

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Milena M. Milošević

**ULOGA HUMORALNOG IMUNSKOG  
ODGOVORA U ETIOPATOGENEZI  
AMIOTROFIČNE LATERALNE SKLEROZE**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Milena M. Milošević

**THE ROLE OF HUMORAL IMMUNE  
RESPONSE IN THE  
AETIOPATHOGENESIS OF  
AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS**

Ph.D. Thesis

Belgrade, 2012

**Mentori:**

dr Pavle R. Anđus, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Matjaž Stenovec, docent, Medicinski fakultet, Univerzitet u Ljubljani

**Članovi komisije:**

dr Pavle R. Anđus, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Zorica Stević, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Biljana Božić, vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Đorđe Miljković, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković,  
Univerzitet u Beogradu

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Centru za lasersku mikroskopiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Pavla R. Anđusa i Institutu za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani, pod rukovodstvom akad. prof. dr Roberta Zoreca, a u saradnji sa Klinikom za neurologiju Kliničkog centra Srbije i Odseka za istraživanje i razvoj Instituta za virusologiju, vakcine i serume – Torlak u Beogradu.*

*Zahvaljujem se:*

*mentorima, prof. dr Pavlu R Anđusu i doc. dr Matjažu Stenovecu na strpljenju, ukazanom poverenju i pruženoj prilici, kao i na ekstenzivnim diskusijama i dobronamernim sugestijama prilikom izrade ove doktorske disertacije*

*akad. prof. dr Robertu Zorecu na ukazanom poverenju*

*prof. dr Zorici Stević, dr Ljiljani Dimitrijević i dr Vladimiru Petrušiću na pomoći u prikupljanju i pripremi materijala, podršci i savetima*

*dr Biljani Božić i dr Đorđu Miljkoviću na sugestijama prilikom izrade ove doktorske disertacije*

*dr Aleksandru Bajiću i dr Zoranu Gačiću koji su me uveli u svet nauke, na podršci i prijateljskim savetima*

*kolegama u Centru za lasersku mikroskopiju, bivšim, sadašnjim i pridruženim, na nesebičnoj podršci*

*kolegama na Institutu za patofiziologiju na gostoprimstvu*

*prijateljima i porodici na podršci i tolerantnosti*

# ULOGA HUMORALNOG IMUNSKOG ODGOVORA U ETIOPATOGENEZI AMIOTROFIČNE LATERALNE SKLEROZE

## REZIME

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) je fatalna neurodegenerativna bolest sa početkom u adultnom dobu koja se karakteriše progresivnim gubitkom gornjih i donjih motoneurona, što dovodi do atrofije miškulature, mišićne paralize i smrti usled slabosti respiratorne miškulature. Oko 5-10% ALS slučajeva su sa familijarnom istorijom bolesti (fALS), dok su preostali slučajevi sporadični (sALS) sa nepoznatim uzrokom bolesti. Cilj ove disertacije bio je da proceni efekat imunoglobulina G (IgG) izolovanog iz sALS bolesnika (ALS IgG) na homeostazu kalcijuma i mobilnost endozoma/lizozoma kod pacovskih kortikalnih astrocita u kulturi. ALS IgG (0.1 mg/ml) poreklom od 7 ALS pacijenata, za razliku od IgG iz 3 kontrolne osobe, izazvao je prolazne promene unutarćelijske koncentracije kalcijuma ( $\text{Ca}^{2+}$ -talas) u astrocitima. Povećana aktivnost kalcijuma detektovana je kod oko polovine astrocita nakon tretmana sa ALS IgG, bez obzira na prisustvo vanćelijskog kalcijuma ( $47,5 \pm 12,9 \%$ , 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  naspram  $48,2 \pm 13,6 \%$ , 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ). U prisustvu vanćelijskog kalcijuma, maksimalna vrednost promene dostignuta je ~3x brže ( $19,7 \pm 2,8$  s, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  naspram  $56,3 \pm 6,8$  s, 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) i ukupno povećanje kalcijuma (površina pod  $\text{Ca}^{2+}$ -talasom) bilo je ~1.7x veće ( $26,0 \pm 1,6$  F/F<sub>0</sub> \*s, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  naspram  $15,6 \pm 1,1$  F/F<sub>0</sub> \*s, 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ), ali vanćelijski kalcijum nije uticao na maksimum amplitude kalcijumovog talasa. Primena farmakoloških inhibitora otkrila je da je aktivacija inozitol 1,4,5-trifosfatnog (IP<sub>3</sub>), za razliku od rianodinskog receptora neophodna i dovoljna da inicira povećanu aktivnost, a ulazak kalcijuma kroz TRPC kanale produžava odgovor. Inhibicija fosfolipaze C (PLC) umanjuje, dok inhibicija fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K) u potpunosti sprečava tipičan ALS IgG-izazvan kalcijumski odgovor. Populacija vezikula obeleženih lizotrekerom koji boji endozome i lizosome, sastojala se od stacionarnih vezikula (6,1%) sa prosečnom brzinom koja nije prelazila 67 nm/s i mobilnih vezikula (93.9%) čija je ukupna dužina putanje (TL) pređene za 15 s iznosila u proseku  $3,03 \pm 0,01$   $\mu\text{m}$ . ALS IgG (0.1 mg/ml) poreklom iz 12 od 13 ALS bolesnika povećao je TL mobilnih vezikula za ~24% i maksimalni pomeraj (MD) za ~26%

tokom praćenih 4 min, za razliku od kontrolnih IgG (poreklom od 4 osobe) koji nisu uticali na mobilnost vezikula. ALS IgG-izazvano povećanje mobilnosti bilo je manje izraženo u rastvoru bez  $\text{Ca}^{2+}$ , što ukazuje da su promene u homeostazi kalcijuma uključene u proces kojim ALS IgG povećava mobilnost vezikula. Interesantno, ALS IgG kao i ATP (1 mM) nisu uticali na oslobađanje sadržaja vezikula, što znači da je brza i kompletna egzocitoza malo verovatan događaj kod astrocita u kulturi u našim eksperimentalnim uslovima. Sumarno, ALS IgG utiče na kalcijumovu homeostazu astrocita preko  $\text{IP}_3$ -posredovanog oslobađanja kalcijuma iz endoplazmatičnog retikuluma i ulaska kalcijuma kroz TRPC kanale, uz aktivaciju PI3K uzvodno od PLC. ALS IgG povećavaju mobilnost endozoma i lizozoma, a ovaj efekat delimično zavisi od vanćelijskog kalcijuma. Ova studija je otkrila molekulske mehanizme kojima astrociti postaju meta humoralnog imunskog odgovora u ALS, što može da doprinese etiopatogenezi bolesti.

*Ključne reči: amiotrofična lateralna skleroza, imunoglobulin G, kalcijumova homeostaza, endozomi, lizozomi, mobilnost vezikula, astrociti*

*Naučna oblast: Neuronauke*

*Uža naučna oblast: Neurofiziologija sa biofizikom*

*UDK broj: [577.27:[576.311.33:577.352.4]]:616.8-003.99*

# THE ROLE OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN THE AETIOPATHOGENESIS OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

## ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult onset fatal neurodegenerative disease characterized mainly by the progressive loss of upper and lower motor neurons resulting in wasting, paresis and death from respiratory failure. Approximately 5-10% of ALS cases are familial (fALS), while the rest are sporadic (sALS) with unknown cause of disease. The objective of this dissertation was to evaluate the effect of immunoglobulin G (IgG) isolated from sALS patients (ALS IgG) on calcium homeostasis and mobility of endosomes/lysosomes in cultured rat cortical astrocytes. ALS IgG (0.1 mg/ml) from 7 ALS patients, but not IgG from 3 control individuals evoked calcium transients ( $\text{Ca}^{2+}$ -waves) in astrocytes. About half of the tested astrocytes responded with elevated calcium activity regardless of the presence of extracellular calcium ( $47.5 \pm 12.9$  %, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  vs.  $48.2 \pm 13.6$  %, 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ). In presence of extracellular calcium, the peak amplitude developed  $\sim 3$ x faster ( $19.7 \pm 2.8$  s, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  vs.  $56.3 \pm 6.8$  s, 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) and the overall magnitude of calcium rise (area under the  $\text{Ca}^{2+}$ -wave) was  $\sim 1.7$ x larger ( $26.0 \pm 1.6$   $\text{F}/\text{F}_0$  \*s, 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  vs.  $15.6 \pm 1.1$   $\text{F}/\text{F}_0$  \*s, 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ), while the peak amplitude itself was not affected. Application of pharmacological inhibitors revealed that activation of inositol 1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3$ ), but not of ryanodine receptors is necessary and sufficient to initiate elevated activity, while the influx of extracellular calcium through TRPC channels prolongs the responses. Inhibition of phospholipase C (PLC) diminishes, while the inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) completely prevents typical ALS IgG evoked calcium response. The population of vesicles labeled with lysotracker that mainly stains endosomes and lysosomes, consisted of non-mobile (6.1%) vesicles with the average speed of  $<67$  nm/s and mobile vesicles (93.9%) with total track length (TL) in 15 s averaging at  $3.03 \pm 0.01$   $\mu\text{m}$ . ALS IgG (0.1 mg/ml) from 12 of 13 patients increased the TL of mobile vesicles by  $\sim 24$ % and the maximal displacement (MD) by  $\sim 26$ % within 4 min, while IgG from control group (n=4) did not alter the vesicle mobility. The mobility enhancement by ALS IgG was less pronounced in  $\text{Ca}^{2+}$ -free extracellular solution, indicating that ALS IgG

vesicle mobility enhancement involves changes in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. Interestingly, neither ALS IgG nor ATP (1 mM) triggered the release of vesicular cargo, making rapid and complete exocytosis unlikely in cultured astrocytes in our experimental conditions. In conclusion, ALS IgG affect calcium homeostatic system in astrocytes by  $\text{IP}_3$  mediated calcium release from the endoplasmic reticulum and entry of extracellular calcium through TRPC channels, with the activation of PI3K upstream of PLC. ALS IgG enhance the mobility of endosomes and lysosomes, and this effect is partially dependent on extracellular calcium. This study revealed the molecular mechanisms by which astrocytes become targeted cells for humoral immune response in ALS that could contribute to the aetiopathogenesis of the disease.

*Key words: amyotrophic lateral sclerosis, immunoglobulin G, calcium homeostasis, endosomes, lysosomes, vesicle mobility, astrocytes*

*Scientific field: Neuroscience*

*Narower scientific field: Neurophysiology and Biophysics*

*UDK number: [577.27:[576.311.33:577.352.4]]:616.8-003.99*



<b>Skraćenica</b>	<b>Naziv</b>	<b>Originalni naziv</b>
2-APB	2-aminoetoksidifenilboran	2-Aminoethoxydiphenyl borate
A172	Ćelijska linija glioblastoma	Glioblastoma cell line
ALS	Amiotrofična lateralna skleroza	Amyotrophic lateral sclerosis
AM	Acetoksimetil estar	Acetoxymethyl ester
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol-propanoična kiselina	2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoic acid
AQP4	Akvaporin 4	Aquaporin 4
ATP	Adenozin-3-fosfat	Adenosine-5'-triphosphate
Bcl2	B-ćelijski limfom 2	B-cell lymphoma 2
BDNF	Moždani neurotrofni faktor	Brain-derived neurotrophic factor
BiP	Imunoglobulin vezujući protein	Binding immunoglobulin protein
BSA	Albumin goveđeg seruma	Bovine serum albumin
CCE	Kapacitativni ulazak kalcijuma	Capacitative calcium entry
CIK	Cirkulišući imunski kompleksi	Circulating immune complexes
CNS	Centralni nervni sistem	Central nervous system
CNTF	Cilijarni neurotrofni faktor	Ciliary neurotrophic factor
CRAC	Struje aktivirane oslobađanjem kalcijuma	Calcium release activated currents
CSF	Cerebrospinalna tečnost	Cerebrospinal fluid
DAG	1,2-diacil glicerol	Diacylglycerol
DCG	Granule gustog saržaja	Dense-core granule
DI	Indeks usmerenosti kretanja vezikula	Directionality index

DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sulfoksid	Dimethyl sulfoxide
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina	-
EAAT1	Ekscitatorni aminokiselinski transporter 1	Excitatory amino acid transporter 1
EAAT2	Ekscitatorni aminokiselinski transporter 2	Excitatory amino acid transporter 2
ECS	Veštački vanćelijski rastvor	Extracellular solution
ECS-Ca	Veštački vanćelijski rastvor bez kalcijuma	Calcium free extracellular solution
EDTA	Etilendiamintetrasirćetna kiselina	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Etilen glikol tetrasirćetna kiselina	Ethylene glycol tetraacetic acid
eIF2 $\alpha$	Eukariotski faktor inicijacije 2 $\alpha$	Eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$
EI	Escorial kriterijum	Escorial World Federation of Neurology Criteria
ER	Endoplazmatični retikulum	Endoplasmic reticulum
ERAD	ER-asocirani degradativni mehanizam	Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
ESCRT	Endozomalni kompleks za sortiranje neophodnih za transport	Endosomal sorting complex required for transport
fALS	familijarna ALS	familial ALS
FasR/CD95	Receptor faktora nekroze tumora	Tumor necrosis factor receptor
FBS	Fetalni teleći serum	Fetal bovine serum
GA	Goldžijev aparat	Golgi apparatus

GABA	Gama-aminobuterna kiselina	Gamma-aminobutyric acid
GDNF	Glijalni neurotrofni faktor	Glial cell-derived neurotrophic factor
GFAP	Glijalni fibrilarni kiseli protein	Glial fibrillary acidic protein
GLT-1	Glukozni transporter 1	Glucose Transporter Type 1
HEB	Hemato-encefalna barijera	Hemato-encephalic barrier
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-pipirazinetansulfonična kiselina	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRE	Element odgovora na hipoksiju	Hypoxia response element
IFN- $\gamma$	Interferon gama	Interferon-gamma
Ig	Imunoglobulini	Immunoglobulin superfamily
IGF-1	Insulinu nalik faktor rasta 1	Insulin-like growth factor 1
IL-10	Interleukin 10	Interleukin 10
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 beta	Interleukin 1 beta
IL-4	Interleukin 4	Interleukin 4
IP <sub>3</sub>	Inozitol 1,4,5-trisfosfat	Inositol 1,4,5-trisphosphate
iRNK	informaciona RNK	-
ITPR2	Inozitol trifosfatni receptor 2	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 2
Kir4.1	Ulazno ispravljački kanal za kalijum 4.1	Inward rectifier-type potassium channel 4.1
L-15+	Leibovitz medijum za izolaciju ćelija	Leibovitz Medium
LIF	Inhibitorni faktor leukemije	Leukemia inhibitory factor
Ly	Lizotreker	LysoTracker® Red DND-99
LYST	Regulatorni protein transporta lizozoma	Lysosomal trafficking regulator

MVE	Multivezikularni endozomi	Multivesicular endosome
NGF	Faktor rasta neurona	Nerve growth factor
NMDA	N-metil-D-aspartat	N-Methyl-D-aspartic acid
p75 <sup>NTR</sup>	p75 receptor za neurotrofine	p75 neurotrophin receptor
PBS	Fiziološki rastvor bez divalentnih katjona sa fosfatnim puferom	Phosphate buffered saline
PDI	Protein disulfid izomeraza	Protein disulfide-isomerase
PET	Pozitronska emisijska tomografija	Positron emission tomography
PI3K	Fosfatidilinozitol-3-kinaza	Phosphoinositide 3-kinase
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP <sub>3</sub>	Fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
PLC	Fosfolipaza C	Phospholipase C
PLL	Poli-L-lizin	Poly-L-Lysine
PH	Domen homolog plekstrinu	Pleckstrin homology domain
RNK	Ribonukleinska kiselina	-
ROI	Regioni interesa	Region of interest
ROS	Reaktivne kiseonične vrste	Reactive oxygen species
RTK	Receptor tirozin kinaza	Receptor Tyrosine Kinase
Ry	Rianodin, 1H-pirol-2-karboksilna kiselina	Ryanodine, 1H-Pyrrole-2-carboxylic acid
sALS	sporadična ALS	sporadic ALS
SDS	Natrijum dodecil sulfat	Sodium dodecyl sulfate
SH2	Src homologni domen 2	Src homology domain 2

SLMV	Mikrovezikule nalik sinaptičkim	Synaptic-like microvesicle
SOC	Kanali kontrolisani depoima	Store operated channels
SOD1	Superoksid dismutaza 1	Superoxide dismutase 1
TDP-43	TAR DNK vezujući protein od 43 kDa	TAR DNA-binding protein 43 kDa
TGFβ	Faktor transformacije rasta β	Transforming growth factor beta
TNF-α	Faktor nekroze tumora alfa	Tumor necrosis factor alpha
TRP	Prolazni receptorski potencijal	Transient receptor potential
TRPC	Kanonska forma kanala prolaznog receptorskog potencijala	Canonical transient receptor potential channels
U73122		1-[6-[[[(17β)-3-metoksiestra-1,3,5(10)-trien-17-il]amino]heksil]-1H-pirol-2,5-dion
UPR	Odgovor na nepravilno savijene proteine	Unfolded protein response
VDCC	Voltažno zavisni Ca <sup>2+</sup> kanali	Voltage-dependent Ca <sup>2+</sup> channels
VEGF	Vaskularni endotelijalni faktor rasta	Vascular endothelial growth factor
VSC4.1	Hibridna motoneuronska ćelijska linija	Hybrid motoneuron cell line
W	Vortmanin	Wortmannin
XeC	(-)-ksestospongin C	(-)-Xestospongin C

# SADRŽAJ

---

<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>AMIOTROFIČNA LATERALNA SKLEROZA.....</b>	<b>1</b>
<b>GENETIČKA OSNOVA ALS .....</b>	<b>3</b>
<b>MEHANIZMI NASTANKA BOLESTI – MOTONEURONI KAO NAJSLABIJA KARIKA.....</b>	<b>5</b>
EKSCITOTOKSIČNOST I ULOGA KALCIJUMA .....	5
OKSIDATIVNI STRES.....	9
AGREGACIJA PROTEINA NARUŠENE KONFORMACIJE .....	10
DISFUNKCIJE SEKRETORNOG PUTA .....	10
DISFUNKCIJA MITOHONDRIJA .....	14
AGREGACIJA NEUROFILAMENATA I POREMEĆEN AKSONSKI TRANSPORT .....	15
DEFICIT NEUROTROFIČKIH FAKTORA I DISFUNKCIJA SIGNALNIH PUTEVA.....	16
INFLAMACIJA.....	16
<b>ASTROCITI – FIZIOLOŠKE FUNKCIJE I NJIHOVA ULOGA U PATOLOGIJI ALS .....</b>	<b>19</b>
FIZIOLOŠKE FUNKCIJE ASTROCITA .....	19
Razvoj CNS i formiranje sinapsi.....	19
Sinaptička homeostaza .....	20
Tripartitna sinapsa .....	21
Regulacija ekspresije subjedinica glutamatnog receptora kod neurona.....	21
Krvno-moždana barijera i kontrola protoka krvi.....	22
IZMENJENE FUNKCIJE ASTROCITA U ALS.....	23
Astroglioza .....	23
Deficit neurotrofičkih faktora i lučenje štetnih materija .....	23
Problem otklanjanja glutamata iz sinaptičke pukotine.....	24
Problem održavanja homeostaze K <sup>+</sup> jona.....	24
<b>HUMORALNA IMUNOST I ALS.....</b>	<b>26</b>
HUMORALNI IMUNSKI FAKTORI I ALS .....	26
SPECIFIČNOST I EKSPERIMENTI SA IMUNOGLOBULINIMA G ALS PACIJENATA.....	27

<b>CILJEVI.....</b>	<b>29</b>
<b>MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>31</b>
<b>REAGENSI I RASTVORI .....</b>	<b>31</b>
REAGENSI.....	31
RASTVORI.....	31
<b>IZOLACIJA IMUNOGLOBULINA G IZ UZORAKA KRVI.....</b>	<b>34</b>
<b>ĆELIJSKA KULTURA KORTIKALNIH ASTROCITA .....</b>	<b>35</b>
IZOLACIJA PRIMARNIH KORTIKALNIH ASTROCITA IZ MOZGA PACOVA .....	35
RASEJAVANJE ASTROCITA .....	37
BROJANJE ĆELIJA.....	37
OBLAGANJE POKROVNIH STAKALA POLI-L-LIZINOM.....	38
<b>ODREĐIVANJE PROMENA UNUTARĆELIJSKOG KALCIJUMA NAKON IGG TRETMANA POMOĆU FULORESCENTNOG OBELEŽIVAČA KALCIJUMA .....</b>	<b>39</b>
KARAKTERISTIKE FLUO-3 I FLUO-4 FLUORESCENTNIH OBELEŽIVAČA KALCIJUMA .....	39
UVODENJE FLUORESCENTNIH KALCIJUMOVIH INDIKATORA U ĆELIJU I REGISTROVANJE INTENZITETA BOJE .....	40
KORIŠĆENJE FARMAKOLOŠKIH SUPSTANCI U CILJU BLOKIRANJA SPECIFIČNIH RECEPTORA I KANALA ASTROCITA .....	41
OBRADA PODATAKA .....	43
<b>PRAĆENJE MOBILNOSTI ENDOZOMA/LIZOZOMA NAKON IGG TRETMANA POMOĆU OBELEŽIVAČA KISELIH VEZIKULA .....</b>	<b>45</b>
KARAKTERISTIKE BOJE LYSOTRACKER RED DND-99.....	45
OBELEŽAVANE KISELIH VEZIKULA ASTROCITA BOJOM LY I REGISTRACIJA VREMENSKIH SERIJA .....	45
PRAĆENJE MOBILNOSTI VEZIKULA I ANALIZA PODATAKA .....	46
<b>REZULTATI.....</b>	<b>48</b>
<b>UTICAJ ALS IGG NA KALCIJUMOVE TRANZIJENTE PACOVSKIH ASTROCITA U KULTURI .....</b>	<b>48</b>
ALS IGG IZAZIVAJU TRANZIJENTNI PORAST UNUTARĆELIJSKE KONCENTRACIJE KALCIJUMA .....	48

VANĆELIJSKI KALCIJUM NIJE NEOPHODAN ZA POJAVU ALS IGG- IZAZVANIH KALCIJUMOVIH TRANZIENATA ALI UTIČE NA NJIHOVU DINAMIKU.....	52
AKTIVACIJA IP <sub>3</sub> RECEPTORA JE ODGOVORNA ZA ALS IGG- IZAZVANO OSLOBAĐANJE KALCIJUMA IZ UNUTARĆELIJSKIH DEPOA .....	55
PLAZMA MEMBRANSKI KANALI I ASOCIRANI ENZIMI KAO POSREDNICI U FORMIRANJU ALS IGG-OM IZAZVANIH KALCIJUMOVIH TRANZIENATA.....	58
<b>UTICAJ ALS IGG NA MOBILNOST LIZOZOMA/ENDOZOMA PACOVSKIH ASTROCITA U KULUTURI.....</b>	<b>63</b>
MOBILNOST OBELEŽENIH VEZIKULA U NORMALNIM FIZIOLOŠKIM USLOVIMA .....	63
PROMENE U MOBILNOSTI LIZOTREKEROM OBELEŽENIH VEZIKULA NAKON AKUTNOG ALS IGG TRETMANA .....	65
UTICAJ VANĆELIJSKE KONCENTRACIJE KALCIJUMA NA ALS IGG- IZAZVANO POVEĆANJE MOBILNOSTI OBELEŽENIH VEZIKULA .....	69
ATP STIMULACIJA MENJA MOBILNOST LY VEZIKULA.....	72
ALS IGG NE IZAZIVA IZLUČIVANJE SADRŽAJA OBELEŽENIH VEZIKULA .....	74
<b>DISKUSIJA .....</b>	<b>76</b>
<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>85</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>87</b>
<b>BIOGRAFIJA .....</b>	<b>126</b>



# UVOD

---

## AMIOTROFIČNA LATERALNA SKLEROZA

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) je fatalna neurodegenerativna bolest koju karakteriše selektivan gubitak motoneurona korteksa, moždanog stabla i kičmene moždine. Samo ime bolesti ukazuje na različite tkivne strukture koje su oštećene u ALS. Termin **amiotrofična** odnosi se na gubitak mišićne mase i atrofiju mišićnih vlakana, termin **lateralna** ukazuje na oštećene kortikospinalne traktove koji se protežu sa obe strane kičmene moždine, a termin **skleroza** oslikava nastanak promena u tkivu kao rezultat degeneracije neurona (*Rowland & Shneider, 2001*). Posledice degeneracije kortikalnih, bulbarnih i spinalnih motoneurona (sa izuzetkom okulomotornih neurona i neurona koji kontrolišu bešiku) su: razvoj spastične hipertonije, slabost mišićne mase, fascikulacija, mišićna atrofija, problemi sa govorom i gutanjem, progresivna paraliza i progresivna slabost respiratorne mišićne mase. Ljudi sa klinički dijagnostifikovanim ALS umiru usled paralize respiratornih mišića i dijafragme, u proseku 3 do 5 godina nakon pojave prvih simptoma bolesti (*Rowland & Shneider, 2001*).

Većina ALS slučajeva je sporadična (*eng. sporadic ALS, sALS*), ali oko 5-10% pacijenata ima familijarnu istoriju bolesti (*eng. familial ALS, fALS*) (*Andersen, 2003; Byrne et al., 2011*). Incidencija sporadičnih oblika ALS (*sALS*) u Evropi i Severnoj Americi je tokom devedestih godina procenjena na 1.87 slučajeva na 100.000 (*Worms, 2001*), dok se prevalencija bolesti u istom periodu kretala između 2.7 i 7.4 na 100.000. Životni rizik oboljevanja od ALS u 70-oj godini života procenjuje se između 1/1000 (*Traynor et al., 1999*) i 1/400 (*Johnston, 2006*), što ovu bolest čini najčešćom motoneuronskom bolešću. Dugo se registrovala povećana stopa oboljevanja muškaraca u odnosu na žene (1.5:1), ali noviji podaci sugerišu da nema razlike u podložnosti bolesti između polova (*Worms, 2001; Abhinav et al., 2007; Zoccollella et al., 2008; Logroscino et al., 2008*). Stopa mortaliteta se procenjuje između 1.54 i 2.55 na 100.000 stanovnika po godini (*Worms, 2001*). Srednja vrednost godina života na početku bolesti kod sporadičnih

bolesnika kreće se između 55 i 65 godina, sa medijanom 64 (*Leigh, 2007*), ali je ipak oko 5% pacijenata mlađe od 30 godina (*Gouveia & de Carvalho, 2007*). Bulbarni početak bolesti je češći kod žena i starijih osoba, sa 43% pacijenata starosti preko 70 godina nasuprot 15% pacijenata ispod 30 godina (*Forbes et al., 2004*).

Kod fALS formi, nasleđivanje je uglavnom autozomalno dominantno, sa visokom penetrabilnošću, mada su prisutni i recesivni tipovi nasleđivanja (*Mulder et al., 1986; Gros-Louis et al., 2006*). Odnos polova je ujednačen, srednja vrednost godina starosti na početku bolesti je za oko 10 godina manja nego kod sALS pacijenata, a vreme preživljavanja nakon početka bolesti je kraće (*Valdmanis & Rouleau, 2008*).

Jedini odobren lek za ALS je riluzol, iako su inicijalna klinička ispitivanja, obavljena pre oko 15 godina, pokazala veoma skromno povećanje preživljavanja (3 meseca u proseku). Ipak, neki pacijenti (koji se ne mogu identifikovati pre početka tretmana) preživljavaju znatno duže sa korišćenjem riluzola (*Miller et al., 2007*), tako da se i dalje svim ALS pacijentima preporučuje ovaj medikament. U prethodnih 15-ak godina pokrenuto je mnogo kliničkih studija, ali nijedna od aktivnih supstanci još uvek nije odobrena za korišćenje u kliničkoj praksi. Mnoga klinička ispitivanja su se završila već u drugoj fazi. Primer jednog takvog raspleta je litijum, koji se već dugo godina koristi u terapiji manijačno depresivnih poremećaja. Preliminarni rezultati u animalnom modelu i na malom uzorku pacijenata su pokazali dramatično usporavanje progresije bolesti kada se litijum koristi u manjim dozama (*Fornai et al., 2008*), ali su kliničke studije pokazale da nema efekta (*Verstraete et al., 2012*). Smatra se da postoje bar tri pristupa u tretiranju ALS koji bi mogli da dovedu do značajnih pomaka u lečenju bolesti: korišćenje nanotehnologije za usmereno dejstvo medikamenata na ciljana žarišta/tipove ćelija, korišćenje vakcina protiv epitopa proteina sa greškom u konformaciji ili imunskih posrednika bolesti i razvoj terapije matičnim ćelijama (*Eisen, 2009*).

## GENETIČKA OSNOVA ALS

ALS je neurodegenerativno oboljenje sa heterogenom genetičkom osnovom (*Andersen, 2006*). Manje od 10% slučajeva ima familijarnu istoriju bolesti. Ostalih 90% su sporadični i smatra se da su multifaktorijalni, odnosno da se bolest razvija kao kombinacija uticaja sredinskih faktora i genetičkih predizpozicija. Procenjuje se da se heritabilnost ALS-a kreće između 0.38 i 0.85 (*Eisen, 2009*). Genetika obe forme ALS (sALS i fALS) je vrlo složena (*Valdmanis & Rouleau, 2008*). Bolest može da nastane kao posledica vrlo različitih uticaja koji nisu međusobno isključivi, a podrazumevaju: disfunkciju jednog ili najverovatnije, većeg broja interagujućih gena, kombinaciju multifaktorijalnih interagujućih gena i sredinskih faktora ili ne-genetički uzrok. Dakle, u slučaju ALS mora se govoriti o kompleksnoj interakciji genetičkih i sredinskih faktora (*Shaw, 2005; Cozzolino et al., 2008*).

Zahvaljujući skorašnjem napretku u humanoj genetici i genomici koji je značajno ubrzao hromozomalno mapiranje genskih lokusa, do danas je identifikovano više od 16 gena koji su uključeni u razvoj bolesti (tabela 1). Zahvaljujući karakterizaciji gena uključenih u razvoj ALS i konstruisanju animalnih modela bolesti, danas se dosta zna o molekularnim mehanizmima uključenim u nastanak bolesti.

Tabela 1: Različiti tipovi ALS-a i asociirani geni (modifikovano iz *Otomo et al., 2012*)

tip bolesti	lokus	gen	protein	tip nasleđivanja *	početak bolesti	funkcija proteina
ALS1	21q22.11	<i>SOD1</i>	SOD1	D	adultni	oksidativni i ER stres
ALS2	2q33.1	<i>ALS2</i>	ALS2/alsin	R	juvenilni	cirkulacija vezikula i degradacija proteina
ALS3	18q21	-	-	D	adultni	-
ALS4	9q34.13	<i>SETX</i>	sentaksin	D	juvenilni	odgovor na oštećenje DNK
ALS5	15q21.1	<i>SPG11</i>	spatascin	R	juvenilni	-
ALS6	16p11.2	<i>FUS</i>	FUS	D	adultni	metabolizam DNK i RNK
ALS7	20p13	-	-	D	adultni	-
ALS8	20q13.32	<i>VAPB</i>	VAPB	D	adultni	cirkulacija membrana između ER i Goldžijevog kompleksa
ALS9	14q11.2	<i>ANG</i>	angiogenin	D	adultni	neuroprotektivna
ALS10	1p36.22	<i>TARDBP</i>	TDP-43	D, R ili S	adultni	metabolizam DNK i RNK
ALS11	6q21	<i>FIG4</i>	FIG4	D ili S	adultni	regulacija PI(3,5)P <sub>2</sub>
ALS12	10p13	<i>OPTN</i>	optineurin	D ili R	adultni	regulacija NFκB
ALS13	12q24.12	<i>ATXN2</i>	ataksin-2	D	adultni	genska regulacija
ALS14	9p13.3-p12	<i>VCP</i>	VCP ili p97	D	adultni	degradacija proteina
ALS15	Xp11.21	<i>UNQLN2</i>	ubikvilin-2	D	adultni	degradacija proteina
ALS16	9p13.3	<i>SIGMAR1</i>	SIGMAR1	R	juvenilni	šaperoni ER
ALS-FTD1	9q21-q22	-	-	D ili S	adultni	-
ALS-FTD2	9p21.2	<i>C9orf72</i>	C9ORF72	D ili S	adultni	-
ALS**	5q35.3	<i>SQSTM1</i>	sekvestrom ili p62	?	adultni	degradacija proteina

\*tip nasleđivanja: D – dominantno, R – recesivno, S – sporadično

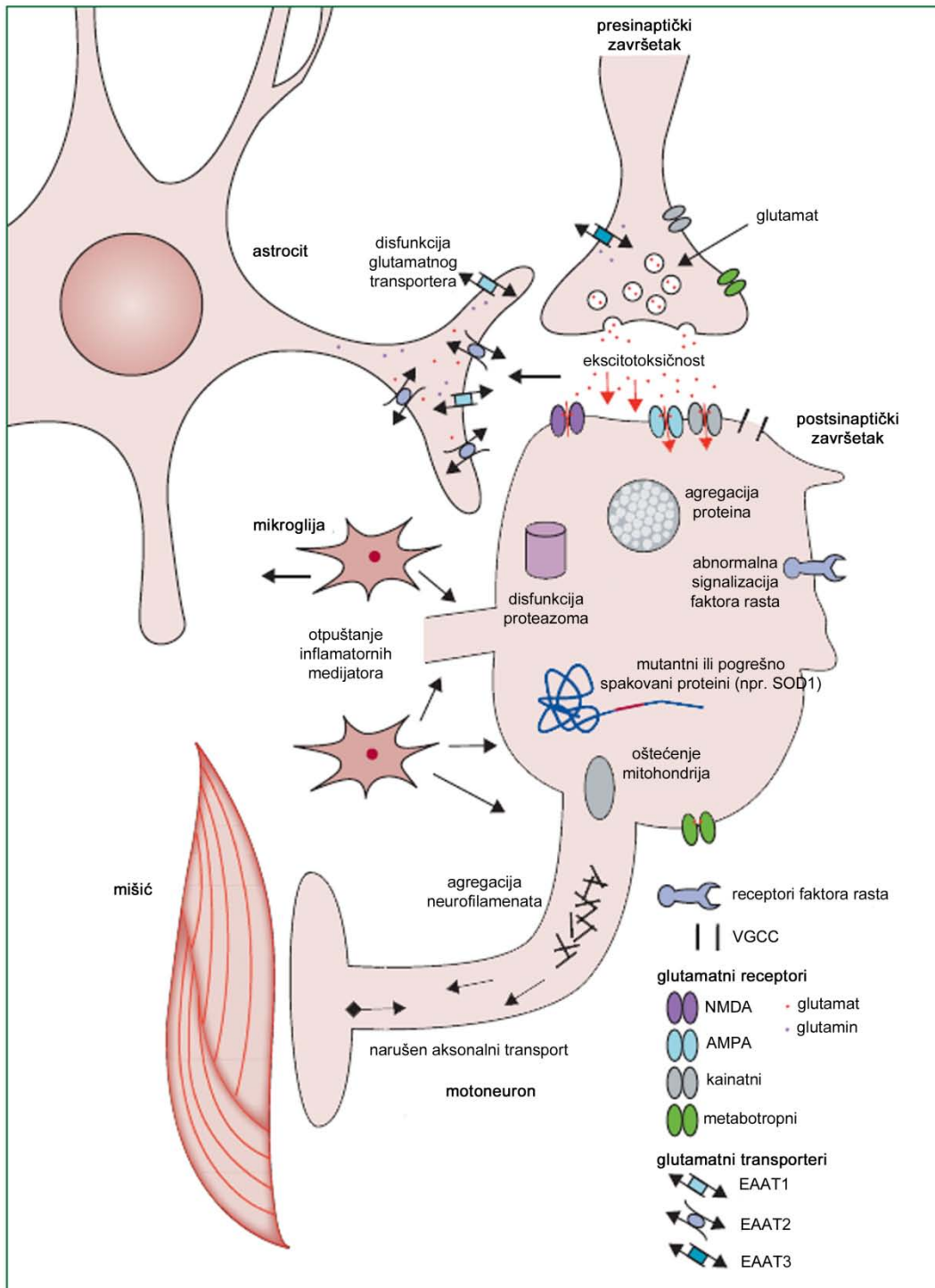
\*\*ALS: Fecoto i saradnici su pronašli nekoliko novih SQSTM1 mutacija kod ALS pacijenata; *in silico* analizom su predvideli da 8 od 9 varijanti mutantnih proteina mogu da se ponašaju kao patogeni (*Fecoto et al., 2011*)

## **MEHANIZMI NASTANKA BOLESTI – MOTONEURONI KAO NAJSLABIJA KARIKA**

Jedna od iznenađujućih karakteristika ALS-a je zapažanje da dolazi do selektivnog umiranja motoneurona. Ovakvu selektivnost potvrđuje i činjenica da čak i u familijarnoj formi bolesti, izazvanoj mutacijom superoksid dismutaze 1 (SOD1), gde se mutirani protein eksprimira u svakoj ćeliji organizma, degenerišu samo motoneuroni (*Pasinelli & Brown, 2006*). Predloženo je nekoliko, međusobno povezanih mehanizama koji mogu da utiču na nastanak i razvoj bolesti: ekscitotoksičnost izazvana glutamatom, oksidativni stres, agregacija proteina narušene konformacije, disfunkcije sekretornog puta, disfunkcija mitohondrija, narušen aksonski transport, nedostatak faktora rasta i inflamacija. Mehanizmi nastanka bolesti ilustrovani su na slici 1.

### **EKSCITOTOKSIČNOST I ULOGA KALCIJUMA**

Glutamat je neurotransmiter koji se u fiziološkim uslovima oslobađa iz presinaptičkog neurona egzocitozom i aktivira glutamatne receptore na postsinaptičkom neuronu, povećavajući propustljivost za jone  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  koji ulaze u ćeliju, izazivaju depolarizaciju postsinaptičke membrane i genuzu akcionog potencijala. Ekscitotoksičnost je oštećenje neurona koje nastaje zbog preterane aktivacije glutamatnih receptora. Ovaj koncept je zasnovan na zapažanju da prekomerna koncentracija glutamata koji može da aktivira NMDA (N-metil-D-aspartat) i AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol-propanoična kiselina) receptore može da indukuje umiranje neurona (*Olney, 1978*). Do danas je sakupljeno dosta eksperimentalnih dokaza da ekscitotoksičnost može da doprinese oštećenjima neurona u epilepsiji, neurotraumi, moždanim udarima i velikom broju neurodegenerativnih oboljenja, uključujući i ALS (*Coyle & Puttfracken, 1993; Lipton & Rosenberg, 1994; Doble, 1999*).



Slika 1. **Patogeneza amiotrofične lateralne skleroze.** Glavni patogeni mehanizmi odigravaju se u motoneuronima, na motornoj ploči i u okruženju ćelija. Astrociti modulišu vanćelijsku

koncentraciju glutamata koji, stimulacijom neurona, posreduje u ekscitotoksičnosti. U telu motoneurona zapaža se agregacija proteina i disfunkcija mitohondrija. Aksonalni transport je narušen, što vodi gubitku sinapse sa mišićem i atrofiji mišića. Spoljašnji neuroinflamatorni procesi (posredovani mikroglijom) mogu da nastranu sekundarno, kao odgovor na oštećenje motoneurona, ili da imaju primarnu ulogu u patogenezi. Modifikovano iz *Turner et al., 2009*.

EAAT = transporter ekscitatornih amino kiselina; SOD1 = superoksid dismutaza 1; VGCC = voltažno zavisni kalcijumovi kanali

Motoneuroni moždanog stabla i kičmene moždine imaju nekoliko specifičnih osobina koje su vrlo značajne za njihovo normalno funkcionisanje, ali ih čine vrlo ranjivim pri povećanoj stimulaciji. Naime, ALS-ranjivi motoneuroni imaju manji kapacitet puferovanja unutarćeljskog kalcijuma (*Van Den Bosch et al., 2006; Grosskreutz et al., 2010*) što im daje prednost pri dužim motornim aktivnostima kao što su trčanje ili disanje, jer dozvoljava znatno brži oporavak kalcijumovih tranzijentata uz malu potrošnju energije (*Lips & Keller, 1999*), kao i veću zapreminu kalcijumovih mikrodomena u blizini otvorenih kanala (*von Lewinski & Keller, 2005*), koja je vrlo značajna u integraciji signala između voltažno zavisnih  $Ca^{2+}$  kanala (*eng. voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels, VDCC*) na membrani ćelije i okolnih organela, kao što su mitohondrije ili endoplazmatični retikulum (ER). S druge strane, ALS-ranjivi motoneuroni imaju veliku gustinu  $Ca^{2+}$ -propustljivih AMPA receptora (*Carriedo et al., 2000; Van Den Bosch et al., 2000*) koji mogu da doprinesu osetljivosti ovih motoneurona na ekscitotoksične uslove.

Ekscitotoksičnost može da bude prouzrokovana narušenim preuzimanjem glutamata iz vanćeljskog prostora, pa i sinaptičke pukotine. U sinaptozomima izolovanim iz bolešću zahvaćenih delova mozga i kičmene moždine ALS pacijenata utvrđeno je narušeno preuzimanje glutamata (*Rothstein et al., 1992; Shaw et al., 1994*). Selektivni gubitak astroglijalnog glutamatnog transportera EAAT2 (*eng. excitatory amino acid transporter 2*) utvrđen je u regijama motornog korteksa i kičmene moždine sALS i fALS bolesnika (*Fray et al., 1998; Rothstein et al., 1995; Sasaki & Iwata, 2000*) i u ventralnom rogu mutantnih SOD1 miševa i pacova (*Bendotti et al., 2001; Bruijn et al., 1997; Howland et al., 2002*). Takođe je pokazano, kako u *in vitro* tako i u *in vivo* uslovima, da gubitak EAAT2 dovodi

do selektivne degeneracije motoneurona (*Rothstein, 1996*), kao i da stimulacija ekspresije EAAT2  $\beta$ -laktam antibioticima produžava životni vek mutantnih SOD1 miševa (*Rothstein et al., 2005*).

Propustljivost AMPA receptora za  $\text{Ca}^{2+}$  jon zavisi od sastava subjedinica ovog kanala. Ukoliko je GluR2 subjedinica prisutna u formiranju tetramera, AMPA receptor slabije propušta  $\text{Ca}^{2+}$  jone. Relativna količina iRNK za GluR2 je značajno manja u motoneuronima u odnosu na ostale neurone, što znači da se količina dostupne GluR2 subjedinice reguliše na transkripcionom nivou (*Van Damme et al., 2002*). Nivo ekspresije GluR2 subjedinice motoneurona kičmene moždine kod ljudi je manji nego u ostalim neuronima (*Hearth et al., 2002; Kawahara et al., 2003*). Kod mutantnih SOD1 miševa koji ne eksprimiraju GluR2 subjedinicu dolazi do ubrzane i dramatične degeneracije motoneurona (*Van Damme et al., 2005*), a ako se poveća ekspresija GluR2 subjedinice, povećava im se životni vek (*Tateno et al., 2004*). Astrociti koji okružuju motoneurone mogu da utiču na nivo ekspresije GluR2 subjedinice u motoneuronima (*Van Damme et al., 2007*), najčešće lučenjem VEGF (*eng. vascular endothelial growth factor*), BDNF (*eng. brain-derived neurotrophic factor*) ili GDNF (*eng. glial cell-derived neurotrophic factor*) (*Bogaert et al., 2010; Brene et al., 2000*). Važan događaj u sintezi GluR2 subjedinice je obrada iRNK koja uvodi kod za pozitivno naelektrisanu amino kiselinu arginin umesto neutralnog glutamina na Q/R mestu. Ovo pozitivno naelektrisanje smanjuje propustljivost GluR2 subjedinice za kalcijum. Kod motoneurona kičmene moždine sALS bolesnika primećen je defekt u obradi iRNK za GluR2 (*Kawahara et al., 2004*).

U eksperimentima na hipoglosalnim motoneuronima utvrđeno je da mitohondrije imaju značajnu ulogu u skladištenju unutraćelijskog kalcijuma i kontroli električne aktivnosti (*Grosskreutz et al., 2010*). Upravo mitohondrije vrlo rano pokazuju patološke promene kako u mišjem modelu bolesti tako i kod ALS bolesnika (*Wong et al., 1995; Kong et al., 1998*). Druga značajna subćelijska struktura odgovorna za preuzimanje viška kalcijuma je ER. U pacijenata iz Holandije, Švedske i Belgije pokazana je jaka asocijacija između pojave ALS i nukleotidnog polimorfizma na genu koji kodira inozitol trifosfatni receptor 2 (ITPR2) na ER-u; nivo iRNK za ITPR2 kod ALS bolesnika je bio veći nego kod



kontrola (*van Es et al., 2007*). Pošto su izmenjene normalne fiziološke funkcije glavnih aktera uklanjanja unutarćelijskog kalcijuma, mitohondrija i ER, povećana koncentracija unutarćelijskog kalcijuma može da doprinese indukovanju ćelijske smrti (*Lindholm et al., 2006*).

### **OKSIDATIVNI STRES**

Oksidativni stres se javlja zbog neravnoteže između procesa proizvodnje reaktivnih kiseoničnih vrsta (*eng. reactive oxygen species, ROS*) i mogućnosti sistema da ih ukloni, popravi oštećenja i vrati sistem u stanje sa predominantno redukujućim vrstama. Ćelijske ROS su proizvod aerobnog metabolizma, uglavnom zbog curenja elektrona iz mitohondrijskog respiratornog lanca, što dovodi do nekompletne redukcije molekulskog kiseonika za vreme oksidativne fosforilacije i stvaranja superoksidnog anjona i vodonik peroksida (*Barber & Shaw, 2010*). Superoksid i vodonik peroksid ne spadaju u visoko reaktivne radikale, ali mogu u daljim reakcijama da daju reaktivnije radikale. Superoksid reaguje sa azot oksidom i tom prilikom se stvara peroksinitrit (*Pryor & Squadrito, 1995; Beckman & Koppenol, 1996*), dok se vodonik peroksid raspada na hidroksidni radikal u Fentonovoj reakciji, a taj proces katalizuje dvovalentni jon gvožđa. Peroksinitrit i hidroksidni radikal su vrlo reaktivni i mogu da oštete proteine, lipide i DNK, što dovodi do menjanja konformacije proteina, narušene dinamike ćelijske membrane usled oksidacije nesaturisanih masnih kiselina i promena u DNK i RNK.

Mnoge studije koje su se bavile proučavanjem patoloških stanja dale su dokaze o povećanom nivou oksidativnog stresa u post mortem tkivu ALS bolesnika u odnosu na kontrole (*Shaw et al., 1995; Ferrante et al., 1997; Abe et al., 1995; Beal et al., 1997*). Markeri lipidne oksidacije su detektovani u kičmenoj moždini sALS bolesnika, a nisu bili prisutni kod kontrolnih ispitanika (*Shibata et al., 2001*), dok su markeri oksidovane DNK bili povišeni kod sALS pacijenata (*Fitzmaurice et al., 1996*), sa najznačajnijim povećanjem u ventralnim rogovima (*Ferrante et al., 1997*). Markeri oksidativnog stresa mogu se detektovati u cerebrospinalnoj tečnosti (*eng. cerebrospinal fluid, CSF*) ALS pacijenata već u ranim fazama bolesti.

### **AGREGACIJA PROTEINA NARUŠENE KONFORMACIJE**

Prisustvo proteinskih agregata je glavna karakteristika koja je zajednička mnogim neurodegenerativnim oboljenjima, uključujući i ALS (*Ross & Poirier, 2005*). Opisan je veliki broj proteina koji u ALS imaju tendenciju da stvaraju agregate, a najčešći agregati koji se u ovoj bolesti javljaju su ubikvitinske inkluzije, nazvane po proteinu ubikvitinu koji je prisutan u svim inkluzijama (*Wood et al., 2003*). Protein koji se najčešće nalazi u ubikvitinskim inkluzijama u ALS je TDP-43 (*eng. TAR DNA-binding protein 43*) (*Neumann et al., 2006; Arai et al., 2006*). Mutirana SOD1 je glavni konstituent inkluzija u fALS slučajevima (*Shibata et al., 1996a; Shibata et al., 1996b; Chou et al., 1996*), a nalazi se i u inkluzijama kod mutantnih SOD1 miševa (*Johnston et al., 2000; Watanabe et al., 2001*) kao i u ćelijskim kulturama *in vitro* modela bolesti (*Durham et al., 1997; Lee et al., 2002*). Oksidativno oštećenje i mutirane i nemutirane forme SOD1 dovodi do disocijacije dimera na monomere i agregacije monomera pri čemu se formiraju inkluziona tela koja mogu biti citotoksična (*Rakhit et al., 2004*). Izgleda da je opšti mehanizam agregacije različitih mutantnih formi SOD1 vrlo sličan, jer su mnoge varijante mutiranih SOD1 proteina u apo-SOD1 formi, pre metalizacije, podložne oligomerizaciji (*Banci et al., 2008*). Proteinski agregati se javljaju neposredno pre ili u vreme pojave simptoma bolesti i narastaju sa progresijom bolesti (*Rothstein, 2009*), a mogu da potpomognu degeneraciji neurona na nekoliko načina: fizičkim razdvajanjem esencijalnih ćelijskih komponenti (*Bruijn et al., 1998*), smanjenjem aktivnosti šaperona (*Bruening et al., 1999*) i negativnim uticajem na ubikvitin-proteozomalni put (*Niwa et al., 2002*).

### **DISFUNKCIJE SEKRETORNOG PUTA**

Endoplazmatični retikulum (ER) je esencijalni deo ćelije odgovoran za sintezu proteina i lipida. Proteini se u ER pakuju da bi zauzeli nativnu tercijarnu konformaciju. Ukoliko je protein pravilno upakovan, sledi njegovo transportovanje sekretornim putem do finalne destinacije. U lumenu ER, polipeptidima u pravilnom pakovanju pomažu proteini iz familije šaperona, foldaze i razni kofaktori. Većina proteina u prvom pokušaju pakovanja zauzme nativnu konformaciju. Međutim, ukoliko se nativna konformacija ne postigne iz prvog pokušaja, nastupa drugi ciklus u kome se vrši reorganizacija disulfidnih veza, sa

ciljem postizanja pravilne tercijarne konformacije. Glikopeptidi narušene konformacije ulaze u ER-asocirani degradativni (ERAD) mehanizam gde ih šaperoni, transmembranski proteini i enzimi asocirani sa ubikvitinom prepoznaju, obeležavaju i transportuju do citoplazme gde će biti degradirani u proteazomalnom sistemu (*Vembar & Brodsky, 2008*). Nepravilno funkcionisanje ERAD mehanizma pokazano je u nekoliko neuro-degenerativnih oboljenja, uključujući i ALS (*Nishitoh et al., 2008*).

Procenjuje se da je ukupna koncentracija proteina u lumenu ER oko 100 mg/ml, a ovako koncentrovani proteini imaju tendenciju da formiraju agregate. Vrlo efikasan sistem kontrole nativnih konformacija sprečava agregaciju proteina u lumenu ER (*Naidoo, 2009; Stevens & Argon, 1999*). Različite promene u ćeliji, kao što su abnormalna homeostaza kalcijumovih jona, poremećen redoks status, nedostatak glukoze/energije, ekspresija mutiranih gena ili velika sekretorna aktivnost, mogu da dovedu do zastoja u funkcionisanju ER, što vodi akumulaciji neupakovanih ili pogrešno upakovanih proteina u lumenu ER (*Schroder & Kaufman, 2005*). Ovakvo stanje se naziva stres ER, a ćelija se protiv njega bori aktiviranjem UPR (*eng. unfolded protein response*) signalnog puta, čiji je cilj smanjenje količine proteina koji ulaze u ER radi pakovanja i povećanje količine proteina koji su uključeni u procese pakovanja. Dakle, UPR je integrisani signalni odgovor na stanje stresa ER koji pokreće adaptivne procese usmerene ka otklanjanju uzročnika stresa ER. U slučajevima hroničnog stresa ER, aktiviraju se pro-apoptotski mehanizmi u ćeliji koji dovode do njene apoptoze (*Rodrigues et al., 2002; Rojas-Rivera et al., 2009; Schroder & Kaufman, 2005*).

Stres ER može da doprinese patogenezi sALS i fALS (*Atkin et al., 2006; Hertz et al., 2007; Ilieva et al., 2007; Kikuchi et al., 2006*). Zapaženo je povećanje fosforilacije eIF2 $\alpha$  (translacioni faktor koji posreduje u ubacivanju proteina u lumen ER, inhibiran fosforilacijom) kao i povećanje BiP (medijator pakovanja proteina u ER) i PDI (protein disulfid izomeraza, posreduje u rearanžiranju disulfidnih veza) u kičmenoj moždini sALS bolesnika (*Ilieva et al., 2007; Kierlan et al., 2007*) sa istovremenom pojavom povećane akumulacije ubikvitiranih proteinskih inkluzija (*Ilieva et al., 2007*).

Goldžijev aparat (GA) se sastoji od niza pljosnatih, paralelnih i međusobno povezanih cisterni raspoređenih oko centra organizacije mikrotubula u perinuklearnom regionu. GA je dinamična struktura sa važnom ulogom u transportu, obradi i usmeravanju proteina ka finalnim destinacijama (plazma membrani, ER ili lizozomima) (Farquhah, 1985). GA je u neuronima uključen u aksonski transport endogenih proteina i egzogenih makromolekula (Hamman et al., 1998; Rhodes et al., 1987), pa patološke promene GA mogu da poremete normalne funkcije aksona i sinaptičkih završetaka (Fujita et al., 2008). Fragmentacija GA prethodi smrti neurona uzrokovanoj ekscitotoksinima, oksidantima, stresom ER i drugim faktorima (Nakagomi et al., 2008), a nezavisna je od promena u citoskeletu (Mukherjee et al., 2007). Histopatološkim analizama tkiva sALS bolesnika utvrđeno je da ~30% motoneurona ima fragmentisan GA, dok je kod kontrolnih ispitanika taj broj oko 1%. Istovremeno, nije bilo razlike u distribuciji citosolnih proteina neurona sa fragmentisanim i normalnim GA (Gonatas et al., 1992). Sumarno, ovi nalazi sugerišu da morfološke promene GA nisu posledica disfunkcije citoskeleta.

Mnogi proteini na površini membrane, pa i receptori za koje su vezani ligandi, se internalizuju putem vezikula obloženih klatrinom, a zatim se transportuju do ranih i kasnih endozoma. Iz endozoma se upućuju ka lizozomima gde se vrši degradacija. Za vreme ovog puta, proteini se obeležavaju ubikvitinom koji predstavlja signal za sortiranje u multivezikularnim endozomima (MVE) (Gruenberg & Stenmark, 2004; Katzmann et al., 2002). Proces uvlačenja vezikula u MVE obavlja se posredstvom endozomnih kompleksa za sortiranje neophodnih za transport (*eng.* endosomal sorting complex required for transport, ESCRT). Kao odeljak ćelije zadužen za degradaciju i sortiranje, MVE su strukturno i funkcionalno povezani sa lizozomima i autofagozomima (Caldero et al., 2009). Disfunkcija ili nedostatak bilo koje komponente ESCRT sistema vodi nagomilavanju autofagozoma (Lee et al., 2007). Disfunkcija MVE može da dovede do pojave ALS i u fALS je pronađena autozomalno dominantna mutacija gena *Chmp2b* gen koji kodira naelektrisani multi-vezikularni protein 2 B, deo ESCRT III kompleksa (Parkinson et al., 2006).

Proteazomni i lizozomni putevi predstavljaju dve glavne rute degradacije proteina. U proteazomima se uglavnom degraduju kratkoživeći proteini, koji prvo moraju biti denaturisani da bi mogli da prođu kroz usku poru proteazoma (*Rubinsztein, 2006*). Degradacija proteina autofagijom izgleda da korelira sa sposobnošću proteina da formiraju agregate (*Hartl & Hayer-Hartl, 2009*). Autofagija je uključena u katabolizam citoplazmatskih komponenti, oštećenih organela, toksičnih proteinskih agregata i intracelularnih patogena. Materijal koji treba da se razgradi prvo se uokviruje dvostrukom membranom i na taj način se stvara autofagozom. Autofagozom se dalje fuzioniše sa lizozomom da bi se napravio autolizozom u kome lizozomski enzimi razgrađuju materijal. Stres ER i inhibicija proteazoma stimulišu autofagiju (*Ding & Yin, 2008*), a nekontrolisana i preterana autofagija je pogubna za ćelije zbog nekontrolisanog katabolizma organela i makromolekula (*Levine & Kroemer, 2008*). Aktivnost autofagije je povećana u ALS i ovim putem se otklanjaju proteinski agregati kako mutirane SOD1 (protein p62 interaguje sa mutiranim proteinom i moduliše njegovo usmeravanje ka autofaganom i proteazomnom degradativnom putu nezavisno od prisustva/ odsustva ubikvitina) (*Gal et al., 2009*), tako i ubikvitinizedovanog TDP-43 proteina (*Ju et al., 2009; Urushitani et al., 2010; Wang et al., 2010*). Takođe, povećane količine iRNK za regulatorni protein transporta lizozoma (LYST), koji moduliše egzocitozu lizozoma i transport ovih vezikula, detektovane kod sALS bolesnika i miševa sa mutiranom SOD1, sugerišu da je funkcija lizozoma kao i njihov transport izmenjen u ALS (*Offen et al., 2009*).

### **DISFUNKCIJA MITOHONDRIJA**

Studijama koje su proučavale patološka neurološka stanja otkrivene su morfološki abnormalne mitohondrije u motoneuronima ALS bolesnika (*Siklos et al., 1996; Sasaki & Iwata, 1996*), čime se dovode u vezu patogeneza bolesti i disfunkcija mitohondrija. Abnormalne mitohondrije su primećene i kod miševa sa mutiranom SOD1, kao i u ćelijskim modelima bolesti, a njihove karakteristike su: smanjena aktivnost elektron transportnog lanca, smanjenje potencijala membrane mitohondrija, izmenjena homeostaza kalcijuma, povećana oštećenja DNK mitohondrija, promene u mitohondrijalnim proteinima i smanjenje aktivnosti mitohondrijalnog antioksidativnog odbrambenog mehanizma (*Barber & Shaw, 2010*).

Za proizvodnju adenzin-3-fosfata (ATP) u mitohondrijama neophodno je postojanje elektrohemijskog gradijenta protona kroz unutrašnju mitohondrijalnu membranu. Da bi se gradijent protona uspostavio i održavao, elektroni se prebacuju duž mitohondrijalnog respiratornog lanca i finalno stižu do molekularnog kiseonika kojeg redukuju do molekula vode. Ipak, neki elektroni „procure“ iz lanca i dođu u direktan kontakt sa kiseonikom, što dovodi do stvaranja ROS (*Adam-Vizi, 2005*). Procenjuje se da se u normalnim fiziološkim uslovima 1-4% kiseonika u mitohondrijama pretvori u superoksidni radikal (*Boveris, 1977*), što mitohondrije čini glavnim izvorom ROS. Antioksidantni mehanizmi mitohondrija su u normalnim uslovima u stanju da se bore sa velikim količinama ROS, ali kumulativna oksidativna oštećenja koja nastaju tokom vremena mogu da dovedu do smanjenja efikasnosti mitohondrija i visoke stope mutacija mitohondrijske DNK (*Mecocci et al., 1993*). Zbog neobično velikih zahteva za energijom, motoneuroni su podložniji kumulativnom oksidativnom stresu nego drugi tipovi ćelija. Frekvencija mutacija mitohondrijske DNK u motornom korteksu i kičmenoj moždini ALS bolesnika je veća u odnosu na kontrole (*Dhaliwal & Grewal, 2000; Wiedemann et al., 2002*). Povećano preuzimanje kalcijuma u mitohondrije kao posledica ekscitotoksičnosti izazvane glutamatom može da dovede do generisanja ROS (*Carreido et al., 2000; Dykens, 1994*), a pokazano je da je ekscitotoksična degeneracija neurona prednjeg mozga zapravo

posledica preuzimanja kalcijuma od strane mitohondrija a ne povećanja njegove unutarćelijske koncentracije (*Stout et al., 1998*).

Još jedan od parametara koji može da doprinese disfunkciji mitohondrija je prisustvo mutirane SOD1 ili SOD1 narušene konformacije. Iako se smatra da je SOD1 citosolni protein, njegovo prisustvo je primećeno i u međumembranskom prostoru mitohondrija (*Strutz et al., 2001; Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001; Higgins et al., 2002*). Pronađeno je dvanaest mutiranih formi SOD1 sa različitim enzimatskim aktivnostima i sklonostima ka agregaciji koji se akumuliraju u mitohondrijama u mnogo većoj meri nego nemutirana SOD1, što vodi zaključku da akumulacija u mitohondrijama može biti zajednički toksični mehanizam različitih SOD1 mutiranih formi (*Ferri et al., 2006*).

#### **AGREGACIJA NEUROFILAMENATA I POREMEĆEN AKSONSKI TRANSPORT**

Neurofilamenti predstavljaju najzastupljeniju vrstu citoskeletnih proteina motoneurona i igraju važnu ulogu u stimulaciji rasta aksona kao i određivanju njegovog prečnika (*Xu et al., 1993*). Abnormalna organizacija i akumulacija neurofilamenata dešava se u raznim neurodegenerativnim oboljenjima, uključujući i ALS (*Carpenter, 1968; Hirano et al., 1984*). Kod oko 1% sALS pacijenata pronađene su mutacije u genu koji kodira za neurofilament teškog lanca IV grupe intermedijarnih neurofilamenata (*Figlewicy et al., 1994; Tomkins et al., 1998*). Mutacije su uočene i u genu za periferin (*Gros-Luis et al., 2004*) protein III grupe intermedijarnih neurofilamenata, već ranije detektovanog u aksonskim agregatima motoneurona ALS bolesnika (*Corbo & Hays, 1992*).

Motoneuroni su vrlo izdužene ćelije, sa aksonima koji mogu da porastu do 1 m u dužinu, pa je za njihovo preživljavanje veoma značajan efikasan unutarćelijski transport (anterogradni, brzi i spori, i retrogradni). Molekularni motor anterogradnog transporta je kinezinski kompleks, dok se retrogradni kompleks zasniva na dinaktinu (*Grierson et al., 2006*). U aksonima miša sa mutiranom SOD1 usporena su oba tipa aksonskog transporta (*Williamson & Cleveland, 1999*). Identifikovana je tačkasta mutacija u genu za dinaktin u porodici sa autozomno dominantnom formom bolesti donjih motoneurona koju karakteriše paraliza glasnih žica (*Puls et al., 2003*). Mehanizmi kojima aksonski transport može da

utiče na smrt neurona još uvek nisu potpuno jasni, ali se pretpostavlja da značajnu ulogu mogu imati neefikasno otklanjanje ili dostavljanje distalnih mitohondrija, kao i neefikasan retrogradni transport periferno izlučenih trofičkih faktora (*Rothstein, 2009*).

### **DEFICIT NEUROTROFIČKIH FAKTORA I DISFUNKCIJA SIGNALNIH PUTEVA**

Neurotrofički faktori su u fiziološkim uslovima bitni za preživljavanje ćelija na koje deluju preko receptora spregnutih sa enzimom tirozin kinaznog tipa. Signalni putevi koje pokreću neurotrofički faktori inhibiraju ćelijsku smrt, tako da je nedostatak trofičkih faktora jedan od događaja koji može da potpomogne umiranje neurona. Zapaženi su smanjeni nivoi CNTF-a (*eng. ciliary neurotrophic factor*), BDNF-a, GDNF-a i IGF-1 (*eng. insulin-like growth factor*) u post mortem tkivu ALS bolesnika i u *in vitro* modelima ALS (*Anand et al., 1995; Elliott & Snider, 1996; Oppenheim, 1996*). Takođe, delecija HRE (*eng. hypoxia response element*) u genu za VEGF dovodi do pojave bolesti motoneurona kod miševa (*Oosthuysen et al., 2001*). Kod ljudi su pronađene tri mutacije u VEGF genu koje su asocirane sa predispozicijom za sALS (*Lambrechts et al., 2003*).

Smatra se da finalni proces smrti motoneurona u ALS liči na programiranu ćelijsku smrt (apoptozu). Biohemijski markeri apoptoze mogu se detektovati u terminalnim fazama kod ljudi i animalnih modela ALS (*Guegan & Przedborski, 2003; Pasinelli et al., 1998; Li et al., 2000; Vukosavic et al., 1999*). Ključni elementi normalnog apoptotskog puta, koji su uključeni i u ćelijsku smrt u ALS obuhvataju kaspaznu familiju proteolitčkih enzima, Bcl2 familiju onkoproteina i familiju proteina inhibitora apoptoze (*Shaw, 2005; Sathasivam et al., 2001; Pasinelli & Brown, 2006*).

### **INFLAMACIJA**

Opšta pojava karakteristična za ALS i druge neurodegenerativne bolesti je neuroinflamacija, jer dolazi do aktivacije ćelija glije, uglavnom mikroglije i astrocita, i T limfocita imunog sistema.

Mikroglija je mezenhimalnog porekla i predstavlja rezidentne makrofage u nervnom sistemu koje konstantno nadgledaju promene u vanćelijskoj sredini i interaguju sa astrocitima i neuronima. Mikrogliju mogu da aktiviraju raznorazni signali (*Hanisch &*



*Kettenmann, 2007*) i ona predstavlja prvu liniju odbrane od infekcija ili povreda u nervnom sistemu. Odgovor mikroglije na signale u vanćelijskoj sredini može da bude vrlo raznorodan, ali se njena aktivacija uopšteno karakteriše promenom u ameboidni oblik i sekrecijom proinflammatoryh faktora kao što su TNF- $\alpha$  (*eng.* tumor necrosis factor alpha), IFN- $\gamma$  (interferon gama) i IL(interleukin)-1 $\beta$ , kao i produkcijom oksidujućih molekula kao što su NO i O<sub>2</sub>, koji mogu da učestvuju u zaštiti mikrosredine od mikroorganizama, ali mogu i da izazovu oštećenja okolnog tkiva. Ovi proinflammatory mehanizmi dovode do uklanjanja opasnosti ali je za kontrolu ovog procesa neophodna aktivacija antiinflammatoryh mehanizama koji će omogućiti reparaciju nastalih oštećenja, a završava se kada antiinflammatory molekularni putevi nadjačaju proinflammatory. Mikroglija sintetisuje i oslobađa trofične i antiinflammatory faktore kao što su IGF-1, IL-4 i IL-10, koji ograničavaju inflamaciju i omogućavaju odvijanje reparativnih procesa. Okolni astrociti i T limfociti mogu da utiču na fagocitnu i antigen prezentujuću funkciju mikroglije, pa tako u zavisnosti od svojstava same mikroglije, interakcija sa ćelijskom mikrosredinom i prisustva patogenih faktora može da dođe formiranja štetne ili benigne populacije mikroglije (*Hanisch & Kettenmann, 2007; Mantovani et al., 2004; Michelucci et al., 2009; Henkel et al., 2009*).

Astrociti su ektodermalnog porekla, vrlo su brojni u mozgu i imaju mnoge kompleksne funkcije o kojima će biti reči u narednom odeljku. Aktivaciju astrocita karakteriše povećanje ekspresije glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP). Astrociti po prirodi nisu imunske ćelije, ali u specifičnim uslovima mogu da doprinesu imunskom odgovoru (*Farina et al., 2007*). Još nekoliko drugih tipova ćelija može da učestvuje u neuroinflamaciji a to su različiti podtipovi T limfocita koji se infiltriraju u CNS i modulišu neuroinflammatory reakciju na različite načine u zavisnosti od stupnja bolesti (*Chiu et al., 2008; Beers et al., 2008*), NG2 glijalne ćelije koje mogu da se diferenciraju u astrocite ili neurone u specifičnim uslovima (*Rivers et al., 2008; Zhu et al., 2008*) i ependimne ćelije i njihovi prekursori čija je uloga u neurodegeneraciji još uvek neistražena (*Chi et al., 2006*).

Jedna od glavnih karakteristika bolesti, zajednička za mnoge studije je aktivacija mikroglije i astrocita i pojava T limfocita u moždanom tkivu, kako u post mortem tkivu

ALS pacijenata, tako i u kičmenoj moždini miševa sa ALS simptomima (animalni modeli bolesti) (*Engelhardt & Appel, 1990; Engelhardt et al., 1993; Hall et al., 1998; Alexianu et al., 2001; Nagy et al., 1994; Kushner et al., 1991; Shiffer et al., 1996; Kawamata et al., 1992*). Istovremeno sa infiltracijom T limfocita u moždano tkivo, mikroglia parenhima poprima karakteristike antigen prezentujućih ćelija, što je pokazano detekcijom povećane ekspresije specifičnih markera (*Chiu et al., 2008; Growing et al., 2008; Henkel et al., 2004*). U kičmenoj moždini ALS pacijenata zapažena je astrogliaza kako u ventralnim, tako i u dorzalnim rogovima, kao i na mestima gde vlakna kortikospinalnog trakta ulaze u sivu masu (*Shiffer et al., 1996*). U mozgu ALS pacijenata astrogliaza je detektovana i u sivoj i u beloj masi i prevazilazi granice motornog korteksa (*Kushner et al., 1991*). Mikrogliaza je zapažena u motornom korteksu, motornim jedrima moždanog stabla, duž kortikospinalnog trakta i u ventralnim rogovima kičmene moždine (*Kawamata et al., 1992*) gde mikroglia može da dođe u kontakt sa T ćelijskim infiltratima (*Engelhardt et al., 1993*). Sve ove studije rađene su na post mortem tkivu ALS bolesnika i daju informaciju o stanju u finalnoj fazi bolesti. Specifičnom metodom  $^{11}\text{C}$ -PK11195 PET oslikavanja (*Turner et al., 2004*) moguće je detektovati *in vivo* aktivaciju mikroglie u motornom korteksu, dorzolateralnom prefrontalnom korteksu i talamusu ALS pacijenata, pri čemu se značajnom pokazala asocijacija mikrogliaze i oštećenja gornjih, ali ne i donjih motornih puteva (*Turner et al., 2004*). Svi rezultati govore da neuroinflamacija u ALS nije prolaznog nego trajnog karaktera, najverovatnije zbog konstantnog prisustva faktora koji je izaziva. Smatra se, da je u fALS taj faktor sam mutirani SOD1 protein. Aktivacija imunog odgovora, koja u početku ima zaštitnu funkciju, zbog kontinuiranog prisustva inflamatornog uzročnika i nemogućnosti okončanja inflamatorne reakcije, ona prerasta u štetni proces koji doprinosi daljem oštećenju neurona (*Philips & Robberecht, 2011*).

## **ASTROCITI – FIZIOLOŠKE FUNKCIJE I NJIHOVA ULOGA U PATOLOGIJI ALS**

Astroцити су најзаступљеније ћелије у оквиру CNS и у последњих двадесетак година је порастао интерес научника за истраživanje ovog tipa ћелија. Osim što pružaju trofičku, metaboličku i strukturnu podršku neuronima, astroцити imaju značajnu ulogu u kompleksnoj komunikaciji između neurona i glije, modulišu signalizaciju na nivou sinapsi, regulišu protok krvi i mogu da utiču na matične ћелије prekursora neurona u adultnom CNS (*Seifert et al., 2006*). Zbog navedene velike raznovrsnosti uloga astrocitа, nije iznenađujuće što se u CNS mogu naći brojni podtipovi ovih ћелија. U poređenju sa drugim organizmima, ljudski CNS ima najveći broj ћелија glije odnosno najveću proporcionalnu zastupljenost glijalnih ћелија u odnosu na neurone (*Araque et al., 2001; Valverde & Lopez-Mascaraque, 1991*), kao i najveći broj njihovih podtipova (*Oberheim et al., 2006*). Kod akutnih povredа CNS javljaju se reaktivni astroцити koji u početku imaju zaštitnu ulogu ali, s druge strane, glijalni ožiljak koji se formira predstavlja prepreku izrastanju aksona. Prema tome, proliferacija astrocitа koja se često viđa u neurodegenerativnim bolestima može da ima zaštitnu ulogu, ali i da dovede do veoma štetnih efekata.

### **FIZIOLOŠKE FUNKCIJE ASTROCITA**

#### **Razvoj CNS i formiranje sinapsi**

Interakcija između astrocitа i neurona u razviću ima važu ulogu u rastu dendrita, formiranju funkcionalnih sinapsi i uklanjanju nefunkcionalnih sinapsi (*Hansson & Ronnback, 2003; Haydon, 2001; Schipke & Kettenmann, 2004; Slezak & Pfreiger, 2003*). Astroцити sintetišu i luče proteine vanćelijskog matriksа kao što su laminin-1, kolagen tipа IV, nidogen, fibronektin, vitronektin i tenascin C, kao i faktore koji pospešuju ili inhibiraju rast, da bi usmerili izduživanje aksona i napravili glijalne granice (*Garwood et al., 2001*). Glijalne granice koje se sastoje od nezrelih ћелија glije i proteina vanćelijskog matriksа dele nervni sistem u razvoju na funkcionalne odeljke (*Faissner & Steindler, 1995*). Izlučeni faktori kao što su holesterol (*Mauch et al., 2001*), TNF- $\alpha$  (*Beattie et al., 2002*) i trombospondini (*Christopherson et al., 2005*), važni su za razvoj sinapsi. Direktnа kontakt između astrocitа i nastavaka dendrita pospešuje morfolоško sazrevanje dendritskih

nastavaka, što vodi formiranju stabilnih i zrelih sinapsi (*Nishida & Okabe, 2007*). Milioni neurona formiraju milione sinapsi u CNS tokom razvića, a astrociti pomažu u otklanjanju neželjenih aksona i sinapsi mehanizmom koji uključuje indukciju fagocitoze od strane mikroglije ili makrofaga (*Gasque, 2004*).

### **Sinaptička homeostaza**

Astrocitna membrana ima mnogobrojne nastavke na čijim krajevima su strukture nalik prstima, koje obuhvataju sinapse, tela neurona ili snopove aksona (*Wolff, 1968*). Astrociti održavaju fiziološku ravnotežu u mikrodomenu sinapse tako što uklanjaju višak glutamata (glavnog ekscitatornog neurotransmitera),  $\gamma$ -aminobuterne kiseline (GABA, glavnog inhibitornog neurotransmitera), kao i višak jona  $K^+$  i  $H^+$ . Višak glutamata astrociti otklanjaju uz pomoć specifičnih transportera za glutamat od kojih je najviše eksprimiran EAAT2, dok je prisustvo njemu sličnog EAAT1 ograničeno na ćelije Bergmanove glije i astrocite cerebeluma. Preuzimanje glutamata i njegov ulazak u citosol astrocita praćen je ulaskom tri natrijumova jona i jednog protona uz izbacivanje jednog kalijumovog jona. Dakle, energija potrebna za transport glutamata kroz astrocitnu membranu generiše se kroz kretanje jona niz elektrohemijski gradijent. Nakon ulaska, glutamat se u astrocitima pretvara u glutamin, te se na taj način unutarćelijska koncentracija glutamata održava na fiziološkom nivou, a napravljeni glutamin se transportuje nazad u neurone gde će biti pretvoren u glutamat, koji neuroni transportuju u glutamatergičke vezikule i koriste u narednim signalizacijama. Pukotinaste veze su veoma brojne kod astrocita i povezuju ih međusobno, kao i sa oligodendrocitima i ependimskim ćelijama (*Nagy et al., 1992; Ransom & Kettenmann, 1990*). Pošto kroz pukotinaste veze mogu da prođu joni i manji molekuli, one su veoma važne za integraciju signala između ćelija koje povezuju, a omogućavaju astrocitima da materijal koji su preuzeli iz vanćelijske sredine mogu da deponuju na mesta udaljena od mesta preuzimanja, jer su preko astrocitnih stopala u kontaktu sa kapilarima mozga (*Rose & Ransom, 1997*). Svaki astrocit pokriva teritoriju u kojoj može da se nađe i nekoliko hiljada sinapsi, stvarajući tzv. sinaptička ostrva (*Halassa et al., 2007*).

### **Tripartitna sinapsa**

Na osnovu eksperimenata na akutnim presecima mozga i u *in vivo* uslovima, zaključeno je, da je uloga astrocита daleko veća od pretpostavljenog održavanja homeostaze na mestu sinapse. Ispostavilo se da su oni aktivni učesnici u signaliziranju i da igraju važnu ulogu u procesima učenja, formiranju memorije i reorganizacije sinapsi (sinaptičke plastičnosti). Astrociti zajedno sa presinaptičkim i postsinaptičkim neuronom formiraju tripartitnu sinapsu (Araque et al., 2001; Fields & Stevens-Graham, 2002; Vesce et al., 2001) jer oslobađanjem hemijskih transmitera kao što su glutamat, GABA, ATP i D-serin, modulišu sinaptičku transmisiju (Halassa et al., 2007; Parpura et al., 1994; Seifert et al., 2006). Pokazano je da glutamat koji oslobađaju astrociti (kao odgovor na povećanu unutarćelijsku koncentraciju kalcijuma) povećava frekvencije i ekscitatornih i inhibitornih postsinaptičkih struja (Parri et al., 2001), deluje na presinaptičke neurone preko mGluR (metabotropnih glutamatnih receptora), indukuje ulazak kalcijuma (Fiacco & McCarthy, 2004) i deluje na mGluR krvnih sudova mozga povezujući na taj način sinaptičku aktivnost sa lokalnim protokom krvi (Takano et al., 2006). Osim glutamata, astrociti mogu, kao odgovor na sinaptičku transmisiju, da oslobađaju i ATP koji inhibira oslobađanje glutamata iz okolnih završetaka presinaptičkih neurona, direktno ili indirektno preko svog metabolita adenozina, i na taj način umanjuje aktivnost ekscitatorne sinaptičke transmisije aktivirane sinapse i nekoliko susednih sinapsi (Zhang et al., 2003). O tipovima i sadržaju astrocitnih vezikula putem kojih se oslobađaju hemijski transmiteri se i dalje vode debate u naučnim krugovima. Zasad su identifikovane SLMV (*eng.* synaptic-like microvesicle) koje sadrže glutamat i D-serin (Bergersen et al., 2012), DCG (*eng.* dense-core granule) heterogenog sadržaja (Maienschein et al., 1999), a postoje izveštaji o egzocitotskom oslobađanju ATP-a iz lizozomskog odeljka (Jaiswal et al., 2007; Zhang et al., 2007).

### **Regulacija ekspresije subjedinica glutamatnog receptora kod neurona**

Glutamatni receptori se mogu podeliti na jonotropne i metabotropne. U jonotropne receptore spadaju NMDA, AMPA i kainatni receptori, pri čemu su AMPA receptori odgovorni za rutinsku ekscitatornu neurotransmisiju u CNS (Fellin et al., 2004). Svaki receptor za glutamat je izgrađen od nekoliko subjedinica, pri čemu u izgradnji AMPA

receptora učestvuju četiri tipa subjedinica (GluR1-4). U *in vitro* uslovima, astrociti regulišu ekspresiju neuronalnih AMPA subjedinica (Dugan *et al.*, 1995). Ova funkcija astrocita je vrlo značajna jer oni određuju količinu kalcijum-nepropustljive GluR2 subjedinice kod neurona, pa samim tim i osetljivost neurona na ekscitotoksičnost izazvanu glutamatom (Van Den Bosch *et al.*, 2006).

### **Krvno-moždana barijera i kontrola protoka krvi**

Krvno-moždanu barijeru ili hemato-encefalna barijeru (HEB) formiraju astrocitna stopala i endotelne ćelije koje okružuju mikrokapilare mozga. Smatra se da astrociti regulišu funkcije endotelnih ćelija kao što su: formiranje tesnih veza, lokalizacija specifičnih transportera i proizvodnja enzima uključenih u antioksidantne procese (Abbot *et al.*, 2006). Astrociti luče nekoliko angiogenih faktora (angiopoetin 1, GDNF i faktor transformacije rasta – TGF $\beta$ ) koji utiču na razvoj i funkciju moždane kapilarne mreže (Abbott *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2003). S druge strane, endotelne ćelije luče LIF (*eng.* leukemia inhibitory factor) koji utiče na diferencijaciju astrocita.

Astrocitna stopala imaju veliki broj mitohondrija i veliki broj membranskih proteina uključenih u aktivnu razmenu materija, među kojima ističemo akvaporin 4 (AQP4), glukozni transporter 1 (GLT-1) i kalijumov kanal tipa Kir4.1 (Morgello *et al.*, 1995; Yu & Ding, 1998). HEB je dinamička struktura, a faktori koji utiču na njeno remodelovanje su inflamatorni citokini, angiogene supstance, hipoksija, oksidativni stres i ekscitotoksičnost izazvana glutamatom (Drewes, 1998). U *in vivo* eksperimentima je pokazano da glutamat koji izluče neuroni deluje preko mGluR5 receptora na astrocitima što vodi povećanju unutarćelijskog kalcijuma koji utiče na oslobađanje metaboličkih produkata koji utiču na vazodilataciju kapilara (Takano *et al.*, 2006). Prema tome, astrociti su sposobni da prenesu informaciju o sinaptičkoj aktivnosti na lokalne kapilare, regulišući lokalni protok krvi, a verovatno i propustljivost HEB za nutritijente, u prvom redu glukozu (Leybaert, 2005).

## **IZMENJENE FUNKCIJE ASTROCITA U ALS**

### **Astrogljoza**

Astrogljoza je histopatološka karakteristika koja se javlja kako kod ALS bolesnika, tako i u animalnih modelima bolesti (videti odeljak Inflamacija). Ranije je smatrano da se astrogljoza javlja sekundarno, kao odgovor na gubitak motoneurona, međutim, sve brojniji dokazi o poremećenim funkcijama astrocita u ALS naglašavaju ulogu ovih ćelija u nastanku bolesti (*Van Den Bosch & Robberecht, 2008*). Postoje pokazatelji, usko spregnuti sa mehanizmima bolesti, o postojanju tri glavna uzroka pojave astrogljoze u ALSi to su starenje, oksidativni stres izazvan povećanom proizvodnjom azot oksida i peroksinitrita i oštećenje neurona (*Barbeito et al., 2004*).

### **Deficit neurotrofičkih faktora i lučenje štetnih materija**

Poremećena proizvodnja neurotrofičkih faktora smatra se direktnim ili indirektnim uzrokom gubitka motoneurona u ALS (*Ekestern, 2004*), pa smanjeno oslobađanje neurotrofičkih faktora od strane astrocita može da doprinese umiranju neurona. S druge strane, astrociti mogu da budu odgovorni za oslobađanje štetnih materija. Aktivirani astrociti u ćelijskoj kulturi proizvode faktor rasta neurona (*eng. nerve growth factor, NGF*) koji izaziva degeneraciju neurona (*Pehar et al., 2004*). U prisustvu niske koncentracije azot oksida, kondicionirani medijum aktiviranih astrocita, kao i ekstrakti kičmene moždine simptomatskih mutantnih SOD1 miševa mogu da izazovu apoptozu neurona u kulturi, najverovatnije preko aktivacije p75<sup>NTR</sup> receptora (*Pehar et al., 2004*). Drugi štetni faktor poreklom iz astrocita je oslobođena mutirana SOD1, koja može da pokrene aktivaciju mikroglije što finalno dovodi do smrti motoneurona. Pokazano je da hromogranini mogu da pospeše sekreciju mutirane SOD1 delujući kao proteini nalik šaperonima (*Urushitani et al., 2006*).

### **Problem otklanjanja glutamata iz sinaptičke pukotine**

O mehanizmima uklanjanja glutamata i mehanizmima koji dovode do ekscitotoksičnosti izazvane ovim neurotransmiterom bilo je reči ranije u tekstu. S obzirom da postoje sličnosti u disfunkcionalnom transportu glutamata i u drugim bolestima koje su praćene astrogliozom (*Honig et al., 2000; Lauderback et al., 2001*) može se pretpostaviti da je gubitak glutamatnog transportera u ALS možda posledica aktivacije astrocita. Postoje pokazatelji da ROS koje proizvode oštećeni motoneuroni izaziva oksidaciju i poremećaj preuzimanja glutamata od strane okolnih astrocita (*Rao et al., 2003*). ROS i lipidne peroksidaze mogu da oksiduju kritične sulfhidrilne grupe glutamatnog transportera i naj taj način inhibiraju preuzimanje glutamata (*Blanc et al., 1998; Volterra et al., 1994*). Slične efekte mogu da izazovu peroksinitrit i vodonik peroksid delujući na glutamatne transportere rekonstituisane u lipozomima (*Trotti et al., 1996*). S druge strane, inhibicija glutamatnog transportera oksidantima (vodonik peroksidom i drugim ROS) može da predstavlja adaptivni neuroprotektivni mehanizam jer sprečava oslobađanje glutamata posredovano reverznim radom transportera koji je favorizovan povećanom koncentracijom  $K^+$  u vanćelijskoj sredini (*Szatkowski et al., 1999*). Drugi mehanizam kojim astrociti mogu da doprinesu ekscitotoksičnom oštećenju motoneurona je aktivno oslobađanje glutamata, koje može da se desi pod uticajem prostaglandina E2 čija je sinteza katalizovana enzimom ciklooksigenazom 2 (COX2), eksprimiranom u reaktivnim astrocitima (*Drachman et al., 2002*).

### **Problem održavanja homeostaze $K^+$ jona**

Kod miševa sa mutiranjem SOD1 utvrđeno je progresivno smanjenje ekspresije Kir4.1 kalijumovih kanala, kao i gubitak  $\alpha$  subjedinice  $Na^+/K^+$  ATP-aze (*Neusch et al., 2007*) što govori o poremećaju u homeostazi  $K^+$  jona koji može da dovede do promena u potencijalu mirovanja membrane i izmenjenih transmembranskih gradijenata molekula koji se transportuju kroz membranu. Smanjenje ekspresije i funkcije Kir4.1 je opet karakteristika povreda mozga i neurodegenerativnih bolesti u kojima je astrogliozna izražena (*Olsen & Sontheimer, 2008*). U prilog mišljenju da je gubitak Kir4.1 sekundaran u odnosu na aktivaciju astrocita govori i nalaz da eksperimentalno izazvana proliferacija astrocita,



mehaničkom povredom kičmene moždine, utiče na smanjenje aktivnosti Kir4.1, a aktivnost je tri puta manja kod ćelija koje proliferišu (*MacFarlane & Sontheimer, 1997*). Predložen je zaključak da je svako oštećenje nervnog sistema koje izaziva astrogliozu asocirano sa gubitkom Kir4.1, da bi se dozvolila deoba ćelije (*Olsen & Sontheimer*). Međutim, Bataveljić i saradnici (2012) su nedavno predložili da ova promena aktivnosti Kir4.1 u sinergiji sa povećanom ekspresijom AQP4 može da bude u osnovi mehanizma promene propustljivosti HEB kao biomarkera ALS, pri čemu je nekoliko godina ranije izloženo mišljenje da narušena propustljivost HEB može da inicira i/ili doprinese progresiji mnogih neurodegenerativnih bolesti, pa i ALS (*Zlokovic, 2008*).

## HUMORALNA IMUNOST I ALS

### HUMORALNI IMUNSKI FAKTORI I ALS

Humoralni imunski odgovor, nasuprot ćelijskom, posredovan je faktorima koji su rastvoreni u telesnim tečnostima. Antitela po strukturi imunoglobulini (Ig) predstavljaju komponentu humoralnog stečenog imunskog odgovora, dok je sistem komplementa jedna od humoralnih komponenti urođenog imunskog odgovora. U prisustvu antigena različite prirode dolazi do aktivacije B limfocita. Aktivirani B limfociti povećavaju produkciju antitela specifičnih za dati antigen i u ovom procesu dolazi do izmene klasa i sazrevanja afiniteta antitela. Nепroteinski antigeni (polisaharidni i lipidni) mogu direktno da aktiviraju B ćelije, dok je u slučaju proteinskih antigena za aktivaciju B ćelija potrebno dejstvo CD4<sup>+</sup> pomoćnih T ćelija. Postoji nekoliko klasa Ig (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE) od kojih je u humanom serumu najzastupljeniji IgG (*Abbas et al., 2007*). Ig mogu da budu vezani za membranu B limfocita ili izlučeni. IgG učestvuje u opsonizaciji, aktivaciji sistema komplementa, ćelijskoj toksičnosti posredovanoj antitelima, neonatalnoj imunosti i inhibiciji B ćelija sistemom povratne sprege. IgM je antigenski receptor na naivnim B limfocitima, a može da učestvuje i u aktivaciji komplementa (*Abbas et al., 2007*).

Mnogi istraživači su ustanovili povećan nivo cirkulišućih imunskih kompleksa (CIK) kod ALS bolesnika (*Oldstone et al., 1976; Tachovsky et al., 1976; Bartfeld et al., 1982; Apostolski et al., 1991*). U studiji koja je pratila grupu ALS bolesnika u periodu od 6 meseci ustanovljeno je da su CIK povećani u početnim fazama bolesti, pri čemu u formiranju CIK velike molekulske mase učestvuje predominantno IgG, a u CIK male molekulske mase predominantan je IgM kod ALS bolesnika, za razliku od kontrola kod kojih su oba Ig podjednako učestvovala u formiranju svih CIK. Za razliku od početnih faza bolesti, 6 meseci nakon prvih analiza, kod iste grupe ALS bolesnika, sada sa nižim skorom bolesti, nivo CIK je bio niži u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike (*Saleh et al., 2009*). Što se tiče koncentracija samih Ig, podaci iz literature su različiti. Neki autori izveštavaju o povećanim nivoima IgG i normalnim nivoima IgM (*Apostolski et al., 1991; Provincialiet al., 1988; Duarte et al., 1991; Saleh et al., 2009*) sa promenama potklasa (*Westarp et al., 1994*) ili bez njih (*Willison et al., 1994*), dok drugi autori izveštavaju o nepromenjenim

nivoima IgG u ALS (*Bartfeld et al., 1982*) ili čak smanjenim (*Zhang et al., 2005*). Nekonzistentnost nalaza je najverovatnije posledica različitih stadijuma bolesti, s obzirom da se u dve studije daje naznaka o smanjenju količine IgG sa progresijom bolesti (*Zhang et al., 2005; Saleh et al., 2009*). Još uvek je nejasno da li je adaptivni imuni odgovor u ALS predominantno humoralni ili ćelijski, ali je utvrđena korelacija između progresije bolesti i aktivacije monocita/makrofaga (*Zhang et al., 2005*). Saleh i saradnici (2009) predlažu da se CIK velike molekulske mase brže odstranjuju zbog većeg broja aktiviranih fagocitnih ćelija sa progresijom bolesti, ali da CIK male molekulske mase mogu da se infiltriraju u druga tkiva i da se tamo deponuju. Ovi autori takođe postuliraju da bi CIK male molekulske mase mogli da ubrzaju oštećenje motoneurona nakon nagomilavanja u CNS.

#### **SPECIFIČNOST I EKSPERIMENTI SA IMUNOGLOBULINIMA G ALS PACIJENATA**

Pre više od 20 godina, utvrđeno je da miševi kojima je intraperitonealno injektovan prečišćen IgG ALS pacijenata (ALS IgG) imaju povećanu frekvenciju minijaturnih potencijala motorne ploče, bez promene amplitude, što znači da se povećalo spontano oslobađanje acetilholina iz nervnih završetaka (*Appel et al., 1991*). Osim toga, detektovani su IgG u motoneuronima i na motornim pločama ovih miševa. Dakle, ALS IgG su pasivnim transferom izazvali fiziološke abnormalnosti nervno-mišićne sinapse, a ovo je ukazalo na moguće postojanje imunski-posredovanih mehanizama u patogenezi ALS. Pasivni transfer ALS IgG u miševе izaziva degeneraciju motoneurona i povećanu proporciju organela koja sadrže kalcijum kod miša (*Pullen et al., 2004*). ALS IgG su uzročnici apoptotske ćelijske smrti u hibridnoj motoneuronskoj ćelijskoj liniji VSC4.1 (*Alexianu et al., 1994*) i humanim ćelijama neuroblastoma (*Yi et al., 2000*). U mešanoj primarnoj kulturi ćelija kičmene moždine pacova, ALS IgG aktiviraju kaspazu-3 i njene signalne puteve, što vodi selektivnoj apoptozi neurona. Pošto su astrociti u ovoj studiji bili daleko manje podložni apoptozi, autori su ostavili otvorenu mogućnost da je umiranje neurona sekundarni efekat izazvan uticajem ALS IgG na astrocite (*Demestre et al., 2005*). Nakon intraperitonealne inokulacije miševa sa ALS IgG, antitela su lokalizovana u predelu uz jedro motornih neurona ventralnih rogova kičmene moždine, u aksonskim zavšecima, kao i u vezikulama blizu plazma membrane Švanovih ćelija na motornoj ploči (*Engelhardt*

*et al., 2005*). Takođe, IgG su detektovani i u tkivu ALS pacijenata i to: u motoneuronima kičmene moždine (lokalizovani uz ER i miktotubule) i u MVE endotelnih ćelija ventralnih rogova kičmene moždine (*Engelhardt et al., 2005*). Ako se ALS IgG tretman primeni na glodare ili iz njih izolovane neuralne preparate, primećuje se povećanje unutarćelijske koncentracije kalcijuma, degenerativne strukturne promene u motoneuronima i sinaptička plastičnost nervno-mišićne sinapse (*Uchitel et al., 1988, Engelhardt et al., 1995; Fratantoni et al., 2000; Pullen & Humphreys, 2000, Pullen et al., 2004; Pagani et al., 2006*).

U serumu ALS pacijenata pronađena su antitela protiv gangliozida GM1, proteina neurofilamena, receptora faktora nekroze tumora (FAS/CD95) i voltažno zavisnih kalcijumovih kanala (*Smith et al., 1992, Drachman, 2000*). Elektrofiziološka snimanja voltažno-zavisnih kalcijumovih struja pokazala su da u prisustvu ALS IgG dolazi do njihovog povećanja u Purkinjeovim neuronima (*Llinas et al., 1993*), ali i do smanjenja u slučaju granularnih ćelija u kulturi (*Zhainazarov et al., 1994*). ALS IgG povećali su frekvenciju, ali ne i amplitudu spontanih minijaturnih glutamatergičkih struja piramidalnih neurona hipokampusa u kulturi, a ovaj efekat je delimično zavisio od prisustva kalcijuma u vanćelijskoj sredini (*Andjus et al., 1997*). Na istom sistemu ova grupa istraživača pokazala je da ALS IgG dovode do modulacije kalcijumskih tranzijenata (*Andjus et al., 1996*).

## CILJEVI

---

Astroцити су најбројније ћелије у мозгу сисара, задужене за одржавање хомеостазе енергетских метаболита, neurotransmitera i elektrolita. Aktivni su učesnici tripartitne sinapse jer lučenjem neurotransmiterskih molekula mogu da utiču na aktivnost sinapse. Dokumentovane su poremećene funkcije astrocита u ALS (astrogliozа, smanjeno lučenje neurotrofičkih faktora, lučenje тоksičnih materija, smanjeno uklanjanje glutamata i disfunkcija mehanizama koji formiraju i održavaju gradiјente jona kroz membranu). S druge strane, postoje broјni dokazi o efektima ALS IgG na različite populacije nervnih ćelija, koji navode na закljučак da se ova komponenta humoralnog imunskog odgovora razlikuje kod ALS bolesnika, a sposobna je da izmeni homeostazu kalcijumovih jona i sinaptičku aktivnost na nivou neuralnih i nervno-mišićnih sinapsi. Začudo, s obzirom da su astroцити izuzetno aktivni u sinapsama, do sada nije ispitan potencijalni uticaj ALS IgG na ove ćelije.

Može se reći da su promene u unutarćelijskoј koncentraciji kalcijuma pokretači mnogih signalnih puteva, između ostalog i egzocitoze neurotransmitera. S druge strane, ekscitabilnost astrocита nije zasnovana na aktivnosti voltažno zavisnih kanala (kao u slučaju neurona) već na promenama u provodljivosti kanala za kalcijum, koji su lokalizovani na plazma membrani ili membranama unutarćelijskih depoa ovog jona. Stoga je jedan od zadataka koji smo sebi postavili bio rasvetljavanje uticaja ALS IgG na promene unutarćelijske koncentracije kalcijuma i pronalaženje struktura (kanala i/ili enzima) koje su u ovom procesu aktivirane. Pored toga, pošto su lizozomi u poslednje vreme prepoznati kao sekretorne vezikule koje mogu da izluče ATP van ćelije, a značajan su deo sekretornog puta, odlučili smo se da ispitamo da li ALS IgG menjaju mobilnost i utiču na egzocitozu ovih struktura u astroцитима.

Eksperimentalni zadaci ove teze obuhvataju:

- karakterizaciju ALS IgG-izazvanih kalcijumskih tranzijenata
- definisanje struktura koje omogućavaju ALS IgG-izazvane kalcijumove tranzijente
- ispitivanje promena u mobilnosti lizozoma pod dejstvom ALS IgG
- ispitivanje uloge kalcijuma u ALS IgG-izazvanoj promeni mobilnosti lizozoma
- procena ALS IgG-izazvanog izlučivanja sadržaja (egzocitoze) lizozoma van ćelije

# MATERIJAL I METODE

---

## REAGENSI I RASTVORI

### REAGENSI

Za potrebe ovog rada korišćeni su sledeći reagensi: natrijum hlorid, dinatrijum fosfat, natrijum piruvat, kalijum hlorid, kalijum dihidrogen fosfat, kalcijum hlorid, magnezijum hlorid, glukoza, tripsin, etanol, etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), etilen glikol tetrasirćetna kiselina (EGTA), L-glutamin, poli-L-lizin (PLL), 4-(2-hidroksietil)-1-pipirazinetansulfonična kiselina (HEPES), dimetil sulfoksid (DMSO), albumin goveđeg seruma (BSA), tripan plavo, natrijum hidroksid, adenzin-3-fosfat (ATP), Fluo-3 AM, Fluo-4 AM, LysoTracker® Red DND-99 (Ly), lantan(III) hlorid, gadolinijum(III) hlorid, (-)-ksestospongina C (XeC), 2-aminoetoksifenilboran (2-APB), vortmanin (W), 1H-pirol-2-karboksilna kiselina (rianođin, Ry) i 1-[6-[[[(17 $\beta$ )-3-metoksiestra-1,3,5(10)-trien-17-il]amino]heksil]-1H-pirol-2,5-dion (U73122).

### RASTVORI

Za potrebe ovog rada korišćeni su sledeći osnovni rastvori: fiziološki rastvor bez dvovalentnih katjona sa fosfatnim puferom (PBS), veštački vanćelijski rastvor (ECS), veštački vanćelijski rastvor bez kalcijuma (ECS-Ca), fetalni teleći serum (FBS), tripsin-EDTA rastvor za odlepljivanje adherentnih ćelija, medijum za gajenje ćelija (DMEM), rastvor penicilina i streptomicina, medijum za izolaciju ćelija (Leibovitz L-15).

Fiziološki rastvor sa fosfatnim puferom (PBS) korišćen je za disekciju tkiva prilikom izolacije kortikalnih astrocita i kasnije tokom održavanja ćelijske kulture astrocita, kao i za rastvaranje drugih reagenasa. Ovaj rastvor pripreman je rastvaranjem 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> u 1000 ml dejonizovane vode.

Veštački vanćelijski rastvor (ECS) bio je sledećeg sastava: 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES i 10 mM glukoze. Veštački vanćelijski rastvor bez kalcijuma (ECS-Ca) imao je sve sastojke kao ECS osim 2 mM CaCl<sub>2</sub>, uz

dodatak 0.1 mM EGTA. Kiselost oba rastvora je podešavana na pH 7.2, a osmotski potencijal na  $290 \pm 5$  mOsm što je odgovaralo uslovima u medijumu za gajenje ćelija. Ovi ogleadni rastvori korišćeni su prilikom registrovanja unutarćelijske koncentracije kalcijuma, prilikom tretmana astrocita Fluo-3 AM i Fluo-4 AM obeleživačima, prilikom praćenja mobilnosti Ly obeleženih vezikula i za ispiranja ćelija na pokrovnim staklima.

Medijum za gajenje ćelija (DMEM+) pravljen je od osnovnog medijuma DMEM u koji je dodavano 2 mM L-glutamina, 100 IJ/ml penicilina, 100 µg/ml streptomicina, 1 mM natrijum piruvat i 10% FBS.

Medijum za izolaciju ćelija (L-15+) pravljen je od osnovnog medijuma Leibovitz L-15 u koji je dodavano 2 mM L-glutamina, 100 IJ/ml penicilina, 100 µg/ml streptomicina i 0.1% BSA.

Nepoželjno dejstvo komponenti sistema komplementa koje normalno ulaze u sastav fetalnog telećeg seruma bilo je sprečeno zagrevanjem rastvora na 56°C tokom 30 minuta.

Za odlepljivanje astrocita sa podloge pri presejavanju i zasejavanju na pokrovna stakla korišćen je rastvor tripsina koji je pripreman dodavanjem 250 mg ovog enzima i 20 mg EDTA u 100 ml PBS (0.25% tripsin, 0.02% EDTA). Ovako pripremljen rastvor tripsina je razlivan u manje zapremine i do upotrebe čuvan na -20°C.

Za brojanje ćelija korišćen je 0.4% rastvor tripan plavog u PBS koji je mešan u odnosu 1:1 sa ćelijskom suspenzijom. Za oblaganje pokrovnih stakala koje je prethodilo zasejavanju ćelija korišćen je poli-L-lizin (50 µg/ml) rastvoren u sterilnoj dejonizovanoj vodi.

Rastvor fluorescentnog obeleživača unutarćelijskog kalcijuma (Fluo-3 AM i Fluo-4 AM) pripreman je rastvaranjem boje u DMSO u koncentraciji 1 mM. Ovi rastvori su razliveni u manje zapremine i do upotrebe čuvani na -20°C. Za oglede je boja dodatno razblaživana 200 puta u radnom ECS ili ECS-Ca rastvoru.

Rastvor ATP pripreman je rastvaranjem supstance u koncentraciji 200 mM u dejonizovanoj vodi. Ovaj rastvor razlivan je u manje zapremine i do upotrebe čuvan na -20°C. Za oglede je rastvor dodatno razblaživan 20 puta u radnom ECS ili ECS-Ca rastvoru, neposredno pred stimulaciju astrocita.



Rastvor lantan(III) hlorida i gadolinijum(III) hlorida pripreman je rastvaranjem supstanci u koncentraciji 10 mM u dejonizovanoj vodi. Rastvori su razliveni u manje zapremine i do upotrebe čuvani na sobnoj temperaturi. Za oglede su rastvori razblaživani 1000 puta u radnom ECS ili ECS-Ca rastvoru.

Rastvor rianodina (Ry), inhibitora oslobađanja kalcijuma iz sarkoplazmatičnog retikuluma, pripreman je rastvaranje supstance u etanolu u koncentraciji 10 mM. Ovaj rastvor je razlivan u manje zapremine i do upotrebe čuvan na -20°C. Za oglede je supstanca dodatno razblaživana 500 puta u radnom ECS ili ECS-Ca rastvoru.

Rastvor (-)-ksestospongina C (XeC), potentnog i reverzibilnog inhibitora oslobađanja kalcijuma iz ER posredstvom IP<sub>3</sub>, pripreman je rastvaranjem supstance u DMSO u koncentraciji 2 mM. Ovaj rastvor je razlivan u manje zapremine i do upotrebe čuvan na -20°C. Za oglede je supstanca dodatno razblaživana 133.33 puta u radnom ECS ili ECS-Ca rastvoru.

Rastvor 2-aminoetoksidifenilborana (2-APB), antagonista IP<sub>3</sub> receptora na ER, pripreman je rastvaranje supstance u DMSO u koncentraciji 10 mM. Ovaj rastvor je razliven u manje zapremine i do upotrebe čuvan na -20°C. Za oglede je supstanca dodatno razblaživana 400 puta u radnom ECS ili ECS-Ca rastvoru.

Rastvor wortmanina (W), inhibitora fosfatidilinozitol-3-kinaze, pripreman je rastvaranjem supstance u DMSO u koncentraciji 10 mM. Ovaj rastvor je razliven u manje zapremine i do upotrebe čuvan na -20°C. Za oglede je supstanca dodatno razblaživana 1000 puta u radnom ECS ili ECS-Ca rastvoru.

Rastvor U73122, inhibitora fosfolipaze C, pripreman je rastvaranjem supstance u DMSO u koncentraciji 5 mM. Ovaj rastvor je razliven u manje zapremine i do upotrebe čuvan na -20°C. Za oglede je supstanca dodatno razblaživana 1000 puta u radnom ECS ili ECS-Ca rastvoru.

Rastvor fluorescentnog obeleživača kiselih vezikula LysoTracker® Red DND-99 (Ly) pripreman je rastvaranjem boje u DMSO u koncentraciji 40 µM. Ovaj rastvor je razlivan u manje zapremine i do upotrebe čuvan na -20°C. Za oglede je boja dodatno razblaživana 200 puta u DMEM+ medijumu.

## IZOLACIJA IMUNOGLOBULINA G IZ UZORAKA KRVI

Uzorci krvi su sakupljeni na Institutu za neurologiju Kliničkog centra Srbije od pacijenata sa klinički dijagnostifikovanim sALS prema El Escorial kriterijumu (*Brooks et al., 2000*) i od bolesnih (od čega bolesnih) i zdravih kontrolnih subjekata. Sakupljanje uzoraka krvi kao i korišćenje humanog materijala u izradi ove doktorske disertacije odobreno je od strane Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije. Serumi iz uzoraka krvi izolovani su u laboratoriji Instituta za neurologiju Kliničkog centra Srbije. Serumi 18 sALS pacijenata sa srednjim godištem  $59 \pm 2$  i 6 kontrolnih subjekata (dva zdrava, dva obolela od radikulopatije, jedan oboleo od mišićne distrofije i jedan oboleo od Parkinsonove bolesti) sa srednjim godištem  $48 \pm 6$  sakupljeni su za rutinska laboratorijska ispitivanja uz saglasnost pacijenata koji su bili informisani o studiji u skladu sa Etičkim kodom svetske zdravstvene organizacije (Helsinška deklaracija). Deo ovog materijala je zahvaljujući ljubaznosti dr Zorice Stević iskorišćen za izolaciju IgG koji su korišćeni u ovoj disertaciji. Izolacija IgG iz seruma pacijenata vršena je na Institutu za virusologiju, vakcine i serume, Torlak u Beogradu, ljubaznošću dr Ljiljane Dimitrijević i dr Vladimira Petrušića. Ukratko, nakon inaktivacije komplementa inkubacijom 30 minuta na  $56^{\circ}\text{C}$  i centrifugiranja 10 minuta na 9168 g, serumi su dva puta razblaživani u početnom puferu (1.5 M glicin sa 3 M NaCl). Izolacija IgG je vršena pomoću protein A kolone, a elucija je izvođena uz pomoć 0.1 M limunske kiseline (pH 3.5) pri čemu je pH uzorka odmah nakon elucije neutralisan uz pomoć 1 M tris pufera. Elucioni maksimum sadržao je samo IgG što je potvrđeno SDS elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. Prečišćeni uzorci su dijalizovani naspram PBS pomoću creva za dijalizu sa porama prečnika 2.5 nm. Koncentracija izolovanog IgG određivana je prema Bradfordovom metodu (*Bradford, 1976*). Ni u jednom od uzoraka nije detektovano prisustvo endotoksina.

## ĆELIJSKA KULTURA KORTIKALNIH ASTROCITA

Ćelijske kulture za potrebe ovog rada gajene su pod uobičajenim uslovima u inkubatoru sa vlažnom atmosferom uz udeo ugljen dioksida od 5% i pri temperaturi od 37°C. Svi sterilni plastični sudovi za uzgajanje i rad sa kulturama bili su marke Sarstedt.

U ovom radu korišćeni su pacovi soja *Wistar* koji su uzgajani u Vivarijumu Instituta za fiziologiju i biohemiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i Vivarijumu Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Ljubljani. Životinjama su hrana i voda bile stalno dostupne. Održavane su pod dvanaestočasovnim dnevno noćnim ritmom na sobnoj temperaturi. Postupak žrtvovanja pacova i izolovanja nervnog tkiva za kulture odobren je od strane Etičkog komiteta Biološkog fakulteta.

### IZOLACIJA PRIMARNIH KORTIKALNIH ASTROCITA IZ MOZGA PACOVA

Kulture primarnih astrocita izolovane su iz cerebralnog korteksa novoređenih pacova starih dva dana. Pri ovom uzrastu moguće je razlikovanje mladunaca koji se dobro razvijaju i dobro ishranjuju sisanjem od onih koji zaostaju u rastu i razvoju.

Astrociti predstavljaju osnovni konfluentni sloj mešovite primarne kulture nervnog tkiva. Na takvoj podlozi astrocita rastu mikroglija i oligodendroglija. Razlikovanje ovih ćelija od astrocita je moguće prema morfologiji i nejednakoj optičkoj gustini prilikom mikroskopiranja uz upotrebu faznog kontrasta. Astrociti rastu neuređeno i slabo su kontrastni, dok se oligodendrociti odlikuju sferičnim telom sa izraženijim kontrastom u odnosu na podlogu i sa većim brojem granatih nastavaka koji dosežu do nastavaka susednih oligodendrocita. Mikroglija je tamna, okruglasta i sa svetlim prstenom oko tela ćelija, najčešće vrlo slabo zakačena za sloj astrocita koji se nalazi na dnu suda. Zapaženo je da neuroni ne preživljavaju u kulturama koje su dobijane iz životinja starih dva i više dana (*McCarthy & de Vellis, 1980*).

Alat za disekciju je pripreman neposredno pred početak izolacije tako što su instrumenti nakon natapanja u 70% etanolu izlagani dejstvu ultra-ljubičastih zraka unutar laminarne komore u trajanju od najmanje 30 minuta. Kao fiziološki rastvor za disekciju korišćen je hladan PBS, a ćelije su potom prebacivane u L-15+ medijum.

Izolacija je vršena prema modifikovanom protokolu iz ranije objavljenih metoda (McCarthy & de Vellis, 1980; Schwartz & Wilson, 1992). Glava i vrat mladunaca kvašeni su 70% etanolom, a zatim je glava odsecana makazama i spuštana u plitki sud sa hladnim PBS. Glava je potom prebacivana u novi sud sa čistim rastvorom u kome je izolovan mozak. Mozak je zatim prebacivan u naredni sud u kome su izdvajane hemisfere mozga. Hemisfere mozga su zatim prebecivane u naredni sud sa čistim rastvorom gde se pod binokularnom lupom prvo vršilo otklanjanje hipokampusa a zatim temeljno čišćenje hemisfera od moždanih ovojnica. Ovako očišćeni korteksi prebacivani su u sud sa čistim rastvorom i tkivo je prenošeno u laminarnu komoru za sterilni rad.

Pod sterilnim uslovima, hemisfere su prvo nekoliko puta ispirane PBS, a onda prebacivane u 15 ml epruvetu u kojoj je bilo 3 ml hladnog L-15+ medijuma. Disociranje moždanog tkiva vršeno je mehanički pipetom sa plastičnim nastavkom od 1000  $\mu$ l. Čelijska suspenzija je zatim centrifugirana 4 minuta na 500 g. Nakon centrifugiranja odlivan je supernatant i ćelije su resuspendovane u 5 ml L-15+ medijuma. Nakon mešanja pipetom sa nastavkom od 1000  $\mu$ l, ćelijska suspenzija je opet centrifugirana 4 minuta na 500 g. Nakon centrifugiranja odlivan je supernatant i ćelije su resuspendovane u 2 ml L-15+ i prebačene u tubicu od 2 ml. Usledilo je provlačenje suspenzije ćelija kroz sterilne igle, po 3 puta, prvo kroz 21G iglu, a zatim kroz 23G iglu. Sadržaj šprica nakon poslednjeg provlačenja kroz 23G iglu prebacivan je u 15 ml epruveru, dodavano je 3 ml L-15+ medijuma do finalnih 5 ml i ćelijska suspenzija je finalno centrifugirana 4 minuta na 500 g. Nakon poslednjeg centrifugiranja, odliven je supernatant i ćelije su resuspendovane u 2 ml DMEM+ medijuma. Ovakva suspenzija ćelija je dodavana u već postojećih 3 ml DMEM+ medijuma u plastičnim flaskovima zapremine 50 ml (površine 25 cm<sup>2</sup>) koji su za vreme izolacije bili u inkubatoru.

Medijum je prvi put menjan posle 4 dana, a potom na svaka 2 dana. Posle 7-9 dana kultura je postizala konfluentan rast. Tada je iz flaskova aspiriran stari medijum i dodavan DMEM+ sa 25 mM HEPES, i flaskovi su ostavljeni 2 sata u inkubatoru. Nakon isteka 2 sata flaskovi su polagani na orbitalnu mešalicu gde su ostajali sledećih 16 sati pri brzini od 250-300 obrtaja po minuti. Postupak menjanja medijuma, DMEM+ sa 25 mM HEPES,

aklimatizacije u inkubatoru u trajanju od 2 sata i trešenje na orbitalnoj mešalici ponavljano je još 2 puta. Na ovaj način su odlepljivane ćelije mikroglije i oligodendroglije sa tepiha astrocita. Nakon poslednjeg trešenja, ćelije su ispirane 5 puta u zagrejanom PBS a zatim rasejavane u nove flaskove u odnosima 1:4 ili 1:5 za dalje korišćenje.

### **RASEJAVANJE ASTROCITA**

Pri rasejavanjima u flaskove ili zasejavanjima na pokrovna stakla prethodno obložena PLL, ćelije su iz flaskova odlepljivane rastvorom tripsina (1 ml) u trajanju od 3-5 minuta na 37°C. Nakon odlepljivanja u flask je dodavano 4 ml zagrejanog (37°C) DMEM+ da bi se inaktivisao tripsin. Sadržaj flaska je prebacivan u 15 ml epruvete. Ćelije su potom centrifugirane 5 minuta na 500 g. Nakon centrifugiranja odlivan je supernatant i ćelije su resuspendovane u 2 ml zagrejanog DMEM+. Suspenzija ćelija je zatim prebačena u 2 ml tubice i provlačena 3 puta kroz sterilne igle, prvo 21G, a zatim 23G. Potom se pristupalo brojanju ćelija, a zatim je oko  $1.5 \times 10^4$  ćelija/cm<sup>2</sup> zasejavano na 22 mm i 25 mm PLL-prevučena pokrovna stakla.

U zavisnosti od veličine pokrovnih stakala, na stakla je stavljano po 100 µl ćelijske suspenzije u koja je sadržala oko 60 000 (za 22 mm stakla) ili oko 75 000 ćelija (za 25 mm stakla). Petri šolje prečnika 35 mm sa staklima su potom prebacivane u inkubator na 15-20 minuta, period koji je dovoljan da se astrociti zalepe za površinu pokrovnog stakla. Potom je u svaku petri šolju dodavano po 2 ml DMEM+ van površine stakla, tako da se dodavan DMEM+ spoji sa suspenzijom astrocita na staklu. Ovako zasejavanim astrocitima na staklima bilo je potrebno do 2 dana da porastu, a zatim su od drugog do četvrtog dana korišćeni u eksperimentima sa fluorescentnim obeleživačem unutarćelijskog kalcijuma i u eksperimentima sa obeleživačem kiselih vezikula.

### **BROJANJE ĆELIJA**

Za utvrđivanje broja ćelija bilo je neophodno razblažiti ćelijsku suspenziju 2 puta, da bi konačno razblaženje nakon dodavanja tripan plavog bilo 4 puta. Od ovako dobijene ćelijske suspenzije nakapavano je po 10 µl na svaki od dva ležišta komorice za brojanje. Ćelije su prebrojavane u četiri dijagonalna polja, a broj živih ćelija određivan je po formuli

(1). Uobičajen broj živih ćelija koji je utvrđivan posle ovog koraka bio je 2-5 miliona ćelija po flasku.

$$(1) \quad n = \frac{\sum_{i=1}^4 (x_i)}{4} \times 4 \times 10^4 = \sum_{i=1}^4 (x_i) \times 10^4,$$

gde je  $n$  broj živih ćelija po ml i  $x_i$  broj živih ćelija po polju.

### **OBLAGANJE POKROVNIH STAKALA POLI-L-LIZINOM**

Pokrovna mikroskopska stakla prečnika 22 mm i 25 mm su potapana u 70% etanol u trajanju od 20 minuta. Sledilo je ispiranje stakala u dejonizovanoj vodi, dva puta, nakon čega su stakla potapana u rastvor poli-L-lizina (50 µg/ml) u trajanju od 20 minuta. Stakla su potom ispirana 2 puta u dejonizovanoj vodi i položena nakoso na ivice 35 mm plastičnih petri šolja radi sušenja. Svi koraci su obavljani u sterilnoj laminarnoj komori i svi rastvori korišćeni u ovom procesu su prethodno bili sterilisani provlačenjem kroz filtere sa porama od 22 µm. Nakon sušenja, stakla su sa ivice padala na dno 35 mm petri šolja, koje su zatvarane, zamotavane u parafilm i ovako čuvane na 4°C do zasejavanja ćelija.

## ODREĐIVANJE PROMENA UNUTARĆELIJSKOG KALCIJUMA NAKON IGG TRETMANA POMOĆU FULOESCENTNOG OBELEŽIVAČA KALCIJUMA

### KARAKTERISTIKE FLUO-3 I FLUO-4 FLUORESCENTNIH OBELEŽIVAČA KALCIJUMA

Fluorescentni obeleživači kalcijuma u formi acetoksimetil estara, Fluo-3 AM i Fluo-4 AM, su jedinjenja nalik fluorescinu koja po vezivanju unutarćelijskog slobodnog kalcijuma povećavaju intenzitet fluorescencije. Acetoksimetil estarske (AM) forme boja su vrlo zgodne za bojenje ćelija jer im AM omogućava da prođu kroz membranu ćelije, nakon čega ćelijske esteraze odsecaju ovaj deo fluorescentnog obeleživača, što onemogućava izlaženje boje iz ćelije. Bojenje ćelija AM formama je vrlo efikasno, jer upotrebom koncentracija 1-5  $\mu\text{M}$  u rastvoru za bojenje postiže se koncentrovanje boje unutar ćelije sa koncentracijama  $> 100 \mu\text{M}$  (*Paredes et al., 2008*). Još jedna od prednosti AM kalcijumovih indikatora je da mogu da obeleže i organele ćelija. Fluo-3 i Fluo-4 su kalcijumovi indikatori visokog afiniteta sa jednom talasnom dužinom i lako se pobuđuju argonskim laserom talasne dužine 488 nm. Fluo-3 maksimalno apsorbuje na 506 nm, ima maksimum emisije na 526 nm i konstantu disocijacije  $\sim 390 \text{ nM}$ , što može da predstavlja problem za detektovanje kalcijuma u uslovima mirovanja ( $\sim 100 \text{ nM}$ ). U uslovima mirovanja ćelije, kada je koncentracija slobodnog unutarćelijskog kalcijuma mala, Fluo-3 bez vezanog kalcijuma ima vrlo slabu fluorescenciju, međutim, fluorescencija boje kad veže kalcijum može da se poveća i više od 100 puta. Fluo-4 je fotostabilniji derivat Fluo-3. Ima nešto niži afinitet vezivanja kalcijuma sa konstantom disocijacije  $\sim 345$  (niža vrednost konstante daje veći afinitet) nM što znači da je svetliji pri manjoj koncentraciji boje i manje fototoksičan. Njegov maksimum apsorpcije je 494 nm, pa s obzirom da je bliži talasnoj dužini argonskog lasera, samim tim je i pogodniji od Fluo-3 pri pobuđivanju ovim laserom. Maksimum emisije Fluo-4 je na 516 nm.

## **UVOĐENJE FLUORESCENTNIH KALCIJUMOVIH INDIKATORA U ĆELIJU I REGISTROVANJE**

### **INTENZITETA BOJE**

Kao što je gore pomenuto, AM forme boja mogu da prođu kroz ćelijsku membranu, pa i membrane organela, i koncentruju se unutar ćelija dejstvom ćelijskih esteraza koje otklanjaju AM grupi čime boja ostaje zarobljena u ćeliji. Merenje koncentracije unutarćelijskog kalcijuma pre i nakon tretmana ALS IgG i ATP rađeno je na astrocitima 2-4 dana nakon zasejavanja na pokrovna stakla. Medijum za gajenje je ispiran i zamenjivan zagrejanim radnim ECS ili ECS-Ca rastvorom sa 5  $\mu$ M koncentracijom Fluo-3 ili Fluo-4. Bojenje je trajalo 45 min u slučaju Fluo-3 i 30 minuta u slučaju Fluo-4, u mraku na sobnoj temperaturi. Ćelije su zatim ispirane 3 puta u odgovarajućem radnom rastvoru, a nakon poslednjeg ispiranja su ostavljane u mraku na sobnoj temperaturi dodatnih 15 minuta, radi potpune deesterifikacije boje. Snimanje se odigravalo na invertovanom konfokalnom mikroskopu LSM 510, korišćen je vazdušni objektiv 20 $\times$ /NA 0.75 (ogledi rađeni u Ljubljani) ili na uspravnom LSM 510 konfokalnom mikroskopu pri čemu je korišćen vodeni objektiv 40 $\times$ /NA 0.8 (ogledi rađeni u Beogradu). Boja je pobuđivana argonskim laserom sa talasnom dužinom 488 nm, a emisiona svetlost je usmeravana na detektor nakon prolaska kroz širokopojasni LP 505 nm filter za zelenu emisiju. Vremenske serije snimane su alatom Time Series programskog paketa LSM frekvencijom  $\sim$ 1 Hz u trajanju 11-13 minuta. Bazalni nivo fluorescencije je registrovan 1-3 minuta nakon čega je usledilo dodavanje IgG do finalne koncentracije 100  $\mu$ g/ml, a 7-8 minuta nakon IgG dodavanja, u prisustvu IgG ćelije su stimulisane 1 mM ATP i snimanje nastavljeno još 2 minuta. Nakon završenog snimanja, obeležavani su regioni interesa (ROI) nepravilnom krivudavom linijom koja je okruživala pojedinačnu ćeliju u kadru i vrednosti usrednjenog intenziteta svakog od ROI čuvani su u tekstualnim datotekama.



## **KORIŠĆENJE FARMAKOLOŠKIH SUPSTANCI U CILJU BLOKIRANJA SPECIFIČNIH**

### **RECEPTORA I KANALA ASTROCITA**

Ekscitabilnost astrocita nije zasnovana na aktivaciji voltažno zavisnih kanala, kao što je to slučaj kod neurona, već počiva na aktivaciji signalnih puteva koji potiču od ligand zavisnih receptora, a mobilišu kalcijum iz unutarćelijskih depoa (*Volterra & Meldolesi, 2005*). Iako astrociti mogu da reaguju na neurotransmitterske supstance (kao što su glutamat i ATP) otvaranjem jonotropnih kanala, odgovori astrocita na neurotransmitere opstaju i u uslovima bez vanćelijskog kalcijuma, pa je najznačajnija struktura koja je odgovorna za ekscitabilnost astrocita zapravo ER (*Verkhratsky et al., 2012*). Astrociti ekspimiraju dve vrste receptora na ER koji mogu da propuste kalcijumove jone u citoplazmu: Ry receptor tipa 3 (*Matyash et al., 2002*) i IP<sub>3</sub> receptor tipa 2 (*Holtzclaw et al., 2002; Petravicz et al., 2008; Sheppard et al., 1997*).

U cilju blokiranja izlaska kalcijuma iz depoa koje je posredovano gore pomenutim receptorima, korišćeni su sledeći farmakološki agensi:

- Rianodin (Ry) je potentan inhibitor oslobađanja kalcijuma putem Ry receptora, koji zatvara kanal na ER kada se koristi u koncentracijama većim od 1 μM (*Sutko et al., 1997*). Stoga je Ry u ogleđima bio korišćen u koncentraciji 20 μM, 20 minuta, rastvoren u ECS-Ca.
- (-)-ksestospongin C (XeC) je veoma potentan permeabilni inhibitor oslobađanja kalcijuma kroz IP<sub>3</sub> receptor, koji u koncentracijama 10-20 μM (*Gafni et al., 1997*) sprečava oslobađanje kalcijuma iz ER indukovano povećanjem koncentracije IP<sub>3</sub>. Stoga je XeC u ogleđima bio korišćen u koncentraciji 15 μM, 20 minuta, rastvoren u ECS-Ca
- 2-aminoetoksidifenilboran (2-APB) je permeabilni antagonist IP<sub>3</sub> receptora, koji u koncentracijama 20-30 μM sprečava izlazak kalcijuma kroz IP<sub>3</sub> receptore ER (*Pagani et al., 2006; Maruyama et al., 1997*). Stoga je 2-APB bio korišćen u koncentraciji 25 μM, 20 minuta, rastvoren u ECS-Ca.

Fosfolipaza C (PLC) je solubilni protein koji je delom lociran u citoplazmi a delom asociran sa plazma membranom. Postoji više potklasa ovog enzima, pri čemu potklasu β

aktiviraju receptori kuplovani sa G proteinima, dok ostale potklase aktivira receptor tirozin kinaza (RTK). Aktivirana PLC se translocira ka membrani gde hidrolizuje fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat (PIP<sub>2</sub>) na sekundarne glasnike 1,2-diacil glicerol (DAG) i IP<sub>3</sub>, pa samim tim značajno utiče na stanje permeabilnosti IP<sub>3</sub> receptora na ER. Fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K) je enzim koji fosforiliše inozitolne lipide plazma membrane i generiše PIP<sub>2</sub> i fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (PIP<sub>3</sub>). Svojim delovanjem i produkcijom PIP<sub>3</sub>, PI3K može s jedne strane da utiče na translokaciju PLC u plazma membranu (*Falasca et al., 1998; Piccolo et al., 2002; Razzini et al., 2000*), a s druge strane na permeabilnost TRPC kanala (*Tseng et al., 2004*).

Poznato je da astrociti na membrani ćelije imaju kanale koji se aktiviraju pražnjenjem unutarćelijskih depoa (*Putney, 2005*). Ovaj proces ulaska kalcijuma je nazvan kapacitativni ulazak kalcijuma (*eng. capacitative calcium entry, CCE*), a kanali koji se tim procesom aktiviraju su kanali kontrolisani depoima (*eng. store operated channels, SOC*). SOC koji su zaduženi za CCE u astrocitima su TRP (*eng. transient receptor potential*) kanali (*Verkhatsky et al., 2012*) koji učestvuju u “oblikovanju” kalcijumovih signala u astroglialnim ćelijama (*Golovina, 2005; Grimaldi et al., 2003; Pizzo et al., 2001*).

U cilju blokiranja plazma membranskih kanala i asociranih enzima koji mogu da posreduju ulasku kalcijuma u ćeliju ili utiču na koncentracije sekundarnih glasnika koji mobilišu kalcijum iz depoa, korišćeni su sledeći farmakološki agensi:

- U73122 je inhibitor PLC u koncentraciji 5 μM (*Centemeri et al., 1997*) te je bio korišćen u pomenutoj koncentraciji, 20 minuta, rastvoren u ECS.
- Vortmanin (W) je blokator PI3K (*Tokuoka & Goda, 2006*). Stoga je bio korišćen u koncentraciji 10 μM, 20 minuta, rastvoren u ECS.
- La(III) hlorid i Gd(III) hlorid kao jedinjenja koja daju trovalentne katjone (La<sup>3+</sup> i Gd<sup>3+</sup>) za koje se zna da inhibiraju ulazak kalcijuma kroz SOC (*Hoth & Penner, 1993; Kerschbaum & Cahalan, 1999*). Stoga su ova jedinjenja bila korišćena u cilju blokiranja CCE u koncentracijama 10 μM za oba, 20 minuta, rastvorena u ECS.
- 2-APB, osim što je antagonist IP<sub>3</sub> receptora (kao što je gore pomenuto), može da inhibira ulazak kalcijuma SOC u koncentraciji od 75 μM (*Ma et al., 2003*). Stoga je

u cilju blokiranja SOC korišćen u pomenutoj koncentraciji, 20 minuta, rastvoren u ECS.

Svi farmakološki agensi su pojedinačno ili u kombinacijama rastvarani u radnom ECS ili ECS-Ca rastvoru. Korak tretmana blokatorima koji je trajao 20 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, uveden je odmah nakon ispiranja fluorescentnog kalcijumovog indikatora. Na taj način su ćelije u isto vreme kad se dešavala finalna deesterifikacija boje (20 minuta nakon ispiranja) bile izložene specifičnim blokatorima. Procedura registracije odgovora na ALS IgG i ATP bila je iste dinamike kao i bez blokatora, a rastvor u kome su bile ćelije za vreme registracije imao je iste koncentracije blokatora kao i pri tretmanu ovim farmakološkim agensima.

### **OBRADA PODATAKA**

Fluorescentni kalcijumovi indikatori Fluo-3 i Fluo-4 su boje koje se pobuđuju jednom talasnom dužinom, a intenzitet boje se menja u zavisnosti od količine dostupnog kalcijuma u citosolu koji može da se veže za molekule boje. Stoga informacija koju daje promena intenziteta ovih kalcijumovih indikatora predstavlja relativnu promenu koncentracije unutarćelijskog kalcijuma. Ova relativna promena se računa po formuli (2)

$$(2) \quad I_t = \frac{\Delta F}{F_0} = \frac{F_t - F_0}{F_0},$$

gde je  $I_t$  funkcija relativnog intenziteta u vremenu, koja reflektuje stepen promene unutarćelijskog kalcijuma, često izražavana u procentima,  $F_0$  je bazalni intenzitet fluorescencije boje (u uslovima mirovanja), a  $F_t$  je intenzitet fluorescencije boje u datom vremenu  $t$ . Intenzitet fluorescencije indikatora se postepeno smanjivao sa vremenom, bez obzira na promene izazvane tretmanima, usled izbeljivanja fluorescentne boje pod dejstvom lasera. Ovo izbeljivanje je nekada bilo neznatno, ali u nekim slučajevima značajno i oblika silazne eksponencijale. Stoga su zapisi (ROI u tekstualnim datotekama) za svaku ćeliju prvo bili korigovani u odnosu na stepen izbeljivanja boje u svakom pojedinačnom slučaju, a zatim se računala relativna promena koncentracije kalcijuma. Za ovu svrhu je napisana interaktivna programska rutina u MATLAB-u, koja je prvo na osnovu zadatih tačaka korigovala bazalnu liniju intenziteta fluorescencije, a onda iz korigovanog zapisa računala

relativan intenzitet fluorescencije po formuli (2), za svaku vremensku tačku pojedinačnog zapisa. Promena normalizovanog intenziteta fluorescencije koja se smatrala odgovorom ćelije bila je svaka promena veća od spontanih promena bazne linije, što je u većini slučajeva značilo promenu >10%. Zatim su se na korigovanom zapisu ručno obeležavali početak ( $s$ ) i kraj odgovora ( $e$ ), a programska rutina je na osnovu ova dva zadata vremenska parametra računala i čuvala vrednosti maksimuma funkcije  $I_t$  u delu između  $I_s$  i  $I_e$ , vreme pojave maksimuma ( $t$  koje odgovara  $I_{max}$  u datom segmentu) i vremenski integral datog segmenta odnosno površinu ispod krive datog segmenta po obrascu:

$$SIgG = \sum_{i=s}^e (I_i \times \Delta t)$$

Ukoliko je ALS IgG izazvao više talasa, jedan za drugim,  $SIgG$  za dati ROI je bio suma svih pojedinačnih površina.

Značajnosti razlika između upoređivanih parametara određivane su dvostranim Studentovim  $t$ -testom. Vrednosti  $p < 0.05$  su smatrane statistički značajnim.

## **PRAĆENJE MOBILNOSTI ENDOZOMA/LIZOZOMA NAKON IGG TRETMANA POMOĆU OBELEŽIVAČA KISELIH VEZIKULA**

### **KARAKTERISTIKE BOJE LYSOTRACKER RED DND-99**

Boja Lysotracker red DND-99 (Ly) sastoji se od fluorofore vezane za slabu bazu koja je samo parcijalno protonovana na neutralnom pH. Ly može da prođe kroz plazma membranu i membrane organela i obično se koncentriše u sferičnim organelama. Mehanizam kojim se boja zadržava u organelama nije još u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da se pri ulasku boje u kiselu vezikulu boja protonizuje što sprečava njenu difuziju van vezikule. Ly je fluorescentna acidotropna boja koja se koristi za obeležavanje i praćenje kiselih organela u živim ćelijama (*Griffiths et al., 1988*). Veoma je selektivna za kisele vezikule i vrlo efikasno obeležava žive ćelije u nanomolarnim koncentracijama. Maksimum apsorpcije Ly je na 577 nm, te je stoga boju moguće pobuditi helijum neonskim laserom na 543 nm, dok je maksimum emisije na 590 nm.

### **OBELEŽAVANE KISELIH VEZIKULA ASTROCITA BOJOM LY I REGISTRACIJA VREMENSKIH SERIJA**

Registrowanje kiselih vezikula astrocita je rađeno 2-4 dana nakon zasejavanja. Medijum je aspiriran i zamenjivan DMEM+ sa Ly pri čemu je finalna koncentracija boje bila 200 nM. Astrociti su inkubirani u medijumu sa bojom 5 minuta na 37°C, nakon čega su ispirani u zagrejanom radnom ECS ili ECS-Ca. Nakon 10 minuta aklimatizacije na sobnu temperaturu, pokrovna stakla sa obojenim astrocitima su smeštana u komoricu za registrowanje sa radnim ECS ili ECS-Ca rastvorom. Snimanje je izvođeno na invertovanom konfokalnom mikroskopu LSM 510 pri čemu je korišćen uljani objektiv 63×/NA 1.4. Boja je pobuđivana helijum neonskim laserom sa talasnom dužinom 543 nm, a emisiona svetlost je usmeravana na detektor nakon prolaska kroz širokopojasni LP 560 nm filter za crvenu emisiju. Vremenske serije snimane su alatom Time Series programskog paketa LSM frekvencijom ~2 Hz u trajanju 2-4 minuta. Prvo je snimana vremenska serija spontanog kretanja vezikula u trajanju od 2 minuta. Zatim su astrociti tretirani dodavanjem IgG

(kontrolnih ili ALS) ili ATP tako da finalna koncentracija u komorici bude 100  $\mu\text{g/ml}$  (za IgG) ili 1 mM (za ATP) i snimana je vremenska serija u trajanju od 4 minuta.

### **PRAĆENJE MOBILNOSTI VEZIKULA I ANALIZA PODATAKA**

Vremenske serije snimljene konfokalnim mikroskopom su prvo bile konvertovane u slike tipa TIFF u LSM programskom paketu. Određivanje koordinata svake vezikule u vremenu je rađeno pomoću ParticleTR softvera koji je dizajnirala firma Celica (Ljubljana, Slovenija). Na prvom kadru vremenske serije obeležavana je vezikula od interesa i biran parametar prečnika polja oko zadate koordinate u kome program traži maksimum dvodimenzionalne Gausove krive u narednom kadru. Iteracija se automatski ponavlja sve do poslednjeg kadra u vremenskoj seriji ukoliko se ručno ne prekine. Parametar prečnika polja je obično bio 6 piksela i ovo je bila optimalna vrednost polja u kome su se nalazile vezikule u narednim kadrovima, a optimalan i za brži rad programa. U slučajevima kada su vezikule bile brže, ovaj parametar se povećavao do 13 piksela, što je značajno usporavalo rad programa. Vezikula je vizuelno praćena u svakom kadru, a rad programa je prekidano u slučajevima neuspešnog detektovanja vezikule u nekom od kadrova vremenske serije, kada se ručno određivao položaj vezikule i datom i nekoliko narednih kadrova, nakon čega je program nastavljao sa automatskim radom. Nakon detekcije koordinata jedne vezikule, ručno je program vraćan na početak vremenske serije i birala se druga vezikula za praćenje. U svakoj od vremenskih serija detektovane su koordinate oko 50 vezikula. Nakon završenog detektovanja koordinata vezikula, vrednosti u pikselima su se konvertovale u mikrometre u skladu sa podešavanjima snimanja (konverzioni faktor je iznosio 0.07  $\mu\text{m}$  za jedan piksel, što je bilo u skladu sa rezolucijom snimanja, 512x512, korišćenim objektivom, 63x, i softverskim uveličanjem kadra snimanja, 4x).

Ovako određene koordinate vezikula su se učitavale u posebno napisanu programsku rutinu u MATLAB-u koja je delila ukupno vreme snimanja (2 ili 4 minuta) na epohe po 15 sekundi, u kojima je računala dužinu pređene putanje (*eng.* track length, TL) i maksimalni pomeraj (*eng.* maximal displacement, MD). TL predstavlja sumu rastojanja između dve sukcesivne tačke, dok je MD maksimalno rastojanje između bilo koje dve tačke u datom potskupu koordinata. Poređeni su nizovi vrednosti oba parametra za svaku ćeliju

pojedinačno (srednja vrednost  $\pm$  standardna greška) u uslovima spontane i izazvane mobilnosti tretmanom IgG ili ATP u dvominutnim intervalima (8 epoha po 15 s), kao i za sve ćelije zajedno. Statistička značajnost razlika je utvrđivana dvostranim Studentovim *t*-testom. Grafičko predstavljanje parametara mobilnosti je rađeno u formi distribucije raspodele frekvencija parametara TL i MD (pri čemu su vrednosti parametara smeštani u rastuće intervale od 0.25  $\mu$ m (TL) i 0.2  $\mu$ m (MD)) i kumulativnih frekvencija.

Zarad procene egzocitotskog oslobađanja sadržaja Ly obeleženih vezikula korišćen je softverski paket ParticleCo (Celica, Ljubljana, Slovenija). Vezikule su ručno obeležavane na kadrovima od interesa, a program je računao njihov broj. Kadrovi od interesa su bili poslednji kadrovi u dvominutnim intervalima spontane i izazvane mobilnosti. Radi detektovanja potencijalnog smanjenja u broju vezikula, što bi odražavalo oslobađanje sadržaja vezikula egzocitozom, nizovi brojeva vezikula po ćeliji u spontanim i stimulisanim uslovima su upoređivani uparenim *t*-testom i predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

# REZULTATI

---

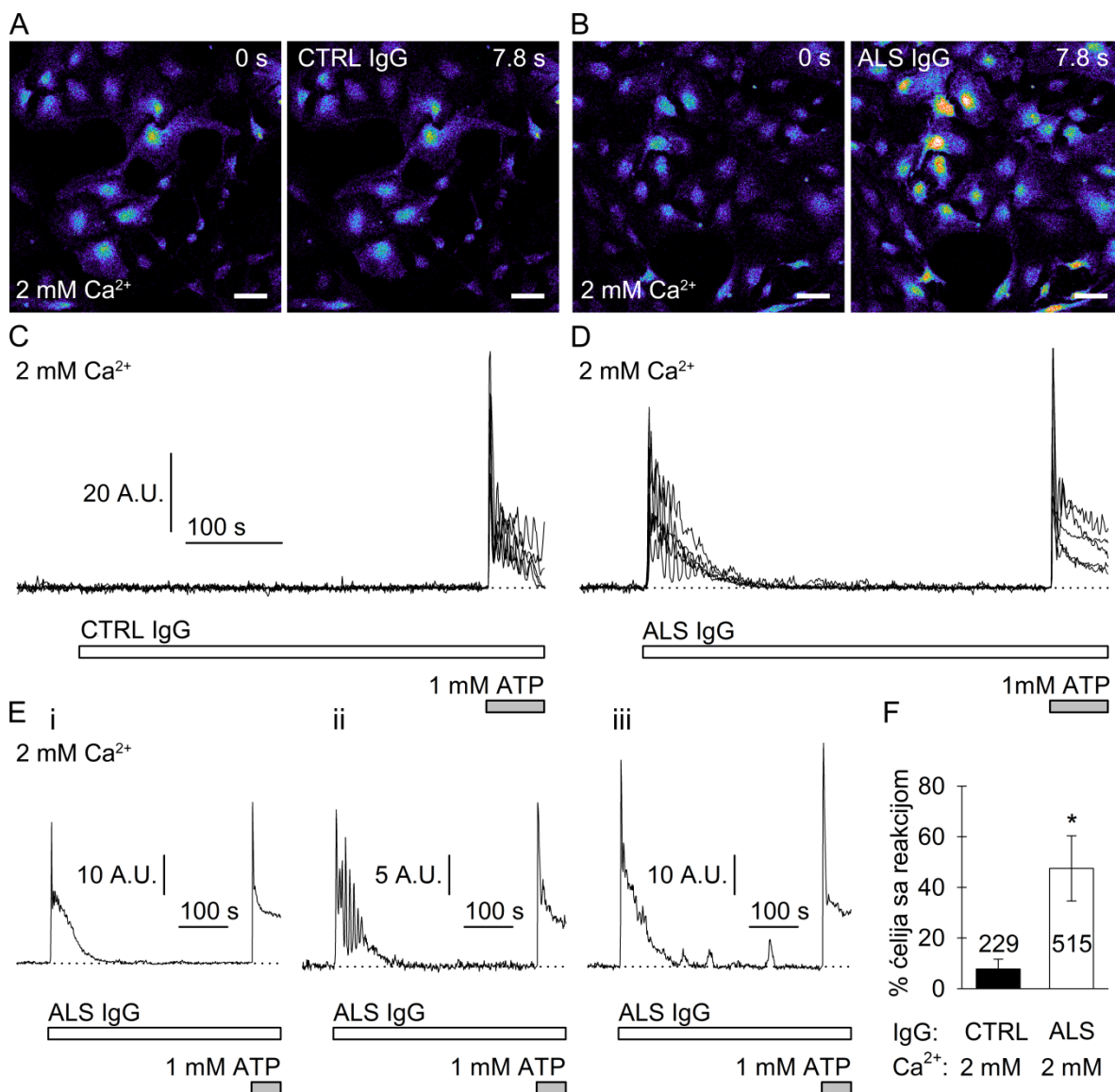
## UTICAJ ALS IGG NA KALCIJUMOVE TRANZIJENTE PACOVSKIH ASTROCITA U KULTURI

### ALS IGG IZAZIVAJU TRANZIJENTNI PORAST UNUTARĆELIJSKE KONCENTRACIJE KALCIJUMA

U ovim eksperimentima korišćeni su IgG iz 7 ALS bolesnika i 3 kontrolna subjekata (jedan sa Parkinsonovom bolešću, jedan zdrav i jedan sa dijagnosticiranom radikulopatijom).

Kultivisani astrociti tretirani Fluo-3-AM permeabilnim kalcijumovim indikatorom imaju citosolnu distribuciju fluorescencije. Promene u intenzitetu boje odražavaju relativnu promenu  $[Ca^{2+}]_i$ . Merenja su pokazala da IgG poreklom iz ALS bolesnika izazivaju drastično povećanje  $[Ca^{2+}]_i$ , za razliku od kontrolnih IgG. Primeri kalcijumskog odgovora prikazani su na slikama 2A (kontrolni IgG pacijenta sa Parkinsonovom bolešću) i 2B (ALS IgG). Ove slike su originalni snimci pre dodavanja IgG (levo) i 7.8 s nakon dodavanja IgG (desno). Na slikama 2C-D prikazani su grafici promene  $[Ca^{2+}]_i$  u nekoliko reprezentativnih astrocita, prilikom dodavanja IgG i ATP. Tretiranje astrocita kontrolnim IgG nije uticalo na  $[Ca^{2+}]_i$  (slika 2C), dok je ALS IgG izazvao tranzijentni porast  $[Ca^{2+}]_i$  (slika 2D). Stimulisanje ćelija 1mM ATP izazvalo je veliku i bifazičnu (šiljak praćen platoom; *Nobile et al., 2003*) promenu  $[Ca^{2+}]_i$  (slike 2 C-D, desni delovi grafika, od 8-10 min) u svim astrocitima.





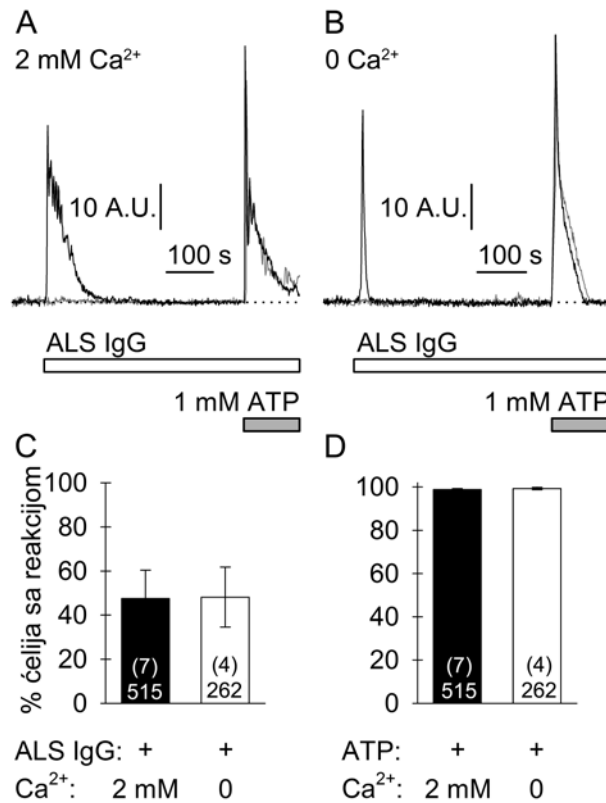
Slika 2. ALS IgG povećavaju aktivnost citosolnog kalcijuma u pacovskim astrocitima u kulturi. (A-B) Slike živih pacovskih astrocita tretiranih fluorescentnim kalcijumovim indikatorom Fluo-3 AM snimljene konfokalnim mikroskopom u vanćelijskom rastvoru sa 2 mM Ca<sup>2+</sup>. Leva slika svakog panela predstavlja ćelije pre (0 s) i nakon (7.8 s) aplikacije bilo kontrolnog IgG (CTRL IgG, A) izolovanog iz krvi bolesnika sa Parkinsonovom bolešću ili ALS IgG (ALS IgG, B). Primećuje se da je ALS IgG, ali ne i kontrolni IgG, izazvao porast unutarćelijskog kalcijuma, što se vidi u područjima žutih, crvenih i belih piksela na slici na kojoj pseudoboje odražavaju intenzitet detektovane fluorescencije (hladnije boje, ljubičasta i plava, označavaju niži intenzitet

fluorescencije dok toplije boje, žuta i crvena, označavaju veće intenzitete fluorescencije). Razmernik: 50  $\mu\text{m}$ . (C-D) Zapisi 5 tipičnih vremenskih tokova intenziteta fluorescencije. Mesta aplikacije 100  $\mu\text{g/ml}$  IgG (C-kontrola, D-ALS) i 1 mM ATP označena su pravougaonicima ispod zapisa. Aplikacija 100  $\mu\text{g/ml}$  ALS IgG izazvala je tranzijentan i kompleksan porast unutarćelijskog kalcijuma. (E) Tri tipa kalcijumovih tranzijenata astrocita koji se javljaju nakon aplikacije ALS: (i) pojedinačni tranzijent promene  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , (ii) visokofrekventna rafalna povećanja  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  i (iii) repetitivna povećanja  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  duž celog perioda registracije nakon tretmana ALS IgG. Tanke tačkaste linije (C-E) označavaju bazalnu fluorescenciju. (F) Histogram relativne frakcije ćelija (i-iii) koje su na IgG aplikaciju odgovorile povećanjem  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; CTRL, kontrolni IgG (n=3); ALS, ALS IgG (n=7). A.U.: arbitrarne jedinice kojima se označava razlika između merene i bazalne fluorescencije. Brojevi na stupcima histograma označavaju broj pojedinačnih ćelija ispitanih u svakom od uslova. \* $p < 0.05$  u poređenju sa tretmanom kontrolnim IgG.

Nakon tretiranja astrocita ALS IgG poreklom iz različitih pacijenata, primećene su razlike u promenama  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , koje mogu da se klasifikuju u tri kategorije (primeri prikazani na slikama 1E i-iii):

- i. pojedinačna tranzijentna promena  $[\text{Ca}^{2+}]_i$
- ii. kompleksna promena sa mnogo šiljkova usled visokofrekventnih rafalnih promena  $[\text{Ca}^{2+}]_i$
- iii. repetitivna povećanja  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  koja se sastoje od nekoliko pojedinačnih tranzijentnih promena  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , razdvojenih u vremenu i varijabilnog intenziteta amplitude šiljka.

U retkim slučajevima primećeno je da kontrolni IgG izaziva promene  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (nije prikazano), stoga su određene frakcije ćelija koje pokazuju IgG-izazvane promene u  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  kako u kontrolnoj grupi (n=3, 229 ćelija), tako i u ALS grupi (n=7, 515 ćelija). Analiza je pokazala da su IgG iz kontrolne grupe izazvali povećanje  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  u zanemarljivoj frakciji ćelija u odnosu na ALS grupu ( $7,7 \pm 3,9$  % naspram  $47,5 \pm 12,9$  %,  $p=0,0158$ , slika 2F), što ukazuje da ALS IgG ima jak i specifičan efekat na kalcijumovu homeostazu u astrocitima.



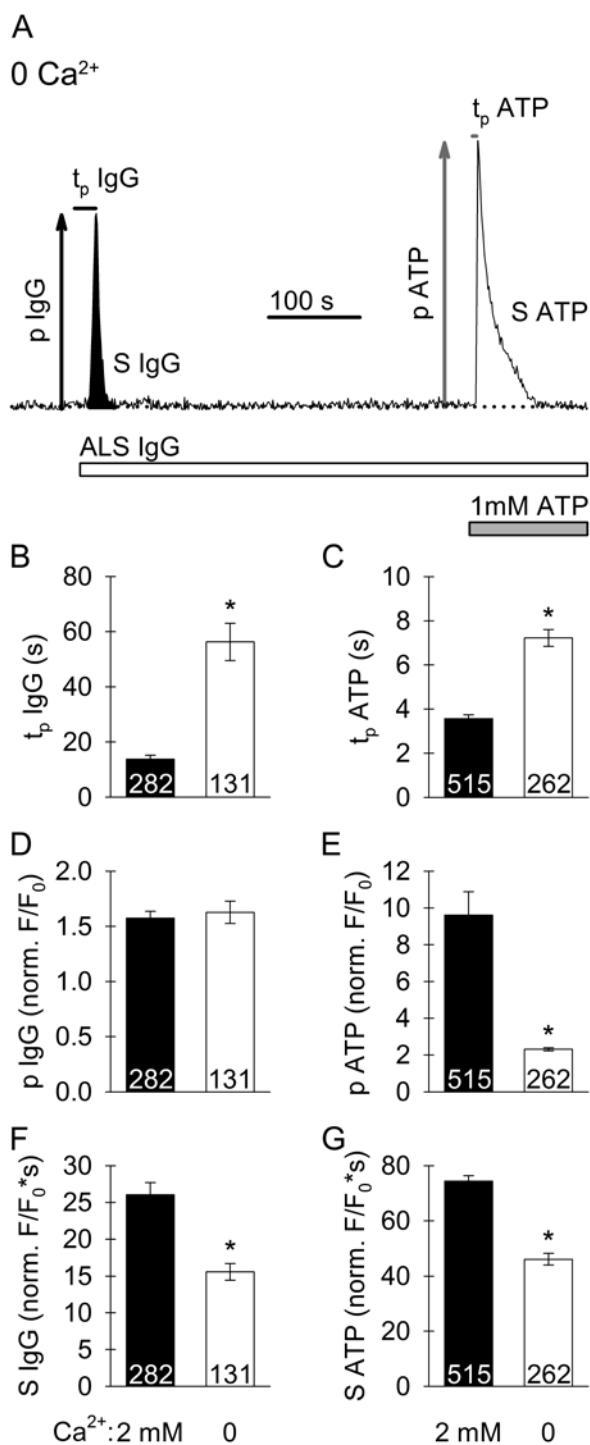
**Slika 3. Frakcija pacovskih astrocita koji na ALS IgG tretman odgovaraju povećanjem unutarćelijskog kalcijuma ne zavisi od vanćelijske koncentracije ovog jona.** (A-B) Zapisi vremenskog toka intenziteta fluorescencije kalcijumovog indikatora po dve reprezentativne ćelije tretirane 100 µg/ml ALS IgG i zatim stimulisane 1 mM ATP u vanćelijskim rastvorima sa (A, 2 mM) i bez (B, 0 mM) kalcijuma. Vremena tretmana su označena belim (ALS IgG) i sivim (ATP) pravougaonicima. Aplikacija 100 µg/ml ALS IgG izazvala je tranzijentno povećanje kalcijuma u jednoj (crna linija), ali ne i u drugoj (siva linija) ćeliji, dok su obe ćelije odgovorile na 1 mM ATP. Primećuje se da u slučaju tretmana ALS IgG u prisustvu vanćelijskog kalcijuma, porast [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> duže traje i mobilisana je veća količina kalcijuma sudeći po površini ispod krive. Tačkaste linije označavaju bazalni nivo fluorescencije. (C-D) Histogrami koji prikazuju procenat ćelija koje su na ALS IgG odgovorile povećanjem [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> u rastvoru sa Ca<sup>2+</sup> (2 mM) i bez Ca<sup>2+</sup> (0 mM). Brojevi u zagradama označavaju broj ispitanih ALS IgG, dok brojevi u osnovi stubaca označavaju broj tretiranih ćelija.

Postavilo se pitanje da li porast  $[Ca^{2+}]_i$  izazvan ALS IgG tretmanom zavisi od ulaska vanćelijskog kalcijuma u citosol. U cilju dobijanja odgovora na ovo pitanje, astrociti, prekondicionirani u ECS-Ca, tretirani su sa ALS IgG (n=4). Na slici 3 A-B prikazana su po dva primera, jedan sa, a drugi bez odgovora na ALS IgG i to u prisustvu 2 mM  $Ca^{2+}$  (slika 3A) i u odsustvu  $Ca^{2+}$  (slika 3B) u vanćelijskom rastvoru. Sve ćelije, bez obzira na prisustvo/odsustvo  $[Ca^{2+}]_e$ , odgovorile su povećanjem  $[Ca^{2+}]_i$  na stimulaciju 1 mM ATP (slika 3A-B). Kvantifikacija frakcije astrocita kod kojih ALS IgG i ATP izazivaju povećanja  $[Ca^{2+}]_i$ , pokazala je da približno polovina ćelija odgovara na ALS IgG kalcijumovim tranzijentima bez obzira na prisustvo ili odsustvo  $[Ca^{2+}]_e$  ( $47,5 \pm 12,9$  %, 2 mM  $Ca^{2+}$  naspram  $48,2 \pm 13,6$  %, 0 mM  $Ca^{2+}$ ,  $p=0,975$ ; slika 3C), dok skoro sve ćelije odgovaraju na 1mM ATP ( $98,9 \pm 0,4$  %, 2 mM  $Ca^{2+}$  naspram  $98,5 \pm 0,6$  %, 0 mM  $Ca^{2+}$ ,  $p=0,637$ ; slika 3D). Ovi podaci ukazuju na postojanje funkcionalne heterogenosti među kultivisanim astrocitima, pri čemu je polovina osetljiva na ALS IgG.

#### **VANĆELIJSKI KALCIJUM NIJE NEOPHODAN ZA POJAVU ALS IGG- IZAZVANIH KALCIJUMOVIH TRANZIJENATA ALI UTIČE NA NJIHOVU DINAMIKU**

Verovatnoća sa kojom ALS IgG izaziva povećanja  $[Ca^{2+}]_i$  ne zavisi od prisustva kalcijuma u vanćelijskoj sredini. Međutim, primećuju se značajne razlike u obliku vremenskog profila intenziteta fluorescencije u uslovima 2 mM  $[Ca^{2+}]_e$  i bez vanćelijskog kalcijuma. Radi ispitivanja ovih razlika, definisani su parametri kalcijumovih tranzijenata (šematski prikazani na slici 4A) koji su mereni u ALS IgG- i ATP-izazvanim vremenskim profilima promene  $[Ca^{2+}]_i$  u prisustvu ili odsustvu  $[Ca^{2+}]_e$ :

- vreme između aplikacije supstance (ALS IgG ili ATP) i pojave vrha šiljka ( $t_p$ ), u sekundama
- amplituda vrha šiljka ( $p$ ), bezdimenziona veličina, normalizovano  $F/F_0$
- vremenski integral odgovora koji daje površinu ispod vremenskog profila krive promene  $[Ca^{2+}]_i$  ( $S$ ), u jedinicama normalizovano  $F/F_0*s$



Slika 4. Vanćelijski kalcijum dodatno doprinosi povećanju [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> izazvanom tretmanom ALS IgG. (A) Grafik vremenske zavisnosti intenziteta fluorescencije astrocita tretiranih 100

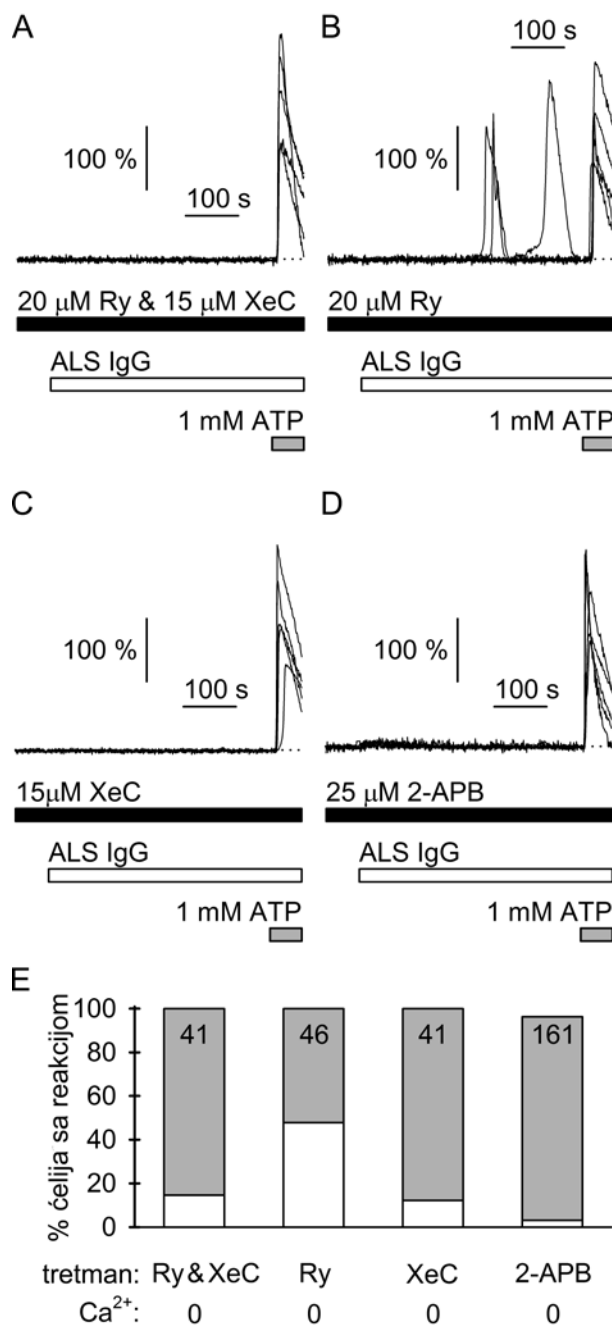
$\mu\text{g/ml}$  ALS IgG i stimuliranih 1 mM ATP u rastvoru bez  $\text{Ca}^{2+}$ . Tačkasta linija označava bazalni nivo fluorescencije ( $F_0$ ). Analizirani su pojedinačni parametri ( $t_p$  IgG,  $t_p$  ATP,  $p$  IgG,  $p$  ATP,  $S$  IgG-crna površina i  $S$  ATP-bela površina, objašnjenja u tekstu) da bi se procenio uticaj ALS IgG i ATP na citosolnu koncentraciju kalcijuma. (B-C) Histogrami koji prikazuju vremensko kašnjenje (srednja vrednost  $\pm$  standardna greška) maksimuma odgovora u odnosu na vreme aplikacije ALS IgG (B) i ATP (C) u rastvoru sa kalcijumom (2 mM, crni stupci) i bez kalcijuma (0 mM, beli stupci). Vremensko kašnjenje odgovora na ALS IgG tretman je znatno veće od kašnjenja odgovora za ATP stimulacijom. (D-E) Histogrami koji pokazuju relativne amplitude povećanja  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  izazvanih ALS IgG (D) i ATP (E) u rastvoru sa kalcijumom (2 mM, crni stupci) i bez kalcijuma (0 mM, beli stupci). Vanćelijski kalcijum ne utiče na amplitudu ALS IgG-izazvane promene  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; amplituda ATP odgovora značajno je veća u  $[\text{Ca}^{2+}]_e=2$  mM (F-G) Histogrami vremenskog integrala povećanja  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  izazvanih sa ALS IgG (F) i sa ATP (G) u rastvoru sa i bez kalcijuma. Vremenski integral kalcijumove aktivnosti izazvan bilo kojom od supstanci, veći je u rastvoru sa 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . \* $p<0,05$

U prisustvu vanćelijskog kalcijuma, vrh šiljka ALS IgG-izazvanog odgovora javljao se nakon  $19,7 \pm 2,8$  s ( $n=282$ ), dok je u odsustvu vanćelijskog kalcijuma bilo potrebno čekati  $56,3 \pm 6,8$  sekundi ( $n=131$ ,  $p<0,001$ ) na pojavu vrha šiljka (slika 4B). Kalcijumski tranzijenti koji su sledili za ATP tretmanom bili su brži, sa vremenima pojave vrha šiljka  $3,6 \pm 0,2$  sekunde ( $n=515$ ) naspram  $7,2 \pm 0,4$  sekunde ( $n=262$ ,  $p<0,001$ ) u uslovima  $[\text{Ca}^{2+}]_e = 2$  mM i  $[\text{Ca}^{2+}]_e = 0$  mM, respektivno (slika 4C). U proseku, kalcijumski tranzijenti kao odgovor na ALS IgG i ATP tretman, javljali su se redom približno tri i dva puta brže u prisustvu vanćelijskog kalcijuma. Međutim, amplitude vrha šiljka ALS IgG-izazvanih kalcijumovih tranzijenata nisu pokazale značajnu razliku u uslovima sa i bez kalcijuma van ćelije ( $1,6 \pm 0,1$  norm.  $F/F_0$ , 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  naspram  $1,6 \pm 0,1$  norm.  $F/F_0$ , 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $p<0,001$ , slika 4D). ATP tretman izazvao je nekoliko puta veću amplitudu vrha šiljka u prisustvu vanćelijskog kalcijuma ( $9,6 \pm 1,3$  norm.  $F/F_0$ , 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  naspram  $2,3 \pm 0,1$  norm.  $F/F_0$ , 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $p<0,001$ , slika 4E). Uopšteno, ATP tretman izazvao je nekoliko puta veću amplitudu kalcijumskog tranzijenta u odnosu na ALS IgG tretman. Vremenski integral promene  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $S$ ) daje informaciju o “potentnosti” supstance kojom se ćelije tretiraju da izazove povećanja  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Što je taj broj veći, veća je i sposobnost

(“potentnost”) supstance da prolazno naruši homeostazu kalcijuma. ALS IgG izaziva veće vremenski integraljene promene  $[Ca^{2+}]_i$  u prisustvu vanćelijskog kalcijuma ( $26,0 \pm 1,6$  norm.  $F/F_0$  \*s, 2 mM  $Ca^{2+}$  naspram  $15,6 \pm 1,1$  norm.  $F/F_0$  \*s, 0 mM  $Ca^{2+}$ ,  $p < 0,001$ , slika 4F). Sličan trend je primećen i u ATP tretmanu ( $74,4 \pm 1,9$  norm.  $F/F_0$  \*s, 2 mM  $Ca^{2+}$  naspram  $46,1 \pm 2,1$  norm.  $F/F_0$  \*s, 0 mM  $Ca^{2+}$ ,  $p < 0,001$ , slika 4G). Sumarno, ovi podaci ukazuju na postojanje struktura na plazma membrani astrocita koje su propustljive za jone  $Ca^{2+}$ , a na čiju permeabilnost može (direktno ili indirektno) da utiče ALS IgG. Doprinos ovog ulaska kalcijuma kroz plazma membranu ne utiče na amplitudu promene, ali izgleda da ubrzava pojavu kalcijumskog tranzijenta i produžava njegovo trajanje u odnosu na promenu izazvanu isključivo oslobađanjem iz organela koje skladište kalcijum.

#### **AKTIVACIJA $IP_3$ RECEPTORA JE ODGOVORNA ZA ALS IGG- IZAZVANO OSLOBADANJE KALCIJUMA IZ UNUTARĆELIJSKIH DEPOA**

Do sada prikazani rezultati sugerišu da su unutarćelijski depoi kalcijuma izvor većine kalcijumovih jona koji se nađu u citoplazmi astrocita nakon ALS IgG tretmana. Stoga su naredni eksperimenti bili dizajnirani sa ciljem da se identifikuju strukture na membranama organela čija se permeabilnost za kalcijum menja pod uticajem ovog humoralnog faktora, specifičnog za ALS. ER je dinamična mreža tubula i cisterni raspoređenih duž cele eukariotske ćelije. ER se ponaša kao dinamičan depo kalcijuma koji generiše i oblikuje citosolne kalcijumove signale (*Parpura et al., 2010*). Poznato je da različiti fiziološki stimuli indirektno (preko sekundarnih glasnika) utiču na permeabilnost dva tipa kalcijumskih kanala na ER, inozitol trifosfatnog ( $IP_3$ ) i rianodinskog (Ry) receptora (*Bezprozvanny, 2005; Dulhunty & Pouliquin, 2003*). Stoga su u narednim eksperimentima, astrociti bili izloženi specifičnim blokatorima gore pomenutih kanala u ECS-Ca, a zatim su snimane promene intenziteta fluorescencije kalcijum senzitivne boje pod uticajem ALS IgG i ATP u ECS-Ca sa blokatorima. Prethodni tretman astrocita koktelom blokatora koji se sastojao od 20  $\mu$ M Ry i 15  $\mu$ M ksestospongina C (XeC), skoro je u potpunosti blokirao ALS IgG-izazvane kalcijumove tranzijente, ali ne i povećanja  $[Ca^{2+}]_i$  usled stimulacije sa 1 mM ATP (karakteristični primeri prikazani su na slici 5A).



Slika 5. Inhibitori oslobađanja  $\text{Ca}^{2+}$  iz  $\text{IP}_3$ -senzitivnih intracelularnih depoa sprečavaju povećanje  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  izazvano tretmanom ALS IgG u rastvoru bez  $\text{Ca}^{2+}$ . (A-D) Grafici vremenske zavisnosti intenziteta fluorescencije u po 5 ćelija prethodno tretiranih različitim inhibitorima oslobađanja  $\text{Ca}^{2+}$  iz depoa, tretiranih 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ALS IgG i stimulisanih 1 mM ATP u vremenskim



trenucima označenim horizontalnim markerima. Tanke tačkaste linije označavaju bazalni nivo fluorescencije kalcijumovog indikatora. (A) Koktel koji se sastojao od 20  $\mu\text{M}$  rianonodina (Ry) i 15  $\mu\text{M}$  ksestospongina C (XeC), kompletno blokira kalcijumove tranzijente. (B) Sam Ry (20  $\mu\text{M}$ ) nije kompletno blokirao porast citosolnog  $\text{Ca}^{2+}$ . Prikazani reprezentativni odgovori su poreklom od tri ćelije koje su odgovorile na ALS IgG tretman odloženim kalcijumovim tranzijentima, dok ostale dve nisu dale odgovore; sve ćelije su odgovorile na 1 mM ATP. (C) XeC (15  $\mu\text{M}$ ) kompletno blokira ALS IgG-izazvane odgovore kod svih ćelija. (D) 2-APB (25  $\mu\text{M}$ ) kompletno blokira kalcijumove tranzijente. (E) Histogram koji pokazuje relativne frakcije astrocita pretretiranih specifičnim blokatorima (A-D) koje su odgovorile kalcijumovim tranzijentima na tretman ALS IgG (beli stupci) i stimulaciju ATP (sivi stupci). Brojevi na vrhu stubaca označavaju broj ispitanih astrocita u svakom od specifičnih tretmana.

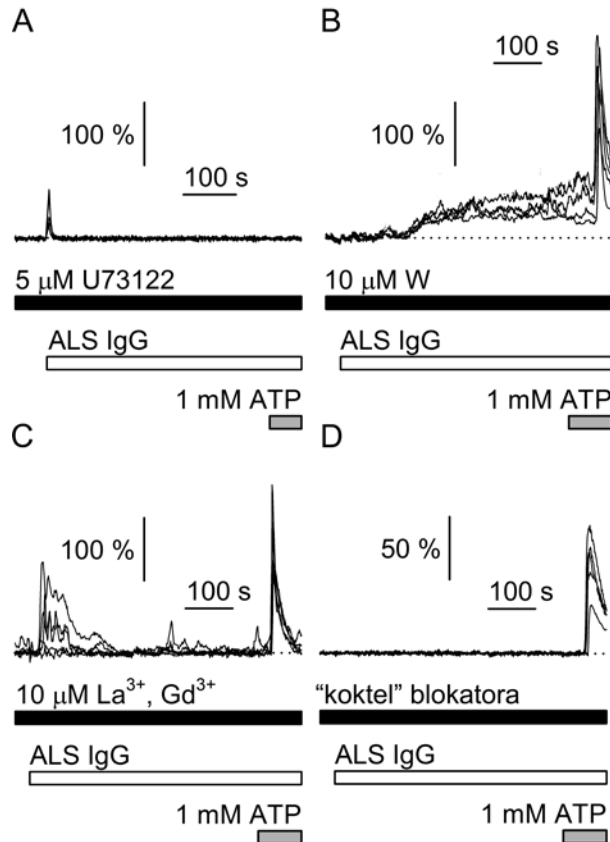
Da bi se razlučilo koji je od signalnih puteva uključen u generisanje ALS IgG-izazvanog odgovora, blokatori Ry i  $\text{IP}_3$  receptora su primenjeni odvojeno. U slučaju blokiranja Ry receptora astrocita (20  $\mu\text{M}$  Ry), tretman ALS IgG je izazvao kalcijumske tranzijente kod 22/46 (~48%) tretirane ćelije (primeri odgovora prikazani su na slici 5B). S druge strane, blokiranje  $\text{IP}_3$  receptora pretretmanom astrocita sa 15  $\mu\text{M}$  XeC, je skoro u potpunosti sprečilo ALS IgG-izazvane kalcijumove tranzijente, jer je samo 5/41 (~12%) ćelija odgovorilo veoma malim povećanjem  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (primeri odgovora su na slici 5C). Ovi podaci su ukazali na ulogu  $\text{IP}_3$ - ali ne i Ry signalnog puta u genezi kalcijumovih tranzijenata izazvanih ALS IgG. Potvrda ove konstatacije je proizašla iz eksperimenta gde je 15  $\mu\text{M}$  XeC bio zamenjen 25  $\mu\text{M}$  2-APB, permeabilnim antagonistom  $\text{IP}_3$  receptora. Sa izuzetkom 5/161 (~3%) ćelija pretretiranih 25  $\mu\text{M}$  2-APB, zapažena je nemogućnost ALS IgG da izazovu kalcijumove tranzijente astrocita (primeri odgovora prikazani su na slici 5D). Slika 5E sumira frakcije astrocita kod kojih je ALS IgG izazvao povećanja  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  u sva četiri pretretmana blokatorima.

## **PLAZMA MEMBRANSKI KANALI I ASOCIRANI ENZIMI KAO POSREDNICI U FORMIRANJU**

### **ALS IGG-OM IZAZVANIH KALCIJUMOVIH TRANZIJENATA**

Prethodni eksperimenti su pokazali da aktivacija IP<sub>3</sub> receptora na membranama ćelijskih organela posreduje u ALS IgG izazvanom povećanju [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Da bi identifikovali koji enzim(i) i/ili strukture na plazma membrani posreduju u ALS IgG-izazvanoj pojavi kalcijumovih tranzijenata, primenjeni su specifični blokatori: U73122 (5 μM), inhibitor fosfolipaze C (PLC), vortmanin (10 μM), potentan, selektivan, permeabilan i ireverzibilan inhibitor fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K), La<sup>3+</sup> i Gd<sup>3+</sup> (10 μM), trovalentni katjoni koji blokiraju struje kroz kanale za kapacitativan ulaz kalcijuma (CCE, od *eng.* calcium capacititative entry) i 2-APB (75 μM), koji u ovoj koncentraciji blokira struje kroz TRPC (*eng.* canonical transient receptor potential) kanale.

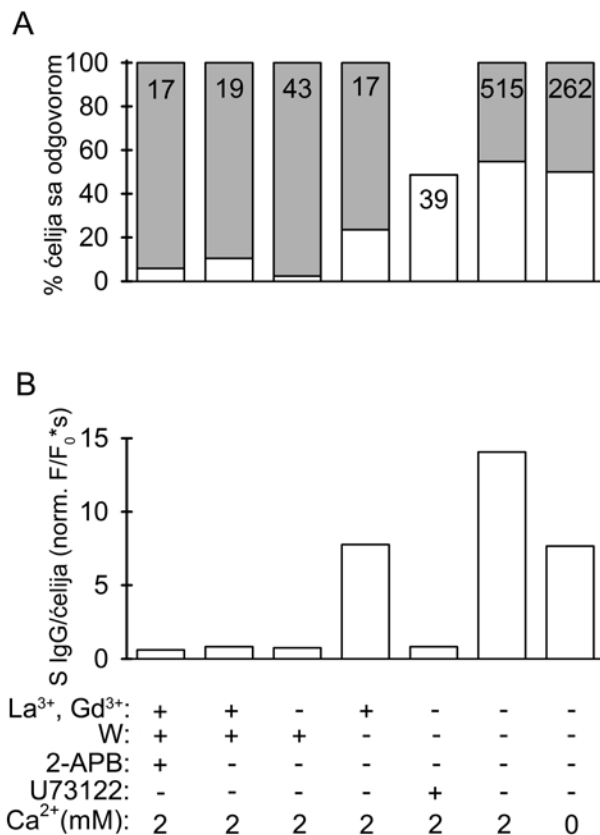
PLC je solubilni protein koji se sa aktivacijom translocira ka membrani gde hidrolizuje PIP<sub>2</sub> na DAG i IP<sub>3</sub>. Pošto je PLC glavni enzim koji svojom aktivnošću povećava unutarćelijsku koncentraciju IP<sub>3</sub>, bilo je očekivano da blokiranje ovog enzima supstancom U73122 sprečava ALS IgG-izazvane kalcijumove tranzijente. Međutim, pretretman astrocita supstancom U73122 u rastvoru sa 2 mM Ca<sup>2+</sup>, nije u potpunosti sprečio ALS IgG-izazvane tranzijente kalcijuma u 19/39 (~49%) tretiranih ćelija (slika 7A), a prolazno povećanje kalcijuma, iako značajne amplitude kratko je trajalo (slika 6A, uočiti brzo dostizanje maksimuma i brzo vraćanje na bazalni nivo). Iako neočekivan, ovaj rezultat je ukazao na postojanje drugih enzima i/ili membranskih kanala koji učestvuju u ALS IgG posredovanom odgovoru astrocita. Detaljnijom analizom površine ispod krive kalcijumskog tranzijenta, koja odražava količinu ukupnog mobilisanog kalcijuma u ovom procesu, ispostavilo se da ovo povećanje [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> nema veliki uticaj na ukupno povećanje [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, jer je vremenski integral ALS IgG izazvanog povećanja [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> po ćeliji (*S IgG/ćelija*) u uslovima blokirane PLC bio znatno manji od *S IgG/ćelija* u uslovima bez prisustva blokatora (0,83, U73122, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub>=2 mM naspram 14,05, bez blokatora, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub>=2 mM i 7,67, bez blokatora [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub>=0; slika 7B).



**Slika 6. Inhibicija fosfatidilinozitol-3-kinaze i TRPC kanala sprečava karakterističan odgovor astrocita na ALS IgG.** (A-D) Grafici vremenske zavisnosti intenziteta fluorescencije u po 5 ćelija pretretiranih različitim kombinacijama inhibitora, tretiranih sa 100  $\mu\text{g/ml}$  ALS IgG i potom stimulisanih sa 1 mM ATP ( $[\text{Ca}^{2+}]_e=2$  mM) u vremenskim trenucima označenim horizontalnim markerima. Tanke tačkaste linije označavaju bazalni nivo fluorescencije kalcijumovog indikatora. (A) 5  $\mu\text{M}$  U73122 smanjuje odgovor astrocita na ALS IgG, ali ne sprečava brzu inicijalnu promenu. (B) 10  $\mu\text{M}$  wortmanin (W) blokira karakteristični odgovor na ALS IgG, ali se javlja naknadno sporo povećanje  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . (C) 10  $\mu\text{M}$   $\text{La}^{3+}$  i 10  $\mu\text{M}$   $\text{Gd}^{3+}$  ne sprečavaju ALS IgG-izazvane odgovore kod svih ćelija. (D) Koktel koji se sastojao od 75  $\mu\text{M}$  2-APB, 10  $\mu\text{M}$   $\text{La}^{3+}$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{Gd}^{3+}$  i 10  $\mu\text{M}$  wortmanina u potpunosti sprečava ALS IgG-izazvane kalcijumove tranzijente.

PI3K je enzim koji fosforilacijom inozitolnih lipida i produkcijom PIP<sub>3</sub> može s jedne strane da utiče na translokaciju PLC u plazma membranu, a s druge strane na permeabilnost TRPC kanala. Astrociti pretretirani vortmaninom, specifičnim blokatorom PI3K, u rastvoru sa 2 mM Ca<sup>2+</sup>, nisu uspjeli da odgovore tipičnim kalcijumovim tranzijentima na ALS IgG (slika 6B); samo se kod 1/43 (~2%) ispitane ćelije (slika 7A) moglo detektovati povećanje [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> nalik na talas izazvan ALS IgG. Međutim, u ovim zapisima je vidljivo naknadno sporo povećanje [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, za koje je, sudeći po obliku talasa (spor i sa platoom) najverovatnije odgovoran proces u vezi sa unutarćelijskim depoima kalcijuma (slika 6B). *S IgG/ćelija* u ovom slučaju (ne uzimajući u obzir naknadno sporo povećanje [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) iznosio je 0,75, daleko manje nego u uslovima bez blokatora (slika 7B).

Pokazalo se da je vremenski integral kalcijumovog talasa izazvan sa ALS IgG veći kod astrocita u rastvoru sa 2 mM Ca<sup>2+</sup> u odnosu na astrocite u rastvoru bez Ca<sup>2+</sup> (slika 4E). Ovaj podatak govori o prisustvu strukture na plazma membrani koja utiče na „oblikovanje“ ALS IgG izazvanog tranzijenta kalcijuma. Obično su struje aktivirane oslobađanjem kalcijuma (*eng.* calcium release activated currents, CRAC) odgovorne za punjenje depoa ER i fazu platoa kalcijumskog tranzijenta (*Verkhratsky et al., 2012*), ali ove struje kod astrocita nisu detektovane (*Pizzo et al., 2001*). Međutim, astrociti eksprimiraju nekoliko vrsta TRPC kanala za koje se smatra da imaju kapacitativnu funkciju (punjenje depoa) i koji „oblikuju“ tranzijentne promene kalcijuma (*Golovina, 2005*). U zavisnosti od tipa subjedinica koje sačinjavaju ove kanale, na njihovu permeabilnost utiču trovalentni katjoni i 2-APB. Kod astrocita pretretiranih sa La<sup>3+</sup> i Gd<sup>3+</sup> u rastvoru sa 2 mM Ca<sup>2+</sup>, ALS IgG je izazvao tipično povećanje [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> u 4/17 ćelija (~24%), kao što je prikazano na slici 7A, odnosno na slici 6C sa reprezentativnim primerima ALS IgG-izazvanog odgovora. Detaljnijom analizom vremenskih integrala promene unutarćelijske koncentracije kalcijuma u ovim uslovima, došlo se do vrednosti 7,77 za *S IgG/ćelija*, što je uporedivo sa vrednošću istog parameta (7,67) u uslovima bez blokatora i [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub>=0 mM (slika 7B). Dakle, sa blokiranjem TRPC, ALS IgG postižu sličan efekat kao u uslovima bez vanćelijskog kalcijuma. Ovo saznanje može da ukaže na ulogu ovih kanala u „oblikovanju“ kalcijumovih talasa izazvanih ALS specifičnim humoralnim imunskim faktorom.



Slika 7. **Poređenje odgovora astrocita na ALS IgG sa ili bez pretretmana blokatorima.** (A) Histogram koji pokazuje relativne frakcije astrocita pretretiranih specifičnim blokatorima i bez blokatora, koje su odgovorile kalcijumovim tranzijentima na tretman sa ALS IgG (beli stupci) i stimulaciju ATP (sivi stupci). Brojevi na vrhu stubaca označavaju broj ispitanih astrocita u svakom od specifičnih uslova tretmana. (B) Histogram koji pokazuje ALS IgG-izazvane vrednosti parametra *S IgG/ćelija* u uslovima kada su astrociti bili pretretirani specifičnim kombinacijama blokatora ili bez njih. Legenda na dnu važi za oba histograma.

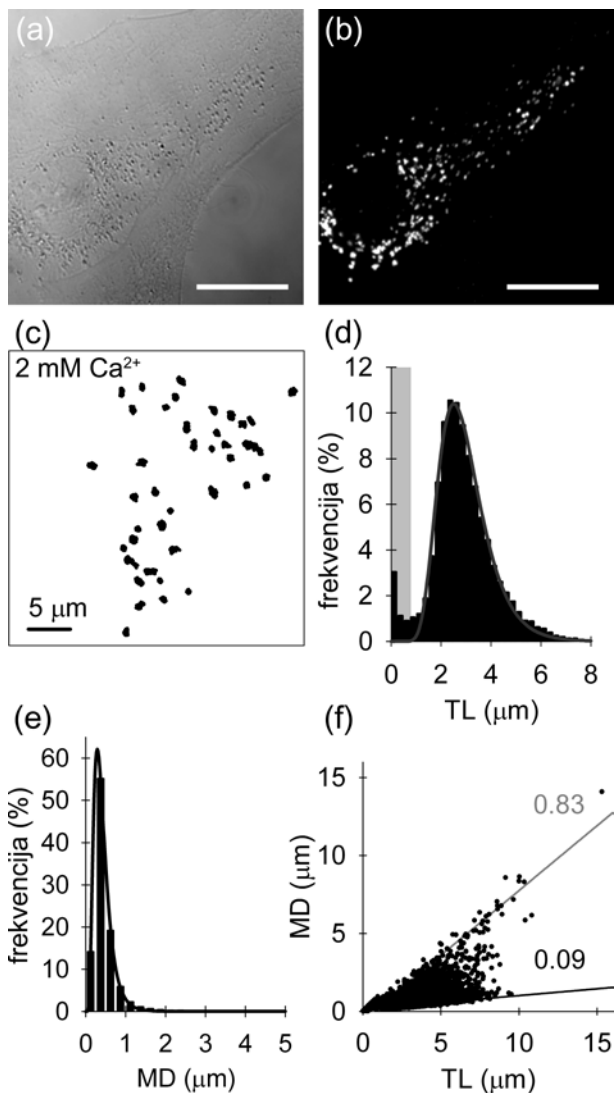
Konačno, radi potpunog blokiranja ALS IgG-izazvanih promena koncentracija kalcijuma, astrociti su pretretirani “koktelom” blokatora da bi se inhibirale aktivnosti TRPC i PI3K. Pretretman astrocita La<sup>3+</sup>, Gd<sup>3+</sup>, 2-APB i vortmaninom sprečio je ALS IgG-izazvane kalcijumove tranzijente u vanćelijskom rastvoru sa 2 mM Ca<sup>2+</sup>. Na ALS IgG

tretman odgovorila je 1/17 (~6%) ispitanih ćelija (slika 7A), a *S IgG/ćelija* iznosio je 0,61 (slika 7B). Karakteristični zapisi dobijeni u ovom slučaju predstavljeni su na slici 6D. Izostavljanjem 2-APB iz “koktela” blokatora dobijeni su slični podaci, samo 2/19 (~10%) ispitanih ćelija u vanćelijskom rastvoru sa 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (slika 7A) odgovorilo je na ALS IgG tretman povećanjem unutarćelijskog kalcijuma. Kvantifikacijom *S IgG/ćelija* došlo se do vrednosti 0,83 (slika 7B).

## UTICAJ ALS IGG NA MOBILNOST LIZOZOMA/ENDOZOMA PACOVSKIH ASTROCITA U KULTURI

### MOBILNOST OBELEŽENIH VEZIKULA U NORMALNIM FIZIOLOŠKIM USLOVIMA

Inkubiranje astrocita u medijumu za gajenje ćelija sa lizotrekerom dovodi do ulaska boje u pojedinačne tačkaste subcelularne strukture (slika 8 a-b) sa kiselim sadržajem, koje uglavnom predstavljaju ćelijske endozome/lizosome (Potokar *et al.*, 2010). Praćena je spontana mobilnost ovih astrocitnih vezikula u normalnim fiziološkim uslovima u vanćelijskom rastvoru sa 2 mM Ca<sup>2+</sup>. Vezikule su u ovim uslovima imale krivudave putanje (slika 8c). Da bi se dobio detaljniji pregled spontane mobilnosti, analizirano je 21505 epoha od po 15 s 2710 vezikula, i za svaku epohu su određeni parametri dužine pređene putanje (TL) i maksimalnog pomeraja (MD). Raspodela vrednosti TL (frekventni histogram) pokazala je postojanje dve subpopulacije vezikula. Manji deo (6,1%) činile su vezikule koje se skoro uopšte nisu kretale, sa TL < 1 μm za 15 s, dok se veći deo (93,9%) sastojao od vezikula koje su prelazile 1-15 μm za 15 s (slika 8d). Vezikule sa TL < 1 μm uglavnom su ostajale blizu početnih pozicija, sa minimalnim nepravilnim pomeranjima. Za razliku od njih, mobilne vezikule su se pomerale daleko od inicijalne pozicije, a u nekoliko slučajeva, izdužene putanje kretanja ovih vezikula pokazivale su usmerenost. TL vrednosti mobilne subpopulacije vezikula podešavane su funkciji  $f = a \cdot \exp(-0,5 \cdot (\ln(x/x_0)/b)^2)/x$ , sa parametrima  $a = 27,59 \pm 0,24$ ,  $b = 0,33 \pm 0,00 \mu\text{m}^{-0.5}$  i  $x_0 = 2,81 \pm 0,01 \mu\text{m}$  (slika 8d). Uprkos mobilnosti, individualne vezikule nisu imale MD mnogo veće. Frekventni histogram MD podataka pokazao je postojanje jedinstvene populacije, a raspodela je podešavana logaritamskoj normalizovanoj funkciji  $f = a \cdot \exp(-0,5 \cdot (\ln(x/x_0)/b)^2)/x$ , sa parametrima  $a = 20,65 \pm 0,06$ ,  $b = 0,49 \pm 0,00 \mu\text{m}^{-0.5}$  i  $x_0 = 0,37 \pm 0,00 \mu\text{m}$  (slika 8e). Da bi se procenila usmerenost kretanja vezikula, napravljen je grafik zavisnost MD od TL opisan regresionom linijom oblika  $MD = MD_0 + a \times (TL)$  (slika 8f). Poređenjem nagiba ( $a$ ) regresionih linija, koji su mera usmerenosti kretanja (Potokar *et al.*, 2005), dobijene su vrlo različite vrednosti koje pokazuju veliku varijabilnost u usmerenosti kretanja ovih vezikula.



**Slika 8. Spontana mobilnost kiselih vezikula obeleženih lizotrekerom (Ly) pacovskih astrocita u kulturi.** (a) Astrocit snimljen transmissionim kanalom konfokalnog mikroskopa. (b) Isti astrocit snimljen fluorescentnim kanalom sa puno fluorescentnih tačaka u citoplazmi koje predstavljaju endosome/lizosome. Razmera: 10  $\mu\text{m}$ . (c) Putanje vezikula ( $n=40$ ) obojenih Ly za vreme dvominutnog perioda astrocita u mirovanju u vanćelijakom rastvoru sa 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Mnoge vezikule imaju ograničenu mobilnost, što se primećuje na osnovu njihovih nepravilnih putanja. (d) Frekventni histogram TL spontano mobilnih vezikula u 21 505 epoha. Razdvajaju se dve populacije na osnovu vrednosti TL: nepokretne vezikule sa  $\text{TL} < 1 \mu\text{m}$  (sivi vertikalni stub na panelu d) i mobilne vezikule sa  $\text{TL} > 1 \mu\text{m}$ . Raspodela TL mobilnih vezikula opisana je logaritamski

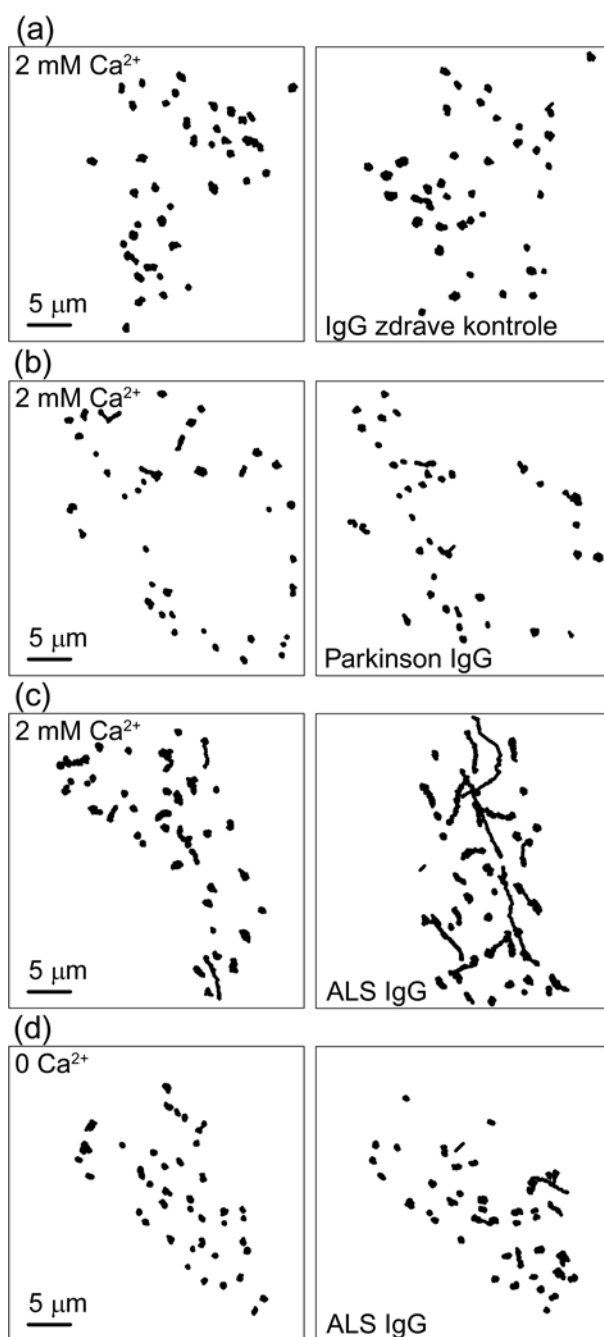


normiranom funkcijom (objašnjenje u tekstu). (e) Frekventni histogram MD spontanog kretanja vezikula u 21 505 epoha. Raspodela vrednosti MD podešena je logaritamski normiranom funkcijom (objašnjenje u tekstu). (F) Grafik zavisnosti MD od TL (daje informaciju o usmerenosti kretanja, DI) populacije Ly vezikula iz 57 astrocita. Nepokretne vezikule sa  $TL < 1 \mu m$  predstavljaju 6,1% ( $n=1305$ ), dok mobilne vezikule sa  $TL < 1 \mu m$  čine 93,9% ( $n=20\ 200$ ) ukupne populacije. Postoji velika varijabilnost u usmerenosti kretanja vezikula. Linearna funkcija oblika  $MD = MD_0 + a * (TL)$  podešena za dve ekstremne grupe (neusmerene i usmerene vezikule) pokazuje velike razlike u nagibu koji je mera usmerenosti kretanja vezikula. Nagibi ( $a \pm SE$ ) variraju od  $0,09 \pm 0,00$  (crna linija) do  $0,83 \pm 0,02$  (siva linija).

Teorijski, nagib regresione linije je jednak 1 ukoliko se vezikula kreće po pravolinijskoj putanji. Međutim, velika većina vezikula u okviru populacije mobilnih vezikula (77,02%) kretala se vrlo nasumično, a usmerenost njihovih kretanja karakteriše nagib od  $0,09 \pm 0,00$  (slika 8f, crna linija). Samo mali deo mobilnih vezikula (0,52%) pokazivao je usmerenost u kretanju sa nagibom regresione linije od  $0,83 \pm 0,02$  (slika 8f, siva linija). Ostatak mobilnih vezikula (16,39%) je po usmerenosti kretanja između ove dve krajnosti.

### **PROMENE U MOBILNOSTI LIZOTREKEROM OBELEŽENIH VEZIKULA NAKON AKUTNOG ALS IGG TRETMANA**

Nakon što su utvrđeni parametri spontane mobilnosti Ly vezikula u pacovskim astrocitima u kulturi, dalja analiza je bila usmerena ka mobilnosti Ly vezikula ovih ćelija tretiranih sa IgG kontrolne grupe pacijenata ( $n=4$  – jedan zdrav, jedan sa Parkinsonovom bolešću, jedan sa mišićnom distrofijom i jedan sa radikulopatijom) i ALS bolesnika ( $n=13$ ). Poređenjem putanja vezikula pre i nakon tretmana sa IgG (slika 9, levi i desni paneli) vidi se da IgG iz zdrave kontrole, kao i IgG izolovan iz krvi obolelog od Parkinsonove bolesti ne izazivaju značajne promene u mobilnosti vezikula (slika 9a-b). Za razliku od kontrolne grupe, ALS IgG-i izazivaju značajna povećanja brzine vezikula što za posledicu ima vrlo izdužene putanje (slika 9c, uporediti putanje na levom i desnom panelu). Izdužene putanje vezikula zapravo mogu da znače da je pored povećane brzine vezikula (reflektovano povećanjem TL), usmerenost kretanja vezikula povećana nakon ALS IgG tretmana. Radi



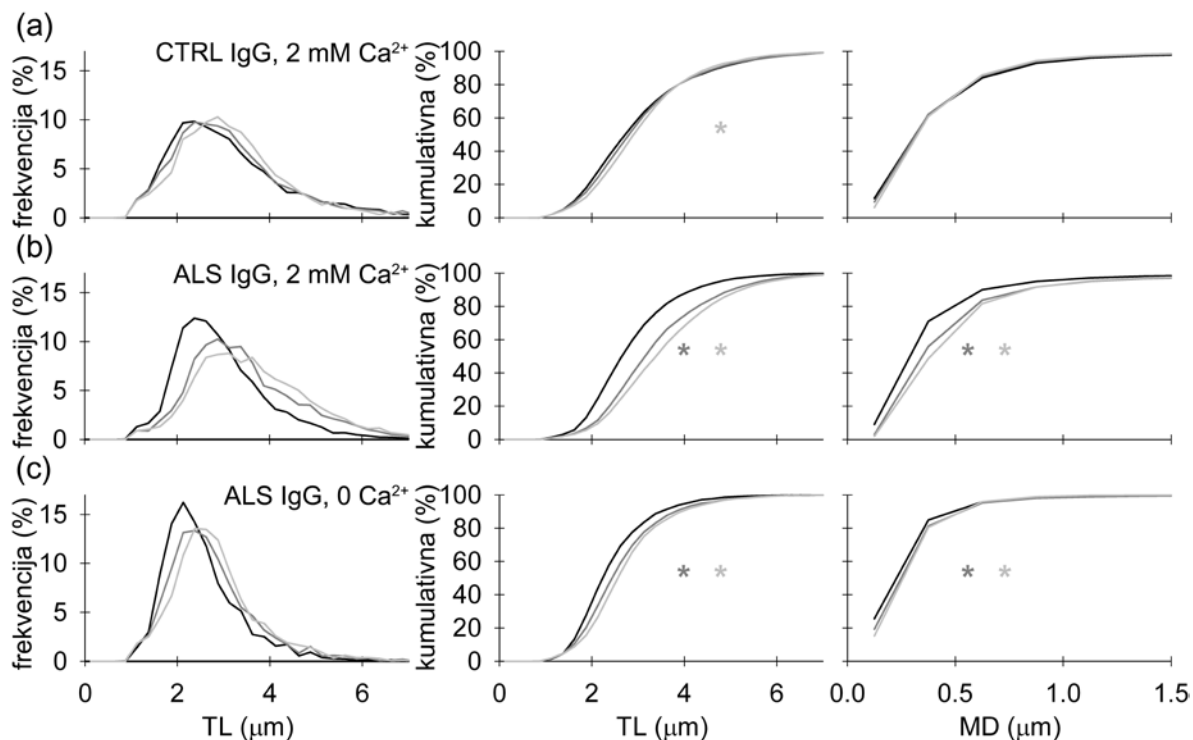
Slika 9. Mobilnost Ly vezikula pacovskih astrocita povećava se nakon tretmana sa ALS IgG. (a-d) Rekonstruisane putanje vezikula ( $n=40$ ) u periodu od 2 minuta pre (levi paneli) i u toku 2 minuta nakon (desni paneli) IgG tretmana u vanćelijskom rastvoru sa 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (a-c) i bez kalcijuma (d). IgG su bili poreklom iz zdrave individue (a), osobe sa Parkinsonovom bolešću (b) i

ALS bolesnika (c-d). Izduženije putanje se javljaju nakon ALS IgG tretmana, ali ne i nakon tretmana sa IgG iz kontrolne grupe. ALS IgG izaziva manje povećanje mobilnosti vezikula u odsustvu kalcijuma iz vanćelijskog rastvora.

ispitivanja eventualnog uticaja vanćelijske koncentracije kalcijuma na efekat ALS IgG, astrociti su prekondicionirani u ECS-Ca a zatim tretirani sa ALS IgG u istom rastvoru. Putanje vezikula i u ovom slučaju su bile izduženije nakon ALS IgG tretmana (slika 9d, uporediti putanje na levom i desnom panelu), ali je ovo izduživanje putanja bilo manje izraženo nego u vanćelijskom rastvoru sa 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (uporediti slike 9c i 9d). Ovi rezultati pokazuju da uticaj ALS IgG na povećanje mobilnosti vezikula može zavisiti od vanćelijske koncentracije kalcijuma.

Da bi se kvantifikovale promene u mobilnosti koje izazivaju ALS IgG, izvršena je detaljnija analiza parametara mobilnosti, TL i MD mobilnih vezikula čije su putanje praćene 2 minuta pre tretmana IgG i 4 minuta nakon IgG tretmana. Podaci o koordinatama Ly vezikula u periodu od 4 minuta nakon IgG tretmana podeljeni su u dve grupe od po 2 minuta (0-2 min i 2-4 min). Pošto vezikule stalno menjaju svoj status mobilnosti, prelazeći iz stanja veće pokretljivosti u stanja mirovanja i obrnuto, praćenje dužeg vremenskog perioda (kao što su 2 minuta) ne može da da pravu sliku o stanju vezikule, jer ako se period intenzivnog kretanja i period mirovanja analiziraju zajedno, u istoj epohi, gube se informacije o posebnim podperiodima. Zato je svaka grupa je analizirana u epohama od po 15 s (podperiod za koji ne bi trebalo očekivati promenu statusa mobilnosti vezikula), kako bi se bolje okarakterisati načini kretanja vezikule. Nakon analize po epohama, koje su bile grupisane u dvominutne periode, napravljeni su frekventni histogrami i kumulativne frekvencije parametara mobilnosti, TL i MD, sa ciljem da se statistički testiraju značajnosti razlika u mobilnosti vezikula izazvanih specifičnim IgG. U astrocitima snimanim u vanćelijskom rastvoru sa 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , vrednosti za TL pre tretiranja bile su slične u svim analiziranim astrocitima (uporediti crne krive na slikama 10a-b levi paneli). Srednja vrednost TL  $\pm$  standardna greška bile su  $3,10 \pm 0,02 \mu\text{m}$  (n=5635; slika 10a) i  $2,96 \pm 0,01 \mu\text{m}$  (n=7054; slika 10b). Nakon aplikacije IgG detektovane su razlike u mobilnosti Ly vezikula, koje su zavisile od tipa primenjenog IgG. IgG iz kontrolne grupe nisu značajno

uticali na pokretljivost vezikula u prva dva minuta, a detektovano je malo, iako značajno povećanje parametra TL u drugom dvominutnom periodu (slika 10a, srednji panel). Parametar MD ostao je nepromenjen tokom celog perioda nakon tretmana (slika 9A, desni panel). Parametar TL se kod astrocita tretiranih sa IgG iz kontrolne grupe povećao u drugom dvominutnom periodu sa  $3,10 \pm 0,02 \mu\text{m}$  (nestimulisani,  $n=5635$ ) na  $3,19 \pm 0,02 \mu\text{m}$  ( $n=5405$ ). Ovo malo povećanje parametra TL kod astrocita tretiranih sa IgG iz kontrolne grupe može da se vidi na grafiku koji pokazuje kumulativne frekvencije (slika 10a, srednji panel) kao malo pomeranje krive na desno ka većim vrednostima TL.



**Slika 10. Spontana i izazvana mobilnost Ly vezikula pacovskih astrocita u kulturi tretiranih sa kontrolnim i ALS IgG.** (a-c) Preklopljeni grafici frekventne raspodele dužine putanje (TL, paneli levo) netretiranih ćelija (crna kriva,  $n=5635$  epoha vezikula (a),  $n=7054$  (b),  $n=2164$  (c)), nakon tretmana u prvom dvominutnom periodu (tamno siva kriva,  $n=5405$  (a),  $n=6964$  (b) i  $n=2053$  (c)) i u drugom dvominutnom periodu (svetlo siva kriva,  $n=5668$  (a),  $n=6835$  (b) i  $n=2124$  (c)). ALS IgG, ali ne i IgG iz kontrolne grupe izazvali su povećanje parametra TL, što se primećuje kao pomeraj u

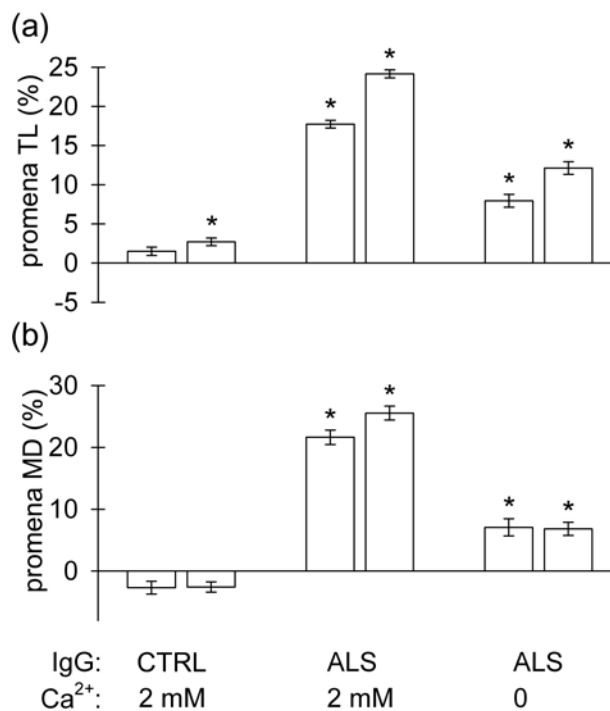
desno na grafiku. Srednji paneli: preklapljeni grafici kumulativne frekvencije parametra TL; desni paneli: parametar MD astrocita tretiranih različitim IgG. Boje linija imaju isto značenje kao u frekventnim histogramima (levi paneli). Stimulacija ćelija sa ALS IgG izazvala je jasan, vremenski zavisani pomeraj oba parametra (TL i MD) ka većim vrednostima; povećanje je nešto manje kod astrocita u vanćelijskom rastvoru bez kalcijuma (c) u odnosu na povećanja istih parametara kod astrocita u vanćelijskom rastvoru sa 2 mM  $Ca^{2+}$ . \* $p < 0,05$  za IgG tretman u odnosu na odgovarajuće netretirane kontrolne uslove.

Za razliku od kontrolnih antitela, ALS IgG 12 od 13 bolesnika izazvali su velike i statistički značajne promene u TL i MD u oba posmatrana poststimulusna perioda (0-2 i 2-4 minuta) (slika 10b). Parametar TL povećao se sa  $2,96 \pm 0,01 \mu m$  ( $n=7054$ ) pre tretmana, na  $3,49 \pm 0,01 \mu m$  ( $n=6964$ ) u prva dva minuta i  $3,68 \pm 0,02 \mu m$  ( $n=6835$ ) u druga dva minuta nakon ALS IgG tretmana. Slično, parametar MD povećao se sa  $0,48 \pm 0,00 \mu m$  ( $n=7054$ ) pre tretmana na  $0,59 \pm 0,01 \mu m$  ( $n=6964$ ) u 0-2 minuta i  $0,61 \pm 0,01 \mu m$  ( $n=6835$ ) u 2-4 minuta nakon ALS IgG tretmana. Robusna i vremenski zavisna povećanja u parametrima TL i MD nakon ALS IgG tretmana predstavljena su pomerajima krivih kumulativnih histograma na desno ka većim vrednostima (slika 10b, srednji panel – TL, desni panel – MD).

#### **UTICAJ VANĆELIJSKE KONCENTRACIJE KALCIJUMA NA ALS IGG- IZAZVANO POVEĆANJE MOBILNOSTI OBELEŽENIH VEZIKULA**

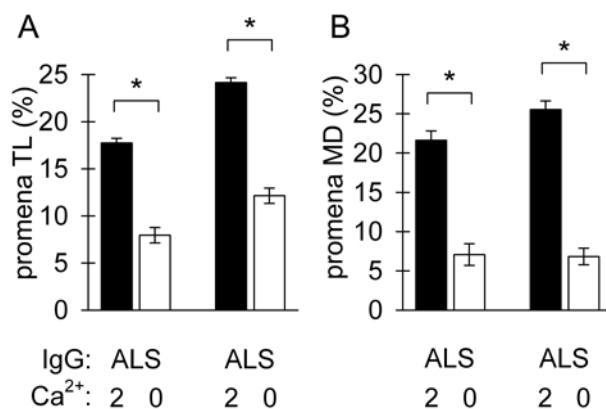
Da bi se detaljnije ispitaio uticaj  $[Ca^{2+}]_e$  na potencijal ALS IgG da izazove povećanje mobilnosti vezikula uočen na slici 9c, astrociti su tretirani sa IgG iz ALS bolesnika ( $n=3$ ) u vanćelijskom rastvoru bez  $Ca^{2+}$ . U ovim eksperimentima, Ly vezikule su pokazivale manju spontanu aktivnost nego u prisustvu vanćelijskog kalcijuma što se jasno vidi poređenjem zapisa sa slike 10c, (panel levo) sa zapisima slika 10a-b (levi paneli). Vrednosti parametara mobilnosti pri  $[Ca^{2+}]_e=2$  mM bili su  $TL = 3,03 \pm 0,01 \mu m$  i  $MD = 0,51 \pm 0,01 \mu m$  ( $n=20200$ ) dok su za  $[Ca^{2+}]_e=0$  analizirane vrednosti bile statistički značajno manje ( $p < 0,001$ ) –  $2,53 \pm 0,02 \mu m$ , odnosno  $0,37 \pm 0,01 \mu m$  ( $n=2164$ ). Ipak i u slučaju odsustva vanćelijskog kalcijuma ALS IgG tretman je doveo do povećanja parametara mobilnosti. Vrednosti TL su se povećale sa spontanih  $2,53 \pm 0,02 \mu m$  ( $n=2164$ ) na  $2,73 \pm 0,02 \mu m$  ( $n=2053$ ) u prva dva

minuta i dalje na  $2,83 \pm 0,02 \mu\text{m}$  ( $n=2124$ ) u druga dva minuta nakon ALS IgG tretmana. Parametar MD se povećao sa spontanih  $0,37 \pm 0,01 \mu\text{m}$  na  $0,40 \pm 0,01 \mu\text{m}$  u prva dva minuta i ostao na vrednosti  $0,40 \pm 0,01 \mu\text{m}$  u drugom dvominutnom periodu nakon ALS IgG tretmana. Ova povećanja vrednosti parametara mobilnosti se vide kao umerena pomeranja na desno a većim vrednostima na graficima distribucije kumulativnih frekvencija TL i MD (slika 10c, srednji i desni panel).



Slika 11. **Ly vezikule menjaju mobilnost pod uticajem ALS IgG.** Srednja vrednost relativne promene ( $\pm$  standardna greška, %) parametra TL (a) i parametra MD (b) u prva dva minuta (levi stupci parova) i druga dva minuta (desni stupci parova) nakon tretmana specifičnim IgG u rastvorima sa i bez kalcijuma (legenda na dnu važi za oba histograma). ALS IgG izaziva masivnu i vremenski zavisnu promenu u parametrima mobilnosti. \* $p < 0,05$  u odnosu na odgovarajuće netretirane kontrolne uslove (spontana mobilnost).

Svedeno u odnosu na kontrolne uslove svakog od eksperimenata (spontana mobilnost pre IgG tretmana), slika 11 pokazuje promene parametara u procentima, kao i statističke značajnosti svake promene u odnosu na kontrolne uslove. Ovakva analiza je pokazala da ALS IgG, ali ne i IgG iz kontrolne grupe, izaziva masivno, vremenski zavisno povećanje mobilnosti Ly vezikula. Parametar TL se povećao za 18% i 24% (slika 11a) dok se MD povećao za 22% i 26% (slika 11b) redom u prvom i drugom dvominutnom periodu u poređenju sa netretiranim ćelijama. Jačina efekta ALS IgG na povećanje mobilnosti Ly vezikula delom zavisi od prisustva vanćelijskog kalcijuma, s obzirom da se u uslovima bez vanćelijskog kalcijuma zabeležila manja, iako i dalje statistički značajna, povećanja parametara mobilnosti. U rastvoru bez kalcijuma, parametar TL se povećao 8% i 12% u uzastopnim dvominutnim periodima, dok se parametar MD povećao 7% u prvom dvominutnom periodu i ostao na istom povećanom nivou u druga dva minuta nakon ALS IgG tretmana (slika 12A-B).



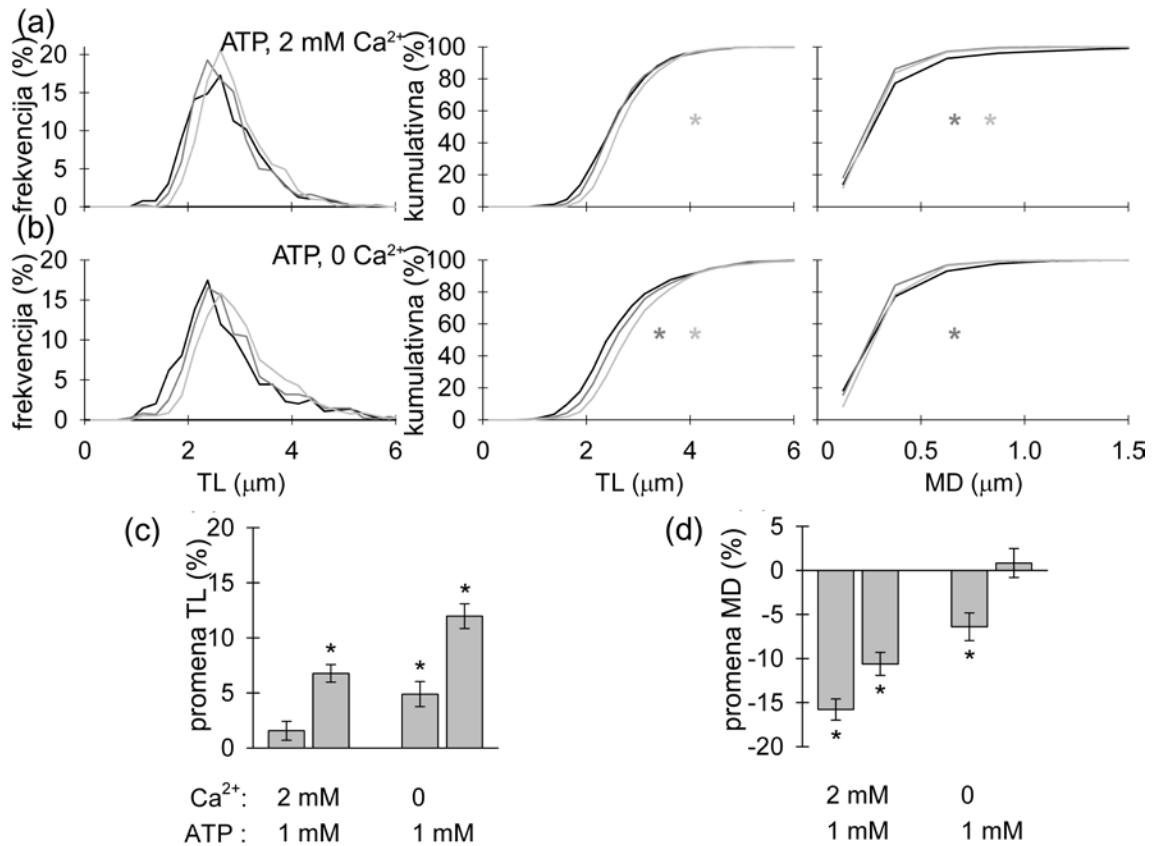
Slika 12. **Promene u mobilnosti Ly vezikula izazvane ALS IgG zavise od vanćelijskog Ca<sup>2+</sup>.** Poređenje srednjih vrednosti relativnih promena ( $\pm$  standardna greška, %) parametra TL (A) i MD (B) u prva dva minuta (prvi par stubaca) i druga dva minuta (drugi par stubaca) nakon ALS IgG tretmana u rastvoru sa (2 mM, crni stupci, 30 ćelija) ili bez (0, beli stipci, 6 ćelija) Ca<sup>2+</sup>. Izražavanje je povećanje mobilnosti u rastvoru sa 2 mM Ca<sup>2+</sup>. \*p<0,05

**ATP STIMULACIJA MENJA MOBILNOST LY VEZIKULA**

S obzirom da su izloženi rezultati pokazali da ALS IgG povećava koncentraciju unutarćelijskog kalcijuma (prvi deo Rezultata) i da je povećanje mobilnosti vezikula veće u prisustvu ovog jona u vanćelijskom rastvoru, postavilo se pitanje da li ALS IgG utiču na mobilnost vezikula na sličan način kao i poznati agensi koji dovode do kalcijumovih tranzijenata u citoplazmi. Stoga su astrociti čiji su endozomi/lizozomi obojeni Ly stimulisani sa 1 mM ATP, koji deluje preko jonotropnih i metabotropnih purinskih receptora (*Bennett et al., 2005, 2009; North & Verkhratsky, 2006; Sperlagh et al., 2006*) i povećava citosolni kalcijum (*Pangršič et al., 2006*). U prisustvu vanćelijskog kalcijuma, stimulacija 1 mM ATP je izazvala povećanje TL sa  $2,70 \pm 0,02 \mu\text{m}$  (n=788) na  $2,74 \pm 0,02 \mu\text{m}$  (n=800) u prva dva minuta i  $2,88 \pm 0,02 \mu\text{m}$  (n=792) u drugom dvominutnom periodu nakon stimulacije (slika 12A, levi panel). Međutim, MD je opala sa  $0,43 \pm 0,01 \mu\text{m}$  na  $0,36 \pm 0,01 \mu\text{m}$  u prva dva minuta i na  $0,38 \pm 0,01 \mu\text{m}$  u drugom dvominutnom periodu nakon stimulacije 1 mM ATP. Detektovano je, dakle, vrlo blago, vremenski zavisno povećanje TL, koje se vidi kao blagi pomeraj u desno, dok se smanjenje MD vidi kao pomeraj u levo na graficima distribucije kumulativnih frekvencija (slika 13a, srednji odnosno desni panel). U slučaju astrocita koji su bili u rastvoru bez  $\text{Ca}^{2+}$ , stimulacija 1 mM ATP je dovela do promena u parametrima mobilnosti Ly vezikula i to do povećanja TL i smanjenja MD. Parametar TL se povećao sa  $2,72 \pm 0,03 \mu\text{m}$  (n=745) na  $2,86 \pm 0,03 \mu\text{m}$  (n=757) u prva dva minuta i  $3,05 \pm 0,03 \mu\text{m}$  (n=796) u druga dva nakon stimulacije (slika 13b, levi panel). Parametar MD se blago, iako statistički značajno, smanjio sa  $0,41 \pm 0,01 \mu\text{m}$  na  $0,38 \pm 0,01 \mu\text{m}$  u prva dva minuta, dok se u druga dva nakon stimulacije vratio na polaznu vrednost  $0,41 \pm 0,01 \mu\text{m}$ . Promene u parametrima mobilnosti vide se kao pomeraji u desno (TL) i levo (MD) na graficima distribucije kumulativnih frekvencija (slika 13b, srednji i desni panel). Dakle, ATP stimulacija je dovela do promena u parametrima mobilnosti Ly vezikula. Kao i u slučaju ALS IgG parametar TL se povećao u uzastopnim periodima od po 2 minuta nakon stimulacije u rastvoru sa 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  2% odnosno 7% (slika 13c), dok su u istim periodima, u rastvoru bez  $\text{Ca}^{2+}$ , TL povećanja bila 5% odnosno 12%. Međutim, za razliku od ALS IgG-izazvanog odgovora, ATP aplikacija je izazvala smanjenje parametra MD za 7% i 12% (slika 13d) u prisustvu 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , dok je u odsustvu vanćelijskog



kalcijuma, MD prvo opao za 6%, a zatim se u druga dva minuta povećao za 1% u odnosu na vrednosti u nestimulisanim uslovima. Iako obe supstance (ALS IgG i ATP) menjaju parametre mobilnosti vezikula, verovatno je da od prisustva kalcijuma u citosolu zavisi u kom će se smeru modifikovati mobilnost Ly vezikula, ali se sa promenama  $[Ca^{2+}]_i$  menjaju i parametri mobilnosti.

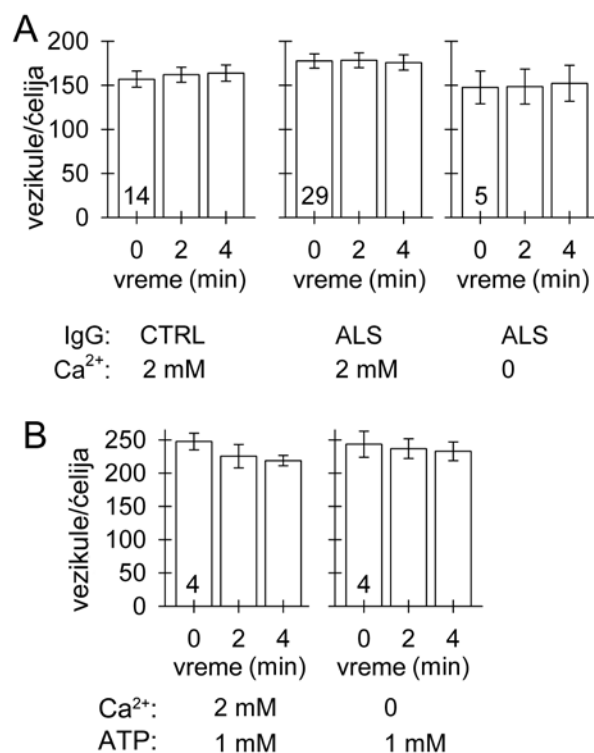


Slika 13. Spontana i ATP-izazvana mobilnost Ly vezikula pacovskih astrocita u kulturi. (a-b) Preklopljeni grafici frekventne raspodele dužine putanje (TL, paneli levo) netretiranih ćelija (crna kriva, a - n=788 i b - n=745 epoha vezikula), nakon 1 mM ATP tretmana u prvom dvominutnom periodu (tamno siva kriva, a - n=800 i b - n=757) i u drugom dvominutnom periodu (svetlo siva kriva, a - n=792 i b - n=796). ATP je izazvao povećanje TL (pomeraj maksimuma distribucije

frekvencija u desno ka većim vrednostima). Srednji i desni paneli: preklopljeni grafici distribucija kumulativnih frekvencija TL odnosno MD pre i nakon ATP stimulacije astrocita. Tipovi krivih su isti kao u panelima levo. ATP stimulacija ćelija izazvala je pomeranje TL u desno - ka većim vrednostima, pri čemu je pomeraj bio veći u rastvoru bez kalcijuma. \* $p < 0,05$  naspram nestimulisane kontrole. Histogrami c) i d) - poređenje srednjih vrednosti relativnih promena ( $\pm$  standardna greška, %) parametra TL odnosno MD u prva dva minuta (prvi par stubaca) i druga dva minuta (drugi par stubaca) nakon 1 mM ATP - tretmana u rastvoru sa (2 mM) ili bez (0 mM)  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **ALS IGG NE IZAZIVA IZLUČIVANJE SADRŽAJA OBELEŽENIH VEZIKULA**

Podaci iz literature govore da dugotrajna stimulacija astrocita čiji su lizozomi obeleženi bojom FM2-10, dovodi do gubitka fluorescencije obeleženih struktura zbog egzocitotskog izbacivanja sadržaja vezikula (*Zhang et al., 2007*). Stoga je analiziran ukupan broj Ly vezikula pre tretmana ALS IgG ili ATP i nakon tretmana u vremenskim intervalima od po 2 minuta, da bi se dobila informacija o eventualnom uticaju ove dve supstance na egzocitozu Ly vezikula. Za razliku od uticaja na mobilnost Ly vezikula, tretman astrocita 100  $\mu\text{g/ml}$  ALS IgG nije doveo do egzocitoze ovih vezikula (slika 14A). Brojanjem vezikula došlo se do sledećih vrednosti:  $157 \pm 9$  naspram  $162 \pm 9$  i  $164 \pm 9$  u ćelijama ( $n=14$ ) tretiranim sa kontrolnim IgG,  $177 \pm 8$  naspram  $178 \pm 8$  i  $176 \pm 9$  u ćelijama ( $n=29$ ) tretiranim sa ALS IgG, u rastvoru sa 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  i  $148 \pm 19$  naspram  $148 \pm 20$  i  $152 \pm 20$  u ćelijama ( $n=5$ ) bez vanćelijskog  $\text{Ca}^{2+}$ . IgG korišćeni u ovim eksperimentima poreklom su iz istih osoba čija su antitela korišćena za procene parametara mobilnosti. Kao i u slučaju ALS IgG, ni ATP nije doveo do značajnijeg izbacivanja sadržaja Ly vezikula, a brojevi vezikula su iznosili:  $247 \pm 13$  naspram  $225 \pm 18$  i  $219 \pm 8$ , i  $243 \pm 20$  naspram  $237 \pm 15$  i  $233 \pm 14$  (bez statističke značajnosti), u prisustvu odnosno odsustvu vanćelijskog  $\text{Ca}^{2+}$  (slika 14B).



**Slika 14. ALS IgG i ATP tretman astrocita ne dovode do egzocitoze Ly vezikula. (A-B)** Vremenski zavisne promene broja Ly vezikula (srednja vrednost  $\pm$  standardna greška) u astrocitima tretiranim sa 100  $\mu$ g/ml IgG (kontrolnim ili ALS) (A) i 1 mM ATP (B), pre tretmana, 2 minuta i 4 minuta nakon tretmana, u prisustvu ili odsustvu vanćelijskog kalcijuma, kako je označeno na legendama ispod slika. Brojevi u stupcima histograma označavaju broj ispitanih ćelija. Nijedan od tretmana nije doveo do egzocitoze Ly vezikula (tj. smanjenja broja obeleženih vezikula), pošto nema statističke značajnosti ni u jednom od ispitanih eksperimentalnih uslova.

## DISKUSIJA

---

Prvi zadatak ove teze bio je definisanje promena u kalcijumovoj homeostazi astrocita pacova u kulturi, koje izazivaju humani IgG izolovani iz seruma sALS pacijenata. Dosadašnji literaturni podaci ukazuju na specifičnosti ALS IgG, ali su studije retko bile usmerene ka detaljnom izučavanju efekta ovih antitela na glijalne ćelije. U ogledima na neuronima, između ostalog, utvrđeno je da ALS IgG mogu da utiču na oslobađanje neurotransmitera motoneurona (*Fratantoni et al., 2000; Pagani et al., 2006; Uchitel et al., 1988*), kao i na sinaptičku aktivnost glutamatergičnih sinapsi u CNS (*Andjus et al., 1996, 1997*). S druge strane, u pokušajima pronalaženja eventualnih efekata ALS IgG na glijalne ćelije, pokazan je citotoksični efekat ovih antitela na A172 ćelijsku liniju glioblastoma nakon jednočasovne ekspozicije (*Parkes et al. 1995*), ali se u studiji nije sugerisao potencijalan mehanizma dejstva ovog humoralnog imunskog faktora. Iako je demonstrirano izmenjeno signaliziranje kalcijumom u neuronima, niko nije proučavao direktan uticaj humoralnog imunskog odgovora na kalcijumovu homeostazu u astrocita.

U sisarskom mozgu, astrociti su najbrojnije ćelije i svojim protoplazmatskim nastavcima - stopalima su u direktnoj vezi sa endotelijalnim ćelijama koje formiraju HEB. Post mortem tkivo ALS pacijenata, pokazuje značajnu redukciju čvrstih membranskih veza (*eng. tight junctions*), kao i smanjenu ekspresiju athezionih proteina u nivou HEB, a dokumentovano je i curenje IgG kroz mikrokapilare u mozak (*Grabuzova-Davis et al., 2012*). Takođe, ispitivanjem ultrastrukture kapilara mozga kod simptomatičnih transgenih SOD1 miševa pokazana su oštećenja membrana endotelijuma i curenje vaskularnog sadržaja (*Grabuzova-Davis et al., 2007*). S obzirom na položaj, odmah uz endotelijalne ćelije, Ig koji cure kroz narušenu HEB prvo se sureću upravo sa astrocitima. Budući da je kalcijumova homeostaza esencijalna za preživljavanje i normalne signalne funkcije svake eukariotske ćelije, pri čemu čak i kratkotrajna povećanja citosolnog  $Ca^{2+}$  preko bazalnog nivoa mogu da ugroze život ćelije (*Case et al., 2007*), rasvetljavanje akutnog efekta ALS IgG na homeostazu kalcijuma u astrocita predstavlja prvi korak u razumevanju uticaja ovog humoralnog faktora na etiopatogenezu bolesti.

U skladu sa nekoliko funkcionalnih, neuro-imunoloških studija na neuronima (*Andjus et al., 1996, 1997; Fratantoni et al., 2000; Pagani et al., 2006; Uchitel et al., 1988*), rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da IgG kontrolnih subjekata retko (~8%) izazivaju povećanja koncentracije kalcijuma kod astrocita. Efekat ALS IgG bio je upravo suprotan, pošto antitela poreklom od 7 sALS bolesnika izazivaju kompleksne kalcijumove tranzijente u značajnoj frakciji (~48%) tretiranih ćelija (slika 2). S obzirom na evidentnu razliku između kontrolnih i ALS IgG, malo je verovatno da antitela reaguju sa strukturama ćelije svojim Fc delom, kao što je predloženo ranije (*Mohamed et al., 2002*), jer bi se onda očekivalo da i kontrolni i ALS IgG u sličnoj meri izazivaju odgovore astrocita. Stoga je izgleda Fab segment ALS IgG uključen u interakciju sa antigenom. Kratkotrajni akutni i specifični efekat ALS IgG na homeostazu kalcijuma nije uticao na funkcionalni integritet purinergičkih signalnih puteva kod astrocita, jer su sve ćelije izložene osmominutnom dejstvu IgG, na aplikaciju ATP odgovorile tipičnom dvofaznom kalcijumovim promenom (slike 2-4; *Nobile et al., 2003*).

Verovatnoća kojom ALS IgG izazivaju kalcijumove tranzijente nije zavisila od prisustva vanćelijskog kalcijuma (slika 3), a pokazalo se da su funkcionalni unutarćelijski depoi kalcijuma neophodni i dovoljni za ALS IgG-izazvano povećanje  $[Ca^{2+}]_i$ . Konceptualno sličan rezultat objavljen je u studiji na neuronima (*Andjus et al., 1997*), gde je fokalna aplikacija ALS IgG (100  $\mu\text{g/ml}$ ) na hipokampalne ćelije u rastvoru bez kalcijuma izazvala povećanje frekvencije minijaturnih ekscitatornih postsinaptičkih struja. Iako verovatnoća izazivanja kalcijumovih tranzijenata od strane ALS IgG nije zavisila od vanćelijskog kalcijuma, primećene su značajne razlike u obliku kalcijumovih talasa sa (2 mM) i bez (0 mM)  $[Ca^{2+}]_e$ . Jedna od značajnijih razlika javila se između vremenskih kašnjenja (vremenske razlike između trenutka aplikacije supstance i trenutka pojave maksimuma kalcijumovog talasa) ALS IgG efekta u ova dva uslova. U proseku, maksimum kalcijumovog talasa javljao se ~3 puta brže u prisustvu vanćelijskog kalcijuma u odnosu na  $[Ca^{2+}]_e=0$  mM (slika 4). Malo je verovatno da je ovaj rezultat posledica odloženog kontakta različitih ALS IgG sa površinom astrocita. Naime, u zavisnosti od koncentracije IgG rastvora, u komoricu u kojoj je na početku ogleđa bilo 200  $\mu\text{l}$  radnog rastvora, dodavano je 70-125  $\mu\text{l}$  IgG rastvora da bi se dobila finalna koncentracija od 100  $\mu\text{g/ml}$ . Stoga je

mešanje rastvora u komorici bilo skoro trenutno, pa je vreme od trenutka aplikacije do kontakta ALS IgG sa površinom astrocita bilo slično pri svakom dodavanju bez obzira na male razlike u zapreminama. Štaviše, isti rastvori antitela su korišćeni u obe ogleadne postavke, pa su i dodavane zapremine antitela istog porekla bile jednake. Daleko verovatnije objašnjenje ove pojave je biohemijska priroda interakcije antigen-antitelo, na koju može da utiče koncentracija kalcijuma (*O'Connor et al., 1998; Luttrell & Henniker, 1991*). U biohemijskoj studiji O'Connor i saradnika (1998), vezivanje antitela poreklom iz glodara za protein C bilo je 1,5-2 puta slabije u uslovima bez kalcijuma, dok je afinitet vezivanja humanog antitela u još većoj meri zavisio od prisustva kalcijuma s obzirom da je afinitet vezivanja bio 5 puta manji u uslovima bez kalcijuma (*O'Connor et al. 1998*). Veće kašnjenje maksimuma kalcijumovog talasa izazvanog ALS IgG u rastvoru bez kalcijuma može biti objašnjen smanjenim afinitetom vezivanja antitela za ciljani antigen(e) što je usporilo dalju signalizaciju i pojavu kalcijumovog talasa. Normalizovane vrednosti maksimuma ALS IgG-izazvanog kalcijumovog tranzijenta nisu se razlikovale u rastvorima sa (2 mM) i bez (0 mM)  $\text{Ca}^{2+}$ ; u proseku, maksimalna vrednost intenziteta fluorescencije kalcijumovog indikatora bila je 1,6 puta veća od bazalne, bez obzira na prisustvo vanćelijskog kalcijuma (slika 4). Stoga se može sugerisati da se maksimum citosolne koncentracije kalcijuma postiže mobilizacijom iz unutarćelijskih depoa, iako postoje indikacije o učešću plazma membranskih struktura u oblikovanju kalcijumskih talasa. Naime, ukupna povećanja relativne koncentracije kalcijuma, merena površinom ispod kalcijumskih talasa su u proseku bila ~1,7 puta veća u rastvoru sa (2 mM) u odnosu na rastvor bez (0 mM)  $\text{Ca}^{2+}$ , što govori da se bar ~60% kalcijuma u ovim odgovorima, mobilise iz unutarćelijskih organela, dok ostalih ~40% može da bude poreklom iz vanćelijskog prostora. Izgleda da putevi koji omogućavaju ulazak vanćelijskog kalcijuma pojačavaju kalcijumski odgovor koji se inicira unutar ćelije, produžavajući njegovo trajanje. Ovo je u saglasnosti sa opšteprihvaćenim mišljenjem da se kod astrocita, kao i kod mnogih drugih ćelija, početni odgovor generiše mobilizacijom  $\text{Ca}^{2+}$  iz unutarćelijskih depoa, što je praćeno aktivacijom kapacitativnog ulaska kalcijuma, pri čemu su za CCE kod astrocita izgleda odgovorni TRPC kanali (*Verkhatsky et al., 2012*); inicijalni odgovor je

brzo tranzijentno povećanje, praćeno dugotrajnijim događajem koji produžava kalcijumov talas i do nekoliko puta (*Kresse et al., 2005*).

U identifikaciji struktura koje su uključene u formiranje ALS IgG - izazvanih kalcijumovih talasa krenulo se od unutarćelijskih depoa. U studiji izvedenoj na neuronima, demonstrirano je da je ALS IgG-izazvana aktivacija  $IP_3$  odnosno Ry receptora u osnovi povećanih spontanih i asinhronih oslobađanja neurotransmitera (*Pagani et al., 2006*). U astrocitima, ER je dominantni izvor unutarćelijskog kalcijuma, a  $IP_3$  i Ry receptori otvaranjem pore posreduju u oslobađanju  $Ca^{2+}$  u citosol (*Parpura et al. 2011; Parpura & Zorec 2010*). U ovoj studiji,  $IP_3$  receptori imaju fundamentalnu ulogu u ALS IgG-izazvanom povećanju unutarćelijskog kalcijuma, dok Ry receptori ne utiču značajno (slika 5). Za razliku od neurona, astrociti eksprimiraju samo Ry receptor tipa 3 (*Matyash et al., 2002*), što može biti razlog manjeg uticaja Ry receptora u ALS IgG-izazvanom povećanju unutarćelijskog kalcijuma kod astrocita. Stoga se može zaključiti da  $IP_3$  put, nakon ALS IgG tretmana, posreduje u oslobađanju kalcijuma iz depoa kako u astrocitima, tako i u motoneuronima pri čemu je u slučaju astrocita odgovoran za inicijaciju porasta kalcijuma.

U identifikaciji enzima, postavljenih u ALS IgG signalizaciji uzvodno od  $IP_3$ , krenulo se od PLC, s obzirom na njenu ulogu u katalizovanju reakcije cepanja  $PIP_2$  na  $IP_3$  i DAG. Inhibicija PLC značajno je smanjila količinu kalcijuma u citoplazmi mobilisanog sa ALS IgG. Prolazno povećanje kalcijuma u ovim uslovima, iako se javilo u skoro polovini ispitanih ćelija, izuzetno je kratko trajalo; verovatno je poreklom iz vanćelijske sredine. S obzirom na kratko trajanje i malo ukupno povećanje kalcijuma (sudeći po vremenskom integralu promene, slika 7) u ovim uslovima, može se zaključiti da se blokiranjem PLC efekat ALS IgG na unutarćelijsko povećanje kalcijuma drastično ublažava. S obzirom na vanćelijsko poreklo ovog kalcijuma, a imajući u vidu tipove kanala koji propuštaju kalcijum na plazma membrani astrocita (*Verkhatsky et al., 2012*), detektovan kalcijumski talas pri inhibiranoj PLC (slika 6) najverovatnije je posredovan kratkotrajnim otvaranjem TRPC kanala. Naime, inhibiranjem PLC inhibirana je i degradacija  $PIP_2$ , supstrata ovog enzima. S druge strane  $PIP_2$  je jedan od supstrata PI3K, koja ga fosforilacijom pretvara u  $PIP_3$ , te je moguće očekivati da je pri inhibiciji PLC količina dostupnog  $PIP_3$  veća. Pokazano je da  $PIP_3$  indukuje struje kroz TRPC6 kanale (*Tseng et al., 2004*). Nekoliko

vrsta kanala iz TRPC familije ima mesto za vezivanje kalmodulina, koje, kad je okupirano kalmodulinom, inhibira aktivnost kanala. Ovaj inhibitorni uticaj na kanal može se sprečiti vezivanjem PIP<sub>3</sub> koji istiskuje kalmodulin sa vezujućeg mesta i posreduje u konformacionoj promeni koja rezultuje otvaranjem kanala (*Kwong et al., 2007*). Ukoliko pretpostavimo da je količina PIP<sub>3</sub> veća pri inhibiciji PLC, veća je i verovatnoća uklanjanja inhibitornog delovanja kalmodulina na TRPC kanale, pa je moguće prolazno povećanje provodljivosti ovih kanala.

Blokiranjem aktivnosti PI3K sprečen je klasičan ALS IgG efekat, samo se u nekim slučajevima moglo detektovati naknadno sporo povećanje unutarćelijskog kalcijuma male amplitude (slika 6). Poreklo ovog malog i sporog povećanja kalcijuma nije utvrđeno, ali s obzirom na intenzitet i dinamiku, može se pretpostaviti da je posledica curenja unutarćelijskih depoa. Poznato je da postoji više vrsta PLC, pri čemu je za aktivaciju PLC $\gamma$  potrebna fosforilacija ovog enzima, kao i translokacija ka membrani. Receptor tirozin kinaze (RTK) su obično odgovorne za fosforilaciju PLC $\gamma$ . Ova reakcija je posredovana prepoznavanjem fosfotirozinske sekvence RTK i SH2 (*eng. Src homology domain 2*) domena PLC $\gamma$ . Osim SH2 domena, PLC $\gamma$ , na svom N-terminalnom kraju ima PH (*eng. pleckstrin homology*) domen za koji se smatra da vezivanjem PIP<sub>3</sub> posreduje u interakciji PLC $\gamma$  sa plazma membranom (*Falasca et al., 1998; Schlessinger, 2000*). Pošto količinu dostupnog PIP<sub>3</sub> diktira aktivnost PI3K, PLC $\gamma$  se u ovom signalnom putu najverovatnije nalazi nizvodno od PI3K (*Piccolo et al., 2002; Schlessinger, 2000*). S druge strane, inhibiranje PI3K ne sprečava ATP-izazvane kalcijumove talase (slika 6), koji mogu da budu posledica aktivacije PLC $\beta$  (*Salter & Hicks, 1995*). Ovaj nalaz, iako indirektno, ukazuje da je u ALS IgG signalni put kod astrocita najverovatnije uključena PLC uzvodno od IP<sub>3</sub>. Konceptualno vrlo slični rezultati dobijeni su u studiji na neuronima, gde je inhibicija PLC sprečila ALS IgG-izazvana povećanja spontanog i asinhronog oslobađanja neurotransmitera, pri čemu su autori приметили da inhibicija tirozin fosfataza može da indukuje ALS IgG-sličan efekat manje amplitude i kraćeg vremenskog profila (*Pagani et al., 2006*). Stoga se može zaključiti da je ALS IgG-izazvana signalna kaskada i kod astrocita i kod neurona na putu do aktivacije IP<sub>3</sub> receptora na ER zahteva aktivaciju PI3K i PLC (najverovatnije tipa  $\gamma$ ). Imajući u vidu da PI3K ima SH2 domen koji interaguje



sa fosfotirozinskom sekvencom RTK, te da RTK može da aktivira PI3K (*Schlessinger, 2000*), može se spekulirati da neki od RTK verovatno sadrži sekvencu na vanćelijskom domenu koju ALS IgG može da prepozna kao antigen.

Konačno, blokiranjem TRPC kanala trovalentnim katjonima i kvantifikacijom ALS IgG-izazvanog efekta pokazano je da je količina mobilisanog kalcijuma u tim uslovima uporediva sa količinom mobilisanog kalcijuma kada su astrociti bili u vanćelijskom rastvoru bez ovog elementa (slika 7), što potvrđuje prethodno iznet zaključak da vanćelijski kalcijum učestvuje u oblikovanju ALS IgG-izazvane promene kalcijuma, a ovaj efekat je najverovatnije posredovan TRPC kanalima na plazma membrani astrocita.

Drugi zadatak ove teze odnosio se na ispitivanje efekta ALS IgG na mobilnost astrocitnih vezikula. U studiji mobilnosti kiselih vezikula astrocita korišćena je boja, *lizotreker*, koja predominantno boji endozome i lizosome (*Potokar et al., 2010*). Spontano kretanje ovako obeleženih, Ly vezikula bilo je vrlo kompleksno, a sastojalo se od pokreta “napred i nazad” koji su bili prekinuti periodima mirovanja. Sličan način kretanja endozoma koji sadrže lipoproteine niske gustine u astrocita opisali su ranije Ichikawa i saradnici (2000). Iako su bile veoma brze ( $\sim 0,2 \mu\text{m/s}$ ), usmerenost 77% vezikula je bila veoma mala sa indeksima usmerenosti, DI od  $\sim 0,09$ , zbog čega je veoma mala verovatnoća da one ciljano stignu do određenog lokaliteta u ćeliji za kratko vreme. Samo se mala frakcija (0,52%) Ly vezikula kretala znatno brže ( $\sim 0,34 \mu\text{m/s}$ ), sa izraženom usmerenošću kretanja ( $\text{DI}=0,83 \pm 0,02$ ). Kretanja ove subpopulacije Ly vezikula bila su znatno brža od prethodno kvantifikovanih brzih endozomalnih vezikula ( $0,04\text{-}0,24 \mu\text{m/s}$ ; *Ichikawa et al., 2000*) i više su odgovarala kretanjima egzocitotskih peptidergičkih vezikula usmerenih ka plazma membrani čije je kretanje vođeno citoskeletom (*Potokar et al., 2005, 2007*). Uzimajući u obzir poluprečnik astrocita koji je oko  $20 \mu\text{m}$  (*Ichikawa et al., 2000*), brze Ly vezikule mogle bi da prenesu svoj sadržaj sa bilo kog mesta u ćeliji do plazma membrane u roku od 1 min u proseku, gde bi mogle da isprazne svoj sadržaj van ćelije, nakon egzocitotskog stimulusa (*Parpura et al., 1994; Kržan et al., 2003; Ramamoorthy & Whim, 2008; Pangršič et al., 2007*).

Uprkos značajnom povećanju parametara mobilnosti Ly vezikula, nijedan od tretmana (ALS IgG i ATP) nije doveo do merljive kvantifikacije egzocitoze praćenih vezikula, ukazujući na brzu i kompletnu egzocitozu vezikula kao na malo verovatnu pojavu u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Nedostatak egzocitoze lizozoma može se objasniti veoma sporim molekularnim mehanizmom koji dovodi do fuzije vezikula sa membranom u astroglialnim ćelijama, koji zahteva veliko ( $K_d \sim 20 \mu\text{M}$ , *Kreft et al., 2004*) i dugotrajno povećanje unutarćelijskog kalcijuma da bi se egzocitoza dogodila (*Li et al., 2008*). Izgleda da samo u uslovima oštećenja membrane i masivnog i dugotrajnog povećanje kalcijuma, koji se obezbeđuju primenom kalcijumove jonofore ili mehaničkom stimulacijom, može da se registruje asinhrona i kompletna egzocitoza lizozoma (*Jaiswal et al., 2007; Li et al., 2008*).

Analiza parametara mobilnosti vezikula sekretornog puta astrocita pokazala je da su, za razliku od kontrolnih IgG, IgG izolovani iz ALS bolesnika povećali mobilnost endocitotskih vezikula i lizozoma. Iako se mobilnost vezikula povećala, zapaženo je veoma malo povećanje parametra usmerenosti vezikula (sa 0,16 pre tretmana na 0,17 u četvorominutnom periodu nakon tretmana). Ovo može da znači da je citoskelet, kao struktura koja pomaže u usmeravanju kretanja vezikula (*Soldati & Schliwa, 2006*), ostao očuvan i održao svoj strukturni integritet. S druge strane, s obzirom na ALS IgG-izazvano povećanje brzine vezikula, izgleda da se povećala efikasnost kretanja vezikula po citoskeletnom supstratu. Moguće je da ALS IgG direktno ili indirektno utiče na interakcije vezikula sa dineinskim ili kinezinskim proteinima za koje se smatra da su asocirani sa endozomima astrocita (*Ichikawa et al., 2000*) i adrenokortikalnih ćelija (*Kimoto et al., 2009*). Većina praćenih vezikula u ovoj studiji je često menjala usmerenost što je u skladu sa gledištem da u kretanju endocitotskih vezikula pomažu kinezinski i dineinski motori. Naime, za vreme šetnje duž mikrotubule, vezikula može da se otkaçi od nje zbog termodinamičkih fluktuacija. U sledećem koraku, vezikula može da se zakaçi za motor druge mikrotubule, pri čemu će dalji smer kretanja vezikule zavisiti od tipa motora (da li vuče ka centru ili periferiji ćelije) i položaja date mikrotubule u odnosu na prethodnu. Ukupno kretanje vezikula dovešće, u ovakvoj postavci, do neuređenog kretanja duž citoskeleta, malo ka centru, malo ka periferiji, kao što se zapaža u oglecima. ALS IgG-

izazvana povećana mobilnost, pri ovakvom tipu kretanja, mogla bi da bude posledica produženog udruživanja vezikula sa kinezinskim ili dineinskim motornim proteinima ili može da ukaže da se veći broj molekularnih motora udružuje sa vezikulom, te dovodi do većeg neto pomaka u određenom smeru.

ALS IgG u sprovedenim ogledima izazivali su povećanje parametara mobilnosti i u rastvoru bez kalcijuma, što znači da vanćelijski kalcijum nije ograničavajući faktor. Povećanja ALS IgG-izazvane mobilnosti bila su manjih razmera u uslovima bez vanćelijskog kalcijuma u odnosu na  $[Ca^{2+}]_e=2$  mM. Međutim, nakon ATP tretmana, koji takođe povećava unutarćelijsku koncentraciju kalcijuma, parametri mobilnosti vezikula su se smanjili. Imajući u vidu da ALS IgG i ATP signaliziraju različitim putevima (što je nagovešteno u prvom delu Diskusije) i da mobilišu različite količine kalcijuma, pri čemu ATP izaziva veća neto povećanja kalcijuma, moguće je da signalni put kojim vanćelijska supstanca prenosi informaciju ćeliji određuje tip promene izazvane mobilnosti i/ili da je kriva zavisnosti mobilnosti vezikula od koncentracije slobodnog kalcijuma zvonastog oblika.

Konačno, detektovano povećanje dinamike saobraćaja vezikula sekretornog puta za ~20% nakon tretmana ALS IgG, može da bude odraz povećane dinamike endocitoze, što bi značilo da se određene strukture efikasnije uklanjaju sa plazma membrane. Imajući u vidu pretpostavljeno učešće RTK (opisano ranije u Diskusiji) u posredovanju prenošenja ALS IgG signala u ćeliju, intracelularnu lokalizaciju IgG u post mortem moždanom tkivu ALS bolesnika (*Engelhardt et al., 2005*), kao i činjenicu da RTK po vezivanju liganda ulazi u endocitotski put koji se završava razgradnjom receptora (*Schlessinger, 2000*), moguće je pretpostaviti da je detektovano povećanje dinamike kretanja endozoma i lizozoma u astrocita nakon izlaganja ALS IgG verovatno posledica endocitoze i razgradnje kompleksa ligand-receptor.

Rezultati izneti u ovoj doktorskoj disertaciji odražavaju promenjenu homeostazu kalcijuma i status mobilnosti vezikula sekretornog puta u vremenima do 10 minuta nakon akutnog izlaganja astrocita ALS IgG. S druge strane, hronična izloženost ovom humoralnom imunskom faktoru dovodi do degeneracije motoneurona, kao što je pokazano u ogledima sa

pasivnim transferom ALS IgG u miša (*Appel et al., 1991; Pullen et al., 2004*), kao i do apoptoze motoneurona u *in vitro* uslovima (*Demestre et al., 2005*). Kao što je primećeno u ogledima na mešovitoj kulturi kičmene moždine, astrociti su izgleda manje osetljivi na ALS IgG od motoneurona (*Demestre et al., 2005*), ali to ne isključuje mogućnost da ALS IgG aktivira astrocite koji onda štetno utiču na motoneurone (*Pehar et al., 2004*). ALS IgG izaziva povećanje unutarćelijskog kalcijuma astrocita (slike 2, 3 i 4) koje može da izazove oslobađanje glutamata iz astrocita vezikularnom egzocitozom (*Malarkey & Parpura, 2008*), a prekomerna količina glutamata vodi ekscitotoksičnosti i selektivnom gubitku motoneurona tokom vremena. Štaviše, gustina EAAT2 na plazma membrani astrocita je regulisana kalcijum zavisnim procesima egzo- i endocitoze (*Stenovec et al., 2008*). Izmenjeno kretanje EAAT2 ka ili od membrane može da dovede do smanjenog neto preuzimanja vanćelijskog glutamata, koji se onda akumulira u sinaptičkoj pukotini. Smanjena aktivnost astrocita u uklanjanju glutamata i njegovo nagomilavanje neminovno vodi ekscitotoksičnoj smrti okolnih neurona (*Grosskreutz et al., 2010*). S druge strane, PI3K je enzim uključen u ALS IgG signalni put (pokazano inhibicijom enzima na slici 6), koji svojim delovanjem povećava količinu PIP<sub>3</sub> u ćeliji. PIP<sub>3</sub> se obično vezuje za PH domene drugih enzima, utičući tako na njihovu aktivnost. Identifikovano je približno 50 proteina koji sadrže SH domen, a koji mogu da budu potencijalne tačke PI3K regulacije (*Stiles, 2009*). Između ostalog, PI3K aktivira AKT kinazu i tako stimuliše ćelijski rast i proliferaciju. Da li ALS IgG može da utiče na pojavu astroglioze ostaje da se proveriti, ali bi posledice ovakve aktivacije bile štetne po neurone, između ostalog zbog lučenja štetnih materija, problema preuzimanja glutamata i problema u održavanju homeostaze K<sup>+</sup> jona, kao što je opisano u Uvodu. Bez obzira na sva moguća scenarija dugoročnog delovanja ALS IgG na astrocite, u ovom radu je pokazano da pored neurona (*Pagani et al., 2006*), astrociti predstavljaju još jednu ćelijsku metu humoralnog imunskog odgovora, koja može da doprinese etiopatogenezi amiotrofične lateralne skleroze.

# ZAKLJUČCI

---

Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj disertaciji mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Za razliku od imunoglobulina G izolovanih iz kontrolnih osoba, imunoglobulin G izolovan iz ALS bolesnika izazvao je prolazne kalcijumove talase kod ~50% tretiranih astrocita. Tipovi prolaznih povećanja unutarćelijskog kalcijuma izazvani sa ALS IgG mogu se svrstati u tri grupe: pojedinačna tranzijentna promena  $[Ca^{2+}]_i$ , kompleksna promena sa mnogo šiljkova usled visokofrekventnih rafalnih promena  $[Ca^{2+}]_i$  i repetitivna povećanja  $[Ca^{2+}]_i$  koja se sastoje od nekoliko pojedinačnih tranzijentnih promena  $[Ca^{2+}]_i$ , razdvojenih u vremenu i varijabilnog intenziteta amplitude šiljka.
2. Prisustvo kalcijuma u vanćelijskom rastvoru nije ograničavajući faktor za pojavu ALS IgG-izazvanih promena  $[Ca^{2+}]_i$  i ne utiče na verovatnoću pojave ove tranzijentne promene.
3. Prisustvo kalcijuma u vanćelijskom rastvoru ~3 puta ubrzava ALS IgG-izazvan nastanak prolaznog kalcijumovog talasa, ali ne utiče na njegovu amplitudu. U odnosu na uslove bez vanćelijskog kalcijuma, ukupno povećanje unutarćelijskog kalcijuma je za ~40% veće u prisustvu 2 mM  $Ca^{2+}$  u rastvoru.
4. Blokodom IP3, ali ne i Ry receptora sprečava se ALS IgG-izazvano prolazno povećanje unutarćelijskog kalcijuma u rastvoru bez  $Ca^{2+}$ .
5. U rastvoru sa 2 mM  $Ca^{2+}$ , inhibicija PLC drastično smanjuje, dok inhibicija PI3K potpuno ukida prolazna povećanja unutarćelijskog kalcijuma astrocita tretiranih sa ALS IgG.
6. Blokiranjem TRPC kanala na plazma membrani u uslovima  $[Ca^{2+}]_e=2$  mM, ukupno povećanje unutarćelijskog kalcijuma nakon tretmana sa ALS IgG poredivo je sa ukupnim povećanjem izazvanim ovim antitelima u uslovima bez vanćelijskog kalcijuma.

7. Za razliku od kontrolnih, ALS IgG izazvao je povećanje brzine i maksimalnog pomaka endozomalnih i lizosomalnih (Ly) vezikula astrocita, pri čemu su ovi efekti bili izraženiji u prisustvu vanćelijskog kalcijuma.
8. ATP stimulacija takođe je uticala na povećanje brzine endozomalnih i lizosomalnih vezikula, ali se ovaj proces razlikovo od ALS IgG-izazvanog, jer je povećanje bilo izraženije u odsustvu vanćelijskog kalcijuma i manje u odnosu na ALS IgG-izazvano povećanje brzine. Takođe, maksimalni pomak je pri  $[Ca^{2+}]_e=2$  mM bio daleko manji nego spontani, dok se pri  $[Ca^{2+}]_e=0$  mM početno smanjenje vratilo na nivo u spontanim uslovima.
9. Nijedan od tretmana (ALS IgG i ATP) nije doveo do egzocitoze Ly vezikula.

# LITERATURA

---

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2007. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: Saunders Elsevier
- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7(1):41-53.
- Abe K, Pan LH, Watanabe M, Kato T, Itoyama Y. 1995. Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 199(2):152-154.
- Abhinav K, Stanton B, Johnston C, Hardstaff J, Orrell RW, Howard R, Clarke J, Sakel M, Among MA, Shaw CE and others. 2007. Amyotrophic lateral sclerosis in South-East England: a population-based study. The South-East England register for amyotrophic lateral sclerosis (SEALS Registry). *Neuroepidemiology* 29(1-2):44-48.
- Adam-Vizi V. 2005. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal* 7(9-10):1140-1149.
- Alexianu ME, Kozovska M, Appel SH. 2001. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* 57(7):1282-1289.
- Alexianu ME, Mohamed AH, Smith RG, Colom LV, Appel SH. 1994. Apoptotic cell death of a hybrid motoneuron cell line induced by immunoglobulins from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 63(6):2365-2368.
- Anand P, Parrett A, Martin J, Zeman S, Foley P, Swash M, Leigh PN, Cedarbaum JM, Lindsay RM, Williams-Chestnut RE and others. 1995. Regional changes of ciliary

neurotrophic factor and nerve growth factor levels in post mortem spinal cord and cerebral cortex from patients with motor disease. *Nat Med* 1(2):168-172.

Andersen P. 2003. Genetic Aspects of Amyotrophic Lateral Sclerosis/Motor Neuron Disease. In: Shaw PJ, Strong MJ, editors. *Motor neuron disorders*. Philadelphia: Butterworth-Heinemann. p 207-208.

Andersen P. 2006. Amyotrophic Lateral Sclerosis Genetics with Mendelian Inheritance. In: Brown RH SM, Pasinelli P, editor. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*: Informa Healthcare UK Ltd. p 187-207.

Andjus PR, Khiroug L, Nistri A, Cherubini E. 1996. ALS IgGs suppress  $[Ca^{2+}]_i$  rise through P/Q-type calcium channels in central neurones in culture. *Neuroreport* 7(12):1914-1916.

Andjus PR, Stevic-Marinkovic Z, Cherubini E. 1997. Immunoglobulins from motoneurone disease patients enhance glutamate release from rat hippocampal neurones in culture. *J Physiol* 504(Pt 1):103-112.

Apostolski S, Nikolic J, Bugarski-Prokopljjevic C, Miletic V, Pavlovic S, Filipovic S. 1991. Serum and CSF immunological findings in ALS. *Acta Neurol Scand* 83(2):96-98.

Appel SH, Engelhardt JI, Garcia J, Stefani E. 1991. Immunoglobulins from animal models of motor neuron disease and from human amyotrophic lateral sclerosis patients passively transfer physiological abnormalities to the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(2):647-651.

Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y and others. 2006. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351(3):602-611.



- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG. 2001. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol* 63:795-813.
- Atkin JD, Farg MA, Turner BJ, Tomas D, Lysaght JA, Nunan J, Rembach A, Nagley P, Beart PM, Cheema SS and others. 2006. Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *J Biol Chem* 281(40):30152-30165.
- Banci L, Bertini I, Boca M, Giroto S, Martinelli M, Valentine JS, Vieru M. 2008. SOD1 and amyotrophic lateral sclerosis: mutations and oligomerization. *PLoS One* 3(2):e1677.
- Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, Estevez AG, Beckman JS. 2004. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev* 47(1-3):263-274.
- Barber SC, Shaw PJ. 2010. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med* 48(5):629-641.
- Bartfeld H, Dham C, Donnenfeld H, Jashnani L, Carp R, Kascsak R, Vilcek J, Rapport M, Wallenstein S. 1982. Immunological profile of amyotrophic lateral sclerosis patients and their cell-mediated immune responses to viral and CNS antigens. *Clin Exp Immunol* 48(1):137-146.
- Bataveljic D, Nikolic L, Milosevic M, Todorovic N, Andjus PR. 2012. Changes in the astrocytic aquaporin-4 and inwardly rectifying potassium channel expression in the brain of the amyotrophic lateral sclerosis SOD1G93A rat model. *Glia* Accepted for publication, DOI 10.1002/glia.22414

- Beal MF, Ferrante RJ, Browne SE, Matthews RT, Kowall NW, Brown RH, Jr. 1997. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 42(4):644-654.
- Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC. 2002. Control of synaptic strength by glial TNF $\alpha$ . *Science* 295(5563):2282-2285.
- Beckman JS, Koppenol WH. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271(5 Pt 1):C1424-1437.
- Beers DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J, Appel SH. 2008. CD4<sup>+</sup> T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(40):15558-15563.
- Bendotti C, Tortarolo M, Suchak SK, Calvaresi N, Carvelli L, Bastone A, Rizzi M, Rattray M, Mennini T. 2001. Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels. *J Neurochem* 79(4):737-746.
- Bennett MR, Farnell L, Gibson WG. 2005. A quantitative model of purinergic junctional transmission of calcium waves in astrocyte networks. *Biophys J* 89(4):2235-2250.
- Bennett MR, Farnell L, Gibson WG. 2009. P2X7 regenerative-loop potentiation of glutamate synaptic transmission by microglia and astrocytes. *J Theor Biol* 261(1):1-16.
- Bergersen LH, Morland C, Ormel L, Rinholm JE, Larsson M, Wold JF, Roe AT, Stranna A, Santello M, Bouvier D and others. 2012. Immunogold detection of L-glutamate and D-serine in small synaptic-like microvesicles in adult hippocampal astrocytes. *Cereb Cortex* 22(7):1690-1697.

- Bezprozvanny I. 2005. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium* 38(3-4):261-272.
- Blanc EM, Keller JN, Fernandez S, Mattson MP. 1998. 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, impairs glutamate transport in cortical astrocytes. *Glia* 22(2):149-160.
- Bogaert E, Van Damme P, Poesen K, Dhondt J, Hersmus N, Kiraly D, Scheveneels W, Robberecht W, Van Den Bosch L. 2010. VEGF protects motor neurons against excitotoxicity by upregulation of GluR2. *Neurobiol Aging* 31(12):2185-2191.
- Boveris A. 1977. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol* 78:67-82.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brene S, Messer C, Okado H, Hartley M, Heinemann SF, Nestler EJ. 2000. Regulation of GluR2 promoter activity by neurotrophic factors via a neuron-restrictive silencer element. *Eur J Neurosci* 12(5):1525-1533.
- Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. 2000. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1(5):293-299.
- Bruening W, Roy J, Giasson B, Figlewicz DA, Mushynski WE, Durham HD. 1999. Up-regulation of protein chaperones preserves viability of cells expressing toxic Cu/Zn-superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 72(2):693-699.

- Bruijn LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL and others. 1997. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18(2):327-338.
- Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW. 1998. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281(5384):1851-1854.
- Byrne S, Walsh C, Lynch C, Bede P, Elamin M, Kenna K, McLaughlin R, Hardiman O. 2011. Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82(6):623-627.
- Caldero J, Brunet N, Tarabal O, Piedrafita L, Hereu M, Ayala V, Esquerda JE. 2010. Lithium prevents excitotoxic cell death of motoneurons in organotypic slice cultures of spinal cord. *Neuroscience* 165(4):1353-1369.
- Carpenter S. 1968. Proximal axonal enlargement in motor neuron disease. *Neurology* 18(9):841-851.
- Carriedo SG, Sensi SL, Yin HZ, Weiss JH. 2000. AMPA exposures induce mitochondrial Ca(2+) overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *J Neurosci* 20(1):240-250.
- Case RM, Eisner D, Gurney A, Jones O, Muallem S, Verkhratsky A. 2007. Evolution of calcium homeostasis: from birth of the first cell to an omnipresent signalling system. *Cell Calcium* 42(4-5):345-350.

- Centemeri C, Bolego C, Abbracchio MP, Cattabeni F, Puglisi L, Burnstock G, Nicosia S. 1997. Characterization of the Ca<sup>2+</sup> responses evoked by ATP and other nucleotides in mammalian brain astrocytes. *Br J Pharmacol* 121(8):1700-1706.
- Chi L, Ke Y, Luo C, Li B, Gozal D, Kalyanaraman B, Liu R. 2006. Motor neuron degeneration promotes neural progenitor cell proliferation, migration, and neurogenesis in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis mice. *Stem Cells* 24(1):34-43.
- Chiu IM, Chen A, Zheng Y, Kosaras B, Tsiftoglou SA, Vartanian TK, Brown RH, Jr., Carroll MC. 2008. T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(46):17913-17918.
- Chou SM, Wang HS, Komai K. 1996. Colocalization of NOS and SOD1 in neurofilament accumulation within motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat* 10(3-4):249-258.
- Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Moshier DF, Bornstein P, Barres BA. 2005. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120(3):421-433.
- Corbo M, Hays AP. 1992. Peripherin and neurofilament protein coexist in spinal spheroids of motor neuron disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 51(5):531-537.
- Coyle JT, Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262(5134):689-695.
- Cozzolino M, Ferri A, Carri MT. 2008. Amyotrophic lateral sclerosis: from current developments in the laboratory to clinical implications. *Antioxid Redox Signal* 10(3):405-443.

- Demestre M, Pullen A, Orrell RW, Orth M. 2005. ALS-IgG-induced selective motor neurone apoptosis in rat mixed primary spinal cord cultures. *J Neurochem* 94(1):268-275.
- Dhaliwal GK, Grewal RP. 2000. Mitochondrial DNA deletion mutation levels are elevated in ALS brains. *Neuroreport* 11(11):2507-2509.
- Ding WX, Yin XM. 2008. Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy* 4(2):141-150.
- Doble A. 1999. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* 81(3):163-221.
- Drachman DB. 2000. Does autoimmunity play role in amyotrophic lateral sclerosis? In: Brown RH MV, Swash M editor. *Amyotrophic lateral sclerosis*. London: Dunitz. p 327-339.
- Drachman DB, Frank K, Dykes-Hoberg M, Teismann P, Almer G, Przedborski S, Rothstein JD. 2002. Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol* 52(6):771-778.
- Drewes LR. 1998. Biology of the blood-brain glucose transporter In: Pardridge WM, editor. *Introduction to the Blood-Brain Barrier: Methodology, Biology and Pathology*: Cambridge University Press. p 165-175.
- Duarte F, Binet S, Lacomblez L, Bouche P, Preud'homme JL, Meininger V. 1991. Quantitative analysis of monoclonal immunoglobulins in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 104(1):88-91.

- Dugan LL, Bruno VM, Amagasu SM, Giffard RG. 1995. Glia modulate the response of murine cortical neurons to excitotoxicity: glia exacerbate AMPA neurotoxicity. *J Neurosci* 15(6):4545-4555.
- Dulhunty AF, Pouliquin P. 2003. What we don't know about the structure of ryanodine receptor calcium release channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30(10):713-723.
- Durham HD, Roy J, Dong L, Figlewicz DA. 1997. Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(5):523-530.
- Dykens JA. 1994. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated  $Ca^{2+}$  and  $Na^{+}$ : implications for neurodegeneration. *J Neurochem* 63(2):584-591.
- Eisen A. 2009. Amyotrophic lateral sclerosis: A 40-year personal perspective. *J Clin Neurosci* 16(4):505-512.
- Ekester E. 2004. Neurotrophic factors and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis* 1(2-3):88-100.
- Elliott JL, Snider WD. 1996. Motor neuron growth factors. *Neurology* 47(4 Suppl 2):S47-53.
- Engelhardt JI, Appel SH. 1990. IgG reactivity in the spinal cord and motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 47(11):1210-1216.
- Engelhardt JI, Siklos L, Komuves L, Smith RG, Appel SH. 1995. Antibodies to calcium channels from ALS patients passively transferred to mice selectively increase intracellular calcium and induce ultrastructural changes in motoneurons. *Synapse* 20(3):185-199.

- Engelhardt JI, Soos J, Obal I, Vigh L, Siklos L. 2005. Subcellular localization of IgG from the sera of ALS patients in the nervous system. *Acta Neurol Scand* 112(2):126-133.
- Engelhardt JI, Tajti J, Appel SH. 1993. Lymphocytic infiltrates in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 50(1):30-36.
- Faissner A, Steindler D. 1995. Boundaries and inhibitory molecules in developing neural tissues. *Glia* 13(4):233-254.
- Falasca M, Logan SK, Lehto VP, Baccante G, Lemmon MA, Schlessinger J. 1998. Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *Embo J* 17(2):414-422.
- Farina C, Aloisi F, Meinl E. 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28(3):138-145.
- Farquhar MG. 1985. Progress in unraveling pathways of Golgi traffic. *Annu Rev Cell Biol* 1:447-488.
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G. 2004. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43(5):729-743.
- Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U, Kowall NW, Brown RH, Jr., Beal MF. 1997. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 69(5):2064-2074.
- Ferri A, Cozzolino M, Crosio C, Nencini M, Casciati A, Gralla EB, Rotilio G, Valentine JS, Carri MT. 2006. Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(37):13860-13865.



- Fiocco TA, McCarthy KD. 2004. Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 24(3):722-732.
- Fields RD, Stevens-Graham B. 2002. New insights into neuron-glia communication. *Science* 298(5593):556-562.
- Figlewicz DA, Krizus A, Martinoli MG, Meininger V, Dib M, Rouleau GA, Julien JP. 1994. Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 3(10):1757-1761.
- Fitzmaurice PS, Shaw IC, Kleiner HE, Miller RT, Monks TJ, Lau SS, Mitchell JD, Lynch PG. 1996. Evidence for DNA damage in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 19(6):797-798.
- Forbes RB, Colville S, Swingler RJ. 2004. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS/MND) in people aged 80 or over. *Age Ageing* 33(2):131-134.
- Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsuchenka O, Ferrucci M, Manca ML, Lazzeri G, Spalloni A, Bellio N, Lenzi P and others. 2008. Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(6):2052-2057.
- Fratantoni SA, Weisz G, Pardal AM, Reisin RC, Uchitel OD. 2000. Amyotrophic lateral sclerosis IgG-treated neuromuscular junctions develop sensitivity to L-type calcium channel blocker. *Muscle Nerve* 23(4):543-550.
- Fray AE, Ince PG, Banner SJ, Milton ID, Usher PA, Cookson MR, Shaw PJ. 1998. The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study. *Eur J Neurosci* 10(8):2481-2489.

- Fujita Y, Mizuno Y, Takatama M, Okamoto K. 2008. Anterior horn cells with abnormal TDP-43 immunoreactivities show fragmentation of the Golgi apparatus in ALS. *J Neurol Sci* 269(1-2):30-34.
- Gafni J, Munsch JA, Lam TH, Catlin MC, Costa LG, Molinski TF, Pessah IN. 1997. Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* 19(3):723-733.
- Gal J, Strom AL, Kwinter DM, Kilty R, Zhang J, Shi P, Fu W, Wooten MW, Zhu H. 2009. Sequestosome 1/p62 links familial ALS mutant SOD1 to LC3 via an ubiquitin-independent mechanism. *J Neurochem* 111(4):1062-1073.
- Garbuzova-Davis S, Haller E, Saporta S, Kolomey I, Nicosia SV, Sanberg PR. 2007. Ultrastructure of blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in SOD1 mice modeling ALS. *Brain Res* 9:126-137.
- Garbuzova-Davis S, Hernandez-Ontiveros DG, Rodrigues MC, Haller E, Frisina-Deyo A, Mirtyl S, Sallot S, Saporta S, Borlongan CV, Sanberg PR. 2012. Impaired blood-brain/spinal cord barrier in ALS patients. *Brain Res* 21:114-128.
- Garwood J, Rigato F, Heck N, Faissner A. 2001. Tenascin glycoproteins and the complementary ligand DSD-1-PG/ phosphacan--structuring the neural extracellular matrix during development and repair. *Restor Neurol Neurosci* 19(1-2):51-64.
- Gasque P. 2004. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol* 41(11):1089-1098.
- Golovina VA. 2005. Visualization of localized store-operated calcium entry in mouse astrocytes. Close proximity to the endoplasmic reticulum. *J Physiol* 564(Pt 3):737-749.

- Gonatas NK, Stieber A, Mourelatos Z, Chen Y, Gonatas JO, Appel SH, Hays AP, Hickey WF, Hauw JJ. 1992. Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 140(3):731-737.
- Gouveia LO, de Carvalho M. 2007. Young-onset sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a distinct nosological entity? *Amyotroph Lateral Scler* 8(6):323-327.
- Gowing G, Philips T, Van Wijmeersch B, Audet JN, Dewil M, Van Den Bosch L, Billiau AD, Robberecht W, Julien JP. 2008. Ablation of proliferating microglia does not affect motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase. *J Neurosci* 28(41):10234-10244.
- Grierson AJ MC. 2006. Axonal transport and amyotrophic lateral sclerosis In: Brown Jr RH SM, Pasinelli P, editor. *Amyotrophic lateral sclerosis* 2nd ed: Informa healthcare. p 309-318.
- Griffiths G, Hoflack B, Simons K, Mellman I, Kornfeld S. 1988. The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* 52(3):329-341.
- Grimaldi M, Maratos M, Verma A. 2003. Transient receptor potential channel activation causes a novel form of [Ca<sup>2+</sup>] oscillations and is not involved in capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in glial cells. *J Neurosci* 23(11):4737-4745.
- Gros-Louis F, Gaspar C, Rouleau GA. 2006. Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762(11-12):956-972.
- Gros-Louis F, Lariviere R, Gowing G, Laurent S, Camu W, Bouchard JP, Meininger V, Rouleau GA, Julien JP. 2004. A frameshift deletion in peripherin gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 279(44):45951-45956.

- Grosskreutz J, Van Den Bosch L, Keller BU. 2010. Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Calcium* 47(2):165-174.
- Gruenberg J, Stenmark H. 2004. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(4):317-323.
- Guegan C, Przedborski S. 2003. Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Invest* 111(2):153-161.
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* 13(2):54-63.
- Hall ED, Oostveen JA, Gurney ME. 1998. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* 23(3):249-256.
- Hamman BD, Hendershot LM, Johnson AE. 1998. BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* 92(6):747-758.
- Hanisch UK, Kettenmann H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10(11):1387-1394.
- Hansson E, Ronnback L. 2003. Glial neuronal signaling in the central nervous system. *Faseb J* 17(3):341-348.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. 2009. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 16(6):574-581.
- Haydon PG. 2001. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2(3):185-193.

- Heath PR, Tomkins J, Ince PG, Shaw PJ. 2002. Quantitative assessment of AMPA receptor mRNA in human spinal motor neurons isolated by laser capture microdissection. *Neuroreport* 13(14):1753-1757.
- Henkel JS, Beers DR, Zhao W, Appel SH. 2009. Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *J Neuroimmune Pharmacol* 4(4):389-398.
- Henkel JS, Engelhardt JI, Siklos L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, Goodman JC, Siddique T, Beers DR, Appel SH. 2004. Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol* 55(2):221-235.
- Hetz C, Thielen P, Fisher J, Pasinelli P, Brown RH, Korsmeyer S, Glimcher L. 2007. The proapoptotic BCL-2 family member BIM mediates motoneuron loss in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Differ* 14(7):1386-1389.
- Higgins CM, Jung C, Ding H, Xu Z. 2002. Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J Neurosci* 22(6):RC215.
- Hirano A, Nakano I, Kurland LT, Mulder DW, Holley PW, Saccomanno G. 1984. Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 43(5):471-480.
- Holtzclaw LA, Pandhit S, Bare DJ, Mignery GA, Russell JT. 2002. Astrocytes in adult rat brain express type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Glia* 39(1):69-84.
- Honig LS, Chambliss DD, Bigio EH, Carroll SL, Elliott JL. 2000. Glutamate transporter EAAT2 splice variants occur not only in ALS, but also in AD and controls. *Neurology* 55(8):1082-1088.

- Hoth M, Penner R. 1993. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol* 465:359-386.
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G and others. 2002. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3):1604-1609.
- Ichikawa T, Yamada M, Homma D, Cherry RJ, Morrison IE, Kawato S. 2000. Digital fluorescence imaging of trafficking of endosomes containing low-density lipoprotein in brain astroglial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 269(1):25-30.
- Ilieva EV, Ayala V, Jove M, Dalfo E, Cacabelos D, Povedano M, Bellmunt MJ, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otin M. 2007. Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 130(Pt 12):3111-3123.
- Jaiswal JK, Fix M, Takano T, Nedergaard M, Simon SM. 2007. Resolving vesicle fusion from lysis to monitor calcium-triggered lysosomal exocytosis in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(35):14151-14156.
- Johnston CA, Stanton BR, Turner MR, Gray R, Blunt AH, Butt D, Ampong MA, Shaw CE, Leigh PN, Al-Chalabi A. 2006. Amyotrophic lateral sclerosis in an urban setting: a population based study of inner city London. *J Neurol* 253(12):1642-1643.
- Johnston JA, Dalton MJ, Gurney ME, Kopito RR. 2000. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(23):12571-12576.

- Ju JS, Fuentealba RA, Miller SE, Jackson E, Piwnica-Worms D, Baloh RH, Weihl CC. 2009. Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *J Cell Biol* 187(6):875-888.
- JW O. 1978. Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: McGeer EG, Olney JW, McGeer PL, editors. *Kainic acid as a tool in neurobiology*. New York: Raven Press. p 95-121.
- Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD. 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(12):893-905.
- Kawahara Y, Ito K, Sun H, Aizawa H, Kanazawa I, Kwak S. 2004. Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* 427(6977):801.
- Kawahara Y, Kwak S, Sun H, Ito K, Hashida H, Aizawa H, Jeong SY, Kanazawa I. 2003. Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: an implication for excitotoxicity in ALS. *J Neurochem* 85(3):680-689.
- Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL. 1992. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol* 140(3):691-707.
- Kerschbaum HH, Cahalan MD. 1999. Single-channel recording of a store-operated Ca<sup>2+</sup> channel in Jurkat T lymphocytes. *Science* 283(5403):836-839.
- Kieran D, Woods I, Villunger A, Strasser A, Prehn JH. 2007. Deletion of the BH3-only protein puma protects motoneurons from ER stress-induced apoptosis and delays motoneuron loss in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(51):20606-20611.
- Kikuchi H, Almer G, Yamashita S, Guegan C, Nagai M, Xu Z, Sosunov AA, McKhann GM, 2nd, Przedborski S. 2006. Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated

with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(15):6025-6030.

Kimoto T, Yamada M, Ichikawa T, Honma D, Cherry RJ, Morrison IE, Kawato S. 2009. Digital fluorescence analysis of trafficking of single endosomes containing low-density lipoprotein in adrenocortical cells: facilitation of centripetal motion by adrenocorticotrophic hormone. *Mol Cell Endocrinol* 307(1-2):185-195.

Kong J, Xu Z. 1998. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci* 18(9):3241-3250.

Kreft M, Stenovec M, Rupnik M, Grilc S, Krzan M, Potokar M, Pangrsic T, Haydon PG, Zorec R. 2004. Properties of Ca(2+)-dependent exocytosis in cultured astrocytes. *Glia* 46(4):437-445.

Kresse W, Sekler I, Hoffmann A, Peters O, Nolte C, Moran A, Kettenmann H. 2005. Zinc ions are endogenous modulators of neurotransmitter-stimulated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in both cultured and in situ mouse astrocytes. *Eur J Neurosci* 21(6):1626-1634.

Krzan M, Stenovec M, Kreft M, Pangrsic T, Grilc S, Haydon PG, Zorec R. 2003. Calcium-dependent exocytosis of atrial natriuretic peptide from astrocytes. *J Neurosci* 23(5):1580-1583.

Kushner PD, Stephenson DT, Wright S. 1991. Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 50(3):263-277.

Kwon Y, Hofmann T, Montell C. 2007. Integration of phosphoinositide- and calmodulin-mediated regulation of TRPC6. *Mol Cell* 25(4):491-503.



- Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I and others. 2003. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* 34(4):383-394.
- Lauderback CM, Hackett JM, Huang FF, Keller JN, Szweda LI, Markesbery WR, Butterfield DA. 2001. The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of A $\beta$ 1-42. *J Neurochem* 78(2):413-416.
- Lee JA, Beigneux A, Ahmad ST, Young SG, Gao FB. 2007. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol* 17(18):1561-1567.
- Lee JP, Gerin C, Bindokas VP, Miller R, Ghadge G, Roos RP. 2002. No correlation between aggregates of Cu/Zn superoxide dismutase and cell death in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 82(5):1229-1238.
- Lee SW, Kim WJ, Choi YK, Song HS, Son MJ, Gelman IH, Kim YJ, Kim KW. 2003. SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat Med* 9(7):900-906.
- Levine B, Kroemer G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132(1):27-42.
- Leybaert L. 2005. Neurobarrier coupling in the brain: a partner of neurovascular and neurometabolic coupling? *J Cereb Blood Flow Metab* 25(1):2-16.
- Li D, Ropert N, Koulakoff A, Giaume C, Oheim M. 2008. Lysosomes are the major vesicular compartment undergoing Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis from cortical astrocytes. *J Neurosci* 28(30):7648-7658.

- Li M, Ona VO, Guegan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, Olszewski AJ, Stieg PE, Lee JP, Przedborski S and others. 2000. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 288(5464):335-339.
- Lindholm D, Wootz H, Korhonen L. 2006. ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ* 13(3):385-392.
- Lips MB, Keller BU. 1999. Activity-related calcium dynamics in motoneurons of the nucleus hypoglossus from mouse. *J Neurophysiol* 82(6):2936-2946.
- Lipton SA, Rosenberg PA. 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330(9):613-622.
- Llinas R, Sugimori M, Cherksey BD, Smith RG, Delbono O, Stefani E, Appel S. 1993. IgG from amyotrophic lateral sclerosis patients increases current through P-type calcium channels in mammalian cerebellar Purkinje cells and in isolated channel protein in lipid bilayer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(24):11743-11747.
- Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio A, Couratier P, Mitchell JD, Swingler RJ, Beghi E. 2008. Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79(1):6-11.
- Luttrell BM, Henniker AJ. 1991. Reaction coupling of chelation and antigen binding in the calcium ion-dependent antibody binding of cyclic AMP. *J Biol Chem* 266(32):21626-21630.
- Ma HT, Venkatachalam K, Rys-Sikora KE, He LP, Zheng F, Gill DL. 2003. Modification of phospholipase C-gamma-induced Ca<sup>2+</sup> signal generation by 2-aminoethoxydiphenyl borate. *Biochem J* 376(Pt 3):667-676.

- MacFarlane SN, Sontheimer H. 1997. Electrophysiological changes that accompany reactive gliosis in vitro. *J Neurosci* 17(19):7316-7329.
- Maienschein V, Marxen M, Volkandt W, Zimmermann H. 1999. A plethora of presynaptic proteins associated with ATP-storing organelles in cultured astrocytes. *Glia* 26(3):233-244.
- Malarkey EB, Parpura V. 2008. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int* 52(1-2):142-154.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25(12):677-686.
- Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K. 1997. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release. *J Biochem* 122(3):498-505.
- Matyash M, Matyash V, Nolte C, Sorrentino V, Kettenmann H. 2002. Requirement of functional ryanodine receptor type 3 for astrocyte migration. *Faseb J* 16(1):84-86.
- Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A, Pfrieder FW. 2001. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294(5545):1354-1357.
- McCarthy KD, de Vellis J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85(3):890-902.
- Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, Beal MF. 1993. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol* 34(4):609-616.

- Michelucci A, Heurtaux T, Grandbarbe L, Morga E, Heuschling P. 2009. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J Neuroimmunol* 210(1-2):3-12.
- Miller RG, Mitchell JD, Lyon M, Moore DH. 2007. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev* 24(1).
- Mohamed HA, Mosier DR, Zou LL, Siklos L, Alexianu ME, Engelhardt JI, Beers DR, Le WD, Appel SH. 2002. Immunoglobulin Fc gamma receptor promotes immunoglobulin uptake, immunoglobulin-mediated calcium increase, and neurotransmitter release in motor neurons. *J Neurosci Res* 69(1):110-116.
- Morgello S, Uson RR, Schwartz EJ, Haber RS. 1995. The human blood-brain barrier glucose transporter (GLUT1) is a glucose transporter of gray matter astrocytes. *Glia* 14(1):43-54.
- Mukherjee S, Chiu R, Leung SM, Shields D. 2007. Fragmentation of the Golgi apparatus: an early apoptotic event independent of the cytoskeleton. *Traffic* 8(4):369-378.
- Mulder DW, Kurland LT, Offord KP, Beard CM. 1986. Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 36(4):511-517.
- Nagy D, Kato T, Kushner PD. 1994. Reactive astrocytes are widespread in the cortical gray matter of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res* 38(3):336-347.
- Nagy JI, Yamamoto T, Sawchuk MA, Nance DM, Hertzberg EL. 1992. Quantitative immunohistochemical and biochemical correlates of connexin43 localization in rat brain. *Glia* 5(1):1-9.

- Naidoo N. 2009. ER and aging-Protein folding and the ER stress response. *Ageing Res Rev* 8(3):150-159.
- Nakagomi S, Barsoum MJ, Bossy-Wetzel E, Sutterlin C, Malhotra V, Lipton SA. 2008. A Golgi fragmentation pathway in neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 29(2):221-231.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM and others. 2006. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314(5796):130-133.
- Neusch C, Bahr M, Schneider-Gold C. 2007. Glia cells in amyotrophic lateral sclerosis: new clues to understanding an old disease? *Muscle Nerve* 35(6):712-724.
- Nishida H, Okabe S. 2007. Direct astrocytic contacts regulate local maturation of dendritic spines. *J Neurosci* 27(2):331-340.
- Nishitoh H, Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Yokota T, Fukutomi H, Noguchi T, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H. 2008. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev* 22(11):1451-1464.
- Niwa J, Ishigaki S, Hishikawa N, Yamamoto M, Doyu M, Murata S, Tanaka K, Taniguchi N, Sobue G. 2002. Dornin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *J Biol Chem* 277(39):36793-36798.
- North RA, Verkhratsky A. 2006. Purinergic transmission in the central nervous system. *Pflugers Arch* 452(5):479-485.

- O'Connor SJ, Meng YG, Rezaie AR, Presta LG. 1998. Humanization of an antibody against human protein C and calcium-dependence involving framework residues. *Protein Eng* 11(4):321-328.
- Oberheim NA, Wang X, Goldman S, Nedergaard M. 2006. Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci* 29(10):547-553.
- Offen D, Barhum Y, Melamed E, Embacher N, Schindler C, Ransmayr G. 2009. Spinal cord mRNA profile in patients with ALS: comparison with transgenic mice expressing the human SOD-1 mutant. *J Mol Neurosci* 38(2):85-93.
- Okado-Matsumoto A, Fridovich I. 2001. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 276(42):38388-38393.
- Oldstone MB, Wilson CB, Perrin LH, Norris FH, Jr. 1976. Evidence for immune-complex formation in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2(7978):169-172.
- Olsen ML, Sontheimer H. 2008. Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K<sup>+</sup> buffering to cell differentiation. *J Neurochem* 107(3):589-601.
- Oosthuyse B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S and others. 2001. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 28(2):131-138.
- Oppenheim RW. 1996. Neurotrophic survival molecules for motoneurons: an embarrassment of riches. *Neuron* 17(2):195-197.

- Pagani MR, Reisin RC, Uchitel OD. 2006. Calcium signaling pathways mediating synaptic potentiation triggered by amyotrophic lateral sclerosis IgG in motor nerve terminals. *J Neurosci* 26(10):2661-2672.
- Pangrsic T, Potokar M, Stenovec M, Kreft M, Fabbretti E, Nistri A, Pryazhnikov E, Khiroug L, Giniatullin R, Zorec R. 2007. Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes. *J Biol Chem* 282(39):28749-28758.
- Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. 2008. Chemical calcium indicators. *Methods* 46(3):143-151.
- Parkes AB, Rickards CR, Rees P, Scanlon MF. 1995. Cytotoxic changes in A172 glioblastoma cells exposed to serum Ig from patients with motor neurone disease. *J Neurol Sci* 129:136-137.
- Parkinson N, Ince PG, Smith MO, Highley R, Skibinski G, Andersen PM, Morrison KE, Pall HS, Hardiman O, Collinge J and others. 2006. ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology* 67(6):1074-1077.
- Parpura V, Baker BJ, Jeras M, Zorec R. 2010. Regulated exocytosis in astrocytic signal integration. *Neurochem Int* 57(4):451-459.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG. 1994. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369(6483):744-747.
- Parpura V, Grubisic V, Verkhratsky A. 2011. Ca(2+) sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes. *Biochim Biophys Acta* 5:984-991.
- Parpura V, Zorec R. 2010. Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev* 63(1-2):83-92.

- Parri HR, Crunelli V. 2001. Pacemaker calcium oscillations in thalamic astrocytes in situ. *Neuroreport* 12(18):3897-3900.
- Pasinelli P, Borchelt DR, Houseweart MK, Cleveland DW, Brown RH, Jr. 1998. Caspase-1 is activated in neural cells and tissue with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations in copper-zinc superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26):15763-15768.
- Pasinelli P, Brown RH. 2006. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 7(9):710-723.
- Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Castellanos R, Viera L, Beckman JS, Estevez AG, Barbeito L. 2004. Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 89(2):464-473.
- Petravicz J, Fiacco TA, McCarthy KD. 2008. Loss of IP3 receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> increases in hippocampal astrocytes does not affect baseline CA1 pyramidal neuron synaptic activity. *J Neurosci* 28(19):4967-4973.
- Philips T, Robberecht W. 2011. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol* 10(3):253-263.
- Piccolo E, Innominato PF, Mariggio MA, Maffucci T, Iacobelli S, Falasca M. 2002. The mechanism involved in the regulation of phospholipase Cgamma1 activity in cell migration. *Oncogene* 21(42):6520-6529.
- Pizzo P, Burgo A, Pozzan T, Fasolato C. 2001. Role of capacitative calcium entry on glutamate-induced calcium influx in type-I rat cortical astrocytes. *J Neurochem* 79(1):98-109.



- PN L. 2007. Amyotrophic lateral sclerosis. In: Eisen A, Shaw PJ, editors. Motor Neuron Disorders And Related Diseases. Amsterdam: Elsevier. p 249-268.
- Potokar M, Kreft M, Li L, Daniel Andersson J, Pangrsic T, Chowdhury HH, Pekny M, Zorec R. 2007. Cytoskeleton and vesicle mobility in astrocytes. *Traffic* 8(1):12-20.
- Potokar M, Kreft M, Pangrsic T, Zorec R. 2005. Vesicle mobility studied in cultured astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 329(2):678-683.
- Potokar M, Stenovec M, Gabrijel M, Li L, Kreft M, Grilc S, Pekny M, Zorec R. 2010. Intermediate filaments attenuate stimulation-dependent mobility of endosomes/lysosomes in astrocytes. *Glia* 58(10):1208-1219.
- Provinciali L, Laurenzi MA, Vesprini L, Giovagnoli AR, Bartocci C, Montroni M, Bagnarelli P, Clementi M, Varaldo PE. 1988. Immunity assessment in the early stages of amyotrophic lateral sclerosis: a study of virus antibodies and lymphocyte subsets. *Acta Neurol Scand* 78(6):449-454.
- Pryor WA, Squadrito GL. 1995. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 268(5 Pt 1):L699-722.
- Pullen AH, Demestre M, Howard RS, Orrell RW. 2004. Passive transfer of purified IgG from patients with amyotrophic lateral sclerosis to mice results in degeneration of motor neurons accompanied by Ca<sup>2+</sup> enhancement. *Acta Neuropathol* 107(1):35-46.
- Pullen AH, Humphreys P. 2000. Ultrastructural analysis of spinal motoneurons from mice treated with IgG from ALS patients, healthy individuals, or disease controls. *J Neurol Sci* 180(1-2):35-45.

- Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, Holzbaaur EL, Tokito M, Mann E, Floeter MK, Bidus K, Drayna D, Oh SJ and others. 2003. Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* 33(4):455-456.
- Putney JW, Jr. 2005. Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *J Cell Biol* 169(3):381-382.
- Rakhit R, Crow JP, Lepock JR, Kondejewski LH, Cashman NR, Chakrabartty A. 2004. Monomeric Cu,Zn-superoxide dismutase is a common misfolding intermediate in the oxidation models of sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 279(15):15499-15504.
- Ramamoorthy P, Whim MD. 2008. Trafficking and fusion of neuropeptide Y-containing dense-core granules in astrocytes. *J Neurosci* 28(51):13815-13827.
- Ransom BR, Kettenmann H. 1990. Electrical coupling, without dye coupling, between mammalian astrocytes and oligodendrocytes in cell culture. *Glia* 3(4):258-266.
- Rao SD, Yin HZ, Weiss JH. 2003. Disruption of glial glutamate transport by reactive oxygen species produced in motor neurons. *J Neurosci* 23(7):2627-2633.
- Razzini G, Brancaccio A, Lemmon MA, Guarnieri S, Falasca M. 2000. The role of the pleckstrin homology domain in membrane targeting and activation of phospholipase C $\beta$ (1). *J Biol Chem* 275(20):14873-14881.
- Rhodes CH, Stieber A, Gonatas NK. 1987. Transneuronally transported wheat germ agglutinin labels glia as well as neurons in the rat visual system. *J Comp Neurol* 261(3):460-465.

- Rivers LE, Young KM, Rizzi M, Jamen F, Psachoulia K, Wade A, Kessar N, Richardson WD. 2008. PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci* 11(12):1392-1401.
- Rodrigues CM, Spellman SR, Sola S, Grande AW, Linehan-Stieers C, Low WC, Steer CJ. 2002. Neuroprotection by a bile acid in an acute stroke model in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 22(4):463-471.
- Rojas-Rivera D, Caballero B, Zamorano S, Lisbona F, Hetz C. 2010. Alternative functions of the BCL-2 protein family at the endoplasmic reticulum. *Adv Exp Med Biol* 687:33-47.
- Rose CR, Ransom BR. 1997. Gap junctions equalize intracellular Na<sup>+</sup> concentration in astrocytes. *Glia* 20(4):299-307.
- Ross CA, Poirier MA. 2005. Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(11):891-898.
- Rothstein JD. 1996. Excitotoxicity hypothesis. *Neurology* 47(4 Suppl 2):S19-25.
- Rothstein JD. 2009. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 65(1):S3-9.
- Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. 1992. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 326(22):1464-1468.
- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS and others. 2005. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433(7021):73-77.

- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncel RW. 1995. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38(1):73-84.
- Rowland LP, Shneider NA. 2001. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344(22):1688-1700.
- Rubinsztein DC. 2006. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 443(7113):780-786.
- Saleh IA, Zesiewicz T, Xie Y, Sullivan KL, Miller AM, Kuzmin-Nichols N, Sanberg PR, Garbuzova-Davis S. 2009. Evaluation of humoral immune response in adaptive immunity in ALS patients during disease progression. *J Neuroimmunol* 215(1-2):96-101.
- Salter MW, Hicks JL. 1995. ATP causes release of intracellular Ca<sup>2+</sup> via the phospholipase C beta/IP3 pathway in astrocytes from the dorsal spinal cord. *J Neurosci* 15(4):2961-2971.
- Sasaki S, Iwata M. 1996. Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 204(1-2):53-56.
- Sasaki S, Iwata M. 2000. Immunocytochemical and ultrastructural study of the motor cortex in patients with lower motor neuron disease. *Neurosci Lett* 281(1):45-48.
- Sathasivam S, Ince PG, Shaw PJ. 2001. Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27(4):257-274.
- Schiffer D, Cordera S, Cavalla P, Migheli A. 1996. Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 139:27-33.

- Schipke CG, Kettenmann H. 2004. Astrocyte responses to neuronal activity. *Glia* 47(3):226-232.
- Schlessinger J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103(2):211-225.
- Schroder M, Kaufman RJ. 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74:739-789.
- Schwartz JP, Wilson DJ. 1992. Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum, and striatum. *Glia* 5(1):75-80.
- Seifert G, Schilling K, Steinhauser C. 2006. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7(3):194-206.
- Shaw PJ. 2005. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76(8):1046-1057.
- Shaw PJ, Chinnery RM, Ince PG. 1994. Non-NMDA receptors in motor neuron disease (MND): a quantitative autoradiographic study in spinal cord and motor cortex using [3H]CNQX and [3H]kainate. *Brain Res* 655(1-2):186-194.
- Shaw PJ, Ince PG, Falkous G, Mantle D. 1995. Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann Neurol* 38(4):691-695.
- Sheppard CA, Simpson PB, Sharp AH, Nucifora FC, Ross CA, Lange GD, Russell JT. 1997. Comparison of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor distribution and subcellular Ca<sup>2+</sup> release sites that support Ca<sup>2+</sup> waves in cultured astrocytes. *J Neurochem* 68(6):2317-2327.

- Shibata N, Asayama K, Hirano A, Kobayashi M. 1996a. Immunohistochemical study on superoxide dismutases in spinal cords from autopsied patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Dev Neurosci* 18(5-6):492-498.
- Shibata N, Hirano A, Kobayashi M, Siddique T, Deng HX, Hung WY, Kato T, Asayama K. 1996b. Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement. *J Neuropathol Exp Neurol* 55(4):481-490.
- Shibata N, Nagai R, Uchida K, Horiuchi S, Yamada S, Hirano A, Kawaguchi M, Yamamoto T, Sasaki S, Kobayashi M. 2001. Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycoxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res* 917(1):97-104.
- Siklos L, Engelhardt J, Harati Y, Smith RG, Joo F, Appel SH. 1996. Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 39(2):203-216.
- Slezak M, Pfrieder FW. 2003. New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* 26(10):531-535.
- Smith RG, Hamilton S, Hofmann F, Schneider T, Nastainczyk W, Birnbaumer L, Stefani E, Appel SH. 1992. Serum antibodies to L-type calcium channels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 327(24):1721-1728.
- Soldati T, Schliwa M. 2006. Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(12):897-908.
- Sperlagh B, Vizi ES, Wirkner K, Illes P. 2006. P2X7 receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol* 78(6):327-346.

- Stenovec M, Kreft M, Grilc S, Pangrsic T, Zorec R. 2008. EAAT2 density at the astrocyte plasma membrane and Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis. *Mol Membr Biol* 25(3):203-215.
- Stevens FJ, Argon Y. 1999. Protein folding in the ER. *Semin Cell Dev Biol* 10(5):443-454.
- Stiles BL. 2009. PI-3-K and AKT: Onto the mitochondria. *Adv Drug Deliv Rev* 61(14):1276-1282.
- Stout AK, Raphael HM, Kanterewicz BI, Klann E, Reynolds IJ. 1998. Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat Neurosci* 1(5):366-373.
- Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC. 2001. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* 276(41):38084-38089.
- Sutko JL, Airey JA, Welch W, Ruest L. 1997. The pharmacology of ryanodine and related compounds. *Pharmacol Rev* 49(1):53-98.
- Szatkowski M, Barbour B, Attwell D. 1990. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* 348(6300):443-446.
- Tachovsky TG, Lisak RP, Koprowski H, Theofilopoulos AN, Dixon FJ. 1976. Circulating immune complexes in multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet* 2(7993):997-999.
- Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, Nedergaard M. 2006. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci* 9(2):260-267.

- Tateno M, Sadakata H, Tanaka M, Itohara S, Shin RM, Miura M, Masuda M, Aosaki T, Urushitani M, Misawa H and others. 2004. Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. *Hum Mol Genet* 13(19):2183-2196.
- Tokuoka H, Goda Y. 2006. Myosin light chain kinase is not a regulator of synaptic vesicle trafficking during repetitive exocytosis in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 26(45):11606-11614.
- Tomkins J, Usher P, Slade JY, Ince PG, Curtis A, Bushby K, Shaw PJ. 1998. Novel insertion in the KSP region of the neurofilament heavy gene in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neuroreport* 9(17):3967-3970.
- Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman O. 1999. Incidence and prevalence of ALS in Ireland, 1995-1997: a population-based study. *Neurology* 52(3):504-509.
- Trotti D, Rossi D, Gjesdal O, Levy LM, Racagni G, Danbolt NC, Volterra A. 1996. Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *J Biol Chem* 271(11):5976-5979.
- Tseng PH, Lin HP, Hu H, Wang C, Zhu MX, Chen CS. 2004. The canonical transient receptor potential 6 channel as a putative phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-sensitive calcium entry system. *Biochemistry* 43(37):11701-11708.
- Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, Banati RB. 2004. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* 15(3):601-609.



- Turner MR, Kiernan MC, Leigh PN, Talbot K. 2009. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 8(1):94-109.
- Uchitel OD, Appel SH, Crawford F, Szczupak L. 1988. Immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis patients enhance spontaneous transmitter release from motor-nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(19):7371-7374.
- Urushitani M, Sato T, Bamba H, Hisa Y, Tooyama I. 2010. Synergistic effect between proteasome and autophagosome in the clearance of polyubiquitinated TDP-43. *J Neurosci Res* 88(4):784-797.
- Urushitani M, Sik A, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Julien JP. 2006. Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 9(1):108-118.
- Valdmanis PN, Rouleau GA. 2008. Genetics of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70(2):144-152.
- Valverde F, Lopez-Mascaraque L. 1991. Neuroglial arrangements in the olfactory glomeruli of the hedgehog. *J Comp Neurol* 307(4):658-674.
- Van Damme P, Bogaert E, Dewil M, Hersmus N, Kiraly D, Scheveneels W, Bockx I, Braeken D, Verpoorten N, Verhoeven K and others. 2007. Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(37):14825-14830.
- Van Damme P, Braeken D, Callewaert G, Robberecht W, Van Den Bosch L. 2005. GluR2 deficiency accelerates motor neuron degeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 64(7):605-612.

- Van Damme P, Van Den Bosch L, Van Houtte E, Callewaert G, Robberecht W. 2002. GluR2-dependent properties of AMPA receptors determine the selective vulnerability of motor neurons to excitotoxicity. *J Neurophysiol* 88(3):1279-1287.
- Van Den Bosch L, Robberecht W. 2008. Crosstalk between astrocytes and motor neurons: what is the message? *Exp Neurol* 211(1):1-6.
- Van Den Bosch L, Van Damme P, Bogaert E, Robberecht W. 2006. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762:1068-1082.
- Van Den Bosch L, Vandenberghe W, Klaassen H, Van Houtte E, Robberecht W. 2000. Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *J Neurol Sci* 180(1-2):29-34.
- van Es MA, Van Vught PW, Blauw HM, Franke L, Saris CG, Andersen PM, Van Den Bosch L, de Jong SW, van 't Slot R, Birve A and others. 2007. ITPR2 as a susceptibility gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a genome-wide association study. *Lancet Neurol* 6(10):869-877.
- Vembar SS, Brodsky JL. 2008. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(12):944-957.
- Verkhatsky A, Rodriguez JJ, Parpura V. 2012. Calcium signalling in astroglia. *Mol Cell Endocrinol* 353(1-2):45-56.
- Verstraete E, Veldink JH, Huisman MH, Draak T, Uijtendaal EV, van der Kooij AJ, Schelhaas HJ, de Visser M, van der Tweel I, van den Berg LH. 2012. Lithium lacks effect on survival in amyotrophic lateral sclerosis: a phase IIb randomised sequential trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83(5):557-564.

- Vesce S, Bezzi P, Volterra A. 2001. Synaptic transmission with the glia. *News Physiol Sci* 16:178-184.
- Volterra A, Meldolesi J. 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6(8):626-640.
- Volterra A, Trotti D, Tromba C, Floridi S, Racagni G. 1994. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J Neurosci* 14(5 Pt 1):2924-2932.
- von Lewinski F, Keller BU. 2005. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> buffering in hypoglossal motoneurons from mouse. *Neurosci Lett* 380(3):203-208.
- Vukosavic S, Dubois-Dauphin M, Romero N, Przedborski S. 1999. Bax and Bcl-2 interaction in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 73(6):2460-2468.
- Wang X, Fan H, Ying Z, Li B, Wang H, Wang G. 2010. Degradation of TDP-43 and its pathogenic form by autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Neurosci Lett* 469(1):112-116.
- Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC, Price DL, Wong PC, Rothstein JD. 2001. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis* 8(6):933-941.
- Westarp ME, Bartmann P, Kornhuber HH. 1994. Immunoglobulin-G isotype changes in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neurosci Lett* 173(1-2):124-126.
- Wiedemann FR, Manfredi G, Mawrin C, Beal MF, Schon EA. 2002. Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J Neurochem* 80(4):616-625.

- Williamson TL, Cleveland DW. 1999. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci* 2(1):50-56.
- Willison HJ, Chancellor AM, Veitch J, Kennedy PG, Warlow CP. 1994. Immunoglobulin G subclasses are normal in motor neuron disease. *J Neurol Sci* 124(1):115-116.
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL. 1995. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14(6):1105-1116.
- Wood JD, Beaujeux TP, Shaw PJ. 2003. Protein aggregation in motor neurone disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29(6):529-545.
- Worms PM. 2001. The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *J Neurol Sci* 191(1-2):3-9.
- Xu Z, Cork LC, Griffin JW, Cleveland DW. 1993. Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell* 73(1):23-33.
- Yi FH, Lautrette C, Vermot-Desroches C, Bordessoule D, Couratier P, Wijdenes J, Preud'homme JL, Jauberteau MO. 2000. In vitro induction of neuronal apoptosis by anti-Fas antibody-containing sera from amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 109(2):211-220.
- Yu S, Ding WG. 1998. The 45 kDa form of glucose transporter 1 (GLUT1) is localized in oligodendrocyte and astrocyte but not in microglia in the rat brain. *Brain Res* 797(1):65-72.

- Zhainazarov AB, Annunziata P, Toneatto S, Cherubini E, Nistri A. 1994. Serum fractions from amyotrophic lateral sclerosis patients depress voltage-activated Ca<sup>2+</sup> currents of rat cerebellar granule cells in culture. *Neurosci Lett* 172(1-2):111-114.
- Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo MM, Duan S. 2003. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40(5):971-982.
- Zhang R, Gascon R, Miller RG, Gelinas DF, Mass J, Hadlock K, Jin X, Reis J, Narvaez A, McGrath MS. 2005. Evidence for systemic immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *J Neuroimmunol* 159(1-2):215-224.
- Zhang Z, Chen G, Zhou W, Song A, Xu T, Luo Q, Wang W, Gu XS, Duan S. 2007. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol* 9(8):945-953.
- Zhu X, Hill RA, Nishiyama A. 2008. NG2 cells generate oligodendrocytes and gray matter astrocytes in the spinal cord. *Neuron Glia Biol* 4(1):19-26.
- Zlokovic BV. 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57(2):178-201.
- Zoccolella S, Beghi E, Palagano G, Fraddosio A, Guerra V, Samarelli V, Lepore V, Simone IL, Lamberti P, Serlenga L and others. 2008. Analysis of survival and prognostic factors in amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79(1):33-37.

# BIOGRAFIJA

---

Milena Milošević je rođena 26.11.1977. godine u Kragujevcu, gde je završila osnovnu školu i Prvu kragujevačku gimnaziju. Školske 1996/1997. godine upisala je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Opšta biologija, a školske 1998/1999. godine prebacila se na smer Molekularna biologija i fiziologija. Studije je završila u oktobru 2006. godine, sa srednjom ocenom 9,34. Školske 2006/2007. godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Neuronauke, modul Neurofiziologija sa biofizikom. Od 2007. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik, a od 2009. godine kao istraživač saradnik na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. U okviru FP6 projekta pod rukovodstvom prof. dr Pavla R Andusa, radila je u laboratoriji akad. prof. dr Roberta Zoreca na Institutu za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani u martu 2008. i maju 2009. godine. U istoj laboratoriji je radila u okviru FP7 Edu-GLIA projekta, pod rukovodstvom akad. prof. dr Roberta Zoreca od marta do septembra 2010. godine. U okviru sporazuma o bilateralnoj saradnji između Republike Srbije i Republike Francuske, radila je u laboratoriji dr Hoze Manuel Kancele na Institutu za neuronauke u Žifu u septembru 2009. godine. Februara 2010. godine dobila je stipendiju Mreže evropskih škola za neuronauke, koja joj je omogućila jednomesečni studijski boravak u laboratoriji dr Leonarda Khiruga u Centru za neuronauke u Helsinkiju. Trenutno radi u Centru za lasersku mikroskopiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu gde se bavi registracijom unutarćelijskog kalcijuma i slobodnih radikala, kao i praćenjem mobilnosti vezikula i pokretljivosti mitohondrija u ćelijama nervnog sistema, primenom konfokalne mikroskopije. Član je Društva biofizičara Srbije, Evropskog biofizičkog društva i Društva za neuronauke Srbije. Autor je i koautor više publikacija. Deo rezultata predstavljenih u doktorskoj disertaciji publikovani su u radu:

Stenovec M, **Milošević M**, Petrušić V, Potokar M, Stević Z, Prebil M, Kreft M, Trkov S,

Andjus PR, Zorec R. Amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins G enhance the mobility of Lysotracker-labelled vesicles in cultured rat astrocytes. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011 Dec; **203**(4):457-71.

**Прилог 1.**

**ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ**

Потписани-а \_\_\_\_\_ Милена М. Милошевић \_\_\_\_\_

број уписа \_\_\_\_\_ KB060019 \_\_\_\_\_

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

Улога хуморалног имунског одговора у етиопатогенези амиотрофичне латералне  
склерозе

---

- 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, 01.09.2012.

Милена Милошевић

**Прилог 2.**

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ  
ДОКТОРСКОГ РАДА**

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Милена М. Милошевић \_\_\_\_\_

Број уписа \_\_\_\_\_ КВ060019 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ НЕУРОНАУКЕ \_\_\_\_\_

Наслов рада \_Улога хуморалног имунског одговора у етиопатогенези амиотрофичне латералне склерозе

Ментор \_\_ проф. Др Павле Р. Анђус и др. Матјаж Стеновец \_\_\_\_\_

Потписани \_\_\_\_\_ Милена М. Милошевић \_\_\_\_\_

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, 01.09.2012.

Милена Милошевић



### Прилог 3.

#### ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

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

**Улога хуморалног имунског одговора у етиопатогенези амиотрофичне латералне склерозе**

---

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

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 01.09.2012.

