

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Katarina M. Arsikin Csordás

Uloga kinaze aktivirane adenozin monofosfatom i
mitogenom aktivirane protein kinaze p38 u
indukciji autofagije i smrti u ćelijama
neuroblastoma tretiranim oksidopaminom u
uslovima *in vitro*

Doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Katarina M. Arsikin Csordás

The role of adenosine monophosphate-activated
protein kinase and mitogen-activated protein
kinase p38 in autophagy and death induction in
neuroblastoma cells treated with oxidopamine *in*
vitro

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

MENTOR:

Prof. dr Vladimir Trajković

Redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR:

dr Ljubica Harhaji Trajković

Naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Aleksandra Isaković

Redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Silvana Andrić

Redovni profesor Prirodnomatematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu

dr Gordana Tovilović Kovačević

Viši naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije:

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i u laboratorijama Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Istraživanja predstavljena u disertaciji su realizovana u okviru projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Uloga autofagije u regulaciji smrti tumorskih ćelija“ pod rukovodstvom dr Ljubice Harhaji Trajković i „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetski balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“ pod rukovodstvom prof. dr Vladimira Trajkovića.

ZAHVALNICA

Prof. dr Vladimiru Trajkoviću dugujem veliku zahvalnost za dobro osmišljenu temu i ukazano poverenje i privilegiju da budem deo njegovog istraživačkog tima.

Zahvaljujem se dr Ljubici Harhaji Trajković na neposrednom rukovođenju, ogromnoj podršci i savetima prilikom osmišljavanja i realizacije ogleđa i pisanja disertacije.

Prof. dr Aleksandri Isaković želim da se zahvalim na savetima, strpljenju i bodrenju tokom izrade doktorske disertacije i korisnim savetima i pomoći pri oblikovanju konačne verzije disertacije.

Prof. dr Silvani Andrić se zahvaljujem na podršci i savetima, kao i na pažljivom čitanju i korisnim sugestijama tokom pisanja disertacije.

dr Gordani Tovilović Kovačević najusrdnije se zahvaljujem na posvećenom vremenu i dragocenoj pomoći tokom eksperimentalnog rada i pisanja disertacije.

Mojim dragim koleginicama i kolegama u Laboratoriji za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu: dr Neveni Zogović, dr Kristini Janjetović, dr Ljubici Vučićević, dr Maji Misirkić Marjanović, dr Biljani Ristić, dr Mihajlu Bošnjaku, dr Marini Milenković Stamenković, Milici Kosić, Milošu Mandiću, i, kao i svim ostalim kolegama i tehničkom osoblju, želim da zahvalim na pomoći, saradnji i pozitivnoj atmosferi u laboratoriji u toku izrade doktorske disertacije.

Deo eksperimenata za ovu disertaciju urađen je na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Veoma sam zahvalna svim koleginicama i kolegama na čelu sa prof. dr Ivankom Marković na kolegijalnosti i gostoprimstvu, kao i tehničkom osoblju ovog instituta sa kojima sam sarađivala.

Zahvaljujem se još jednom Milošu, Milici, Biljani i Marini, kao i sjajnom osoblju Studentske službe za doktorske studije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu koji su mi svojom predusretljivošću i saradnjom omogućili da najveći deo pisanja disertacije i administrativnih obaveza obavim „na daljinu“.

Mojoj najbližoj porodici, na безусловnoj podršci, razumevanju i veri na koje sam se oslanjala tokom izrade ove disertacije – Mama, Balázs, Nevenka, hvala vam do neba, od srca.

Uloga kinaze aktivirane adenozin monofosfatom i mitogenom aktivirane protein kinaze p38 u indukciji autofagije i smrti u ćelijama neuroblastoma tretiranim oksidopaminom u uslovima *in vitro*

SAŽETAK

Autofagija, razgradnja nepotrebnih/nefunkcionalnih unutarćelijskih komponenti u autolizozomima, kiselim organelama nastalim spajanjem autofagozoma i lizozoma, može biti citoprotektivna i citotoksična. U ovoj tezi ispitivana je uloga glavnog ćelijskog energetskog senzora protein kinaze aktivirane adenozin monofosfatom (AMPK) i mitogenom aktivirane protein (MAP) kinaze p38 u autofagiji i apoptozi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y izazvanoj mimetikom Parkinsonove bolesti 6-hidroksidopaminom (6-OHDA). 6-OHDA je indukovao apoptozu zavisnu od oksidativnog stresa i aktivacije kaspaza. Prisustvo autofagnih vezikula, zakišeljavanje citoplazme, autofagozomima asocirana konverzija LC3 proteina i razgradnja supstrata autofagne proteolize p62 ukazali su da 6-OHDA indukuje autofagiju. 6-OHDA je aktivirao AMPK i njegov supstrat Raptor, te inhibirao glavni supresor autofagije mTOR i njegov supstrat S6K, uprkos tome što je stimulisao mTOR aktivator Akt. Konverzija LC3, degradacija p62, zakišeljavanje citoplazme i inhibicija mTOR/S6K izazvani 6-OHDA poništeni su supresijom AMPK. Inhibicija AMPK i autofagije su smanjile, dok su inhibicije mTOR i Akt pojačale oksidativni stres i apoptozu indukovanu 6-OHDA. 6-OHDA je stimulisao MAP kinaze JNK, ERK i p38. Inhibicija JNK i ERK nisu imale uticaja, dok je inhibicija p38 suprimirala proapoptotsko dejstvo 6-OHDA, ali nije delovala na aktivnost AMPK i autofagiju. Sa druge strane, inhibicija AMPK smanjila je aktivaciju p38 u ćelijama tretiranim 6-OHDA. Antioksidans N-acetil cistein je inhibirao aktivaciju AMPK, p38 i autofagiju stimulisanu 6-OHDA. Navedeni rezultati ukazuju da bi oksidativnim stresom indukovana AMPK/mTOR zavisna citotoksična autofagija i AMPK/p38 zavisna apoptoza mogle biti pogodne mete za terapiju Parkinsonove bolesti.

Ključne reči: 6-hidroksidopamin, neurotoksičnost, AMPK, autofagija, MAPK, oksidativni stres

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK broj:

The role of adenosine monophosphate-activated protein kinase and mitogen-activated protein kinase p38 in autophagy and death induction in neuroblastoma cells treated with oxidopamine *in vitro*

ABSTRACT

Autophagy, the degradation of unused/dysfunctional cellular components in autolysosomes, acidic organelles created by fusion of autophagosomes and lysosomes, can be either cytotoxic or cytoprotective. Here we investigated the role of the main cellular energy sensor, AMP-activated protein kinase (AMPK) and mitogen activated protein (MAP) kinase p38 in autophagy and apoptosis caused by the Parkinsonian mimetic 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. 6-OHDA induced apoptosis dependent on oxidative stress and caspase activation. Presence of autophagic vesicles, cytoplasm acidification, autophagosome-associated conversion of LC3 protein, degradation of autophagic proteolysis substrate p62, all indicated that 6-OHDA induced autophagy. 6-OHDA activated AMPK and its substrate Raptor, and suppressed main autophagy inhibitor, mTOR and its target S6K, in spite of activating the mTOR-activating Akt. LC3 conversion, p62 degradation, cytoplasm acidification and mTOR/S6K inhibition caused by 6-OHDA were all abolished by AMPK suppression. Inhibition of AMPK and autophagy decreased, while inhibition of mTOR and Akt potentiated oxidative stress and apoptosis caused by 6-OHDA. 6-OHDA stimulated MAP kinases JNK, ERK and p38. Inhibition of JNK and ERK did not affect, while p38 inhibition reduced pro-apoptotic effects of 6-OHDA, although it did not influence AMPK activation nor autophagy. Conversely, AMPK inhibition mitigated p38 activation in 6-OHDA treated cells. Antioxidant N-acetyl cysteine suppressed activation of AMPK, p38 and autophagy stimulated by 6-OHDA. These results suggest that oxidative stress-induced, AMPK/mTOR-dependent cytotoxic autophagy and AMPK/p38-dependent apoptosis could be valid therapeutic targets for treating Parkinson's disease.

Keywords: 6-Hydroxydopamine, neurotoxicity, AMPK, autophagy, MAPK, oxidative stress

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Molecular medicine

UDC number:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. CILJEVI	9
3. MATERIJALI I METODE.....	10
3.1. REAGENSI I RASTVORI.....	10
3.1.1. Reagensi	10
3.1.2. Rastvori	10
3.2. ĆELIJE I KULTIVACIJA ĆELIJA	11
3.3. PRIMENJENE METODE.....	11
3.3.1. Određivanje broja i vijabilnosti ćelija.....	11
3.3.1.1. Test aktivnosti mitohondrijalnih dehidrogenaza (MTT test).....	11
3.3.1.2. Kristal violet test.....	12
3.3.1.3. Test oslobađanja laktat dehidrogenaze.....	12
3.3.2. Ispitivanje morfoloških karakteristika ćelija	13
3.3.2.1. Fazno kontrastna mikroskopija	13
3.3.3. Ultrastrukturalna analiza ćelija.....	13
3.3.3.1. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM).....	13
3.3.4. Analiza parametara ćelijske smrti.....	13
3.3.4.1. Određivanje tipa ćelijske smrti (apoptoza/nekroza).....	13
3.3.4.2. Merenje aktivacije kaspaza.....	14
3.3.5. Merenje unutarćelijske produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta.....	14
3.3.5.1. Određivanje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV).....	14
3.3.6. Detekcija autofagije u ćelijama obojenim akridin oranžom.....	14
3.3.6.1. Detekcija unutarćelijskog zakišeljavanja pomoću invertnog fluorescentnog mikroskopa.....	15
3.3.6.2. Detekcija autofagije pomoću protočnog citofluorimetra	15
3.3.7. Imunoblot analize	15
3.3.7.1. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima	15
3.3.7.2. Elektroforeza i transfer	16
3.3.7.3. Imunoblot i detekcija proteina	16
3.3.8. Utišavanje ekspresije gena pomoću RNK interferencije	17
3.3.8.1. Prolazna transfekcija kratkom interferirajućom RNK (engl. short interfering RNA, siRNA)	17
3.3.8.2. Transfekcija kratkom ukosničastom RNK (engl. short hairpin RNA, shRNA) ...	17
3.3.9. Statistička analiza	18
4. REZULTATI.....	19

4.1. 6-OHDA INDUKUJE APOPTOZU U SH-SY5Y ČELIJAMA ZAVISNU OD AKTIVACIJE KASPAZA I OKSIDATIVNOG STRESA	19
4.1.1. 6-OHDA smanjuje vijabilitet ćelija neuroblastoma.....	19
4.1.2. 6-OHDA indukuje apoptozu u SH-SY5Y ćelijama.....	19
4.1.3. 6-OHDA menja morfologiju SH-SY5Y ćelija neuroblastoma.....	20
4.1.4. Oksidopamin indukuje aktivaciju kaspaza i oksidativni stres u SH-SY5Y ćelijama ..	20
4.2. 6-OHDA IZAZIVA AUTOFAGIJU U SH-SY5Y ČELIJAMA.....	21
4.2.1. 6-OHDA indukuje akumulaciju kiselih vezikula u SH-SY5Y ćelijama.....	21
4.2.2. 6-OHDA indukuje konverziju LC3 i degradaciju p62 proteina u SH-SY5Y ćelijama	22
4.2.3. 6-OHDA indukuje pojavu vezikula sa delimično razgrađenim ćelijskim sadržajem u SH-SY5Y ćelijama	23
4.3. AUTOFAGIJA INDUKOVANA 6-OHDA ZAVISI OD AMPK/MTOR SIGNALNOG PUTA	24
4.3.1. 6-OHDA indukuje aktivaciju AMPK i Akt i supresiju mTOR u SH-SY5Y ćelijama	24
4.3.2. Oksidopaminom indukovana aktivnost AMPK odgovorna je za indukciju mTOR zavisne autofagije u SH-SY5Y ćelijama	26
4.3.3. 6-OHDA stimulira aktivnost Akt koja se suprotstavlja indukciji autofagije u SH-SY5Y ćelijama	27
4.4. 6-OHDA INDUKUJE CITOTOKSIČNU AUTOFAGIJU	28
4.4.1. Inhibicija autofagije suprimira citotoksično delovanje 6-OHDA u SH-SY5Y ćelijama	28
4.4.2. Stimulacija autofagije pojačava neurotoksično dejstvo 6-OHDA.....	31
4.5. AMPK AKTIVIRA, A AKT INHIBIRA CITOTOKSIČNO DELOVANJE AUTOFAGIJE INDUKOVANE OKSIDOPAMINOM	31
4.5.1. Indukcija citotoksične autofagije oksidopaminom u SH-SY5Y ćelijama posredovana je stimulacijom AMPK.....	31
4.5.2. Citotoksično delovanje AMPK stimulisane oksidopaminom posredovano je apoptozom zavisnom od aktivacije kaspaza i oksidativnog stresa.....	32
4.5.3. Aktivacija Akt štiti SH-SY5Y ćelije od toksičnog delovanja 6-OHDA.....	33
4.6. MAP KINAZA P38 UČESTVUJE U NEUROTOKSIČNOSTI 6-OHDA NEZAVISNO OD AUTOFAGIJE ..	35
4.6.1. 6-OHDA aktivira kinaze ERK i JNK.....	35
4.6.2. 6-OHDA aktivira MAP kinazu p38, koja deluje citotoksično	36
4.6.3. Aktivacija p38 je zavisna od AMPK, ali ne utiče na indukciju autofagije	37
4.7. OKSIDATIVNI STRES JE ODGOVORAN ZA POKRETANJE AMPK ZAVISNE CITOTOKSIČNE AUTOFAGIJE I AKTIVACIJE P38	38
4.7.1. Inhibicija oksidativnog stresa spašava neurone od citotoksičnog delovanja 6-OHDA	38
4.7.2. Antioksidans inhibira citotoksičnu autofagiju i aktivacije AMPK i p38 indukovane oksidopaminom	39
5. DISKUSIJA	40
6. ZAKLJUČCI	48
7. LITERATURA	49

1. UVOD

Parkinsonova bolest (PB) je neurodegenerativni poremećaj, u kome selektivno odumiru dopaminergički (DA) neuroni u *substantia nigra pars compacta* (SNpc), delu mozga koji je zadužen za kontrolu pokreta. Usled gubitka ovih neurona razvijaju se tremor u mirovanju, ukočenost i usporenost pokreta (Klockgether, 2004). Iako se često razmatra kao poremećaj motornog sistema, PB je zapravo kompleksno oboljenje sa raznovrsnim kliničkim manifestacijama, među kojima su i neuropsihijatrijski simptomi: gubitak kognitivnih funkcija i demencija, psihoze i halucinacije, depresija, anksioznost, apatija i drugi poremećaji raspoloženja, poremećaji sna, senzorni poremećaji i umor (Cubo i Goetz, 2014). Samo oboljenje je neizlečivo, ali se tremor i bradikinezija mogu prolazno otkloniti terapijom L dopaminom (L-DOPA) u kombinaciji sa karbidopom ili kombinacijom različitih dopaminskih agonista i inhibitora monoaminske oksidaze B u slučaju težih oblika bradikinezije (Dagda i sar., 2013). Međutim, smatra se da kada se pojave prvi simptomi bolesti već je odumrlo više od 90% DA neurona, što podvlači potrebu za razvojem novih dijagnostičkih procedura i biomarkera za dijagnostifikovanje PB u ranim fazama (Dagda i sar., 2013). Učestalost ovog oboljenja u opštoj populaciji je oko 0,3%, a oko 1% među starijima od 60 godina (Salari i Bagheri, 2019). Među obolelima 5-10% slučajeva može se pripisati genetičkim faktorima i danas je poznato oko 30 genskih lokusa čije su mutacije povezane sa povećanim rizikom od oboljevanja od PB (Salari i Bagheri, 2019). U njima se nalaze geni koji regulišu proteazomsku degradaciju proteina (parkin, *UCHL-1*), homeostazu mitohondrija (*PINK1*, *Omi/Htra*, *DJ-1*, *LRRK2*), funkciju lizozoma (*ATP13A2*), antioksidativni odgovor (*DJ-1*) i mitofagiju (*PINK1*, parkin) (Dagda i sar., 2013). Poznato je da neki pesticidi (rotenon) i herbicidi (parakvat), zbog toksičnog dejstva na DA neurone, mogu doprineti razvoju PB. Izlaganje nekim metalima, među kojima su gvožđe, mangan, cink i bakar, koji indukuju oksidativni stres i dovode do umiranja DA neurona u SNpc, takođe je faktor rizika za nastanak PB (Salari i Bagheri, 2019). Međutim, najveći broj slučajeva PB je nepoznatog porekla (Cubo i Goetz, 2014). Neuroni srednjeg mozga su posebno osetljivi na oksidativni stres indukovani toksinima, u poređenju sa drugim vrstama neurona i drugim tipovima ćelija u nervnom sistemu, što bi se moglo objasniti visokim sadržajem dopamina i neuromelanina, a relativno malim brojem mitohondrija (Dagda i sar., 2013). Tipične histopatološke pojave u mozgu obolelih od PB su gubitak većeg dela DA neurona u SNpc i prisustvo proteinskih inkluzija Luijevih tela u citoplazmi preostalih DA neurona (Cubo i Goetz, 2014). Luijeva tela su uglavnom sačinjena od α -sinukleina, proteina koji se inače nalazi u presinaptičkim završecima i reguliše vezikularni transport, kao i ubikvitina, parkina, PINK 1 (PTENom indukovana kinaza 1) i drugih manje zastupljenih proteina (Dagda i sar., 2013).

Uprkos tome što su neurohemijski defekti i neuropatološke karakteristike PB dobro proučeni, molekularni mehanizmi koji dovode do oštećenja neurona i dalje su nedovoljno poznati. Jedan od najčešće korišćenih toksina u eksperimentalnim modelima PB koji selektivno ubija DA i noradrenergičke neurone *in vivo* i *in vitro* je 6-hidroksidopamin (6-OHDA, oksidopamin) (Blum i sar., 2001). Prisustvo ovog hidroksilovanog analoga neurotransmitera dopamina pokazano je u mozgu čoveka i pacova (Senoh i sar., 1959; Curtius i sar., 1974), a detektovano je i u urinu obolelih od PB koji su na dugotrajnoj terapiji L-DOPA (Park i sar., 2013). Ranije se smatralo da se oksidopamin unosi dopaminskim i noradrenalinskim transporterima i tako akumulira u kateholaminergičkim neuronima (Simola i sar., 2007). Međutim, pokazano je da 6-OHDA oštećuje i ćelije koje nemaju pomenute receptore (Raicevic i sar., 2005), kao i da blokada ovih receptora na SH-SY5Y ćelijama ne umanjuje neurotoksično delovanje oksidopamina u kulturi neuroblastoma (Storch i sar., 1999). Za neurotoksično delovanje 6-OHDA najvećim delom su odgovorne reaktivne

kiseonične vrste (vodonik peroksid, superoksid i hidroksil radikal; nadalje RKV), koje nastaju autooksidacijom oksidopamina unutar i van ćelije (Cohen i Heikkila, 1974). Pored toga, delovanjem monoaminske oksidaze na oksidopamin u ćeliji oslobađa se H₂O₂, koji dalje reaguje sa gvožđem i od njega nastaje izuzetno reaktivni hidroksil radikal (Blum i sar., 2001). Oksidativni stres dovodi do peroksidacije lipida, dezintegracije citoskeleta i oštećenja DNK, što zajedno sa direktnom inhibicijom respiratornog lanca mitohondrija dovodi do apoptotične ili nekrotične smrti neurona (Klockgether, 2004; Blum i sar., 2001). 6-OHDA se razlikuje od drugih parkinsonovskih mimetika po tome što se njegova toksičnost ne bazira primarno na direktnom oštećenju mitohondrija i transportnog lanca elektrona (Dagda i sar., 2013). Oksidopamin dovodi do fisije mitohondrija, gubitka mitohondrija usled mitofagije i poremećaja dinamike mikrotubula (Kulich i sar., 2007; Dagda i sar., 2013). Još jedna specifičnost oksidopamina, u odnosu na druge PB toksine, je sposobnost da suprimira gene sa neuroprotektivnim efektom (Dagda i sar., 2013).

Autofagija je proces lizosomalne razgradnje unutarćelijskog sadržaja, prevashodno organela i dugoživećih proteina (Yorimitsu i Klionsky, 2005). Postoje tri vrste autofagije: makroautofagija, mikroautofagija i autofagija posredovana šaperonima, koje se razlikuju po načinu dopremanja supstrata do lizozoma (Nixon i Yang, 2012). Najveći kapacitet za selektivnu i neselektivnu razgradnju ima makroautofagija (nadalje u tekstu autofagija). Proces autofagije započinje formiranjem fagofore, strukture sačinjene od dvostruke membrane, a zatim od nje nastaje tzv. preautofagozomalna struktura (PAS). PAS se izdužuje, obuhvata deo citoplazme i formira autofagozom, vezikulu sa dvostrukom membranom. Spoljašnja membrana autofagozoma se fuzioniše sa lizozomskom ili membranom kasnog endozoma, čime nastaje autofagolizom/autolizom, odnosno amfizom (Nixon i Yang, 2012). Kod neurona autofagozomi se često fuzionišu sa kasnim endozomima u aksonu formirajući amfizom, koji se zatim retrogradnim transportom doprema do proksimalnih delova aksona i perikariona gde se spaja sa lizozomom (Nixon i Yang, 2012). U tako formiranim autolizozomima unutrašnji sadržaj organele, uključujući i unutrašnju membranu, razlaže se delovanjem lizozomalnih hidrolaza (Yorimitsu i Klionsky, 2005). Lizozomi se na kraju razgradnje ponovo formiraju od autolizozoma, dok mali organski molekuli, proizvodi razgradnje, kontinuirano prelaze u citosol (Nixon i Yang, 2012). Fiziološka uloga autofagije je uklanjanje nefunkcionalnih dugoživećih proteina i oštećenih organela (White, 2008). Poznato je da autofagija štiti ćelije od nedostatka energije i nutrijenata, ali i od patološke agregacije proteina (Nixon i Yang, 2012). Razgrađujući neesencijalne delove ćelije autofagija obezbeđuje aminokiseline, lipide i ostale metabolite neophodne za održavanje energetskog balansa i sintezu adaptivnih proteina (Nixon i Yang, 2012). Autofagija je uključena u različite fiziološke procese, kao što su npr. rast i diferencijacija ćelija (Yorimitsu i Klionsky, 2005), a pojačana autofagija se dovodi u vezu sa produženjem životnog veka različitih životinjskih modela (Nixon i Yang, 2012). Međutim, kada je autofagija preterano ili neadekvatno aktivirana, ili kada je aktivirana u ćelijama sa mutiranim genima za apoptozu, ona može biti i alternativni način umiranja ćelija (programirana ćelijska smrt tipa II) (Ghavami i sar., 2008; Ghavami i sar., 2010, Maycotte i Thorburn, 2011).

Autofagija je bitna za održavanje homeostaze u neuronima, ali preterana ili poremećena autofagija doprinosi njihovom umiranju u ishemijskim povredama mozga i različitim neurodegenerativnim oboljenjima, uključujući i PB (Batlevi i La Spada, 2011; Lee, 2012). Studija Dagda i saradnika je pokazala da delecija gena za Atg5 i Atg7 uzrokuje raširenu degeneraciju u mozgu pacova, čime je dokazano da autofagija ima zaštitnu ulogu u centralnom nervnom sistemu (Dagda i sar., 2013). Utvrđeno je da autofagija učestvuje u eliminaciji potencijalno toksičnih proteina i proapoptotskih molekula u različitim neurodegenerativnim bolestima (Nixon i Yang, 2012). U mišjem modelu Alchajmerove bolesti (AB) pokazano je prisustvo aktivirane kaspaze 3 u autofagozomima neurona (Nixon i Yang, 2012). Osim toga, utvrđeno je da mitofagija štiti neurone od apoptoze selektivnim uklanjanjem oštećenih mitohondrija (Nixon i Yang, 2012). Autofagija je u

neuronima konstitutivno aktivna, a autofagne vezikule (AV) su malobrojne, jer je lizozomalno razlaganje njihovog sadržaja veoma efikasno. Međutim, visok nivo bazalne autofagije čini neurone veoma osetljivim na bilo kakav poremećaj u razlaganju i uklanjanju autofagozoma (Dagda i sar., 2013). U skladu sa tim, pokazano je da mnogobrojna lizozomalna oboljenja prevashodno pogađaju mozak (Nixon i Yang, 2012). Velikoj osetljivosti na poremećaje u funkcionisanju lizozoma i autofagije doprinosi i dugovečnost neurona, kao i odsustvo mitoze, kojom bi se inače količina nakupljenog oštećenog i nefunkcionalnog materijala sukcesivno smanjivala (Nixon i Yang, 2012). Pokazano je da hronična izloženost oksidativnom stresu, koja se javlja kod mnogih neurodegenerativnih bolesti (AB, PB, amiotrofna lateralna skleroza–ALS, Hantingtonova bolest–HB i prionske bolesti), dovodi do poremećaja u regulaciji autofagije (Dagda i sar., 2013). Osim toga, autofagne vezikule moraju da pređu dugačak put kroz aksone da bi se spojile sa lizozomima u somi neurona, pa svako zaustavljanje proteolitičke aktivnosti lizozoma remeti transport AV i dovodi do njihove akumulacije u nastavcima i perikarionu (Nixon i Yang, 2012). Međutim, izučavanjem autofagije na isečcima moždanog tkiva teško je utvrditi da li je akumulacija autofagozoma posledica patološkog pojačanja autofagije ili inhibicije autofagnog fluksa i nakupljanja autofagozoma usled nemogućnosti fuzije sa lizozomima. Tako na primer, aberantno povećanje u broju ranih autofagnih vezikula i sniženi nivo beklina-1, koji su nađeni u neuronima obolelih od AB, ukazuju da supresija autofagnog fluksa doprinosi stvaranju nakupina fibrilarnih proteina i odumiranju zahvaćenih neurona (Dagda i sar., 2013). Nasuprot tome, povećanje broja autofagnih vezikula u somama i neuritima neurona obolelih od PB, sugeriše da preterano povećanje autofagnog fluksa doprinosi patogenezi ove bolesti (Dagda i sar., 2013). Tretman eksperimentalnih životinja sa MPTP (eng. *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*) ili neurona u kulturi sa MPP+ (eng. *1-methyl-4-phenylpyridinium*), koji predstavljaju mimetike Parkinsonove bolesti, takođe izaziva intenziviranje neurotoksične autofagije (Zhu i sar., 2007). Nasuprot tome, PB toksin parakvat zaustavlja autofagni fluks, što dovodi do nakupljanja disfunkcionalnih mitohondrija i indukcije α -sinukleopatija (Dagda i sar., 2013). Dakle, i preterano aktivirani autofagni fluks i supresija autofagije mogu proizvesti slične štetne efekte koji doprinose umiranju neurona (Dagda i sar., 2013).

Glavni negativni regulator autofagije je protein kinaza mTOR (eng. *mechanistic target of rapamycin*), koji suprimira ekspresiju i aktivaciju brojnih Atg (eng. *autophagy-related*) proteina neophodnih za indukciju i odvijanje procesa autofagije (He i Klionsky, 2009; Meijer i Codogno, 2004). Kod sisara u uslovima dostupnosti nutrijenata mTOR fosforiliše i inaktivira ULK1 i ULK2 (eng. *Unc-51-like kinase*) i Atg13. Prilikom gladovanja mTOR biva inhibiran, a ULK1 i ULK2 podležu autofosforilaciji i fosforilišu Atg13 i FIP200 (eng. *focal adhesion kinase family-interacting protein of 200kD*), sa kojima zajedno formiraju kompleks koji omogućava nastanak fagofore (He i Klionsky, 2009). Za nukleaciju i formiranje inicijalne fagoforne membrane neophodno je delovanje kompleksa PI3K (eng. *class III phosphatidylinositol 3-kinase*), koji se sastoji od fosfoinozimid 3-kinaze klase III (PI3K) Vps34 (eng. *vacuolar protein sorting 34*), kinaze p150, mAtg14 i beklina-1. U uslovima dostupnosti nutrijenata, Bcl-2 (eng. *B-cell lymphoma/leukemia-2*), antiapoptotski protein, inhibira autofagiju vezujući se za beklina-1, dok je disocijacija beklina-1 od Bcl-2 neophodna za indukciju autofagije (He i Klionsky, 2009). PI3K kompleks dalje mobilizuje na nascentnu fagoforu dva srodna konjugacijska sistema proteina nalik ubikvitinu: Atg12-Atg5-Atg16 i LC3-PE, koji regulišu elongaciju membrane i rast nastajućeg autofagozoma. Atg7, protein nalik E1 ligazi ubikvitinskog sistema, aktivira Atg12 i prebacuje ga na Atg 10, koji deluje kao E2 ligaza i kovalentno vezuje Atg12 za Atg5 protein. Za razliku od ubikvitinskog sistema, veza između Atg12-Atg5 je ireverzibilna i njen nastanak ne zahteva učešće ekvivalenta E3 ligaze. Atg12-Atg5 zatim formira kompleks sa Atg16, koji vezuje ceo kompleks za fagoforu (He i Klionsky, 2009). U drugom konjugacijskom sistemu, Atg4 proteolitički obrađuje LC3 protein (eng. *microtubule-associated protein 1 light chain 3*), sisarski homolog Atg8. Nakon toga, Atg7, u ulozi E1 ligaze, aktivira LC3 i prebacuje ga na Atg3 (ekvivalent E2 ligaze), a konjugat Atg12-Atg5 vezuje fosfatidiletanolamin

(eng. *phosphatidylethanolamine*, PE) za LC3, slično delovanju ligaze E3. Konverzija LC3 proteina iz citoplazmatske, solubilne forme LC3-I u membransku LC3-II formu tokom sazrevanja autofagozoma koristi se za eksperimentalno dokazivanje prisustva autofagije. Kada je autofagozom formiran, LC3-II, koji se nađe vezan za spoljašnju membranu, se odvajaju od fosfatidiletanolamina pomoću Atg4 i vraća u citosol. LC3 se direktno vezuje p62 (eng. *p62/sequestosome1-SQSTM1*) protein, čija je osnovna uloga da dopremi proteine obeležene ubikvitinom do autofagozoma (He i Klionsky, 2009). Sam p62 se degradira tokom autofagije, pa se smanjivanje njegove koncentracije u eksperimentalnim uslovima koristi kao dokaz efikasne autofagne degradacije (Bjorkoy i sar., 2009). Jedini transmembranski Atg protein, mAtg9 (eng. *mammalian Atg9*) dovodi membrane u neposrednu blizinu i omogućava njihovu fuziju (He i Klionsky, 2009). Osim što je posredovana „standardnim“ setom proteina koji su neophodnih za fuziju homotipskih vezikula, u fuziju autofagozoma i lizozoma uključeni su i proteini lizozomske membrane LAMP-2 (eng. *lysosome associated membrane protein-2*) i GTPaza Rab7. Sadržaj autolizozoma, kao i njegova unutrašnja membrana razgrađuju se kiselim hidrolazama, a odgovarajuće vakuolarne permeaze omogućavaju efluks aminokiselina i drugih malih molekula koji se oslobađaju hidrolizom (He i Klionsky, 2009).

Osim što je glavni supresor autofagije, mTOR je bitan za transkripciju, sintezu proteina, funkcionisanje citoskeleta, rast i proliferaciju ćelije (Shaw, 2009). Njegova aktivnost regulisana je koncentracijom faktora rasta, insulina, aminokiselina, kiseonika i nivoom energije u ćeliji (Switon i sar., 2017). Ova serin/treonin kinaza je zajednička katalitička subjedinica dva različita kompleksa: mTOR kompleksa 1 (mTORC1) i mTOR kompleksa 2 (mTORC2). Ključnu ulogu u regulaciji autofagije ima mTORC1, koji se kod sisara sastoji od 4 subjedinice: Raptor, PRAS40, mLST8 i mTOR. Raptor (eng. *regulatory associated protein of mTOR*), koji je osetljiv na imunosupresivni lek rapamicin, služi za pričvršćivanje supstrata, npr. eIF4E vezujućeg (eng. *binding*) proteina 1 - 4EBP1 i kinaze ribozomalnog proteina S6 (eng. *ribosomal protein S6 kinase, S6K*) za mTORC1 kompleks (Shaw, 2009). Posredstvom 4EBP1 mTORC1 reguliše proliferaciju ćelija (Inoki i sar., 2012). Aktivirana S6K fosforiliše raznovrsne supstrate preko kojih deluje na inicijaciju translacije, posttranskripcionu obradu iRNK i rast ćelije. Pokazano je da Raptor takođe deluje na unutarćelijsku lokalizaciju mTORC1 u odgovoru na dostupnost amino kiselina, što utiče na aktivaciju mTORC1 (Inoki i sar., 2012). Dva tumor supresora koji čine TSC kompleks (eng. *tuberous sclerosis complex*), TSC1 (hamartin) i TSC2 (tuberin) su ključni inhibitori mTORC1 kompleksa, a gubitak TSC1 ili TSC2 dovodi do hiperaktivacije mTORC1 (Shaw, 2009). Fosforilacija TSC kompleksa je mesto integracije različitih signala iz ćelije i spoljašnje sredine, koji regulišu aktivnost mTOR (Shaw, 2009). Protein kinaze koje su uključene u regulaciju rasta (Akt, ERK i druge) inhibiraju TSC2 i tako aktiviraju mTORC1 (Inoki i sar., 2012). Sa druge strane, glavni inhibitor mTORC1 je adenzin monofosfatom aktivirana protein kinaza (eng. *AMP-activated protein kinase, AMPK*) (Jung, Ro i sar., 2010; Ravikumar, Sarkar i sar., 2010).

U centralnom nervnom sistemu mTOR je bitan za rast, regeneraciju i mijelinizaciju aksona, kao i za ekspresiju jonskih i receptorskih kanala na neuronima. mTOR utiče na ekscitabilnost, sinaptičku plastičnost i različite više fiziološke funkcije neurona (Hoeffler i Klann, 2009). Shodno tome, disfunkcionalna aktivnost mTOR je primećena kod brojnih psihijatrijskih (depresija, shizofrenija) i neuroloških stanja i poremećaja (Daunov sindrom, epilepsija, povrede mozga, poremećaji iz autističnog spektra) (Bockaert i Marin, 2015; Ryskalin i sar., 2018). Izmenjena aktivnost mTOR je često prisutna u neurodegenerativnim oboljenjima. Kod obolelih od AB nađena je povećana aktivnost mTOR u delovima mozga zahvaćenim bolešću u odnosu na okolno tkivo, ali ne postoji saglasnost da li i kako ona doprinosi patogenezi AB (Bockaert i Marin, 2015; Garelick i Kennedy, 2010; Switon i sar., 2017). Rapamicin smanjuje neurotoksičnost poliglutamina u eksperimentalnim modelima (Garelick i Kennedy, 2010). Povećanje aktivnosti mTOR inhibira autofagiju i pojačava toksičnost mutantnog hantingtina, pa se može pretpostaviti da je inhibicija mTOR zaštitni mehanizam u HB (Garelick i Kennedy, 2010). Sa druge strane, kod životinjskih

modela, kao i u uzorcima tkiva obolelih od HB, aktivnost mTOR je smanjena (Garelick i Kennedy, 2010). Podaci vezani za ulogu mTOR u PB su dosta raznoliki i oprečni. U zavisnosti od glavnog uzroka patogeneze i stimulacija i inhibicija mTOR mogu doprinosti preživljavanju DA neurona (Bockaert i Marin, 2015; Garelick i Kennedy, 2010). Pojačano prisustvo REDD1, proteina koji inhibira mTOR, nađeno je u mozgovima obolelih od PB, kao i u različitim *in vitro* modelima sa MPTP i 6-OHDA, pri čemu je aktivacija mTOR delovala neuroprotektivno (Garelick i Kennedy, 2010). Nasuprot tome, rapamicin je poboljšao preživljavanje DA neurona životinja tretiranih MPTP (Garelick i Kennedy, 2010). Imajući u vidu nejasan odnos između aktivnosti mTOR i patogeneze PB, pretpostavlja se da inhibicija mTOR, iako je sama citoprotektivni mehanizam, sprečava aktivaciju drugih zaštitnih mehanizama (Garelick i Kennedy, 2010).

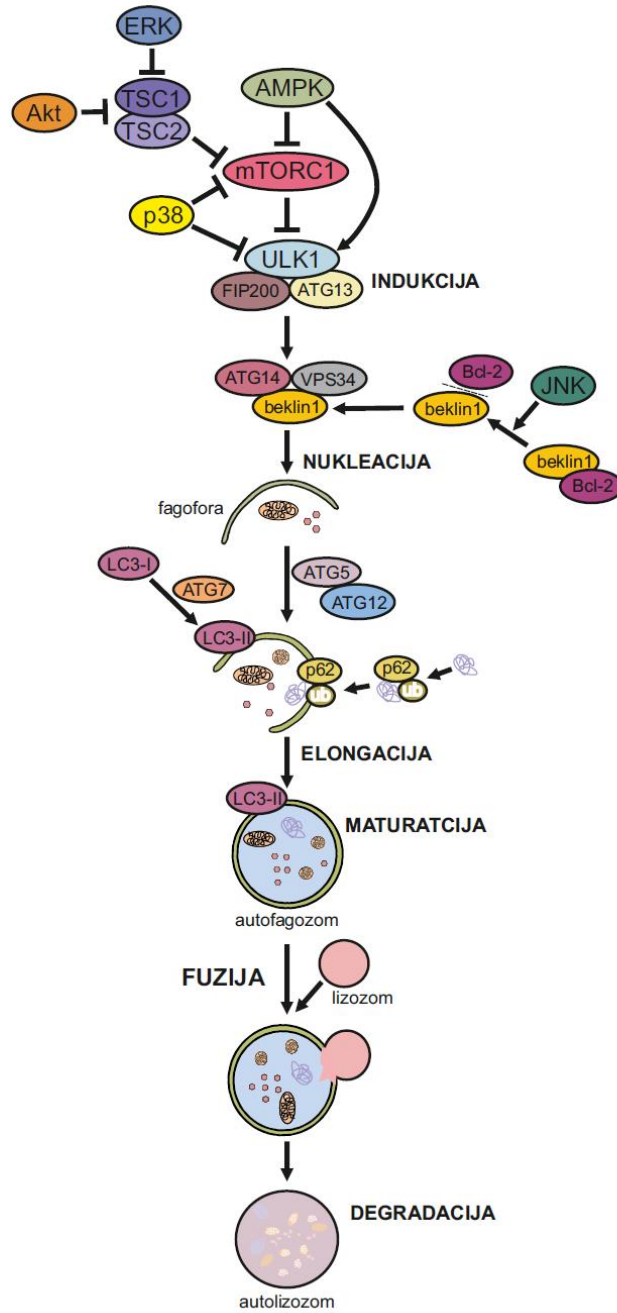
Jedan od osnovnih regulatora aktivnosti mTORC1 je AMPK, koja se kao glavni energetski senzor u ćeliji aktivira u uslovima energetskog stresa, odnosno povišenog odnosa AMP/ATP (Shaw, 2009). AMPK stimuliše kataboličke procese u kojima se stvara ATP, a inhibira anaboličke procese koji troše ATP (Mihaylova i Shaw, 2012). Ovaj enzim je heterotrimer i sastoji se od katalitičke α subjedinice i regulatornih β i γ subjedinica. Za kodiranje ovih subjedinica zaduženo je više gena. Sve verzije subjedinica su prisutne u mozgu, a njihova zastupljenost varira između različitih ćelijskih tipova (Amato i Man, 2011). U uslovima smanjene citosolne koncentracije ATP, AMP i ADP se direktno vezuju za γ regulatornu subjedinicu, što dovodi do konformacione promene koja omogućava fosforilaciju na treoninu 172. Neki autori smatraju da je ADP glavni signalni nukleotid za aktivaciju AMPK (Mihaylova i Shaw, 2012). Različite protein kinaze, među kojima su kinaza jetre B1 (eng. *liver kinase B1*, LKB1), Ca^{2+} /kalmodulin-zavisne kinaze β (eng. *calcium/calmodulin-dependent kinase* β , CaMKK β) i kinaza aktivirana transformišućim faktorom rasta β (eng. *transforming growth factor- β -activated kinase 1*, TAK1), mogu fosforilisati AMPK na treoninu 172 i postoje tkivno specifične preference prema određenim AMPK kinazama (Mihaylova i Shaw, 2012, Amato i Man, 2011, Li i McCullough, 2010). Za razliku od većine drugih tkiva, LKB1 ne igra važnu ulogu u fosforilaciji AMPK u neuronima (Mihaylova i Shaw, 2012). U eksperimentima sa farmakološkom inhibicijom CaMKK β , utvrđeno je da je ova AMPK kinaza glavni aktivator AMPK u mozgu pacova (Amato i Man, 2011). CaMKK β učestvuje u fiziološkim cerebralnim procesima, kao što je generisanje akcionog potencijala, a uključena je i u patološke pojave u neuronima (npr. ishemijskom indukovanim influsom Ca^{2+} kroz NMDA receptore) (Li i McCullough, 2010). Utvrđeno je da CaMKK β funkcioniše kao AMPK kinaza u hipotalamusu, regulišući uzimanje hrane, što znači da ova dva enzima praktično kontrolišu energetski balans celog organizma (Li i McCullough, 2010).

Kao ključni regulator energetske homeostaze na nivou ćelije, AMPK aktivacijom PI3K/Akt signalne kaskade pokreće transport glukoze i omogućava stvaranje energije u neuronima (Amato i Man, 2011). Pored toga što omogućava β oksidaciju masnih kiselina u mitohondrijama, AMPK aktivira PGC-1 α , transkripcioni koaktivator koji stimuliše transkripciju jedarnih gena neophodnih za biosintezu mitohondrija, te i na taj način doprinosi energetskoj homeostazi u neuronima (Amato i Man, 2011). Osim toga, AMPK utiče i na razvoj nervnog tkiva. Pokazano je da se miševi bez funkcionalne AMPK rađaju sa upola manjim mozgom i drugačijim udelom ćelijskih tipova u odnosu na fiziološko stanje (Amato i Man, 2011). U smislu efekta na preživljavanje neurona pogođenih raznim vrstama stresa, aktivnost AMPK može biti i zaštitna i citotoksična. Pretpostavlja se da ovo zavisi od tipa i specifičnosti neurona, prirode stresora, intenziteta i dužine aktivacije AMPK (Amato i Man, 2011). Farmakološka aktivacija AMPK poboljšava preživljavanje hipokampalnih neurona u odgovoru na nedostatak glukoze, hemijsku ishemiju i izlaganje glutamatu (Amato i Man, 2011). S druge strane, pokazano je da farmakološka inhibicija AMPK smanjuje oštećenje mozga prouzrokovano šlogom (Amato i Man, 2011). Poznato je da se u AB javljaju različiti poremećaji u energetskom metabolizmu, kao i da postoje oprečni rezultati o dejstvu AMPK na sintezu amiloida β (Amato i Man, 2011). Pokazano je i da AMPK indukuje fosforilaciju i

akumulaciju proteina tau (τ) i na taj način učestvuje u patogenezi AB (Amato i Man, 2011). Kod HB preterana aktivacija AMPK doprinosi umiranju neurona i formiranju Huntingtonovih agregata, dok supresija aktivnosti AMPK i blokada prelaska AMPK u jedro imaju zaštitni efekat na neurone (Amato i Man, 2011). Pored toga, važan način delovanja AMPK u uslovima enegetskog deficita je zaustavljanje rasta ćelije putem inhibicije mTORC1 kompleksa, što dovodi i do indukcije autofagije (Mihaylova i Shaw, 2012). AMPK zavisna autofagija ima dvojaku ulogu u preživljavanju neurona. Tako je na primer pokazano da AMPK zavisna autofagija deluje neuroprotektivno kada učestvuje u uklanjanju amiloid beta agregata (Vingtdeux i sar., 2010), a citotoksično u odgovoru na tretman neurotoksinima (Nakatsu i sar., 2010). *In vitro* eksperimenti na drugačijim modelima PB ukazuju da je snažna aktivacija AMPK, koja dovodi do indukcije zaštitne autofagije, važan deo neuroprotektivnog učinka resveratrola (Wu i sar., 2011).

Najvažniji aktivator mTORC1 je PI3 kinaza, čija je glavna uloga pospešivanje rasta ćelija i posredovanje efekata insulina na metabolizam. PI3K, preko PDK1 (eng. *phosphoinositide-dependent kinase-1*), aktivira Akt/protein kinazu B (PKB) (Shaw, 2009), koja zatim fosforiliše/inhibira TSC2 od koga se zatim oslobađa mTORC1, što dovodi do njegove aktivacije (Shaw, 2009). Akt je serin/treonin kinaza koja učestvuje u regulaciji metabolizma, proliferacije, rasta i preživljavanja ćelije (Rai i sar., 2019). Delovanje Akt se gotovo uvek dovodi u vezu sa preživljavanjem neurona (Rai i sar., 2019). Mnogi direktni supstrati koje ova kinaza inhibira fosforilacijom su proteini koji imaju ulogu u indukciji apoptoze. Najznačajniji među njima su: Bad – inhibitor antiapoptotskog Bcl-2 proteina, prokaspaza 9 i Forkhead, transkripcioni faktor koji učestvuje u indukciji apoptoze (Rai i sar., 2019). Takođe, postoje podaci da Akt inhibira proapoptotski signalni put JNK/p53/Bax (Rai i sar., 2019). Dakle, Akt pomaže preživljavanje neurona i na transkripcionom i posttranskripcionom nivou. U skladu s tim, u preostalim DA neuronima SNpc obolelih od PB nađeno je značajno smanjeno prisustvo aktivirane forme Akt u odnosu na zdrave kontrole (Greene i sar., 2011). Pored toga, studije su pokazale da je nivo aktivirane Akt kinaze, ali ne i ukupni nivo Akt, drastično smanjen u različitim eksperimentalnim *in vitro* modelima PB (Greene i sar., 2011).

Na aktivnost mTOR i indukciju autofagije mogu uticati i mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAP kinaze, MAPK) (Tchevkina i Komelkov, 2012). Ove serin/treonin kinaze su takođe uključene u regulaciju inflamacije, proliferacije, diferencijacije, preživljavanja i smrti ćelija. Kod sisara, MAP kinaze obuhvataju JNK (eng. *c-Jun N-terminal kinases*), ERK (eng. *extracellular signal-regulated kinase*) i p38 MAP kinazu, a svaka od njih postoji u više različitih izoformi. JNK1 i JNK2 se javljaju u većini tkiva, dok se JNK3 javlja prevashodno u neuronima. Od 4 izoforme MAPK p38 (p38- α , p38- β , p38- γ , p38- δ) najbitniju ulogu u neurodegenerativnim i inflamatornim oboljenjima ima p38- δ . ERK postoji u čak 8 izoformi (1-8) (Kim i Choi, 2015). Signalne kaskade MAPK sastoje se od barem 3 kinazne komponente: MAPK kinaza kinaza (MAP3K), MAPK kinaza (MAP2K) i MAPK. MAP3K fosforilišu i aktiviraju MAP2K, a onda one fosforilišu i aktiviraju određenu MAP kinazu, a aktivirana MAP kinaza zatim fosforiliše različite target proteine, među kojima su i transkripcioni faktori (c-Jun i c-Myc), antiapoptotski (Bcl-2) i proapoptotski proteini (Bad) (Kim i Choi, 2015). JNK i p38 signalni putevi se aktiviraju oksidativnim, genotoksičnim i osmotskim stresom, a mogu ih stimulisati i neke mikrobijalne komponente (bakterijski LPS) i proinflamatorni citokini (TNF- α , IL-1 β) (Kim i Choi, 2015). Isti set MAP3K kinaza aktivira i JNK i p38 signalnu kaskadu, koje nishodno od MAP3K divergiraju (Kim i Choi, 2015). ERK 1/2 se aktivira MEK 1/2 kinazom, a nju aktivira RAF, koga aktivira GTPaza Ras, koja reaguje na aktivaciju receptorske tirozin kinaze (Kim i Choi, 2015).



Shema 1. Interakcije komponenti mTORC1 sa AMPK, Akt i MAP kinazama, i molekularni mehanizam autofagije. Ovaj pojednostavljen prikaz pokazuje samo deo dokumentovanih interakcija među pomenutim signalnim putevima i njihov efekat na inicijaciju autofagije.

Poremećaji u MAPK signalnim putevima igraju važnu ulogu u različitim oboljenjima, između ostalih i u neurodegenerativnim bolestima kao što su AB, PB i ALS (Kim i Choi, 2015; Kim i Choi 2010). Prisustvo neurofibrilarnih klubadi u mozgu miševa koji preterano ekspimiraju α -sinuklein preklapa se sa povećanjem aktivnosti JNK i ERK (Kim i Choi, 2015). Nasuprot tome, kod mutiranih miševa kod kojih se javlja degeneracija DA neurona, aktivnost ERK 1/2 je smanjena u

substantia nigra, dok aktivnost JNK i p38 kinaze nije umanjena (Kim i Choi, 2015). Postoje brojni primeri koji pokazuju sposobnost MAP kinaza da regulišu autofagiju. Pokazano je da je indukcija autofagije hipoksijom regulisana AMPK/mTOR i PKC δ -JNK signalnim putevima (He i Klionsky, 2009). Takođe, poznato je i da ERK može da inaktivira TSC2 i tako aktivira mTORC1 kompleks (Shaw, 2009). JNK može indukovati autofagiju tako što fosforiliše Bcl-2, što dovodi do otpuštanja Bcl-2 od beklina-1, za koji se Bcl-2 vezuje (Maycotte i Thorburn, 2011). Osim toga, poznato je da u regulaciji indukcije autofagije različitim stimulusima učestvuje i p38. Pokazano je da p38 može da inhibira autofagiju preko ULK1 (He, She i sar., 2018), ali i da može da je aktivira inhibicijom mTOR (Zhu i sar., 2020). U brojnim studijama je pokazano da 6-OHDA indukuje aktivaciju MAPK u različitim vrstama neurona. Oksidopamin aktivira ERK u B65 ćelijskoj liniji neurona (Kulich i Chu, 2001), u neuronima miševa (Weng i sar., 2007) i pacova (Huang i sar., 2018), p38 u SH-SY5Y ćelijama i dopaminergičkim neuronima miševa (Gomez-Lazaro i sar., 2008; Tong i sar., 2018), i pacova (Huang i sar., 2018, Collins i sar., 2013), a JNK u SH-SY5Y (Chambers i sar., 2013) i PC12 ćelijskim linijama (Mnich i sar., 2010).

Dakle, poznato je da oksidopamin u neuronima indukuje citoprotektivnu (Lin i Tsai, 2017; He i sar., 2018; He i sar., 2021; Li i sar., 2016), ali i citotoksičnu autofagiju (Chung i sar., 2018; Li i sar., 2011). Takođe, poznato je da su AMPK i MAP kinaze bitne za regulaciju autofagije, ali njihova uloga u autofagiji indukovanoj 6-OHDA nije do sada ispitana. U ovoj studiji, ispitivana je uloga AMPK/mTOR signalnog puta i p38 MAP kinaze u autofagiji i ćelijskoj smrti indukovanoj 6-OHDA u SH-SY5Y ćelijskoj liniji humanog neuroblastoma.

2. CILJEVI

Ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije su sledeći:

1. Ispitati sposobnost 6-OHDA da indukuje autofagiju i smrt u SH-SY5Y ćelijama humanog neuroblastoma.
2. Ispitati uticaj 6-OHDA na aktivnost AMPK/mTOR signalnog puta i MAP kinaze p38 u SH-SY5Y ćelijama.
3. Ispitati ulogu AMPK/mTOR signalnog puta i MAP kinaze p38 u indukciji autofagije, oksidativnog stresa i smrti u SH-SY5Y ćelijama tretiranim oksidopaminom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Reagensi i rastvori

3.1.1. Reagensi

U izradi ove doktorske disertacije korišćeni su sledeći reagensi: serum fetusa govečeta (engl. *fetal calf serum*, FCS), medijumi za kultivaciju ćelija - MEM (engl. Modified Eagle Medium), Ham F12, L-glutamin, MEM neesencijalne aminokiseline, rastvor antibiotika i antimikotika (PAA, Linz, Austrija), natrijum piruvat (GIBCO), HEPES, tripsin (Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), etilendiamino tetrasirćetna kiselina (EDTA), 6-hidroksidopamin (6-OHDA), MTT (3-4,5dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid), dimetilsulfoksid (DMSO), Tween 20, Tris, natrijum acetat, triton X-100, p-nitrofenil fosfat, N-acetilcistein, bafilomicin-A1, hlorokin, 3-metiladenin, vortmanin, rapamicin, NH₄Cl, SB203580, SP600125, PD98059 (sve Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), kristal violet, H₃PO₄, HCl metanol, glicerol (Zorka, Šabac, Srbija), NaOH, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, KOH (Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika), jodonitrotetrazolijum hlorid, mlečna kiselina, N-metilfenazonijum metilsulfat, β-nikotinamid dinukleotid, aneksin V-fluorescein izotiocijanat (aneksin V-FITC), propidijum jodid (PI; BD Pharmingen, San Diego, SAD), ApoStat (R&D Systems, Minneapolis, SAD), dihidroetidijum (DHE; SigmaAldrich, St. Louis, SAD), dihidrorodamin 123 (DHR; Invitrogen), akridin oranž, albumin iz seruma govečeta (engl. bovine serum albumin, BSA), RNAza (Sigma-Aldrich), paraformaldehid, glutaraldehid (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska), akrilamid/bisakrilamid (30% w/v), N,N,N',N'-tetrametiletilen-1,2-diamin (TEMED) (Serva, Heidelberg, Nemačka), fenil-metil-sulfonil-fluorid (PMSF), natrijum ortovanadat, natrijum fluorid, koktel inhibitora proteaza, natrijum dodecil sulfat (engl. sodium dodecyl sulfate, SDS), bromfenol plavo, amonijumpersulfat, glicin, Coomassie Brilliant Blue G-250, odmašćeno mleko u prahu (Carl Roth, Karlsruhe, Nemačka), zečja antitela protiv formi LC3, p62, beclin-1, fosforilisanih i nefosforilisanih formi AMPK, mTOR, Raptor, p70S6K, Akt, JNK, ERK, p38 (Cell Signaling Technology, Danvers, SAD) i β-aktina (Abcam, Cambridge, SAD), kozji anti-zečji IgG konjugovan sa peroksidazom rena (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, SAD), Lipofektamin 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD), kratke ukosničaste RNK (engl. Short Hairpin RNA, shRNA) za utišavanje ekspresije gena za AMPK i LC3, kontrolna nasumična shRNA, reagens i medijum za transfekciju ćelija sa shRNA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, SAD), puromicin (Santa Cruz Biotechnology), komplet za prolaznu transfekciju kratkim interferirajućim RNK (engl. Short Interfering RNA, siRNA) za utišavanje ekspresije gena za Akt kinazu (Qiagen, Valencia, California, SAD).

Vreme inkubacije i koncentracije određenih agenasa su navedeni na slikama ili u legendama slika.

3.1.2. Rastvori

SH-SY5Y ćelije gajene su u sledećem medijumu: kombinovani MEM/Ham F12 (1:1) obogaćen sa 10% FCS, 2 mM L-glutaminom, rastvorom neesencijalnih aminokiselina, 100 IJ/ml penicilina, 100 µg/ml streptomycina i 0,25 µg/ml amfotericina B.

Za odvajanje ćelija od podloge korišćen je 0,25% rastvor tripsina u PBS-u (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ i 2 mM KH₂PO₄, pH7,4), uz dodatak 0,02% EDTA. Za brojanje ćelija je korišćen 0,1% rastvor tripan plavog u PBS.

Za ispitivanje citotoksičnosti, odnosno preživljavanja ćelija, određivanjem količine oslobođene laktat dehidrogenaze korišćen je rastvor sledećeg sadržaja: 54 mM mlečnu kiselinu, 0,28mM N-metilfenazonijum metilsulfat, 0,66 mM jodonitro-tetrazolijum hlorid i 1,3mM β-nikotinamid adenin dinukleotid u 0,2 M Tris puferu, pH8,2.

3.2. Ćelije i kultivacija ćelija

U ovom istraživanju, korišćena je komercijalna SH-SY5Y ćelijska linija humanog neuroblastoma nabavljena od Američke kolekcije ćelijskih kultura (American Type Culture Collection, SAD). Ova ćelijska linija dobijena je subkloniranjem iz prvobitne ćelijske linije SK-N-SH, poreklom od aspirata metastatske promene u kostnoj srži ženske osobe (Biedler i sar., 1973; Beidler i sar., 1978). Izabrana ćelijska linija smatra se dobrim eksperimentalnim modelom za izučavanje PB *in vitro*, jer poseduje neke od ključnih karakteristika dopaminergičkih neurona: sposobnost sinteze dopamina i noredrenalina (usled ekspresije tirozin hidrosilaze i dopamin β hidrosilaze), eksprimira dopaminski transporter (DAT) i dopaminski receptor (Xie i sar., 2010).

Ćelije su gajene u opisanom medijumu, u inkubatoru na temperaturi od 37°C, u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Po dostizanju konfluentnosti SH-SY5Y ćelije su blago tripsinizovane, centrifugirane i korišćene za eksperimente.

Za testove vijabilnosti SH-SY5Y ćelije su sađene u polistirenske pločice sa 96 bunarića sa ravnim dnom (Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka) u gustini od 1,5 x 10⁴ ćelija/bunaru, dok su za FACS analize sađene u polistirenske pločice sa 24 bunara sa ravnim dnom (Sarstedt) u gustini od 1,2 x 10⁵ ćelija/bunaru. Za imunoblot analize, uzorke za elektronsku mikroskopiju i transfekcije, SH-SY5Y ćelije su sađene u gustini od 1 x 10⁶ ćelija u Petrijeve posude prečnika 10 cm (Sarstedt) i tretirane nakon dostizanja 80% konfluentnosti.

3.3. Primenjene metode

3.3.1. Određivanje broja i vijabilnosti ćelija

Ukupan broj živih ćelija određivan je brojanjem pod mikroskopom u komori po Bürker-Türk-u nakon bojenja rastvorom boje tripan plavo. Pošto tripan plavo prodire u mrtve ćelije usled narušenog integriteta ćelijske membrane, one se boje plavo, i tako se mogu razlikovati od živih, nebojenih ćelija.

Za određivanje broja, odnosno udela živih ćelija nakon tretmana od 24 h, korišćene su niže opisane kolorimetrijske metode:

3.3.1.1. Test aktivnosti mitohondrijalnih dehidrogenaza (MTT test)

Ovaj test omogućava da se na osnovu količine određenog produkta delovanja mitohondrijalnih dehidrogenaza odredi broj živih ćelija u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije. MTT (3-4,5-

dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid) je tetrazolijumska so, koju mogu da redukuju samo dehidrogenaze u aktivnim mitohondrijama, u živim ćelijama. Na taj način nastaje obojeni produkt formazan, crveno-ljubičaste boje, čija se apsorbancija meri na 570nm.

Nakon završetka tretmana medijum je uklonjen, i u bunariće je naliveno po 50 µl rastvora MTT (0,5 mg/ml u medijumu). Posle inkubacije od 1 h na 37°C, supernatanti su odliveni, a naliven je DMSO (50 µl) koji rastvara nastali formazan. Na osnovu kolorimetrijskog merenja na automatskom čitaču mikrotitarskih ploča (Sunrise; Tecan, Männedorf, Švajcarska), određivan je intenzitet boje, od kog je oduzeta apsorbancija samog rastvora MTT. Intenzitet boje je srazmeran broju živih ćelija, koji se izražava kao postotak vijabiliteta kontrolne kulture (100%).

3.3.1.2. Kristal violet test

Kristal violet test omogućava određivanje relativnog broja adherentnih ćelija (Flick i Gifford, 1984). Kristal violet je bazna boja koja boji sve negativno naelektrisane polisaharide, proteine i nukleinske kiseline u ćelijama koje su ostale vezane za podlogu nakon tretmana. Zato je intenzitet apsorbancije boje koju zalepljene ćelije vežu direktno proporcionalan broju živih ćelija.

Na kraju odgovarajućeg tretmana kultura je isprana PBS-om da bi se odstranile neadherirane, mrtve ćelije, nakon čega su adherentne ćelije fiksirane metanolom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Potpuno osušene ploče, bez tragova metanola, nalivene su rastvorom kristal violeta (1%). Nakon kraće inkubacije na sobnoj temperaturi (10-30 minuta), boja je odlivena a ploče detaljno oprane u vodi, radi odstranjivanja zaostale boje. Posle sušenja, u ploče sa bunarićima je naliven 33% rastvor sirćetne kiseline. Sirćetna kiselina rastvara boju koju su primile fiksirane ćelije. Intenzitet nastale boje je određivan merenjem apsorbancije svetlosti (570 nm) na automatskom čitaču ploča za mikrotitraciju (Sunrise, Tecan), i proporcionalan je broju ćelija adheriranih za dno bunarića. Od svih vrednosti je oduzeta vrednost apsorbance rastvora same boje, iz bunarića bez ćelija. Rezultati kristal violet testa su sračunati u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije, čija je vijabilnost arbitrarno postavljena na 100%.

3.3.1.3. Test oslobađanja laktat dehidrogenaze

Usled narušavanja građe membrane umirućih ćelija, dolazi do oslobađanja citosolnog enzima laktat dehidrogenaze u okolinu, odnosno u medijum za kultivaciju (Raicevic i sar., 2005). Prisustvo ovog enzima u medijumu se meri preko njegove aktivnosti, kojom se iz niže opisanih jedinjenja dobija formazan, tamno crvene boje. Intenzitet boje je srazmeran broju ćelija sa oštećenom membranom u kulturi, i koristi se za procenu citotoksičnosti datog tretmana.

Po isteku tretmana, pripremljena je pozitivna kontrola, koju čini supernatant netretirane kulture, koja je u potpunosti lizirana pomoću deterdženta triton X-100 (3%), pa se računa kao najveća moguća vrednost LDH testa. Zatim je identična zapremina supernatanta iz svih bunarića preneti u drugu ploču, gde je pomešana sa istom zapreminom rastvora supstrata za LDH (54 mM L(+) laktat, 0,28 mM N-metilfenazonijum metilsulfat, 0,66 mM jodonitrotetrazolijum hlorid, 1,3 mM β-nikotinamid adenin dinukleotid koji su rastvoreni u 0,2 M Tris puferu, pH 8,2). Smeša je inkubirana oko 20 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbancija rastvora je očitana na automatskom čitaču ploča za mikrotitraciju (Sunrise, Tecan), na 492nm sa korekcijom na 592nm. Od svih vrednosti je oduzeta apsorbancija smeše medijuma iz bunarića bez ćelija i supstrata za LDH. Udeo mrtvih ćelija je računat po formuli:

$$\%C = [(E-S)/(M-S)] \times 100, \text{ gde je:}$$

E - apsorbancija tretiranih ćelija

S - apsorbancija kontrolnih ćelija

M - apsorbanacija pozitivne kontrole dobijene liziranjem sa triton X-100

C - citotoksičnost (broj ćelija sa narušenim integritetom ćelijske membrane)

3.3.2. Ispitivanje morfoloških karakteristika ćelija

3.3.2.1. Fazno kontrastna mikroskopija

Morfološke promene humane neuroblastomske ćelijske linije SH-SY5Y analizirane su pomoću fazno-kontrastnog mikroskopa (Leica Microsystems DMIL), uz korišćenje Leica Microsystems DFC320 kamera i Leica Application Suite (verzija 2.8.1), pri čemu je izabrano uveličanje od 20x.

3.3.3. Ultrastrukturna analiza ćelija

3.3.3.1. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)

Analiza prisustva vezikula i njihove strukture u SH-SY5Y ćelijama tretiranim 6-hidroksidopaminom rađena je pomoću transmisione elektronske mikroskopije (TEM). Ćelije su zasejavane u 60 mm Petri šolje, i nakon 24 h pod tretmanom su tripsinizirane, i centrifugirane u odgovarajućim epruvetama (500 g, 5 minuta). Ćelije su zatim resuspendovane u 1ml PBS i centrifugirane (200 g, 5 minuta), dva puta. Posle toga, ćelije su fiksirane 3% gluteraldehidom u PBS, ispirane u kakodilatnom puferu 30 minuta, a potom fiksirane 1% osmijum tetroksidom u trajanju od 1 h. Ćelije su opet isprane kakodilatnim puferom i ostavljene u uranil acetatu preko noći, na 4°C. Zatim je rađena dehidracija uzorka u alkoholima rastuće koncentracije. Ovako pripremljeni uzorci su prožeti smešom propilenoksida i EPON 812 (Agar Scientific). Usledilo je kalupljenje i sušenje, i zatim sečenje gotovog kalupa na ultramikrotomu. Prvo je napravljen polutanki isečak, koji je bojen toluidin plavim i na njemu je izabran deo koji će biti isečen za ultratanke isečke. Ultratanke isečki su hvatani na bakarne mrežice, kontrastirani uranil acetatom i olovo citratom, i analizirani na elektromikrografijama načinjenim pomoću transmisionog elektronskog mikroskopa (Morgagni 268D, FEI, Hillsboro, SAD).

3.3.4. Analiza parametara ćelijske smrti

Protočna citofluorimetrija omogućava analizu različitih ćelijskih parametara na pojedinačnim ćelijama. Različiti pokazatelji ćelijske smrti su procenjivani ovom metodom na aparatu FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Nemačka), nakon obeležavanja odgovarajućih ćelijskih struktura fluorescentnim molekulima. Svako merenje je obuhvatilo 10000 događaja, tj. ćelija po pojedinačnom uzorku za tretmane koji su rađeni u duplikatu ili triplikatu. Dobijeni podaci su analizirani korišćenjem softvera BD Cell Quest Pro (BD, Heidelberg, Nemačka).

3.3.4.1. Određivanje tipa ćelijske smrti (apoptoza/nekroza)

Za određivanje prisustva i tipa ćelijske smrti protočnom citofluorimetrijom, koriste se istovremeno dve fluorescentne boje, koje obeležavaju molekule specifične za datu pojavu. U ranoj fazi apoptoze, dolazi do povećanja prisustva fosfatidilserina na spoljašnjoj strani ćelijske membrane, čiji integritet u ovoj fazi nije narušen. Oštećenje ćelijske membrane, usled kojih ona postaje propustljiva i za velike molekule, karakteristično je za nekrozu, ali se javlja i u kasnoj

apoptozi kod ćelija gajenih u kulturi. Propidijum jodid (PI) se vezuje za DNK, pa tako boji samo ćelije čija je membrana dovoljno oštećena da omogući njegov ulazak u ćeliju. AneksinV, koji se specifično vezuje za fosfatidilserin, kuplovan je sa fluoroforom fluorescein izotiocijanatom (FITC), i obeležava ćelije u ranoj fazi apoptoze. Računa se da su aneksin-/PI- ćelije žive, aneksin+/PI- ćelije u ranoj fazi apoptoze, a aneksin+/PI+ ćelije u kasnoj fazi apoptoze ili nekrozi.

Nakon isteka tretmana i tripsinizacije, ćelije su centrifugirane 5 minuta na 500 g, a potom resuspendovane u 100 µl aneksin vezujućeg pufera u kome su rastvorene obe boje u odgovarajućoj koncentraciji (aneksin V-FITC 2 µg/ml i PI 20 µg/ml). Posle inkubacije od 15 minuta u mraku, u uzorke je naliveno po još 400 µl pufera, i odmah se pristupilo merenju na FACSCalibur protočnom citofluorimetru.

3.3.4.2. Merenje aktivacije kaspaza

Aktivirane kaspaze dovode do razgradnje brojnih ćelijskih proteina i fragmentacije DNK, pored ostalog, što u konačnici rezultira umiranjem ćelije apoptozom. Aktivaciju kaspaza, koja je karakteristična za pokretanje izvršne faze apoptoze, moguće je meriti primenom pan-kaspaznog inhibitora, Apostat. Apostat je konjugovan sa fluorescentnom bojom fluorescein izotiocijanatom (FITC), i konjugat može da prolazi kroz intaktnu ćelijsku membranu, pa se višak boje, koji se nije vezao za ciljne molekule može eliminisati ispiranjem. Dakle, izmereni intenzitet zelene fluorescence FITC je srazmeran količini aktiviranih kaspaza u ćeliji.

Posle završetka tretmana, tripsinizacije i centrifugiranja (5 minuta, 500 g), ćelije su resuspendovane u medijumu u koji je dodato 100 µl rastvora ApoStat (0,5 µg/ml). Nakon inkubacije u mraku 30 minuta na 37°C, ćelije su ponovo centrifugirane (5 minuta, 500 g) i resuspendovane u PBS, pa centrifugirane (5 minuta, 500 g) da bi se uklonio višak boje. Na kraju su ćelije resuspendovane u 500 µl PBS, i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati merenja su prikazani kao povećanje intenziteta zelene fluorescence u odnosu na kontrolu.

3.3.5. Merenje unutarćelijske produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta

3.3.5.1. Određivanje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV)

Za određivanje ukupne produkcije RKV, koristili smo neselektivnu redoks senzitivnu boju dihidrorodamin 123 (DHR), koja fluorescira zeleno (FL1), a za merenje produkcije superoksidnog anjona korišćena je fluorescentna boja dihidroetidijum (DHE; crvena fluorescenca, FL2). Prateći uputstva proizvođača, DHR je dodavan u ćelijske kulture na početku tretmana (finalna koncentracija 2 µM), po čijem isteku su ćelije tripsinizirane i centrifugirane (5 minuta, 500 g), pa oprane u PBS. S druge strane, DHE je dodavan u medijum nakon isteka tretmana (finalna koncentracija 20 µM), i inkubiran u mraku 30 minuta na 37°C. Zatim su ćelije tripsinizirane, centrifugirane (5 minuta, 500 g) i oprane u PBS. Na kraju su u oba slučaja ćelije resuspendovane u po 500 µl PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati merenja su prikazani u obliku histograma raspodele intenziteta fluorescence (FL1 za DHR, FL2 za DHE), pri čemu pomeraj histograma tretiranih ćelija udesno u odnosu na kontrolu ukazuje na povećanje produkcije RKV, odnosno superoksidnog anjona.

3.3.6. Detekcija autofagije u ćelijama obojenim akridin oranžom

Zakišeljavanje citoplazme ukazuje na porast broja i/ili zapremine kiselih vezikula kao što su autolizozomi i može ukazivati na aktivaciju autofagije. Ovaj fenomen analiziran je na

fluorescentnom mikroskopu i protočnom citofluorimetrijom nakon bojenja ćelija pH senzitivnom bojom akridin oranžom. Akridin oranž emituje narandžasto-crvenu fluorescencu (FL3) na kiselom pH, kakav je recimo u autolizozomima, dok na neutralnom pH, kakav je u citoplazmi, fluorescira zeleno (FL1).

3.3.6.1. Detekcija unutarćelijskog zakišeljavanja pomoću invertnog fluorescentnog mikroskopa

Nakon tretmana ćelije su oprane sa 0,5 ml PBS, i zatim inkubirane 30 min na 37 °C sa svežim medijumom u koji je dodat akridin oranž u finalnoj koncentraciji 1 µM. Posle inkubacije i jednog pranja u PBS, ćelije su analizirane na invertnom fluorescentnom mikroskopu (Leica Microsystems DMIL) koristeći Leica Microsystems DFC320 kameru i Leica Application Suite software. Autofagne vezikule sa niskim pH se vide kao crvene ili narandžaste fluorescentne vezikule u citoplazmi, dok se jedro boji zeleno na neutralnom pH.

3.3.6.2. Detekcija autofagije pomoću protočnog citofluorimetra

Radi analize na protočnom citofluorimetru ćelije su nakon tretmana i inkubacije sa akridin oranžom (1 µM akridin oranž dodat u medijum, 30 minuta na 37 °C) tripsinizirane, centrifugirane (500 g, 5 minuta), i na kraju resuspendovane u 500 µl PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru. Relativni odnos intenziteta narandžaste i zelene fluorescence (FL3/FL1) kod kontrolnih, netretiranih ćelija se arbitrarno uzima za 1, i poređenjem ovog odnosa između kontrole i tretiranih uzoraka se procenjuje u kojoj meri je došlo do povećanja kiselosti citoplaze, tj autofagije.

3.3.7. Imunoblot analize

Imunoblot (Western blot) je metoda za analizu aktivnosti i ekspresije proteina u uzorku, a zasniva se na elektroforetskom razdvajanju proteina po veličini, i detekciji proteina od interesa pomoću odgovarajućih antitela.

Najpre smo pripremili svež pufer za liziranje ćelija, koji sadrži koktel inhibitora 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). Po isteku inkubacije, ćelije su stavljene na led, i lizirane hladnim puferom za lizu. Da bismo osigurali potpuno razaranje ćelija, lizati su iz petri šolja prebačeni u odgovarajuće epruvete (sve na ledu), i držani na ledu još 15 minuta uz povremeno snažno mešanje. Usledilo je centrifugiranje lizata na 14000 g, 20 minuta, na 4°C. Zatim su supernatanti, koji predstavljaju ukupan ćelijski ekstrakt, izdvojeni za dalju analizu i čuvani na -20 °C do upotrebe.

3.3.7.1. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima

Koncentracija ukupnih proteina u lizatima određivana je metodom po Bradfordu (Bradford, 1976). Princip metode zasnovan je na osobini proteina da se u kiseloj sredini vezuju za boju Comassie Brilliant Blue G-250 i prevode je u anjonski oblik, pri čemu se apsorbanacija boje pomera iz crvene u plavu oblast vidljivog spektra. Intenzitet dobijene plave boje direktno je srazmeran koncentraciji proteina u uzorku.

Za konstruisanje standardne krive, pravljani su standardni rastvori goveđeg albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA) u Bradfordovom reagensu (0,1 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G-250, 5 % etanol, 10 % H₃PO₄ u vodi), od 5, 10, 15 i 20 mg/ml. Za merenje koncentracije proteina u uzorcima, u 2 ml Bradfordovog reagensa rastvarano je 2 µl uzorka (1:1000 razblaženje proteina iz uzorka). Apsorbancija je očitavana na čitaču za mikrotitarske ploče na 570 nm. Na osnovu

izmerenih apsorbanija standardnih rastvora, konstruisana je standardna kriva, i pomoću nje određene su koncentracije proteina u uzorcima.

3.3.7.2. Elektroforeza i transfer

Uzorci za elektroforezu su pripremljeni kuvanjem (5 minuta, 100 °C) određene zapremine ukupnog ćelijskog ekstrakta sa odgovarajućom zapreminom redukujućeg pufera za pripremu uzorka (finalne koncentracije sastojaka pufera u uzorku su bile: 2 % SDS, 10 % glicerol, 2 mM 2-merkaptotanol, 0,002 % bromfenol plavo, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8). Na ovaj način osigurava se denaturacija proteina, i sprečava formiranje disulfidnih veza u denaturisanim proteinima dodavanjem 2-merkaptotanola. Denaturisani proteini bivaju u potpunosti obloženi negativno naelektrisanim SDS molekulima, usled čega svi proteini zadobijaju jednako, negativno naelektrisanje. Stoga njihova elektroforetska mobilnost zavisi jedino od njihove molekulske mase.

Pripremljeni uzorci proteina su podvrgnuti elektroforezi na 8% (za analizu mTOR proteina), 10 % (za analizu Akt, beclin-1, p62, AMPK, S6K, JNK, ERK, Raptor proteina i aktina) ili 12 % (za analizu p38 MAPK i LC3 proteina) poliakrilamidnom gelu. Na gel su nanošene jednake količine proteina (5 µg-20 µg, zavisno od analiziranog proteina). Uzorci su nalivani u bunariće u gelu za sabijanje proteina (4 % akrilamid/0,14 % bisakrilamid, 0,1 % SDS, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8), koji je prethodno naslojen na gel za razdvajanje proteina (10 % akrilamid/0,34 % bisakrilamid ili 12 % akrilamid/0,41 % bisakrilamid, 0,1 % SDS, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8). Kao katalizatori polimerizacije gelova korišćeni su 0,05 % amonijumpersulfat i 0,033 % TEMED. Puffer za elektroforezu se sastojao od 192 mM glicina, 0,1 % SDS i 25 mM Tris-HCl, pH 8,3. Elektroforetsko razdvajanje je trajalo oko 90 minuta, pri konstantnom naponu: prvih 20 minuta primenjivan je konstantni napon od 100 V, a nakon prolaska uzoraka kroz gel za sabijanje proteina, napon je povećan na 150 V. Uzorci su putovali kroz gel do izlaska fronta boje bromfenol plavo sa gela. U cilju detektovanja proteina određenih molekulskih težina nakon transfera, na svaki gel je naneta i smeša referentnih proteina poznatih molekulskih masa (10 - 250 kDa, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; BioRad, Marnes-laCoquette, Francuska).

Odmah nakon završetka elektroforeze, pristupili smo transferu proteina sa gela na nitrocelulozne membrane (Hybond C; GE Healthcare, Little Chalfont, Velika Britanija) pomoću aparature za polusubi transfer (TE 70 Semi-dry transfer unit, Amersham Biosciences). U aparaturu za transfer je postavljan tzv. „sendvič“: na donju, pozitivnu elektrodu je sagan prvo sloj visoko adsorbujućeg filter papira koji je prethodno natopljen pufferom za transfer (192mM glicin, 20% metanol i 25 mM Tris-HCl, pH 8,3). Na filter papir je postavljana nitrocelulozna membrana, koja je pre toga inkubirana oko 5 minuta u pufferu za transfer, i na nju je stavljan gel, isto prethodno ispran malom količinom pufera za transfer. Preko gela je stavljan opet sloj visoko adsorbujućeg filter papira natopljenog pufferom, koji se je na kraju u dodiru sa negativnom elektrodom. Nakon sastavljanja „sendviča“ i sklapanja aparature, pokrenut je transfer pomoću struje konstantne jačine (0.8 mA/cm² membrane), koji se odvijao na sobnoj temperaturi, u trajanju 90 minuta. Tokom transfera, negativno naelektrisani proteini putuju sa gela ka membrani, koja se nalazi prema anodi. Membrana zaustavlja proteine i oni se hidrofobnim interakcijama vezuju za nju.

3.3.7.3. Imunoblot i detekcija proteina

Po završetku transfera delovi membrane sa proteinima od interesa su inkubirani 60 minuta na sobnoj temperaturi u 5 % rastvoru nemasnog mleka u Tris pufferu (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6) sa 0.05 % Tween 20 deterdženta (nadalje TBST). Na taj način su blokirana nespecifična mesta vezivanja proteina na membranama. Nakon blokiranja preko noći membrane su inkubirane na +4°C uz blago mešanje sa primarnim zečjim antitelima na LC3 (1:900), p62 (1:1000), beclin-1 (1:1000), fosfo-S6K (pS6K, 1:1000), S6K (1:1000), fosfo-Akt (pAkt, 1:1000), Akt (1:1000), fosfo-

AMPK (pAMPK, 1:1000), AMPK (1:1000), fosfo-Raptor (p-Raptor, 1:1000), Raptor (1:1000), fosfo-mTOR (pmTOR, 1:1000), mTOR (1:1000), fosfo-JNK (p-JNK, 1:500), JNK (1:1000), fosfo-ERK (p-ERK, 1:500), ERK (1:1000), fosfo-p38 (p38, 1:500), p38 (1:1000), aktin (1:8000). Zatim su usledila 3 ispiranja od po 10 minuta u TBST, a membrane su potom inkubirane na sobnoj temperaturi 75 minuta sa anti-zečjim IgG antitelom, konjugovanim sa peroksidazom rena (1:5000). Nakon završene inkubacije membrane su ponovo isprane 3 puta po 10 minuta u TBST-u i prelivane 3 minuta supstratom za peroksidazu rena (ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, SAD). Peroksidaza, koja je vezana za sekundarno antitelo, razlaže H₂O₂ iz supstrata do kiseonika i vode. Kiseonik reaguje sa luminolom iz supstrata uz nastanak 3-aminofalata, koji emituje foton. Nastala svetlost je zabeležena pomoću rendgenskog filma (Hyperfilm™ ECL; GE Healthcare). Intenzitet hemiluminiscence je direktno proporcionalan količini ispitivanog proteina koja je vezana za membranu. Nakon razvijanja filma, ekspresija proteina kvantifikovana je optičkom denzitometrijom pomoću ImageJ softvera. Aktivnost Akt, ERK, JNK, AMPK, S6K, p38, Raptor i mTOR proteina je izražena deljenjem optičke gustine trake fosforilisane forme sa optičkom gustinom trake totalne forme proteina, a u slučaju markera autofagije, beclin-1 i p62 gustina trake beklina-1 i p62 je deljena sa optičkom gustinom aktina. Za LC3 protein, optička gustina donje trake (LC3-II) deljena je optičkom gustinom gornje trake (LC3-I). Rezultati su predstavljeni u odnosu na kontrolu kojoj je arbitarno dodeljena vrednost jedinice.

3.3.8. Utišavanje ekspresije gena pomoću RNK interferencije

3.3.8.1. Prolazna transfekcija kratkom interferirajućom RNK (engl. *short interfering RNA*, siRNA)

Ovaj način regulacije genske ekspresije koristi težnju ćelija da što brže razgrade dvolančane RNK zavojnice u cilju smanjivanja populacije iRNK molekula za određeni gen, što onda dovodi do smanjenja translacionih produkata date iRNK, i umanjenog prisustva tog proteina u ćeliji.

Radi inhibicije ekspresije Akt kinaze, SH-SY5Y ćelije su transfektovane siRNA koje ciljaju Akt iRNK (Akt-), ili kontrolnom siRNA, pomoću transfekcionog reagensa Lipofektamina 2000. Pre transfekcije ćelije su zasejavane u ploče sa 96 bunarića, za merenje vijabilnosti, i petrijeve posude, za proveru efikasnosti transfekcije. Nakon dostizanja 70% konfluentnosti, u medijum je dodata pripremljena smeša siRNA i transfekcionog reagensa. Smeša siRNA i lipofektamina napravljena je po uputstvima proizvođača – u Opti-MEM medijumu bez seruma i antibiotika rastvoreni su zasebno transfekcioni reagens u razblaženju 1:350 i siRNA molekuli (100 nM). U sledećem koraku ova dva rastvora su pomešana u odnosu 1:1. Transfekcioni kompleksi RNA molekula i lipida iz transfekcionog reagensa nastaju spontano, i nakon inkubacije od 20 min na sobnoj temperaturi, transfekcioni kompleksi su dodati u medijum u kome je gajena ćelijska kultura. 24h posle transfekcije, ćelije su tretirane kako je opisano u legendama slika, i po isteku naznačenog vremena merena im je vijabilnost, odnosno lizirane su za uzorke za imunoblot.

3.3.8.2. Transfekcija kratkom ukosničastom RNK (engl. *short hairpin RNA*, shRNA)

Transfekcija shRNA obezbeđuje veći broj ćelija za eksperimente, i veći broj pasaža sa suzbijenom ekspresijom određenih gena, pa je ovaj pristup izabran za dobijanje ćelija sa utišanim genima za važne autofagne molekule AMPK i LC3. Koristili smo LC3β shRNA, za utišavanje ekspresije LC3B, koji je najbolje proučeni ortolog Atg8 kod sisara i neophodan za odvijanje autofagije (Schaaf i sar., 2016). Princip ove metode je da se plazmidi sa ekspresionim vektorom za izabrani gen ili za kontrolnu shRNA, koji takođe sadrže i gen za otpornost na određeni selekcion

agens unose u ćelije i nasumično ugrađuju u genom ćelije. Ćelije kod kojih je plazmid uspešno ugrađen u genom, sintetišu shRNK, koja putem RNK intereferencije utišava ekspresiju odgovarajućeg gena, i uz to stiču rezistenciju na predviđeni selekcionni agens, najčešće antibiotik. Dalje gajenje i pasažiranje ćelija sprovodi se u medijumu sa selekcionim antibiotikom, kako bi se umnožavale samo ćelije sa funkcionalno integrisanim plazmidom.

SH-SY5Y ćelije su gajene u pločama sa 6 bunara (20×10^4 ćelija po bunaru) u standardnom medijumu, ali bez antibiotika. Nakon 24 sata kada su ćelije bile oko 60 % konfluentne, transfektovane su AMPK shRNA, odnosno LC3 shRNA, i kontrolnom shRNA, koristeći odgovarajući transfekcioni reagens i medijum sa redukovanim sadržajem seruma prema uputstvima proizvođača. Da bismo pripremili transfekcione komplekse, pripremili smo rastvor A: 1 μg shRNA plazmidske DNK je razblažen u 90 μl medijuma za transfekciju bez antibiotika. Istovremeno smo pripremili rastvor B, rastvarajući 1 μl reagensa za transfekciju u medijumu za transfekciju sa redukovanim serumom i bez antibiotika, do finalne zapremine 100 μl . Rastvor A i rastvor B su pažljivo pomešani u odnosu 1:2, smeša je laganim pokretima pipetom resuspendovana, a potom inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi radi formiranja transfekcionih kompleksa. Ćelije su isprane 2 puta medijumom za transfekciju, a potom je, u svaki bunar, u 0.8 ml medijuma za transfekciju sipano po 200 μl smeše sa transfekcionim kompleksima, kako je preporučeno od strane proizvođača. Ćelije su inkubirane 8 sati u inkubatoru u vlažnoj atmosferi sa 5% CO_2 , na temperaturi od 37°C , i nakon toga je dodata jednaka zapremina (1 ml) kompletnog medijuma za kultivaciju po bunaru. Posle 24 h, uklonjen je plazmid bez ispiranja PBS-om, a nakon 48 h od transfekcije ćelijama je dodat medijum sa puromicinom. Stabilno transfektovane ćelije su selektovane inkubacijom u medijumu sa puromicinom (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

3.3.9. Statistička analiza

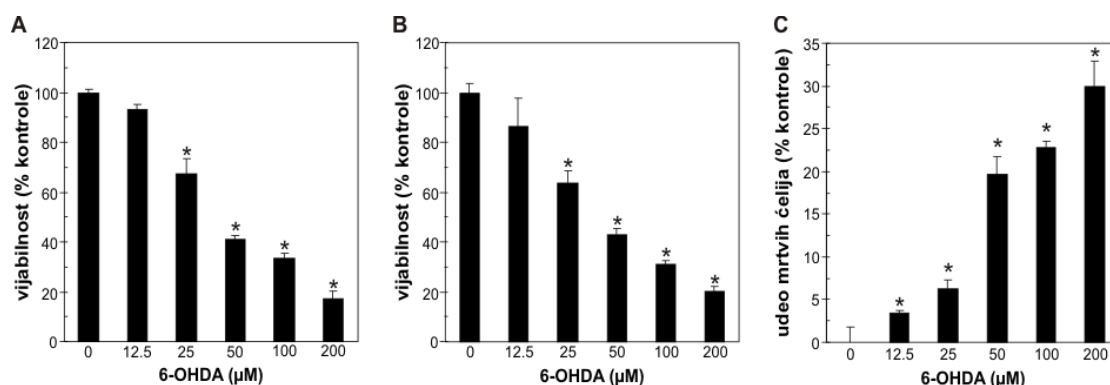
Za analizu statističke značajnosti razlike između rezultata dobijenih različitim tretmanima korišćena je analiza varijanse (ANOVA), praćena Student-Newman-Keuls-ovim testom za višestruka poređenja. Za procenu značajnosti razlike dva nezavisna uzorka korišćen je parametarski test – Studentov t-test. Vrednost parametra p manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1. 6-OHDA indukuje apoptozu u SH-SY5Y ćelijama zavisnu od aktivacije kaspaza i oksidativnog stresa

4.1.1. 6-OHDA smanjuje vijabilitet ćelija neuroblastoma

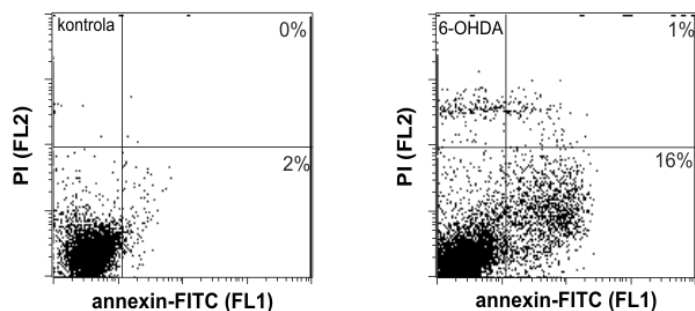
Da bismo ispitali toksično delovanje 6-OHDA na ćelije neuroblastoma SH-SY5Y, ćelije smo inkubirali 24h u prisustvu različitih koncentracija ove supstance. Kako je pokazano merenjem broja adherentnih ćelija kristal violet testom i merenjem aktivnosti mitohondrijalne dehidrogenaze MTT testom, tretman oksidopaminom doveo je do dozno zavisnog, statistički značajnog smanjenja broja živih ćelija (slika 1A, B). Istovremeno došlo je i do dozno zavisnog, statistički značajnog povećanja broja mrtvih ćelija, što je utvrđeno merenjem propustljivosti ćelijske membrane LDH testom (slika 1C). IC₅₀ koncentracija izračunata na osnovu rezultata MTT i kristal violet testa bila je oko 50µM, pa je ta koncentracija 6-OHDA korišćena za dalje eksperimente. Dakle, 6-OHDA smanjuje vijabilitet SH-SY5Y neurona.



Slika 1. 6-OHDA smanjuje vijabilitet ćelija neuroblastoma. SH-SY5Y ćelije inkubirane su 24h u prisustvu različitih koncentracija 6-OHDA. Vijabilnost ćelija je određivana kristal violet (A), MTT (B) i LDH testom (C). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD triplikata jednog od tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statističku značajnost razlike u odnosu na netretirane ćelije).

4.1.2. 6-OHDA indukuje apoptozu u SH-SY5Y ćelijama

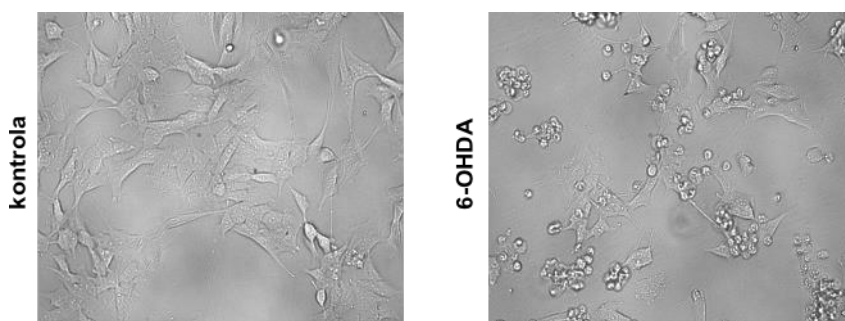
Poznato je da 6-OHDA može da izazove različite tipove ćelijske smrti u kulturi ćelija sličnih neuronima (Woodgate i sar., 1999). Da bi se ustanovilo na koji način umiru neuroblastomske ćelije tretirane oksidopaminom u našim eksperimentalnim uslovima, prisustvo apoptoze i nekroze analizirali smo protočnom citofluorimetrijom, nakon bojenja ćelija aneksinom V-FITC i propidijum jodidom. Pokazalo se da tretman 6-OHDA izaziva statistički značajno povećanje broja ćelija u apoptozu (aneksin⁺/PI⁻) sa 2% na 16%, i neznatno povećanje broja ćelija u nekrozi (aneksin⁺/PI⁺) (slika 2).



Slika 2. 6-OHDA indukuje apoptozu. SH-SY5Y ćelije su tretirane oksidopaminom ($50\mu\text{M}$). Posle 16h ćelije su bojene propidijum jodidom i aneksinom V-FITC i analiziran je procenat apoptotičnih ćelija (aneksin⁺/PI⁻) i ćelija u nekrozi sa narušenim integritetom ćelijske membrane (aneksin⁺/PI⁺) na protočnom citofluorimetru. Prikazana je reprezentativna dot plot analiza protočne citofluorimetrije iz jednog od tri nezavisna eksperimenta.

4.1.3. 6-OHDA menja morfologiju SH-SY5Y ćelija neuroblastoma

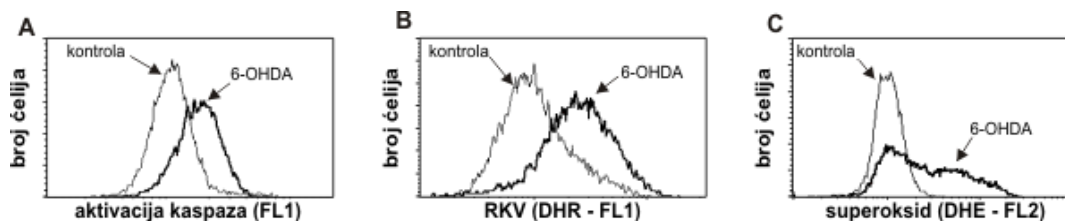
Dalje, hteli smo da ispitamo kako oksidopamin utiče na morfologiju SH-SY5Y ćelija. Posmatranjem pod svetlosnim mikroskopom, ustanovljeno je da su ćelije tretirane 6-OHDA izgubile citoplazmatske nastavke, da su se zaokruglile i smanjile, kao i da su se odlepile od podloge, što je sve u skladu sa indukcijom apoptoze (slika 3).



Slika 3. 6-OHDA menja morfologiju ćelija neuroblastoma. SH-SY5Y ćelije su inkubirane 24h u prisustvu 6-OHDA ($50\mu\text{M}$). Morfologija ćelija je analizirana pod svetlosnim mikroskopom.

4.1.4. Oksidopamin indukuje aktivaciju kaspaza i oksidativni stres u SH-SY5Y ćelijama

Pošto je pokazano prisustvo apoptoze, pokušali smo da utvrdimo da li 6-OHDA indukuje apoptozu zavisnu ili nezavisnu od aktivnosti kaspaza. Ćelije su obojene pankaspaznim inhibitorom ApoStat, a zatim je njihova fluorescencija merena protočnom citofluorimetrijom. Tretman oksidopaminom doveo je do statistički značajne aktivacije kaspaza ($1,66\pm 0,27$ puta povećana u odnosu na kontrolu, slika 4A).



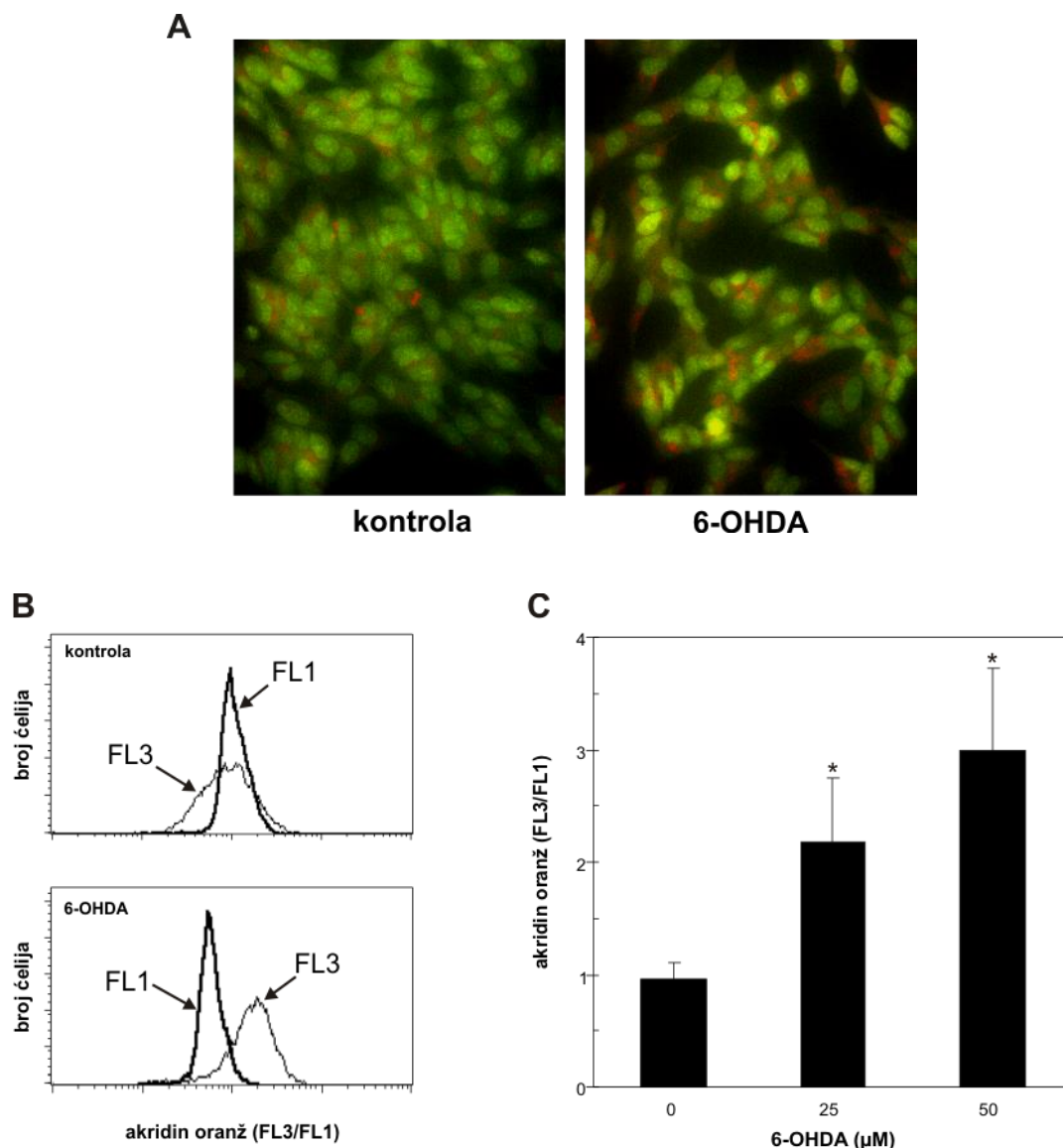
Slika 4. Oksidopamin indukuje aktivaciju kaspaza i oksidativni stres. SH-SY5Y ćelije su 16h inkubirane sa ili bez 6-OHDA ($50\mu\text{M}$). Nakon toga ćelije su bojene fluorescentnom bojom ApoStat da bi se izmerila aktivacija kaspaza (A), DHR, da bi se izmerila intracelularna produkcija RKV (B) ili DHE, da bi se izmerio unutarćelijski superoksid (C), a zatim analizirane na protočnom citofluorimetru. Prikazani su reprezentativni histogrami protočne citofluorimetrije iz jednog od tri nezavisna eksperimenta.

Imajući u vidu da je indukcija apoptoze često zavisna od oksidativnog stresa (Blum i sar., 2001), i da je toksičnost 6-OHDA usko povezana sa stvaranjem RKV (Cohen i Heikkila, 1974), interesovalo nas je da li oksidopamin uzrokuje produkciju RKV i u našem eksperimentalnom modelu. Bojenjem redoks-osetljivim fluorohromom DHR i superoksid-selektivnim DHE pokazano je da tretman oksidopaminom uzrokuje statistički značajno povećanje oksidativnog stresa u SH-SY5Y ćelijama ($2\pm 0,3$ puta veća fluorescencija u odnosu na kontrolu, slika 4B), koji se barem delimično može pripisati dejstvu superoksidnog anjona ($1,8\pm 0,1$ puta povećana FL2 fluorescencija u odnosu na kontrolu, slika 4C), takođe u statistički značajnoj meri. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da 6-OHDA indukuje apoptozu zavisnu od kaspaza i oksidativnog stresa u SH-SY5Y ćelijama.

4.2. 6-OHDA izaziva autofagiju u SH-SY5Y ćelijama

4.2.1. 6-OHDA indukuje akumulaciju kiselih vezikula u SH-SY5Y ćelijama

U prethodnim eksperimentima smo pokazali da 6-OHDA izaziva oksidativni stres, a RKV su dobro poznati aktivatori autofagije (Scherz-Shouval i sar., 2007). Pošto smo potvrdili da tretman 6-OHDA izaziva programiranu ćelijsku smrt tipa I u ćelijama neuroblastoma, želeli smo da ispitamo da li dolazi i do indukcije programirane ćelijske smrti tipa II – autofagije. Nakon tretmana oksidopaminom, SH-SY5Y ćelije obojene su akridin oranžom, bojom koja na neutralnom i slabo kiselom pH fluorescira zeleno, dok na niskom pH, kakav je u autolizozomima, fluorescira crveno. Posle bojenja ćelije su analizirane fluorescentnom mikroskopijom ili protočnom citofluorimetrijom. Fotografije fluorescentne mikroskopije jasno pokazuju prisustvo crvenih kiselih vezikula u ćelijama tretiranim 6-OHDA (slika 5A). Takođe, protočnom citofluorimetrijom pokazano je statistički značajno povećanje odnosa crvene (FL3) i zelene (FL1) fluorescence na dozno zavisnan način, što ukazuje da oksidopamin povećava kiselost citoplazme, odnosno pojavu kiselih autofagnih vezikula, što je jedan od osnovnih pokazatelja autofagije (slika 5B, C).

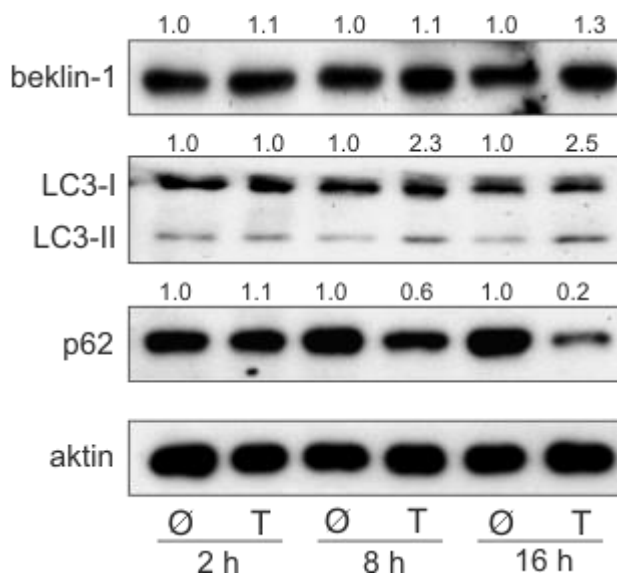


Slika 5. 6-OHDA indukuje akumulaciju kiselih vezikula. SH-SY5Y ćelije su inkubirane 16h sa ili bez 6-OHDA (50μM) (A, B) ili sa različitim koncentracijama 6-OHDA (C). Prisustvo kiselih, crvenih autofagnih vezikula u akridin-oranž bojenim ćelijama analizirano je na fluorescentnom mikroskopu (A) ili protočnom citofluorimetru kao porast inteziteta crvene u odnosu na zelenu fluorescencu (FL3/FL1) (B, C). Prikazane su reprezentativne mikroskopije i reprezentativni histogrami iz jednog od tri nezavisna eksperimenta (A, B). (C) Autofagija je kvantifikovana kao srednja vrednost FL3/FL1 u odnosu na kontrolu, kojoj je arbitarno dodeljena vrednost 1, a prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost \pm SD tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statističku značajnost razlike u odnosu na netretirane ćelije).

4.2.2. 6-OHDA indukuje konverziju LC3 i degradaciju p62 proteina u SH-SY5Y ćelijama

U skladu sa gore pomenutim rezultatima, imunoblotom je pokazano da 6-OHDA vremenski zavisno povećava konverziju proteina LC3-I u njegovu lipidovanu formu LC3-II (slika 6). LC3-I se

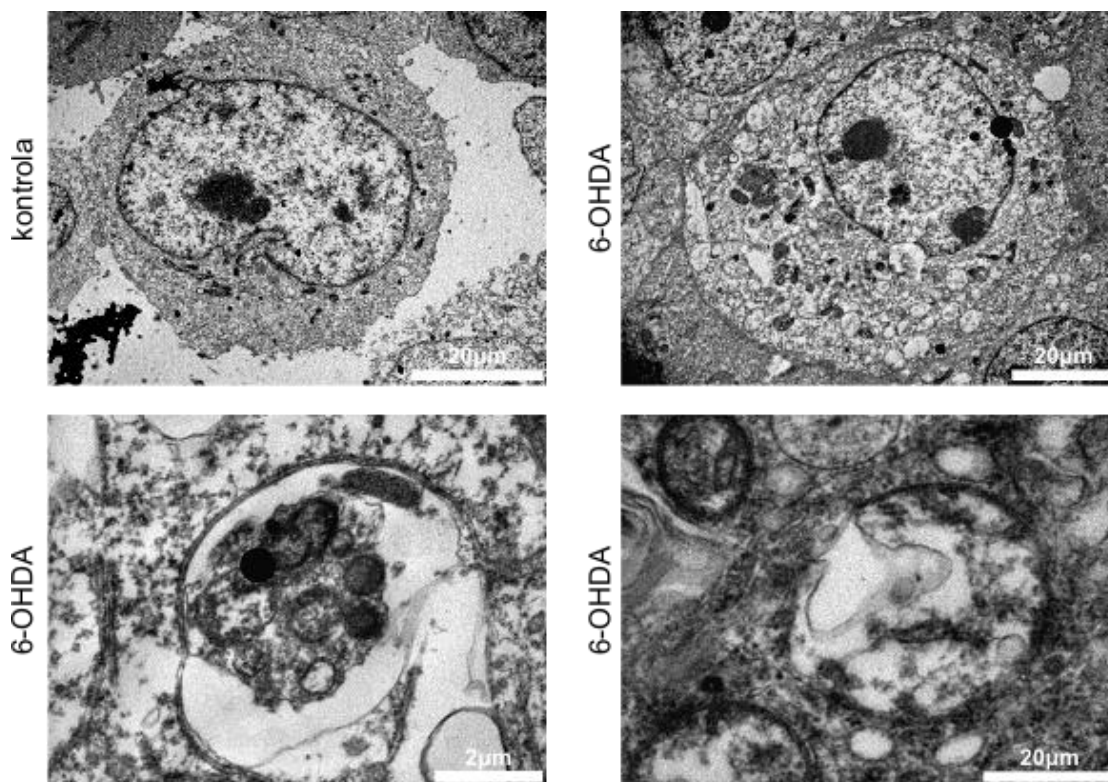
kovalentno konjuguje sa fosfatidil-etanolaminom gradeći LC3-II, koji se specifično inkorporira u fagoforu i ostaje vezan za membranu autofagozoma i autolizozoma (Rubinsztein i sar., 2009). Pored konverzije LC3, merili smo i promenu u ekspresiji beclin-1, ključnog regulatora formiranja autofagozoma (Hill i sar., 2019). Protein p62 se degradira samo putem autofagije, i smanjeno prisustvo p62 u ćeliji ukazuje na povećanu autofagnu proteolizu (Ichimura i sar., 2008). Najveće promene su zabeležene 16h nakon tretmana 6-OHDA za sva tri proteina: udeo LC3-II u odnosu na LC3-I je 2,5 puta povećan, p62 ima 5 puta manje, dok je nivo beclin-1 samo 30% veći u odnosu na netretirane ćelije. Naposljetku, naši rezultati potvrđuju sposobnost 6-OHDA da indukuje potpunu autofagiju



Slika 6. 6-OHDA indukuje konverziju LC3 i degradaciju p62 proteina. SH-SY5Y ćelije su inkubirane sa oksidopaminom (50 μ M) tokom naznačenog vremena. Konverzija LC3 i koncentracije p62 i beclin-1 analizirane su imunoblotom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz jednog od tri nezavisna eksperimenta i denzitometrijski podaci iznad odgovarajućih traka.

4.2.3. 6-OHDA indukuje pojavu vezikula sa delimično razgrađenim ćelijskim sadržajem u SH-SY5Y ćelijama

Prisustvo autofagije potvrđeno je i transmissionom elektronskom mikroskopijom. Nakon tretmana oksidopaminom primećena je ekstenzivna vakuolizacija citoplazme (slika 7, gore desno), uz mnoštvo vidljivih autofagozoma sa dvostrukom membranom (slika 7, dole levo), kao i autolizozoma sa jednostrukom membranom i delimično razgrađenim ćelijskim sadržajem (slika 7, dole desno). Imajući u vidu da smo pokazali da oksidopamin indukuje zakišeljavanje citoplazme, pojavu vezikula sa delimično razgrađenim ćelijskim sadržajem koje imaju jednostruku ili dvostruku membranu, konverziju LC3 i degradaciju p62 proteina, možemo nedvosmisleno zaključiti da 6-OHDA indukuje autofagiju u SH-SY5Y neuronima.

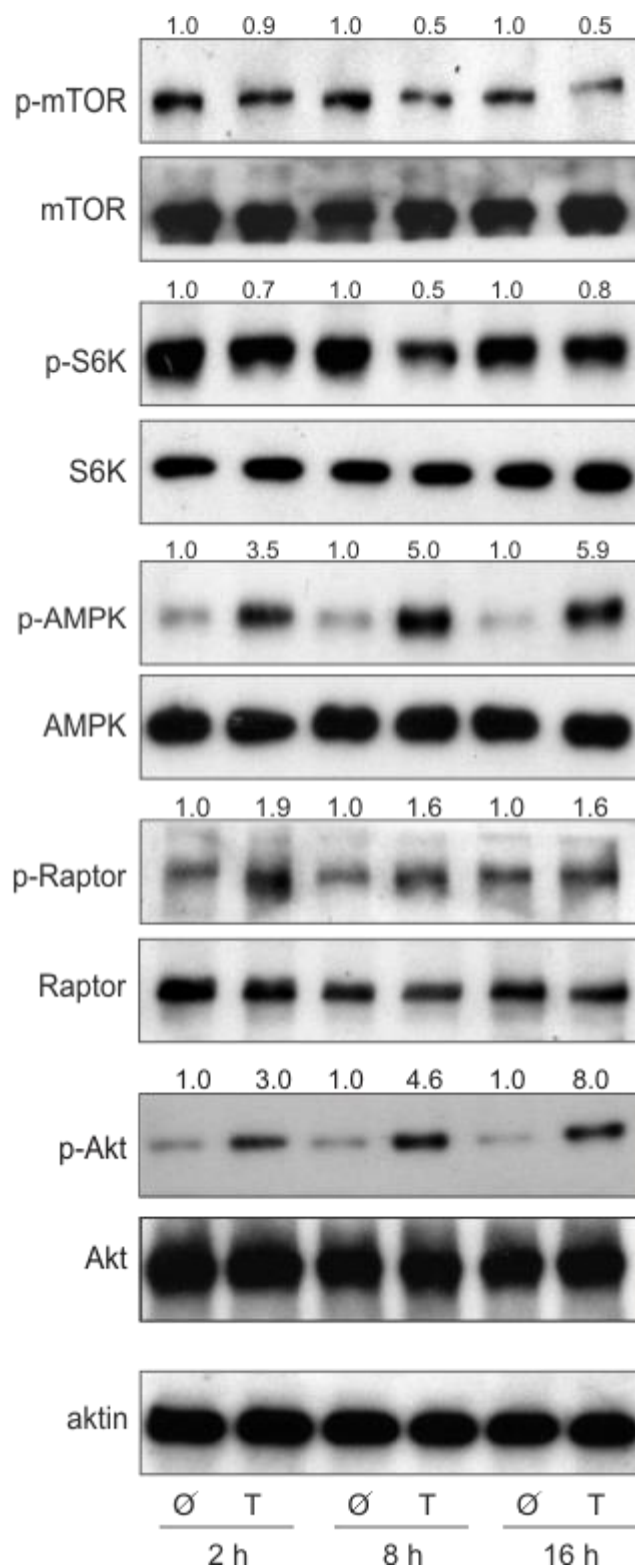


Slika 7. Oksidopamin indukuje pojavu vezikula sa delimično razgrađenim ćelijskim sadržajem. TEM analiza ćelija humanog neuroblastoma nakon 16h inkubacije sa 6-OHDA (50 μ M) pokazala je intenzivnu vakuolizaciju (gore desno), vezikule sa dvostrukom membranom nalik autofagozomima (dole levo) i vezikule sa jednostrukom membranom i delimično degradiranim ćelijskim sadržajem koje nalikuju autolizozomima (dole desno). Prikazane su reprezentativne mikrografije iz jednog od dva nezavisna eksperimenta.

4.3. Autofagija indukovana 6-OHDA zavisi od AMPK/mTOR signalnog puta

4.3.1. 6-OHDA indukuje aktivaciju AMPK i Akt i supresiju mTOR u SH-SY5Y ćelijama

U sledećim eksperimentima hteli smo da rasvetlimo molekularne mehanizme odgovorne za indukciju autofagije oksidopaminom. Imunoblot analizom pokazano je da 6-OHDA dovodi do deaktivacije/defosforilacije glavnog represora autofagije mTOR, kao i njegove nishodne mete S6K, već nakon 2h, dok su promene u njihovoj aktivnosti najizraženije nakon 8h (Slika 8). Inaktivacija mTOR korelirala je sa aktivacijom njegovog inhibitora AMPK i direktnog supstrata AMPK, Raptor.

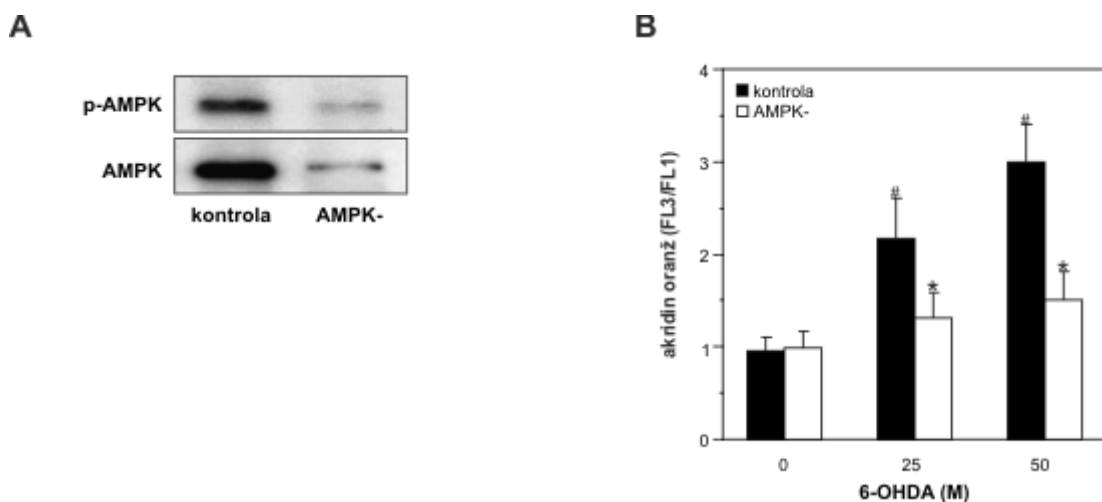


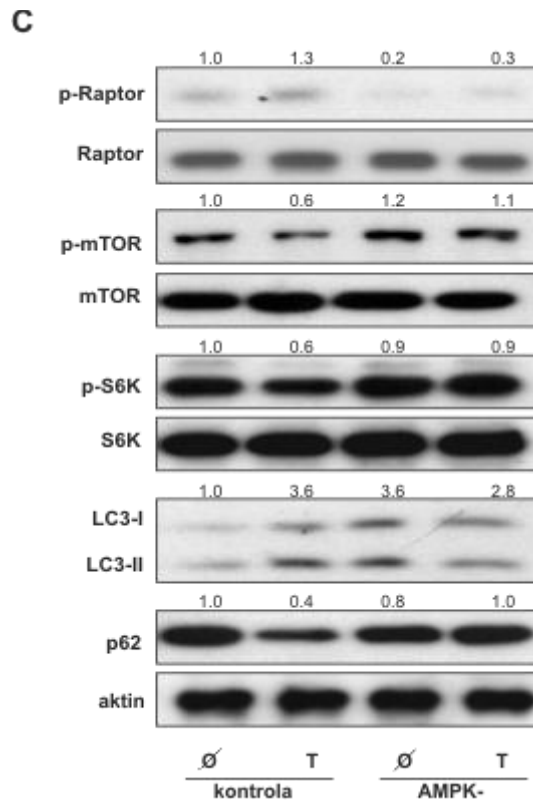
Slika 8. 6-OHDA indukuje aktivaciju AMPK i supresiju mTOR u SH-SY5Y ćelijama. SH-SY5Y ćelije su tretirane 6-OHDA (50 μ M) tokom naznačenog vremena. Fosforilacija mTOR, S6K, AMPK, Raptor i Akt su analizirane imunoblotom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz jednog od tri nezavisna eksperimenta i denzitometrijski podaci iznad odgovarajućih traka.

Nasuprot indukciji autofagije i supresiji mTOR-a, ispostavilo se da dolazi do snažne aktivacije mTOR aktivatora Akt u ćelijama neuroblastoma tretiranim oksidopaminom. Za razliku od ostalih proteina, čija indukcija kulminira posle 8h i aktivnost opstaje na sličnom nivou 16h nakon početka tretmana, aktivacija Akt kinaze nastavlja da raste i nakon 16h dostiže 8 puta veću vrednost nego kod netretiranih ćelija. Dakle, 6-OHDA stimuliše AMPK i Akt, a inhibira mTOR u neuronima.

4.3.2. Oksidopaminom indukovana aktivnost AMPK odgovorna je za indukciju mTOR zavisne autofagije u SH-SY5Y ćelijama

Nakon što se ispostavilo da 6-OHDA aktivira AMPK, zanimalo nas je da li je aktivnost ove kinaze neophodna za indukciju autofagije u SH-SY5Y ćelijama tretiranim 6-OHDA. U tom cilju ekspresiju gena za AMPK smo utišali transfekcijom ćelija sa AMPK shRNA, a efikasnost inhibicije utvrdili imunoblotom na kom se jasno vidi da je nakon transfekcije smanjena ekspresija i totalne AMPK i njene fosforilisane forme (slika 9A). Pokazalo se da u slučaju umanjene ekspresije AMPK gena kod ćelija tretiranih oksidopaminom ne dolazi do aktivacije Raptor, niti do inaktivacije mTOR i S6K (Slika 9C). Ovaj podatak ukazuje da je aktivacija AMPK posredstvom Raptor odgovorna za inhibiciju mTOR. Dalje, u ćelijama sa utišanom AMPK bila je inhibirana konverzija LC3, degradacija p62 (Slika 9C) i zakišeljavanje citoplazme u prisustvu oksidopamina u odnosu na ćelije transfektovane kontrolnom shRNA (slika 9B), što ukazuje na ključnu ulogu AMPK u indukciji autofagije.

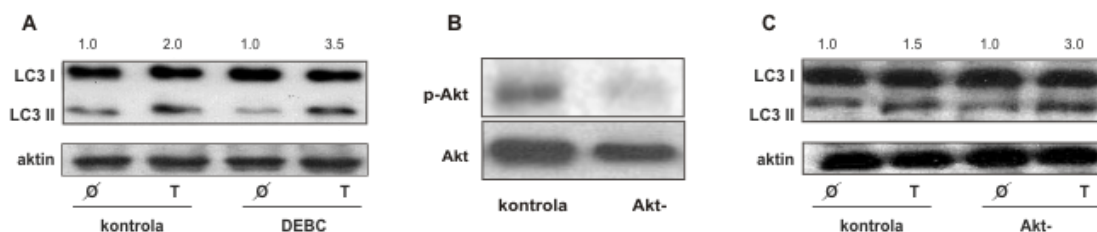




Slika 9. Oksidopaminom aktivirana AMPK odgovorna je za indukciju mTOR zavisne autofagije u SH-SY5Y ćelijama. (A) Nakon transfekcije kontrolnom i AMPK shRNA uspešnost transfekcije je potvrđena imunoblotom. (B) Transfektovane SH-SY5Y ćelije su tretirane 6-OHDA (50 μ M) tokom 16h, nakon čega su bojene akridin oranžom i analizirane protočnom citofluorimetrijom. (C) Nakon 8h tretmana oksidopaminom u transfektovanim ćelijama imunoblotom je analizirano prisustvo p62, konverzija LC3 i fosforilacija Raptor, mTOR i S6K. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi sa denzitometrijskim podacima iznad odgovarajućih traka (A, C), odnosno FL3/FL1 vrednosti koje predstavljaju srednju vrednost \pm SD iz tri nezavisna eksperimenta (B) ($^{\#}p < 0,05$ označava statističku značajnost razlike u odnosu na netretirane ćelije, $*p < 0,05$ u odnosu na kontrolnom shRNA transfektovane ćelije tretirane oksidopaminom).

4.3.3. 6-OHDA stimuliše aktivnost Akt koja se suprotstavlja indukciji autofagije u SH-SY5Y ćelijama

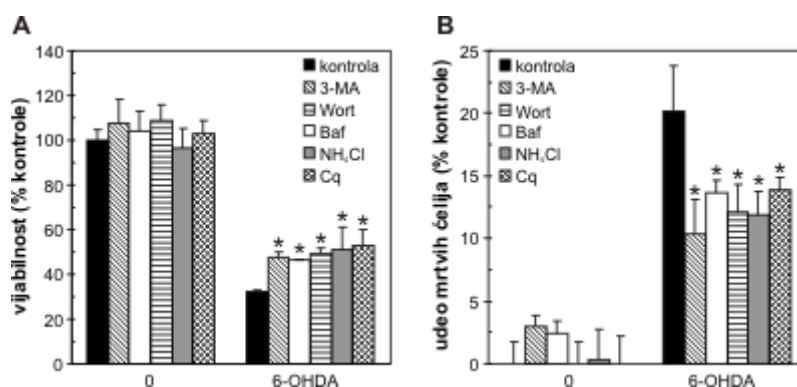
Imajući u vidu da je Akt aktivator mTOR i inhibitor autofagije, prepostavili smo da njegova aktivacija ne doprinosi indukciji autofagije oksidopaminom. Međutim, hteli smo da ispitamo da li se aktivacija Akt suprotstavlja stimulaciji autofagije u neuronima tretiranim 6-OHDA. Imunoblot analizom ćelija tretiranih oksidopaminom u prisustvu ili odsustvu DEBC (10-DEBC-dihridohlorid), inhibitora Akt, pokazano je da dolazi do dodatne stimulacije konverzije LC3, odnosno povećanja autofagije (Slika 10A). Da bismo dalje potvrdili suprimirajuću ulogu Akt na autofagiju, ekspresiju ove kinaze inhibirali smo transfekcijom ćelija sa Akt siRNA. Uspešnost transfekcije je pokazana imunoblotom, na kome se vidi da siRNA za Akt smanjuje koncentraciju i fosforilisane i totalne forme proteina (Slika 10B). Kod ovih ćelija 6-OHDA je indukovao veću autofagiju, odnosno dvostruko veću konverziju LC3 proteina, nego u ćelijama transfektovanim kontrolnom siRNA (Slika 10C). Može se zaključiti da bi AMPK/mTOR zavisna autofagija bila još jača da oksidopamin ne indukuje supresivno delovanje Akt.



Slika 10. 6-OHDA stimuliše aktivnost Akt koja se suprotstavlja indukciji autofagije u SH-SY5Y ćelijama. (A) SH-SY5Y ćelije su tretirane 6-OHDA (50 μ M) tokom 8h u odsustvu ili prisusutvu inhibitora Akt 10-DEBC-dihridohlorida (DEBC, 20 μ M). (B) SH-SY5Y ćelije su transfektovane kontrolnom ili Akt siRNA i uspešnost transfekcije pokazana je imunoblot metodom. (C) Nakon transfekcije SH-SY5Y ćelije su 4h tretirane 6-OHDA (50 μ M). Fosforilacija Akt (B) i konverzija LC3 proteina (A, C) su analizirane imunoblotom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz jednog od tri nezavisna eksperimenta i denzitometrijski podaci iznad odgovarajućih traka.

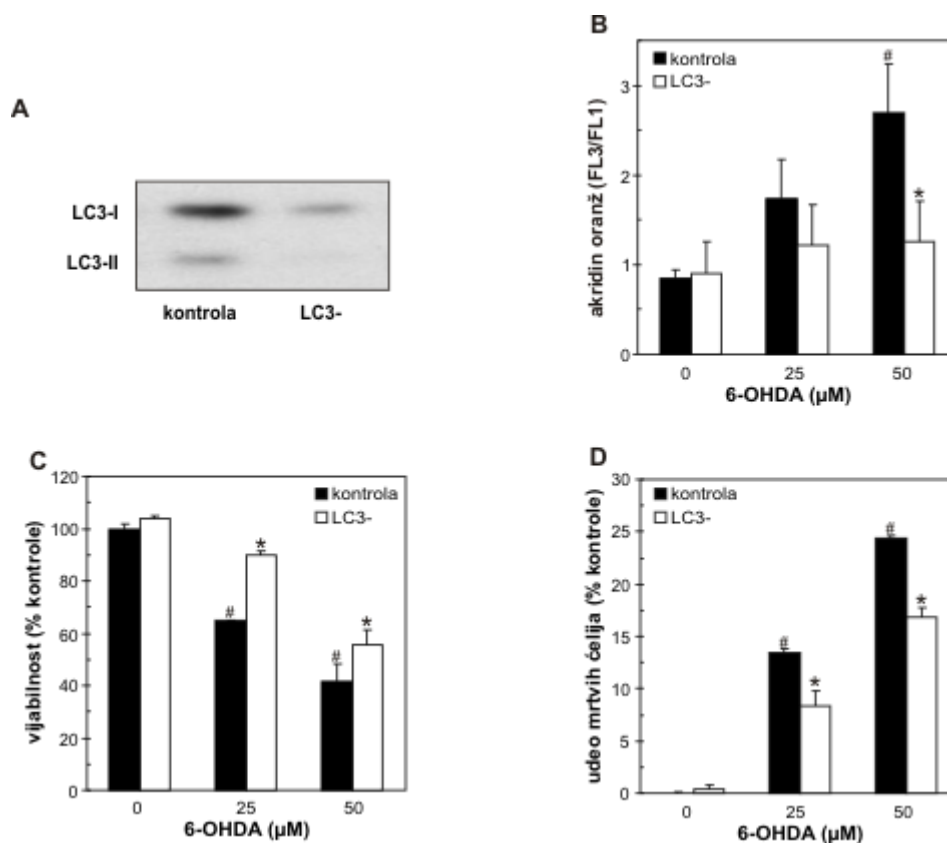
4.4. 6-OHDA indukuje citotoksičnu autofagiju

4.4.1. Inhibicija autofagije suprimira citotoksično delovanje 6-OHDA u SH-SY5Y ćelijama



Slika 11. Farmakološka inhibicija autofagije suprimira citotoksično delovanje 6-OHDA u SH-SY5Y ćelijama. SH-SY5Y ćelije su inkubirane sa 6-OHDA (50 μ M) u prisustvu ili odsustvu autofagnih inhibitora: 3-metil adenina (3-MA; 4 mM), vortmanina (Wort; 100 nM), bafilomicina A1 (Baf; 2 nM), amonijum hlorida (NH₄Cl; 10 mM) i hlorokina (Cq; 20 μ M). Posle 24h vijabilitet ćelija je izmeren MTT testom (A), a citotoksičnost 6-OHDA LDH testom (B). Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost \pm SD iz triplikata jednog od tri nezavisna eksperimenta (* p < 0,05 označava statističku značajnost razlike u odnosu na ćelije tretirane oksidopaminom).

Da bismo rasvetlili ulogu autofagije u neurotoksičnosti 6-OHDA, testirali smo kako se njegova toksičnost menja pri inhibiciji, odnosno indukciji autofagije. U tom cilju autofagiju smo suprimirali farmakološkim inhibitorima koji ili blokiraju nastanak autofagozoma zavisano od PI3K (vortmanin, 3-metil adenin) ili onemogućavaju nastanak i/ili zakišeljavanje autolizozoma (bafilomicin A1, NH₄Cl, hlorokin), a zatim merili vijabilitet ćelija tretiranih oksidopaminom. Nezavisno od mehanizma dejstva svi inhibitori autofagije su statistički značajno umanjili citotoksično dejstvo 6-OHDA i oštećenje ćelija (slika 11A, B), ukazujući na citotoksičnu ulogu autofagije stimulisane oksidopaminom.

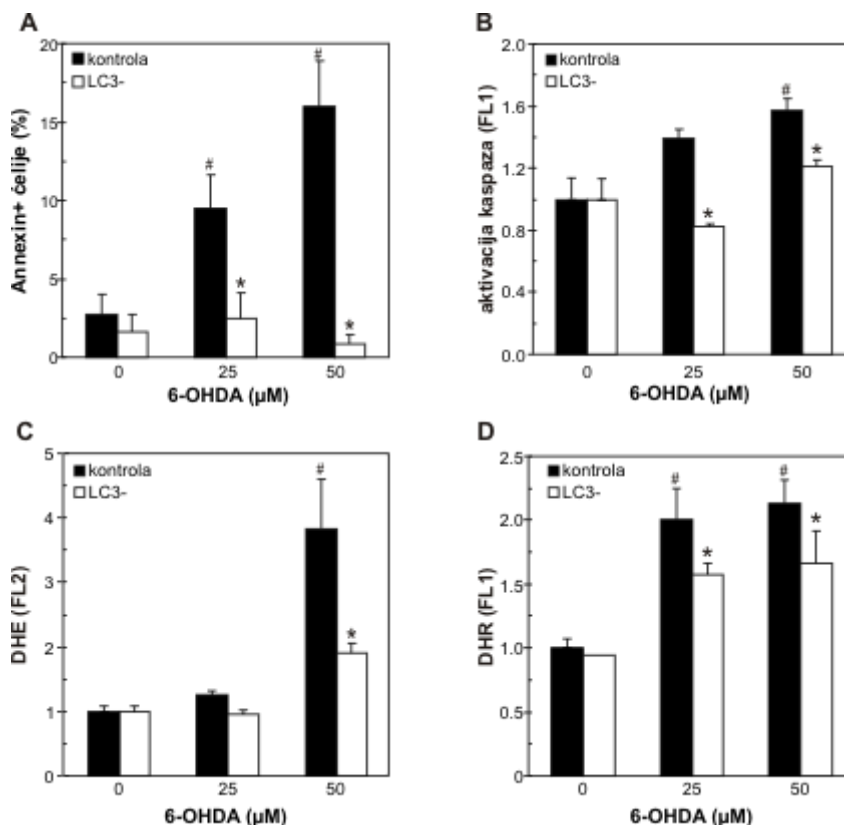


Slika 12. Genetička inhibicija autofagije suprimira citotoksično delovanje 6-OHDA u SH-SY5Y ćelijama. (A-D) SH-SY5Y ćelije su transfektovane kontrolnom ili LC3 shRNA. Uspešnost transfekcije pokazana je imunoblot metodom (A). Transfektovane ćelije tretirane su oksidopaminom (25 μM ili 50 μM), pa je nakon 16h acidifikacija citoplazme određena protočnom citofluorimetrijom u ćelijama obojenim akridin oranžom (B), dok je nakon 24h vijabilitet ćelija određen kristal violet (C) i LDH metodom (D). Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost ± SD tri nezavisna eksperimenta (B), odnosno srednju vrednost ± SD triplikata jednog od tri nezavisna eksperimenta (C, D) (#p < 0,05 označava statističku značajnost razlike u odnosu na netretirane ćelije, *p < 0,05 u odnosu na kontrolnom shRNA transfektovane ćelije tretirane oksidopaminom).

Da bismo potvrdili citotoksično delovanje autofagije, autofagiju smo suprimirali i genetički, transfekcijom ćelija sa LC3 shRNA. Uspešnost transfekcije pokazana je imunoblotom na kome se može videti da transfekcija smanjuje koncentraciju obe forme LC3 (Slika 12A). Kada se ove ćelije tretiraju oksidopaminom, imaju manju kiselost citoplazme nego ćelije transfektovane kontrolnom shRNA, što ukazuje na njihovu smanjenu sposobnost da stvaraju autofagne vezikule (Slika 12B). U

skladu sa rezultatima farmakološke inhibicije, transfekcija sa LC3 shRNA oporavila je vijabilitet neurona i smanjila citotoksičnost 6-OHDA u statistički značajnoj meri (Slika 12C, D). Ovo nedvosmisleno pokazuje da 6-OHDA indukuje citotoksičnu autofagiju u SH-SY5Y ćelijama.

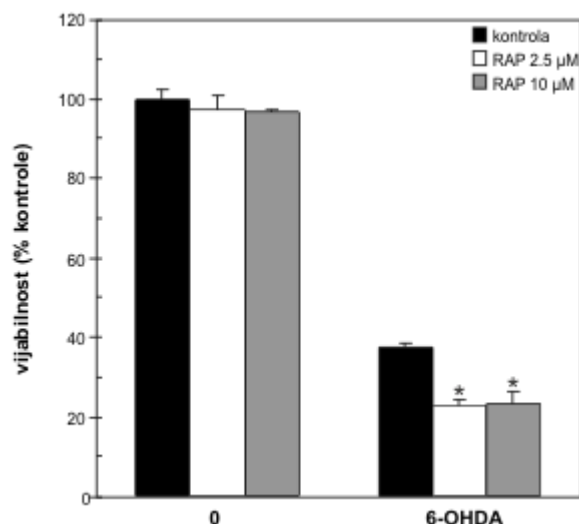
Nakon toga, hteli smo da ispitamo mehanizme citotoksičnog delovanja autofagije indukovane 6-OHDA. Zaštitno delovanje genetičke inhibicije autofagije koreliralo je sa smanjenjem eksternalizacije fosfatidil serina, aktivacije kaspaza i oksidativnog stresa (slika 13A-D), ukazujući da autofagija zapravo doprinosi indukciji apoptoze u neuroblastomskim ćelijama tretiranim oksidopaminom.



Slika 13. Inhibicija autofagije smanjuje oksidativni stres i sprečava apoptozu kod SH-SY5Y ćelija tretiranih 6-OHDA. SH-SY5Y ćelije su transfektovane kontrolnom ili LC3 shRNA. Transfektovane ćelije tretirane su oksidopaminom (25μM ili 50μM). Nakon 16h na protočnom citofluorimetru analiziran je procenat apoptotičnih (aneksin⁺) ćelija nakon bojenja aneksinom V-FITC (A), određivana je aktivnost kaspaza nakon bojenja pankaspaznim inhibitorom (B), određivana je intracelularna produkcija superoksid anjon radikala u DHE obojenim ćelijama (C), ili je određivana koncentracija RKV u DHR obojenim ćelijama (D). Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost ± SD tri nezavisna eksperimenta (B, C, D) u odnosu na kontrolu kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost 1 ([#]*p* < 0,05 označava statističku značajnost razlike u odnosu na netretirane ćelije, ^{*}*p* < 0,05 u odnosu na kontrolnom shRNA transfektovane ćelije tretirane oksidopaminom).

4.4.2. Stimulacija autofagije pojačava neurotoksično dejstvo 6-OHDA

Pošto smo pokazali da 6-OHDA indukuje citotoksičnu autofagiju, u sledećem eksperimentu smo hteli da ispitamo ulogu osnovnog represora autofagije mTOR. Za razliku od prethodno opisanog zaštitnog dejstva supresije autofagije, inhibitor mTOR i aktivator autofagije rapamicin je statistički značajno pojačao citotoksično delovanje oksidopamina na SH-SY5Y ćelije (Slika 14). Dakle, pošto dodatna supresija mTOR pojačava toksičnost 6-OHDA, može se pretpostaviti da mTOR spašava oksidopaminom tretirane neurone inhibicijom citotoksične autofagije.



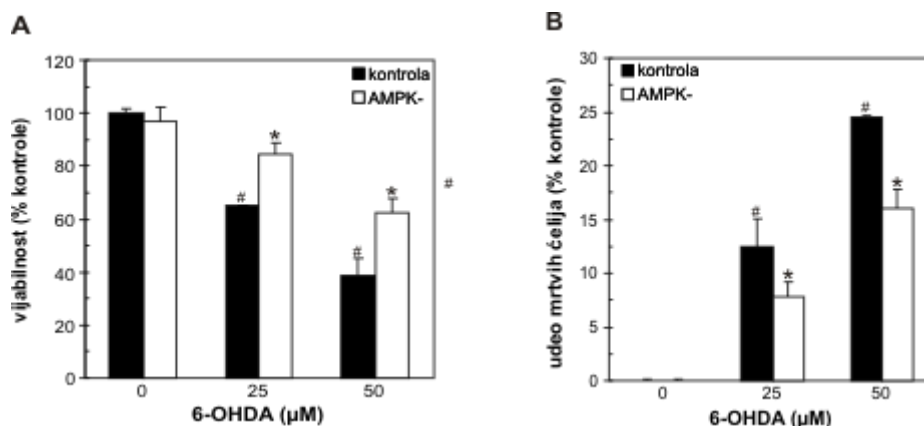
Slika 14. Inhibicija mTOR pojačava neurotoksično dejstvo 6-OHDA. SH-SY5Y ćelije su inkubirane sa 6-OHDA (50 μM) u prisustvu ili odsustvu rapamicina (RAP). Vijabilitet ćelija nakon 24h određivan je MTT testom. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost ± SD triplikata reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ u odnosu na ćelije tretirane oksidopaminom).

4.5. AMPK aktivira, a Akt inhibira citotoksično delovanje autofagije indukovane oksidopaminom

4.5.1. Indukcija citotoksične autofagije oksidopaminom u SH-SY5Y ćelijama posredovana je stimulacijom AMPK

Imajući u vidu da 6-OHDA indukuje citotoksičnu autofagiju i da je autofagija zavisna od AMPK, hteli smo da ispitamo da li aktivacija AMPK ima toksično delovanje. Da bismo to utvrdili ispitivali smo vijabilitet ćelija transfektovanih sa AMPK shRNA nakon tretmana oksidopaminom. Rezultati prikazani na slici 15A i B pokazali su da utišavanje ekspresije AMPK dovodi do statistički značajnog oporavka vijabiliteta neurona tretiranih oksidopaminom. Dakle, 6-OHDA indukuje

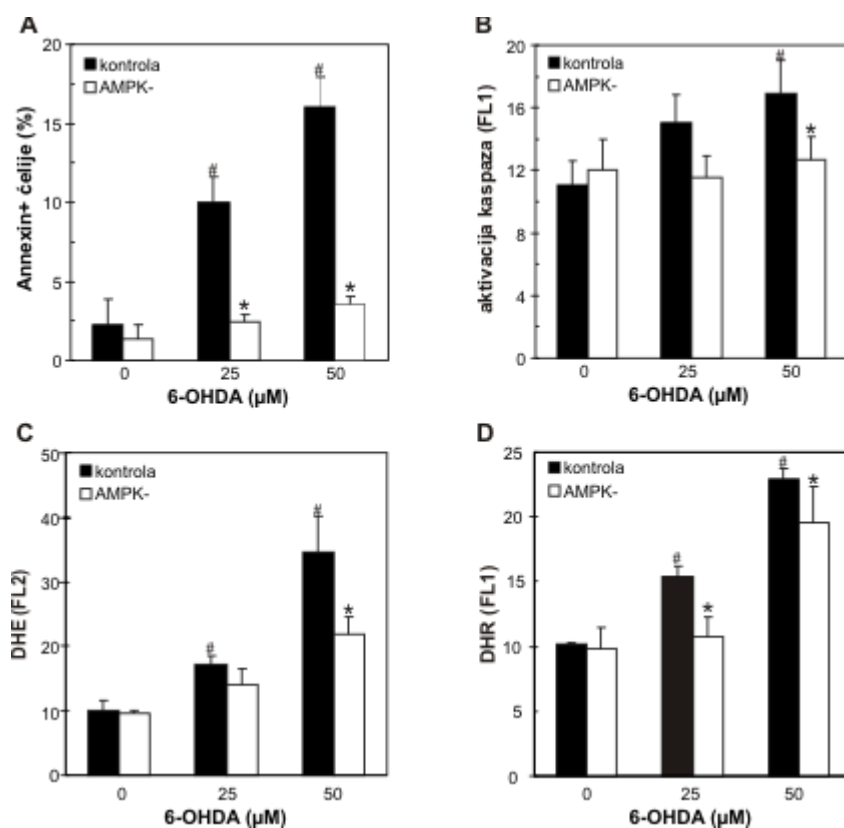
neurotoksično delovanje AMPK, koje je bar delimično posredovano učestvovanjem ove kinaze u indukciji citotoksične autofagije.



Slika 15. 6-OHDA indukuje citotoksično delovanje AMPK. SH-SY5Y ćelije transfektovane kontrolnom i AMPK shRNA tretirane su oksidopaminom (25 i 50 μM) i nakon 24h vijabilitet ćelija određen je MTT testom (A), dok je citotoksičnost određena LDH testom (B). Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost ± SD triplikata jednog od tri nezavisna eksperimenta ([#]p < 0,05 označava statističku značajnost razlike u odnosu na netretirane ćelije, ^{*}p < 0,05 u odnosu na kontrolnom shRNA transfektovane ćelije tretirane oksidopaminom).

4.5.2. Citotoksično delovanje AMPK stimulisane oksidopaminom posredovano je apoptozom zavisnom od aktivacije kaspaza i oksidativnog stresa

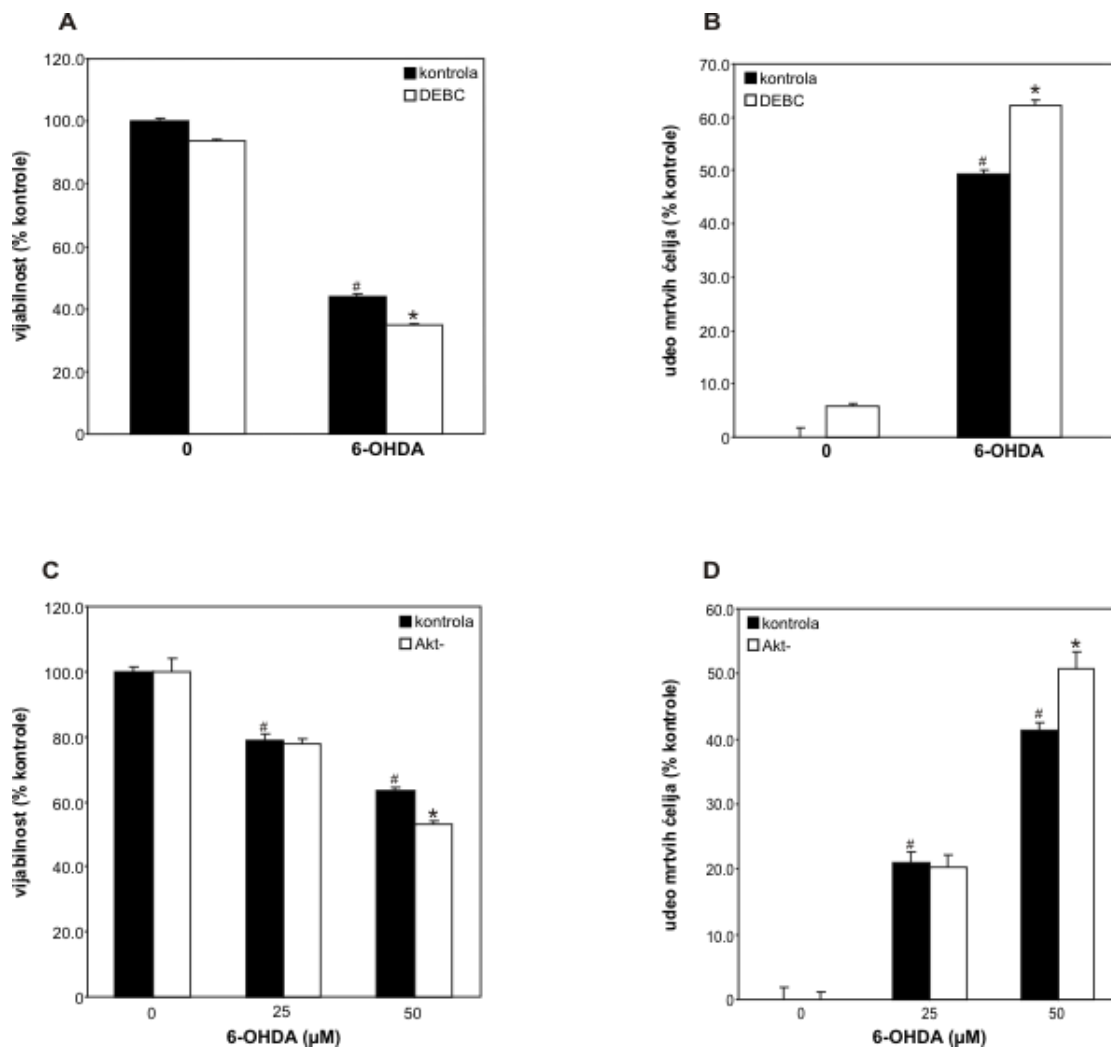
U skladu sa ključnom ulogom AMPK u indukciji citotoksične autofagije, pokazano je da utišavanje ekspresije AMPK u ćelijama tretiranim oksidopaminom dovodi do smanjenja ekspresije fosfatidil serina na spoljnoj strani ćelijske membrane (Slika 16A), aktivacije kaspaza (Slika 16B), indukcije oksidativnog stresa (Slika 16D) i produkcije superoksida (Slika 16C). Ovi rezultati upućuju na zaključak da aktivacija AMPK u neuronima tretiranim 6-OHDA stimuliše apoptozu posredovanu oksidativnim stresom i aktivacijom kaspaza.



Slika 16. AMPK stimulirana oksidopaminom doprinosi apoptozi zavisnoj od aktivacije kaspaza i oksidativnom stresu u SH-SY5Y ćelijama. SH-SY5Y ćelije transfektovane kontrolnom ili AMPK shRNA su tretirane oksidopaminom (25 ili 50 μM). Posle 16h protočnom citofluorimetrijom određen je procenat apoptotičnih ćelija nakon bojenja aneksinom V FITC (A), aktivacija kaspaza nakon bojenja fluorescentnom bojom ApoStat (B), produkcija superoksid anjon radikala nakon bojenja DHE (C) ili produkcija RKV nakon bojenja DHR (D). Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost \pm SD tri nezavisna eksperimenta ([#] $p < 0,05$ označava statističku značajnost razlike u odnosu na netretirane ćelije, ^{*} $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnom shRNA transfektovane ćelije tretirane oksidopaminom).

4.5.3. Aktivacija Akt štiti SH-SY5Y ćelije od toksičnog delovanja 6-OHDA

Pošto smo prethodno utvrdili da se aktivacija Akt suprotstavlja indukciji citotoksične autofagije, hteli smo da utvrdimo ulogu Akt u neurotoksičnom delovanju 6-OHDA. Pokazano je da inhibicija Akt pomoću DEBC dovodi do statistički značajnog dodatnog smanjenja vijabiliteta (Slika 17A), odnosno povećanja citotoksičnosti oksidopamina (Slika 17B). U skladu sa tim, pokazali smo i da supresija Akt transfekcijom ćelija sa Akt siRNA pojačava toksično delovanje oksidopamina (Slika 17 C i D). Prikazani rezultati ukazuju da aktivacija Akt ima protektivno delovanje na SH-SY5Y ćelije pri tretmanu 6-OHDA, koje je verovatno delimično posredovano sposobnošću Akt da se suprotstavi indukciji citotoksične autofagije.

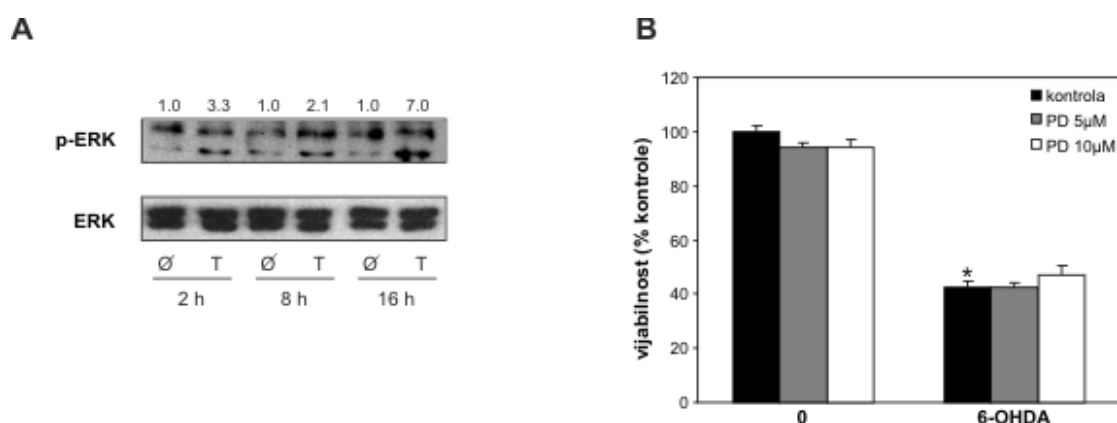


Slika 17. Aktivacija Akt štiti SH-SY5Y ćelije od toksičnog delovanja 6-OHDA. (A, B) SH-SY5Y ćelije su tretirane oksidopaminom (50μM) u prisustvu ili odsustvu 10-DEBC-dihridohlorida (20μM). (C, D) SH-SY5Y transfektovane kontrolnom ili Akt siRNA su tretirane oksidopaminom (25 i 50μM). Nakon 24h vijabilitet ćelija je određen kristal violet testom (A, C), a citotoksičnost LDH testom (B, D). Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost ± SD triplikata reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta ([#]*p* < 0,05 u odnosu na netretirane ćelije, ^{*}*p* < 0,05 u odnosu na ćelije tretirane oksidopaminom (A, B) ili kontrolnom siRNA transfektovane ćelije tretirane oksidopaminom (C, D)).

4.6. MAP kinaza p38 učestvuje u neurotoksičnosti 6-OHDA nezavisno od autofagije

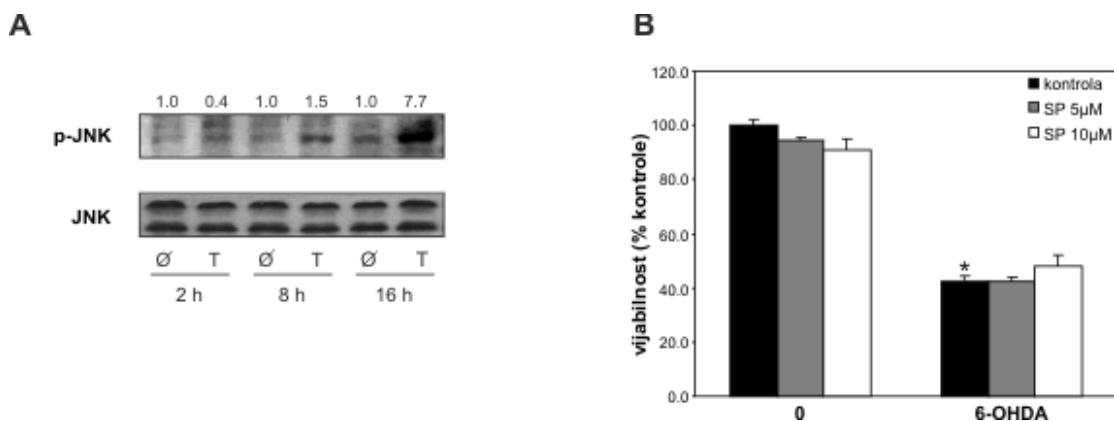
4.6.1. 6-OHDA aktivira kinaze ERK i JNK

Imajući u vidu važnost MAP kinaza ERK, JNK i p38 u indukciji apoptoze i autofagije u neuronima pod dejstvom različitih stresora (Rai i sar., 2019), dalje smo ispitali ulogu ovih enzima u citotoksičnom delovanju 6-OHDA na SH-SY5Y ćelije. Imunoblot analizom je pokazano da 6-OHDA indukuje značajnu aktivaciju ERK već 2h nakon dodavanja, i nakon 16h dostiže 7 puta veću vrednost nego u netretiranim ćelijama (Slika 18A). Da bismo ispitali ulogu ovog enzima u neurotoksičnom delovanju oksidopamina koristili smo inhibitor ERK PD98059. MTT testom je pokazano da inhibicija ERK ne utiče na vijabilitet neurona tretiranih 6-OHDA (Slika 18B). Iako 6-OHDA stimuliše aktivaciju MAP kinaze ERK, ova kinaza nema značajnu ulogu u toksičnom delovanju oksidopamina na SH-SY5Y ćelije.



Slika 18. Citotoksično delovanje 6-OHDA ne zavisi od indukcije ERK. (A) SH-SY5Y ćelije su tretirane oksidopaminom (50 μM) tokom naznačenih vremena, nakon čega je fosforilacija ERK merena imunoblotom. (B) SH-SY5Y ćelije su 24h tretirane 6-OHDA (50 μM) odsustvu ili prisustvu inhibitora ERK PD98059 (5 i 10 μM), posle čega je vijabilitet ćelija određen MTT testom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi jednog od tri nezavisna eksperimenta i denzitometrijski podaci iznad odgovarajućih traka (A), odnosno srednje vrednosti ± SD triplikata jednog od tri nezavisna eksperimenta (B) (* $p < 0,05$ u odnosu na netretirane ćelije).

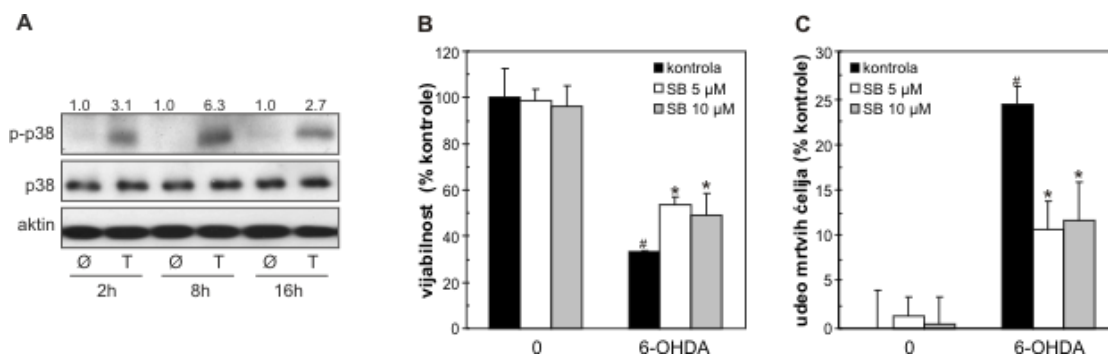
Imunoblotom je takođe utvrđeno da 6-OHDA na vremenski zavisni način aktivira JNK (Slika 19A). Inhibicija ove MAP kinaze farmakološkim inhibitorom SP600125 takođe nije imala statistički značajan uticaj na vijabilitet SH-SY5Y ćelija tretiranih 6-OHDA (Slika 19B). Premda 6-OHDA indukuje aktivaciju MAP kinaze JNK, ova kinaza ne učestvuje u toksičnom delovanju oksidopamina na SH-SY5Y ćelije.



Slika 19. Citotoksično delovanje 6-OHDA ne zavisi od aktivacije JNK. (A) SH-SY5Y ćelije su tretirane oksidopaminom (50 μM) tokom naznačenih vremena, nakon čega je fosforilacija JNK merena imunoblotom. (B) SH-SY5Y ćelije su 24h tretirane samo 6-OHDA (50 μM) odsustvu ili prisustvu inhibitora JNK SP600125 (10 μM), posle čega je vijabilitet ćelija određen MTT testom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi jednog od tri nezavisna eksperimenta i denzitometrijski podaci iznad odgovarajućih traka (A), odnosno srednje vrednosti ± SD triplikata jednog od tri nezavisna eksperimenta (B) (* $p < 0,05$ u odnosu na netretirane ćelije).

4.6.2. 6-OHDA aktivira MAP kinazu p38, koja deluje citotoksično

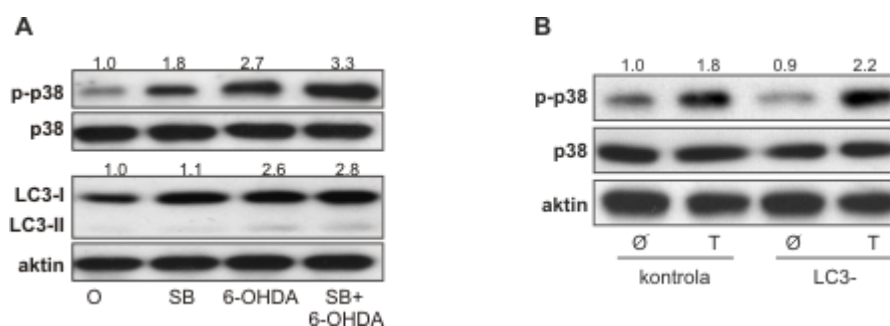
Dalje, imunoblotom je ustanovljeno da usled tretmana oksidopaminom dolazi do snažne aktivacije p38 MAPK, koja je najizraženija nakon 8h tretmana (Slika 20A). Inhibitor ove MAP kinaze SB203580 je statistički značajno oporavio vijabilitet (Slika 20B) i smanjio citotoksično delovanje oksidopamina, kako je pokazano kristal violet, odnosno LDH testom (Slika 20C). Dakle, p38 učestvuje u neurotoksičnosti 6-OHDA prema SH-SY5Y ćelijama.



Slika 20. Citotoksično delovanje 6-OHDA zavisi od aktivacije p38. (A) SH-SY5Y ćelije su tretirane oksidopaminom (50 μM) tokom naznačenih vremena, nakon čega je fosforilacija p38 merena imunoblotom. (B) SH-SY5Y ćelije su 24h tretirane 6-OHDA (50 μM) odsustvu ili prisustvu p38 inhibitora SB203580 (10 μM), posle čega je vijabilitet ćelija određen kristal violet (B), a citotoksičnost LDH testom (C). Prikazani su reprezentativni imunoblotovi jednog od tri nezavisna eksperimenta i denzitometrijski podaci iznad odgovarajućih traka (A), odnosno srednje vrednosti ± SD triplikata jednog od tri nezavisna eksperimenta (B, C) (# $p < 0,05$ u odnosu na netretirane ćelije, * $p < 0,05$ u odnosu na ćelije tretirane 6-OHDA).

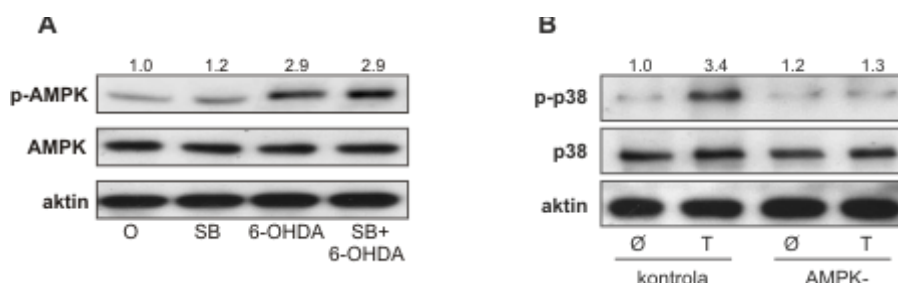
4.6.3. Aktivacija p38 je zavisna od AMPK, ali ne utiče na indukciju autofagije

U sledećem eksperimentu ispitivali smo ulogu p38 u indukciji citotoksične autofagije oksidopaminom. Ponovo smo koristili SB203580, koji iako blokira aktivnost p38, ne sprečava njegovu fosforilaciju (Kumar i sar., 1999) (Slika 21A). Supresija p38 nije imala uticaja na konverziju LC3 proteina stimulisanu oksidopaminom (Slika 21A), odnosno nije uticala na indukciju autofagije. Da bismo ispitivali da li autofagija utiče na aktivnost p38, ćelije sa smanjenom ekspresijom LC3 smo stimulisali 6-OHDA. Imunoblot metodom smo utvrdili da supresija autofagije nema uticaja na aktivaciju p38 oksidopaminom (Slika 21B). Dakle, aktivacija MAP kinaze p38 i indukcija autofagije oksidopaminom su dva nezavisna događaja.



Slika 21. Aktivacija MAP kinaze p38 i indukcija autofagije oksidopaminom su dva nezavisna događaja. (A) SH-SY5Y ćelije su tretirane 6-OHDA (50 μM) u prisustvu ili odsustvu p38 inhibitora SB203580 (10 μM), (B) SH-SY5Y ćelije transfektovane kontrolnom ili LC3 shRNA su tretirane oksidopaminom (50 μM). Nakon 8h su imunoblotom merene fosforilacija p38 i konverzija LC3 proteina. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz jednog od tri nezavisna eksperimenta i denzitometrijski podaci iznad odgovarajućih traka.

Pošto smo već pokazali da 6-OHDA izaziva snažnu aktivaciju AMPK (Slika 8), zanimalo nas da li postoji veza između aktivnosti AMPK i p38. Western blot metodom smo pokazali da kada je aktivnost MAP kinaze p38 inhibirana, oksidopamin izaziva jednako intenzivnu fosforilaciju AMPK, kao i u kontrolnim SH-SY5Y ćelijama (Slika 22A). Sa druge strane, u ćelijama sa suprimiranom ekspresijom AMPK, 6-OHDA gubi sposobnost da indukuje aktivaciju p38 (Slika 22B). Ovi rezultati sugerišu da se kod neurona stimulisanih 6-OHDA, AMPK aktivira nezavisno od p38, dok je indukcija p38 posredovana aktivnošću AMPK.



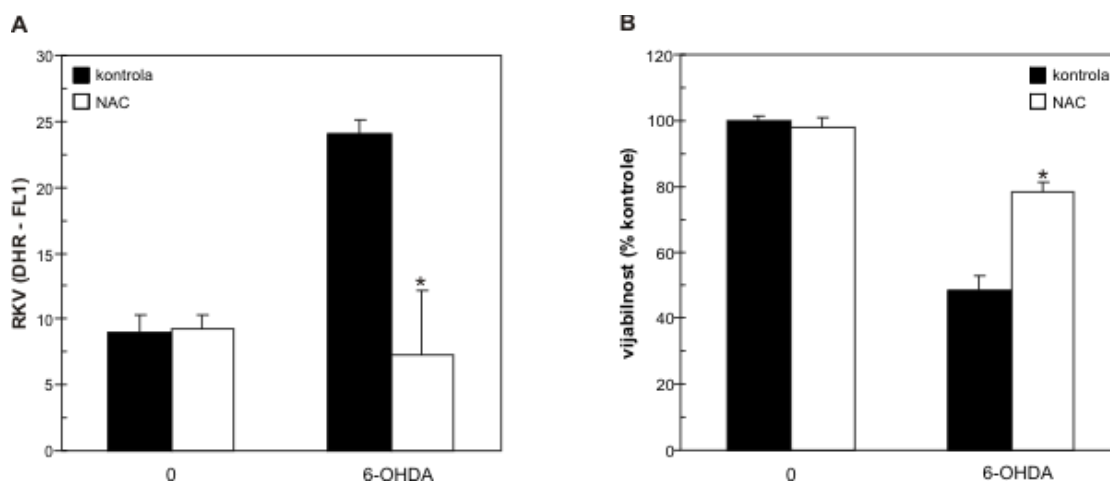
Slika 22. Aktivacija MAP kinaze p38 oksidopaminom zavisi od aktivnosti AMPK, dok je stimulacija AMPK nezavisna od aktivnosti p38. (A) SH-SY5Y ćelije su tretirane 6-OHDA (50 μM) u prisustvu ili odsustvu p38 inhibitora SB203580 (10 μM), (B) SH-SY5Y ćelije transfektovane

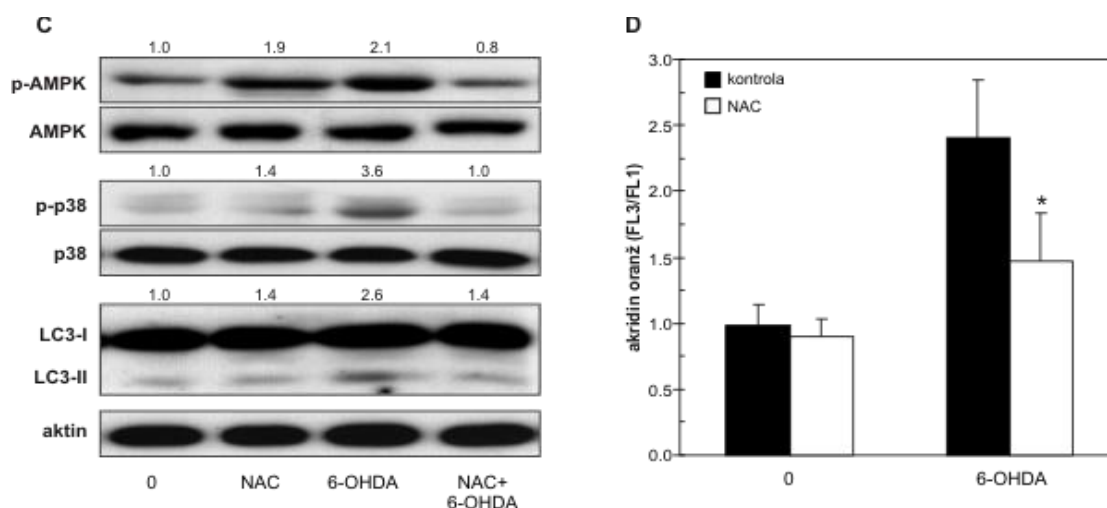
kontrolnom ili AMPK shRNA su tretirane oksidopaminom ($50\mu\text{M}$). Nakon 8h fosforilacije AMPK (A) i p38 (B) su određivane imunoblotom. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz jednog od tri nezavisna eksperimenta i denzitometrijski podaci iznad odgovarajućih traka.

4.7. Oksidativni stres je odgovoran za pokretanje AMPK zavisne citotoksične autofagije i aktivacije p38

4.7.1. Inhibicija oksidativnog stresa spašava neurone od citotoksičnog delovanja 6-OHDA

Pošto smo na početku utvrdili da 6-OHDA snažno indukuje oksidativni stres u SH-SY5Y ćelijama (Slika 4B i C), u sledećim eksperimentima hteli smo da rasvetlimo moguću ulogu oksidativnog stresa u indukciji citotoksične autofagije, aktivaciji AMPK i p38. U tom cilju, koristili smo antioksidans N-acetil cistein (NAC). Najpre smo citofluorimetrijskom analizom ćelija obojenih fluorescentnom bojom DHR, pokazali da antioksidans efikasno smanjuje koncentraciju kiseoničnih radikala u neuronima tretiranim oksidopaminom (Slika 23A). Nakon toga, kristal violet testom je pokazano da antioksidans statistički značajno povećava preživljavanje SH-SY5Y ćelija tretiranih oksidopaminom (Slika 23B), ukazujući na bitnu ulogu oksidativnog stresa u neurotoksičnosti 6-OHDA.





Slika 23. Oksidativni stres izazvan 6-OHDA u neuroblastomskoj kulturi uključen je u pokretanje AMPK zavisne autofagije i aktivaciju p38. SH-SY5Y ćelije su inkubirane sa 6-OHDA (50 μ M), sa ili bez NAC-a (2mM). Nakon 16h produkcija RKV (A) i zakišeljavanje citoplazme (D) mereni su protočnom citofluorimetrijom, nakon 24h vijabilitet ćelija određen je kristal violet testom (B), dok su nakon 8h fosforilacija AMPK i p38 i konverzija LC3 proteina određivani imunoblotom (C). Pokazani su reprezentativni imunoblotovi iz jednog od tri nezavisna eksperimenta i denzitometrijski podaci iznad odgovarajućih traka (C), i rezultati koji predstavljaju srednju vrednost \pm SD tri nezavisna eksperimenta (A, D), odnosno srednju vrednost \pm SD triplikata jednog od tri nezavisna eksperimenta (B) (* $p < 0,05$ u odnosu na ćelije tretirane 6-OHDA).

4.7.2. Antioksidans inhibira citotoksičnu autofagiju i aktivacije AMPK i p38 indukovane oksidopaminom

Konačno, imunoblot metodom smo pokazali da NAC sprečava aktivaciju AMPK i p38 u ćelijama neuroblastoma tretiranim oksidopaminom (Slika 23C), iz čega smo zaključili da povećano prisustvo RKV učestvuje u aktivaciji ovih kinaza. Pored toga, ispostavilo se da je antioksidans inhibirao oksidopaminom indukovanu konverziju LC3 molekula (Slika 23C), što navodi na zaključak da je oksidativni stres indukovani 6-OHDA odgovoran za pokretanje autofagije. U narednom eksperimentu, citofluorimetrijska analiza ćelija obojenih akridin oranžom (Slika 23D) pokazala je da NAC statistički značajno redukuje zakišeljavanje citoplazme SH-SY5Y ćelija tretiranih oksidopaminom, što je u skladu sa prethodnim nalazima da antioksidans smanjuje intenzitet autofagije indukovane oksidopaminom. Dobijeni rezultati ukazuju da je oksidativni stres odgovoran za indukciju AMPK zavisne autofagije i aktivacije p38 u neuronima tretiranim 6-OHDA.

5. DISKUSIJA

U ovoj disertaciji pokazano je da neurotoksin 6-OHDA u SH-SY5Y neuroblastomskim ćelijama indukuje citotoksičnu proapoptotsku autofagiju posredovanu oksidativnim stresom, aktivacijom AMPK i inhibicijom mTOR. Nezavisno od indukcije autofagije, aktivacija AMPK oksidopaminom dovodi i do neurotoksične aktivacije MAP kinaze p38. Dakle, oksidativnim stresom posredovana aktivacija AMPK učestvuje u proapoptotskom delovanju oksidopamina na neuroblastomske ćelije pokretanjem dva međusobno nezavisna neurotoksična mehanizma: indukcijom citotoksične autofagije i aktivacijom p38 (Shema 2).

Početni eksperimenti ove studije pokazali su da tretman 6-OHDA izaziva snažan oksidativni stres, koji dovodi do kaspazno zavisne apoptoze u SH-SY5Y ćelijama. Sposobnost 6-OHDA da stvarajući RKV van i unutar ćelije indukuje kaspazno zavisnu apoptozu u neuronima dokumentovana je brojnim studijama (Ju i sar., 2010; Li, Luo i sar., 2011; Li, Tweedie i sar., 2011; Chung i sar., 2018; Garcia-Garcia i sar., 2013; Achour i sar., 2016). Pokazano je da 6-OHDA najpre podleže autooksidaciji u toku koje nastaju H_2O_2 , p-hinon i veoma reaktivni intermedijeri O_2^- , OH^- i semihinonski radikal (Heikkila i Cohen, 1973). Osim toga, unutarćelijske RKV nastaju tako što monoaminske oksidaze metabolišu 6-OHDA do reaktivnih hinona i H_2O_2 (Gomez-Lazaro, Bonekamp i sar., 2008). Pretpostavlja se da nakon toga oslobođene RKV aktiviraju unutrašnji mitohondrijalni put apoptoze oštećujući mitohondrijalnu membranu i izazivajući oslobađanje proapoptotskog citohroma c u citosol, koji zatim aktivira kaspaze (Gomez-Lazaro i sar., 2008). Ovim promenama prethodi dobro poznata kaskada proapoptotskih molekularnih događaja kao što su povećanje ekspresije Bax i PUMA proteina i smanjenje nivoa Bcl-2 proteina pod dejstvom 6-OHDA (Gomez Lazaro i sar., 2008; Kramer i Mytilineou 2004). Oštećenje mitohondrijalne membrane, pored neospornog efekta na aktivaciju apoptoze, doprinosi i potenciranju oksidativnog stresa u ćeliji (Gomez-Lazaro, Bonekamp i sar., 2008). Naime, zbog „curenja“ superoksid anjon radikala iz narušenog transportnog lanca elektrona usled pada potencijala mitohondrijalne membrane, količina RKV u ćeliji se višestruko uvećava (Gomez-Lazaro, Bonekamp i sar., 2008). Iako u ovoj disertaciji nisu praćene promene potencijala mitohondrijalne membrane, zabeležena aktivacija kaspaza i povećanje broja apoptotičnih ćelija sugerišu da i u našim eksperimentalnim uslovima dolazi do oštećenja mitohondrija i aktivacije unutrašnjeg puta apoptoze. U skladu sa tim, pored toga što odražava autooksidaciju i unutarćelijski metabolizam 6-OHDA, povećanje superoksid anjon radikala pod dejstvom 6-OHDA bi barem delimično moglo biti i posledica oštećenja mitohondrijalne membrane. Aktivacija apoptoze u našim eksperimentalnim uslovima potvrđena je i karakterističnim morfološkim promenama na ćelijama, kao i snažnom aktivacijom kaspaza, koje su izvršni enzimi apoptoze.

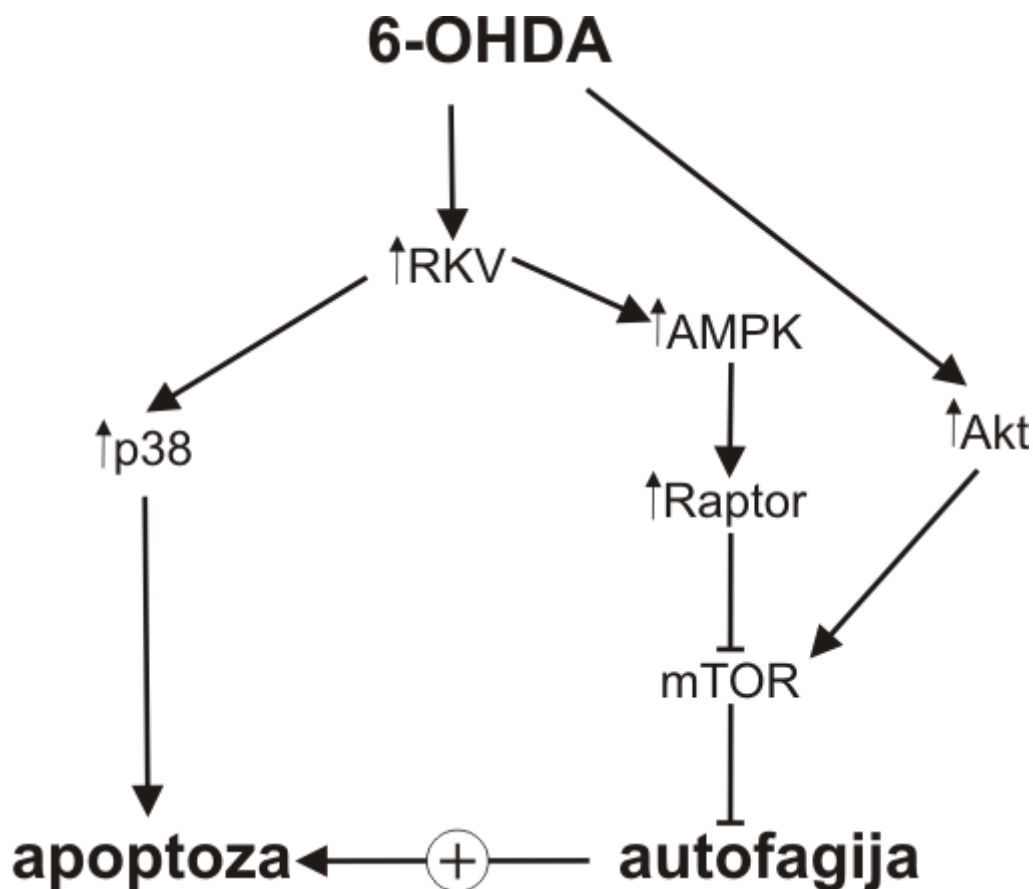
Sposobnost 6-OHDA da indukuje autofagiju je nedvosmisleno pokazana u različitim vrstama neurona: SH-SY5Y (Lin i Tsai, 2017; He i sar., 2021; Li i sar., 2021; Zhou i Cheng, 2019) i SK-N-SH humanim neuroblastomskim ćelijama (Garcia-Garcia i sar., 2013), MN9 mišjim neuroblastomskim ćelijama (Chung i sar., 2018), kao i u neuronima izolovanim iz *substantia nigra* pacova (Li, Wang i sar., 2011; Vucicevic i sar., 2018). U nameri da dokažemo indukciju i propagaciju autofagije kod neuroblastomskih ćelija tretiranih oksidopaminom, ispitali smo karakteristične pokazatelje različitih faza autofagnog fluksa: konverziju LC3, ekspresiju beklina-1, prisustvo autofagozoma i autolizozoma, zakišeljavanje citoplazme i razgradnju proteina p62. U skladu sa rezultatima drugih autora (Chen i sar., 2020; Fouillet i sar., 2012; Chung i sar., 2018;

Garcia-Garcia i sar., 2013), razgradnja supstrata autofagne proteolize p62 proteina pokazuje da 6-OHDA indukuje potpuni autofagni fluks u SH-SY5Y ćelijama.

Interesantno je da je u našoj studiji koncentracija proautofagnog molekula beklina-1 bila samo neznatno povećana pod uticajem 6-OHDA. Ovaj nalaz mogao bi se objasniti, s jedne strane postojanjem tzv. nekanonske autofagije nezavisne od aktivnosti beklina-1 (Grishchuk i sar., 2011), ili sa druge strane mogućnošću da je bazalna koncentracija beklina-1 dovoljna za inicijaciju stvaranja autofagozoma (Li, Liu i sar., 2011). U prilog prvoj pretpostavci govore podaci o postojanju autofagije posredovane inhibicijom mTOR koja je nezavisna od beklina-1 (Gao i sar., 2010). Beklin-1 nezavisna autofagija zabeležena je i u neurotoksičnom delovanju MPP+ na SH-SY5Y ćelije (Zhu i sar., 2007; Zhao i sar., 2019). Za našu studiju bitno je istaći i da je beklin-1 nezavisna autofagija obično povezana sa jačom indukcijom autofagije i pokretanjem autofagne ćelijske smrti (Chu, 2014). Tako je, na primer, u kortikalnim neuronima pacova tretiranim poznatim induktorom apoptoze staurosporinom, beklin-1 nezavisna autofagija bila uključena u indukciju apoptoze (Grishchuk i sar., 2011). Konačno, postoji i mogućnost da je došlo do povećanja koncentracije beklina-1 u nekom od termina koji mi nismo analizirali imunoblotom, nakon čega je ovaj protein razgrađen. Ovakva pretpostavka mogla bi biti podržana prethodno pokazanom sposobnošću kaspaza da seku beklin-1 (Wirawan i sar., 2010; Nikolettou i sar., 2013; Booth i sar., 2015). Pretpostavlja se da isečeni beklin-1 iz citosola prelazi u mitohondrije, gde stimuliše oslobađanje citohroma c iz mitohondrija i apoptozu (Booth i sar., 2015). Dakle, ova mogućnost ne može se isključiti, pogotovo ako se ima u vidu da je u našoj studiji pokazano da 6-OHDA istovremeno indukuje i autofagiju i apoptozu.

Da bismo utvrdili ulogu autofagije u toksičnosti 6-OHDA, a kako bismo izbegli moguće nespecifične efekte modulacije autofagije (Ichimura i sar., 2008), upotrebili smo farmakološke inhibitore i ranih (nastanak autofagozoma) i kasnih faza autofagije (formiranje autolizozoma), kao i inhibiciju ekspresije gena za LC3 protein RNK interencijom. Pored inhibitora autofagije, upotrebili smo i rapamicin, poznati supresor aktivnosti mTOR i induktor autofagije. Iako je moguće da su neki efekti inhibitora autofagije, LC3 shRNK ili rapamicina, bili nezavisni od autofagije, sinteza svih dobijenih rezultata nesumnjivo ukazuje da autofagija doprinosi neurotoksičnosti 6-OHDA. U skladu sa činjenicom da autofagija može pokrenuti apoptozu pod određenim uslovima (Fimia i Piacentini, 2009; Salazar i sar., 2009), pokazali smo da AMPK/mTOR zavisna autofagija doprinosi oksidativnom stresu koji dovodi do aktivacije kaspaza i apoptotske smrti SH-SY5Y ćelija. Eksperimenti sa oksidopaminom na drugim dopaminergičkim neuronskim linijama pokazali su kompleksan međusobni odnos autofagije i apoptoze (Chung i sar., 2018; Garcia-Garcia i sar., 2013). Utvrđeno je da se indukcija autofagije u dopaminergičkoj neuronskoj liniji MN9D pod dejstvom oksidopamina dešava istovremeno sa oslobađanjem citohroma c u citosol i aktivacijom kaspaze 3. Pretretman ćelija ranim inhibitorom autofagije 3-metiladeninom i uslovna delecija *Atg7* inhibirali su autofagiju i apoptozu, dok je kasni inhibitor autofagije hlorokin suprimirao autofagni fluks, ali nije imao efekta na apoptozu (Chung i sar., 2018), sugerišući da preterano aktivirana autofagija dovodi do indukcije apoptoze. Tretman SK-N-SH neuroblastomskih ćelija oksidopaminom je takođe stimulisao autofagni fluks i apoptozu. Međutim, ni farmakološka ni genetička modulacija autofagije nisu imale efekat na preživljavanje SK-N-SH ćelija, sugerišući da autofagija nema značajnu ulogu indukciji ćelijske smrti (Garcia-Garcia i sar., 2013). Sa druge strane, u nekim studijama je pretretman ćelija agensom koji indukuje autofagiju imao zaštitni efekat na neurone tretirane oksidopaminom (Lin i Tsai, 2017). Izazivanje blagog ER stresa indukovalo je autofagiju u SH-SY5Y ćelijama, koja je zaštitila neurone od toksičnosti 6-OHDA, tako što je onemogućila aktivaciju kaspaza (Fouillet i sar., 2012), a sličan efekat pokazali su i egzozomi mezenhimalnih matičnih ćelija iz pupčane vrpce u kulturi SH-SY5Y ćelija tretiranih oksidopaminom (Chen, Liang i sar., 2020). Takođe, neuropeptid grelin oporavio je inhibiciju autofagnog fluksa i spasio SH-SY5Y ćelije od neurotoksičnosti 6-OHDA (He i sar., 2021). Stoga, neki autori čak predlažu potenciranje

autofagije kao terapijski pristup u lečenju obolelih od PB, koji bi trebalo da doprinese eliminisanju oštećenih organela, proteinskih agregata i drugih struktura (Giordano i sar., 2014). Međutim, očigledno je da je regulacija autofagije i njena uloga u neuronima rezultat vrlo složene integracije raznih signala, koji zavise od eksperimentalnih uslova primenjenih u različitim istraživanjima, te da su neophodna opsežna istraživanja da bi se bolje razjasnila njena uloga u PB. Jedno od najjednostavnijih objašnjenja za postojanje kontradiktornih rezultata je da uloga autofagije zavisi od primenjene doze 6-OHDA. Naime, može su uočiti da manje doze (20 μM) pokreću protektivnu autofagiju (Zhuang i sar., 2020), dok veće doze primenjene u našoj (50 μM) i studiji He i saradnika (He i sar., 2018) (75 μM) izazvaju citotoksičnu autofagiju ili remete autofagni fluks. Stoga, moguće je da veće doze oksidopamina posredstvom snažnog oksidativnog stresa indukuju preterano aktiviranu i/ili nepotpunu autofagiju, koja umesto da zaštiti neurone doprinosi toksičnosti 6-OHDA.



Shema 2. Hipotetički model toksičnog dejstva oksidopamina na ćelije SH-SY5Y humanog neuroblastoma. 6-OHDA dovodi do oslobađanja RKV i sledstvene aktivacije AMPK. Aktivacija AMPK, s jedne strane učestvuje u indukciji mTOR zavisne citotoksične autofagije, a sa druge strane u aktivaciji proapoptotskog delovanja MAP kinaze p38. 6-OHDA indukuje i aktivaciju Akt, koja se opire inhibiciji mTOR i indukciji citotoksične autofagije.

AMPK ima važnu ulogu u mnogim aspektima razvoja i funkcionisanja mozga: proliferaciji i migraciji neurona, morfogenezi i sinaptičkoj komunikaciji, ali uključena je i u patološke pojave, kao što su umiranje neurona, deplecija energetskih zaliha i neurodegenerativna oboljenja (Amato i Man, 2011). U našoj studiji je po prvi put pokazana sposobnost 6-OHDA da indukuje aktivaciju AMPK.

Sa druge strane, još ranije je pokazano da indukcija autofagije u neuronima tretiranim dopaminom, prekursorom 6-OHDA, koincidira sa aktivacijom AMPK (Gimenez-Xavier i sar., 2009). Takođe, nakon naše studije više drugih istraživanja potvrdilo je sposobnost oksidopamina da aktivira AMPK u SH-SY5Y ćelijama (Urano i sar., 2018; Zhou i Cheng, 2019; Zhang i sar., 2017), ili na drugim neuronskim ćelijskim linijama i primarnoj kulturi neurona (Chung i sar., 2018; Xu i sar., 2014). Naši eksperimenti su pokazali da aktivacija AMPK učestvuje u neurotoksičnom efektu oksidopamina bar delimično posredstvom indukcije citotoksične autofagije. Posle naše studije nekoliko istraživanja je takođe pokazalo da je aktivacija AMPK odgovorna za indukciju citotoksične autofagije oksidopaminom (Urano i sar., 2018; Zhou i Cheng, 2019; Zhang i sar., 2017; Chung i sar., 2018; Xu i sar., 2014). Sa druge strane u studiji Ma i saradnika pokazano je da 6-OHDA suprimira aktivnost AMPK u SH-SY5Y ćelijama što deluje kao citotoksični mehanizam (Ma i sar., 2020). Međutim, treba naglasiti da su u ovom istraživanju korišćene ekstremno visoke koncentracije 6-OHDA, čak 6 puta više nego u našim eksperimentima. Inhibicijom ekspresije AMPK i farmakološkom aktivacijom mTOR pokazali smo da autofagija indukovana oksidopaminom zavisi od aktivacije AMPK/Raptor i posledične inhibicije mTOR. Naša pretpostavka mogla bi biti podržana rezultatima Xu i saradnika, koji su pokazali da su aktivacija AMPK, supresija mTOR i njenih supstrata S6K i 4E-BP1 barem delimično odgovorni za smrt PC12 neuroblastomskih ćelija i primarnih neurona tretiranih oksidopaminom (Xu i sar., 2014). Takođe, sposobnosti neurotrofnog faktora mezencefalnih astrocita i α -lipoične kiseline da štite SH-SY5Y od 6-OHDA bile su posredovane inhibicijom AMPK/mTOR zavisne autofagije (Zhang i sar., 2017; Zhou i Cheng, 2019). Osim toga, naši rezultati bili su u skladu i sa neuroprotektivnom aktivnošću Akt/mTOR signalnog puta i citotoksičnom ulogom autofagije indukovane u dopaminergičkim neuronima miševa tretiranih oksidopaminom (Cheng i sar., 2011).

Osim AMPK, 6-OHDA je snažno aktivirao Akt u SH-SY5Y ćelijama. Ova serin/treonin kinaza igra ključnu ulogu u regulaciji ćelijske smrti, rastu i metabolizmu ćelija (Cheng, Kim i sar., 2011). Kod postmitotskih neurona, ne samo da utiče na rast i veličinu, već i na karakteristike specifične za neurone kao što su: izrastanje aksona, debljinu i grananje aksona, snagu sinapsi, rast dendrita i aksonalnu degeneraciju (Cheng, Kim i sar., 2011). Većina studija pokazuje da Akt pomaže preživljavanje ćelija i inhibira apoptozu (Zhao i sar., 2017). Međutim, pospešivanjem oksidativne fosforilacije Akt može doprineti nastanku i akumulaciji RKV (Zhao i sar., 2017), čineći tako ćelije osetljivijim na oštećenja i smrt izazvanu oksidativnim stresom. U prethodnim studijama je pokazano da 6-OHDA indukuje protektivnu aktivaciju Akt (Jiang i Yu, 2005) ili da izaziva inhibiciju Akt, koja posreduje u neurotoksičnom delovanju oksidopamina na SH-SY5Y ćelije (Chen i sar., 2004; Xu i sar., 2014). U skladu sa tim, pokazano je da konstitutivno aktivna forma Akt (miristoilovana Akt, myr-Akt) i Rheb, aktivator mTOR, štite dopaminske neurone nakon injekcije oksidopamina u striatum upravo supresijom preterano aktivirane citotoksične autofagije (Cheng, Kim i sar., 2011). Takođe, na osnovu eksperimenata izvedenih na PC12 ćelijama koje ekspimiraju konstitutivno aktivnu formu Akt kinaze, Xu i saradnici (Xu i sar., 2014) su utvrdili da je zaštitni efekat povećane aktivacije Akt u stresu izazvanom oksidopaminom posredovan povećanom aktivnošću mTOR i njegovih supstrata. U skladu sa pomenutim studijama, pokazali smo da Akt štiti SH-SY5Y ćelije od neurotoksičnog delovanja 6-OHDA. Pošto smo pokazali smo da inhibitor Akt 10-DEBC-dihidrohlorid i transfekcija sa Akt siRNA dodatno stimulišu autofagiju u 6-OHDA tretiranim ćelijama, možemo pretpostaviti da je protektivno delovanje Akt bilo delimično posredovano inhibicijom citotoksične autofagije. Osim toga, važno je istaći i da je snažna aktivacija Akt bila u neskladu sa inhibicijom njegovog supstrata mTOR, pa se postavlja pitanje kako uopšte dolazi do inhibicije mTOR i aktivacije autofagije u prisustvu aktiviranog Akt. Najlogičniji odgovor je da inhibitorski uticaj AMPK nadjačava stimulatorski efekat Akt na mTOR. Takođe, moguće je i da modifikacija nekih drugih, u našoj studiji neispitanih signalnih puteva, dovodi do inhibicije mTOR. Iako uticaj Akt na mTOR nije ispitivan u ovoj disertaciji, podatak da inhibicija Akt pojačava

autofagiju stimulisanu 6-OHDA sugerise da se Akt, u skladu sa svojom dobro poznatom aktivirajućom ulogom na mTOR (Shaw, 2009), suprotstavlja inhibiciji mTOR indukovanoj 6-OHDA u SH-SY5Y ćelijama.

Poznato je da postoji složena interakcija između aktivnosti AMPK i Akt (Zhao i sar., 2017). Pokazano je da Akt inhibira AMPK u modelu ishemije kod pacova (Zhao i sar., 2017). Takođe, utvrđeno je i da AMPK može inhibirati Akt (Zhao i sar., 2017). Sa druge strane, postoje i podaci da AMPK može da aktivira Akt, kako u uslovima metaboličkog stresa (Lieberthal i sar., 2011), tako i u degeneraciji SH-SY5Y ćelija izazvanoj neurotoksinom MPP+ (Jovanovic-Tucovic i sar., 2019). Rezultati navedene studije pokazuju da AMPK zavisna aktivacija Akt štiti SH-SY5Y ćelije od neurotoksina MPP+ supresijom oksidativnog stresa (Jovanovic-Tucovic i sar., 2019). Iako uzajamni odnos između aktivnosti AMPK i Akt, kao ni veza između Akt i produkcije RKV, nisu praćeni u našoj studiji, moguće je da bi sličan scenario mogao doprineti zaštitnim efektima Akt u smrti SH-SY5Y ćelija indukovanoj oksidopaminom.

Zna se da je neurotoksični efekat oksidopamina u kulturi neuronskih ćelija posredovan promenama u aktivnosti MAP kinaza (Bohush i sar., 2018). Postoji više studija koje ukazuju na smrtonosno dejstvo aktivacije ERK i u *in vivo* i u *in vitro* modelima smrti neurona (Rai i sar., 2019), uključujući i neurotoksičnost indukovanu oksidopaminom u B65 neuroblastomskim ćelijama (Kulich i sar., 2007). Sa druge strane, postoje podaci da aktivacija ERK deluje neuroprotektivno (Fahlman i sar., 2002; Karmarkar i sar., 2011), ali i podaci koji pokazuju da aktivacija ERK nema nikakvog uticaja na preživljavanje ćelija (Jiang i Yu, 2005). U skladu sa prethodnim rezultatima (Kulich i Chu, 2001; Weng i sar., 2007; Huang i sar., 2018), 6-OHDA je i u našim eksperimentima aktivirao ERK. Međutim, farmakološka inhibicija ERK kinaza nije imala značajan efekat na vijabilitet neuroblastomskih ćelija tretiranih oksidopaminom, što ukazuje da smrt nije bila posredovana niti suprimirana aktivnošću ERK. Kontradiktorna uloga ERK u različitim istraživanjima bi se mogla objasniti studijama koje sugerisu da aktivacija ERK sama po sebi ne određuje sudbinu ćelije (Rai i sar., 2019), već da zavisi od konteksta (Ferrer i sar., 2001), doze neurotoksina kojim se izaziva, kao od i trajanja same aktivacije (Park i sar., 2013).

Takođe, prethodno je pokazano da aktivacija JNK učestvuje u neurotoksičnosti 6-OHDA (Eminel i sar., 2004; Crocker i sar., 2011). 6-OHDA je i u našoj studiji na vremenski zavisni način aktivirao JNK, ali inhibicija ove MAP kinaze farmakološkim inhibitorom SP600125 nije imala statistički značajan efekat na vijabilitet SH-SY5Y ćelija. U skladu sa rezultatima dobijenim iz istraživanja neurotoksičnosti citostatika citarabina (Besirli i Malcolm, 2003), možemo pretpostaviti da je u našoj studiji aktivacija JNK bila simptom umiranja neurona tretiranih 6-OHDA, a ne uzrok smrti. Iako je iz literature poznato da aktivacija ERK (Wang i sar., 2019) i aktivacija JNK (Wei i sar., 2008), mogu učestvovati u indukciji autofagije, imajući u vidu da inhibitori ovih MAP kinaza u našoj studiji nisu imali bitan uticaj na preživljavanje neurona tretiranih 6-OHDA, nismo dalje ispitivali da li aktivacija ERK i JNK posreduje u indukciji autofagije.

p38 MAP kinaza se aktivira pod uticajem raznih stresnih stimulusa – proinflamatornih citokina, UV zračenja, toplotnog i osmotskog šoka, kao i pod dejstvom mitogena (Wang i sar., 2012). Postojana aktivacija MAP kinaze p38 učestvuje u indukciji apoptoze u različitim neurodegenerativnim bolestima, uključujući i PB (Fadaka i sar., 2017). Studije na *in vivo* i *in vitro* modelima neurodegenerativnih bolesti pokazale su da aktivirana p38 deluje proapoptotski, aktivirajući p53 i transkripcioni faktor NF- κ B, koji zatim dovode do povećane sinteze proinflamatornih citokina (TNF α , IL6, NO), proapoptotskih proteina PUMA i Bax (Karunakaran i sar., 2008) i aktivacije mitohondrijalnog puta apoptoze (Wang i sar., 2012). Eksperimenti na životinjama su pokazali da inhibitori p38 poboljšavaju preživljavanje transplantiranih dopaminergičkih neurona, kao i da štite ćelije od neurotoksičnih procesa koji se javljaju kod PB

(Gomez-Lazaro i sar., 2008; Karunakaran i sar., 2008). Pojačano prisustvo fosforilisanе p38 MAP kinaze nađeno je u neuronima koji se nalaze u SNpc obolelih od PB (Wang i sar., 2012). Konačno, pokazano je i da 6-OHDA stimuliše aktivaciju p38 u dopaminergičkim neuronima koja doprinosi indukciji apoptoze (Gomez-Lazaro, Galindo i sar., 2008; Choi i sar., 2004). U skladu sa pomenutim studijama 6-OHDA je snažno aktivirao p38 i u našim eksperimentima. Za razliku od ERK i JNK, pojačana aktivnost p38 signalnog puta je u našem istraživanju bila direktno povezana sa toksičnim efektima 6-OHDA, što je dokazano korišćenjem farmakološkog inhibitora p38 SB203580.

Pošto je bilo utvrđeno da tretman 6-OHDA dovodi do aktivacije p38 i AMPK i da je aktivnost oba enzima bitna za njegovo neurotoksično dejstvo, interesovalo nas je da li postoji međuzavisnost između aktivnosti ova dva molekula. Sposobnost AMPK da aktivira p38 je pokazana u različitim eksperimentalnim uslovima (Bae i sar., 2011; Kim i sar., 2011; Song i sar., 2019), uključujući i SH-SY5Y ćelije u uslovima metaboličkog i oksidativnog stresa (Filomeni i sar., 2011). S druge strane, postoje i radovi u kojima je pokazana negativna korelacija između aktivnosti ova dva enzima. Tako je na primer pokazano da AMPK inhibira p38 u SH-SY5Y ćelijama tretiranim alkoholom (Gu i sar., 2018) i da aktivacija AMPK metforminom suprimira morfinom indukovanu stimulaciju p38 u ćelijama mikroglije (Pan i sar., 2016). Takođe, utvrđeno je da je supresija AMPK supstancom C u leukemijskim ćelijama posredovana aktivacijom p38 (Chiou i sar., 2020) i da pojačana aktivnost p38 inhibira AMPK u ćelijama jetre tokom procesa glukoneogeneze (Ruggieri i Bartenschlager, 2015). Pošto inhibitor p38 nije uticao na aktivnost AMPK u ćelijama tretiranim oksidopaminom, pretpostavili smo da stimulacija AMPK indukovana 6-OHDA u SH-SY5Y ćelijama nije bila posredovana aktivacijom p38. Sa druge strane, imajući u vidu da je genetička supresija AMPK potpuno inhibirala aktivnost p38, zaključili smo da 6-OHDA upravo preko aktivacije AMPK aktivira MAP kinazu p38.

Poznato je da p38 može imati i stimulatorno i inhibitorno dejstvo na indukciju autofagije. Na primer, aktivacija p38 je doprinela indukciji autofagije u fibroblastima tretiranim vodonik peroksidom i glatkim mišićnim ćelijama izloženim osteopontinu (Luo i sar., 2011; Zheng i sar., 2012), dok je inhibirala autofagiju u mikroglijalnim ćelijama aktiviranim LPS (He, She i sar., 2018). Takođe, studija na različitim ćelijskim linijama neurona pokazala je da p38 i autofagija negativno regulišu jedna drugu preko mTOR (Guo i sar., 2016). Sa druge strane, u studiji Zhanga i saradnika pokazano je da inhibitor p38 SB203580 nezavisno od supresije p38 indukuje autofagiju u ćelijama hepatocelularnog karcinoma (Zhang i sar., 2016). Pošto u našem istraživanju inhibicija p38 nije uticala na autofagiju, niti je inhibicija autofagije uticala na aktivnost p38 stimulisane 6-OHDA, mogli smo da zaključimo da su to dva nezavisna događaja. Dakle, mogli bismo pretpostaviti da uticaj p38 na indukciju autofagije zavisi od vrste i trajanja stimulusa, intenziteta i postojanosti aktivacije p38, kao i od modulacije nishodnih signalnih puteva (Webber i Tooze, 2010; Guo i sar., 2016).

Oksidativni stres je glavni medijator neurotoksičnosti 6-OHDA (Cohen i Heikkila, 1974; Klockgether, 2004; Blum i sar., 2001). U skladu sa tim, ključna uloga RKV u neurotoksičnosti 6-OHDA potvrđena je sposobnošću antioksidansa N-acetil cisteina da neutrališe toksično delovanje oksidopamina na SH-SY5Y ćelije. Poznato je da RKV mogu direktno da aktiviraju AMPK (Zhao i sar., 2017; Xu i sar., 2014), ali i da su jedan od najvažnijih stimulusa za indukciju autofagije (Filomeni i sar., 2015; Yun i sar., 2020). Više studija na primarnim i neuronima različitih ćelijskih linija pokazalo je da oksidativni stres indukuje aktivaciju AMPK (Filomeni i sar., 2011; Yu i sar., 2014) i da pokreće autofagiju (Chung i sar., 2018; Xu i sar., 2014). Takođe, utvrđeno je da oksidativni stres posreduje u indukciji AMPK zavisne autofagije dopaminom, prekursorom 6-OHDA (Gimenez-Xavier i sar., 2009). U skladu sa tim, u našoj studiji je pokazano da N-acetil cistein značajno smanjuje aktivaciju AMPK i indukciju autofagije, pa se može zaključiti da je upravo oksidativni stres odgovoran za indukciju AMPK zavisne autofagije oksidopaminom. Sa

druge strane, interesantno je da su i genetička supresija AMPK i genetička supresija autofagije smanjile oksidativni stres indukovani 6-OHDA, što bi značilo da aktivacija AMPK i indukcija autofagije oksidopaminom stimulišu produkciju RKV. Dakle, moglo bi se zaključiti da između oksidativnog stresa, aktivacije AMPK i indukcije citotoksične autofagije pod uticajem oksidopamina postoji pozitivna povratna sprega koja doprinosi propagaciji neurotoksičnog signala. Iako je primarna uloga autofagije da suprimira štetne efekte RKV razgradnjom molekula oštećenih oksidativnim stresom i mitohondrija koji su glavni proizvođači RKV (Dan Dunn i sar., 2015), poznato je da u određenim uslovima autofagija može promovisati oksidativni stres. Na primer utvrđeno je da preterano aktivirana autofagija indukuje oksidativna oštećenja u aterosklerozi (Yang i sar., 2017). Jedno od mogućih objašnjenja za prooksidativno delovanje autofagije moglo bi biti autofagna razgradnja antioksidativnog enzima katalaze, što je utvrđeno da se dešava u ćelijama fibrosarkoma tretiranim inhibitorima kaspaza (Yu i sar., 2006). Dakle može se zaključiti da je u našoj studiji oksidopaminom indukovana produkcija RKV jedan od početnih događaja, koji je odgovoran za pokretanje AMPK zavisne autofagije, ali i efektorski mehanizam ćelijske smrti indukovane citotoksičnom autofagijom.

Od ranije je poznato da RKV posreduju u aktivaciji p38 izazvanoj oksidopaminom (Choi i sar., 2004; Song i sar., 2010; Kwon i sar., 2014). Pošto je antioksidans suprimirao 6-OHDA indukovanu aktivaciju p38, zaključili smo da je i u našoj studiji oksidativni stres indukovani oksidopaminom bio odgovoran za aktivaciju ove MAP kinaze. Pošto smo utvrdili da oksidativni stres posreduje u stimulaciji i AMPK i p38, a da AMPK posreduje u aktivaciji p38, može se pretpostaviti da je stimulatorni efekat RKV na p38 bio bar delimično posredovan aktivacijom AMPK. Sa druge strane, pokazano je da aktivirana p38 može potencirati stvaranje RKV (He i sar., 2018). Stoga, iako uticaj p38 na produkciju RKV nismo ispitivali, imajući u vidu pomenuto istraživanje, kao i njen potvrđeni citotoksični efekat, ne možemo isključiti mogućnost da između oksidativnog stresa i aktivacije p38 indukovane oksidopaminom takođe postoji pozitivna povratna sprega.

Imajući u vidu da je i na animalnim modelima i kod obolelih od PB pokazano da je oksidativni stres glavni medijator neurotoksičnosti (Giordano i sar., 2014), neuroprotektivni potencijal primene antioksidanasa se odavno ispituje. Međutim, iako su različiti antioksidansi bili efikasni u *in vitro* i *in vivo* modelima PB, u kliničkim istraživanjima su se uglavnom pokazali kao neuspešni (Giordano i sar., 2014). Neuspeh antioksidativne terapije mogao bi se objasniti činjenicom da je većina dopaminergičkih neurona u substantia nigra izumrla u trenutku uspostavljanja dijagnoze PB (Cheng i sar., 2011), dok su u preživelim neuronima mehanizmi antioksidativne zaštite odavno preopterećeni (Giordano i sar., 2014). Drugi problem je što nijedan antioksidans pojedinačno ne može efikasno neutralisati sve RKV koje nastaju u nervnom tkivu (Giordano i sar., 2014). Stoga, bilo bi dobro kombinovati više različitih antioksidanasa ili antioksidanse kombinovati sa inhibitorima prooksidativnih/citotoksičnih mehanizama, što bi prema našoj studiji mogle biti aktivacija AMPK, aktivacija p38 i citotoksična autofagija.

Konačno, treba naglasiti da je u ovoj studiji, inhibicijom AMPK zavisne autofagije i aktivacije p38 postignuta samo delimična zaštita neurona, što upućuje na postojanje dodatnih AMPK nezavisnih mehanizama koji doprinose neurotoksičnosti 6-OHDA. Pored toga, postavlja se pitanje koje bi implikacije mogli imati prikazani rezultati na terapiju Parkinsonove bolesti. Iako je pokazano prisustvo abnormalnih akumulacija autofagnih vezikula u mozgovima obolelih od PB (Gao i sar., 2010; Anglade i sar., 1997), tačna uloga autofagije u PB još uvek nije utvrđena. Preovlađuje gledište da autofagija ima neuroprotektivnu ulogu, omogućavajući razgradnju nakupljenog α -sinukleina i nefunkcionalnih mitohondrija (Chu, 2011). Međutim, postoje dokazi i za suprotnu hipotezu (Xilouri i Stefanis, 2010). Moguće je da se razmimoilaženja javljaju usled posmatranja različitih trenutaka u patogenezi PB. Smatra se da autofagija u početku patogeneze PB

ima zaštitnu ulogu jer omogućava degradaciju štetnih i/ili nefunkcionalnih struktura, dok je njena preterana aktivacija u kasnijim fazama štetna (Xilouri i Stefanis, 2011). Prema tome model neurotoksinom izazvane ćelijske smrti ispitan u ovoj disertaciji, i pretpostavljeni efektorski mehanizmi, mogli bi biti relevantni za razmatranje kasnijih faza PB.

Dakle, naša studija pokazuje da postoje i zavisni i mehanizmi nezavisni od autofagije, koji su uključeni u *in vitro* neurotoksičnost oksidopamina. Oba mehanizma su pokrenuta aktivacijom AMPK, koja je pak zavisna od indukcije oksidativnog stresa. Citotoksični mehanizmi mTOR zavisne autofagije posredovani su amplifikacijom oksidativnog stresa i indukcijom apoptoze. Neurotoksični signali nezavisni od autofagije posredovani su aktivacijom MAP kinaze p38. Uz sva ograničenja *in vitro* studije sprovedene na neuroblastomskoj ćelijskoj liniji koja simplifikuje realne uslove koji postoje u mozgu obolelih od PB, naši rezultati jasno sugerišu da bi AMPK, MAP kinaza p38 i autofagija mogle biti dobra meta za terapiju neurodegeneracije.

6. ZAKLJUČCI

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

1. 6-OHDA indukuje oksidativnim stresom i aktivacijom kaspaza posredovanu apoptozu SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma.
2. 6-OHDA indukuje oksidativnim stresom posredovanu aktivaciju AMPK/Raptor, koja inhibira aktivnost mTOR/S6K u SH-SY5Y ćelijama.
3. 6-OHDA indukuje oksidativnim stresom i modulacijom AMPK/mTOR posredovanu autofagiju u SH-SY5Y ćelijama.
4. 6-OHDA indukuje protektivnu aktivaciju Akt koja se opire indukciji autofagije.
5. Autofagija indukovana 6-OHDA ima citotoksično dejstvo, koje ostvaruje stimulacijom oksidativnog stresa i apoptoze.
6. 6-OHDA aktivira MAP kinaze ERK i JNK, ali one ne učestvuju u citotoksičnom delovanju 6-OHDA na SH-SY5Y ćelije.
7. 6-OHDA indukuje aktivaciju MAP kinaze p38 posredovanu oksidativnim stresom i aktivacijom AMPK.
8. p38 ne posreduje u aktivaciji AMPK i indukciji autofagije, ali učestvuje u citotoksičnom delovanju 6-OHDA na SH-SY5Y ćelije.

7. LITERATURA

- Achour, I., Arel-Dubeau, A. M., Renaud, J., Legrand, M., Attard, E., Germain, M., & Martinoli, M. G. (2016). Oleuropein Prevents Neuronal Death, Mitigates Mitochondrial Superoxide Production and Modulates Autophagy in a Dopaminergic Cellular Model. *International journal of molecular sciences*, *17*(8), 1293.
- Amato, S., & Man, H. Y. (2011). Bioenergy sensing in the brain: the role of AMP-activated protein kinase in neuronal metabolism, development and neurological diseases. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *10*(20), 3452–3460.
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M. T., Michel, P. P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E. C., & Agid, Y. (1997). Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histology and histopathology*, *12*(1), 25–31.
- Bae, C. H., Kim, J. W., Ye, S. B., Song, S. Y., Kim, Y. W., Park, S. Y., & Kim, Y. D. (2011). AMPK induces MUC5B expression via p38 MAPK in NCI-H292 airway epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, *409*(4), 669–674.
- Batlevi, Y., & La Spada, A. R. (2011). Mitochondrial autophagy in neural function, neurodegenerative disease, neuron cell death, and aging. *Neurobiology of disease*, *43*(1), 46–51.
- Besirli, C. G., & Johnson, E. M., Jr (2003). JNK-independent activation of c-Jun during neuronal apoptosis induced by multiple DNA-damaging agents. *The Journal of biological chemistry*, *278*(25), 22357–22366.
- Biedler, J. L., Helson, L., & Spengler, B. A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research*, *33*(11), 2643–2652.
- Biedler, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., & Freedman, L. S. (1978). Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer research*, *38*(11 Pt 1), 3751–3757.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., & Johansen, T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods in enzymology*, *452*, 181–197.
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A. L., Sadoul, R., & Verna, J. M. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, *65*(2), 135–172.
- Bockaert, J., & Marin, P. (2015). mTOR in Brain Physiology and Pathologies. *Physiological reviews*, *95*(4), 1157–1187.

- Bohush, A., Niewiadomska, G., & Filipek, A. (2018). Role of Mitogen Activated Protein Kinase Signaling in Parkinson's Disease. *International journal of molecular sciences*, *19*(10), 2973.
- Booth, L. A., Tavallai, S., Hamed, H. A., Cruickshanks, N., & Dent, P. (2014). The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Cellular signalling*, *26*(3), 549–555.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*, 248–254.
- Chambers, J. W., Howard, S., & LoGrasso, P. V. (2013). Blocking c-Jun N-terminal kinase (JNK) translocation to the mitochondria prevents 6-hydroxydopamine-induced toxicity in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry*, *288*(2), 1079–1087.
- Chen, G., Bower, K. A., Ma, C., Fang, S., Thiele, C. J., & Luo, J. (2004). Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death. *FASEB journal*, *18*(10), 1162–1164.
- Chen, H. X., Liang, F. C., Gu, P., Xu, B. L., Xu, H. J., Wang, W. T., Hou, J. Y., Xie, D. X., Chai, X. Q., & An, S. J. (2020). Exosomes derived from mesenchymal stem cells repair a Parkinson's disease model by inducing autophagy. *Cell death & disease*, *11*(4), 288.
- Chen, J., Jiang, C., Du, J., & Xie, C. L. (2020). MiR-142-5p Protects Against 6-OHDA-Induced SH-SY5Y Cell Injury by Downregulating BECN1 and Autophagy. *Dose-response*, *18*(1), 1559325820907016.
- Cheng, H. C., Kim, S. R., Oo, T. F., Kareva, T., Yarygina, O., Rzhetskaya, M., Wang, C., During, M., Talloczy, Z., Tanaka, K., Komatsu, M., Kobayashi, K., Okano, H., Kholodilov, N., & Burke, R. E. (2011). Akt suppresses retrograde degeneration of dopaminergic axons by inhibition of macroautophagy. *The Journal of neuroscience*, *31*(6), 2125–2135.
- Cheng, H. C., Ulane, C. M., & Burke, R. E. (2010). Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Annals of neurology*, *67*(6), 715–725.
- Chiou, J. T., Huang, C. H., Lee, Y. C., Wang, L. J., Shi, Y. J., Chen, Y. J., & Chang, L. S. (2020). Compound C induces autophagy and apoptosis in parental and hydroquinone-selected malignant leukemia cells through the ROS/p38 MAPK/AMPK/TET2/FOXP3 axis. *Cell biology and toxicology*, *36*(4), 315–331.
- Choi, W. S., Eom, D. S., Han, B. S., Kim, W. K., Han, B. H., Choi, E. J., Oh, T. H., Markelonis, G. J., Cho, J. W., & Oh, Y. J. (2004). Phosphorylation of p38 MAPK induced by oxidative stress is linked to activation of both caspase-8- and -9-mediated apoptotic pathways in dopaminergic neurons. *The Journal of biological chemistry*, *279*(19), 20451–20460.
- Chu C. T. (2011). Diversity in the regulation of autophagy and mitophagy: lessons from Parkinson's disease. *Parkinson's disease*, *2011*, 789431.

- Chu CT (2014): Autophagy, iz: Aminoff MJ, Daroff RB (urednici), Encyclopedia of The Neurological Sciences (2. izdanje, tom I, str. 355-357), 2014, Elsevier, Oxford, UK
- Chung, Y., Lee, J., Jung, S., Lee, Y., Cho, J. W., & Oh, Y. J. (2018). Dysregulated autophagy contributes to caspase-dependent neuronal apoptosis. *Cell death & disease*, 9(12), 1189.
- Cohen, G., & Heikkila, R. E. (1974). The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *The Journal of biological chemistry*, 249(8), 2447–2452.
- Collins, L. M., O'Keeffe, G. W., Long-Smith, C. M., Wyatt, S. L., Sullivan, A. M., Toulouse, A., & Nolan, Y. M. (2013). Mitogen-activated protein kinase phosphatase (MKP)-1 as a neuroprotective agent: promotion of the morphological development of midbrain dopaminergic neurons. *Neuromolecular medicine*, 15(2), 435–446.
- Connolly, D. T., Knight, M. B., Harakas, N. K., Wittwer, A. J., & Feder, J. (1986). Determination of the number of endothelial cells in culture using an acid phosphatase assay. *Analytical biochemistry*, 152(1), 136–140.
- Crocker, C. E., Khan, S., Cameron, M. D., Robertson, H. A., Robertson, G. S., & Lograsso, P. (2011). JNK Inhibition Protects Dopamine Neurons and Provides Behavioral Improvement in a Rat 6-hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease. *ACS chemical neuroscience*, 2(4), 207–212.
- Cubo E, Goetz CG (2014): Parkinson's Disease, iz: Aminoff MJ, Daroff RB (urednici), Encyclopedia of The Neurological Sciences (2. izdanje, tom III, str. 828--829), 2014, Elsevier, Oxford, UK
- Curtius, H. C., Wolfensberger, M., Steinmann, B., Redweik, U., & Siegfried, J. (1974). Mass fragmentography of dopamine and 6-hydroxydopamine. Application to the determination of dopamine in human brain biopsies from the caudate nucleus. *Journal of chromatography*, 99(0), 529–540.
- Dagda, R. K., Das Banerjee, T., & Janda, E. (2013). How Parkinsonian toxins dysregulate the autophagy machinery. *International journal of molecular sciences*, 14(11), 22163–22189.
- Dagda, R. K., Zhu, J., Kulich, S. M., & Chu, C. T. (2008). Mitochondrially localized ERK2 regulates mitophagy and autophagic cell stress: implications for Parkinson's disease. *Autophagy*, 4(6), 770–782.
- Dan Dunn, J., Alvarez, L. A., Zhang, X., & Soldati, T. (2015). Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox biology*, 6, 472–485.
- Eminel, S., Klettner, A., Roemer, L., Herdegen, T., & Waetzig, V. (2004). JNK2 translocates to the mitochondria and mediates cytochrome c release in PC12 cells in response to 6-hydroxydopamine. *The Journal of biological chemistry*, 279(53), 55385–55392.

- Fadaka AO, Ojo OA, Osukoya OA, Akuboh O, Ajiboye BO (2017). Role of p38 MAPK Signaling in Neurodegenerative Diseases: A Mechanistic Perspective. *Ann Neurodegener Dis* 2(1): 1026.
- Fahlman, C. ., Bickler, P. ., Sullivan, B., & Gregory, G. . (2002). Activation of the neuroprotective ERK signaling pathway by fructose-1,6-bisphosphate during hypoxia involves intracellular Ca²⁺ and phospholipase C. *Brain Research*, 958(1), 43–51.
- Ferrer, I., Blanco, R., & Carmona, M. (2001). Differential expression of active, phosphorylation-dependent MAP kinases, MAPK/ERK, SAPK/JNK and p38, and specific transcription factor substrates following quinolinic acid excitotoxicity in the rat. *Brain research. Molecular brain research*, 94(1-2), 48–58.
- Ferrer, I., Blanco, R., Carmona, M., Puig, B., Barrachina, M., Gómez, C., & Ambrosio, S. (2001). Active, phosphorylation-dependent mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK), and p38 kinase expression in Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 108(12), 1383–1396.
- Filomeni, G., Cardaci, S., Da Costa Ferreira, A. M., Rotilio, G., & Ciriolo, M. R. (2011). Metabolic oxidative stress elicited by the copper(II) complex [Cu(isaepy)₂] triggers apoptosis in SH-SY5Y cells through the induction of the AMP-activated protein kinase/p38MAPK/p53 signalling axis: evidence for a combined use with 3-bromopyruvate in neuroblastoma treatment. *The Biochemical journal*, 437(3), 443–453.
- Filomeni, G., De Zio, D., & Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell death and differentiation*, 22(3), 377–388.
- Fimia, G. M., & Piacentini, M. (2009). Toward the understanding of autophagy regulation and its interplay with cell death pathways. *Cell death and differentiation*, 16(7), 933–934.
- Flick, D. A., & Gifford, G. E. (1984). Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *Journal of immunological methods*, 68(1-2), 167–175.
- Fouillet, A., Levet, C., Virgone, A., Robin, M., Dourlen, P., Rieusset, J., Belaidi, E., Ovize, M., Touret, M., Nataf, S., & Mollereau, B. (2012). ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy. *Autophagy*, 8(6), 915–926.
- Gao, P., Bauvy, C., Souquère, S., Tonelli, G., Liu, L., Zhu, Y., Qiao, Z., Bakula, D., Proikas-Cezanne, T., Pierron, G., Codogno, P., Chen, Q., & Mehrpour, M. (2010). The Bcl-2 homology domain 3 mimetic gossypol induces both Beclin 1-dependent and Beclin 1-independent cytoprotective autophagy in cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 285(33), 25570–25581.
- Garcia-Garcia, A., Anandhan, A., Burns, M., Chen, H., Zhou, Y., & Franco, R. (2013). Impairment of Atg5-dependent autophagic flux promotes paraquat- and MPP⁺-induced apoptosis but not rotenone or 6-hydroxydopamine toxicity. *Toxicological sciences*, 136(1), 166–182.

- Garelick, M. G., & Kennedy, B. K. (2011). TOR on the brain. *Experimental gerontology*, *46*(2-3), 155–163.
- Ghavami, S., Asoodeh, A., Klonisch, T., Halayko, A. J., Kadkhoda, K., Krocak, T. J., Gibson, S. B., Booy, E. P., Naderi-Manesh, H., & Los, M. (2008). Brevinin-2R(1) semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*, *12*(3), 1005–1022.
- Ghavami, S., Eshragi, M., Ande, S. R., Chazin, W. J., Klonisch, T., Halayko, A. J., McNeill, K. D., Hashemi, M., Kerkhoff, C., & Los, M. (2010). S100A8/A9 induces autophagy and apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes that involves BNIP3. *Cell research*, *20*(3), 314–331.
- Giménez-Xavier, P., Francisco, R., Santidrián, A. F., Gil, J., & Ambrosio, S. (2009). Effects of dopamine on LC3-II activation as a marker of autophagy in a neuroblastoma cell model. *Neurotoxicology*, *30*(4), 658–665.
- Giordano, S., Darley-USmar, V., & Zhang, J. (2013). Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease. *Redox biology*, *2*, 82–90.
- Gomez-Lazaro, M., Bonekamp, N. A., Galindo, M. F., Jordán, J., & Schrader, M. (2008). 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells. *Free radical biology & medicine*, *44*(11), 1960–1969.
- Gomez-Lazaro, M., Galindo, M. F., Concannon, C. G., Segura, M. F., Fernandez-Gomez, F. J., Llecha, N., Comella, J. X., Prehn, J. H., & Jordan, J. (2008). 6-Hydroxydopamine activates the mitochondrial apoptosis pathway through p38 MAPK-mediated, p53-independent activation of Bax and PUMA. *Journal of neurochemistry*, *104*(6), 1599–1612.
- Greene, L. A., Levy, O., & Malagelada, C. (2011). Akt as a victim, villain and potential hero in Parkinson's disease pathophysiology and treatment. *Cellular and molecular neurobiology*, *31*(7), 969–978.
- Grishchuk, Y., Ginet, V., Truttmann, A. C., Clarke, P. G., & Puyal, J. (2011). Beclin 1-independent autophagy contributes to apoptosis in cortical neurons. *Autophagy*, *7*(10), 1115–1131.
- Gu, X., Cai, Z., Cai, M., Liu, K., Liu, D., Zhang, Q., Tan, J., & Ma, Q. (2018). AMPK/SIRT1/p38 MAPK signaling pathway regulates alcohol-induced neurodegeneration by resveratrol. *Molecular medicine reports*, *17*(4), 5402–5408.
- Guo, F., He, X. B., Li, S., & Le, W. (2017). A Central Role for Phosphorylated p38 α in Linking Proteasome Inhibition-Induced Apoptosis and Autophagy. *Molecular neurobiology*, *54*(10), 7597–7609.
- Harhaji-Trajkovic, L., Vilimanovich, U., Kravic-Stevovic, T., Bumbasirevic, V., & Trajkovic, V. (2009). AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, *13*(9B), 3644–3654.

- He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics*, 43, 67–93.
- He, J., Zhong, W., Zhang, M., Zhang, R., & Hu, W. (2018). P38 Mitogen-activated Protein Kinase and Parkinson's Disease. *Translational neuroscience*, 9, 147–153.
- He, X., Yuan, W., Li, Z., Hou, Y., Liu, F., & Feng, J. (2018). 6-Hydroxydopamine induces autophagic flux dysfunction by impairing transcription factor EB activation and lysosomal function in dopaminergic neurons and SH-SY5Y cells. *Toxicology letters*, 283, 58–68.
- He, X., Yuan, W., Liu, F., Feng, J., & Guo, Y. (2021). Acylated Ghrelin is Protective Against 6-OHDA-induced Neurotoxicity by Regulating Autophagic Flux. *Frontiers in pharmacology*, 11, 586302.
- He, Y., She, H., Zhang, T., Xu, H., Cheng, L., Yepes, M., Zhao, Y., & Mao, Z. (2018). p38 MAPK inhibits autophagy and promotes microglial inflammatory responses by phosphorylating ULK1. *The Journal of cell biology*, 217(1), 315–328.
- Heikkila, R. E., & Cohen, G. (1973). 6-Hydroxydopamine: evidence for superoxide radical as an oxidative intermediate. *Science (New York, N.Y.)*, 181(4098), 456–457.
- Hill, S. M., Wrobel, L., & Rubinsztein, D. C. (2019). Post-translational modifications of Beclin 1 provide multiple strategies for autophagy regulation. *Cell death and differentiation*, 26(4), 617–629.
- Hoeffler, C. A., & Klann, E. (2010). mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends in neurosciences*, 33(2), 67–75.
- Huang, C., Lin, F., Wang, G., Lu, D., Wu, Q., Liu, J., Shi, J., & Zhang, F. (2018). Tetrahydroxystilbene Glucoside Produces Neuroprotection against 6-OHDA-Induced Dopamine Neurotoxicity. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 7927568.
- Huang, N., Zhang, Y., Chen, M., Jin, H., Nie, J., Luo, Y., Zhou, S., Shi, J., & Jin, F. (2019). Resveratrol delays 6-hydroxydopamine-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt signaling pathway. *Experimental gerontology*, 124, 110653.
- Ichimura, Y., Kumanomidou, T., Sou, Y. S., Mizushima, T., Ezaki, J., Ueno, T., Kominami, E., Yamane, T., Tanaka, K., & Komatsu, M. (2008). Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *The Journal of biological chemistry*, 283(33), 22847–22857.
- Inoki, K., Kim, J., & Guan, K. L. (2012). AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 52, 381–400.
- Jiang, Z., & Yu, P. H. (2005). Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 and (phosphoinositide 3-kinase)/Akt signal pathways in acquired resistance against neurotoxin of 6-hydroxydopamine in SH-SY5Y cells following cell-cell interaction with astrocytes. *Neuroscience*, 133(2), 405–411.

- Jovanovic-Tucovic, M., Harhaji-Trajkovic, L., Dulovic, M., Tovilovic-Kovacevic, G., Zogovic, N., Jeremic, M., Mandic, M., Kostic, V., Trajkovic, V., & Markovic, I. (2019). AMP-activated protein kinase inhibits MPP⁺-induced oxidative stress and apoptotic death of SH-SY5Y cells through sequential stimulation of Akt and autophagy. *European journal of pharmacology*, *863*, 172677.
- Ju, M. S., Lee, P., Kim, H. G., Lee, K. Y., Hur, J., Cho, S. H., Sung, S. H., & Oh, M. S. (2010). Protective effects of standardized Thuja orientalis leaves against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *Toxicology in vitro*, *24*(3), 759–765.
- Jung, C. H., Ro, S. H., Cao, J., Otto, N. M., & Kim, D. H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters*, *584*(7), 1287–1295.
- Kaludjerović, G. N., Miljković, D., Momčilović, M., Djinović, V. M., Mostarica Stojković, M., Sabo, T. J., & Trajković, V. (2005). Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro. *International journal of cancer*, *116*(3), 479–486.
- Karunakaran, S., Saeed, U., Mishra, M., Valli, R. K., Joshi, S. D., Meka, D. P., Seth, P., & Ravindranath, V. (2008). Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase in dopaminergic neurons of substantia nigra leads to nuclear translocation of p53 in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice. *The Journal of neuroscience*, *28*(47), 12500–12509.
- Kim, E. K., & Choi, E. J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et biophysica acta*, *1802*(4), 396–405.
- Kim, E. K., & Choi, E. J. (2015). Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Archives of toxicology*, *89*(6), 867–882.
- Kim, J. H., Lee, J. O., Lee, S. K., Moon, J. W., You, G. Y., Kim, S. J., Park, S. H., Park, J. M., Lim, S. Y., Suh, P. G., Uhm, K. O., Song, M. S., & Kim, H. S. (2011). The glutamate agonist homocysteine sulfinic acid stimulates glucose uptake through the calcium-dependent AMPK-p38 MAPK-protein kinase C zeta pathway in skeletal muscle cells. *The Journal of biological chemistry*, *286*(9), 7567–7576.
- Klockgether T. (2004). Parkinson's disease: clinical aspects. *Cell and tissue research*, *318*(1), 115–120.
- Kowalchuk, C., Kanagasundaram, P., Belsham, D. D., & Hahn, M. K. (2019). Antipsychotics differentially regulate insulin, energy sensing, and inflammation pathways in hypothalamic rat neurons. *Psychoneuroendocrinology*, *104*, 42–48.
- Kramer, B. C., & Mytilineou, C. (2004). Alterations in the cellular distribution of bcl-2, bcl-x and bax in the adult rat substantia nigra following striatal 6-hydroxydopamine lesions. *Journal of neurocytology*, *33*(2), 213–223.

- Kubota, C., Torii, S., Hou, N., Saito, N., Yoshimoto, Y., Imai, H., & Takeuchi, T. (2010). Constitutive reactive oxygen species generation from autophagosome/lysosome in neuronal oxidative toxicity. *The Journal of biological chemistry*, 285(1), 667–674.
- Kulich, S. M., & Chu, C. T. (2001). Sustained extracellular signal-regulated kinase activation by 6-hydroxydopamine: implications for Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 77(4), 1058–1066.
- Kulich, S. M., Horbinski, C., Patel, M., & Chu, C. T. (2007). 6-Hydroxydopamine induces mitochondrial ERK activation. *Free radical biology & medicine*, 43(3), 372–383.
- Kumar, S., Jiang, M. S., Adams, J. L., & Lee, J. C. (1999). Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochemical and biophysical research communications*, 263(3), 825–831.
- Kwon, S. H., Ma, S. X., Lee, S. Y., & Jang, C. G. (2014). Sulfuretin inhibits 6-hydroxydopamine-induced neuronal cell death via reactive oxygen species-dependent mechanisms in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochemistry international*, 74, 53–64.
- Lee J. A. (2012). Neuronal autophagy: a housekeeper or a fighter in neuronal cell survival?. *Experimental neurobiology*, 21(1), 1–8.
- Li, J., & McCullough, L. D. (2010). Effects of AMP-activated protein kinase in cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 30(3), 480–492.
- Li, J., Liu, Y., Wang, Z., Liu, K., Wang, Y., Liu, J., Ding, H., & Yuan, Z. (2011). Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment. *Journal of virology*, 85(13), 6319–6333.
- Li, L., Gao, L., Song, Y., Qin, Z. H., & Liang, Z. (2016). Activated cathepsin L is associated with the switch from autophagy to apoptotic death of SH-SY5Y cells exposed to 6-hydroxydopamine. *Biochemical and biophysical research communications*, 470(3), 579–585.
- Li, L., Wang, X., Fei, X., Xia, L., Qin, Z., & Liang, Z. (2011). Parkinson's disease involves autophagy and abnormal distribution of cathepsin L. *Neuroscience letters*, 489(1), 62–67.
- Li, Y., Luo, F., Wei, L., Liu, Z., & Xu, P. (2011). Knockdown of glycogen synthase kinase 3 beta attenuates 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Neuroscience letters*, 487(1), 41–46.
- Li, Y., Tweedie, D., Mattson, M. P., Holloway, H. W., & Greig, N. H. (2010). Enhancing the GLP-1 receptor signaling pathway leads to proliferation and neuroprotection in human neuroblastoma cells. *Journal of neurochemistry*, 113(6), 1621–1631.
- Lieberthal, W., Zhang, L., Patel, V. A., & Levine, J. S. (2011). AMPK protects proximal tubular cells from stress-induced apoptosis by an ATP-independent mechanism: potential role of Akt activation. *American journal of physiology. Renal physiology*, 301(6), F1177–F1192.

- Lin, C. Y., & Tsai, C. W. (2017). Carnosic Acid Attenuates 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells by Inducing Autophagy Through an Enhanced Interaction of Parkin and Beclin1. *Molecular neurobiology*, *54*(4), 2813–2822.
- Liu, J., Liu, W., & Yang, H. (2019). Balancing Apoptosis and Autophagy for Parkinson's Disease Therapy: Targeting BCL-2. *ACS chemical neuroscience*, *10*(2), 792–802.
- Liu, X., Chen, J., Guan, T., Yao, H., Zhang, W., Guan, Z., & Wang, Y. (2019). miRNAs and target genes in the blood as biomarkers for the early diagnosis of Parkinson's disease. *BMC systems biology*, *13*(1), 10.
- Liu, Y., Song, Y., & Zhu, X. (2017). MicroRNA-181a Regulates Apoptosis and Autophagy Process in Parkinson's Disease by Inhibiting p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)/c-Jun N-Terminal Kinases (JNK) Signaling Pathways. *Medical science monitor*, *23*, 1597–1606.
- Luo, Y., Zou, P., Zou, J., Wang, J., Zhou, D., & Liu, L. (2011). Autophagy regulates ROS-induced cellular senescence via p21 in a p38 MAPK α dependent manner. *Experimental gerontology*, *46*(11), 860–867.
- Ma, L., , Zhang, B., , Liu, J., , Qiao, C., , Liu, Y., , Li, S., , & Lv, H., (2020). Isoorientin exerts a protective effect against 6-OHDA-induced neurotoxicity by activating the AMPK/AKT/Nrf2 signalling pathway. *Food & function*, *11*(12), 10774–10785.
- Marin, C., & Aguilar, E. (2011). In vivo 6-OHDA-induced neurodegeneration and nigral autophagic markers expression. *Neurochemistry international*, *58*(4), 521–526.
- Maycotte, P., & Thorburn, A. (2011). Autophagy and cancer therapy. *Cancer biology & therapy*, *11*(2), 127–137.
- Meijer, A. J., & Codogno, P. (2004). Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *36*(12), 2445–2462.
- Mihaylova, M. M., & Shaw, R. J. (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature cell biology*, *13*(9), 1016–1023.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, *140*(3), 313–326.
- Mnich, K., Finn, D. P., Dowd, E., & Gorman, A. M. (2010). Inhibition by anandamide of 6-hydroxydopamine-induced cell death in PC12 cells. *International journal of cell biology*, *2010*, 818497.
- Moors, T. E., Hoozemans, J. J., Ingrassia, A., Beccari, T., Parnetti, L., Chartier-Harlin, M. C., & van de Berg, W. D. (2017). Therapeutic potential of autophagy-enhancing agents in Parkinson's disease. *Molecular neurodegeneration*, *12*(1), 11.
- Morales, I., Sanchez, A., Rodriguez-Sabate, C., & Rodriguez, M. (2017). Striatal astrocytes engulf dopaminergic debris in Parkinson's disease: A study in an animal model. *PloS one*, *12*(10), e0185989.

- Nakatsu, Y., Kotake, Y., Takai, N., & Ohta, S. (2010). Involvement of autophagy via mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition in tributyltin-induced neuronal cell death. *The Journal of toxicological sciences*, 35(2), 245–251.
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et biophysica acta*, 1833(12), 3448–3459.
- Nixon, R. A., & Yang, D. S. (2012). Autophagy and neuronal cell death in neurological disorders. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(10), a008839.
- Obergasteiger, J., Frapporti, G., Pramstaller, P. P., Hicks, A. A., & Volta, M. (2018). A new hypothesis for Parkinson's disease pathogenesis: GTPase-p38 MAPK signaling and autophagy as convergence points of etiology and genomics. *Molecular neurodegeneration*, 13(1), 40.
- Pan, Y., Sun, X., Jiang, L., Hu, L., Kong, H., Han, Y., Qian, C., Song, C., Qian, Y., & Liu, W. (2016). Metformin reduces morphine tolerance by inhibiting microglial-mediated neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation*, 13(1), 294.
- Papandreou, I., Lim, A. L., Laderoute, K., & Denko, N. C. (2008). Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell death and differentiation*, 15(10), 1572–1581.
- Park, H. J., Park, K. H., Shin, K. S., & Lee, M. K. (2013). The roles of cyclic AMP-ERK-Bad signaling pathways on 6-hydroxydopamine-induced cell survival and death in PC12 cells. *Toxicology in vitro*, 27(8), 2233–2241.
- Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 20(3), 460–473.
- Rai, S. N., Dilmashin, H., Birla, H., Singh, S. S., Zahra, W., Rathore, A. S., Singh, B. K., & Singh, S. P. (2019). The Role of PI3K/Akt and ERK in Neurodegenerative Disorders. *Neurotoxicity research*, 35(3), 775–795.
- Raicevic, N., Mladenovic, A., Perovic, M., Harhaji, L., Miljkovic, D., & Trajkovic, V. (2005). Iron protects astrocytes from 6-hydroxydopamine toxicity. *Neuropharmacology*, 48(5), 720–731.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J. E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z. W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V. I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D. C., Menzies, F. M., Moreau, K., Narayanan, U., Renna, M., Siddiqi, F. H., Underwood, B. R., Winslow, A. R., & Rubinsztein, D. C. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 90(4), 1383–1435.
- Ries, V., Silva, R. M., Oo, T. F., Cheng, H. C., Rzhetskaya, M., Kholodilov, N., Flavell, R. A., Kuan, C. Y., Rakic, P., & Burke, R. E. (2008). JNK2 and JNK3 combined are essential for apoptosis in dopamine neurons of the substantia nigra, but are not required for axon degeneration. *Journal of neurochemistry*, 107(6), 1578–1588.

- Rubinsztein, D. C., Cuervo, A. M., Ravikumar, B., Sarkar, S., Korolchuk, V., Kaushik, S., & Klionsky, D. J. (2009). In search of an "autophagometer". *Autophagy*, 5(5), 585–589.
- Ruggieri, A., & Bartenschlager, R. (2015). Going full circle: validation of P-body dispersion in hepatitis C virus-infected patients. *Journal of hepatology*, 62(4), 756–758.
- Ryskalin, L., Limanaqi, F., Frati, A., Busceti, C. L., & Fornai, F. (2018). mTOR-Related Brain Dysfunctions in Neuropsychiatric Disorders. *International journal of molecular sciences*, 19(8), 2226.
- Salari, S., & Bagheri, M. (2019). In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease. *Physiological research*, 68(1), 17–24.
- Salazar, M., Carracedo, A., Salanueva, I. J., Hernández-Tiedra, S., Lorente, M., Egia, A., Vázquez, P., Blázquez, C., Torres, S., García, S., Nowak, J., Fimia, G. M., Piacentini, M., Cecconi, F., Pandolfi, P. P., González-Feria, L., Iovanna, J. L., Guzmán, M., Boya, P., & Velasco, G. (2009). Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *The Journal of clinical investigation*, 119(5), 1359–1372.
- Schaaf, M. B., Keulers, T. G., Vooijs, M. A., & Rouschop, K. M. (2016). LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *FASEB journal*, 30(12), 3961–3978.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., & Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO journal*, 26(7), 1749–1760.
- Schultze, S. M., Hemmings, B. A., Niessen, M., & Tschopp, O. (2012). PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis. *Expert reviews in molecular medicine*, 14, e1.
- Senoh, S., Creveling, C. R., Udenfriend, S., & Witkop, B. (1959). *Chemical, Enzymatic and Metabolic Studies on the Mechanism of Oxidation of Dopamine*. *Journal of the American Chemical Society*, 81(23), 6236–6240.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254.
- Shaw R. J. (2009). LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 196(1), 65–80.
- Shaw, M. M., Gurr, W. K., McCrimmon, R. J., Schorderet, D. F., & Sherwin, R. S. (2007). 5'AMP-activated protein kinase alpha deficiency enhances stress-induced apoptosis in BHK and PC12 cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 11(2), 286–298.
- Simola, N., Morelli, M., & Carta, A. R. (2007). The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity research*, 11(3-4), 151–167.
- Song, C., Heping, H., Shen, Y., Jin, S., Li, D., Zhang, A., Ren, X., Wang, K., Zhang, L., Wang, J., & Shi, D. (2020). AMPK/p38/Nrf2 activation as a protective feedback to restrain oxidative

- stress and inflammation in microglia stimulated with sodium fluoride. *Chemosphere*, *244*, 125495.
- Song, J. X., Shaw, P. C., Sze, C. W., Tong, Y., Yao, X. S., Ng, T. B., & Zhang, Y. B. (2010). Chrysotoxine, a novel bibenzyl compound, inhibits 6-hydroxydopamine induced apoptosis in SH-SY5Y cells via mitochondria protection and NF- κ B modulation. *Neurochemistry international*, *57*(6), 676–689.
- Storch, A., Kaftan, A., Burkhardt, K., & Schwarz, J. (2000). 6-Hydroxydopamine toxicity towards human SH-SY5Y dopaminergic neuroblastoma cells: independent of mitochondrial energy metabolism. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, *107*(3), 281–293.
- Switon, K., Kotulska, K., Janusz-Kaminska, A., Zmorzynska, J., & Jaworski, J. (2017). Molecular neurobiology of mTOR. *Neuroscience*, *341*, 112–153.
- Tchevkina E., Komelkov A. (2012) Poglavlje 1: Protein Phosphorylation as a Key Mechanism of mTORC1/2 Signaling Pathways, u Huang C.(urednik): *Protein Phosphorylation in Human Health* (str. 4), InTech, Rijeka, Croatia
- Tong, H., Zhang, X., Meng, X., Lu, L., Mai, D., & Qu, S. (2018). Simvastatin Inhibits Activation of NADPH Oxidase/p38 MAPK Pathway and Enhances Expression of Antioxidant Protein in Parkinson Disease Models. *Frontiers in molecular neuroscience*, *11*, 165.
- Travaglione, S., Loizzo, S., Vona, R., Ballan, G., Rivabene, R., Giordani, D., Guidotti, M., Dupuis, M. L., Maroccia, Z., Baiula, M., Rimondini, R., Campana, G., & Fiorentini, C. (2020). The Bacterial Toxin CNF1 Protects Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells against 6-Hydroxydopamine-Induced Cell Damage: The Hypothesis of CNF1-Promoted Autophagy as an Antioxidant Strategy. *International journal of molecular sciences*, *21*(9), 3390.
- Urano, Y., Mori, C., Fuji, A., Konno, K., Yamamoto, T., Yashirogi, S., Ando, M., Saito, Y., & Noguchi, N. (2018). 6-Hydroxydopamine induces secretion of PARK7/DJ-1 via autophagy-based unconventional secretory pathway. *Autophagy*, *14*(11), 1943–1958.
- Vingtdeux, V., Giliberto, L., Zhao, H., Chandakkar, P., Wu, Q., Simon, J. E., Janle, E. M., Lobo, J., Ferruzzi, M. G., Davies, P., & Marambaud, P. (2010). AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. *The Journal of biological chemistry*, *285*(12), 9100–9113.
- Vucicevic, L., Misirkic-Marjanovic, M., Harhaji-Trajkovic, L., Maric, N., & Trajkovic, V. (2018). Mechanisms and therapeutic significance of autophagy modulation by antipsychotic drugs. *Cell stress*, *2*(11), 282–291.
- Wang, G., Pan, J., & Chen, S. D. (2012). Kinases and kinase signaling pathways: potential therapeutic targets in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, *98*(2), 207–221.
- Wang, H., Liu, Y., Wang, D., Xu, Y., Dong, R., Yang, Y., Lv, Q., Chen, X., & Zhang, Z. (2019). The Upstream Pathway of mTOR-Mediated Autophagy in Liver Diseases. *Cells*, *8*(12), 1597.

- Wang, X., Wang, X. L., Chen, H. L., Wu, D., Chen, J. X., Wang, X. X., Li, R. L., He, J. H., Mo, L., Cen, X., Wei, Y. Q., & Jiang, W. (2014). Ghrelin inhibits doxorubicin cardiotoxicity by inhibiting excessive autophagy through AMPK and p38-MAPK. *Biochemical pharmacology*, *88*(3), 334–350.
- Webber, J. L., & Tooze, S. A. (2010). Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *The EMBO journal*, *29*(1), 27–40.
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., & Levine, B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular cell*, *30*(6), 678–688.
- Weng, Z., Signore, A. P., Gao, Y., Wang, S., Zhang, F., Hastings, T., Yin, X. M., & Chen, J. (2007). Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling. *The Journal of biological chemistry*, *282*(47), 34479–34491.
- White E. (2008). Autophagic cell death unraveled: Pharmacological inhibition of apoptosis and autophagy enables necrosis. *Autophagy*, *4*(4), 399–401.
- Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J., Declercq, W., Agostinis, P., Vanden Berghe, T., Lippens, S., & Vandenabeele, P. (2010). Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell death & disease*, *1*(1), e18.
- Woodgate, A., MacGibbon, G., Walton, M., & Dragunow, M. (1999). The toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 and P19 cells. *Brain research. Molecular brain research*, *69*(1), 84–92.
- Wu, Y., Li, X., Zhu, J. X., Xie, W., Le, W., Fan, Z., Jankovic, J., & Pan, T. (2011). Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease. *Neuro-Signals*, *19*(3), 163–174.
- Xiang, H., Zhang, J., Lin, C., Zhang, L., Liu, B., & Ouyang, L. (2020). Targeting autophagy-related protein kinases for potential therapeutic purpose. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, *10*(4), 569–581.
- Xie, H. R., Hu, L. S., & Li, G. Y. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese medical journal*, *123*(8), 1086–1092.
- Xilouri, M., & Stefanis, L. (2010). Autophagy in the central nervous system: implications for neurodegenerative disorders. *CNS & neurological disorders drug targets*, *9*(6), 701–719.
- Xilouri, M., & Stefanis, L. (2011). Autophagic pathways in Parkinson disease and related disorders. *Expert reviews in molecular medicine*, *13*, e8.

- Xu, L., Jia, Y., Yang, X. H., Han, F., Zheng, Y., Ni, Y., Chen, X., Hong, J., Liu, J. Q., Li, Q., Sun, R. H., & Mo, S. J. (2017). MicroRNA-130b transcriptionally regulated by histone H3 deacetylation renders Akt ubiquitination and apoptosis resistance to 6-OHDA. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1863(6), 1678–1689.
- Xu, Y., Liu, C., Chen, S., Ye, Y., Guo, M., Ren, Q., Liu, L., Zhang, H., Xu, C., Zhou, Q., Huang, S., & Chen, L. (2014). 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. *Cellular signalling*, 26(8), 1680–1689.
- Xu, Z. X., Liang, J., Haridas, V., Gaikwad, A., Connolly, F. P., Mills, G. B., & Gutterman, J. U. (2007). A plant triterpenoid, avicin D, induces autophagy by activation of AMP-activated protein kinase. *Cell death and differentiation*, 14(11), 1948–1957.
- Yang, L., Wang, H., Liu, L., & Xie, A. (2018). The Role of Insulin/IGF-1/PI3K/Akt/GSK3 β Signaling in Parkinson's Disease Dementia. *Frontiers in neuroscience*, 12, 73.
- Yang, X., Li, Y., Li, Y., Ren, X., Zhang, X., Hu, D., Gao, Y., Xing, Y., & Shang, H. (2017). Oxidative Stress-Mediated Atherosclerosis: Mechanisms and Therapies. *Frontiers in physiology*, 8, 600.
- Yang, Y., Fukui, K., Koike, T., & Zheng, X. (2007). Induction of autophagy in neurite degeneration of mouse superior cervical ganglion neurons. *The European journal of neuroscience*, 26(10), 2979–2988.
- Yorimitsu, T., & Klionsky, D. J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell death and differentiation*, 12 Suppl 2(Suppl 2), 1542–1552.
- Yu, L., Wan, F., Dutta, S., Welsh, S., Liu, Z., Freundt, E., Baehrecke, E. H., & Lenardo, M. (2006). Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), 4952–4957.
- Yun, H. R., Jo, Y. H., Kim, J., Shin, Y., Kim, S. S., & Choi, T. G. (2020). Roles of Autophagy in Oxidative Stress. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3289.
- Zhai, H., Kang, Z., Zhang, H., Ma, J., & Chen, G. (2019). Baicalin attenuated substantia nigra neuronal apoptosis in Parkinson's disease rats via the mTOR/AKT/GSK-3 β pathway. *Journal of integrative neuroscience*, 18(4), 423–429.
- Zhang, J., Cai, Q., Jiang, M., Liu, Y., Gu, H., Guo, J., Sun, H., Fang, J., & Jin, L. (2017). Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor alleviated 6-OHDA-induced cell damage via ROS-AMPK/mTOR mediated autophagic inhibition. *Experimental gerontology*, 89, 45–56.
- Zhang, T. G., Wang, Y. M., Zhao, J., Xia, M. Y., Peng, S. Q., & Ikejima, T. (2016). Induction of protective autophagy against apoptosis in HepG2 cells by isoniazid independent of the p38 signaling pathway. *Toxicology research*, 5(3), 963–972.

- Zhao, M., Chen, J., Mao, K., She, H., Ren, Y., Gui, C., Wu, X., Zou, F., & Li, W. (2019). Mitochondrial calcium dysfunction contributes to autophagic cell death induced by MPP⁺ via AMPK pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 509(2), 390–394.
- Zhao, Y., Hu, X., Liu, Y., Dong, S., Wen, Z., He, W., Zhang, S., Huang, Q., & Shi, M. (2017). ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway. *Molecular cancer*, 16(1), 79.
- Zheng, Y. H., Tian, C., Meng, Y., Qin, Y. W., Du, Y. H., Du, J., & Li, H. H. (2012). Osteopontin stimulates autophagy via integrin/CD44 and p38 MAPK signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Journal of cellular physiology*, 227(1), 127–135.
- Zhou, L., & Cheng, Y. (2019). Alpha-lipoic acid alleviated 6-OHDA-induced cell damage by inhibiting AMPK/mTOR mediated autophagy. *Neuropharmacology*, 155, 98–103.
- Zhu, J. H., Guo, F., Shelburne, J., Watkins, S., & Chu, C. T. (2003). Localization of phosphorylated ERK/MAP kinases to mitochondria and autophagosomes in Lewy body diseases. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 13(4), 473–481. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2003.tb00478.x>
- Zhu, J. H., Horbinski, C., Guo, F., Watkins, S., Uchiyama, Y., & Chu, C. T. (2007). Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. *The American journal of pathology*, 170(1), 75–86.
- Zhu, J., Xia, R., Liu, Z., Shen, J., Gong, X., Hu, Y., Chen, H., Yu, Y., Gao, W., Wang, C., & Wang, S. L. (2020). Fenvalerate triggers Parkinson-like symptom during zebrafish development through initiation of autophagy and p38 MAPK/mTOR signaling pathway. *Chemosphere*, 243, 125336.
- Zhuang, X. X., Wang, S. F., Tan, Y., Song, J. X., Zhu, Z., Wang, Z. Y., Wu, M. Y., Cai, C. Z., Huang, Z. J., Tan, J. Q., Su, H. X., Li, M., & Lu, J. H. (2020). Pharmacological enhancement of TFEB-mediated autophagy alleviated neuronal death in oxidative stress-induced Parkinson's disease models. *Cell death & disease*, 11(2), 128.

BIOGRAFSKI PODACI O AUTORU

Katarina (Milan) Aršikin Csordás rođena je 8. juna 1980. godine u Beogradu. Osnovnu i srednju školu (I zemunska gimnazija) završila je u Beogradu. Diplomirala je molekularnu biologiju i fiziologiju na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2009. godine sa prosečnom ocenom u toku studija 8,69.

Doktorske studije Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna medicina upisala je 2010. godine i do kraja 2014. godine radila je kao istraživač saradnik na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Od januara 2011. do kraja 2014. godine bila je angažovana na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Uloga autofagije u regulaciji smrti tumorskih ćelija“ (evidencioni broj 173053), čiji je rukovodilac dr Ljubica Harhaji Trajković.

Koautor je 15 radova u međunarodnim časopisima.

Od januara 2015. godine živi sa porodicom u Budimpešti.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Улога киназе активирани аденозин монофосфатом и митогеном активирани протеин киназе р38 у индукцији аутофагије и смрти у ћелијама неуробластома третираним оксидопамином у условима *in vitro*“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис докторанда

У Београду, 21. априла 2021

Kolence Arslanovic Gordic

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Катарина Арскиин Csordás

Број индекса mm105027

Студијски програм молекуларна медицина

Наслов рада „Улога киназе активиране аденозин монофосфатом и митогеном активиране протеин киназе р38 у индукцији аутофагије и смрти у ћелијама неуробластома третираним оксидопамином у условима *in vitro*“

Ментор проф. др Владимир Трајковић

Коментор др Љубица Хархаји Трајковић

Потписани/а Катарина Арскиин Csordás

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 21. априла 2021

Katarina Arskien Csordás

Изјава о ауторству

Потписани-а Катарина Арсикин Csordás

број индекса mm105027

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Улога киназе активирани аденозин монофосфатом и митогеном активирани протеин киназе p38 у индукцији аутофагије и смрти у ћелијама неуробластома третираним оксидопамином у условима *in vitro*“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 21. априла 2021

Katarina Arsić Csordás

