pri fiziološkom pH. Tada dolazi do produkcije *O*-hinona i slobodnih radikala. Ciklizacijom lanca *O*-hinona nastaje aminohrom, prekursor neuromelanina (Slika 2) (61). Zecca i saradnici su pokazali da je upravo neuromelanin jedan od glavnih aktivatora mikroglije i neuroinflamacije koja može da dovede do smrti neurona (62).



Slika 2. Metabolizam dopamina. Monoamin oksidaza (MAO) katalizuje reakciju oksidativne deaminacije DA. Ovo je dvostepena reakcija, u kojoj najpre dolazi do stvaranja imina uz redukciju flavinskog kofaktora (FAD), a zatim ne-enzimskom reakcijom nastaju amonijak i 3,4-dihidroksifenilacetaldehida – (DOPAL), dok se redukovani FAD oksidiše do FAD⁺ uz nastanak H₂O₂. DOPAL se dalje aldehyd dehidrogenazom prevodi do 3,4-dihidroksifenil sirćetnu kiselinu (DOPAC), iz koje će kasnije uz uvođenje jedne metil grupe nastati homovanilinska kiselina. H₂O₂ sa Fe²⁺ može da uđe u Fentonovu reakciju, dajući toksični hidroksilni radikal i vrlo reaktivno Fe³⁺. Pored toga na fiziološkom pH dopamin može da autooksiduje do *O*-hinona, koji je prekursor za nastanak aminohroma i neuromelanina, ili do 6-OHDA i da tako indukuje porast oksidativnog stresa.

1.1.3.2. Disfunkcija mitohondrija

Mitohondrije su ćelijske organele sa dvoslojnom membranom, organizovane u vrlo dinamičnu tubularnu mrežu. Sadrže haploidni genom, koji se replicira nezavisno od jedarne DNK i faze ćelijskog ciklusa (63). Ove organele su specijalizovane za vršenje procesa aerobne oksidativne fosforilacije, tokom koje dolazi do biosinteze ATP. Pored

toga, mitohondrije imaju vrlo značajnu ulogu u procesu apoptoze i u brojnim drugim ćelijskim procesima.

Mitohondrijalna DNK (mtDNK) je smeštena u mitohondrijalnom matriksu. Poznato je da sadrži samo 37 gena, od kojih 13 gena kodira neke od proteina mitohondrijalnih kompleksa I-V, 2 gena koji kodiraju subjedinice mitohondrijalne ribozomalne RNK i 22 gena koji kodiraju mitohondrijalne transportne RNK (64). Ostale proteinske komponente mitohondrijalnih kompleksa i sistema za translaciju mitohondrijalni proteina kodira jedarna DNK (65). mtDNK je posebno osetljiva na oštećenja nastala oksidativnim stresom, pre svega jer se nalazi u neposrednoj blizini LPE, ne sadrži histone i ima manje enzima za reparaciju oštećenja od jedarne DNK (66).

Svakako najvažnija funkcija ovih organela je sinteza ATP koja se dešava na unutrašnjoj membrani mitohondrija u kojoj je smešten LPE, izgrađen od nekoliko katalitičkih proteinskih kompleksa i ATP sintaze, koji zajedno predstavljaju sistem za oksidativnu fosforilaciju (67). LPE je odgovoran za mitohondrijalnu respiraciju i sintezu ATP (65). LPE čine kompleksi I-IV i oni omogućavaju transport elektrona do krajnjeg akceptora, molekularnog kiseonika (O_2), koji se redukuje do vode (H_2O). Transport elektrona je omogućen postojanjem razlika u redoks potencijalu kompleksa I, III i IV (68). Kompleks I ili NADH dehidrogenaza, je flavoprotein i najveći kompleks u LPE. Sastoji se od 45 subjedinica, od kojih je samo 7 kodirano od strane mtDNK, dok su ostale kodirane jedarnom DNK (67,69). NADH dehidrogenaza (Kompleks I ili NADH-koenzim Q oksidoreduktaza) katalizuje prvi korak u LPE, to je zapravo mesto reoksidacije NADH. NADH predaje dva elektrona, koji se prenose do koenzima Q_{10} (CoQ_{10}), ubihinona. Ubihinon se potom oksiduje u ubihinol, predajući dva elektrona kompleksu III. Kompleks II ili sukcinat dehidrogenaza, je najmanji kompleks TLE i on povezuje ciklus trikarboksilnih kiselina (engl. *Tricarboxylic acid cycle*, TCA) sa LPE. Tom prilikom dolazi do oksidacije sukcinata do fumarata, uz predaju dva elektrona CoQ_{10} , koji dalje prenosi elektrone do kompleksa III. Mitohondrijalne ROS najčešće nastaju curenjem elektrona sa kompleksa I i III (70–72). Kompleks III ili citohrom bc_1 , dalje prevodi elektrone sa redukovanog CoQ_{10} do citohroma C (engl. *Cytochrome C*, cyt C), koji se nalazi na spoljašnjoj strani unutrašnje membrane mitohondrija i povezuje komplekse III i IV. Kompleks IV ili citohrom C oksidaza (engl. *Cytochrome C oxidase*,

COX), predstavlja poslednji kompleks LPE i omogućava bezbednu redukciju O₂ do H₂O (68).

Tokom transporta elektrona, kompleksi I, III i IV, istovremeno ispumpavaju protone (H⁺) u međumembranski prostor i tako formiraju elektrohemijski membranski potencijal, čiju energiju koristi ATP sintaza za sintezu ATP (engl. *Adenosine triphosphate*, ATP).

Mitohondrije su, zbog svoje specifične građe, metaboličke aktivnosti i funkcije, podložne egzogenim i endogenim oštećenjima. U slučaju energetskeg stresa indukovano mitohondrijalnim oštećenjem, takve mitohondrije se otklanjaju iz mitohondrijalne mreže procesom koji se naziva mitofisija, a potom selektivno razgrađuju mitofagijom (73). Ukoliko su delimično oštećene mitohondrije, dolazi do njihove fuzije i komplementacije kako bi prevazišle oštećenja i nastali energetske stres (74). Svi ovi procesi su pod kontrolom evolutivno konzerviranih GTPaza iz dinamin superfamilije proteina. Tako mitofisiju kontrolišu Drp1 (engl. *Dynamain-related protein 1*), Mff (mitohondrijalni fisioni faktor) i Mfp1 (mitohondrijalni fisioni protein 1), dok je proces mitofuzije kontrolisan Mfn1/2 (mitofuzinom1/2) i Opa1 (engl. *Optic atrophy 1*) (74).

Otkriće 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) i rasvetljavanje mehanizma njegovog toksičnog dejstva u DA neuronima SN, podstaklo je istaživače da ispituju da li sličan deficit aktivnosti kompleksa I postoji i kod pacijenata sa sporadičnim tipom PB. *Post-mortem* analize su pokazale da ovakav deficit postoji i kod pacijenata u SN, ali i u nekim drugim tkivima (75). Pored ovoga, ustanovljeno je da inhibicija kompleksa I dovodi do produkcije slobodnih radikala i sledstvene indukcije oksidativnog stresa, ali i da oksidativni stres može da izazove disfunkciju kompleksa I.

Kako i sporadična i familijarna forma PB, dele iste značajne kliničke, patološke i biohemijske osobine, postalo je jasno, da bi, obe forme bolesti, mogle da dele i iste molekularne mehanizme koji indukuju oštećenja DA neurona SN. Utvrđeno je da neke od monogenских mutacija, tipičnih za familijarni tip PB, dovode do disfunkcije mitohondrija, porasta oksidativnog stresa i smanjenja kapaciteta mitohondrija za proizvodnju ATP, usled poremećaja u procesima poput mitofagije, mitofuzije i fisije (24,76) (Tabela 1.).

Tabela 1. Česte monogenske mutacije kod pacijenata sa naslednim oblikom PB.

Simbol	OMIM	Klinička slika	Gen	Tip nasleđivanja
<i>PARK1</i>	168601	Rani početak bolesti	<i>SNCA</i>	AD
<i>PARK2</i>	600116	Rani početak bolesti	Parkin	AR
<i>PARK5</i>	191342	tipična PB	<i>UCHL-1</i>	AD
<i>PARK6</i>	605909	Rani početak bolesti	<i>PINK1</i>	AR
<i>PARK7</i>	606324	Rani početak bolesti	<i>DJ-1</i>	AR
<i>PARK8</i>	607060	tipična PB	<i>LRRK2</i>	AD
<i>PARK9</i>	606693	Kufor-Rakebov sindrom	<i>ATP13A2</i>	AR
<i>PARK13</i>	606441	tipična PB	<i>HTRA2</i>	AR
<i>PARK17</i>	614203	tipična PB	<i>VPS35</i>	AD

*Preuzeto i prerađeno iz reference (24)

1.1.3.3. Oštećenje sistema za razgradnju proteina

Integritet ćelijskih procesa zavisi od održavanja proteostaze. U ćeliji postoji nekoliko različitih puteva kojim se otklanjaju stari proteini. Prvi od sistema uključenih u kontrolu kvaliteta proteina u ćeliji je ubikvitin-proteazomski sistem (UPS). UPS predstavlja glavni mehanizam proteolize unutarćelijskih proteina potpuno nezavisno od lizozoma. Njegova uloga se ogleda ne samo u proteolizi proteina koji nemaju adekvatnu konformaciju, već ovaj sistem kontroliše i neke od fundamentalnih procesa, poput regulacije progresije ćelijskog ciklusa, deobe, razvoja i diferencijacije, apoptoze, unutarćelijskog transporta i imunog odgovora. Centralni događaj u ovom sistemu predstavlja kovalentno vezivanje ubikvitina (Ub) za proteine koji su oštećeni, oksidovani, imaju pogrešnu konformaciju ili su regulatorni proteini koje ćelija mora da ukloni kako regulisala progresiju ćelijskog ciklusa (poput ciklina). Ovako Ub obeležene proteine prepoznaje ATP-zavisna, multikatalitička proteaza 26S proteazom (77). Oštećenja UPS mogu poremetiti ćelijsku homeostazu i uticati na razvoj različitih imunoloških i inflamatornih bolesti. Pored toga disfunkcija UPS se sve češće dovodi u vezu sa različitim neurodegenerativnim bolestima kod koji je primećena akumulacija i agregacija proteina praćena poremećajem proteostaze (78). Ukoliko je UPS oštećen ili

onesposobljen, ćelija će pokušati da otkloni nepoželjne proteine ili proteinske agregate u autofagno-lizozomalnim sistem razgradnje proteina (ALS). Danas, sve veći broj podataka u literaturi ukazuje da u PB postoji poremećaj u funkciji lizozoma, odnosno da bi se PB mogla smatrati i lizozomalnom bolešću.

Kada je ustanovljeno da α SYN predstavlja glavnu komponentu LT u DA neuronima, postalo je jasno da bi prekomerna sinteza i/ili nemogućnost razgradnje α SYN, mogli biti odgovorni za oštećenje neurona u SN u PB. Polymeropoulos i saradnici su 1997. godine prvi pokazali da postoji veza između tačkaste mutacije u genu za α SYN i familijarne forme PB (22). Usledile su brojne genetičke studije koje su ustanovile da pored ove mutacije postoji još nekoliko tačkastih mutacija u genu za α SYN, u nekim porodicama sa naslednom formom bolesti, ali su nađene i duplikacije i triplikacije čitavog neizmenjenog ishodnog gena za sinuklein (engl. *wild-type*, wt) (79–81). Najpre se mislilo da se wt α SYN razgrađuje delovanjem UPS, međutim, brzo je ustanovljeno da je osnovni mehanizam razgradnje šaperonima posredovana autofagija (engl. *Chaperone-mediated autophagy*, CMA). Za α SYN se vezuju košaperoni Hsp90, 70 i 40 i sprovode ga do membrane lizozoma. Upravo na membrane lizozoma, α SYN prepoznaje i vezuje se za monomere proteina LAMP-1/2 (engl. *Lysosome-associated membrane protein 1/2*) (82,83). Ovako grupisani LAMP-1/2 monomeri formiraju poru, preko koje α SYN ulazi u lizozom i razgrađuje se delovanjem lizozomalnih proteaza (79,84). Pokazano je da se mutirane forme α SYN A53T i A30P (alanin na poziciji 53 zamenjen je treoninom, odnosno na poziciji 30 prolinom), sa velikim afinitetom vezuju za monomerni LAMP-1/2, koji se međusobno povezuju ali ne formiraju poru, usled čega je sprečen njihov ulazak u lizozom i razgradnja. Na ovaj način remeti se i CMA u ćeliji, jer se remeti normalan rad lizozoma (84). Na sličan način i dopaminska modifikacija α SYN, kao i oksidovana forma, blokira CMA (85). Ako ćelija nije u mogućnosti da razgradi različite forme α SYN (wt, mutirane, oksidovane i sl.) CMA putem, α SYN se onda razgrađuje procesom makroautofagije, ili skraćeno autofagije, o kojoj će biti više reči u daljem tekstu. Ukoliko se ne otkloni iz ćelije, α SYN može imati štetne efekte na ćeliju. Naime, α SYN u rastvoru ne zauzima stabilnu konformaciju i ukoliko se nađe u povećanoj koncentraciji u nekom od ćelijskih odeljaka ili mikrodomena, može da poprimi strukturu β -nabrane ploče, koja ima veću sklonost ka agregaciji i stvaranju oligomera, od kojih su neki oblici vrlo toksični i mogu uzrokovati

niz oštećenja uz ćeliji (npr. fragmentacija Goldži aparata, raskidanja veze Goldži-endoplazmin retikulum, oštećenje lizozoma, oštećenje mitohondrija itd.) (75,86).

Mutacije u *LRRK2* genu (engl. *Leucine rich repeat kinase 2*) su među najčešćim mutacijama kod nasledne forme PB (u Evropi 7% kod porodica sa dominantnim ispoljavanjem PB), ali se često javljaju i kod sporadičnog oblika (1-2%). *LRRK2* je veliki protein kod kojih je idenifikovano više od 20 promena u sekvenci u porodicama sa PB, ali je samo za 6 potvrđena patogenost (R1441C, R1441G, R1441H, Y1699C, G2019S, I2020T). Ovaj protein se takođe razgrađuje putem CMA. Kao i α SYN, mutirani oblici *LRRK2* se vezuju za LAMP-1 i mogu dovesti do nakupljanja supstrata na membrani lizozoma, usled čega dolazi do inhibicije rada lizozoma i CMA (87).

PINK1 (engl. *PTEN-induced kinase 1*) i Parkin proteini se vezuju za oštećene mitohondrije i na taj način ih obeležavaju za autofagni proces razgradnje mitohondrija – mitofagiju. Mutacije u ovim genima inhibiraju mitofagiju i dovode do nakupljanja oštećenih mitohondrija u citoplazmi (88). Pored ove dve mutacije u *Parkin* i *PINK1* genu, i *DJ-1* mutacija je nedvosmisleno povezana sa naslednom formom PB, a sve tri navedene mutacije karakteriše rani početak bolesti. *DJ-1* protein se nalazi kao homodimer u citoplazmi, međutim, u uslovima oksidativnog stresa, može se naći i u mitohondrijama, gde se pretpostavlja da ispoljava antioksidativnu aktivnost (89). Međutim, kako je ovo jedna od najređih mutacija u familijarnom obliku PB, opisana u svega nekoliko porodica, u literaturi postoji ograničena količina podataka u vezi sa kliničkom slikom i odnosom genotipa-fenotipa.

Jedna od najskorije otkrivenih mutacija, koja se dovodi u vezu sa familijarnom formom PB, je u genu za *VSP35* (engl. *Vacuolar protein sorting-associated protein 35*). *VSP35* protein je odgovoran za retrogradni transport proteina od endozoma ka Goldžijevom aparatu. Mutacije u ovom genu mogu da poremete distribuciju lizozomalnih hidrolaza i da tako uzrokuju disfunkciju lizozoma i autofagije (90).

Pored mutacija u genima za α SYN, *PINK-1*, *Parkin*, *LRRK2*, za koje se danas zna da su povezani sa naslednim oblikom PB, kao i da remete normalnu funkciju autofagno-lizozomskog sistema razgradnje, ustanovljeno je da se još neke mutacije mogu dovesti do povećanog rizika za razvoj PB. Tako je pokazano da mutacije u genu za lizozomalnu ATPazu *13A2* i u genu za glukocerebrozidazu, dovode do poremećene funkcije lizozoma, i da nose povećani rizik za razvoj PB (91,92).

Kao rezultat oštećenja ALS, u DA neuronima dolazi do nakupljanja oštećenih i/ili štetnih proteina, proteinskih agregata i disfunkcionalnih mitohondrija, usled čega može doći do degeneracije i smrti DA.

1.2. Modaliteti ćelijske smrti dopaminergičkih neurona

1.2.1. Uloga apoptoze u oštećenju i smrti dopaminergičkih neurona

Hronične neurodegenerativne bolesti, u koje spada i PB, karakteriše dugotrajna i tiha ćelijska smrt - apoptoza (93). Apoptoza predstavlja programiranu, evolutivno konzerviranu i genetički determinisanu ćelijsku smrt (94), koja ima za cilj održavanje homeostaze tkiva. Takođe, apoptoza ima i odbrambenu funkciju u imunološkim reakcijama ili u otklanjanju oštećenih ćelija (95).

Proces apoptoze je složen, energetska zavisan i koordinisan aktivacijom proteolitičkih enzima kaspaza, koje pripadaju porodici cistein-proteaza (96). Kaspaze se u ćeliji nalaze u formi neaktivnih prekursora - proenzima, i mogu se podeliti na tri kategorije: inicijatorske, efektorne i inflamatorne kaspaze (96). Dinamika uključivanja kaspaza u proces apoptoze zavisi od načina njene aktivacije.

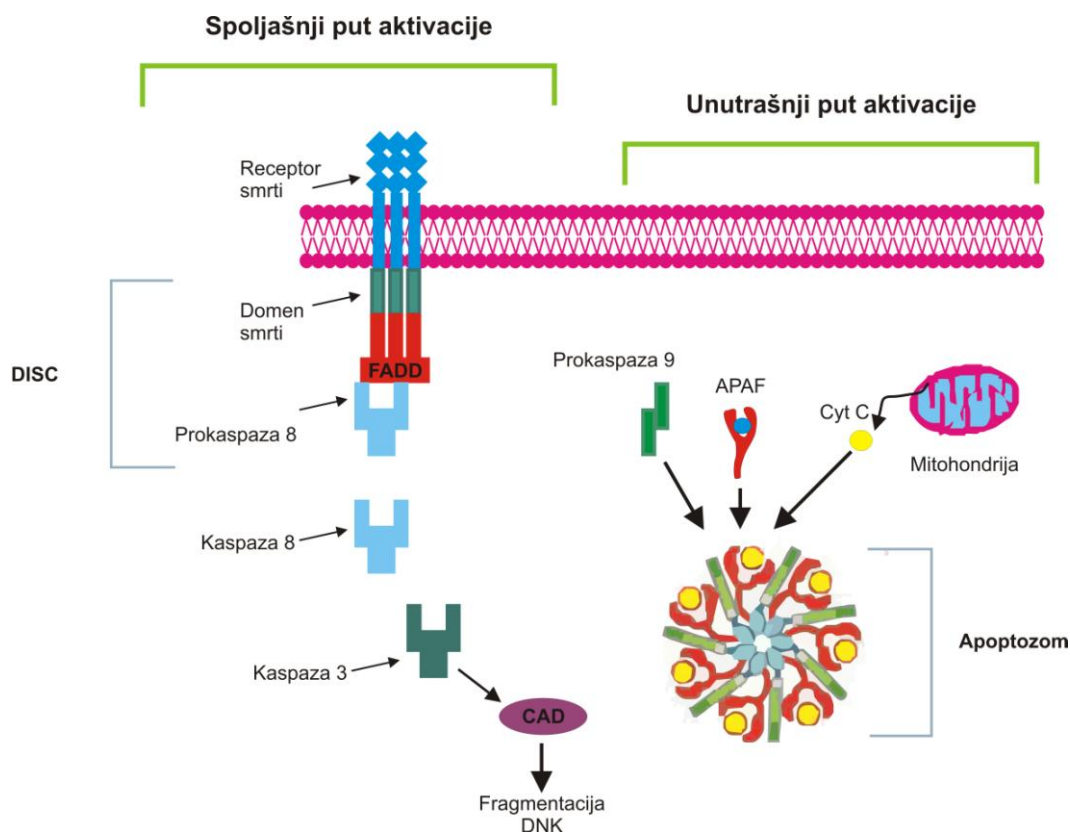
Postoje dva osnovna puta aktivacije apoptoze – spoljašnji ili put receptora smrti i unutrašnji ili mitohondrijalni put (Slika 3.). Apoptoza posredovana receptorom najpre aktivira inicijatorsku kaspazu 8 preko domena smrti, koja dalje aktivira efektorske kaspaze 3 i 7, dok mitohondrijalni put aktivacije apoptoze aktivira kaspazu 9, kao inicijatorsku (96). Mitohondrijalni put pokreću stimuli poput hipoksije, radijacije, različitih toksina i slobodnih radikala. Pored ovih, postoje i stimuli koji ostvaruju negativan efekat svojim prisustvom na indukciju unutrašnjeg puta apoptoze kao što su faktori rasta, citokini i hormoni, tako da se u slučaju njihovog odsustva, pokreće apoptoza (97). Prisustvo pozitivnih i odsustvo negativnih stimulusa, mogu da dovedu do otvaranja mitohondrijalne pore (98). Kontrolu i regulaciju otvaranja mitohondrijalne pore vrši porodica Bcl 2 proteina (engl. *B cell lymphoma 2*). Unutar ove porodice proteina nalaze se proteini sa pro-apoptotskom (Bcl 10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, Blk, Puma i Noxa) ali i sa anti-apoptotskom funkcijom (Bcl 2, Bcl x, Bcl XL, Bcl XS, Bcl W, BAG) (99). Dimerizacija Bcl 2 pro-apoptotskih proteina na mitohondrijalnoj

membrani dovodi do otvaranja mitohondrijanih pora, gubitka transmembranskog potencijala mitohondrija i do oslobađanja jednog od dve grupe proapoptotskih proteina – Cyt C-SMAC/DIABLO-HtrA2/Omi i AIF-endonuleaza G-CAD (engl. *Apoptosis-inducing factor*, AIF, engl. *Caspase-activated DNase*, CAD). Cyt C se vezuje i aktivira Apaf-1 (engl. *Apoptotic protease activating factor 1*) i pokreće kaskadnu reakciju aktivacije kaspaza. Najpre aktivira kaspazu 9 i sa njom formira proteinski kompleks - apoptozom. Aktivirana kaspaza 9 potom aktivira efektorsku kaspazu 3, dok se SMAC/DIABLO i HtrA2/Omi vezuju za protein koji inhibiraju apoptozu - (engl. *Inhibitors of apoptosis proteins*, IAP) (100,101).

Do otpuštanja druge grupe proapoptotskih proteina, AIF-endonuleaza G-CAD, dolazi u kasnijim fazama apoptoze. One svoje dejstvo ostvaruju u nukleusu, gde dovode do kondenzacije hromatina i fragmentacije DNK (102–104).

Ćelije koje umiru apoptozom prolaze specifične morfološke promene, gube volumen, dolazi do kondenzacije i fragmentacije hromatina i do stvaranja apoptotskih tela. Apoptotska tela predstavljaju delove citoplazme sa gusto pakovanim organelama, obavijene očuvanom ćelijskom membranom na čijoj površini se nalazi fosfatidilserin, koji predstavlja signal za prepoznavanje od strane fagocita (105). Na ovaj način, gotovo da nema zapaljenske reakcije, jer apoptotične ćelije ne ispuštaju svoj unutarćelijski sadržaj u međjućelijski prostor, a makrofagi brzo fagocituju apoptotska tela (106,107).

Danas postoje brojne potvrde iz različitih studija koje ukazuju na značaj apoptoze u etiologiji PB. *In vitro* modeli PB sa dopaminom i neurotoksinima, 6-OHDA (6-hidroksi dopamin) i MPTP/MPP+, pokazali su karakteristične biohemijske, histohemijske i morfološke promene tipične za apoptozu u različitim neuronskim ćelijskim linijama (108–111).



Slika 3. Najznačajniji događaji u apoptozi

* Preuzeto i prilagođeno iz reference (97).

1.2.2. Uloga neapoptotskih puteva u oštećenju i smrti dopaminergičkih neurona

Krajem prošlog veka definisana su tri osnovna modaliteta ćelijskog umiranja: apoptoza, autofagija i nekroza, međutim danas se zna da pojedini tipovi ćelijskog umiranja prevazilaze okvire ove podele (112). Tako se u studijama istraživanja različitih eksperimentalnih neurotoksičnih modela pored apoptoze, autofagije i nekroze, mogu naći i novi modaliteti ćelijskog umiranja poput ferroptoze ili piroptoze.

Pored apoptoze, autofagija može biti i alternativni put programirane ćelijske smrti tipa II, međutim to nije njena glavna funkcija (više o autofagiji u poglavlju 1.3.). Citotoksična autofagija se javlja u slučaju kada je apoptozna mašinerija onesposobljena, kada oštećenje prevlada ćelijske reparacione mehanizme ili u slučaju kada je autofagija neadekvatno ili preterano aktivirana (114). Tako su Arsikin i saradnici pokazali da 6-

OHDA indukuje citotoksičnu autofagiju na SH-SY5Y ćelijskoj liniji humanog neuroblastoma (113).

Nomenklatura tipova ćelijskog umiranja je, kao što je već prethodno pomenuto, više puta revidirana. Danas sve tipove ćelijskog umiranja možemo zapravo podeliti samo na dva osnovna podtipa – slučajnu ili akcidentalnu ćelijsku smrt i regulisanu. Pod akcidentalnim tipom ćelijske smrti smatramo nekrozu. Do njene trenutne, ireverzibilne indukcije dolazi u patološkim stanjima usled delovanja jakih noksi, fizičkih i hemijskih oštećenja. U pitanju je inflamatorni proces, bez prisustva posebnih hemijskih ili morfoloških distinkcija. U literaturi se mogu naći podaci da akutni tretman MPTP toksinom indukuje nekrozu u DA tkivu kod miša (114). Pored toga, u literaturi se takođe mogu naći podaci koji govore da različiti neurotoksini mogu indukovati aktivaciju tzv. regulisane nekroze – nekroptoze (115–118). Nekroptoza karakteriše povećanje volumena ćelije i mitohondrija koje je praćeno narušavanjem integriteta njihovih membrana, usled čega dolazi do izlivanja sadržaja mitohondrija i drugih unutarćelijskih molekula u vanćelijski matriks, među njima i tzv. DAMP molekula (engl. *Damage-associated molecular pattern*). DAMP molekuli kada se nađu van ćelije bivaju prepoznati od strane antigen-prezentujućih ćelija i dovode do njihove aktivacije uz indukciju imunološkog odgovora (119,120). Tokom indukcije nekroptoze dolazi najpre do aktivacije receptora smrti, ukoliko je apoptoza iz nekog razloga onemogućena, i do formiranja nekroptozoma koji se sastoji od FADD, kaspaze 8, RIP 1 i 3 (engl. *Receptor-interacting protein 1 and 3*) i MLKL proteina (engl. *Mixed-lineage kinase domainlike pseudokinase*) (121). Upravo RIP 3-posredovana aktivacija pseudokinaze MLKL dovodi do narušavanja membranskog integriteta i izlivanja DAMP molekula iz ćelije (121). Brojne studije su pokazale da upravo oksidativni stres, disfunkcija mitohondrija i porast koncentracije jona Ca^{2+} u citoplazmi mogu dovesti do indukcije nekroptoze (122). Imajući u vidu da većina neurotoksina upravo na taj isti način indukuje degeneraciju i smrt DA neurona, ne iznenađuju podaci dobijeni u studijama sa MPTP i 6-OHDA, ali i rezultati dobijeni ispitivanjem cerebrospinalne tečnosti i uzoraka moždanog tkiva pacijenata obolelih od PB. Naime, u ovim studijama je pokazano prisustvo nekroptoze u DA neuronima (115–118).

Pored apoptoze, autofagije, nekroze i nekroptoze u pojedinim studijama pokazano je prisustvo ferroptoze i piroptoze. Reč je takođe o regulisanim tipovima

ćelijskog umiranja, gde u slučaju ferroptoze dolazi do indukcije smrti indukovane jonima gvožđa, odnosno kaspaze 1 u slučaju piroptoze. Ferroptaza je nezavisna od aktivacije kaspaza i karakteriše je smanjenje koncentracije glutaciona, lipidna peroksidacija, smanjenje zapremine mitohondrija, kondenzacija hromatina, povećanje ćelijskog volumena i na kraju pucanje plazma membrane (123). U slučaju piroptoze pokazano je da inflamacija ima ključnu ulogu u pokretanju ovog tipa regulisanog ćelijskog umiranja. Iako je poznato da ćelijska izloženost patogenu dovodi do aktivacije inflamazoma, koji dalje aktivira kaspazu 1 i pokreće piroptozu, u pojedinim modelima PB je pokazano da su amiloid β i fibrilarni α SYN, u odsustvu patogena, sposobni da aktiviraju inflamazom i kaspazu 1 (124,125).

1.3. Autofagija

Autofagija je koordinisan katabolički proces, tokom kog dolazi do razgradnje proteinskih agregata i oštećenih organela. Autofagija se javlja kako na bazalnom nivou u fiziološkim uslovima, tako i u uslovima ćelijskog i metaboličkog stresa, ali i u slučaju infiltracije patogena (126). Do danas su opisana tri osnovna tipa autofagije: makroautofagija (u daljem tekstu autofagija), mikroautofagija i autofagija posredovana šaperonima (CMA). Pored važne uloge u rastu, razvoju i održavanju homeostaze (127), autofagija može biti i alternativni put programirane ćelijske smrti tipa II. Citotoksična autofagija se javlja u slučaju kada je apoptozna mašinerija onesposobljena, kada oštećenje prevlada ćelijske reparacione mehanizme ili u slučaju kada je autofagija neadekvatno ili preterano aktivirana (128).

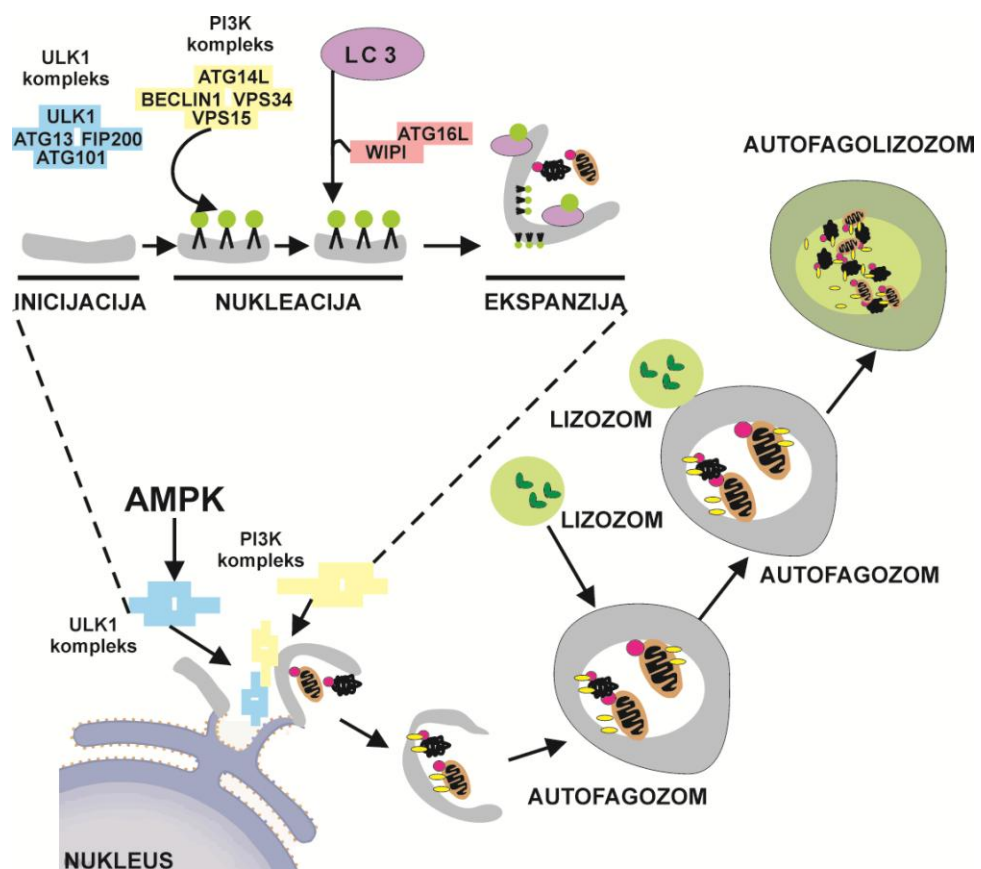
Glavna morfološka karakteristika ćelija kod kojih je autofagija indukovana je stvaranje autofagozoma, vezikula sa dvoslojnom membranom, unutar kojih se nalazi citoplazmatski sadržaj obeležen za razgradnju (129,130). Autofagija je evolutivno konzerviran i koordinisan proces kod svih eukariota i odvija se u nekoliko faza (Slika 4). Najpre dolazi do stvaranja autofagozoma kroz fazu inicijacije, nukleacije, ekspanzije i maturacije. Zreli autofagozomi potom fuzionišu sa lizozomom, i tada dolazi do razgradnje sadržaja (129,131). U inicijaciji i regulaciji ovih procesa učestvuju produkti ATG gena (engl. *Autophagy related genes*). Takođe, proces indukcije formiranja autofagozoma zavisi i od aktivnosti dva tipa Ser/Thr kinaza, mTOR (engl. *Mechanistic*

target of rapamycin) i ULK1 ili 2 (engl. *Unc-51 like autophagy kinase 1/2*) (126,132). U fiziološkim uslovima mTOR inhibira aktivaciju ULK kinaza i na taj način reguliše indukciju autofagije, dok se u uslovima ćelijskog i metaboličkog stresa, u slučaju deprivacije nutrienata, hipoksije, pada koncentracije ATP i narušene homeostaze Ca^{2+} , aktivira AMPK (engl. *5' AMP-activated protein kinase*, AMPK) koja suprimira mTOR aktivnost, fosforilacijom Raptor i TSC2 proteina (133–135). Aktivirana AMPK kinaza inicira stvaranje autofagozoma, fosforiliše ULK1 (na Ser317, 555 i 777) (136), Atg9 (137,138) i Beklin1-VPS34-VPS15-Atg14L-Atg101 kompleks (139,140). Pored toga AMPK povećava aktivnost transkripcionog faktora EB (TFEB), koji pozitivno reguliše transkripciju gena uključenih u autofagno-lizozomske puteve razgradnje, kao i biogenezu samih lizozoma (141–143). Pored toga, ULK fosforiliše i Ambra1 protein (engl. *Beclin 1-regulated autophagy protein 1*) i stimuliše translokaciju PI3K (engl. *Phosphatidylinositol 3-kinase*) kompleksa na membranu endoplazmatičnog retikuluma, koja će postati membrana novog autofagozoma (129). PI3K kompleks se sastoji od PI3K, Atg14L, VPS34, VPS15 i Beklin1 proteina i njegov osnovni zadatak je da vrši kontrolu nukleacije i elongacije pre-autofagozomne membrane (126,144). U ovom delu membrane u nastajanju, dolazi do produkcije i ugradnje PI3 fosfata, dok u kasnijim fazama rasta i sazrevanja autofagozoma učestvuju dva ubikvitinu slična konjugaciona sistema: Atg12-Atg5-Atg16L i Atg4-LC3 (129). Atg4 je proteolitički enzim koji LC3 (engl. *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) prevodi u solubilnu formu LC3-I. Posredstvom Atg12-Atg5-Atg16L kompleksa, LC3-I se dalje konjuguje sa fosfatidiletanolamidom (engl. *Phosphatidylethanolamine*, PE) do LC3-II (145). LC3-II ne samo da dalje stimuliše ekspanziju membrane, već omogućava i selektivno prepoznavanje citoplazmatskog sadržaja za razgradnju obeleženog proteinima p62 i NBR1 (engl. *Neighbor of BRCA1 gene1*) (144,146). I p62 i NBR1 prepoznaju ubikvitinom obeležen citoplazmatski materijal. Zreli autofagozom se transportuje duž mikrotubula do lizozoma, sa kojim fuzioniše i formira autofagolizozom. U njemu dolazi do digestije unutarvezikularnog sadržaja, dejstvom kiselih hidrolaza u uslovima niskog pH (126).

Gotovo svi molekularni mehanizmi koji mogu da dovedu do PB, poput oštećenja mitohondrija i nakupljanja proteinskih agregata, su u određenoj meri povezani sa autofagijom. Pored toga, pokazano je da mutacije u PINK-1 i Parkin genu otežavaju

proces mitofagije (147,148), kao i da mutacije u PINK-1 i DJ-1 snižavaju bazalnu autofagiju (149,150), dok mutacije u LRRK2 dovode do nakupljanja autofagnih vezikula (151). Takođe, postoje brojni podaci da neurotoksini mogu da indukuju autofagiju, koja se u nekim studijama pokazala kao citoprotektivna, a u drugim citotoksična (113,152–156).

Imajući u vidu energetske zahteve neurona i složenost metaboličkih procesa koji se u njima dešavaju, postalo je jasno da bi autofagija mogla imati značajnu ulogu u patogenezi PB.



Slika 4. Indukcija autofagije, formiranje autofagolizozoma. U uslovima metaboličkog stresa AMPK kinaza inhibira mTOR. Pored toga, AMPK inicira stvaranje autofagozoma aktivacijom ULK1 kompleksa i stimuliše formiranje PI3K kompleksa. Tokom sazrevanja, autofagozom prolazi nekoliko faza: inicijaciju, nukleaciju, ekspanziju, elongaciju i maturaciju. Zreli autofagozomi fuzionišu sa lizozom, dajući autofagolizozom, u kom se posredstvom kiselih hidrolaza, razgrađuje sadržaja vezikula.

1.4. Uloga protein kinaza u neurodegeneraciji u Parkinsonovoj bolesti

Orkestriran proces signalne transdukcije u ćeliji predstavlja složenu, evolutivno konzerviranu i vrlo kompleksnu interakciju različitih signalnih molekula, uključujući protein kinaze, fosfataze i fosfoprotein-interagujućih domene. Protein kinaze imaju važnu ulogu u kontroli veoma značajnih ćelijskih procesa kako u fiziološkim, tako i u patološkim stanjima. U fiziološkim uslovima protein kinaze regulišu procese poput proliferacije, diferencijacije, imunološkog odgovora, migracije, preživljavanja i regulacije genske ekspresije (157). Na ovaj način ćelija je u mogućnosti da na dinamičan, reverzibilan i pre svega adekvatan način odgovori na različite stimulse iz spoljašnje ili unutrašnje sredine. Rezultati do kojih se došlo poslednjih decenija, ukazuju da bi istraživanje uloge protein kinaza u PB moglo doprineti boljem razumevanju molekularnih mehanizama koji prethode degeneraciji DA neurona, ali i da bi pojedine kinaze mogle biti mete u razvoju novih terapijskih pristupa u lečenju. Neuron su izuzetno metabolički aktivne ćelije, kod kojih, u uslovima metaboličkog i oksidativnog stresa, dolazi do aktivacije različitih signalnih puteva uključenih u procese održanja energetske homeostaze i antioksidativne zaštite. Među njima se posebno izdvajaju tri evolutivno konzervirane Ser/Thr kinaze: protein kinaza aktivirana adenzin monofosfatom (AMPK), mTOR i protein kinaza B/Akt (Slika 5.).

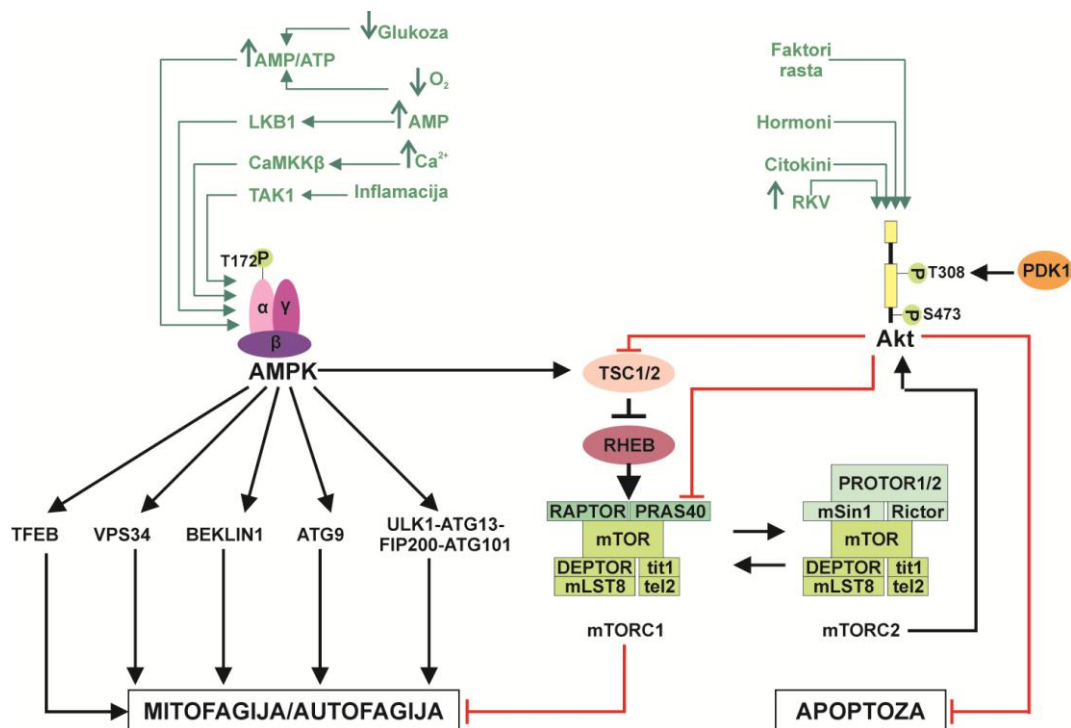
Protein kinaza aktivirana adenzin monofosfatom je centralni unutaćelijski energetska senzor čija je osnovna funkcija održavanje energetske homeostaze u ćeliji. AMPK je heterotrimer, koji se sastoji od jedne katalitičke, α i dve regulatorne subjedinice, β i γ . Do danas je opisano po dve izoforme α i β subjedinice i tri izoforme γ subjedinice (158). Ova različitost se objašnjava širokim spektrom dejstva metaboličke regulacije AMPK u različitim tkivima (159,160).

Kao što i samo ime kaže, vezivanjem adeninskih nukleotida, pre svega AMP, ali i ADP, za γ subjedinicu, dolazi do alosterne aktivacije enzima. Na taj način se povećava kinazna aktivnost AMPK deset puta (161). Pored toga, alosterna promena konformacije promovise fosforilaciju Thr172 na α subjedinici i produžava poluživot aktivirane AMPK, jer štiti pThr172 od delovanja fosfataza (161–163). Fosforilacija Thr172 je vrlo bitna, jer bez nje AMPK je praktično enzimski neaktivna (164). Do danas je indentifikovano nekoliko kinaza koje mogu da fosforilišu i aktiviraju AMPK, od kojih

su najbitnije tri: (1) LKB1 (engl. *Liver kinase B1*) koja aktivira AMPK u usled nedostatka glukoze u ćeliji; (2) CaMKK β (Ca²⁺/kalmmodulin zavisna kinaza β) koja se aktivira u uslovima porasta unutarćelijske koncentracije Ca²⁺ i TAK1 (engl. *Transforming growth factor-activated kinase-1*) koja aktivira AMPK u odgovoru na brojne citokine, usled inflamacije ili prijema apoptotskih signala (164). Sa druge strane, kinaznu aktivnost AMPK inhibiraju dve protein fosfataze PP2A i PP2C (engl. *Protein Phosphatase 2A* i *Protein Phosphatase 2C*) tako što defosforilišu Thr172 (165,166). Jednom aktivirana AMPK pokreće niz kataboličkih procesa i inhibira anaboličke, kako bi obezbedila neophodnu energiju ćeliji za preživljavanje (167) (Slika 5.).

Sinteza proteina je jedan od najvažnijih, ali i energetski najzahtevnijih anaboličkih procesa u ćeliji. mTORC1 ima važnu ulogu u koordinaciji translacione mašinerije kao i u inhibiciji autofagije. U uslovima energetskog stresa AMPK inhibira mTORC1 i sintezu proteina, indukuje formiranje autofagozomskog kompleksa fosforilacijom ULK1/2, Atg9 i Beklin1, stimuliše biogenezu lizozoma preko TFEB (136–140), i takođe pospešuje i transkripciju i replikaciju mtDNK, fosforilacijom transkripcionog faktora PGC1 α (engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), čiji je jedan od supstrata i TFAM (engl. *Mitochondrial transcription factor A*) (168). Pored toga, u uslovima mitohondrijalnog stresa, AMPK kontroliše i mitohondrijalnu dinamiku, fosforiliše Mff i preko PGC1 α stimuliše brojne procese poput: mitofuzije, mitofisije i mitofagije, tako što indukuje transkripciju Drp1 i Mfn1/2 (164) (Slika 5.).

U kontekstu PB, neke studije su pokazale da bi aktivacija AMPK mogla imati protektivno dejstvo, jer bi tako pokrenula autofagno otklanjanje proteinskih agregata iz oštećenih mitohondrija (164). Takođe, pokazano je da aktivacija AMPK u uslovima oksidativnog stresa može da aktivira PGC1 α i FOXO3 (engl. *Forkhead box O*), koji regulišu biogenezu mitohondrija i transkripciju enzima antioksidativne zaštite, kao što su glutation i enzimi uključeni u njegov metabolizam (glutation peroksidaza i glutation reduktaza), superoksid dismutaza (SOD) i katalaza (169).



Slika 5. Uloga protein kinaza u neurodegeneraciji u PB. Regulacija aktivnosti Ser/Thr protein kinaza u neuronima je od izuzetnog značaja u uslovima metaboličkog stresa. AMPK, kao centralni energetske senzor održava energetske homeostazu u ćeliji. U ćeliji se aktivira usled porasta nivoa AMP ili jona Ca²⁺, tokom inflamacije, kao i usled pada nivoa glukoze. AMPK, Raptor- i TSC2-posredovanom mTORC1 inhibicijom, stimuliše mitofagiju/autofagiju, aktivacijom TFEB, VPS34, Beklin1, ATG9 i ULK1 kompleksa. Sa druge strane, Akt kinaza, inhibitornom fosforilacijom PRAS40 i TSC2 proteina, aktivira mTORC1. Akt kinazu aktiviraju faktori rasta, citokini, hormone ali ROS. Pored toga, poznato je da Akt kinaza ima inhibitorno dejstvo na proapototske protein. Da bi Akt kinaza imala potpunu enzimsku aktivnost, neophodno je da bude fosforilisana na dva mesta, na Thr 308, posredstvom PDK1 kinaze, i na Ser 473 posredstvom mTORC2 kinaze. Odnos AMPK i Akt kinaze, do danas nije u potpunosti razjašnjen.

Kao što je već pomenuto, mTOR je još jedna važna Ser/Thr kinaza. Ova kinaza učestvuje u građi dva proteinska kompleksa mTORC1 i mTORC2, koji se razlikuju kako po građi, tako i po funkciji koju obavljaju u ćeliji. U građu oba kompleksa pored mTOR kinaze ulaze i DEPTOR (engl. *DEP domain containing mTOR-interacting protein*), mLST8 (engl. *Mammalian lethal with sec-13 protein 8*) i Tti1/Tel2 kompleks (engl. *TELO2 Interacting Protein 1 / telomere maintenance 2*) (170). Pored ovih proteina u mTORC1 ulaze i PRAS40 (engl. *Proline-rich Akt substrate 40 kDa*) i Raptor (engl. *Regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin*), dok u

kompleks 2 ulaze Rictor (engl. *Rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSin1 (engl. *Mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1*) i Protor1/2 (engl. *Protein observed with rictor 1 and 2*) (170). U odgovoru na energetske status ćelije, faktore rasta, aminokiseline i koncentraciju kiseonika, mTORC1 upravlja ćelijskim rastom, diferencijacijom i ima ključnu ulogu u kontroli biosinteze proteina, jer reguliše sintezu ribozoma i translaciju proteina (171). Naime, on fosforiliše ribozomalnu p70 S6 kinazu i 4E-BP1 (engl. *Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) (170,172). Fosforilacija 4E-BP1 dovodi do dislokacije 4E-BP1 sa eIF4E (engl. *Eukaryotic translation initiation factor 4E*), i omogućava asocijaciju eIF4E sa eIF4G i započinje translaciju iRNK (173). Takođe, mTOR kinaza u fiziološkim uslovima fosforiliše ULK1 na Ser757 i na taj način onemogućava AMPK-zavisnu aktivaciju ULK1 kompleksa i indukciju autofagije (136) (Slika 5.).

mTORC2 u odgovoru na faktore rasta, takođe reguliše preživljavanje, metabolizam i učestvuje u organizaciji citoskeleta. On aktivira nekoliko nishodnih kinaza PKB/Akt, PKC α i SGK1 (engl. *Serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1*) (174).

U uslovima metaboličkog stresa, kao što su hipoksija ili smanjena koncentracija ATP-a, AMPK inhibira mTORC1 preko TSC2, kao i inhibitornu fosforilaciju Raptor proteina (134,170). Ukoliko je AMPK duže vremena aktivirana, to može dovesti do produžene inhibicije mTORC1-zavisne sinteze proteina, usled čega može doći do smanjenja integriteta i plastičnosti sinapsi i degeneracije DA neurona (175–177). Pokazano je da aktivacija AMPK dovodi do inhibicije mTORC1 signalnog puta fosforilacijom TSC2 (engl. *Tuberous Sclerosis Complex 2*) na barem dva mesta Ser1387 i Thr1271 (178), koji potom stimuliše hidrolizu GTP (engl. *Guanosine-5'-triphosphate*) vezanog za RHEB (engl. *Ras homolog enriched in brain*) u GDP (engl. *Guanosine diphosphate*) i na taj način inhibira RHEB-zavisnu aktivaciju mTORC1 signalnog puta (179). Nasuprot tome, Akt kinaza fosforiliše TSC2 na Ser 939 i Thr 1462 i na taj način inhibira njegovu GTPaznu aktivnost, usled čega se otklanja inhibitorno dejstvo RHEB-GDP, i favorizuje stvaranje RHEB-GTP-zavisna aktivacija mTORC1 signalnog puta (133) (Slika 5.).

PKB/Akt je treća, važna Ser/Thr kinaza, koja učestvuje u regulaciji metabolizma, ćelijskog rasta i preživljavanja, sinteze proteina i apoptoze (180). Akt

kinazu stimulišu faktori rasta, citokini, hormoni, ali i različiti stresori, poput slobodnih kiseoničnih radikala (180,181). Akt se aktivira posredstvom lipidne kinaze PI3K, koja fosforiliše PIP₂ (engl. *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) do PIP₃ (engl. *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*), koji vezuje citoplazmatski Akt za ćelijsku membranu. Tada, posredstvom PDK1 kinaze (engl. *Phosphoinositide dependent kinase 1*), dolazi do fosforilacije Thr 308 u katalitičkom domenu Akt, koja omogućava i drugu fosforilaciju Ser 473, nakon koje Akt stiče punu kinaznu aktivnost vrsta (180). Za tu drugu fosforilaciju Akt, odgovoran je mTORC2 (182). Aktivirana Akt kinaza reaguje sa velikim brojem supstrata u citoplazmi i nukleusu. Neki od nishodnih proteina Akt signalnog puta su uključeni u metabolizam glukoze, kao što su GLUT4 (engl. *Glucose transporter type 4*), IRS1 (engl. *Insulin receptor substrate 1*) i GSK3β (engl. *Glycogen synthase kinase 3 beta*), drugi su uključeni u sintezu proteina poput PRAS40 i TSC2 (aktiviraju mTORC1 signalnog puta), dok jedna grupa proteina direktno inhibira proapoptotske proteine poput ASK1 (engl. *Apoptosis signal-regulating kinase 1*), BAD i prokaspazu 9 (183).

Do danas je pokazano da aktivacija Akt signalnog puta učestvuje u regulaciji razvoja DA neurona u SN postnatalno, kao i da stimuliše grananje i regeneraciju aksona (184,185). Sa druge strane, histopatološke analize moždanog tkiva su pokazale smanjenu aktivnost Akt signalnog puta kod obolelih od PB u odnosu na zdrave kontrole (186,187). Takođe, podaci dobijeni iz različitih genetičkih i neurotoksičnih studija, ukazuju da Akt ima značajnu ulogu u protekciji i preživljavanju DA neurona. Tako je u eksperimentima sa MPTP na miševima sa homozigotnom delecijom u *DJ-1* genu (*DJ-1*^{-/-}), pokazano da virusnom transfekcijom dodatne kopije Akt gena, wt Akt, dolazi do spašavanja od MPTP, dok se to kod kontrolnih, *DJ-1*^{-/-}, bez dodatka wt Akt, ne dešava (188). Druga studija je pokazala da se injektovanjem virusnog vektora sa konstitutivno aktivnom formom Akt, inhibira citotoksični efekat 6-OHDA u DA neuronima miša *in vivo* (189).

Ono što ostaje nejasno, jeste odnos između AMPK i Akt, dve, na prvi pogled, kinaze suprotnog dejstva, u uslovima oksidativnog i metaboličkog stresa. Novije studije ukazuju da bi mogla postojati uzajamna regulacija ova dva signalna puta (190).

1.5. Eksperimentalni modeli PB

Potpuno novu dimenziju u istraživanju etiologije, patologije i molekularnih mehanizama uključenih u degeneraciju neurona u PB omogućio je slučajni nalaz meperidinskog analoga MPTP i otkriće monogenih mutacija u porodicima sa naslednim oblikom parkinsonizma. Poslednje tri decenije istraživači su upotrebom ćelijskih modela uspeali da identifikuju pojedinačne događaje na molekularnom nivou koji mogu da dovedu do degeneracije DA neurona, dok su primenom različitih animalnih modela uspeali da reprodukuju gotovo sve odlike PB. Primena eksperimentalnih modela se takođe pokazala kao vrlo korisna u ispitivanju novih lekova i terapijskih strategija (2,191).

Metode genetičkog inženjeringa omogućile su istraživačima da naprave ćelijske linije i transgene životinje koje u sebi nose monogenne mutacije koje se direktno dovode u vezu sa naslednim oblicima PB, poput mutacija u *SNCA* genu za α -sinuklein (A53T, A30P), *PINK1*, *PARKIN*, *LRRK2* i *DJ-1*. Ovi modeli se uglavnom koriste da bi se ispitalo značaj i efekat mutacije na molekularne i biohemijske puteve u DA neuronima.

1.5.1. Neurotoksični (hemijski indukovani) modeli PB

U istraživanjima PB danas je u upotrebi nekoliko toksina koji se koriste u eksperimentima kako u *in vitro* uslovima, tako i na životinjama. Najčešće korišćeni toksini su: MPTP/MPP⁺, 6-OHDA, parakvat i rotenon (192).

6-OHDA još pedesetih godina prošlog veka privukao pažnju istraživačima kada je pokazano njegovo prisustvo u mozgu i utvrđeno da može nastati kao jedan od sporednih proizvoda metabolizma dopamina (193,194) (Tabela 2.). Upravo iz tog razloga vrlo često koristi i u *in vitro* i u *in vivo* istraživanjima PB. Primena ovog modela ima svoje prednosti i mane u eksperimentalnom istraživanju. Glavna mana ovog modela sistema je invazivnost, odnosno u *in vivo* uslovima 6-OHDA ne prolazi krvno-moždanu barijeru, već se životinji mora injektovati direktno u mozak (2,191). Međutim, nepropustljivost krvno-moždane barijere za 6-OHDA ima i svoje eksperimentalne prednosti, ukoliko se toksin primeni unilateralno, druga hemisfera mozga životinje se

može iskoristiti kao kontrola, usled čega se izbegava eventualna fenotipska varijabilnost do koje može doći ako se kao kontrola koristi druga životinja.

Parakvat (PQ) je širokoprimenjivan herbicid u poljoprivredi, koji po svojoj hemijskoj strukturi podseća na MPP+. Do 2013. godine je identifikovano 95 slučajeva PB koji su dovedeni u vezi sa izloženošću ovom toksinu (Tabela 2.) (195).

Rotenon je, za razliku od PQ, naišao na primenu u poljoprivredi i kao herbicid i kao insekticid. U pitanju je prirodna supstanca koja se može izolovati iz kore različitih tropskih biljaka. Kako mu je poluživot u prirodi svega 3 do 5 dana i kako je reč o fotosenzitivnom jedinjenju, ne smatra se zagađivačem pijaće vode i poljoprivrednog zemljišta (Tabela 2.) (195).

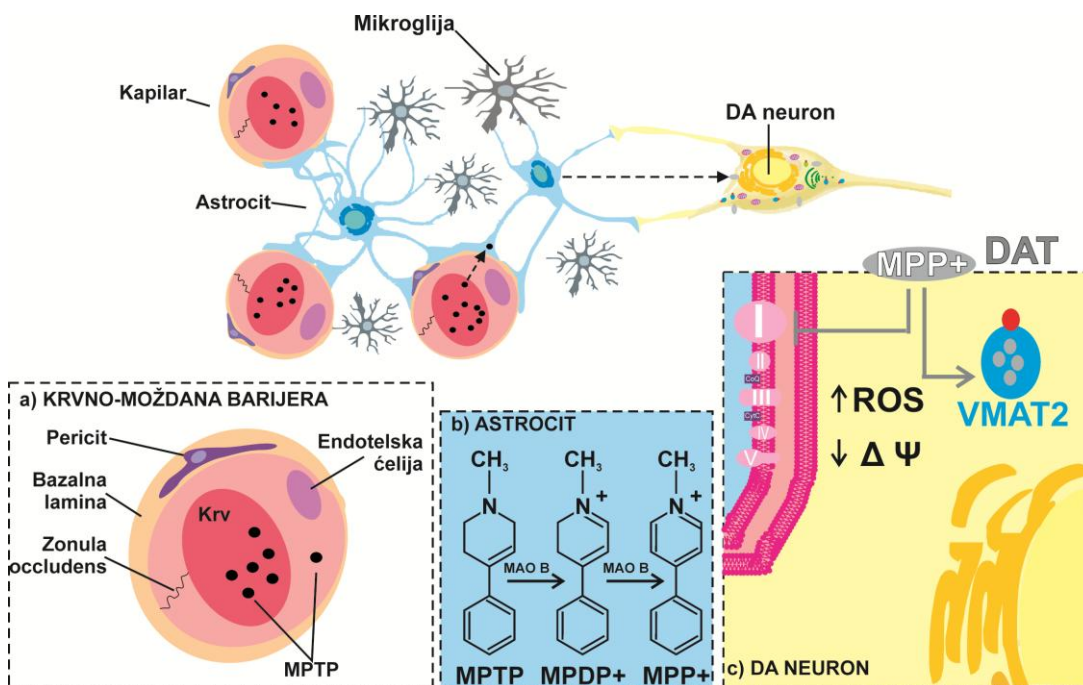
Zajednička osobina ovih toksina je da u neuronima dovode do indukcije oksidativnog stresa i do mitohondrijalne disfunkcije, usled čega može doći do degeneracije i smrti DA neurona (192).

1.5.2. MPTP/MPP+

Događaj sa kraja sedamdesetih i početka osamdesetih godina prošlog veka, kada je grupa mladih, intravenskih narkomana u roku od nekoliko dana nakon zloupotebe meperidinskog analoga, dezmetilprodina (1-metil-4-fenil-4-propionokspiperidin (MPPP), razvila tešku formu PB, navela je istraživače na pretpostavku da toksini iz spoljašnje sredine mogu dovesti do oštećenja DA neurona (32,33). Kasnija hemijska analiza pokazala je da je do trovanja došlo 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinom (MPTP), u visokoj koncentraciji, a koji predstavlja nus proizvod reakcije sinteze dezmetilprodina (Slika 3.) (196,197).

Usledila su brojna istraživanja, tokom kojih je otkriveno da je MPTP lipofilni pro-toksin, koji prolazi krvno-moždanu barijeru i da se u astrocitima (198), pomoću monoamin oksidaze B (MAO B), prevodi u toksični oblik, 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP+) (Slika 6.) (199–202). Pokazano je da MPP+ ulazi u DA neurone posredstvom dopaminskog transportera (DAT), gde inhibira kompleks I mitohondrija. Pored toga, utvrđeno je da MPP+ remeti i distribuciju DA u citoplazmi. Naime, on preko VMAT2 ulazi u sinaptičke vezikule i interferira sa odlaganjem DA (Slika 6.) (203–208). Kao rezultat ovakvog dejstva, dolazi do poremećaja funkcije mitohondrija, smanjenja koncentracije ATP, idukcije oksidativnog stresa i smrt DA neurona (209). Slučajno

otkriće MPTP značajno je doprinelo rasvetljavanju molekularnih mehanizama uključenih u proces patogeneze u PB.



Slika 6. Metabolizam MPTP. MPTP je lipofilno jedinjenje koje prolazi krvno-moždanu barijeru. U glijalnim ćelijama se uz pomoć MAO B prevodi u MPP⁺, koji preko DAT ulazi u DA neurone. U njima MPP⁺ inhibira kompleks I mitohondrija, remeti odlaganje citoplazmatskog DA u vezikule i indukuje porast oksidativnog stresa.

Simptomi i znaci koji se javljaju nakon trovanja MPTP, izuzetno liče na idiopatsku PB i zbog toga se došlo na ideju da bi primena MPTP kod oglednih životinja mogao biti dobar model za izučavanje PB, kao i da treba ispitati mogućnost da izloženost egzogenim toksinim može uticati na propadanje DA neurona i samim tim veću učestalost oboljevanja kod takvih osoba. Međutim, ovakva tvrdnja je previdela nekoliko činjenica: da je nakon trovanja, u jako kratkom vremenskom intervalu, došlo do pojave akutne, vrlo teške kliničke slike koja odgovara terminalnoj fazi PB; da nije

bilo dalje progresije oštećenja; kao i da nastala oštećenja, ne odgovaraju u potpunosti oštećenjima u PB, jer nije utvrđeno prisustvo LT u neuronima (2).

I pored ovih mana, MPTP model se pokazao kao vrlo značajan u ispitivanju mehanizama oštećenja DA neurona u PB, jer je ukazao da oksidativni stres i disfunkcija mitohondrija mogu biti deo patogeneze PB. Takođe, pokazao se vrlo značajan u ispitivanjima potencijalnih neuroprotektivnih i terapijskih agenasa (Tabela 2.) (197).

Tabela 2. Neurotoksični (hemijski indukovani) modeli PB

Toksin	Model		Motorni simptomi (* <i>In vivo</i>)	Stepen oštećenja DA neurona (* <i>In vivo</i>)	Agregati α -sinukleina/ prisustvo LT	Upotreba modela	Nedostaci modela
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>					
6-OHDA	+	Glodari, psi, mačke, primati	+	<i>In situ</i> gubitak inervacije DA neurona	-	Mehanizam ćelijskog umiranja; ispitivanje terapijskih strategija	Nedostatak agregata α -sinukleina; Intracerebralno injektovanje
MPTP/MPP+	+	Glodari, primati	Manje izraženi kod glodara; kod primata uočljivi	Gubitak DA neurona u zavisnosti od primenjene doze; u akutnom modelu gubitak DA neurona je 95%	Nadani samo u pojedinim studijama	Mehanizam ćelijskog umiranja; ispitivanje terapijskih strategija	Inkluzije α -sinukleina retke; nema progresije; glodari nisu dobar model zbog izostanka bihevioralnih simptoma
ROTENON	+	Glodari, primati	+	Gubitak DA neurona; smanjena inervacija DA neurona	+	Mehanizam ćelijskog umiranja; ispitivanje terapijskih strategija; neuroprotekcije	Znatan morbiditet i smrtnost
PARAKVAT	+	Glodari, primati	+	Pad TH pozitivnih ćelija	Primećen unutarćelijski porast α -sinukleina, bez LT	Mehanizam ćelijskog umiranja; ispitivanje terapijskih strategija; neuroprotekcije	Retko korićen; utiče i na druge neurotransmitterske sisteme

* *Preuzeto i prilagođeno iz reference (191).*

2. CILJEVI

Imajući u vidu hipotezu da signalni putevi AMPK i PKB/Akt imaju značajnu ulogu u oksidativnim stresom indukovanom oštećenju ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y neurotoksičnim agensom 1-metil-4-fenilpiridinom (MPP+), postavljeni su sledeći ciljevi ovog rada:

1. Ispitati citotoksično delovanje neurotoksina MPP+ na ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y.
2. Ispitati uticaj MPP+ na aktivnost signalnih puteva AMPK i PKB/Akt u neuronima tretiranim MPP+.
3. Ispitati ulogu AMPK i PKB/Akt signalnih puteva i njihove interakcije u indukciji oksidativnog stresa i ćelijske smrti u neuronima tretiranim MPP+.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Rastvori i reagensi

U izradi ovog rada korišćeni su sledeći reagensi: serum fetusa govečeta (engl. *Fetal calf serum*, FCS), medijumi za kultivaciju ćelija MEM (engl. *Modified Eagle Medium*) i Ham F12 koji su mešani u odnosu 1:1; MEM neesencijalne aminokiseline, L-glutamin, rastvor antibiotika i antimikotika (sve od Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Nemačka), tripsin (Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), etilendiamino-tetrasirćetna kiselina (EDTA), Tris, Tween 20, akrilamid/bisakrilamid (30% w/v), N,N,N',N'-tetrametileten-1,2-diamin (TEMED) (od SERVA, Heidelberg, Nemačka), LysoTracker Red DND-99, PageRuler, OPTI-MEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), propidijum jodid (40 µg/ml; PI; BD Pharmingen, San Diego, SAD), albumin iz seruma govečeta (engl. *Bovine serum albumin*, BSA), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid), RNaza (50 µg/ml), dihidroetidijum (DHE) (20 µM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), JC-1 (5,5',6,6'-tetrahloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilkarbocijanin jodid), GeneJET Plasmid Midiprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), dimetilsulfoksid (DMSO), 1-metil-4-fenilpiridinijum (MPP+), farmakološki inhibitor AMPK dorzomorfin/supstanca C (engl. *Compound C*, Comp C), antioksidansi N-acetilcistein i butilirani hidroksianizol, inhibitori autofagije bafilomicin A1, hlorokin, vortmanin, inhibitor fosfatidilinozitol 3 kinaze LY294002, 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, 2-Merkaptoetanol, Coomassie Brilliant Blue G-250, 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonukleotid (AICAR), polietilen glikol 3350 (PEG) (sve od Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), Akt inhibitor 10-[4'-(N,N-dietilamino) butil]-2-hlorofenoksazin hidrohlorid (10-DEBC hidrohlorid) (Tocris Bioscience, Ellisville, MO), odmašćeno mleko u prahu (Carl Roth, Karlsruhe, Nemačka), metformin, ampicilin (Galenika a.d., Belgrade, Serbia), ekstrakt kvasca, tripton (Torlak, Srbija), glukoza, MgSO₄×7H₂O (Zorka Šabac, Srbija), CaCl₂×2 (BDH, Engleska), NaCl, NaOH, MgCl (Centrohem, Srbija), metanol, etanol (CARLO ERBA Reagents) i zečja antitela protiv fosforilisanih i totalnih formi proteina Akt, AMPK, Raptor, mTOR, p70S6K, PRAS40, ULK1, 4E-BP1, LC3-II, LAMP-1 i β-aktina (sve od Cell Signaling Technology, Beverly, MA), p62 (Novus

Biologicals, Littleton, CO), kozji anti-zečji IgG konjugovan peroksidazom rena (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), protein A agarozne kuglice (Cell Signaling Technology, Beverly, MA).

3.2. Čelijske kulture i tretmani

Delovanje MPP⁺ neurotoksina ispitivano je na SH-SY5Y, komercijalnoj čelijskoj liniji humanog neuroblastoma koja je kupljena od Evropske kolekcije čelijskih kultura (European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, UK). SH-SY5Y su gajene u inkubatoru u vlažnoj atmosferi, na temperaturi od 37 °C, pri koncentraciji CO₂ od 5%. Ova čelijska linija pokazuje veliku sličnost sa dopaminergičkim neuronima, ekspirira tirozin-hidroksilazu, dopaminski transporter, dopaminski D2 receptor, dopamin-β hidroksilazu, i iz tog razloga se često koristi u toksičnim modelima Parkinsonove bolesti (210–212).

Za kultivaciju SH-SY5Y ćelija, korišćen je kombinovani medijum MEM/Ham F12, u odnosu 1:1, obogaćen sa 10% FCS, 2 mM L-glutaminom, 1% rastvorom neesencijalnih aminokiselina i 1% rastvorom antimikotik/antibiotik. Po dostizanju konfluentnosti od 80%, SH-SY5Y ćelije su najpre prane sa PBS, zatim tripsinizirane pomoću 0.25% rastvor tripsina u PBS-u (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ i 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4), uz dodatak 0.02% EDTA. Po isteku inkubacije od 5 minuta, dodat je medijum za inhibiciju enzimske aktivnosti tripsina i ćelije su centrifugirane na 500g. U cilju ispitivanja vijabiliteta, ćelije su zasejavane u ploče sa 96 bunara (2x10⁴ ćelija/bunaru). Za brojanje ćelija je korišćen 0.1% rastvor boje Tripan plavo u PBS-u. Za analize na protočnom citofluorimetru ćelije su zasejavane u ploče sa 24 bunara (1,5x10⁵ ćelija/bunaru), nakon nukleoporacije ćelije su gajene u pločama sa 6 bunara, dok su za potrebe imunoblot analize zasejavane Petrijeve šolje prečnika 10 cm (3x10⁶ ćelija) i tretirane 24 h nakon zasejavanja. Ploče sa bunarima i Petri šolje su nabavljene od Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka.

3.3. Određivanje vijabiliteta ćelija

Uticaj MPP+ na vijabilitet ćelija je određivan MTT testom, nakon tretmana SH-SY5Y ćelija od 24 ili 48 h.

MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid) test je zasnovan na merenju aktivnosti mitohondrijalnog enzima sukcinat dehidrogenaze. Princip ove analize je da je aktivnost mitohondrijalnih enzima konstantna u većini živih ćelija, tako da je njihova aktivnost direktno proporcionalna broju živih ćelija. Ukoliko su ćelije žive, mitohondrijalni enzim sukcinat dehidrogenaza redukuje tetrazolijumske soli, dolazi do cepanja tetrazolijumskog prstena i do pojave kristala formazana u mitohondrijama (213). Kristali formazana su specifično tamno obojeni i rastvaraju se u DMSO. Ovaj kolorimetrijski test pogodan je ne samo za određivanje broja živih ćelija, već i za praćenje aktivnosti njihovih mitohondrija ali i proliferacije.

Nakon završetka inkubacije, neposredno pre dodavanje rastvora MTT, iz ploča je uklonjen medijum, a zatim je u bunare dodato po 50 µl rastvora MTT rastvorenog u medijumu (0,5 mg/ml). MTT je inkubiran 2 h. Po isteku inkubacije, supernatanti su odlivani, a ćelije lizirane sa DMSO. Rastvoreni kristali formazana su u bunarima davali ljubičastu boju, čiji je intenzitet određivan na automatskom čitaču mikrotitarskih ploča pri talasnoj dužini svetlosti od 570 nm (Sunrise; Tecan, Dorset, Velika Britanija). Intenzitet razvijene boje i odgovarajuća vrednost apsorbancije proporcionalno su broju živih ćelija. Vijabilnost kontrolnih, netretiranih ćelija je arbitrarno matematički predstavljena kao 100%, dok je vijabilnost tretiranih ćelija prikazana kao % u odnosu na kontrolu. IC₅₀ (engl. *Inhibitory concentration*) vrednost je matematički izračunata pomoću GraphPad Prism programa (GraphPad Prism, trial version). IC₅₀ vrednost je u stvari ona koncentracija ispitivane supstance, MPP+ toksina, koja dovodi do smanjenja broja živih ćelija na 50%.

3.4. Fazno kontrastna mikroskopija

Morfološke promene humanog neuroblastoma SH-SY5Y analizirane su na Leica DCF320 mikroskopu na uveličanju od 200x, uz pomoć Leica Application Suite software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

3.5. Protočna citofluorimetrija

Za analizu fragmentacije DNK, produkcije slobodnih kiseoničnih radikala, kao i za merenje potencijala membrane mitohondrija i broja citoplazmatskih vezikula kiselog sadržaja u ćelijama, korišćena je metoda protočne citofluorimetrije na aparatu FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Nemačka) (113,214). Svaka analiza je obuhvatila 10^4 događaja/ćelija, po pojedinačnom uzorku za tretmane koji su rađeni u duplikatu ili triplikatu. Dobijeni podaci su analizirani korišćenjem kompjuterskog programa BD Cell Quest Pro.

3.5.1. Analiza fragmentacije DNK

Za analizu fragmentacije DNK koristili smo PI bojenje (215). Ćelije su nakon tretmana 2 puta oprane u 1 ml PBS, zatim resuspendovane u 300 μ l PBS i fiksirane dodavanjem 700 μ l apsolutnog etanola i ostavljene na +4 °C. Sutradan, ćelije su oprane u 1 ml PBS i centrifugirane na 800 g, 5 minuta. Nakon toga, ćelijski talog je resuspendovan u 300 μ l PBS sa 0,1 % Triton X-100 deterdžentom i 1 mg/ml RNA-ze (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Nakon isteka inkubacije od 15 minuta na 37 °C, u svaku epruvetu je dodato po 0,05 mg/ml PI. Nakon 30 minuta inkubacije na 37 °C, uzorci su analizirani na protočnom citofluorimetru (FL2 kanal).

PI emituje crvenu fluorescencu i vezuje se za DNK i RNK. Intenzitet crvene fluorescence, posle dodavanja RNaze, je direktno proporcionalan količini DNK u ćeliji. Količina DNK se menja kako ćelija prolazi kroz različite faze ćeljskog ciklusa. Tako, ćelija u G_0/G_1 fazi poseduje diploidnu, $2n$, količinu hromozoma, tokom S faze dolazi do sinteze novih lanaca DNK, da bi se pred deobu ćelije, količina DNK udvostručila ($4n$). Pored analize ćeljskog ciklusa, ova metoda može se koristiti i za određivanje broja ćelija kod kojih je došlo do fragmentacije DNK. To su ćelije koje umiru. Naime, u kasnoj fazi apoptoze, endonukleaze seku DNK lance između nukleozoma, pa tako nastaju fragmenti DNK dužine $n \times 180$ baznih parova. Ćelije sa fragmentisanom DNK se nakon bojenja PI, pri analizi na protočnom citofluorimetru vide u tzv. sub G_0 regionu

koji u vidu pika prethodi piku ćelija G₀/G₁ fazi ćelijskog ciklusa. Ćelije u subG₀ regionu se smatraju mrtvim.

3.5.2. Određivanje produkcije slobodnih kiseoničnih radikala

Da bi se odredila ukupna produkcija superoksidnog anjona, nakon tretmana MPP+ toksinom, ćelije su obojene fluorescentnom bojom dihidroetidijumom (DHE). DHE nakon reakcije sa superoksidnim anjon radikalom daje crveni fluorescentni produkt etidijum, koji se umeće u DNK. Ćelije su bojene prema instrukcijama proizvođača. Ukratko, DHE je po isteku tretmana, dodat u bunare u kojima su kultivisane ćelije, u finalnoj koncentraciji 20 μM i inkubiran 30 minuta na 37 °C. Nakon toga, ćelije su tripsinizirane, prebačene u FACS epruvete i centrifugirane (500 g, 5 minuta, na sobnoj temperaturi), a zatim oprane sa 1 ml PBS. Ćelije su finalno resuspendovane u 500 μl PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani u obliku histograma raspodele intenziteta crvene fluorescence (FL2), pri čemu pomeraj histograma tretiranih ćelija udesno u odnosu na kontrolu ukazuje na povećanje produkcije superoksidnog anjona. Za analizu rezultata korišćena je relativna promena srednjeg intenziteta fluorescence tretiranih ćelija u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije u kojima je vrednost svedena na 1.

3.5.3. Merenje potencijala membrane mitohondrija

Za merenje potencijala membrane mitohondrija koristili smo fluoroforom JC-1. Ova boja zahvaljujući svom pozitivnom naelektrisanju prolazi kroz membranu mitohondrija kada je unutrašnjost mitohondrija negativno naelektrisana, tj. kada je potencijal membrane mitohondrija ($\Delta\psi$) očuvan. Tako, JC-1 polimeriše u mitohondrijalnom matkriksu i emituje narandžasto-crvenu fluorescencu (FL2 kanal na citofluorimetru). Ukoliko je potencijal membrane mitohondrija narušen, što se dešava u apoptozi sa otvaranjem spoljašnje mitohondrijalne membrane i curenjem sadržaja, JC-1 ne može da se akumulira u mitohondrijama, već ostaje u svojoj monomernoj formi u citoplazmi i fluorescira zeleno (FL1 kanal na citofluorimetru). Stoga je povećanje zelene

fluorescence u odnosu na crvenu (porast FL1/FL2) pokazatelj pada potencijal membrane mitohondrija.

Po završetku inkubacije sa MPP+, ćelije su isprane PBS-om, tripsinizirane i centrifugirane na 500 g, 5 minuta na sobnoj temperaturi. Ćelijski talog je resuspendovan u 100 μ l prethodno zagrejane boje na 37 °C, u finalnoj koncentraciji 5 μ g/ml. Po isteku inkubacije, ćelije su oprane 2 puta sa 1 ml PBS-a i centrifugirane na 500 g, 5 minuta, na sobnoj temperaturi. Posle drugog centrifugiranja, ćelije su resuspendovane u 500 μ l PBS-a i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su predstavljeni kao odnos zelene i crvene fluorescence (FL1/FL2, arbitrarno matematički postavljen kao 1) pri čemu je porast ovog odnosa u poređenju sa kontrolom odražavao pad (depolarizaciju) potencijala membrane mitohondrija.

3.5.4. Detekcija autofagije u ćelijama primenom LysoTracker Red DND-99 boje

Jedan od pokazatelja autofagije jeste prisutvo većeg broja ili porasta zapremine kiselih vezikula lizozoma/autofagolizozoma u ćeliji. Za potrebe ovog eksperimenta korišćena je pH senzitivna boja LTR. Ćelije su bojene prema instrukcijama proizvođača. Po isteku tretmana sa MPP+, u bunare je dodata LTR boja u finalnoj koncentraciji 100 nM. Boja je inkubirana 15 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije, ćelije su oprane hladnim PBS-om, tripsinizirane, prebačene u FACS epruvete i centrifugirane (500 g, 5 minuta, na sobnoj temperaturi), a zatim oprane sa 1ml hladnog PBS-a. Ćelije su finalno resuspendovane u 500 μ l PBS. Porast crvene fluorescence je analiziran na protočnom citofluorimetru (FL3 kanal). Rezultati su prikazani u obliku histograma raspodele intenziteta crvene fluorescence (FL3), pri čemu pomeraj histograma tretiranih ćelija u odnosu na kontrolu ukazuje da je došlo do povećanja broja unutarćelijskih vezikula kiselog sadržaja. Za analizu rezultata korišćena je relativna promena srednjeg intenziteta fluorescence tretiranih ćelija u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije u kojima je vrednost svedena na 1.

3.6. Imunoblot analiza

Primenom imunoblot tehnike (engl. *Western blot*) analizirana je aktivnost i ekspresiju proteina u uzorcima. Ova metoda se zasniva na elektroforetskom razdvajanju proteina na osnovu njihove veličine, dok su detekcija i vizuelizacija proteina, zasnovane na reakciji antigen-antitelo.

Nakon isteka tretmana, ćelije su lizirane na ledu, u puferu za lizu ćelija, u koji su dodati inhibitori proteaza i fosfataza (30 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM PMSF, 20 µl/ml koktela proteaznih inhibitora, 2 mM Na₃VO₄ i 50 mM NaF). Potpuno razaranje ćelijskih membrana je postignuto inkubacijom ćelijske suspenzije tokom 15 minuta na ledu, uz povremeno mešanje na vorteksu. Lizati su zatim centrifugirani na 14000 g, 20 minuta, na +4 °C. Nakon centrifugiranja, pipetom su odvojeni ćelijski supernatanti od ćelijskog debrisa. Supernatanti su zatim čuvani na -20 °C za dalju analizu.

3.6.1. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima

Koncentracija ukupnih proteina, u svakom supernatantu lizata, određivana je metodom po Bradford-u (216). Princip ove kolorimetrijske metode, je da se proteini u kiseloj sredini vezuju za boju Coomassie Brilliant Blue i prevode je u anjonski oblik. Ovo vezivanje uzrokuje promenu boje od smeđe-crvene u plavu oblast vidljivog spektra. Intenzitet boje je određivan na automatskom čitaču mikrotitarskih ploča, pri talasnoj dužini svetlosti od 570 nm (Sunrise; Tecan, Dorset, Velika Britanija). Intenzitet razvijene boje i odgovarajuća vrednost apsorbance proporcionalno su odgovarali koncentraciji proteina u uzorku.

Da bismo odredili tačnu koncentraciju proteina u uzorcima, konstruisana je standardna kriva nakon očitavanja apsorbanci koje su dobijene u reakciji standardnih rastvora seruma govečeta (koncentracija: 0, 1, 2, 4, 8, 16 mg/ml BSA) sa Coomassie Brilliant Blue bojom.

3.6.2. Elektrofereza i transfer

Da bi se uzorci pripremili za elektroferezu, najpre su kuvani na 95 °C, 5 minuta, određene zapremine lizata sa odgovarajućom zapreminom redukujućeg pufera za pripremu uzoraka. Krajnje koncentracije sastojaka redukujućeg pufera u uzorcima nakon kuvanja bile su: 2% SDS, 10% glicerol, 2 mM 2-merkaptotanol, 0,002 bromfenol plavo, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8. Proteini se tekom elektrofereze razdvajaju u poliakrilamidnom gelu, na osnovu molekulskih masa. Naime, tokom pripreme uzoraka, visoka temperatura služi da denaturiše proteine, SDS oblaže proteine negativnim naelektrisanjem, dok 2-merkaptotanol sprečava formiranje disulfidnih veza u denaturisanim proteinima.

U zavisnosti od veličine proteina korišćena su tri gela različitih koncentracija poliakrilamida: 8% (za analizu Raptor, mTOR, ULK1 proteina), 10% (za analizu Akt, AMPK, p70S6K, PRAS40, LAMP-1, p62 proteina i β -aktina) ili 12% (za analizu 4E-BP1 i LC3 proteina). U bunare, na gelu, su sipane jednake količine proteina (10 do 20 μ g). Prvi deo gela, tzv. *stacking* gel, služio je da se svi proteini iz uzoraka dovedu u istu poziciju pri ulasku u gel za razdvajanje tokom elektrofereze. Kranje koncentracije sastojaka ovog gela su 4% akrilamid/0,14% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,125M Tris-HCl, pH 6,8. Ovaj gel se naslanjao na gel za razdvajanje proteina (8% akrilamid/0,27% bisakrilamid, 10% akrilamid/0,34% bisakrilamid ili 12% akrilamid/0,41% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,375M Tris-HCl, pH 8,8). Kao katalizatori polimerizacije gelova korišćeni su 0,05% amonijumpersulfat (APS) i 0,033% Tetrametiletilediamin (TEMED). Puffer u kom se odvijala elektrofereza, sastojao se od 192mM glicina, 0,1% SDS i 25 mM Tris-HCl, pH 8,3.

Elektroferezsko razdvajanje je trajalo od 90 do 120 minuta pri konstantnom naponu i naizmjeničnoj struji, na +4 °C. Prvih 30 minuta primenjivan je konstantni napon od 100 V, a nakon ulaska uzoraka u gel za razdvajanje proteina, napon je povećan na 150 V. U cilju određivanja molekulskih težina, na svaki gel je naneta i smeša referentnih proteina, obojenih i poznatih molekulskih masa.

3.6.3. Prenos proteina na nitroceluloznu membranu

Po završetku elektroforeze izvršen je polusubi transfer proteina sa gela na nitrocelulozne membrane koje imaju visok afinitet za vezivanje proteina. Pre transfera, one su inkubirane nekoliko minuta u puferu za transfer (192 mM glicin, 20% metanol i 25 mM Tris-HCl, pH 8,3). U aparaturu za transfer najpre se stavlja filter papir prethodno potopljen u pufer za transfer, preko njega se postavlja membrana bliže pozitivnoj elektrodi, anodi, potom gel bliže negativno naelektrisanjoj elektrodi, katodi i na kraju još jedan sloj filter papira. Ovakvom orijentacijom gela i membrane, omogućeno je kretanje negativno naelektrisanih proteina sa gela ka anodi, uz koju je smeštena membrana. Transfer se odvijao na sobnoj temperaturi pod dejstvom konstante struje (0,8 mA/cm² membrane), pri naizmeničnom naponu.

3.6.4. Imunoblot i detekcija proteina

Nakon transfera, membrane su inkubirane 1 sat na 22 °C u rastvoru za blokiranje (5% rastvor odmašćenog mleka u prahu u Tris puferu sa dodatkom deterdženta Tween20, TBS-T: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6; 0,05% Tween 20). Na taj način proteini iz mleka će se vezati za membranu i time sprečiti nespecifično vezivanje antitela koja služe za detekciju proteina od interesa. Nakon toga, membrane su inkubirane preko noći na +4 °C, uz blago mešanje na rotirajućoj podlozi, sa primarnim zečjim antitelima, rastvorenim u rastvoru za blokiranje membrana, i to na fosfo-AMPK (1:1000), AMPK (1:1000), fosfo-Raptor (1:1000), Raptor (1:1000), fosfo-Akt (Thr308 i Ser473, 1:1000), Akt (1:1000), fosfo-mTOR (1:1000), mTOR (1:1000), fosfo-p70S6K (1:1000), p70S6K (1:1000), fosfo-4E-BP1 (1:1000), 4E-BP1 (1:1000), fosfo-ULK1 (1:1000), ULK1 (1:1000), LC3-II (1:1000), LAMP-1 (1:1000), β-aktin (1:1000) i p62 (1:4000). Sutradan, nakon otkaljanja primarnih antitela, membrane su isprane 3 puta u TBS-T. Zatim im je dodato sekundarno antitelo, kozje antizečje IgG antitelo (1:5000) za koje je vezana peroksidaza rena. Sekundarno antitelo je takođe rastvoreno u rastvoru za blokiranje. Membrane su inkubirane na sobnoj temperaturi, na rotirajućoj podlozi, 90 minuta. Po isteku inkubacije, 3 puta su oprane u TBS-T i postavljene u aparat za skeniranje membrana i detekciju signala ChemiDoc. Membrane su potom prelivene

supstratom za peroksidazu rena - reagensom pojačane hemiluminiscence (engl. *Enhanced chemiluminescence reagent*, ECL). Peroksidaza rena, koja je vezana za sekundarno antitelo, u tom trenutku razgrađuje H₂O₂ iz ECL, do O₂ i H₂O. Nastali O₂ potom reaguje sa luminolom iz ECL, nastaje 3-aminoftalat i dolazi do emisije fotona svetlosti što se detektuje na aparatu ChemiDoc. Intenzitet hemiluminiscence je direktno proporcionalan količini proteina od interesa vezanog za membranu. Ekspresija proteina je kvantifikovana kompjuterskim programom ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MA) i izražena kao relativan broj dobijen deljenjem intenziteta trake proteina od interesa sa intenzitetom trake β-aktina istog uzorka u slučaju LC3-II, p62 i LAMP-1 proteina, dok je aktivnost AMPK, Raptor, Akt, mTOR, p70S6K, 4E-BP1, PRAS40, ULK1, izražena deljenjem intenziteta trake fosforilisane forme sa intenzitetom trake totalne forme proteina. Rezultati količine proteina u tretiranim ćelijama su predstavljeni u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije) u kojoj je vrednost odnosa intenziteta trake svedena na 1.

3.7. Ko-imunoprecipitacija

Kako bi ispitali da li postoji interakcija između Akt i AMPK proteina, primenili smo metodu ko-imunoprecipitacije. Suština reakcija imunoprecipitacije bazira se na precipitaciji željenog proteina, koji se preko antigena vezuje za antitelo kojim su obložene protein A kuglice. Za imunoprecipitaciju smo koristili protein A agarozne kuglice obložene anti-Akt antitelom.

Na sličan način, primenom metode ko-imunoprecipitacije, moguće je utvrditi i da li postoje određene protein-protein interakcije, jer se prilikom taloženja imunokompleksa “željeni protein-antitelo-protein A kuglice”, talože i svi proteini koji su u kompleksu sa proteinom od interesa.

SH-SY5Y ćelije su tretirane 2 mM MPP⁺ u trajanju od 8 h. Po isteku tretmana ćelije su lizirane u puferu za imunoprecipitaciju (50 mM Tris-Cl pH 7,8, 150 mM NaCl, 0,5% NP-40 i koktel inhibitora proteaza). Imunoprecipitacija se dalje odvijala po protokolu preporučenom od strane proizvođača. Lizati su inkubirani sa anti-Akt antitelom, preko noći, na rotirajućoj podlozi, pri temperaturi od +4 °C. Sutradan, su dodate protein A kuglice, inkubirane sa lizatom 90 min. Potom je novonastali

imunokompleks (Akt+anti-Akt antitelo+protein A) opran 3 puta u 500 μ l puferu za imunoprecipitaciju uz centrifugiranje. Uzorak je potom kuvan sa 3 puta redukujućim puferom, 5 minuta na 95 °C i analiziran imunoblot metodom na anti-Akt i anti-AMPK antitela. Kao negativna kontrola korišćeni su uzorci netretiranih ćelija koji su inkubirani sa protein A kuglicama bez antitela.

3.8. Nukleoporacija

Nukleoporacija je molekularno-biološka tehnika u kojoj se primenom optimizovanih električnih parametara i rastvora specifičnih za određen tip ćelije, menja propustljivost ćelijske i nuklearne membrane. Na ovaj način, kretanjem kroz električno polje, omogućen je ulazak različitih proteina, RNK ili DNK molekula direktno u nukleus. Ova tehnika ima nekoliko prednosti u odnosu na druge ne-virusne transfekcione metode poput klasične elektroporacije ili lipofekcije: (1) visoko je specifična, (2) daje efikasnost transfekcije i do 90% sa DNK konstruktima (pDNK), dok sa RNK konstruktima (siRNK, shRNK, miRNK i sl.) može da da čak do 99%, (3) elektrode su izgrađene od ne-metalnog polimernog provodnika (izbegnut je citotoksični efekat prisustva metalnih jona tokom klasične elektroporacije), (4) tokom transfekcije ne menja se bitno vijabilitet i fiziološki status ćelije, (5) analiza rezultata transfekcije moguća je već nakon nekoliko sati (4 do 8 h), (6) upotrebljiva je za veliki broj različitih supstrata (pDNK, siRNK, shRNK, miRNK, iRNK, peptide, proteine), (7) omogućava transfekciju ćelija koje se teško transfektuju (stem ćelije, primarne, neuronske i sl.).

Za nukleoporaciju ćelija korišćen je aparat Lonza 4D Nucleofector X unit system (217). Za optimizaciju pulseva korišćene su trake (engl. *Strip*) sa 16 bunara, dok su za imunoblot analizu i protočnu citofluorimetriju korišćene kivete.

Pre same nukleoporacije, SH-SY5Y ćelije su kultivisane u Petri šoljama, do 80% konfluentnosti i 3 do 4 dana pred nukleoporaciju ćelije su finalno zasejane u koncentraciji 2×10^5 ćelija/cm². Tokom optimizacije protokola, korišćen je pmaxGFP plazmid iz kita, 0,4 μ l, Lonza SF nukleofektor rastvor (16,4 μ l/bunaru) + Lonza nukleofektor suplement (3,6 μ l/bunaru), preporučeni od strane proizvođača za SH-SY5Y ćelijsku liniju. Poredeći efikasnost transfekcije i vijabilitet ćelija, za dalje eksperimente

odabran je CA-137 puls. Za dalje potrebe istraživanja, ćelije su transfektovane u kivetama zapremine 100 μ l (2×10^6 ćelija, Lonza SF nukleofektor rastvor (82 μ l/kiveti) + Lonza nukleofektor suplement 18 μ l/kiveti, sa 2 μ g pDNK/bunaru, odnosno 100 nM shRNK/bunaru. Nakon nukleoporacije, ćelije su kultivisane u pločama sa 6 bunara, 1ml OPTI-MEM medijumu/bunaru, 24 h. Tokom eksperimenata, da bismo smanjili ekspresiju AMPK, koristili smo male ukosničaste RNK (engl. *Small hairpin RNA*, shRNA, Santa Cruz, CA), kontrolnu shRNK i AMPKshRNK, odnosno dnAMPK plazmid D157A (engl. *Dominant negative AMPK*), koji smo dobili na poklon od prof. Carling-a (MRC London Institute of Medical Sciences, Imperial College, London, UK), a kao kontrolu pcDNA3 (prazan vektor), (218). Sa druge strane, da bismo smanjili ekspresiju Akt koristili smo dnAkt (engl. *Dominant negative Akt*), a kao kontrolu nepromenjen Akt konstrukt, wt Akt (engl. *Wild type Akt*), koji smo dobili na poklon od prof. Boudewijn M. Burgering (University Medical Center, Utrecht, The Netherlands) (219). Efikasnost transfekcije je potvrđena imunoblot analizom.

3.9. Kultivacija i transformacija DH5 α , umnožavanje i izolacija plazmida

Svi rastvori i materijal korišćen u kultivaciji bakterija, najpre su autoklavirani. Termolabilni rastvori poput ampicilina, transformacionog pufera, rastvora za zamrzavanje, su filtrirani kroz filter sa porama veličine 0,2 μ m. Bakterije su uzgajane na čvrstim agaroznim podlogama ili u tečnom LB medijumu (Luria-Bertani). Za pripremu 1 l LB medijama, koristili smo 10 g triptona, 5 g ekstrakta kvasca i 10 g NaCl, koje smo rastvorili u 1 l destilovane vode. pH smo podesili sa NaOH na 7, dok je za pripremu agaroznih podloga u ovaj rastvor dodato i 15 g agaroze. Čvrste podloge su korišćene radi dobijanja i izdvajanja pojedinačnih klonova, dok je tečan LB medijum korišćen za umnožavanje bakterija i izolaciju plazmida uz stalno mešanje, radi bolje aeracije, pri brzini 180 rotacija po minuti (rpm). Pored LB za kultivaciju bakterija korišćen je i SOC medijum. Za 100ml ovog medijuma koristili smo 2 g triptona, 0,5 g ekstrakta kvasca, 0,05 g NaCl, 1 ml 250 mM KCl, 0,5 ml 2M MgCl₂ i 2 ml 1 M glukoze. Sveže napravljen SOC medijum je potom alikvotiran u polipropilenske tubice po 1ml.

Pre same transformacije, bilo je neophodno umnožiti i pripremiti kompetentne *Escherichia coli DH5 α* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Bakterije su najpre

zasejane sterilnom ezom na prethodno pripremljene, sterilne, agarozne podloge u Petri šoljama i inkubirane preko noći na 37 °C. Sutradan smo izbrali pojedinačne kolonije sterilnim nastavkom za pipetu i preneli ih u 10 ml LB medijuma radi dobijanja početne, (engl. *Starter*) kulture. Starter kultura je inkubirana preko noći, na 37 °C, uz stalno mešanje. Sledećeg jutra starter kultura je prenesena u 1 l LB medijuma i ostavljena da se inkubira na 37 °C, uz stalno mešanje i uz praćenje krive rasta. Inkubacija je prekinuta kada su bakterije bile u eksponencijalnoj fazi rasta, pri optičkoj gustini (engl. *Optical density*, OD) 0,4 do 0,6. Optička gustina se određuje spektrofotometrijski na Biophotometer aparatu (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) korišćenjem talasne dužine od 600nm. Tom prilikom se 1 ml kulture stavlja u kivetu, koja se potom postavlja u aparat. Vrednost apsorbance, OD, zapravo predstavlja broj bakterija, gde OD = 1 odgovara približno 10⁸ bakterija u 1 ml kulture.

Kada su bakterije dostigle OD 0,4-0,6, rast bakterijske kulture je prekinut hlađenjem na +4 °C, 15 do 30 minuta. Nakon toga, kultura je centrifugirana na 1000 g, 10 minuta na +4 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant je odliven, a bakterijski talog je resuspendovan na ledu, u odnosu 1:10, zapremina LB i rastvora za zamrzavanje (engl. *Freezing mix*). Rastvor za zamrzavanje sastojao se od 10% PEG (MW=3,350), 5% DMSO i 20 mM Mg²⁺ (10 mM MgCl₂ + 10 mM MgSO₄) (220). Po 100 µl ovako resuspendovanih bakterija je alikvotirano i prebačeno u prethodno ohlađene, polipropilenske tubice. Do upotrebe, alikvoti su čuvani na -80 °C.

Za transformaciju bakterija korišćeno je 100 µl pufera za transformaciju (u vodi rastvoreno 20 µl 5xKCM pufera (0,5M KCl, 0,15M CaCl₂, 0,25M MgCl₂), 5 µl 1 M MnCl₂ i 2 µl plazmidske DNK) i 100 µl bakterijske suspenzije. U eksperimentima su korišćeni dnAMPK, wtAkt i dnAkt plazmidi. Sva tri plazmida su nosila rezistenciju na antibiotik ampicilin. Bakterije su zatim držane na ledu 20 minuta, a potom su podvrgnute toplotnom šoku, 30 sekundi na 42 °C u vodenom kupatilu. Po isteku toplotnog šoka, bakterije su prebačene ponovo na led da bi se zaustavila reakcija. Potom je u svaki uzorak bakterija dodato po 450 µl SOC medijuma, blago su resuspendovane i inkubirane na 37 °C 45 minuta. Po isteku inkubacije bakterije su zasejavane na agarozne podloge sa ampicilinom (100 µg/ml). Podloge su inkubirane preko noći na 37 °C. Sutradan su pikirane pojedinačne kolonije od kojih su pravljene početne kulture (inkubacija 8h, uz rotaciju na 37 °C). Iz početne kulture je potom uzeto po 100 µl i

prebačeno u erlenmajere sa 100 ml LB sa ampicilinom. Radne kulture u erlenmajerima su inkubirane 12 do 16 h na rotirajućoj podlozi i pri temperaturi od 37 °C. Po isteku inkubacije, radne kulture su prebačene u sterilne, polipropilenske epruvete od 50 ml i centrifugirane 10 minuta na 5000 g i pri temperaturi od +4 °C. Iz bakterijskog taloga radne kulture izolovana je plazmidska DNK uz pomoć GeneJET Plasmid Midiprep Kit-a, po protokolu preporučenom od strane proizvođača.

3.10. Statistička analiza podataka

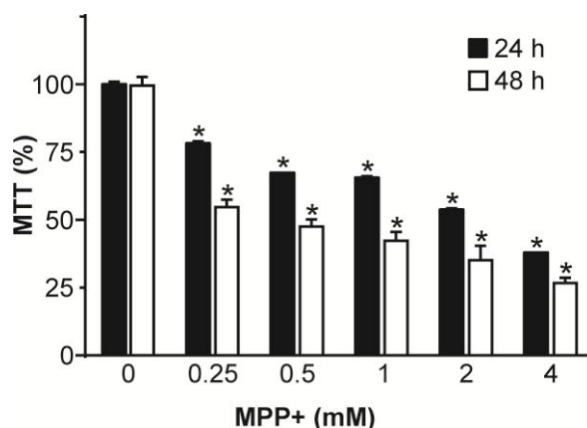
U statističkoj obradi podataka korišćene su metode analitičke statistike. Svi tretmani su rađeni u triplikatu, a rezultati su prikazani kao srednje vrednosti sa standardnim devijacijama (\pm SD). Za procenu značajnosti razlike dva nezavisna uzorka korišćen je parametarski test – Studentov t-test, dok je za analizu statističke značajnosti razlike između rezultata dobijenih različitim tretmanima triplikata kultura korišćena jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA), praćena *Tukey's post-hoc* testom za višestruka poređenja. Vrednost $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1. Uticaj MPP+ na preživljavanje ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y u kulturi

4.1.1. MPP+ smanjuje vijabilitet SH-SY5Y ćelija

Poznato je da ćelijska linija humanog neuroblastoma SH-SY5Y ispoljava brojne biohemijske i funkcionalne karakteristike dopaminergičkih neurona kao što su prisustvo DAT i aktivnosti tirozin-hidroksilaze, dopaminski D2 receptor i β -hidroksilaze (210–212). Upravo iz tog razloga, često se koristi u ćelijskim modelima oštećenja dopaminergičkih neurona. U cilju utvrđivanja citotoksičnog dejstva MPP+ na ćelije humanog neuroblastoma, vijabilitet SH-SY5Y ćelija je ispitivan nakon 24 i 48 h. Imajući u vidu da MPP+ toksin inhibira kompleks I mitohondrija, za potrebe ispitivanja vijabiliteta SH-SY5Y ćelija izabrali smo MTT test, jer podrazumeva da se kao mera vijabiliteta koristi aktivnost mitohondrijalnog enzima sukcinat dehidrogenaze. Dobijeni rezultati su pokazali da dolazi do doznog i vremenski-zavisnog statistički značajnog smanjenja vijabiliteta SH-SY5Y ćelija nakon tretmana sa MPP+ toksinom u koncentracijama većim od 250 μ M (Slika 7.). Na osnovu rezultata određivanja vijabiliteta MTT testom, izračunata je IC_{50} , odnosno utvrđeno je koja koncentracija MPP+ smanjuje vijabilitet SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma za 50%. Ova vrednost je dobijena matematički, primenom statističkog programa *GraphPad Prism (Trial version)* iznosila je oko 2 mM na 24 h i ona je korišćena u daljem eksperimentalnom radu.

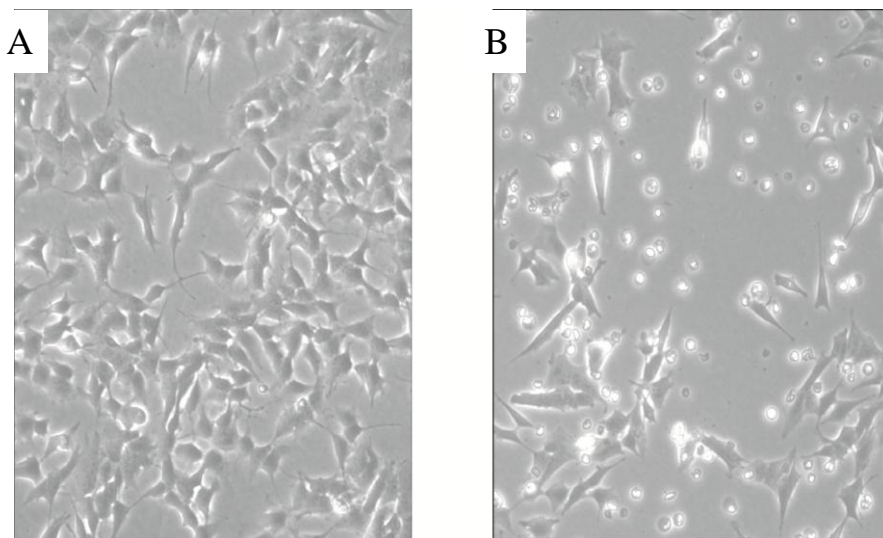


Slika 7. MPP+ pokazuje vremenski i dozno-zavisan citotoksični efekat na SH-SY5Y ćelijskoj liniji humanog neuroblastoma. SH-SY5Y ćelije su tretirane rastućim koncentracijama MPP+ u toku 24 i 48h, nakon čega je ispitan vijabilitet primenom MTT testa. Vrednosti prikazane na grafiku predstavljaju prosečnu vrednost \pm SD triplikata iz tri eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu.

4.1.2. MPP+ menja morfologiju SH-SY5Y ćelija

Kako bi ispitali uticaj MPP+ na morfologiju SH-SY5Y ćelija, ćelije su inkubirane 24h sa 2mM rastvorom MPP+, a potom analizirane na fazno-kontrastnom mikroskopu, pri uveličanju 200 puta.

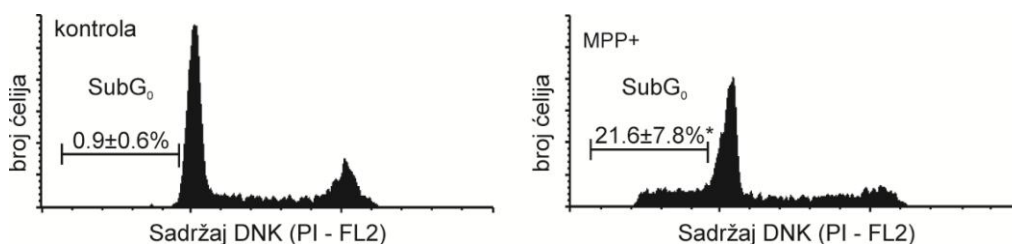
Pokazano je da tretman MPP+ indukuje smanjenje gustine SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma uz promenu citomorfoloških karakteristika. Tretirane ćelije su izgubile nastavke, promenile oblik i veličinu, zaokruglile se i odvojile od površine suda u kom su rasle (slika 8A). Na nekima se moglo videti i bubrenje ćelijske membrane. Sa druge strane, netretirane ćelije su imale brojne neurite, poligonalni oblik i rasle su u klasterima (slika 8B).



Slika 8. MPP+ ima negativan efekat na brojnost i morfologiju SH-SY5Y ćelija. Izgled i morfologija SH-SY5Y ćelija tretiranih sa 2 mM MPP+ ispitivani su svetlosnom mikroskopijom (uveličanje 200x) nakon 24 h.

4.1.3. MPP+ indukuje fragmentaciju DNK u SH-SY5Y ćelijama

Usled prethodno opisanog efekta MPP+ na vijabilitet i izgled SH-SY5Y ćelija, a u cilju boljeg razumevanja mehanizma oštećenja ćelija, ispitivan je uticaj primene MPP+ na ćelijski ciklus. Analizom ćelijskog ciklusa na protočnom citofluorimetru ćelija bojenih PI, pokazano je da 24 h tretman MPP+ (2 mM) indukuje porast procenta ćelija sa hipodiploidnim sadržajem DNK, što ukazuje na pojavu fragmentacije DNK, koja je jedna od karakteristika apoptoze. Na slici (Slika 9.) su prikazani reprezentativni histogrami kontrolnih i tretiranih ćelija. Naime, PI boja ulazi u ćelije sa narušenim membranskim integritetom i umeće se u DNK heliks. Ako je došlo do fragmentacije DNK, uočava se porast procenta ćelija koje imaju tzv. hipodiploidni sadržaj DNK (SubG₀), odnosno to su ćelije koje imaju manju količinu DNK od ćelija koje se nalaze u G₀/G₁ fazi ćelijskog ciklusa (ćelije u G₀/G₁ fazi imaju diploidnu količinu DNK).



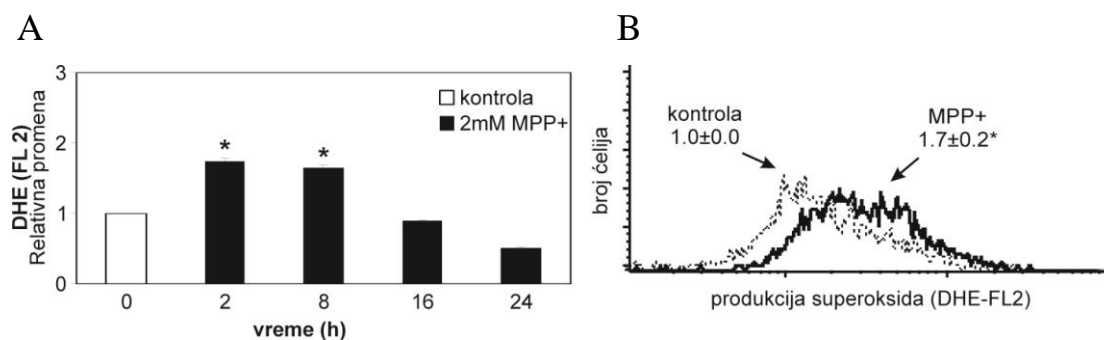
Slika 9. MPP+ indukuje porast SubG₀ frakcije u SH-SY5Y ćelijama humanog neuroblastoma. Ćelije su tretirane sa 2 mM MPP+ 24 h. Prikazani su reprezentativni histogrami iz jednog od tri odvojena eksperimenta. Vrednosti prikazane na grafiku predstavljaju prosečnu vrednost ± SD iz tri odvojena eksperimenta. * p < 0,05 u odnosu na kontrolu.

Procenat ćelija u SubG₀ fazi nakon tretmana iznosio je $21,6 \pm 7,8\%$, dok je u kontrolnim ćelijama iznosio svega $0,9 \pm 0,6\%$ ($p < 0,05$). Ovaj rezultat je bio u skladu sa već opisanim smanjenjem vijabiliteta i morfološkim promenama na SH-SY5Y ćelijama humanog neuroblastoma. Takođe, primenom ove analize, isključena je mogućnost da MPP+ dovodi do smanjenja vijabiliteta zaustavljanjem SH-SY5Y ćelija u nekoj od faza ćelijskog ciklusa.

4.1.4. Primena MPP+ stimuliše produkciju superoksidnog anjona u SH-SY5Y ćelijama

Imajući u vidu da je MPP+ mitohondrijalni toksin, kao i da oksidativni stres i oštećenje mitohondrija mogu biti vrlo potentni aktivatori apoptoze, sledeće što smo ispitivali je da li je efektu MPP+ na smanjenje vijabiliteta prethodio porast produkcije superoksidnog anjona. Za potrebe ovog eksperimenta, SH-SY5Y ćelije su inkubirane sa fluorescentnom bojom, dihidroetidijumom (DHE), selektivnom za superoksidni anjon, i intenzitet fluorescence je meren protočnom citofluorimetrijom. Tom prilikom je pokazano da MPP+ dovodi do statistički značajnog povećanja fluorescence usled produkcije superoksidnog anjona u odnosu na kontrolne ćelije (Slika 10.). Najveći porast produkcije superoksidnog anjona je zabeležen već nakon 2 h tretmana i bio je 1,7 puta veći u odnosu na koncentraciju superoksida u netretiranim, kontrolnim ćelijama. Produkcija superoksida je takođe bila značajno povećana i nakon 8h tretmana, ali u

manjoj meri u odnosu na 2 h, dok u kasnijim ispitivanim terminima nije bilo porasta u odnosu na kontrolne ćelije (Slika 10.).

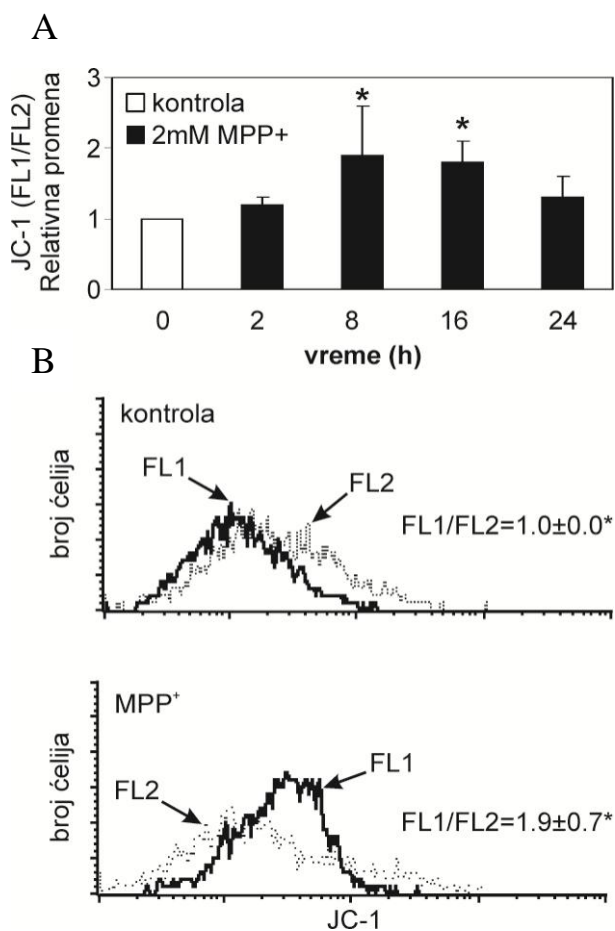


Slika 10. MPP+ indukuje porast produkcije superoksidnog anjona u SH-SY5Y ćelijama. SH-SY5Y ćelije su tretirane 2 mM MPP+ u vremenskim intervalima naznačenim u histogramu (A). Tokom 2 h tretmana ćelija sa 2 mM MPP+ (B). Prikazane vrednosti predstavljaju prosečnu vrednost \pm SD iz 3 odvojena eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu.

4.1.5. MPP+ indukuje pad potencijala unutrašnje mitohondrijalne membrane u SH-SY5Y ćelijama

Kao što je prethodno pomenuto, oštećenje mitohondrija predstavlja jedan od važnih mehanizama oštećenja dopaminergičkih neurona u PB. Takođe je poznato da porast produkcije superoksidnog anjona može da dovede do depolarizacije mitohondrijalne membrane, ali i da oštećenje mitohondrija može da bude uzrok povećane produkcije ROS. Upravo iz tog razloga, sledeće što smo pratili je potencijal unutrašnje membrane mitohondrija SH-SY5Y ćelija, nakon tretmana MPP+ (2 mM) u različitim vremenskim intervalima. Ćelije su nakon tretmana inkubirane sa fluorohromom JC-1 čije nakupljanje u mitohondrijama zavisi od potencijala unutrašnje membrane mitohondrija, a zatim analizirane protočnom citofluorimetrijom. U uslovima intaktnog potencijala unutrašnje membrane mitohondrija, JC-1 unutar mitohondrija formira agregate koji emituju crvenu fluorescencu, dok u uslovima depolarizacije membrane boja ostaje u monomernom obliku koji emituje zelenu fluorescencu. Primena MPP+ toksina je izazvala depolarizaciju unutrašnje mitohondrijalne membrane, što se na protočnoj citometriji registruje kao povećanje odnosa zelene i crvene fluorescence (FL1/FL2) u odnosu na kontrolne ćelije. Vremenska analiza je pokazala da do

depolarizacije mitohondrijalne membrane SH-SY5Y ćelija dolazi nakon indukcije porasta sadržaja superoksidnog anjona (Slika 11.). Tretman MPP+ u trajanju od 8 h, doveo je do statistički značajnog porasta odnosa FL1/FL2 - 1,9 puta u odnosu na kontrolne ćelije. Na osnovu ovih rezultata, možemo zaključiti da je MPP+ indukovana produkcija superoksidnog anjona inicirala depolarizaciju unutrašnje membrane mitohondrija.



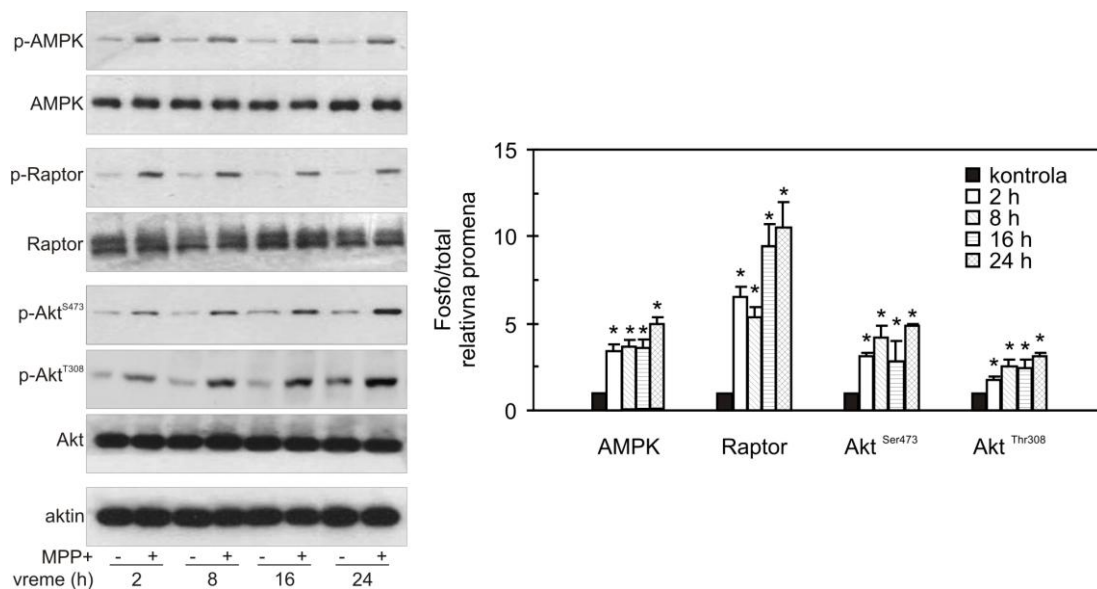
Slika 11. MPP+ indukuje pad potencijala mitohondrijalne membrane u SH-SY5Y ćelijama. SH-SY5Y ćelije su tretirane MPP+ (2 mM) u vremenskim intervalima naznačenim u grafiku (A), a zatim obojene JC-1 fluorohromom. Prikazani su reprezentativni histogrami iz jednog od tri odvojena eksperimenta (B). Na grafiku su prikazane prosečne vrednosti \pm SD iz tri odvojena eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu.

4.2. Uloga oksidativnog stresa u MPP⁺ indukovanoj ćelijskoj smrti i aktivaciji protein kinaze aktivirane adenozin monofosfatom (AMPK) i protein kinaze B (PKB/Akt)

4.2.1. Primena MPP⁺ u ćelijama neuroblastoma dovodi do aktivacije kinaza AMPK i Akt

Poznato je da u uslovima oksidativnog stresa u ćeliji može doći do aktivacije brojnih signalnih puteva u ćeliji. U narednim eksperimentima ispitivan je uticaj MPP⁺ na AMPK i Akt signalne puteve. Kao što je već pomenuto, različite studije koje su se bavile ispitivanjem procesa neurodegeneracije u PB, ukazale su da bi aktivacija ove dve kinaze, AMPK i Akt, mogla imati neuroprotektivno dejstvo, posebno u uslovima povećanog oksidativnog stresa, u cilju održavanja energetske homeostaze i preživljavanja ćelija. Tako je pokazano da AMPK kinaza u uslovima oksidativnog stresa i oštećenja mitohondrija može učestvovati u aktivaciji različitih transkripcionih faktora koji stimulišu biogenezu mitohondrija poput PGC1 α i TFAM (221). Pored toga, AMPK može pokrenuti proces mitofagije tokom kog se otklanjaju oštećene mitohondrije, aktivirajući ULK1/2 kompleks, ATG9 i Beclin1 proteine, neophodne za indukciju autofagije (136). Na ovaj način AMPK stimulacijom biogeneze mitohondrija i otklanjanjem oštećenih mitohondrija doprinosi ponovnom uspostavljanju energetske homeostaze. Uz AMPK, poznato je da i Akt kinaza može imati značajnu ulogu u neuronima, pre svega zato što učestvuje u regulaciji različitih metaboličkih procesa, ćelijskom rastu i diferencijaciji, inhibiciji procesa apoptoze, ali i u održavanju energetske homeostaze zbog svoje uloge u metabolizmu glukoze. Pored toga, histopatološkom analizom moždanog tkiva obolelih od PB utvrđeno je da postoji pad aktivnosti ove kinaze. U našim eksperimentima imunoblot analizom pokazano je da MPP⁺, već nakon 2 h, indukuje porast fosforilacije (aktivacije) AMPK na Thr 172. Ovaj rani porast aktivacije AMPK kinaze, praćen je i fosforilacijom njenog direktnog supstrata, Raptor proteina (Slika 12.). Takođe, MPP⁺ je doveo i do vremenski zavisnog povećanja fosforilacije Thr 308 i Ser 473 u katalitičkom domenu Akt kinaze. Tako fosforilisan Akt ima punu kinaznu aktivnost. Dakle, tokom dejstva MPP⁺ dolazi do

aktivacije AMPK i Akt kinaza u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y, što ukazuje na to da se unutar ćelije aktiviraju mogući neuroprotektivni signalni putevi.

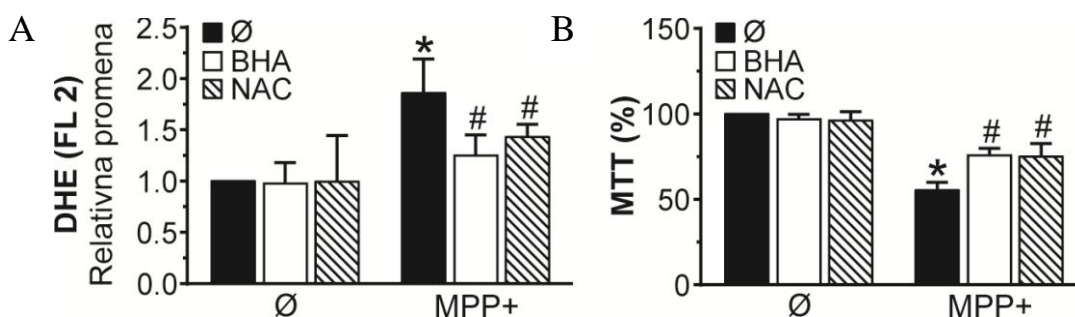


Slika 12. MPP+ indukuje aktivaciju AMPK i Akt kinaze u SH-SY5Y ćelijama. Imunoblot metodom je praćen stepen aktivnosti AMPK, Raptor i Akt kinaza, 2 do 24 h nakon tretmana MPP+. Prikazane vrednosti predstavljaju prosečnu vrednost \pm SD iz 3 odvojena eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu.

4.2.2. Antioksidansi inhibiraju citotoksično dejstvo MPP+

U cilju ispitivanja da li i u kojoj meri oksidativni stres učestvuje u oštećenju ćelija izazvanom MPP+, pola sata pre dodavanja MPP+ u kulturu, SH-SY5Y ćelije su tretirane antioksidansima: N-acetilcisteinom (NAC, 2 mM) ili butiliranim hidroksianizolom (BHA, 100 μ M). Mehanizam antioksidativnog dejstva NAC može biti direktan, kada je sulfhidrilna grupa donor redukcionih ekvivalenata, ili indirektan, kada NAC služi za obnovu nivoa unutarćelijskog glutaciona, dok se mehanizam antioksidativnog dejstva BHA ogleda u sposobnosti njegovog aromatičnog prstena da uđe u oksidoredukcionu reakciju neutrališući slobodan kiseonični radikal (222). Tretman SH-SY5Y ćelija antioksidansima je efikasno smanjio produkciju superoksidnog anjona indukovanu MPP+ nakon 2 h tertmana. Citofluorimetrijska

analiza je pokazala da pretretman sa BHA i NAC dovodi do statistički značajnog smanjenja produkcije superoksidnog anjona sa 1,86 puta, koliko je u MPP+ tretmanu, na 1,25 puta u pretretmanu sa BHA, odnosno 1,43 puta u pretretmanu sa NAC u odnosu na kontrolne ćelije (Slika 13.). Pored toga, MTT testom je pokazano da antioksidansi štite SH-SY5Y ćelije od MPP+, odnosno došlo je do statistički značajnog povećanja vijabilnosti ćelija u odnosu na vijabilnost ćelija koje su tretirane samo MPP+ toksinom. Ovaj rezultat sugerira da je pad vijabiliteta ćelija u uslovima dejstva MPP+ posredovan indukcijom oksidativnog stresa.

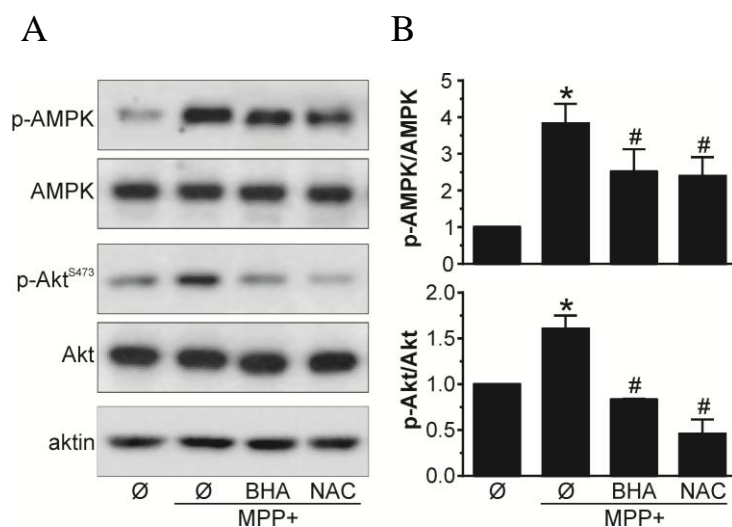


Slika 13. Antioksidansi inhibiraju citotoksično dejstvo MPP+ na SH-SY5Y ćelije. SH-SY5Y ćelije su pretretirane antioksidansima butiliranim hidroksianizolom (BHA; 100 μ M) ili N-acetilcisteinom (NAC; 2 mM) i potom inkubirane 2 h sa 2 mM MPP+ (A), odnosno 24 h (B). Po isteku tretmana, ćelije su obojene fluorohromom DHE, specifičnim za superoksid anjon radikal O_2^- i analizirane na protočnom citofluorimetru (A), dok je ćelijski vijabilitet određen MTT testom (B). Prikazane vrednosti predstavljaju relativnu promenu srednjeg intenziteta fluorescence tretiranih ćelija u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije u kojima je vrednost arbitrarno postavljena na 1 (A). Prikazane su vrednosti aritmetičke sredine \pm SD iz 3 nezavisna eksperimenta u odnosu na netretirane ćelije (A), odnosno triplikata iz tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$ u odnosu na MPP+ tretman.

4.2.3. Antioksidansi smanjuju aktivaciju AMPK i Akt signalnih puteva u SH-SY5Y ćelijama tretiranim MPP+

Kako smo pokazali da primena antioksidanasa utiče na smanjenje produkcije slobodnih radikala i poboljšanje preživljavanja ćelija u uslovima tretmana MPP+ toksinom, sledeće što smo želeli da ispitamo je kakav efekat NAC i BHA imaju na aktivaciju AMPK i Akt signalnih puteva. SH-SY5Y ćelije humanog neuroblastoma su 30 minuta pre tretmana MPP+ (2 mM) tretirane sa NAC (2 mM) ili BHA (100 μ M).

Nakon 2 h ćelije su lizirane. Imunoblot analiza je pokazala da u prisustvu NAC ili BHA dolazi do smanjenja aktivacije kinaza AMPK i Akt, u odnosu na nivo njihove aktivacije pri tretmanu MPP+ (Slika 14.). Ovi rezultati ukazuju da oksidativni stres izazvan MPP+ toksinom ima značajnu ulogu u aktivaciji AMPK i Akt signalnih puteva, uključenih u procese proliferacije, preživljavanja, održavanja energetske homeostaze i otklanjanja oštećenih organela.



Slika 14. Antioksidansi inhibiraju aktivaciju AMPK i Akt kinaze u MPP+-tretiranim ćelijama. SH-SY5Y ćelije su tretirane antioksidansima butiliranim hidrosianizolom (BHA; 100 μ M) ili N-acetilcisteinom (NAC; 2 mM) i potom inkubirane 2 h sa 2 mM MPP+ (A). Po isteku tretmana, analiziran je stepen aktivacije/fosforilacije AMPK i Akt metodom imunoblotova (A). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi, dobijeni iz 3 nezavisna eksperimenta. Trake su kvantifikovane u ImageJ programu (B). Vrednosti prikazane u histogramima predstavljaju aritmetičku sredinu \pm SD iz 3 nezavisna eksperimenta. * $p < 0.05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, dok # $p < 0.05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane MPP+.

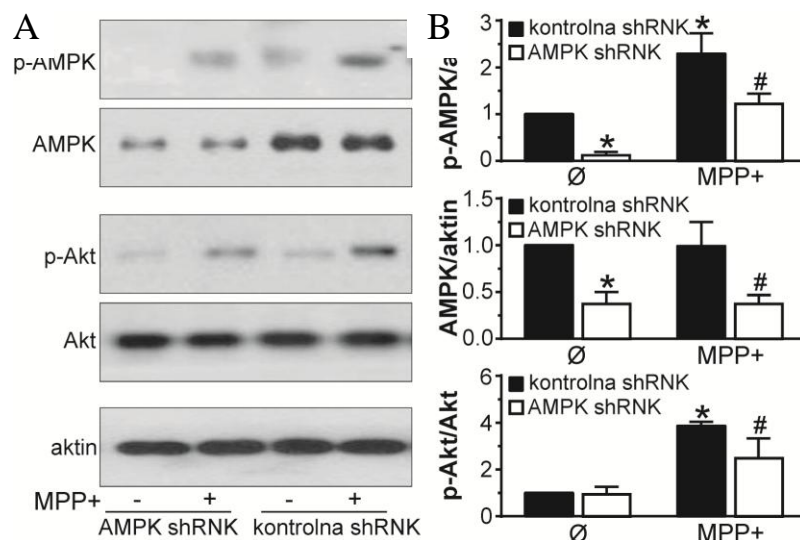
4.3. Uloga AMPK u aktivaciji Akt signalnog puta i oštećenju ćelija izazvanom MPP+ toksinom

U ovom radu primenjena su dva pristupa u modulaciji AMPK signalnog puta. Prvi je bio genska modulacija, gde smo metodom nukleoporacije inhibirali aktivnost AMPK pomoću shRNK ili primenom dnAMPK plazmida. Drugi pristup u modulaciji

AMPK bio je farmakološki, gde su primenjeni farmakološki inhibitor AMPK dorzomorfin - Comp C (223), ili farmakološki aktivatori AMPK, AICAR i metformin (224,225). Dorzomorfin je liposolubilni derivat pirazolopirimidina koji se u ćelijama ponaša kao jak, selektivni inhibitor AMPK (223,226). AICAR se u ćeliji prevodi u ZMP (5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleotid), nukleozid koji je analog adenozin monofosfata i na taj način stimuliše aktivaciju AMPK, dok je metformin biguanidinsko jedinjenje koje se koristi u terapiji dijabetesa tipa 2. Pored toga, metformin je i inhibitor kompleksa I mitohondrija, usled čega u ćelijama dovodi do aktivacije AMPK signalnog puta (224).

4.3.1. AMPK stimuliše aktivaciju Akt u SH-SY5Y ćelijama tretiranim MPP+

S obzirom da su rezultati prethodno prikazanih eksperimenata pokazali da MPP+ toksinom-indukovan oksidativni stres dovodi do oštećenja mitohondrija i pospešuje smrt ćelija, kao i da dovodi do aktivacije AMPK i Akt, dve bitne protein kinaze uključene u procese preživljavanja i regulacije energetskog balansa ćelije, sledeće je ispitano kakva je vremenska dinamika i međuzavisnost aktivacije ovih kinaza u tretmanu SH-SY5Y ćelija MPP+. Da bismo to ispitali, u eksperimentima smo koristili metodu genskog utišavanja pomoću male ukosničaste RNK (shRNK). Ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y su transfektovane kontrolnom shRNK i shRNK specifičnom za *AMPK*. Nakon toga, transfektovane ćelije su tretirane MPP+ u trajanju od 8 h i potom lizirane za imunoblot analizu. Uspešnost transfekcije shRNK za *AMPK*, potvrđena je imunoblot analizom, koja je pokazala da je došlo do utišavanja gena za *AMPK*, jer su nivoi ukupnog AMPK proteina i fosforilisane forme bili značajno sniženi u odnosu na kontrolno transfektovane ćelije (Slika 15.). Pored ovoga, imunoblot analiza je pokazala da dolazi i do smanjenja aktivacije Akt signalnog puta u MPP+ tretiranim ćelijama kod kojih je prisustvo shRNK negativno uticalo na transkripciju gena za *AMPK*. Ovakav rezultat je ukazao da aktivacija AMPK signalnog puta ima ulogu u stimulaciji Akt indukovanoj MPP+.

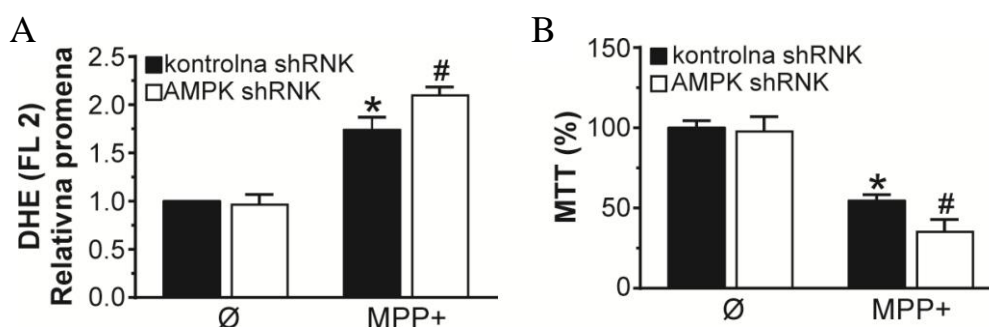


Slika 15. Utišavanje gena za AMPK dovodi do smanjenja aktivnosti Akt kinaze u tretmanu sa MPP+. SH-SY5Y ćelije su transfektovane sa kontrolnom ili AMPK shRNK. Transfektovane ćelije su tretirane MPP+ u trajanju od 2 h i potom analizirane imunoblot metodom. Utišavanje gena za AMPK rezultiralo je i smanjenjem aktivacije Akt kinaze u tretmanu sa MPP+. Efikasnost transfekcije je potvrđena imunoblot analizom poređenjem totalne forme AMPK i aktina. Vrednosti prikazane u histogramima predstavljaju aritmetičku sredinu ± SD iz 3 nezavisna eksperimenta. * $p < 0.05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (Ø), dok # $p < 0.05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije tretirane MPP+.

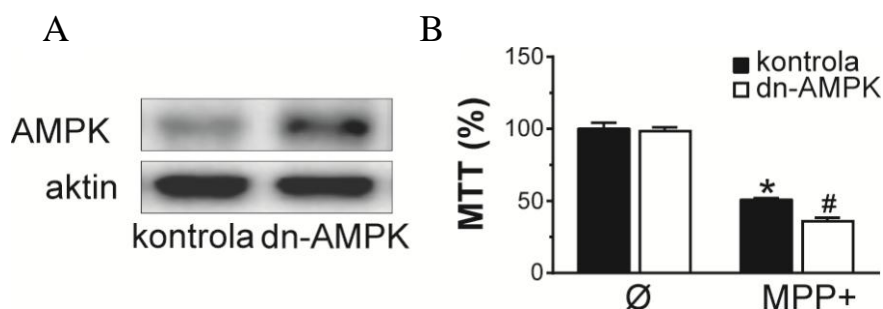
4.3.2. Genska inhibicija AMPK dovodi do povećanja produkcije superoksidnog anjona u SH-SY5Y ćelijama tretiranim MPP+

Rezultati istraživanja etiologije PB sve češće ukazuju da bi AMPK mogla imati značajnu ulogu u procesu neurodegeneracije u PB (227–229). Međutim, neke od ovih studija su pokazale da bi aktivacija AMPK mogla imati neuroprotektivan efekat, dok su druge studije pokazale da bi aktivacija AMPK mogla doprinositi oštećenju neurona. Da bismo ispitali ulogu AMPK u porastu produkcije superoksidnog anjona tokom dejstva MPP+ toksina, SH-SY5Y ćelije, transfektovane pomoću shRNK za *AMPK*, su tretirane MPP+ (2 h). Po isteku tretmana, ćelije su obojene DHE bojom, selektivnom za superoksid, a potom analizirane protočnom citofluorimetrijom. Dobijeni rezultati su pokazali da je inhibicija transkripcije *AMPK* gena dovela do statistički značajnog porasta produkcije superoksidnog anjona u tretmanu MPP+, sa 1,7 puta u kontrolno

transfektovanim ćelijama na 2,2 puta u AMPK shRNK transfektovanim ćelijama (Slika 16.). Pored toga, analiza preživljavanja ćelija neuroblastoma u tretmanu sa MPP+ (24 h), MTT testom je pokazala da postoji statistički značajna razlika u vijabilitetu AMPK shRNK transfektovanih ćelija (35,7%) u odnosu na kontrolno transfektovane ćelije (54,5%) (Slika 16.). Sličan rezultat je dobijen i u eksperimentima gde je u SH-SY5Y ćelije nukleoporacijom ubačen dnAMPK plazmid, čija je funkcija bila da spreči fosforilaciju supstrata nishodno u putu aktivacije AMPK, dok je u kontrolno transfektovane ćelije ubačen prazan vektor pcDNA3. Efikasnost transfekcije je potvrđena imunoblot analizom, odnosno zabeleženo je ukupno povećanje količine AMPK proteina. (Slika 17.). Po isteku 24-časovnog tretmana MPP+, rezultati MTT testa su pokazali da inhibicija transkripcije AMPK gena dodatno smanjuje vijabilnost ćelija (Slika 17). Na osnovu ovoga možemo zaključiti da gensko utišavanje AMPK povećava nivo superoksidnog anjona i osetljivost SH-SY5Y ćelija na citotoksično dejstvo MPP+.



Slika 16. Genska inhibicija AMPK primenom AMPK shRNK povećava MPP+ - indukovanu produkciju oksidativnog stresa i dodatno smanjuje ćelijski vijabilitet kod SH-SY5Y ćelija tretiranih MPP+. Transfektovane ćelije su inkubirane 2 h sa 2 mM MPP+, potom obojene DHE bojom i analizirane na protočnom citofluorimetru (A), dok je ćelijski vijabilitet određen MTT testom nakon 24 h tretmana (B). Prikazane su prosečne vrednosti \pm SD iz tri različita eksperimenta u odnosu na kontrolne ćelije (Ø) (A), odnosno triplikata iz tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na Ø, # $p < 0,05$ u odnosu na MPP+ tretman.

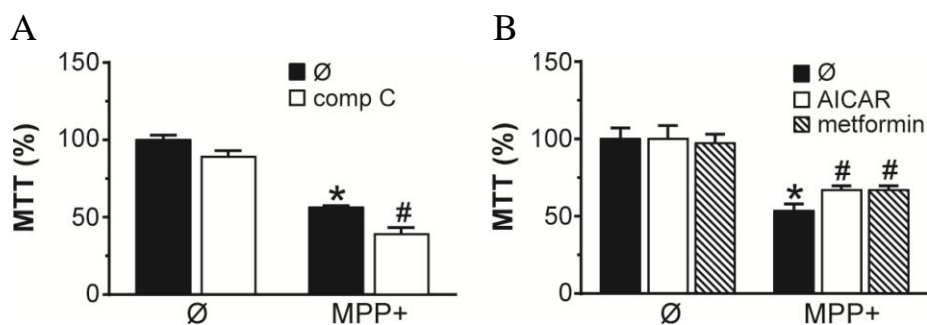


Slika 17. Utišavanjem gena za AMPK primenom dn-AMPK plazmida povećava se osetljivost SH-SY5Y ćelija na MPP+. SH-SY5Y ćelije su transfektovane sa kontrolnim pcDNA3 plazmidom ili dn-AMPK plazmidom (2 µg). Efikasnost transfekcije je potvrđena imunoblot analizom poređenjem nivoa totalne forme AMPK u kontrolno-, odnosno dn-AMPK transfektovanim ćelijama (A). Transfektovane ćelije su potom inkubirane 24 h sa 2 mM MPP+ (B). Po isteku tretmana, MTT testom je analiziran ćelijski vijabilitet (B). Prikazane su vrednosti aritmetičke sredine ± SD iz triplikata iz tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$ u odnosu na MPP+ tretman.

4.3.3. Farmakološka modulacija AMPK signalnog puta ukazuje na protektivnu ulogu ovog signalnog puta u MPP+ tretmanu ćelija

U cilju daljeg ispitivanja uticaja inhibicije AMPK u MPP+ citotoksičnom modelu PB, primeni MPP+ (2 mM) tretmana na SH-SY5Y ćelije je prethodio tretman farmakološkim inhibitorom AMPK, Comp C, (1 µM, 30 minuta). Po isteku 24 h, MTT testom je pokazano da i farmakološka inhibicija AMPK povećava osetljivost SH-SY5Y na MPP+, što je bilo u skladu sa rezultatima dobijenim u eksperimentima sa *AMPK* shRNK (Slika 18A).

Nakon ovoga, zanimalo nas je da li bi primena farmakoloških aktivatora AMPK mogla imati protektivnu ulogu u MPP+ modelu. SH-SY5Y ćelije su najpre tretirane farmakološkim aktivatorima, AICAR-om (250 µM.) i metforminom (4 mM) u trajanju od pola sata, a potom i 2 mM MPP+. Po isteku tretmana, ispitivanjem vijabiliteta, pokazano je da oba farmakološka aktivatora AMPK dovode do statistički značajnog povećanja vijabiliteta u tretmanu MPP+ u odnosu na kontrolno tretirane ćelije (Slika 18 B).



Slika 18. Farmakološka inhibicija AMPK signalnog puta povećava osetljivost SH-SY5Y ćelija na MPP+, dok primena farmakoloških aktivatora AICAR i metformina inhibira citotoksično dejstvo MPP+. SH-SY5Y ćelije su pretretirane sa Comp C (A), AICAR i metforminom (B). Nakon pola sata su tretirane 2 mM MPP+. Po isteku tretmana, MTT testom je analiziran ćelijski vijabilitet (A, B). Prikazane su vrednosti aritmetičke sredine \pm SD iz triplikata iz tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$ u odnosu na MPP+ tretman.

4.4. Uloga protein kinaze B (PKB/Akt) u modulaciji AMPK signalnog puta i citotoksičnom dejstvu MPP+ izazvanim oksidativnim stresom

Dosadašnje studije su pokazale da aktivacija Akt signalnog puta ima važnu ulogu ne samo u regulaciji postnatalnog razvića DA neurona, već i u protekciji DA neurona u različitim modelima PB (184–189). Tako je u eksperimentima sa transgenim miševima koji su homozigotni nosioci *DJ-1* mutacije, pokazano da virusna transfekcija dodatne kopije wt Akt gena smanjuje toksično dejstvo MPTP (188), dok je u drugoj studiji pokazano da se *in situ* injeckovanjem virusnog vektora sa konstitutivno aktivnom formom Akt kinaze, inhibira citotoksični efekat 6-OHDA u DA neuronima miša (189).

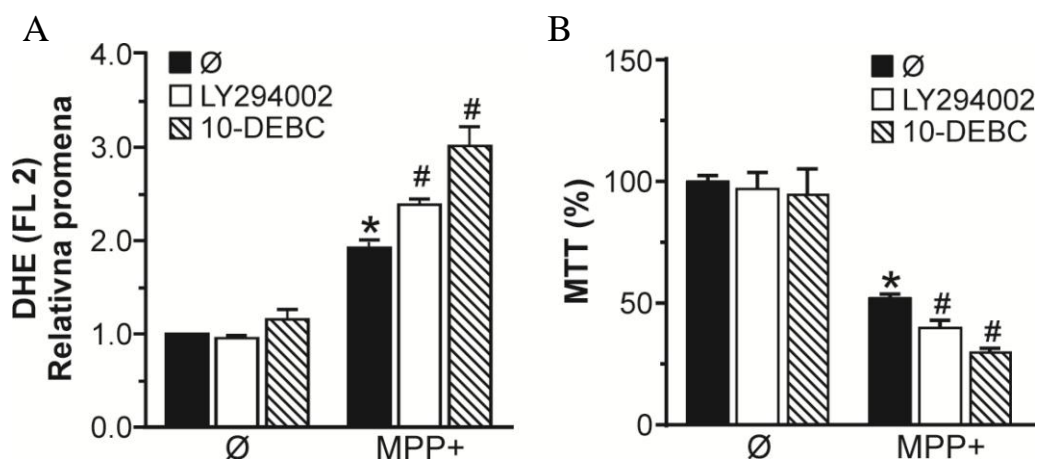
Kako smo modulacijom AMPK signalnog puta pokazali da AMPK smanjuje stepen oštećenja ćelija izazvan MPP+ i nivo oksidativnog stresa, ali i da dovodi do aktivacije Akt signalnog puta, dalje smo ispitivali u kakvom su odnosu AMPK i Akt signalni put u ovom modelu. Aktivnost Akt signalnog puta je modulirana na sličan

način kao i u slučaju AMPK- genskom modulacijom i primenom farmakoloških inhibitora. U ćelije je nukleoporacijom ubačen dnAkt plazmid čija je funkcija bila da spreči fosforilaciju supstrata nishodno u putu aktivacije Akt, dok smo za farmakološku inhibiciju aktivnosti Akt kinaze, koristili inhibitor njemu ushodne kinaze PI3K, LY294002, odnosno direktan inhibitor Akt kinaze, 10-DEBC hidrohlorid.

4.4.1. Farmakološka inhibicija Akt signalnog puta povećava osetljivost ćelija neuroblastoma na štetno dejstvo MPP+

Uzimajući u obzir činjenicu da Akt kinaza ima važnu ulogu u regulaciji vitalnih ćelijskih procesa kao što su sinteza proteina, metabolizam glukoze, ćelijski rast, proliferacija i diferencijacija (180), u sledećim eksperimentima smo ispitivali kako farmakološka inhibicija Akt signalnog puta utiče na oksidativni stres i preživljavanje SH-SY5Y ćelija u tretmanu MPP+. SH-SY5Y ćelije su pre primene MPP+ (2 mM) tretirane inhibitorima (LY294002 10 μ M i 10-DEBC hidrohlorid 20 μ M) u trajanju od 30 minuta. Po isteku inkubacije smo analizirali procenat vijabilnosti ćelija i produkciju superoksidnog anjona. Analiza vijabiliteta je pokazala da su ćelije tretirane inhibitorima osetljivije na štetno dejstvo MPP+, dok je analiza protočnom citofluorimetrijom pokazala statistički značajan porast produkcije superoksida u uzorcima gde je primeni MPP+ tretmana prethodio tretman inhibitorima LY294002 i 10-DEBC hidrohlorid (Slika 19.).

Rezultati farmakološke inhibicije Akt signalnog puta upućuju na to da bi ovaj signalni put mogao imati značajnu ulogu u smanjenju nivoa produkcije superoksidnog anjona i protekciji SH-SY5Y ćelija u MPP+ modelu.



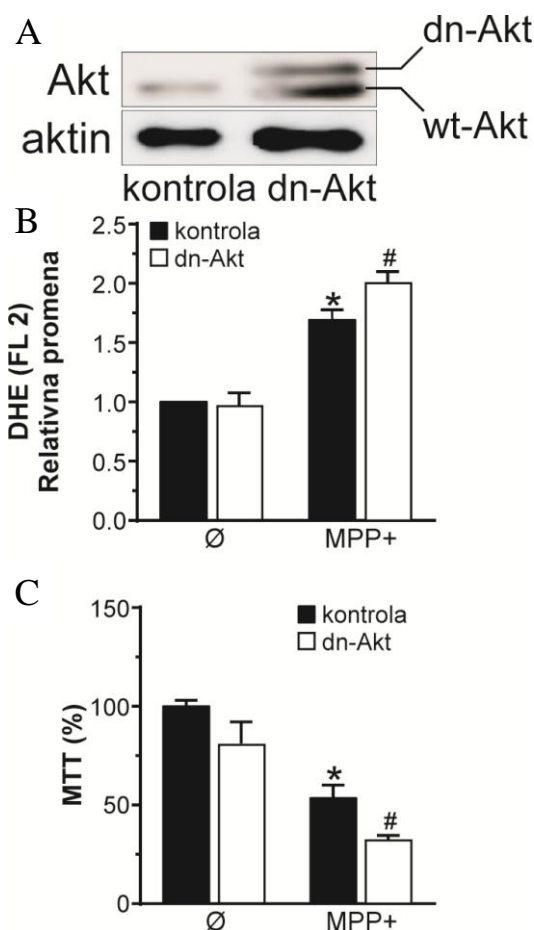
Slika 19. Farmakološki inhibitori Akt povećavaju oksidativni stres i citotoksično dejstvo MPP+ u SH-SY5Y ćelijama. SH-SY5Y ćelije su pretretirane farmakološkim inhibitorima Akt kinaze LY294002 (10 μ M) ili 10-DEBC (20 μ M) i potom inkubirane 2 h sa 2 mM MPP+ (A), odnosno 24 h (B). Po isteku tretmana, ćelije su obojene fluorohromom DHE, specifičnim za superoksid anjon radikal O_2^- i analizirane na protočnom citofluorimetru (A), dok je ćelijski vijabilitet određen MTT testom (B). Prikazane vrednosti predstavljaju relativnu promenu srednjeg intenziteta fluorescencije tretiranih ćelija u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije u kojima je vrednost arbitrarno postavljena na 1 (A). Prikazane su vrednosti aritmetičke sredine \pm SD iz 3 nezavisna eksperimenta u odnosu na netretirane ćelije (A), odnosno vrednosti tripplikata iz tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu, # $p < 0,05$ u odnosu na MPP+ tretman.

4.4.2. Genska inhibicija aktivnosti Akt kinaze doprinosi oksidativnom stresu i osetljivosti ćelija neuroblastoma na oštećenje izazvano MPP+

Kako bismo isključili mogućnost da je protektivni efekat Akt posledica nespecifičnog dejstva farmakoloških inhibitora, želeli smo da ispitamo da li bismo genskim utišavanjem Akt kinaze, potvrdili prethodno dobijene rezultate.

Ćelije humanog neuroblastoma su transfektovane dnAkt plazmidom. Efikasnost transfekcije je potvrđena imunoblot analizom, gde se mutirana forma Akt kinaze vidi kao gornja, teža, proteinska traka ukupnog Akt proteina u lizatu (Slika 20.). Nakon inkubacije transfektovanih ćelija sa MPP+, MTT testom je pokazano da su dnAkt ćelije značajno osetljivije na toksično dejstvo MPP+ u odnosu na kontrolno transfektovane ćelije vektorom sa nepromenjenom (*wt*) kopijom *Akt* gena (Slika 20.). U skladu sa tim je bio i rezultat da je u ovim uslovima produkcija superoksidnog anjona veća u dnAkt transfektovanim ćelijama

tretiranim MPP+ u odnosu na kontrolno transfektovane ćelije pod istim tretmanom (Slika 20.).



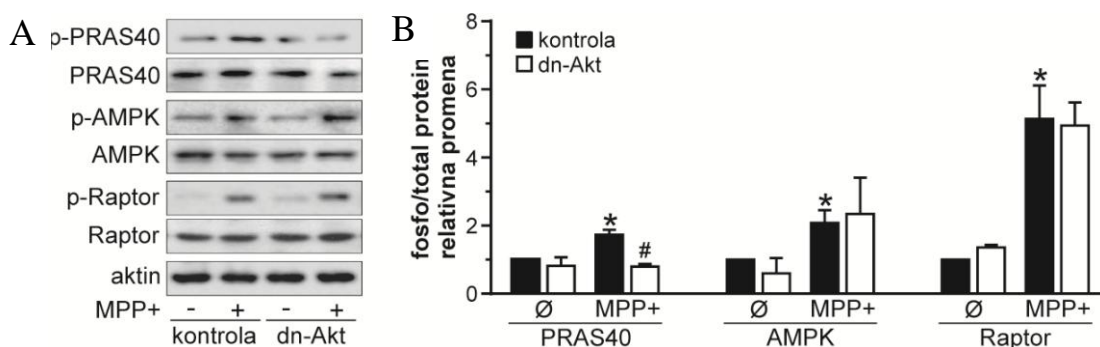
Slika 20. Utišavanjem gena za Akt primenom dn-Akt plazmida povećava se oksidativni stres i osetljivost SH-SY5Y ćelija na MPP+. SH-SY5Y ćelije su transfektovane sa kontrolnim wt-Akt plazmidom ili dn-Akt plazmidom (2 µg). Efikasnost transfekcije je potvrđena imunoblot analizom., dn-Akt plazmid predstavlja gornju traku (A). Transfektovane ćelije su potom inkubirane 2 h, odnosno 24 h sa 2 mM MPP+ (B, C). Po isteku tretmana, ćelije su obojene fluorohromom DHE i analizirane na protočnom citofluorimetru (B), dok je ćelijski vijabilitet određen MTT testom (C). Prikazani rezultati predstavljaju prosečnu vrednost ± SD iz tri različita eksperimenta u odnosu na netretirane ćelije (B), odnosno triplikata iz tri nezavisna eksperimenta (C). * p < 0,05 u odnosu na kontrolu, # p < 0,05 u odnosu na MPP+ tretman.

Prikazani rezultati su potvrdili da u ovom modelu aktivacija Akt kinaze ima citoprotektivno dejstvo, koje se ogleda u inhibiciji oksidativnog stresa.

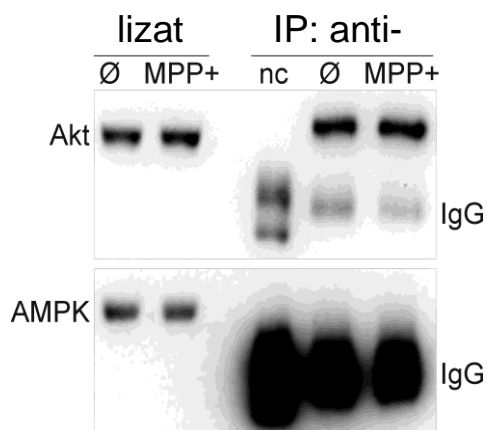
4.4.3. Uloga Akt kinaze u modulaciji AMPK signalnog puta u MPP+ modelu PB

U eksperimentima sa shRNK AMPK smo pokazali da je pad ekspresije AMPK praćen i padom aktivnosti Akt kinaze. Sledeće što smo želeli da ispitamo je kako se inhibicija Akt signalnog puta odražava na aktivnost AMPK. Imunoblot analizom ćelija humanog neuroblastoma transfektovanih dnAkt plazmidom, pokazali smo da je snižen stepen Akt-zavisne fosforilacije PRAS40 (na poziciji Ser 246), direktnog supstrata za

Akt (Slika 21.). Pored toga, imunoblot analiza je pokazala da dnAkt ne dovodi do promene u aktivnosti AMPK i njoj nishodne kinaze Raptora (Slika 21.). Dakle, dobijeni rezultati pokazuju da AMPK može da moduliše aktivnost Akt kinaze, ali obrnut efekat nije pokazan. Da bismo utvrdili da li efekat AMPK na aktivnost Akt kinaze direktan ili indirektan, primenili smo metodu ko-immunoprecipitacije. Po isteku tretmana MPP⁺ (8 h). SH-SY5Y ćelije humanog neuroblastoma su lizirane i inkubirane sa anti-Akt antitelom i agaroznim kuglicama. Na ovaj način dolazi do vezivanja imunokompleksa za agarozne kuglice, odnosno kuglice preko anti-Akt antitela vezuju za sebe iz ćelijskog lizata Akt protein, ali i sve druge proteine sa kojima je on u direktnoj vezi. Nakon toga, imunokompleksi su analizirani imunoblotom. Primenom anti-Akt antitela vizuelizovane su proteinske trake imunokompleksa vezanog za agarozni nosač, dok signal anti-AMPK antitela nije detektovan (Slika 22.). Ovaj rezultat sugerise da interakcija AMPK sa Akt kinazom nije direktna, već se verovatno AMPK-zavisna aktivacija Akt dešava indirektnim mehanizmom.



Slika 21. Primena dn-Akt konstrukta ne utiče na aktivnost AMPK kinaze u tretmanu sa MPP⁺. SH-SY5Y ćelije su transfektovane sa kontrolnim ili dn-Akt plazmidom. Transfektovane ćelije su tretirane MPP⁺ u trajanju od 2h i potom analizirane imunoblot metodom. Inhibicija kinazne aktivnosti Akt-a dovela je do smanjenja nivoa Akt-zavisne fosforilacije PRAS40 proteina (Thr 246), ali nije uticala na promenu nivoa aktivnosti AMPK kinaze i njenog nishodnog supstrata Raptor proteina (A). Vrednosti prikazane u histogramima predstavljaju aritmetičku sredinu ± SD iz 3 nezavisna eksperimenta (B). * p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na Ø, dok # p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu MPP⁺-tretirane ćelije.



Slika 22. AMPK i Akt kinaza nisu u direktnoj fizičkoj vezi. SH-SY5Y ćelije su tretirane MPP+ i po isteku tretmana lizirane. Lizati su analizirani metodom imunoprecipitacije i vizuelizovani imunoblot tehnikom.

4.5. mTORC1-zavisna autofagija smanjuje toksično dejstvo u MPP+ modelu PB

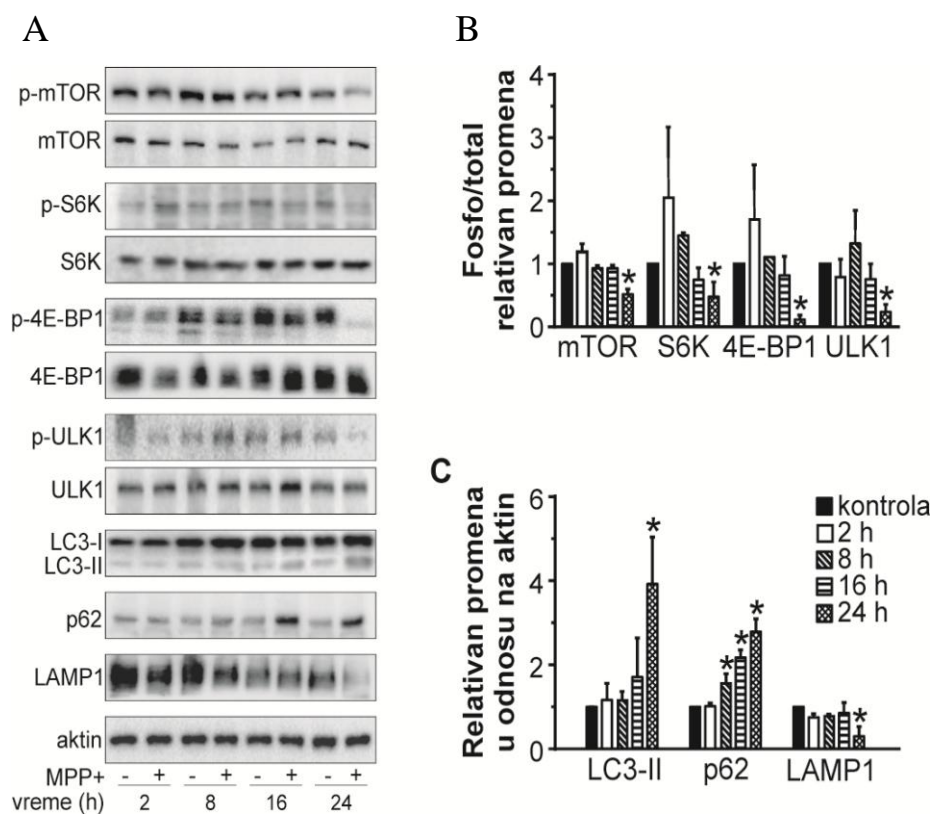
Kako je karakteristika degeneracije dopaminergičkih neurona u PB oštećenje mitohondrija i nakupljanje proteinskih agregata, ne čudi da se sve veći broj studija, poslednjih godina bavi ispitivanjem značaja autofagije u patogenezi PB (130,230–232).

4.5.1. MPP+ izaziva mTORC1-zavisnu autofagiju u SH-SY5Y ćelijama

U prethodno dobijenim rezultatima pokazali smo da u MPP+ modelu dolazi do rane aktivacije AMPK, ali i Akt kinaze. Poznato je da obe kinaze utiču na mTORC1 signalni put. Naime, pokazano je da, u uslovima energetske stresa, dolazi do AMPK-zavisne inhibicije mTORC1. Tako aktivirana AMPK, tada fosforiliše TSC2 na Ser 1387, koji dalje preko RHEB (engl. *Ras homolog enriched in brain*) proteina inhibira aktivaciju mTORC1 (233). Suprotno delovanju AMPK, Akt kinaza direktnom fosforilacijom Thr 1462 na TSC2, poništava inhibitory efekat na RHEB i dovodi do aktivacije mTORC1 (179). Imajući ove činjenice u vidu, zanimalo nas je da utvrdimo

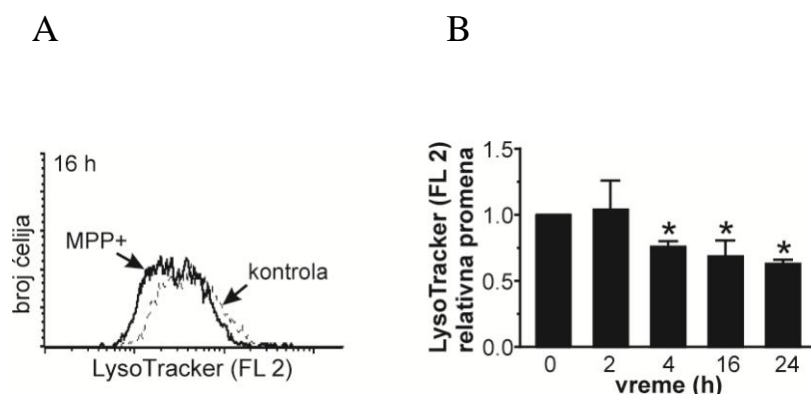
stepen aktivacije mTORC1 kinaze u MPP+ modelu. Čelije humanog neuroblastoma su tretirane 2 mM MPP+ u trajanju 2 do 24 h i lizirane po isteku tretmana (Slika 23.). Imunoblot analizom, utvrdili smo da, za razliku od brzih promena u stepenu aktivnosti AMPK i Akt, do pada u nivou fosforilacije mTORC1 dolazi tek nakon 24 h. U skladu sa ovom inhibicijom zabeležen je i pad aktivnosti supstrata mTORC1, p70S6K i 4E-BP1, takođe tek nakon 24 h (Slika 23.).

Pored uloge u koordinaciji sinteze proteina i kontroli ćelijskog rasta, mTORC1 je glavni inhibitor autofagije. Tako, u fiziološkim uslovima mTORC1 inhibira ULK1, fosforilacijom na Ser 757 i onemogućava započinjanje procesa autofagije. Imunoblot analizom pokazali smo da MPP+, nakon 24 h, dovodi do pada fosforilacije ULK1 na poziciji Ser 757, da indukuje konverziju proteina LC3-I u LC3-II, što je karakteristika autofagije, ali i da dovodi do kontinuiranog nakupljanja p62 i pada u nivou lizozomalnog proteina LAMP-1 (Slika 23.).



Slika 23. MPP⁺ indukuje mTORC1-zavisnu autofagiju u SH-SY5Y ćelijama. Prikazani su reprezentivni imunoblotovi (A). Vrednosti u histogramima odgovaraju vrednostima dobijenim denzitometrijskom analizom nivoa fosforilacije mTORC1, S6k, 4E-BP1 i ULK1 proteina (B), kao i vrednostima dobijenim denzitometrijskom analizom nivoa LC3-II, p62 i LAMP1 proteina (C). Vrednosti prikazane u histogramima predstavljaju prosečnu vrednost \pm SD iz tri nezavisna eksperimenta (B). * $p < 0.05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (\emptyset).

Sledeće što smo želeli da ispitamo, jeste nivo zastupljenosti kiselih, unutarćelijskih vezikula (koje odgovaraju lizozomima i autofagolizozomima) u različitim vremenskim intervalima nakon tretmana MPP⁺, primenom pH senzitivne boje LysoTracker Red DND-99. Analiza SH-SY5Y ćelija protočnom citofluorimetrijom, pokazala je da dolazi do pada u nivou crvene fluorescence nakon 2 h, odnosno do smanjenja broja lizozoma u ostalim ispitivanim vremenima, u odnosu na netretirane ćelije (Slika 24.).



Slika 24. MPP+ dovodi do smanjenja broja lizozoma u ćelijama humanog neuroblastoma. Ćelije su tretirane 2 mM MPP+ u vremenskim intervalima naznačenim u histogramu (B). Po isteku tretmana, ćelije su obojene fluorohromom LysoTracker Red DND-99, koji specifično boji kisele vezikule i analizirane na protočnom citofluorimetru. Prikazan je reprezentativni histogram dobijen iz 3 nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu.

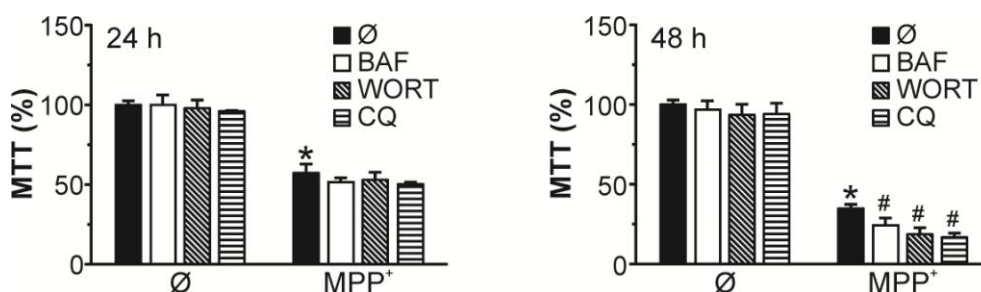
Dakle, možemo da zaključimo da MPP+ dovodi do indukcije autofagije koja je delimično inhibirana smanjenjem broja lizozoma i sledstvenim padom proteolize u SH-SY5Y ćelijama.

4.5.2. MPP+ indukuje kasnu, citoprotektivnu autofagiju u SH-SY5Y ćelijama humanog neuroblastoma

Pored klasične uloge autofagije u održavanju energetske i proteinske homeostaze u ćelijama, ona može biti i alternativni put programirane ćelijske smrti tipa II ukoliko je oštećenje ćelije preveliko ili ukoliko je autofagija nepravilno ili preterano aktivirana (126,128,234).

U cilju ispitivanja uloge autofagije u MPP+ toksičnom modelu PB, SH-SY5Y ćelije su tretirane farmakološkim inhibitorima autofagije. Za potrebe ovog eksperimenta koristili smo wortmanin (W), inhibitor rane faze autofagije, koji svoje dejstvo ostvaruje inhibicijom klase III PI3K i na taj način sprečava formiranje autofagozoma; i dva inhibitora kasne faze autofagije, koji sprečavaju fuziju autofagozoma i lizozoma,

bafilomicin (BAF) i hlorokin (CQ) (235–237). Istovremena primena MPP⁺ i nekog od ovih inhibitora nije dovela do promena u vijabilnosti ćelija nakon 24 h u odnosu na tretman samo MPP⁺. Međutim, kako je imunoblot analiza pokazala da dolazi do kasne inhibicije mTORC1 i porasta LC3-II, odnosno da MPP⁺ indukuje kasnu autofagiju, tek nakon 24 h, analizirali smo vijabilitet SH-SY5Y ćelija i nakon 48 h. Rezultati MTT testa pokazali su da i rani i kasni inhibitori autofagije pojačavaju citotoksično dejstvo MPP⁺ na SH-SY5Y ćelije nakon 48 h (Slika 25.). Dakle, prikazani rezultati zajedno ukazuju na to da MPP⁺ indukuje kasnu, mTORC1-zavisnu autofagiju, koja je delimično blokirana na lizozomalnom nivou, usled smanjenja broja lizozoma, i da ova indukcija kasne autofagije ima citoprotektivnu ulogu.



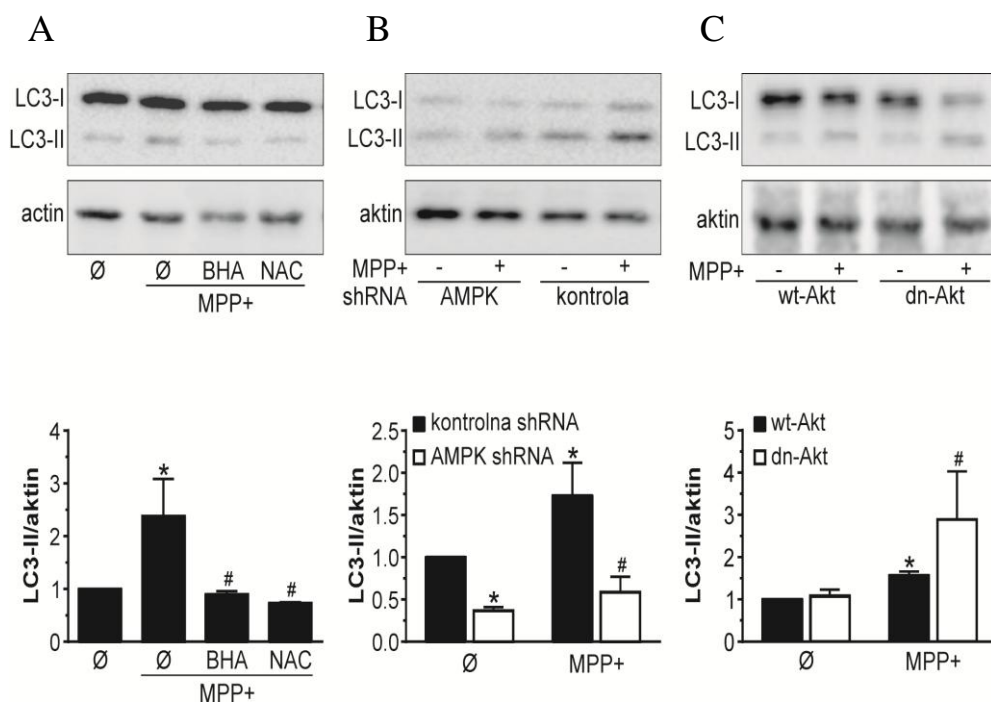
Slika 25. MPP⁺ pokreće citoprotektivnu autofagiju u SH-SY5Y ćelijama. SH-SY5Y ćelije su tretirane 24 i 48 h 2 mM MPP⁺ u prisustvu ili odsustvu inhibitora autofagije, bafilomicina A1 (BAF, 10 nM), vortmanina (200 nM) ili hlorokina (20 μM). Vijabilitet je određen MTT testom po isteku tretmana, a prezentovani rezultati predstavljaju aritmetičku sredinu ± SD iz tri različita eksperimenta. * p < 0,05 u odnosu na Ø, # p < 0,05 u odnosu na MPP⁺ tretman.

4.6. Mehanizam autofagije indukovane MPP⁺ posredovan je porastom oksidativnog stresa i aktivacijom AMPK signalnog puta

Pošto smo pokazali da MPP⁺ izaziva oksidativni stres i aktivaciju AMPK i Akt kinaza, dalje je ispitivano koja je njihova uloga u MPP⁺-indukovanoj autofagiji. U tu svrhu, SH-SY5Y ćelije su tretirane najpre sa antioksidansima NAC i BHA, nakon čega je određivan nivo konverzije LC3-I u LC3-II. U uzorcima ćelija koje su pretretirane antioksidansima zabeležen je pad nivoa LC3-II, više od 60% u odnosu na MPP⁺ tretirane ćelije (Slika 26.). Sličan rezultat je dobijen i u eksperimentu sa genskim utišavanjem *AMPK*, primenom male ukosničaste RNK. *AMPK* shRNK u tretmanu sa

MPP+ je dovela do smanjenja LC3-II u poređenju sa kontrolno transfektovanim ćelijama (Slika 26.). Nasuprot ovim rezultatima, transfekcija SH-SY5Y ćelija sa *dnAkt* plazmidom, indukovala je porast nivoa LC3-II u tretmanu sa MPP+ u poređenju sa kontrolno transfektovanim ćelijama (Slika 26.). Shodno tome, ovi rezultati ukazuju da ekspresija *dnAkt* doprinosi indukciji autofagije u ovom modelu.

Dakle, može se izvesti sledeći zaključak da MPP+-indukovan oksidativni stres i aktivacija AMPK stimulišu citoprotektivnu autofagiju u SH-SY5Y ćelijama, dok istovremena aktivacija Akt signalnog puta u MPP+ modelu, dovodi do supresije autofagije, inhibicijom oksidativnog stresa.



Slika 26. MPP⁺ indukuje citoprotektivnu autofagiju mehanizmom zavisnim od oksidativnog stresa i aktivacije AMPK u SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma. SH-SY5Y ćelije su tretirane 2 mM MPP⁺. Po isteku tretmana od 24 h, analizirana je konverzija LC3-I u LC3-II u vremenskim intervalima naznačenim u histogramu (B). SH-SY5Y ćelije su inkubirane sa antioksidansima butiliranim hidroksianizolom (BHA; 100 μM) ili N-acetilcisteinom (NAC; 2 mM) (A), transfektovane sa kontrolnom i AMPK shRNK (B), sa wt-Akt (kontrola) ili dn-Akt (C) i potom tretirane 2 mM MPP⁺ u trajanju od 24 h. Po isteku tretmana analizirana je relativna promena LC3-II proteina u odnosu na količinu aktina u odgovarajućem uzorku i u odnosu na netretirane ćelije (Ø) gde je nivo proteina arbitrarno postavljen na 1. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi, dobijeni iz 3 nezavisna eksperimenta. Vrednosti prikazane u histogramima predstavljaju aritmetičku sredinu ± SD iz 3 nezavisna eksperimenta (B). * p < 0.05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (Ø).

5. DISKUSIJA

U ovoj disertaciji je ispitivan odnos AMPK i Akt signalnog puta, oksidativnog stresa i autofagije u *in vitro* modelu PB izazvane MPP+ toksinom. Dobijeni rezultati su po prvi put pokazali da oksidativni stres indukovani MPP+ dovodi do aktivacije AMPK, koja dalje sa jedne strane indukuje aktivaciju Akt kinaze, koja ima važnu ulogu u preživljavanju i inhibiciji oksidativnog stresa, dok sa druge strane pokreće autofagiju zavisnu od mTORC1, koja ima citoprotektivni efekat. Pored toga, u ovoj studiji je pokazano i da aktivacija Akt kinaze može, u izvesnoj meri, da ima nepovoljan uticaj na aktivaciju AMPK i njen citoprotektivni efekat, i to inhibicijom autofagije.

Podaci dobijeni iz različitih epidemioloških studija ukazuju da i incidencija i prevalencija PB povećavaju sa godinama starosti populacije koja se ispituje, tako da se može reći da je starost najznačajniji faktor rizika za PB (2). Imajući u vidu činjenicu da je u poslednjih nekoliko decenija došlo do produžavanja prosečnog životnog veka, očekuje se da bi broj obolelih do 2040. mogao povećati na više od 17 miliona (238). Uzimajući u obzir dugu premotornu fazu bolesti, nedovoljno razjašnjenu etiologiju bolesti, kao i to da je trenutno jedina dostupna terapija simptomatska, fokus istraživanja u poslednje tri decenije je bio usmeren na otkrivanje molekularnih mehanizama koji se nalaze u osnovi degeneracije DA neurona u PB (193). Dosadašnja saznanja ukazuju da bi oksidativni stres, oštećenje mitohondrija i ćelijskih sistema za održavanje homeostaze proteina i/ili organela, mogli biti odgovorni za degeneraciju i smrt DA neurona u SN (44,73,79). Ustanovljeno je da se DA neuroni nalaze u stanju konstantnog oksidativnog stresa, zbog samog metabolizma DA (239–241), relativnog manjka enzima antioksidativne zaštite (169), visokog sadržaja jona gvožđa (54–56,59,242) i prisustva neuromelanina (61,62,243–245). Pored toga, histopatološkom analizom tkiva mozga obolelih od PB, pokazano je da u SN, dolazi do nakupljanja proteinskih agregata u vidu LT. Danas znamo da je α SYN kvantitativno najzastupljeniji protein LT (9), ali su pored ovog proteina u LT prisutni i ubikvitin, α -tubulin, neurofilamenti, proteini toplotnog stresa i mnogi drugi. Utvrđeno je da do nakupljanja proteina može doći ili usled produkcije mutiranih formi proteina, povećane produkcije wt forme proteina ili usled disfunkcije autofagno-lizozomskog sistema razgradnje (87–92).

Jedno od značajnijih otkrića u rasvetljavanju molekularnih mehanizama degeneracije DA neurona, bilo je slučajno otkriće MPP⁺ (32,33). Naime, nakon slučajnog otkrića da MPTP dovodi do fudroajantne pojave kliničke slike parkinsonizma, mnoga istraživanja ćelijskim i animalnim modelima su pokušala da objasne mehanizme neurodegeneracije dopaminergičkih neurona usled delovanja ovog toksina. Pokazano je da se MPTP u astrocitima, delovanjem enzima MAO B, prevodi iz forme protoksina, uz pomoć, u aktivni oblik MPP⁺ (202), koji preko DAT ulazi u neurone (208) i inhibira kompleks I LPE mitohondrija (205). Ovakav rezultat, kao i otkriće monogeniski mutacija kod pacijenata sa familijarnim oblikom bolesti, poput mutacija u genima *SNCA*, *CHCHD2* (engl. *Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 2*), *PARKIN*, *PINK1*, *LRRK2*, *DJ-1* i *ATP132*, kod koji je pokazana direktna veza između genske mutacije i poremećene mitohondrijalne dinamike, biogeneze, mitofagije, regulacije unutarćelijskih nivoa jona Ca²⁺ i disfunkcije LPE, podstaklo je istraživače da ispituju ulogu mitohondrija u etiopatogenezi PB (76). Tako je obdukcijom analizom tkiva mozga obolelih od PB, ustanovljeno da postoji pad u aktivnosti kompleksa I (246–250). U prilog ovim rezultatima išli su i rezultati dobijeni u drugim studijama. U studiji u kojoj je analizirano mišićno tkivo obolelih od PB, primenom magnetno-rezonantne spektroskopije, pokazano je da postoji značajno smanjenje odnosa neorganskih fosfata i fosfokreatina, odnosno da kod pacijenata postoji opšta mitohondrijalna disfunkcija (251). U drugim studijama je analizirana koncentracija CoQ₁₀, akceptora elektrona iz kompleksa I i II u LPE i pokazano je da kod obolelih od PB dolazi do smanjenja koncentracije CoQ₁₀ (252). Rezultati ovih vrlo metodološki heterogenih studija zajedno ukazuju da u PB postoji poremećaj u funkciji mitohondrija.

Za ispitivanje efekta MPP⁺ na preživljavanje ćelija humanog neuroblastoma korišćen je MTT test. U našoj studiji je zabeležen dozno i vremenski-zavisni pad vijabiliteta koji je bio u skladu sa rezultatima dobijenim u prethodno sprovedenim studijama ispitivanja toksičnosti MPP⁺ na SH-SY5Y neuronskoj ćelijskoj liniji (253,254). Takođe, ovaj rezultat je korelirao sa nalazima studija u kojima su korišćeni i drugi neurotoksini koji se koriste kao model u ispitivanju molekularnih mehanizama neurodegeneracije u PB, poput 6-OHDA, rotenona ili parakvata (113,255,256).

Apoptoza je jedan od modaliteta ćelijske smrti, a kako je reč o programiranoj ćelijskoj smrti, tokom apoptoze, ćelije prolaze specifične morfološke promene (112).

Iako modalitet i tip ćelijske smrti nije bio predmet bližeg istraživanja u ovoj disertaciji, primenom fazno-kontrasne mikroskopije, nakon delovanja MPP+ uočene su citomorfološke promene koje ukazuju na prisustvo apoptoze SH-SY5Y ćelija: gubitak poligonalnog oblika, vakuolizacija, smanjenje veličine ćelija i gubitak adherentnih svojstava. Ovakav nalaz je bio u skladu sa podacima iz literature različitih *in vivo* i *in vitro* studija (257–261). Tako su Sheehan i saradnici primenom transmisione elektronske mikroskopije, analizirali ultrastrukturne promene do kojih MPP+ dovodi na ćelijskom nivou. Oni su pokazali da nakon tretmana, dolazi do gubitka neurita SH-SY5Y ćelija i one gube karakteristični poligonalni oblik, volumena citoplazme se smanjunje, a uočavaju se i promene ćelijskog jedra po tipu piknoze i kariorekse, uz izraženu vakuolizaciju, disperziju ribozoma, Goldžijevog kompleksa, mikrotubula i glatkog endoplazminog retikuluma (260). Sve ove morfološke promene ukazuju da tretman MPP+om dovodi do pojave apoptoze u SH-SY5Y ćelijama. Ovaj rezultat je bio u skladu i sa rezultatima drugih eksperimentalnih studija na SH-SY5Y ćelijskoj liniji humanog neuroblastoma u kojima su za indukciju oštećenja neurona korišćeni 6-OHDA, rotenon i parakvat (255,256,262). Pored citomorfoloških promena koje odgovaraju apoptozi, u eksperimentima sa 6-OHDA i MPP+ na SH-SY5Y i PC12 ćelijskoj liniji pokazano je da dolazi do indukcije aktivnosti kaspaza 3 i 9 (254,262–264), dok je na PC12 ćelijskoj liniji pokazano je i da dolazi do porasta u nivou p53 proteina (110). U prilog ovakvim tvrdnjama, da je apoptoza dominantan mehanizam ćelijskog umiranja u ovim *in vitro* toksičnim modelima PB, išao je i rezultat da se primenom kaspaznih inhibitora *in vitro* sprečava citotoksično dejstvo 6-OHDA (108).

Neurotoksični animalni modeli PB su takođe pokazali da apoptoza igra značajnu ulogu u oštećenju dopaminergičkih neurona (265–269). Tako je pokazano da unilateralna injekcija 6-OHDA u strijatum dovodi do apoptotske smrti DA neurona u SN miševa (266,270,271). U eksperimentalnom modelu PB izazvanom MPTP kod miševa, pokazano je da dolazi do selektivne degeneracije DA neurona u SN, kao i do fragmentacije DNK (268). Sa druge strane, pokazano je da su miševi sa Bax-/- mutacijom otporniji na toksično dejstvo MPTP (267).

U prilog dobijenim rezultatima i hipotezi da apoptoza ima značajnu ulogu u propadanju DA neurona u PB, išli su rezultati dobijeni *post-mortem* patohistološkom analizom tkiva mozga obolelih od PB. Mochizuki i saradnici su 1996. godine pokazali

prisustvo apoptotičnih neurona u SN pacijenata obolelih od PB (272). Do sličnih podataka su došli i Anglade, Tompkins i Tatton sa svojim saradnicima (231,273,274). Takođe, *post-mortem* analizom uzoraka tkiva mozga pacijenata obolelih od PB, imunohistohemijskom analizom neurona SN pokazana je veća zastupljenost aktivnih oblika apoptotskih efektorskih proteina, kaspaze 3, 8 i 9, kao i Bax proapoptotskog proteina u odnosu na kontrole (109,275,276).

Imajući u vidu navedene podatke iz literature, kao i citomorfološku analizu ćelija koja je govorila u prilog apoptoze, urađena je citometrijska analiza faza ćelijskog ciklusa nakon bojenja ćelija propidijum jodidom u cilju detekcije fragmentacije DNK, jednog od poslednjih molekularnih događaja tokom apoptoze. Pokazano je da MPP+ dovodi do fragmentacije DNK nakon 24 h tretmana, što je bilo u skladu sa rezultatima ranijih studija (277,278). Itano i saradnici su pokazali da MPP+, ne samo da dovodi do fragmentacije DNK, već i da se radi o kontrolisanom tipu fragmentacije, odnosno da fragmenti odgovaraju nukleozomalnoj DNK (277).

Hipoteza da oksidativni stres i poremećena funkcija mitohondrija, mogu biti deo patogeneze koja prethodi degeneraciji DA neurona u PB, postala je aktuelna nakon otkrića MPTP. Najpre je utvrđeno da MPP+ indukuje oksidativni stres u DA neuronima inhibicijom mitohondrijalnog kompleksa I LPE (202,205,207), dok su Fall i saradnici pokazali da apoptozi, koja je indukovana sa MPP+ toksinom, prethodi oksidativni stres (258). Kasnije studije su pokazale da pored inhibicije kompleksa I, MPP+ indukuje oksidativni stres i aktivacijom NADH oksidaze, Cyt 450 reduktaze, ksantin oksidaze, aldehid dehidrogenaze i lipoamid dehidrogenaze (279–281). Rezultati dobijeni u našoj studiji su bili saglasni sa podacima iz literature o povećanoj produkciji superoksidnog anjona, što je jedna od karakteristika oksidativnog stresa (282). Naime, u našoj studiji je uočen porast produkcije superoksidnog anjona, čija je maksimalna vrednost bila nakon 2 h tretmana i prethodila je padu potencijala unutrašnje membrane mitohondrija, što bi moglo da bude posledica snižene aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, povećane koncentracije jona gvožđa i prisustva neuromelanina. Iako sam DA nije toksičan, pri fiziološkom pH može doći do njegove autooksidacije do 6-OHDA i aminohroma, koji je prekursor za nastanak neuromelanina. Pored toga, dva enzima koja imaju značajnu funkciju u katabolizmu DA, MAO B i TH, svojom aktivnošću dovode do nastanka H₂O₂, kao jednog od nusproizvoda reakcije, koji usled niske aktivnosti enzima

antioksidativne zaštite, ali i prisustva jona gvožđa u SN, dalje može da uđe u Fentonovu reakciju, dajući vrlo toksične ROS, poput hidroksilnog radikala (OH[•]) (53,60).

U literaturi se mogu naći podaci koji govore da bi disfunkcija mitohondrija mogla biti posledica, ali i uzrok oksidativnog stresa (283). Upravo iz tog razloga, ispitivan je hronološki redosled događaja u MPP⁺ modelu. Analizirajući rezultate protočne citofluorimetrije uočili smo da u našem modelu najpre dolazi do povećane produkcije superoksidnog anjona (2 h), što je jedna od karakteristika oksidativnog stresa, dok smo pad potencijala unutrašnje membrane mitohondrija detektovali tek nakon 8 h. U ovoj disertaciji je pokazano da oksidativni stres indukovano MPP⁺ toksinom prethodi padu potencijala unutrašnje membrane mitohondrija, što je bilo u skladu sa rezultatima drugih studijama (205,257,279,284–289). Naime, u više različitih studija pokazano je da depolarizacija unutrašnje mitohondrijalne membrane indukovana MPP⁺ toksinom je zapravo rezultat udruženog dejstva ROS i direktne inhibicije NADH dehidrogenaze, tokom koje dolazi do permeabilizacije spoljne membrane mitohondrija, odnosno do otvaranja mitohondrijalne tranzicione pore (290,291) i do oslobađanja proapoptotskih proteina poput Cyt C, faktora indukcije apoptoze (AIF) i SMAC/DIABLO kompleksa u citoplazmu (261,290–293).

Poznato je da Bcl2 familija proteina može odrediti sudbinu ćelija tako što reguliše permeabilnost mitohondrijalne membrane i kontroliše oslobađanje Cyt C iz međumembranskog prostora (291,294,295). Tako oslobođen Cyt C učestvuje u formiranju apoptozoma i aktivaciji Cas 9 i 3 (296).

Slično je pokazano i u drugim studijama, gde su oštećenja DA neurona indukovana rotenonom i 6-OHDA. Naime, nekoliko istraživačkih grupa je biohemijskom analizom potvrdilo hipotezu da su oksidativni stres i disfunkcija mitohondrija neki od mogućih procesa koji prethode degeneraciji i umiranju neurona u SN (297–299), dok je patohistološka analiza tkiva mozga obolelih od PB nakon obdukcije potvrdila da postoji smanjena aktivnost kompleksa I mitohondrija u SN (199,246,247), ali i u drugim ćelijama, poput mišićnih, limfocita i trombocita (300–304). Kasnije, otkrićem monogenских mutacija, utvrđeno je da neki od gena koji se dovode u vezu sa familijarnom formom PB, kodiraju proteine koji svoju funkciju obavljaju u ili na mitohondrijama. Tako su mutacije u genima za *Parkin*, *PINK1* i *DJ-1*, povezane sa poremećajima procesa mitofagije mitofuzije i mitofisije (148,150,305–

308), dok se prekomerna sinteza α SYN, kako mutirane, tako i ishodne *wt* forme proteina, dovodi u vezu sa povećanom fragmentacijom mitohondrija i poremećajem mitofagije (309).

Pored toga, u uzorcima tkiva mozga obolelih od PB primećene su posledice oksidativnog stresa, u vidu oksidativnih oštećenja lipida, proteina i DNK (42–44,46–51,310), kao i snižen nivo glutaciona u SN (169,311).

Budući da je citotoksični efekat MPP⁺ bio udružen sa snažnom indukcijom oksidativnog stresa, usled koje dolazi do depolarizacije unutrašnje mitohondrijalne membrane i sledstvene ćelijske smrti, postavljena je hipoteza da bi primena antioksidanasa mogla imati neuroprotektivno dejstvo u zaštiti DA neurona od štetnog delovanja slobodnih radikala (312,313). Pojedine *in vitro* studije su pokazale da antioksidansi poput NAC, vitamina C i E, CoQ₁₀ i katalaze, štite neurone od MPP⁺-indukovanog oksidativnog stresa i ćelijske smrti (314). Pored toga u toku su studije sa velikim brojem ispitanika u kojima se ispituje eventualno neuroprotektivno svojstvo CoQ₁₀ u cilju usporavanja progresije PB (315). U našoj studiji, pokazano je da je primena BHA i NAC imala citoprotektivan efekat u kulturi SH-SY5Y ćelija tretiranih MPP⁺, međutim, korišćene doze antioksidanasa nisu u potpunosti mogle da spreče citotoksično dejstvo MPP⁺.

Mitohondrije su izuzetno značajne, posebno za ćelije sa velikim energetske potreba, kao što su neuroni, jer se u mitohondrijama odvija proces oksidativne fosforilacije, tokom kog se u ćelijama sintetise najveći deo njihovog ATP-a. U slučaju oštećenja mitohondrija, smanjuje se njihov kapacitet za sintezu ATP (316). Tako je na različitim neuronskim ćelijskim linijama pokazano da primena MPP⁺ dovodi do brzog pogoršanja metaboličkog stanja ćelija, indukujući vremenski i dozno-zavisni pad koncentracije ATP usled čega može doći do aktivacije AMPK (312,313,317).

Oksidativni stres pored toga što dovodi do oštećenja mitohondrija, koje može biti praćeno degeneracijom i indukcijom smrti DA neurona, utiče i na aktivnost velikog broja signalnih puteva uključenih u proces antioksidativne zaštite, održavanje energetske homeostaze i otklanjanja oštećenih proteina i organela, u cilju poboljšanja ćelijskog vijabiliteta.

AMPK predstavlja glavni, evolutivno konzervirani regulator energetskog balansa u ćeliji. Ova protein kinaza je aktivna u svim fazama razvića neurona (318) i

uključena je energetska regulaciju ne samo na nivou ćelije, već na nivou celog organizma, jer integriše nutritivne i hormonske signale iz perifernih tkiva i hipotalamusa, odnosno posreduje u odgovoru ćelije na adipokine (leptin, adiponektin), nivo glukoze i učestvuje u održavanju lipidne homeostaze (319). Sa druge strane, poznato je da do aktivacije AMPK može doći pri različitim vrstama ćelijskog stresa, poput hipoksije, nedostatka glukoze i oksidativnog stresa, dakle u procesima u kojima raste odnos AMP/ATP (319). Pored uloge koju ima u integraciji velikog broja signala, (aktivira se u uslovima metaboličkog stresa, porasta nivoa unutarćelijske koncentracije jona Ca^{2+} itd.) AMPK utiče i na mnogobrojne signalne i metaboličke puteve, kao i na ekspresiju različitih gena, u cilju održavanja energetske homeostaze unutar ćelija.

Kao što je već pomenuto, AMPK mogu da aktiviraju barem tri ushodne kinaze, LKB1 usled porasta odnosa AMP/ATP, CaMKK β čija je aktivnost indukovana porastom koncentracije jona Ca^{2+} u ćeliji i dejstvom TAK1 kinaze koja se aktivira u uslovima oksidativnog stresa i/ili inflamacije (164). Pored toga, AMPK može biti alostročki aktivirana porastom koncentracije AMP, do kog može doći tokom energetske stresa, ali i povećanom produkcijom ROS u uslovima hipoksije, čak i u uslovima kada je odnos AMP i ATP u ćeliji očuvan (320). Takođe, pokazano je da AMPK može imati inhibitorno dejstvo na produkciju ROS u ćeliji, i to pre svega aktivacijom transkripcionih faktora FOXO3, PGC1 α i NRF2. Na taj način se obezbeđuje dugoročna transkripciona regulacija enzima antioksidativne zaštite, poput glutation peroksidaze, katalaze i superoksid dismutaze (190,321,322). Kako se za oštećenje DA neurona u PB često vezuje disfunkcija mitohondrija i oksidativni stres, postavili smo hipotezu da bi aktivacija signalnog puta AMPK mogla imati citoprotektivni efekat, pre svega inhibicijom produkcije ROS i podizanjem kapaciteta ćelijske antioksidativne zaštite, na taj način, smanjujući oksidativni stres u DA neuronima i drugim vulnerabilnim neuronskim ćelijama (323).

Imajući sve to u vidu, mehanizam oštećenja neurona delovanjem MPP+ koji se ogleda u inhibiciji kompleksa I, oštećenju mitohondrija i porastu oksidativnog stresa, bi se mogao dovesti u vezu sa promenama u aktivaciji AMPK signalnog puta. U našoj studiji smo pokazali da primena MPP+ dovodi do aktivacije AMPK signalnog puta, što je bilo u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima (164,324–326).

Pored AMPK, i Akt kinaza ima vrlo značajnu ulogu u adekvatnom odgovoru na neurotrofičke i faktore rasta (327–332). Do danas je otkriveno najmanje 50 proteina koji mogu biti supstrati za Akt kinazu. Na taj način Akt signalni put utiče na veliki broj ćelijskih procesa poput preživljavanja, diferencijacije, proliferacije, migracije i metabolizma (185). Ries i saradnici su u *in vivo* studiji pokazali da Akt ima važnu ulogu u postnatalnom razvoju DA neurona SN (184), kao i da može da utiče na rast neurita (333–335), ali i na rast i grananje aksona (336,337), dok je u drugim studijama pokazano da disfunkcija Akt signalnog puta često dovodi u vezu sa starenjem i različitim patološkim stanjima, poput neurodegeneracije (184,336–338).

Pored navedenih efekata na rast, proliferaciju i regeneraciju, brojne studije su pokazale da Akt ima inhibitorno dejstvo na kaspazu 9 i oslobađanje Cyt C iz mitohondrija (339). Takođe, u različitim modelima PB je pokazano da Akt signalni put ima važnu ulogu u oštećenju DA neurona i patogenezi bolesti. Tako su Aleyasin i saradnici pokazali da povećana aktivnost Akt kinaze štiti neurone SN od štetnog delovanja MPTP (188). Pored toga, pokazano je da PINK1 preko Rictor/mTORC2 signalnog puta stimuliše aktivaciju Akt signalnog puta, fosforilacijom na poziciji Ser473, dok je patohistološka analiza uzoraka tkiva mozga obolelih od PB nakon obdukcije, pokazala snižen nivo fosforilacije Akt-a na nivou Ser473 i Thr308 (186,187). Rezultati dobijeni u našoj studiji su pokazali da oksidativni stres indukovani MPP+ dovodi do aktivacije Akt kinaze, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u drugim studijama (340,341). Osim toga, u ovoj studiji je prvi put pokazano da je aktivacija AMPK indukovana sa MPP+ delimično odgovorna i za aktivaciju Akt signalnog puta. AMPK-zavisna aktivacija Akt je zabeležena i u nekoliko drugih studija, na leukemijskim i neuronskim ćelijama u odgovoru na AICAR, farmakološki aktivator AMPK, zatim tokom diferencijacije mezenhimskih stem ćelija u osteoblaste, u odgovoru endotelskih ćelija na faktore rasta, kao i u aktivaciji makrofaga indukovanoj bakterijskim lipopolisaharidom (342–348).

Iako u literaturi postoje podaci da Akt može imati inhibitorno dejstvo na AMPK, tako što je fosforiliše na Ser 485/491 (343), u našoj studiji to nije bio slučaj. U našem modelu smo pokazali da je veza između AMPK i Akt jednosmerna, odnosno da AMPK može da indukuje aktivaciju Akt, ali da Akt kinaza nema uticaja na AMPK aktivnost. Do tog saznanja smo došli farmakološkom i genskom inhibicijom AMPK,

odnosno Akt kinaze. Naime, u našem modelu smo pokazali da farmakološka inhibicija Akt kinaze nije imala uticaja na aktivaciju AMPK signalnog puta indukovanu MPP+. Pored toga pokazali smo da ne dolazi do ko-imunoprecipitacije AMPK i Akt, nema direktne interakcije ova dva enzima, odnosno da do AMPK-zavisne aktivacije Akt kinaze dolazi indirektno, za sada još nepoznatim mehanizmom.

Istovremena aktivacija AMPK i Akt kinaze, prema podacima iz literature bi se mogla objasniti barem na dva načina. Jedno od mogućih objašnjenja jeste da AMPK inhibira mTORC1 i da na taj način favorizuje stvaranje mTORC2 u ćeliji, što za posledicu može imati aktivaciju Akt kinaze zavisnu od kompleksa mTORC2, fosforilacijom Akt u položaju Ser473 (347). Međutim, u našem modelu to najverovatnije nije slučaj, zato što do inhibicije aktivnosti mTORC1 dolazi značajno kasnije, tek posle 16h, dok se AMPK i Akt kinaze aktiviraju već nakon 2 h tretmana sa MPP+. Dakle, u našem modelu MPP+ ne dovodi do istovremene aktivacije AMPK/Akt signalnog puta i inhibicije mTORC1. Drugo moguće objašnjenje istovremene aktivacije AMPK i Akt signalnih puteva pružili su Amato i saradnici. Naime, oni su u eksperimentima koristili farmakološki activator AMPK, AICAR i pokazali da dolazi do AMPK-zavisne fosforilacije Akt kinaze i njegove ushodne kinaze PI3K (342).

Farmakološka i genska inhibicija Akt kinaze, u ovoj studiji su ukazale na još jedan bitan podatak, a to je da MPP+/AMPK-zavisna aktivacija Akt kinaze ima ulogu u smanjenju oksidativnog stresa. U prilog ovoj hipotezi idu i rezultati drugih studija. Naime, Song i saradnici su pokazali na modelu ishemije mozga da Akt kinaza posreduje u aktivaciji transkripcionog faktora NF- κ B (engl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), koji može delovati i kao pro- i kao antioksidans (349,350). Tako NF- κ B može da pokrene transkripciju gena čiji su produkti uključeni u mehanizme antioksidativne zaštite poput SOD1 i 2 (superoksid dismutaza 1 i 2), HO-1 (Hem oksigenaza-1), glutation peroksidaze-1 i mnogih drugih (349,350). Pored Akt-zavisne aktivacije NF- κ B, u literaturi se mogu naći i podaci da Akt aktivira i Nrf2, redoks-senzitivni transkripcioni faktor, koji takođe pokreće transkripciju gena enzima antioksidativne zaštite poput NQO1 (engl. *NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1*), GCL (Glutamat cistein ligaza) i HO-1 (351). Među njima se posebno ističe značaj NQO1, koja se aktivira tokom oksidativnog stresa nastalog oksidacijom dopamina (352,353).

Pored toga, u pojedinim studijama je pokazano da je narušena funkcija ovog enzima jedna od biohemijskih karakteristika PB (354,355).

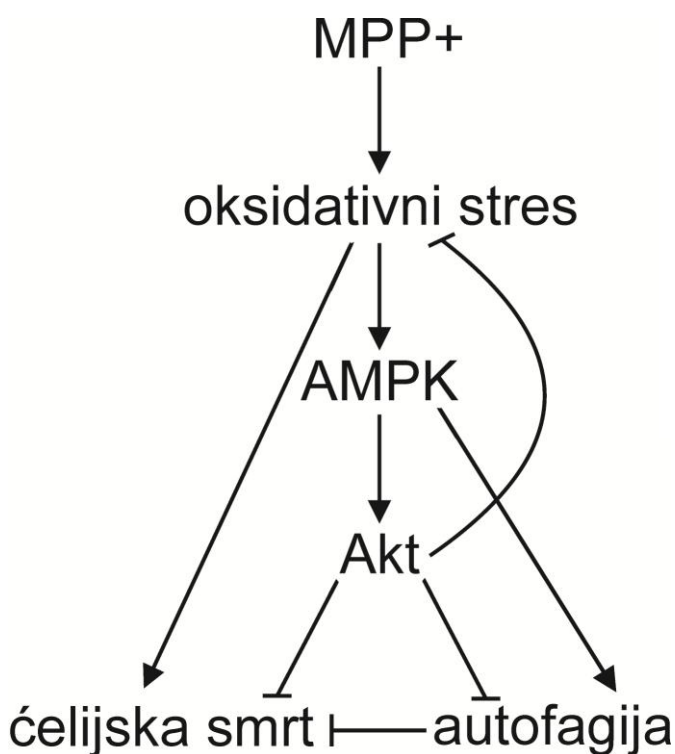
Dosadašnji podaci iz literature ne pružaju jasnu sliku o ulozi aktivacije AMPK u neuronima izloženim stresu. Nakon pola veka ispitivanja etiopatogeneze PB, ispitivanje uloge AMPK u oštećenju DA neurona u PB još uvek nisu dala konzistentne rezultate. Kako je najpre, otkrićem neurotoksina, a potom i monogenjskih mutacija, ustanovljeno da je mitohondrijalna disfunkcija važna karakteristika PB, postalo je jasno da bi AMPK mogla imati značajnu ulogu u patogenezi PB, zbog svoje funkcije u procesima održavanja mitohondrijalne dinamike, odnosno regulacije procesa poput mitofuzije/fisije, mitofagije i biogeneze mitohondrija (74,76,148,150,305,308). Tako ne iznenađuje podatak do kog su došli Reznik i saradnici, koji su pokazali da tokom starenja, koje je najvažniji faktora rizika za razvoj idiopatske PB, dolazi do redukcije aktivnosti AMPK i smanjene biogeneze mitohondrija (356).

Tako je na animalnom modelu PB izazvanom primenom 6-OHDA, pokazano da dolazi do aktivacije AMPK, kao i da se dodatkom AMPK aktivatora, metformina, pospešuje oštećenje DA neurona indukovano 6-OHDA (357). Do sličnih rezultata su došli i Ismaiel i saradnici, koji su takođe na animalnom modelu, primenom MPTP, dodatkom metformina, koji aktivira AMPK povećava stepen oštećenja neurona u SN (358), dok je u modelima prekomerne ekspresije wt α SYN pokazano da hiperaktivacija AMPK ima citotoksični efekat (359,360). Jedno od mogućih objašnjenja ovih studija u kojima je pokazano da AMPK ima negativan efekat na preživljavanje DA neurona u ovim modelima, je da usled prekomerne aktivacije AMPK dolazi do produžene inhibicije mTORC1 i da se na taj način remeti sinteza proteina, integritet i plastičnost sinapsi, što može indukovati smrt DA neurona (175–177).

Nasuprot ovim rezultatima, brojne studije su pokazale da AMPK može imati citoprotektivno dejstvo u modelima PB. Tako su Dulović i saradnici pokazali da farmakološki aktivatori AMPK, AICAR i metformin, štite ćelije humanog neuroblastoma od citotoksičnog dejstva prekomerne produkcije wt forme α SYN (214). Pored toga u *in vivo* studiji sa MPTP, pokazano je da metformin aktivacijom AMPK štiti DA neurone miša, dok je u *in vitro* studiji sa MPP+ pokazano da metformin pokreće AMPK-zavisnu citoprotektivnu autofagiju i otklanjanje disfunkcionalnih mitohondrija u SH-SY5Y ćelijama humanog neuroblastoma (326,361). Slično tome

Choi i saradnici su pokazali da Comp C, farmakološki inhibitor AMPK, pospešuje citotoksično dejstvo MPP+, dok povećana ekspresija AMPK povećava vijabilnost SH-SY5Y ćelija tretiranih MPP+ (324).

Rezultati naše studije ukazuju da aktivacija AMPK u našem modelu ima neuroprotektivni karakter, odnosno da štiti ćelije od neurotoksičnog dejstva MPP+. Ovakva uloga AMPK u našem modelu bi se mogla barem delimično objasniti AMPK-zavisnom aktivacijom Akt signalnog puta i supersijom oksidativnog stresa (Slika 27.).



Slika 27. Pretpostavljena uloga AMPK signalnog puta u MPP+ modelu PB. MPP+ dovodi do oksidativnim stresom-posredovane aktivacije AMPK, antioksidativne AMPK-zavisne aktivacije Akt kinaze i indukuje AMPK/mTORC1-zavisnu, citoprotektivnu autofagiju, koja je delimično inhibirana aktivacijom Akt signalnog puta i smanjenjem broja lizozoma.

Kao što je ranije pomenuto u uslovima energetskeg stresa dolazi do aktivacije AMPK, koja za posledicu ima inhibiciju anaboličkih i stimulaciju kataboličkih procesa, u cilju regulisanja energetske homeostaze (362). U skladu sa tim, pokazano je da AMPK dovodi do inhibicije mTOR signalnog puta, kao i da kontroliše druge signalne puteve bitne za preživljavanje ćelije u uslovima metaboličkog stresa (134,178,363).

Kao i u slučaju AMPK, do danas nije postignut konsenzus među istraživačima ni o ulozi mTORC1 signalnog puta u degeneraciji DA neurona u PB. Poznato je da mTOR učestvuje u regulaciji brojnih procesa poput rasta, diferencijacije, sinteze lipida i proteina (170). U pojedinim studijama je pokazano da povećana ekspresija izvorne (*wt*) forme mTOR može delimično da inhibira ćelijsku smrt u toksičnim modelima PB (364–

366). Domansky i saradnici su pokazali u *in vivo* modelu da delecija PTEN gena, čiji proteinski produkt inhibira mTOR, dovodi do aktivacije mTOR signalnog puta, koji potom štiti DA neurone SN miša od neurotoksičnog oštećenja izazvanog MPTP i 6-OHDA (367). Pored toga, u literaturi se mogu pronaći i podaci da MPTP, 6-OHDA i rotenon suprimiraju aktivnost mTOR kompleksa i smanjuju vijabilitet ćelija (152,364,366,368–370). Nasuprot tome, rezultati studija u kojima je korišćen inhibitor mTORC1, pokazali su da rapamicin ima neuroprotektivno dejstvo i u *in vivo* i u *in vitro* modelima (365,371–378). Takođe, pokazano je da je L-DOPA-indukovana diskinezija, motorna nuspojava izazvana upravo L-DOPA-zavisnom aktivacijom mTOR signalnog puta u strijatumu miša, i da se može sprečiti primenom rapamicina ili nekog od njegovih analoga (377,379). Na osnovu ovih podataka možemo reći da je uloga mTOR signalnog puta važna u ispitivanju etiopatogeneze PB. U ovoj studiji je po prvi put ispitivan odnos AMPK i Akt signalnog puta u MPP+ indukovanoj autofagiji i pokazano je da aktivacija AMPK kod ćelija tretiranih MPP+ izaziva kasnu aktivaciju mTORC1/ULK1 zavisne citoprotektivne autofagije. Pored toga, u ovoj studiji je pokazano da paralelno sa indukcijom autofagije, dolazi i do smanjenja broja lizozoma i nakupljanja p62 proteina.

Sve veći broj podataka ukazuje da u PB postoji poremećaj u funkciji lizozoma. Danas je poznato da mutacije u genima za α SYN, PINK-1, Parkin, LRRK2, ATPazu13A2 i za glukocerebrozidazu, remete normalnu funkciju autofagno-lizozomskog sistema razgradnje (91,92). U prilog ovoj hipotezi idu i rezultati patohistološke *post-mortem* analize tkiva mozga pacijenata sa idiopatskim oblikom PB, kod kojih je utvrđeno povećan nivo proteina lizozoma (LAMP-1 i 2a, katepsina D, GBA, ATPaze13A2 i VPS35) i pokazatelja autofagije, poput LC3-II u LT (376,380–384). Kao što smo već pomenuli, u našem modelu dolazi do kasne indukcije autofagije uz inhibiciju mTORC1 kinaze i njenih nishodnih supstrata pS6k i 4E-BP1 proteina. Uz kasnu indukciju mTORC1-zavisne, citoprotektivne autofagije primetili smo i pad u broju lizozoma, što smo potvrdili imunoblot analizom na LAMP-1 protein, marker proteina lizozoma ali i LTR bojenjem kiselog vezikularnog sadržaja na protočnoj citometriji. Pored toga, u našim eksperimentima je zabeležen porast nivoa p62 proteina koji je pored LC3-II jedan od glavnih pokazatelja autofagije. Naime, tokom autofagije p62 protein se vezuje za UB-obeležene proteine i organele tokom formiranja autofagozoma. Po spajanju sa lizozomom, uz dejstvo kiselih fosfataza, celokupni

sadržaj autofagolizozoma se razgrađuje, uključujući i p62 (385). Ovaj rezultat je bio u skladu sa rezultatima istraživanja drugih autora koji su pokazali da MPP+ smanjuje autofagni fluks u neuronskim ćelijama (195,386,387). Sa druge strane, u literaturi postoje podaci da oksidativni stres može da indukuje povećanu transkripciju p62 gena i tako dovede do povećanja nivoa proteina u ćeliji (388,389).

Garcia-Garcia i saradnici su ispitujući mehanizam citotoksičnog dejstva kao najčešće korišćenih neurotoksina u eksperimentalnom istraživanju PB, utvrdili da MPTP/MPP+, 6-OHDA, rotenon i parakvat indukuju autofagiju. Međutim, primenom farmakološke i genske inhibicije autofagije, ustanovljeno je da u slučaju rotenona i 6-OHDA, dolazi do poboljšanja ćelijskog vijabiliteta, dok u slučaju MPP+ i parakvata povećava se stepen oštećenja i smrti ćelija (195). Dakle, oni su pokazali da je 6-OHDA i rotenon indukuju citotoksičnu autofagiju, dok MPP+ i parakvat indukuju citoprotektivnu autofagiju. Slično su pokazali i Lim i saradnici, da MPP+ dovodi do smanjenja autofagnog fluksa (387). U našoj studiji je zabeležen sličan fenomen, da MPP+ indukuje autofagiju, ali i da dolazi do smanjenja broja lizozoma, lizosomalnog markera LAMP-1 i do porasta nivoa p62 proteina (385). Dva su osnovna razloga zbog kojih može doći do povećanja u nivou proteina p62 u ćeliji, ili zbog poremećaja u razgradnji p62 usled defektne autofagije, ili usled povećane transkripcije. Kako u literaturi postoje podaci da oksidativni stres može povećati transkripciju p62, ne možemo sa sigurnošću tvrditi šta je uzrok povećanja nivoa p62 u našoj studiji, da li je zabeležen realan porast nivoa p62 proteina u ćelijama ili je došlo do nakupljanja p62 usled smanjenja broja lizozoma (388,389).

Iako u ovoj studiji postoje dokazi o indukciji autofagije, ona ne rezultira povećanom razgradnjom supstrata, najverovatnije usled smanjenja broja lizozoma. Naime, u uslovima primene farmakoloških inhibitora autofagije - inhibicijom formiranja autofagolizozoma vortmaninom, odnosno inhibicijom lizosomalne funkcije bafilomicinom i hlorokinom, došlo je do povećanja citotoksičnog dejstva MPP+. Ovi podaci ukazuju da, i pored smanjenja broja lizozoma, u našem modelu, proces autofagije se u SH-SY5Y ćelijama i dalje odvija u izvesnoj meri. Takođe, na osnovu rezultata dobijenih primenom inhibitora autofagije, može se reći da indukovana autofagija ima citoprotektivni efekat. Ovakav rezultat je bio u skladu sa prethodno publikovanim rezultatima drugih istraživačkih grupa (195,326,390,391). Sa druge strane,

Zhao i saradnici, iako su pokazali slične rezultate u vezi sa ulogom AMPK u indukciji autofagije u MPP+ modelu, naveli su da je MPP+-indukovana autofagija citotoksična (392).

Rezultati ove studije ukazuju da AMPK u *in vitro* modelu PB indukovano sa MPP+ ostvaruje svoje citoprotektivno dejstvo na najmanje dva načina, preko pokretanja AMPK/Akt-zavisne inhibicije oksidativnog stresa i kasnom indukcijom AMPK/mTOR-zavisne citoprotektivne autofagije. Imajući u vidu da bi aktivacija AMPK signalnog puta mogla uticati na ključne mehanizme uključene u proces oštećenja i umiranja DA neurona u PB, modulacija ovog signalnog puta bi se mogla uzeti u razmatranje kao potencijalan meta za neuroprotektivne terapijske strategije u PB (164). Pored toga, važno je istaći da ova studija ima svoja ograničenja, *in vitro* model neuronske linije ne može u potpunosti odgovarati kompleksnim uslovima i procesima koji se odvijaju unutar složenih organizama sisara. Iako među istraživačima ne postoji konsenzus o ulozi AMPK u različitim modelima PB, rezultati ove studije, uprkos svojim ograničenjima, otvaraju prostor za dalja istraživanja odnosa AMPK i Akt signalnih puteva i autofagije, kao potencijalnim kandidatima za razvoj terapijske strategije koja bi u izvesnoj meri usporila i smanjila stepen oštećenja DA neurona SN u PB.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima, a na osnovu dobijenih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci ovog istraživanja:

1. Citotoksično dejstvo MPP⁺ na SH-SY5Y ćelije humanog neuroblastoma indukovano je povećanom produkcijom superoksidnog anjona, koje je praćeno depolarizacijom mitohondrijalne membrane i indukcijom apoptotske smrti.
2. Primena MPP⁺-a indukuje aktivaciju signalnih puteva AMPK i Akt kinaze u ćelijama humanog neuroblastoma.
3. Aktivacija AMPK smanjuje citotoksičnost MPP⁺ ranom aktivacijom Akt i posledičnom inhibicijom oksidativnog stresa, kao i kasnom inhibicijom mTORC1 koja indukuje citoprotektivnu autofagiju.
4. Dakle, rezultati ove disertacije ukazuju da signalni put AMPK ima protektivnu ulogu u modelu oštećenja ćelija izazvanom MPP⁺ toksinom, i da bi modulacija aktivnosti AMPK/Akt kinaze i autofagije mogle biti potencijalne mete za postizanje neuroprotektivnih efekata u Parkinsonovoj bolesti.

7. LITERATURA

1. Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: From pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013. Sep;62:132-144.
2. Kostić VS. Parkinsonova bolest i parkinsonizam. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu - CIBIF; 1998.
3. Barone P. Neurotransmission in Parkinson's disease: Beyond dopamine. *European Journal of Neurology*. 2010. Mar;17(3):364-76.
4. Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rüb U. Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol*. 2002. Oct;249 Suppl 3:III/1-5.
5. Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*. 2004 Oct;318(1):121-34.
6. Deng H, Wang P, Jankovic J. The genetics of Parkinson disease. *Ageing Res Rev*. 2018 Mar;42:72-85.
7. Gibb WRG, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1988 Jun;51(6):745-52.
8. Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2002 Spring;14(2):223-36; discussion 222.
9. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388(6645):839-40.
10. Lees AJ, Selikhova M, Andrade LA, Duyckaerts C. The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff. *Mov Disord*. 2008 Apr 30;23(6):777-83.
11. Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B. On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science*. 1958 Feb 28;127(3296):471.
12. Bertler Å, Rosengren E. Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia*. 1959 Jan 15;15(1):10-1.
13. Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM. Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med*. 1967. Feb 16;276(7):374-9.
14. Riess O, Krüger R. Parkinson's disease - A multifactorial neurodegenerative

- disorder. *J Neural Transm Suppl.* 1999;56:113-25.
15. Hindle J V. Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age Ageing.* 2010 Mar;39(2):156-61.
 16. Quinn N, Critchley P, Marsden CD. Young onset Parkinson's disease. *Mov Disord.* 1987;2(2):73-91.
 17. Collier TJ, Kanaan NM, Kordower JH. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: Evidence from studies of non-human primates. *Nat Rev Neurosci.* 2011 Jun;12(6):359-66.
 18. Cummings SR. The biology of aging. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2007;7(4):340-1.
 19. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11(3):298-300.
 20. Harman D. The Biologic Clock: The Mitochondria? *J Am Geriatr Soc.* 1972;20(4):145-7.
 21. Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G, et al. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science.* 1996;274(5290):1197-9.
 22. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* 1997;276(5321):2045-7.
 23. Bonifati V. Genetics of Parkinson's disease - state of the art. *Parkinsonism Relat Disord.* 2014 Jan;20 Suppl 1:S23-8.
 24. Marras C, Lang A, van de Warrenburg BP, Sue CM, Tabrizi SJ, Bertram L, et al. Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. *Mov Disord.* 2016 Apr;31(4):436-57.
 25. Klein C, Westenberger A. Genetics of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Jan;2(1):a008888.
 26. Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Shrivastava S. A meta-analysis of Parkinson's disease and exposure to pesticides. *Neurotoxicology.* 2000;21(4):435-40.
 27. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov A V.,

- Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2000;3(12):1301–6.
28. Cory-Slechta DA, Manning-Bog AB, Thiruchelvam M, Di Monte DA, McCormack AL, Thiffault C, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis.* 2002;10(2):119–27.
 29. Ascherio A, Chen H, Weisskopf MG, O'Reilly E, McCullough ML, Calle EE, et al. Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2006 Aug;60(2):197-203.
 30. Schapira AHV. Etiology of Parkinson's disease. *Neurology.* 2006 May 23;66(10 Suppl 4):S10-23.
 31. Vingerhoets FJG, Snow BJ, Tetrud JW, Langston JW, Schulzer M, Calne DB. Positron emission tomographic evidence for progression of human MPTP-induced dopaminergic lesions. *Ann Neurol.* 1994 Nov;36(5):765-70.
 32. Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, et al. Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* 1979;1(3):249–54.
 33. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* 1983;219(4587):979–80.
 34. Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 Years' observations on male British doctors. *Br Med J.* 2004;328(7455):1519–28.
 35. Grandinetti A, Morens DM, Reed D, Maceachern D. Prospective study of cigarette smoking and the risk of developing idiopathic parkinson's disease. *Am J Epidemiol.* 1994;139(12):1129–38.
 36. Paganini-Hill A. Risk factors for Parkinson's disease: The Leisure World cohort study. *Neuroepidemiology.* 2001;20(2):118–24.
 37. Quik M. Smoking, nicotine and Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 2004 Sep;27(9):561-8.
 38. Palacios N, Gao X, McCullough ML, Schwarzschild MA, Shah R, Gapstur S, et al. Caffeine and risk of Parkinson's disease in a large cohort of men and women.

- Mov Disord. 2012;27(10):1276–82.
39. de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2006 Jun;5(6):525-35..
 40. Jovanovic-Tucovic M, Marković I. The role of amp-activated protein kinase in neurodegeneration in parkinson's disease. *Med Podml.* 2019. 70(4):13–20.
 41. Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 2;93(7):2696-701.
 42. Alam ZI, Daniel SE, Lees AJ, Marsden DC, Jenner P, Halliwell B. A Generalised Increase in Protein Carbonyls in the Brain in Parkinson's but Not Incidental Lewy Body Disease. *J Neurochem.* 1997 Sep;69(3):1326-9.
 43. Zhang J, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ, Graham DG, et al. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am J Pathol.* 1999 May;154(5):1423-9.
 44. Jenner P. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Handb Clin Neurol.* 2007;83:507-20.
 45. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine, fourth edition. *Free Radic Biol Med.* 2007;105–13.
 46. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, et al. Basal Lipid Peroxidation in Substantia Nigra Is Increased in Parkinson's Disease. *J Neurochem.* 1989 Feb;52(2):381-9.
 47. Dexter DT, Holley AE, Flitter WD, Slater TF, Wells FR, Daniel SE, et al. Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: An HPLC and ESR study. *Mov Disord.* 1994;
 48. Castellani RJ, Perry G, Siedlak SL, Nunomura A, Shimohama S, Zhang J, et al. Hydroxynonenal adducts indicate a role for lipid peroxidation in neocortical and brainstem Lewy bodies in humans. *Neurosci Lett.* 2002 Feb 8;319(1):25-8.
 49. Fessel JP, Hulette C, Powell S, Roberts LJ, Zhang J. Isofurans, but not F2-isoprostanes, are increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease and with dementia with Lewy body disease. *J Neurochem.* 2003. 85: 645-650.2003.
 50. E F, Mg W. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta

- in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J Neurochem.* 1998 Jan;70(1):268-75.
51. Sanchezramos JR, Overvik E, Ames BN. A marker of oxyradical-mediated dna-damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) is increased in nigro-striatum of parkinsons-disease brain. *Neurodegeneration.* 1994.
 52. Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol.* 2008 Jan;21(1):172-88.
 53. Meiser J, Weindl D, Hiller K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal.* 2013 May 17;11(1):34.
 54. Dexter DT, Wells FR, Agid F, Agid Y, Lees AJ, Jenner P, et al. Increased nigral iron content in postmortem parkinsonian brain. *Lancet.* 1987 Nov 21;2(8569):1219-20.
 55. Jellinger K, Paulus W, Grundke-Iqbal I, Riederer P, Youdim MBH. Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 1990;2(4):327-40.
 56. Dexter DT, Wells FR, Lee AJ, Agid F, Agid Y, Jenner P, et al. Increased Nigral Iron Content and Alterations in Other Metal Ions Occurring in Brain in Parkinson's Disease. *J Neurochem.* 1989 Jun;52(6):1830-6.
 57. Sofic E, Riederer P, Heinsen H, Beckmann H, Reynolds GP, Hebenstreit G, et al. Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J Neural Transm.* 1988;74(3):199-205.
 58. Zecca L, Youdim MBH, Riederer P, Connor JR, Crichton RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Nov;5(11):863-73.
 59. Dexter DT, Carayon A, Vidailhet M, Ruberg M, Agid F, Agid Y, et al. Decreased Ferritin Levels in Brain in Parkinson's Disease. *J Neurochem.* 1990 Jul;55(1):16-20.
 60. Olanow CW. An introduction to the free radical hypothesis in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1992;32 Suppl:S2-9.
 61. Double KL, Ben-Shachar D, Youdim MBH, Zecca L, Riederer P, Gerlach M. Influence of neuromelanin on oxidative pathways within the human substantia nigra. *Neurotoxicol Teratol.* 2002 Sep-Oct;24(5):621-8.
 62. Zecca L, Zucca FA, Costi P, Tampellini D, Gatti A, Gerlach M, et al. The

- neuromelanin of human substantia nigra: Structure, synthesis and molecular behaviour. *J Neural Transm Suppl.* 2003;(65):145-55..
63. Holt IJ, Reyes A. Human mitochondrial DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Dec 1;4(12).
 64. Taanman JW. The mitochondrial genome: Structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Feb 9;1410(2):103-23.
 65. Ryan MT, Hoogenraad NJ. Mitochondrial-Nuclear Communications. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:701-22.
 66. Xin JC, Butow RA. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet.* 2005 Nov;6(11):815-25.
 67. Mimaki M, Wang X, McKenzie M, Thorburn DR, Ryan MT. Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Jun;1817(6):851-62.
 68. Koopman WJH, Distelmaier F, Smeitink JAM, Willems PHGM. OXPHOS mutations and neurodegeneration. *EMBO J.* 2013 Jan 9;32(1):9-29.
 69. Sharma L, Lu J, Bai Y. Mitochondrial Respiratory Complex I: Structure, Function and Implication in Human Diseases. *Curr Med Chem.* 2009;16(10):1266-77.
 70. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003 Oct 15;552(Pt 2):335-44.
 71. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000 Nov 9;408(6809):239-47.
 72. Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: Sites of production in States 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr.* 1999 Aug;31(4):347-66.
 73. Hang L, Thundiyil J, Lim KL. Mitochondrial dysfunction and Parkinson disease: a Parkin-AMPK alliance in neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1350(1):37-47.
 74. Youle RJ, Van Der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science.* 2012. 337:1062-5.
 75. Winklhofer KF, Haass C. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2010;1802(1):29-44.

76. Park JS, Davis RL, Sue CM. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2018 Apr 3;18(5):21.
77. Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci.* 2006 Mar;31(1):137-55.
78. Thibautaud TA, Anderson RT, Smith DM. A common mechanism of proteasome impairment by neurodegenerative disease-associated oligomers. *Nat Commun.* 2018;9(1).
79. Gan-Or Z, Dion PA, Rouleau GA. Genetic perspective on the role of the autophagy-lysosome pathway in Parkinson disease. *Autophagy.* 2015;11(9):1443-57.
80. Farrer M, Kachergus J, Forno L, Lincoln S, Wang DS, Hulihan M, et al. Comparison of Kindreds with Parkinsonism and α -Synuclein Genomic Multiplications. *Ann Neurol.* 2004 Feb;55(2):174-9.
81. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton AB, Hague S, Kachergus J, et al. α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science.* 2003;302(5646):841.
82. Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC. α -synuclein Is Degraded by Both Autophagy and the Proteasome. *J Biol Chem.* 2003 Jul 4;278(27):25009-13.
83. Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L. Wild type α -synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem.* 2008 Aug 29;283(35):23542-56.;
84. Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant α -synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science.* 2004 Aug 27;305(5688):1292-5.
85. Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Kaushik S, Massey AC, Mazzulli J, Mosharov E V., et al. Dopamine-modified α -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest.* 2008 Feb;118(2):777-88.
86. Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, Bhullar B, et al. α -synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science.* 2006 Jul 21;313(5785):324-8.

87. Orenstein SJ, Kuo SH, Tasset I, Arias E, Koga H, Fernandez-Carasa I, et al. Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nat Neurosci*. 2013 Apr;16(4):394-406.
88. Geisler S, Holmström KM, Treis A, Skujat D, Weber SS, Fiesel FC, et al. The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations. *Autophagy*. 2010 Oct;6(7):871-8.
89. Canet-Avilés RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, et al. The Parkinson's disease DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(24):9103-8.
90. Williams ET, Chen X, Moore DJ. VPS35, the retromer complex and Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*. 2017;7(2):219-233.
91. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2009 Oct 22;361(17):1651-61.
92. Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*. 2004 Nov 4;351(19):1972-7.
93. Lev N, Melamed E, Offen D. Apoptosis and Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003 Apr;27(2):245-50.
94. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med*. 2003 Apr 3;348(14):1365-75.
95. Watson NB, McGregor WG. Cellular Responses to DNA Damage. *Comprehensive Toxicology: Second Edition*. 2010.
96. Cohen GM. Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997 Aug 15; 326(Pt 1): 1-16.
97. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun;35(4):495-516.
98. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, Van Gorp M, Van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *ncogene*. 2004 Apr 12;23(16):2861-74.
99. Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: Life-or-death switch. *F FEBS Lett*. 2000

- Jan 21;466(1):6-10..
100. van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, et al. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ.* 2002 Jan;9(1):20-6.
 101. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* 2006 Aug 7;25(34):4798-811.
 102. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CYJ, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature.* 2001 Mar 29;410(6828):549-54.
 103. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *Exp Med.* 2000 Aug 21;192(4):571-80.
 104. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 2001 Jul 5;412(6842):95-9.
 105. Bogner C, Leber B, Andrews DW. Apoptosis: Embedded in membranes. *Curr Opin Cell Biol.* 2010 Dec;22(6):845-51.
 106. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):784-8.
 107. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. *J Immunol.* 2003 Nov 1;171(9):4672-9.
 108. Takai N, Nakanishi H, Tanabe K, Nishioku T, Sugiyama T, Fujiwara M, et al. Involvement of caspase-like proteinases in apoptosis of neuronal PC12 cells and primary cultured microglia induced by 6-hydroxydopamine. *J Neurosci Res.* 1998 Oct 15;54(2):214-22.
 109. Andersen JK. Does neuronal loss in Parkinson's disease involve programmed cell death? *Bioessays.* 2001 Jul;23(7):640-6.
 110. Blum D, Wu Y, Nissou MF, Arnaud S, Benabid AL, Verna JM. p53 and Bax activation in 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Brain Res.* 1997 Mar 14;751(1):139-42.
 111. Przedborski S, Jackson-Lewis V. Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov Disord.* 1998;13 Suppl 1:35-8.

112. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018 Mar;25(3):486-541.
113. Arsikin K, Kravic-Stevovic T, Jovanovic M, Ristic B, Tovilovic G, Zogovic N, et al. Autophagy-dependent and -independent involvement of AMP-activated protein kinase in 6-hydroxydopamine toxicity to SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2012;1822(11):1826–36.
114. Thomas B, Banerjee R, Starkova NN, Zhang SF, Calingasan NY, Yang L, et al. Mitochondrial permeability transition pore component cyclophilin D distinguishes nigrostriatal dopaminergic death paradigms in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal.* 2012 May 1;16(9):855-68.
115. Degtarev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 2005 Jul;1(2):112-9.
116. Beal MF. Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann Neurol.* 1998 Sep;44(3 Suppl 1):S110-4.;
117. Li Y, Yang X, Ma C, Qiao J, Zhang C. Necroptosis contributes to the NMDA-induced excitotoxicity in rat's cultured cortical neurons. *Neurosci Lett.* 2008 Dec 12;447(2-3):120-3.
118. Nomura M, Ueno A, Saga K, Fukuzawa M, Kaneda Y. Accumulation of cytosolic calcium induces necroptotic cell death in human neuroblastoma. *Cancer Res.* 2014 Feb 15;74(4):1056-66.
119. Zhang S, Tang MB, Luo HY, Shi CH, Xu YM. Necroptosis in neurodegenerative diseases: a potential therapeutic target. *Cell Death Dis.* 2017 Jun 29;8(6):e2905..
120. Krysko O, Aaes TL, Kagan VE, D'Herde K, Bachert C, Leybaert L, et al. Necroptotic cell death in anti-cancer therapy. *Immunological Rev.* 2017. 280(1):207-219.
121. Grootjans S, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: An overview. *Cell Death Differ.* 2017 Jul;24(7):1184-1195.
122. Van Herreweghe F, Festjens N, Declercq W, Vandenabeele P. Tumor necrosis factor-mediated cell death: To break or to burst, that's the question. *Cell Mol Life*

- Sci. 2010 May;67(10):1567-79.
123. Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, et al. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*. 2017 Oct 5;171(2):273-285.
 124. Tan MS, Tan L, Jiang T, Zhu XC, Wang HF, Jia CD, et al. Amyloid- β induces NLRP1-dependent neuronal pyroptosis in models of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis*. 2014 Aug 21;5:e1382.
 125. Codolo G, Plotegher N, Pozzobon T, Brucale M, Tessari I, Bubacco L, et al. Triggering of Inflammasome by Aggregated α -Synuclein, an Inflammatory Response in Synucleinopathies. *PLoS One*. 2013;8(1):e55375.
 126. Wesselborg S, Stork B. Autophagy signal transduction by ATG proteins: From hierarchies to networks. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Dec;72(24):4721-57.
 127. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: Molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*. 2005 Nov;12 Suppl 2:1542-52.
 128. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Sep;8(9):741-52.
 129. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011. 27:107-32.
 130. Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*. 2014. 112:24-49.
 131. Nakamura S, Yoshimori T. New insights into autophagosome-lysosome fusion. *Cell Sci*. 2017 Apr 1;130(7):1209-1216.
 132. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2014.20(3):460-473.
 133. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017 Mar 9;168(6):960-976.
 134. Inoki K, Zhu T, Guan K-L. TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell*. 2003;115(5):577-90.
 135. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol*

- Cell. 2008;30(2):214–26.
136. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-LL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011;13(2):132–41.
 137. Weerasekara VK, Thompson JW, Panek DJ, Logan GN, Thomson DM, Mathis AD, et al. Metabolic-Stress-Induced Rearrangement of the 14-3-3 Interactome Promotes Autophagy via a ULK1- and AMPK-Regulated 14-3-3 Interaction with Phosphorylated Atg9. *Mol Cell Biol.* 2014 Dec;34(24):4379-88;
 138. Imai K, Hao F, Fujita N, Tsuji Y, Oe Y, Araki Y, et al. Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation. *J Cell Sci.* 2016;129(20):3781–91.
 139. Kim J, Kim YC, Fang C, Russell RC, Kim JH, Fan W, et al. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell.* 2013;152(1–2):290–303.
 140. Zhang D, Wang W, Sun X, Xu D, Wang C, Zhang Q, et al. AMPK regulates autophagy by phosphorylating BECN1 at threonine 388. *Autophagy.* 2016;12(9):1447–59.
 141. Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Arencibia MG, Vetrini F, Erdin S, et al. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science.* 2011;332(6036):1429–33.
 142. Sardiello M, Palmieri M, Ronza A Di, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science.* 2009;325(5939):473–7.
 143. Song W, Wang F, Savini M, Ake A, di ronza A, Sardiello M, et al. TFEB regulates lysosomal proteostasis. *Hum Mol Genet.* 2013;22(10):1994–2009.
 144. Hill SM, Wrobel L, Rubinsztein DC. Post-translational modifications of Beclin 1 provide multiple strategies for autophagy regulation. *Cell Death Differ.* 2019 Mar;26(4):617-629.
 145. Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct.* 2002 Dec;27(6):421-9.
 146. Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjørkøy G, Nunn JL, Bruun JA, et al. A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates. *Mol Cell.* 2009 Feb 27;33(4):505-16.;

147. Lazarou M, Jin SM, Kane LA, Youle RJ. Role of PINK1 Binding to the TOM Complex and Alternate Intracellular Membranes in Recruitment and Activation of the E3 Ligase Parkin. *Dev Cell*. 2012 Feb 14;22(2):320-33.
148. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol*. 2008 Dec 1;183(5):795-803.
149. Michiorri S, Gelmetti V, Giarda E, Lombardi F, Romano F, Marongiu R, et al. The Parkinson-associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy. *Cell Death Differ*. 2010 Jun;17(6):962-74.
150. Krebiehl G, Ruckerbauer S, Burbulla LF, Kieper N, Maurer B, Waak J, et al. Reduced basal autophagy and impaired mitochondrial dynamics due to loss of Parkinson's disease-associated protein DJ-1. *PLoS One*. 2010 Feb 23;5(2):e9367.
151. Janda E, Isidoro C, Carresi C, Mollace V. Defective autophagy in Parkinson's disease: Role of oxidative stress. *Mol Neurobiol*. 2012 Dec;46(3):639-61.
152. Rodríguez-Blanco J, Martín V, García-Santos G, Herrera F, Casado-Zapico S, Antolín I, et al. Cooperative action of JNK and AKT/mTOR in 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced autophagy of neuronal PC12 cells. *J Neurosci Res*. 2012;90(9):1850-60.
153. Nopparat C, Porter JE, Ebadi M, Govitrapong P. 1-Methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death via autophagy through a Bcl-2/Beclin 1 complex-dependent pathway. *Neurochem Res*. 2014 Feb;39(2):225-32.
154. Cheng HC, Kim SR, Oo TF, Kareva T, Yarygina O, Rzhetskaya M, et al. Akt suppresses retrograde degeneration of dopaminergic axons by inhibition of macroautophagy. *J Neurosci*. 2011 Feb 9;31(6):2125-35.
155. Chu CT, Zhu J, Dagda R. Beclin 1-independent pathway of damage-induced mitophagy and autophagic stress: Implications for neurodegeneration and cell death. *Autophagy*. 2007 Nov-Dec;3(6):663-6.
156. Miyara M, Kotake Y, Tokunaga W, Sanoh S, Ohta S. Mild MPP+ exposure impairs autophagic degradation through a novel lysosomal acidity-independent mechanism. *J Neurochem*. 2016;294-308.
157. Sawyer TK. Protein kinases and protein phosphatases in signal transduction pathways. *Symp Soc Exp Biol*. 1990;44:241-55..

158. Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade - A unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci.* 2004 Jan;29(1):18-24.
159. Ross FA, MacKintosh C, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours. *FEBS J.* 2016 Aug;283(16):2987-3001.
160. Cantó C, Auwerx J. AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Oct;67(20):3407-23.
161. Gowans GJ, Hawley SA, Ross FA, Hardie DG. AMP is a true physiological regulator of amp-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metab.* 2013 Oct 1;18(4):556-66.
162. Oakhill JS, Steel R, Chen ZP, Scott JW, Ling N, Tam S, et al. AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science.* 2011 Jun 17;332(6036):1433-5.
163. Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, Heath R, Mayer F V., Carmena D, et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature.* 2011 Apr 14;472(7342):230-3.
164. Curry DW, Stutz B, Andrews ZB, Elsworth JD. Targeting AMPK signaling as a neuroprotective strategy in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 2018;8(2):161-181.
165. Carling D, Clarke PR, Zammit VA, Hardie DG. Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. *Eur J Biochem.* 1989 Dec 8;186(1-2):129-36.
166. Davies SP, Helps NR, Cohen PTW, Hardie DG. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C α and native bovine protein phosphatase-2Ac. *FEBS Lett.* 1995 Dec 27;377(3):421-5.
167. Hardie DG. AMP-Activated Protein Kinase as a Drug Target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:185-210.
168. Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, et al. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet.* 1998;18(3):231-6.
169. Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, et al. Alterations in

- glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol.* 1994;36(3):348–55.
170. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012;149(2):274–93.
 171. Morita M, Gravel SP, Hulea L, Larsson O, Pollak M, St-Pierre J, et al. mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity. *Cell Cycle.* 2015;14(4):473-80.
 172. Beauchamp EM, Platanias LC. The evolution of the TOR pathway and its role in cancer. *Oncogene.* 2013 Aug 22;32(34):3923-32.
 173. Morita M, Gravel SP, Chénard V, Sikström K, Zheng L, Alain T, et al. mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab.* 2013;18(5):698–711.
 174. Lan A ping, Chen J, Zhao Y, Chai Z, Hu Y. mTOR Signaling in Parkinson's Disease. *Neuromolecular Med.* 2017 Mar;19(1):1-10.
 175. Potter WB, O'Riordan KJ, Barnett D, Osting SMK, Wagoner M, Burger C, et al. Metabolic regulation of neuronal plasticity by the energy sensor AMPK. *PLoS One.* 2010;5(2).
 176. Garza-Lombó C, Schroder A, Reyes-Reyes EM, Franco R. mTOR/AMPK signaling in the brain: Cell metabolism, proteostasis and survival. *Curr Opin Toxicol.* 2018 Apr;8:102-110.
 177. Domise M, Sauvé F, Didier S, Caillerez R, Bégard S, Carrier S, et al. Neuronal AMP-activated protein kinase hyper-activation induces synaptic loss by an autophagy-mediated process. *Cell Death Dis.* 2019 Mar 4;10(3):221.
 178. Huang J, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex: A molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J.* 2008 Jun 1;412(2):179-90.
 179. Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Mol Cell.* 2002 Jul;10(1):151-62.
 180. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* 2017 Apr 20;169(3):381-405.
 181. Jha SK, Jha NK, Kar R, Ambasta RK, Kumar P. p38 MAPK and PI3K/AKT Signalling Cascades in Parkinson's Disease. *Int J Mol Cell Med.* 2015

- Spring;4(2):67-86.
182. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005 Feb 18;307(5712):1098-101
 183. Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal*. 2011 Oct;23(10):1515-27.
 184. Ries V, Cheng HC, Baohan A, Kareva T, Oo TF, Rzhetskaya M, et al. Regulation of the postnatal development of dopamine neurons of the substantia nigra in vivo by Akt/protein kinase B. *J Neurochem*. 2009 Jul;110(1):23-33.
 185. Greene LA, Levy O, Malagelada C. Akt as a victim, villain and potential hero in Parkinson's disease pathophysiology and treatment. *Cell Mol Neurobiol*. 2011 Oct;31(7):969-78.
 186. Malagelada C, Zong HJ, Greene LA. RTP801 is induced in Parkinson's disease and mediates neuron death by inhibiting Akt phosphorylation/activation. *J Neurosci*. 2008 Dec 31;28(53):14363-71;
 187. Timmons S, Coakley MF, Moloney AM, O' Neill C. Akt signal transduction dysfunction in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2009 Dec 18;467(1):30-5.
 188. Aleyasin H, Rousseaux MWC, Marcogliese PC, Hewitt SJ, Irrcher I, Joselin AP, et al. DJ-1 protects the nigrostriatal axis from the neurotoxin MPTP by modulation of the AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 16;107(7):3186-91.
 189. Ries V, Henchcliffe C, Kareva T, Rzhetskaya M, Bland R, During MJ, et al. Oncoprotein Akt/PKB induces trophic effects in murine models of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Dec 5;103(49):18757-62.
 190. Zhao Y, Hu X, Liu Y, Dong S, Wen Z, He W, et al. ROS signaling under metabolic stress: Cross-talk between AMPK and AKT pathway. *Mol Cancer*. 2017;16(1):79.
 191. Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:845618.
 192. Tieu K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1(1).
 193. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou MF, Benabid AL, Sadoul R, et al.

- Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: Contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001 Oct;65(2):135-72.
194. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 2004 Oct;318(1):215-24. Epub 2004 Jul 28.
 195. Garcia-Garcia A, Anandhan A, Burns M, Chen H, Zhou Y, Franco R. Impairment of Atg5-dependent autophagic flux promotes paraquat- and MPP+-induced apoptosis but not rotenone or 6-hydroxydopamine toxicity. *Toxicol Sci.* 2013 Nov;136(1):166-82.
 196. Lee J, Ziering A, Heineman SD, Berger L. Piperidine derivatives. Part II. 2-phenyl- and 2-phenylalkyl-piperidines. *J Org Chem.* 1947;12(6):885-93.
 197. Langston JW. The MPTP story. *J Parkinsons Dis.* 2017; 7(Suppl 1): S11-S19.
 198. Ransom BR, Kunis DM, Irwin I, Langston JW. Astrocytes convert the parkinsonism inducing neurotoxin, MPTP, to its active metabolite, MPP+. *Neurosci Lett.* 1987 Apr 10;75(3):323-8.
 199. Langston JW, Irwin I, Langston EB, Forno LS. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+): Identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci Lett.* 1984 Jul 13;48(1):87-92.
 200. Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Herkenham MA. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature.* 1984 Oct 4-10;311(5985):464-7.
 201. Heikkila RE, Manzino L, Cabbat FS, Duvoisin RC. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2, 5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature.* 1984 Oct 4-10;311(5985):467-9.
 202. Salach JI, Singer TP, Castagnoli N, Trevor A. Oxidation of the neurotoxic amine 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) by monoamine oxidases A and B and suicide inactivation of the enzymes by MPTP. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Dec 14;125(2):831-5.
 203. Choi SJ, Panhelainen A, Schmitz Y, Larsen KE, Kanter E, Wu M, et al. Changes in neuronal dopamine homeostasis following 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) exposure. *J Biol Chem.* 2015 Mar 13; 290(11): 6799-6809.
 204. Shen RS, Abell CW, Gessner W, Brossi A. Serotonergic conversion of MPTP

- and dopaminergic accumulation of MPP⁺. *FEBS Lett.* 1985 Sep 23;189(2):225-30.
205. Nicklas W m dotJ, Vyas I, Heikkila RE. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 1985;36(26):2503–8.
 206. Ramsay RR, Salach JI, Singer TP. Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD⁺-linked substrates by MPP⁺. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986 Jan 29;134(2):743-8.
 207. Ramsay RR, Kowal AT, Johnson MK, Salach JI, Singer TP. The inhibition site of MPP⁺, the neurotoxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine is near the Q-binding site of NADH dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* 1987 Dec;259(2):645-9.
 208. Javitch JA, D’Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: Uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Apr;82(7):2173-7.
 209. Chen MK, Kuwabara H, Zhou Y, Adams RJ, Brašić JR, McGlothan JL, et al. VMAT2 and dopamine neuron loss in a primate model of Parkinson’s disease. *J Neurochem.* 2008 Apr; 105(1): 78–90.
 210. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson’s disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener.* 2017 Jan 24;12(1):10.
 211. Xie HR, Hu L Sen, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: In vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson’s disease. *Chin Med J (Engl).* 2010 Apr 20;123(8):1086-92.
 212. Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA. Phenotypic Diversification in Human Neuroblastoma Cells: Expression of Distinct Neural Crest Lineages. *Cancer Res.* 1989 Jan 1;49(1):219-25.
 213. Chacon E, Acosta D, Lemasters J. Primary Cultures of Cardiac Myocytes as In Vitro Models for Pharmacological and Toxicological Assessments. Editor(s): José V. Castell, María José Gómez-Lechón, *In Vitro Methods in Pharmaceutical*

- Research, Academic Press, 1997; 209-223.
214. Dulovic M, Jovanovic M, Xilouri M, Stefanis L, Harhaji-Trajkovic L, Kravic-Stevovic T, et al. The protective role of AMP-activated protein kinase in alpha-synuclein neurotoxicity in vitro. *Neurobiol Dis.* 2014;63:1–11.
 215. Kaludjerović GN, Miljković D, Momcilović M, Djinović VM, Stojković MM, Sabo TJ, et al. Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro. *Int J Cancer.* 2005;116(3):479–86.
 216. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
 217. Zeitelhofer M, Vessey JP, Xie Y, Tubing F, Thomas S, Dahm R. High-efficiency transfection of mammalian neurons via nucleofection. *Nat Protoc.* 2007;2(7):1692-704.
 218. Stein SC, Woods A, Jones NA, Davison MD, Cabling D. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J.* 2000 Feb 1;345 Pt 3:437-43.
 219. Van Weeren PC, De Bruyn KMT, De Vries-Smits AMM, Van Lint J, Burgering BMT. Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB. *J Biol Chem.* 1998;
 220. Chung CT, Miller RH. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Apr 25; 16(8): 3580.
 221. Austin S, St-Pierre J. PGC1 α and mitochondrial metabolism - emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci.* 2012 Nov 1;125(Pt 21):4963-71.
 222. Santus P, Corsico A, Solidoro P, Braido F, Di Marco F, Scichilone N. Oxidative stress and respiratory system: Pharmacological and clinical reappraisal of N-acetylcysteine. *COPD.* 2014 Dec;11(6):705-17.
 223. Dasgupta B, Seibel W. Compound C/Dorsomorphin: Its use and misuse as an AMPK inhibitor. *Methods Mol Biol.* 2018;1732:195-202.
 224. Dunn CJ, Peters DH. Metformin: A Review of its Pharmacological Properties

- and Therapeutic Use in Non—Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Drugs*. 1995 May;49(5):721-49.
225. Sakoda H, Ogihara T, Anai M, Fujishiro M, Ono H, Onishi Y, et al. Activation of AMPK is essential for AICAR-induced glucose uptake by skeletal muscle but not adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 Jun;282(6):E1239-44.
 226. Viollet MDC and B. Editorial (Thematic Issue: AMPK: New Frontiers in Human Diseases). *Curr Drug Targets*. 2016;17(8):852.
 227. Chaturvedi RK, Beal MF. Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radic Biol Med*. 2013 Oct;63:1-29.
 228. Weisová P, Dávila D, Tuffy LP, Ward MW, Concannon CG, Prehn JHM. Role of 5'-Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase in Cell Survival and Death Responses in Neurons. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(10):1863–76.
 229. Poels J, Spasić MR, Callaerts P, Norga KK. Expanding roles for AMP-activated protein kinase in neuronal survival and autophagy. *Bioessays*. 2009 Sep;31(9):944-52.
 230. Wong E, Cuervo AM. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*. 2010 Jul;13(7):805-11.
 231. Anglade P. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol*. 1997;12(1):25–31.
 232. Yamano K, Matsuda N, Tanaka K. The ubiquitin signal and autophagy: an orchestrated dance leading to mitochondrial degradation. *EMBO Rep*. 2016;17(3):300–16.
 233. Li Y, Corradetti MN, Inoki K, Guan KL. TSC2: Filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem Sci*. 2004 Jan;29(1):32-8.
 234. Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The role of autophagy in cancer: Therapeutic implications. *Mol Cancer Ther*. 2011 Sep;10(9):1533-41.
 235. Blommaert EFC, Krause U, Schellens JPM, Vreeling-Sindelárová H, Meijer AJ. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*. 1997 Jan 15;243(1-2):240-6.
 236. Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells.

- Cell Struct Funct. 1998 Feb;23(1):33-42.
237. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: A double-edged sword. *Science*. 2004 Nov 5;306(5698):990-5.
238. Dorsey ER, Sherer T, Okun MS, Bloem DR. The emerging evidence of the Parkinson pandemic. *J Parkinsons Dis*. 2018;8(s1):S3-S8.
239. González-Hernández T, Barroso-Chinea P, De La Cruz Muros I, Del Mar Pérez-Delgado M, Rodríguez M. Expression of dopamine and vesicular monoamine transporters and differential vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons. *J Comp Neurol*. 2004 Nov 8;479(2):198-215.
240. Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain: II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain*. 1999 Aug;122 (Pt 8):1437-48.
241. Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of parkinson's disease: Dopamine, vesicles and α -synuclein. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Dec;3(12):932-42.
242. Sian-Hülsmann J, Mandel S, Youdim MBH, Riederer P. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2011 Sep;118(6):939-57.
243. Nagatsu T, Sawada M. Molecular mechanism of the relation of monoamine oxidase B and its inhibitors to Parkinson's disease: possible implications of glial cells. *J Neural Transm Suppl*. 2006;(71):53-65.
244. Zecca L, Wilms H, Geick S, Claasen JH, Brandenburg LO, Holzknicht C, et al. Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: Implications for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 2008;116(1):47-55.
245. Zucca FA, Basso E, Cupaioli FA, Ferrari E, Sulzer D, Casella L, et al. Neuromelanin of the human substantia nigra: An update. *Neurotox Res*. 2014 Jan;25(1):13-23.
246. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1990;54(3):823-7.
247. Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, Sato T, et al. Deficiencies in Complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Sep 29;163(3):1450-5.

248. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*. 2004;44(4):601–7.
249. Mann VM, Cooper JM, Daniel SE, Srai K, Jenner P, Marsden CD, et al. Complex I, Iron, and ferritin in Parkinson's disease substantia nigra. *Ann Neurol*. 1994 Dec;36(6):876-81.
250. Janetzky B, Hauck S, Youdim MBH, Riederer P, Jellinger K, Pantucek F, et al. Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 1994 Mar 14;169(1-2):126-8.
251. Penn AMW, Roberts T, Hodder J, Allen PS, Zhu G, Martin WRW. Generalized mitochondrial dysfunction in parkinson's disease detected by magnetic resonance spectroscopy of muscle. *Neurology*. 1995;45(11):2097–9.
252. Shults CW, Haas RH, Passov D, Beal MF. Coenzyme Q10 levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from Parkinsonian and nonparkinsonian subjects. *Ann Neurol*. 1997;42(2):261–4.
253. Khwanraj K, Madlah S, Grataitong K, Dharmasaroja P. Comparative mRNA Expression of eEF1A Isoforms and a PI3K/Akt/mTOR Pathway in a Cellular Model of Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis*. 2016;2016.
254. Kim C, Park S. IGF-1 protects SH-SY5Y cells against MPP+-induced apoptosis via PI3K/PDK-1/Akt pathway. *Endocr Connect*. 2018 Mar; 7(3): 443–455.
255. Newhouse K, Hsuan SL, Chang SH, Cai B, Wang Y, Xia Z. Rotenone-induced apoptosis is mediated by p38 and JNK MAP kinases in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Toxicol Sci*. 2004 May;79(1):137-46.
256. Fujimori K, Fukuhara A, Inui T, Allhorn M. Prevention of paraquat-induced apoptosis in human neuronal SH-SY5Y cells by lipocalin-type prostaglandin D synthase. *J Neurochem*. 2012;120(2):279–91.
257. Kalivendi S V., Kotamraju S, Cunningham S, Shang T, Hillard CJ, Kalyanaraman B. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced apoptosis and mitochondrial oxidant generation: Role of transferrin-receptor-dependent iron and hydrogen peroxide. *Biochem J*. 2003 Apr 1;371(Pt 1):151-64.
258. Fall CP, Bennett JP. Characterization and time course of MPP+-induced

- apoptosis in human SH- SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurosci Res.* 1999 Mar 1;55(5):620-8.
259. Halvorsen EM, Dennis J, Keeney PM, Sturgill TW, Tuttle JB, Bennett JP. Methylpyridinium (MPP⁺)- and nerve growth factor-induced changes in pro- and anti-apoptotic signaling pathways in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res.* 2002;952(1):98–110.
260. Sheehan JP, Palmer PE, Helm GA, Tuttle JB. MPP⁺ induced apoptotic cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells: An electron microscope study. *J Neurosci Res.* 1997 May 1;48(3):226-37.
261. Fiskum G, Starkov A, Polster BM, Chinopoulos C. Mitochondrial Mechanisms of Neural Cell Death and Neuroprotective Interventions in Parkinson's Disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Jun;991:111-9.
262. Kim DW, Lee KT, Kwon J, Lee HJ, Lee D, Mar W. Neuroprotection against 6-OHDA-induced oxidative stress and apoptosis in SH-SY5Y cells by 5,7-Dihydroxychromone: Activation of the Nrf2/ARE pathway. *Life Sci.* 2015;130:25–30.
263. Mei JM, Niu CS. Effects of CDNF on 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells via modulation of Bcl-2/Bax and caspase-3 activation. *Neurol Sci.* 2014 Aug;35(8):1275-80.
264. Wales SQ, Laing JM, Chen L, Aurelian L. ICP10PK inhibits calpain-dependent release of apoptosis-inducing factor and programmed cell death in response to the toxin MPP⁺. *Gene Ther.* 2008 Oct;15(20):1397-409.
265. Masserano JM, Gong L, Kulaga H, Baker I, Wyatt RJ. Dopamine induces apoptotic cell death of a catecholaminergic cell line derived from the central nervous system. *Mol Pharmacol.* 1996 Nov;50(5):1309-15.
266. He Y, Lee T, Leong SK. 6-Hydroxydopamine induced apoptosis of dopaminergic cells in the rat substantia nigra. *Brain Res.* 2000 Mar 6;858(1):163-6.
267. Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Djaldetti R, Liberatore G, Offen D, et al. Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Feb 27;98(5):2837-42.
268. Tatton NA, Kish SJ. In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra

- compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience*. 1997 Apr;77(4):1037-48.
269. Cosi C, Colpaert F, Koek W, Degryse A, Marien M. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors protect against MPTP-induced depletions of striatal dopamine and cortical noradrenaline in C57B1/6 mice. *Brain Res*. 1996 Aug 12;729(2):264-9.
270. Zuch CL, Nordstroem VK, Briedrick LA, Hoernig GR, Granholm AC, Bickford PC. Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion. *J Comp Neurol*. 2000 Nov 20;427(3):440-54.
271. Yamada M, Oligino T, Mata M, Goss JR, Glorioso JC, Fink DJ. Herpes simplex virus vector-mediated expression of Bcl-2 prevents 6-hydroxydopamine-induced degeneration of neurons in the substantia nigra in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 30;96(7):4078-83.
272. Mochizuki H, Goto K, Mori H, Mizuno Y. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 1996 May;137(2):120-3.
273. Tompkins MM, Basgall EJ, Zamrini E, Hill WD. Apoptotic-like changes in Lewy-body-associated disorders and normal aging in substantia nigral neurons. *Am J Pathol*. 1997 Jan;150(1):119-31.
274. Tatton NA, Maclean-Fraser A, Tatton WG, Perl DP, Warren CO. A fluorescent double-labeling method to detect and confirm apoptotic nuclei in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1998 Sep;44(3 Suppl 1):S142-8.
275. Tatton NA. Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2000 Nov;166(1):29-43.
276. Hartmann A, Troadec JD, Hunot S, Kikly K, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, et al. Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis. *J Neurosci*. 2001 Apr 1;21(7):2247-55.
277. Itano Y, Nomura Y. 1-Methyl-4-phenyl-pyridinium ion (MPP+) causes DNA fragmentation and increases the Bcl-2 expression in human neuroblastoma, SH-

- SY5Y cells, through different mechanisms. *Brain Res.* 1995 Dec 18;704(2):240-45.
278. Pettifer KM, Jiang S, Bau C, Ballerini P, D'Alimonte I, Werstiuk ES, et al. MPP⁺-induced cytotoxicity in neuroblastoma cells: Antagonism and reversal by guanosine. *Purinergic Signal.* 2007 Sep; 3(4): 399–409.
279. Anantharam V, Kaul S, Song C, Kanthasamy A, Kanthasamy AG. Pharmacological inhibition of neuronal NADPH oxidase protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced oxidative stress and apoptosis in mesencephalic dopaminergic neuronal cells. *Neurotoxicology.* 2007 Sep;28(5):988-97.
280. Hasegawa E, Takeshige K, Oishi T, Murai Y, Minakami S. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 Aug 16;170(3):1049-55.
281. Klaidman LK, Adams JD, Leung AC, Sam Kim S, Cadenas E. Redox cycling of MPP⁺: Evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. *Free Radic Biol Med.* 1993 Aug;15(2):169-79.
282. Cohen G. Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology.* 1984 Spring;5(1):77-82.
283. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 2014 Jul;94(3):909-50.
284. Chu ACY, Ho PWL, Kwok KHH, Ho JWM, Chan KH, Liu HF, et al. Mitochondrial UCP4 attenuates MPP⁺- and dopamine-induced oxidative stress, mitochondrial depolarization, and ATP deficiency in neurons and is interlinked with UCP2 expression. *Free Radic Biol Med.* 2009 Mar 15;46(6):810-20.
285. Lee CS, Han ES, Lee WB. Antioxidant Effect of Phenelzine on MPP⁺-Induced Cell Viability Loss in Differentiated PC12 Cells. *Neurochem Res.* 2003 Dec;28(12):1833-41.
286. Miwa H, Kubo T, Morita S, Nakanishi I, Kondo T. Oxidative stress and microglial activation in substantia nigra following striatal MPP⁺. *Neuroreport.* 2004 Apr 29;15(6):1039-44.

287. Nakamura K, Bindokas VP, Marks JD, Wright DA, Frim DM, Miller RJ, et al. The selective toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium to dopaminergic neurons: The role of mitochondrial complex I and reactive oxygen species revisited. *Mol Pharmacol*. 2000 Aug;58(2):271-8.
288. WU RM, Mohanakumar KP, Murphy DL, Chiueh CC. Antioxidant Mechanism and Protection of Nigral Neurons Against MPP⁺ Toxicity by Deprenyl (Selegiline). *Ann N Y Acad Sci*. 1994 Nov 17;738:214-21.
289. Mizuno Y, Sone N, Saitoh T. Effects of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine and 1-Methyl-4-Phenylpyridinium Ion on Activities of the Enzymes in the Electron Transport System in Mouse Brain. *J Neurochem*. 1987 Jun;48(6):1787-93.
290. Cassarino DS, Parks JK, Parker WD, Bennett JP. The parkinsonian neurotoxin MPP⁺ opens the mitochondrial permeability transition pore and releases cytochrome c in isolated mitochondria via an oxidative mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Jan 6;1453(1):49-62.
291. Lee DH, Kim CS, Lee YJ. Astaxanthin protects against MPTP/MPP⁺-induced mitochondrial dysfunction and ROS production in vivo and in vitro. *Food Chem Toxicol*. 2011 Jan;49(1):271-80.
292. Kakimura J ichi, Kitamura Y, Takata K, Kohno Y, Nomura Y, Taniguchi T. Release and aggregation of cytochrome c and α -synuclein are inhibited by the antiparkinsonian drugs, talipexole and pramipexole. *Eur J Pharmacol*. 2001 Apr 6;417(1-2):59-67.
293. Bilsland J, Roy S, Xanthoudakis S, Nicholson DW, Han Y, Grimm E, et al. Caspase Inhibitors Attenuate 1-Methyl-4-Phenylpyridinium Toxicity in Primary Cultures of Mesencephalic Dopaminergic Neurons. *J Neurosci*. 2002 Apr 1;22(7):2637-49.
294. Crompton M. Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2000 Aug;12(4):414-9.
295. Tatton WG, Olanow CW. Apoptosis in neurodegenerative diseases: The role of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Feb 9;1410(2):195-213.
296. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1312-6.

297. Glinka YY, Youdim MBH. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol.* 1995 Mar 16;292(3-4):329-32.
298. Votyakova T V., Reynolds IJ. $\Delta\Psi_m$ -dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem.* 2001 Oct;79(2):266-77.
299. Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* 1980 Nov 1;191(2):421-7.
300. Benecke R, Strümper P, Weiss H. Electron transfer complexes I and IV of platelets are abnormal in parkinson's disease but normal in parkinson-plus syndromes. *Brain.* 1993 Dec;116 (Pt 6):1451-63.
301. Haas RH, Nasirian F, Nakano K, Ward D, Pay M, Hill R, et al. Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1995 Jun;37(6):714-22.
302. Parker WD, Boyson SJ, Parks JK. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1989 Dec;26(6):719-23.
303. Perier C, Vila M. Mitochondrial biology and Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Feb;2(2):a009332.
304. Yoshino H, Nakagawa-Hattori Y, Kondo T, Mizuno Y. Mitochondrial complex I and II activities of lymphocytes and platelets in Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 1992;4(1):27-34.
305. Scarffe LA, Stevens DA, Dawson VL, Dawson TM. Parkin and PINK1: Much more than mitophagy. *Trends Neurosci.* 2014 Jun;37(6):315-24.
306. Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 2010 Jan 26;8(1):e1000298.
307. McCoy MK, Cookson MR. DJ-1 regulation of mitochondrial function and autophagy through oxidative stress. *Autophagy.* 2011 May; 7(5): 531–532.
308. Chen Y, Dorn GW. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science.* 2013 Apr 26;340(6131):471-5.
309. Choubey V, Safiulina D, Vaarmann A, Cagalinec M, Wareski P, Kuum M, et al. Mutant A53T α -Synuclein induces neuronal death by increasing mitochondrial

- autophagy. *J Biol Chem*. 2011 Mar 25;286(12):10814-24.
310. Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD, et al. Oxidative DNA Damage in the Parkinsonian Brain: An Apparent Selective Increase in 8-Hydroxyguanine Levels in Substantia Nigra. *J Neurochem*. 1997 Sep;69(3):1196-203.
 311. Pearce RKB, Owen A, Daniel S, Jenner P, Marsden CD. Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 1997;104(6-7):661-77.
 312. Fonck C, Baudry M. Toxic effects of MPP⁺ and MPTP in PC12 cells independent of reactive oxygen species formation. *Brain Res*. 2001 Jun 29;905(1-2):199-206.
 313. González-Polo RA, Soler G, Alonso JC, Rodríguez-Martín A, Fuentes JM. MPP⁺ causes inhibition of cellular energy supply in cerebellar granule cells. *Neurotoxicology*. 2003 Mar;24(2):219-25.
 314. Akaneya Y, Takahashi M, Hatanaka H. Involvement of free radicals in MPP⁺ neurotoxicity against rat dopaminergic neurons in culture. *Neurosci Lett*. 1995 Jun 23;193(1):53-6.
 315. Kones R. Parkinson's disease: Mitochondrial molecular pathology, inflammation, statins, and therapeutic neuroprotective nutrition. *Nutr Clin Pract*. 2010 Aug;25(4):371-89.
 316. Gispert S, Ricciardi F, Kurz A, Azizov M, Hoepken HH, Becker D, et al. Parkinson phenotype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration. *PLoS One*. 2009 Jun 3;4(6):e5777.
 317. Kim-Han JS, Antenor-Dorsey JA, O'Malley KL. The parkinsonian mimetic, MPP⁺, specifically impairs mitochondrial transport in dopamine axons. *J Neurosci*. 2011 May 11;31(19):7212-21.
 318. Turnley AM, Stapleton D, Mann RJ, Witters LA, Kemp BE, Bartlett PF. Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *J Neurochem*. 1999;72(4):1707-16.
 319. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism.

- Cell Metab. 2005 Jan;1(1):15-25.
320. Emerling BM, Weinberg F, Snyder C, Burgess Z, Mutlu GM, Viollet B, et al. Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. *Free Radic Biol Med.* 2009;46(10):1386–91.
 321. Anandhan A, Tamilselvam K, Vijayaraja D, Kumar NA, Rajasankar S, Manivasagam T. Resveratrol attenuates oxidative stress and improves behaviour in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) challenged parkinsonic mice. *Ann Neurosci.* 2010;17(3).
 322. Zimmermann K, Baldinger J, Mayerhofer B, Atanasov AG, Dirsch VM, Heiss EH. Activated AMPK boosts the Nrf2/HO-1 signaling axis - A role for the unfolded protein response. *Free Radic Biol Med.* 2015;88(Part B):417–26.
 323. Marinangeli C, Didier S, Vingtdoux V. AMPK in Neurodegenerative Diseases: Implications and Therapeutic Perspectives. *Curr Drug Targets.* 2016;17(8):890–907.
 324. 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.
 325. Sakamoto S, Miyara M, Sanoh S, Ohta S, Kotake Y. Mild MPP+ exposure-induced glucose starvation enhances autophagosome synthesis and impairs its degradation. *Sci Rep.* 2017;7.
 326. Lu M, Su C, Qiao C, Bian Y, Ding J, Hu G. Metformin prevents dopaminergic neuron death in MPTP/P-induced mouse model of Parkinson's disease via autophagy and mitochondrial ROS clearance. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2016;19(9):1–11.
 327. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 1997 Oct 17;91(2):231-41.
 328. Burke RE. Inhibition of Mapk and Stimulation of Akt Kinase Signaling Pathways : Two Approaches With. *Neurodegener Dis.* 2007;114(3):261–77.
 329. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt.

- Science . 1997;275(5300):661–5.
330. Crowder RJ, Freeman RS. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J Neurosci*. 1998;18(8):2933–43.
 331. Duronio V. The life of a cell: Apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J*. 2008 Nov 1;415(3):333–44.
 332. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol*. 2001;11(3):297–305.
 333. Markus A, Zhong J, Snider WD, Road MF, Hill C, Carolina N. Raf and Akt Mediate Distinct Aspects of Sensory Axon Growth. *Neuron*. 2002;35:65–76.
 334. Kwon CH, Luikart BW, Powell CM, Zhou J, Matheny SA, Zhang W, et al. Pten Regulates Neuronal Arborization and Social Interaction in Mice. *Neuron*. 2006;50(3):377–88.
 335. Read DE, Gorman AM. Involvement of Akt in neurite outgrowth. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Sep;66(18):2975–84.
 336. Namikawa K, Honma M, Abe K, Takeda M, Mansur K, Obata T, et al. Akt/protein kinase B prevents injury-induced motoneuron death and accelerates axonal regeneration. *J Neurosci*. 2000;20(8):2875–86.
 337. Grider MH, Park D, Spencer DM, Shine HD. Lipid raft-targeted Akt promotes axonal branching and growth cone expansion via mTOR and Rac1, respectively. *J Neurosci Res*. 2009;87(14):3033–42.
 338. Zheng W, Wang H, Zeng Z, Lin J, Little PJ, Srivastava LK, et al. The possible role of the Akt signaling pathway in schizophrenia. *Oncotarget*. 2017 Aug 8; 8(32): 53791–53803.
 339. Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol*. 2000;151(3):483–94.
 340. Ahn K-H, Kim Y-S, Kim S-Y, Huh Y, Park C, Jeong J-W. Okadaic acid protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis. *Neurosci Lett*. 2009;449(2):93–7.
 341. Eom SA, Kim DW, Shin MJ, Ahn EH, Chung SY, Sohn EJ, et al. Protective effects of PEP-1-Catalase on stress-induced cellular toxicity and MPTP-induced

- Parkinson's disease. *BMB Rep.* 2015;48(7):395–400.
342. Amato S, Liu X, Zheng B, Cantley L, Rakic P, Man HY. AMP-activated protein kinase regulates neuronal polarization by interfering with PI 3-kinase localization. *Science.* 2011;332(6026):247–51.
343. Kim B, Figueroa-Romero C, Pacut C, Backus C, Feldman EL. Insulin resistance prevents AMPK-induced tau dephosphorylation through akt-mediated increase in AMPK Ser-485 phosphorylation. *J Biol Chem.* 2015;290(31):19146–119157.
344. Kimura T, Tomura H, Sato K, Ito M, Matsuoka I, Im DS, et al. Mechanism and role of high density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2010;285(7):4387–97.
345. Leclerc GM, Leclerc GJ, Fu G, Barredo JC. 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.
346. Levine YC, Li GK, Michel T. 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(28):20351–64.
347. Sag D, Carling D, Stout RD, Suttles J. Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase Promotes Macrophage Polarization to an Anti-Inflammatory Functional Phenotype. *J Immunol.* 2008;181(12):8633–41.
348. Pantovic A, Krstic A, Janjetovic K, Kocic J, Harhaji-Trajkovic L, Bugarski D, et al. Coordinated time-dependent modulation of AMPK/Akt/mTOR signaling and autophagy controls osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone.* 2013;52(1):524–31.
349. Song YS, Narasimhan P, Kim GS, Jung JE, Park EH, Chan PH. The role of Akt signaling in oxidative stress mediates NF-κB activation in mild transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(12):1917–26.
350. Lingappan K. NF-κB in oxidative stress. *Curr Opin Toxicol.* 2018 Feb; 7: 81–86.
351. Jyrkkänen HK, Kansanen E, Inkala M, Kivela AM, Hurttila H, Heinonen SE, et al. Nrf2 regulates antioxidant gene expression evoked by oxidized phospholipids in endothelial cells and murine arteries in vivo. *Circ Res.* 2008;103(1).
352. Ji MH, Yong JL, So YL, Eun MK, Moon Y, Ha WK, et al. Protective effect of

- sulforaphane against dopaminergic cell death. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;321(1):249–56.
353. Van Muiswinkel FL, De Vos RAI, Bol JGJM, Andringa G, Jansen Steur ENH, Ross D, et al. Expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase in the normal and Parkinsonian substantia nigra. *Neurobiol Aging.* 2004;25(9):1253–62.
354. BEAL MF. Mitochondria, Oxidative Damage, and Inflammation in Parkinson's Disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;991(1):120–31.
355. Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): Chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem Biol Interact.* 2000;129(1–2):77–97.
356. Reznick RM, Zong H, Li J, Morino K, Moore IK, Yu HJ, et al. Aging-Associated Reductions in AMP-Activated Protein Kinase Activity and Mitochondrial Biogenesis. *Cell Metab.* 2007;5(2):151–6.
357. Kim TW, Cho HM, Choi SY, Sugaira Y, Hayasaka T, Setou M, et al. (ADP-ribose) polymerase 1 and AMP-activated protein kinase mediate progressive dopaminergic neuronal degeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Cell Death Dis.* 2013;4(11).
358. Ismaiel AAK, Espinosa-Oliva AM, Santiago M, García-Quintanilla A, Oliva-Martín MJ, Herrera AJ, et al. Metformin, besides exhibiting strong in vivo anti-inflammatory properties, increases mptp-induced damage to the nigrostriatal dopaminergic system. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016;298:19–30.
359. Kang SS, Zhang Z, Liu X, Manfredsson FP, He L, Iuvone PM, et al. α -Synuclein binds and sequesters PIKE-L into Lewy bodies, triggering dopaminergic cell death via AMPK hyperactivation. *Proc Natl Acad Sci.* 2017;114(5):1183–8.
360. Wakita S, Izumi Y, Nakai T, Adachi K, Takada-Takatori Y, Kume T, et al. Staurosporine induces dopaminergic neurite outgrowth through AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway. *Neuropharmacology.* 2014;77:39–48.
361. Bayliss JA, Lemus MB, Santos V V., Deo M, Davies JS, Kemp BE, et al. Metformin prevents nigrostriatal dopamine degeneration independent of AMPK activation in dopamine neurons. *PLoS One.* 2016;11(7).
362. Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: Conserved guardians of

- cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Oct;8(10):774-85.
363. Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, Codogno P. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie.* 2008;90(2):313–23.
364. Zhou Q, Liu C, Liu W, Zhang H, Zhang R, Liu J, et al. Rotenone induction of hydrogen peroxide inhibits mTOR-mediated S6K1 and 4E-BP1/eIF4E pathways, leading to neuronal apoptosis. *Toxicol Sci.* 2015;143(1):81–96.
365. Malagelada C, Jin ZH, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Greene LA. Rapamycin protects against neuron death in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2010;30(3):1166–75.
366. Xu Y, Liu C, Chen S, Ye Y, Guo M, Ren Q, et al. Activation of AMPK and inactivation of Akt result in suppression of mTOR-mediated S6K1 and 4E-BP1 pathways leading to neuronal cell death in in vitro models of Parkinson's disease. *Cell Signal.* 2014;26(8):1680–9.
367. Domanskyi A, Geißler C, Vinnikov IA, Alter H, Schober A, Vogt MA, et al. Pten ablation in adult dopaminergic neurons is neuroprotective in Parkinson's disease models. *FASEB J.* 2011;25(9):2898–910.
368. Chen L, Xu B, Liu L, Luo Y, Yin J, Zhou H, et al. Hydrogen peroxide inhibits mTOR signaling by activation of AMPK α leading to apoptosis of neuronal cells. *Lab Invest.* 2010;90(5):762–73.
369. Rieker C, Engblom D, Kreiner G, Domanskyi A, Schober A, Stotz S, 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(2):453–60.
370. Selvaraj S, Sun Y, Watt JA, Wang S, Lei S, Birnbaumer L, et al. Neurotoxin-induced ER stress in mouse dopaminergic neurons involves downregulation of TRPC1 and inhibition of AKT/mTOR signaling. *J Clin Invest.* 2012;122(4):1354–67.
371. Ravikumar B, Berger Z, Vacher C, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. Rapamycin pretreatment protects against apoptosis. *Hum Mol Genet.* 2006 Apr 1;15(7):1209-16.
372. Pan T, Kondo S, Zhu W, Xie W, Jankovic J, Le W. Neuroprotection of rapamycin in lactacystin-induced neurodegeneration via autophagy enhancement.

- Neurobiol Dis. 2008 Oct;32(1):16-25.
373. Pan T, Rawal P, Wu Y, Xie W, Jankovic J, Le W. Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction. *Neuroscience*. 2009 Dec 1;164(2):541-51.
374. Spencer B, Potkar R, Trejo M, Rockenstein E, Patrick C, Gindi R, et al. Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in α -synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *J Neurosci*. 2009 Oct 28;29(43):13578-88.
375. Tain LS, Mortiboys H, Tao RN, Ziviani E, Bandmann O, Whitworth AJ. Rapamycin activation of 4E-BP prevents parkinsonian dopaminergic neuron loss. *Nat Neurosci*. 2009 Sep;12(9):1129-35.
376. Dehay B, Bove J, Rodriguez-Muela N, Perier C, Recasens A, Boya P, et al. Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2010;30(37):12535-44.
377. Decressac M, Björklund A. MTOR inhibition alleviates L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *J Parkinsons Dis*. 2013;3(1):13-7.
378. Jiang J, Jiang J, Zuo Y, Gu Z. Rapamycin protects the mitochondria against oxidative stress and apoptosis in a rat model of Parkinson's disease. *Int J Mol Med*. 2013 Apr;31(4):825-32.
379. Santini E, Heiman M, Greengard P, Valjent E, Fisone G. Inhibition of mTOR signaling in parkinson's disease prevents L-DOPA-induced dyskinesia. *Sci Signal*. 2009 Jul 21;2(80):ra36.
380. Chu Y, Dodiya H, Aebischer P, Olanow CW, Kordower JH. Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: Relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiol Dis*. 2009 Sep;35(3):385-98.
381. Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, Caballero C, Ferrer I, Obeso JA, et al. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Arch Neurol*. 2010 Dec;67(12):1464-72.
382. Goker-Alpan O, Stubblefield BK, Giasson BI, Sidransky E. Glucocerebrosidase is present in α -synuclein inclusions in Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*. 2010 Nov;120(5):641-9.
383. Dehay B, Ramirez A, Martinez-Vicente M, Perier C, Canron MH, Doudnikoff E,

- et al. Loss of P-type ATPase ATP13A2/PARK9 function induces general lysosomal deficiency and leads to Parkinson disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jun 12;109(24):9611-6.
384. Xia Q, Liao L, Cheng D, Duong DM, Gearing M, Lah JJ, et al. Proteomic identification of novel proteins associated with Lewy bodies. *Front Biosci*. 2008;
385. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*. 2007 Aug 17;282(33):24131-45.
386. Lim J, Kim HW, Youdim MBH, Rhyu IJ, Choe KM, Oh YJ. Binding preference of p62 towards LC3-II during dopaminergic neurotoxin-induced impairment of autophagic flux. *Autophagy*. 2011;7(1):51–60.
387. Lim J, Lee Y, Jung S, Youdim MBH, Oh YJ. Impaired autophagic flux is critically involved in drug-induced dopaminergic neuronal death. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014 Jan;20 Suppl 1:S162-6.
388. Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, et al. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem*. 2000 May 26;275(21):16023-9.
389. Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Larsen KB, Awuh JA, Øvervatn A, et al. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem*. 2010 Jul 16;285(29):22576-91.
390. Keane H, Ryan BJ, Jackson B, Whitmore A, Wade-Martins R. Protein-protein interaction networks identify targets which rescue the MPP⁺ cellular model of Parkinson's disease. *Sci Rep*. 2015; 5: 17004.
391. Sukumaran P, Sun Y, Antonson N, Singh BB. Dopaminergic neurotoxins induce cell death by attenuating NF- κ B-mediated regulation of TRPC1 expression and autophagy. *FASEB J*. 2018 Mar;32(3):1640-1652.
392. Zhao M, Chen J, Mao K, She H, Ren Y, Gui C, et al. Mitochondrial calcium dysfunction contributes to autophagic cell death induced by MPP⁺ via AMPK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Feb 5;509(2):390-394.

Biografija

Maja Jovanović Tucović je rođena 16. novembra 1984. godine u Beogradu. Završila je Biološki fakultet, Univerziteta u Beogradu kao redovan student studijske grupe Molekularna biologija i fiziologija, na smeru Eksperimentalna biomedicina septembra 2010. Diplomski rad je odbranila pod nazivom „Ispitivanje citotoksičnog efekta i potencijalnih mehanizama delovanja dipropil- (S, S) –etilendiamin - N, N'-di-2-(3-cikloheksil) – propionate - η⁶ - (P - cimen) hloro - rutenijum (II) – heksafluorofosfata (As₃) kompleksa i njegovog prekursorskog liganda L4 na ćelijskoj liniji HL-60“ je odbranila septembra 2010. sa ocenom 10. Iste godine je upisala doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu, modul Molekularna medicina. Od januara 2011. godine je zaposlena kao istraživač pripravnik, kasnije i kao istraživač saradnik na projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije na projektima: evidencioni broj projekta III 41025: „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetski balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“, čiji je rukovodilac prof. dr Vladimir Trajković; i na projektu evidencioni broj projekta OI 175090: „Motorni i nemotorni simptomi parkinsonizma: kliničke, morfološke i molekularno-genetičke korelacije“ čiji je rukovodilac akademik prof. dr Vladimir Kostić.

U septembru 2011. godine dobila je DAAD stipendiju i učestvovala na međunarodnom skupu „Current Methods in Neurosciences“ “DAAD Workshop: Current Methods in Neurosciences”, Kotor, Crna Gora.

Od novembra 2011. do marta 2012. bila je na stručnom usavršavanju u Nemačkoj na Institutu za neurologiju, Edinger Institute, University Hospital Frankfurt.

U oktobru 2014. godine dobila je DAAD stipendiju za kraće naučno usavršavanje u laboratoriji prof. dr 2014. Steffen Roßner, Paul Flechsig Institute for Brain Research, University of Leipzig i prof. dr Rudolf Rübsamen, Institute of Biology, University of Leipzig, Nemačka.

Tokom izrade svoje doktorske teze, Maja Jovanović Tucović je uvela metodu amplifikacije plazida u ćelijama kompetentnih bakterija, umnožila banku kompetentnih bakterija, uvela i optimizovala tehniku direktnog ubacivanja pDNK, siRNK, shRNKu jedro ćelija primenom nukleopatora, uvela tehniku uređivanja gena CRISPR/Cas9 tehnologijom u cilju reprogramiranja αTC 1.6 u HEL ćelijskih linija i napravila banku primarnih fibroblasta poreklom od pacijenata sa retkim i neurološkim bolestima.

U periodu od marta do maja 2020. Maja Jovanović Tucović je učestvovala kao volonter, PCR analitičar u Laboratoriji za ispitivanje COVID-19 Direkcije za nacionalne referentne laboratorije u Batajnici.

Maja Jovanović Tucović je član više nacionalnih i međunarodnih naučnih društava. U novembru 2013. bila je deo organizacionog odbora VI Kongresa Društva za neuronauke Srbije sa međunarodnim učešćem. Autor je u 11 radova koji su štampani u domaćim i međunarodnim časopisima koji se nalaze na JCR listi. Ovi radovi su prema SCOPUS-u citirani 162 puta, a *h*-indeks je 6. Takođe, ona je autor u 51 radu koji su kao izvodi predstavljeni na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima.

Spisak skraćenica

10-DEBC hidrohlorid - 10-[4'-(N,N-dietilamino) butil]-2-hlorofenoksazin hidrohlorid

4E-BP1 - engl. *Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*

6-OHDA - 6-hidroksi dopamin

AACD – engl. *Aromatic L-amino acid decarboxylase*

ADP– engl. *Adenosine diphosphate*

AICAR - 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonukleotid

AIF - engl. *Apoptosis-inducing factor*

ALS - Autofagno-lizozomalnim sistem razgradnje

Ambra1 - engl. *Beclin 1-regulated autophagy protein 1*

AMP – engl. *Adenosine monophosphate*

AMPK – engl. *5' AMP-activated protein kinase*

Apaf-1 - engl. *Apoptotic protease activating factor 1*

ASK1 - engl. *Apoptosis signal-regulating kinase 1*

ATG - engl. *Autophagy related genes*

ATP- engl. *Adenosine triphosphate*

Baf - Bafilomicin A1

Bcl 2 proteina - engl. *B cell lymphoma 2*

BHA - butilirani hidroksianizol

BSA - engl. *Bovine serum albumin*

CAD – engl. *Caspase-activated DNase*

CaMKK β - Ca²⁺/kalmudin zavisna kinaza β

CMA – engl. *Chaperone mediated autophagy*

Comp C – Dezmetilprodin, engl. *Compound C*

CoQ₁₀ - koenzim Q₁₀

COX - Citohrom C oksidaza

CQ - Hlorokin

Cyt C - engl. *Cytochrome C*

DA - dopamin

DAT - Dopaminski transporter

DAT – Dopaminski transporter

DEPTOR - engl. *DEP domain containing mTOR-interacting protein*
DHE - Dihidroetidijum
DMSO - Dimetilsulfoksid
Drp1 - engl. *Dynamin-related protein 1*
EDTA - Etilendiamino-tetrasirćetna kiselina
eIF4E - engl. *Eukaryotic translation initiation factor 4E*
FCS – engl. *Fetal calf serum*
FOXO3 - engl. *Forkhead box O*
GCL - Glutamat cistein ligaza
GDP - engl. *Guanosine diphosphate*
GLUT4 - engl. *Glucose transporter type 4*
GSH - Glutation
GSK3 β - engl. *Glycogen synthase kinase 3 beta*
GTP – engl. *Guanosine-5'-triphosphate*
GWAS- engl. *Genome-wide association studies*
HO-1 - Hem oksigenaza-1
IAP – engl. *Inhibitors of apoptosis proteins*
IRS1 - engl. *Insulin receptor substrate 1*
LAMP-1 - engl. *Lysosome-associated membrane protein 2*
Levo-DOPA - L-DOPA
LKB1 - engl. *Liver kinase B1*
LPE – Lanac prenosilaca elektrona
LRRK2 - engl. *Leucine rich repeat kinase 2*
LT - Levijeva tela
MAO B - monoamin oksidaza B
MEM - engl. *Modified Eagle Medium*
Mff - mitohondrijalni fisioni faktor
Mfn1/2 - Mitofuzinom1/2
Mfp1 - mitohondrijalni fisioni protein 1
mLST8 - engl. *Mammalian lethal with sec-13 protein 8*
MPP+ - 1-metil-4-fenilpiridinijum
MPPP - 1-metil-4-fenil-4-propionokspiperidin

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
mSin1 - engl. *Mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1*
mTOR - engl. *Mechanistic target of rapamycin*
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid
NAC - N-acetilcistein
NaF - Natrijum fluorid
NaVO₃ - Natrijum ortovanadat
NBR1 - engl. *Neighbor of BRCA1 gene1*
NF-κB - engl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NQO1 - engl. *NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1*
Nrf2 – engl. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
Opa1 - engl. *Optic atrophy 1*
PB - Parkinsonova bolest
PDK1 kinaza - engl. *Phosphoinositide dependent kinase 1*
PE – engl. *Phosphatidylethanolamine*,
PEG - Polietilen glikol 3350
PGC1α - engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*
PI - Propidijum jodid
PI3K - engl. *Phosphatidylinositol 3-kinase*
PI3K - Fosfoinozitol-3 kinaza
PIC -Koktel inhibitora proteaza
PINK1 - engl. *PTEN-induced kinase 1*
PIP₂ - engl. *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*
PIP₃ - engl. *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*
PMSF - Fenil-metil-sulfonil-fluorid
PP2A - engl. *Protein Phosphatase 2A*
PP2C - *Protein Phosphatase 2C*
PQ - Parakvat
PRAS40 - engl. *Proline-rich Akt substrate 40 kDa*
Protor1/2 - engl. *Protein observed with rictor 1 and 2*
Raptor - engl. *Regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin*
RHEB - engl. *Ras homolog enriched in brain*

Rictor - engl. *Rapamycin-insensitive companion of mTOR*
ROS – Slobodni kiseonični radikali
RNaza – Ribonukleaza
SDS – engl. *Sodium dodecyl sulfate*
SGK1 - engl. *Serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1*
SNpc - *substantia nigra pars compacta*
SOD - superoksid dismutaza
TAK1 - engl. *Transforming growth factor-activated kinase-1*
TCA – engl. *Tricarboxylic acid cycle*
TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletlen-1,2-diamin
TFAM - engl. *Mitochondrial transcription factor A*
TFEB - Transkripcioni faktor EB
TH - Tirozin hidroksilaza
TSC2 - engl. *Tuberous Sclerosis Complex 2*
Tti1/Tel2 kompleks - engl. *TELO2 Interacting Protein 1 / telomere maintenance 2 complex*
ULK1/2 - engl. *Unc-51 like autophagy kinase 1/2*
UPS - Ubikvitin-proteazomski sistem
VMAT2 – Vezikularni monoaminski transporter 2
VSP35 - engl. *Vacuolar protein sorting-associated protein 35*
W - Vortmanin
wt – engl. *wild-type*
 α SYN - α -sinuklein

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a _____ Maja Jovanović Tucović
broj upisa _____ ds 5058/18

Izjavljujem

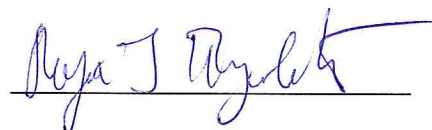
da je doktorska disertacija pod naslovom:

**Uloga kinaze aktivirane adenzin monofosfatom i protein kinaze B (PKB) u
neurotoksičnom oštećenju izazvanom 1-metil-4-fenil piridinijumom u uslovima *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.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 27.05.2020.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Maja Jovanović Tucović

Broj upisa: ds 5058/18

Studijski program: Molekularna medicina

Naslov rada: **Uloga kinaze aktivirane adenozin monofosfatom i protein kinaze B (PKB) u neurotoksičnom oštećenju izazvanom 1-metil-4-fenil piridinijumom u uslovima *in vitro***

Mentor: Prof. dr Ivanka Marković

Ko-mentor: Akademik prof. dr Vladimir Kostić

Potpisani: Maja Jovanović Tucović

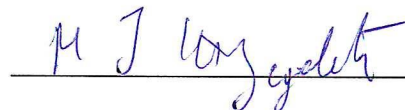
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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 doktoranda

U Beogradu, 27.05.2020.



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 i protein kinaze B (PKB) u neurotoksičnom oštećenju izazvanom 1-metil-4-fenil piridinijumom u uslovima *in vitro*

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima 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 doktoranda

U Beogradu, 27.05.2020.

