

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Odlukom Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu od 25.12.2014. godine za ocenu doktorske disertacije pod nazivom „Uloga kinaze aktivirane adenzin monofosfatom u neurotoksi nom delovanju alfa-sinukleina *in vitro*“, kandidatkinje dr Marije Dulovi , odre ena je komisija u sastavu:

1. prof. dr Aleksandra Isakovi – Institut za medicinsku i klini ku biohemiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. prof. dr Vladimir Trajkovi – Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. prof. dr Silvana Andri – Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matemati ki fakultet Univerziteta u Novom Sadu

Mentor za izradu doktorske disertacije je prof. dr Ivanka Markovi , a komentor akademik prof. dr Vladimir Kostić .

Nakon detaljnog pregleda priložene dokumentacije, konsultacija sa mentorom, komentorom i kandidatkinjom, a prema kriterijumima za ocenu doktorske disertacije, lanovi komisije Nau nom ve u Medicinskog fakulteta u Beogradu jednoglasno podnose slede i

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija „Uloga kinaze aktivirane adenzin monofosfatom u neurotoksi nom delovanju alfa-sinukleina *in vitro*“ sadrži sedam poglavlja: Uvod, Ciljevi istraživanja, Materijal i Metode, Rezultati, Diskusija, Zaklju ci i Literatura. Disertacija je napisana na 129 strana, sadrži 3 šeme i 33 slike. U poslednjem poglavlju je pregled literature koja je citirana u doktorskoj disertaciji i sadrži 279 navoda.

UVOD je izložen na 22 strane, sadrži 3 šeme i sastoji se iz dva odeljka. U prvom odeljku, koji je podeljen u 3 celine, kandidatkinja daje osnovne podatke o etiopatogenezi Parkinsonove bolesti; objašnjava složenost molekularnih mehanizama uklju enih u nastanak i razvoj Parkinsonove bolesti, sa posebnim osvrtom na zna aj proteina alfa-sinukleina. Radi lakšeg razumevanja molekularne osnove Parkinsonove bolesti, prikazana je i šema koja pruža sveobuhvatan uvid u mehanizme ošte enja elijskih komponenata koji su uklju eni u nastanak i razvoj Parkinsonove bolesti: disfunkcija mitohondrija, oksidativni stres, formiranje proteinskih agregata (posledica genskih mutacija i polimorfizama i/ili ošte enja elijskih mehanizama za razgradnju proteina), neuroinflamacija i promene na genima koje mogu dovesti do bilo kog od pomenutih ošte enja. Druga celina ovog odeljka se odnosi na protein alfa-sinuklein, proteina koji je osnovni sastojak najvažnijeg patohistološkog supstrata Parkinsonove bolesti, citoplazmatskih inkluzija nazvanih Levijeva tela. Objašnjene su uloge alfa-sinukleina u eliji, poreme aji u sintezi, razgradnji i agregaciji, kao i mogu a ošte enja uzorokovana promenom strukture i/ili nakupljanjem ovog proteina u eliji. Kandidatkinja objašnjava na koji na in nagomilavanje alfa-sinukleina dovodi do formiranja oligomera i protofibrila, a potom i fibrilarnih agregata, koji ulaze u sastav Levijevih tela, a u prilog tome govori shema koja daje uvid u kompleksne mehanizme ošte enja neurona delovanjem alfa-sinukleina. U tre oj celini ovog odeljka, objašnjeni su mehanizmi i uloge apoptoze i autofagije u održavanju homeostaze elija u fiziološkim i patološkim stanjima, kao i karakteristike ovih unutar elijskih doga aja u toku procesa neurodegeneracije. Imaju i u vidu da se Parkinsonova bolest karakteriše progresivnom degeneracijom i izumiranjem dopaminergičkih neurona u *pars compacta substantiae nigrae* mezencefalona, posebno se razmatraju morfološke i funkcionalne specifi nosti apoptoze kao mehanizma smrti dopaminergičkih neurona i saznanja o dvostrukoj ulozi autofagije u ošte enju neurona izazvanim alfa-sinukleinom.

U drugom odeljku Uvoda, koji je podeljen na 2 celine, kandidatkinja iznosi saznanja o protein kinazi aktiviranoj adenzin monofosfatom (AMPK), najvažnijem energetsom senzoru u eliji. Objašnjeni su mehanizmi kontrole aktivnosti ovog enzima, njegove brojne uloge u homeostazi elija i zna aj, kao i dosadašnja oskudna saznanja o mogu oj ulozi AMPK u ošte enju neurona u Parkinsonovoj bolesti. Imaju i u vidu da je tkivo mozga metaboli ki izuzetno aktivno i da su energetska status neurona, kao i signalni putevi i molekuli koji u estvuju u održavanju energetske ravnoteže u elijama CNS-a od velikog zna aja, logi no se nametnula ideja o ispitivanju uloge AMPK u ošte enju neurona u uslovima prekomerne sinteze alfa-sinukleina. Tako e, poseban segment ovog odeljka razmatra aktivnost i me usobni odnos signalnih puteva protein kinaze B/Akt i

AMPK, kao i povezanost ovih signalnih puteva sa procesima apoptoze i autofagije. Radi lakšeg razumevanja, kandidatkinja daje i šematski prikaz regulacije aktivnosti AMPK. U nastavku, kandidatkinja ukazuje na mogućnost da nagomilavanje proteina alfa-sinukleina može dovesti do poremećaja u regulaciji aktivnosti signalnog puta AMPK iz čega proizilazi i **radna hipoteza** da postoji povezanost između u neurotoksičnog delovanja alfa-sinukleina i promene aktivnosti signalnog puta protein kinaze aktivirane adenzin monofosfatom (AMPK) u ćelijama humanog neuroblastoma diferencovanim u neuronski fenotip u *in vitro* uslovima.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA su jasno definisani: ispitivanje citotoksičnog delovanja unutar ćelijskog alfa-sinukleina na ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferencovanim u neuronski fenotip; ispitivanje citotoksičnog delovanja van ćelijskog alfa-sinukleina na ćelijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferencovanim u neuronski fenotip i ćelijama pacovskog feohromocitoma PC12; ispitivanje uticaja unutar ćelijskog i van ćelijskog alfa-sinukleina na aktivnost signalnog puta AMPK; ispitivanje uticaja modulacije aktivnosti AMPK na neurotoksično dejstvo unutar ćelijskog i van ćelijskog alfa-sinukleina.

MATERIJAL i METODE su jasno i pregledno izloženi na 17 strana u jedanaest odeljaka. U prvom odeljku navedene su sve supstance, reagensi i rastvori, korišćeni u istraživanju. Zatim su, u drugom odeljku, navedene su ćelijske linije korišćene u izradi doktorske teze (ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y; transfekovane ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y koje prekomerno proizvode alfa-sinuklein; ćelije feohromocitoma pacova (PC12) kao i primenjeni tretmani (van ćelijski alfa-sinuklein; modifikovani oblici rekombinantnog alfa-sinukleina). U trećem odeljku ovog segmenta teze, kandidatkinja opisuje protokole testova primenjenih za određivanje broja živih (kristal violet test) i mrtvih ćelija (test bojenja Tripan plavim). Četvrti odeljak se odnosi na opis fazno kontrastne mikroskopije, kojom je vršeno ispitivanje morfoloških karakteristika ćelija. Peti odeljak ovog segmenta teze pruža detaljan uvid u metodu protone citofluorimetrije i izlaže ukratko protokole primenjene za specifično bojenje, u cilju analize parametara ćelijske smrti i identifikacije promena karakteristika za apoptozu (fragmentacija jedarne DNK i aktivacija kaspaza) i autofagiju (porast zastupljenosti vezikula kiselog sadržaja u citoplazmi ćelija). Opis tehnike imunoblotovanja, sa ciljem ispitivanja nivoa ekspresije alfa-sinukleina, kao i unutar ćelijskih kinaza koje su uključene u signalni put AMPK (LKB1, AMPK, Raptor) i Akt (Src, Akt), kao i proteina karakterističnih za autofagiju (LC3-II), izložen je u šestom odeljku. U ovom odeljku je opisana i kvantifikacija aktivnosti proteina primenom denzitometrijske analize,

koriš enjem kompjuterskog programa ImageJ. Na in pripreme i analize uzoraka za analizu elektronskom mikroskopijom izložen je u sedmom odeljku. U osmom odeljku prikazan je protokol za kvantitativnu analizu ekspresije gena (reakcija lan anog umnožavanja sa detekcijom produkata u realnom vremenu – qPCR, nakon izolacije RNK i reverzne transkripcije). U devetom odeljku je prikazan metod odre ivanja unutar elijskog sadržaja adenzin trifosfata. Deseti odeljak opisuje protokol za transfekciju elija pomo u male ukosni aste RNK (engl. *short hairpin RNA*, shRNA), u cilju smanjenja transkripcije gena koji kodira AMPK. Jedanaesti odeljak ovog segmenta teze je dao prikaz statisti ih metoda koriš enih u analizi podataka. Za pore enje rezultata dobijenih za nezavisne uzorke koriš en je parametarski – Studentov t-test. Vrednosti $p < 0,05$ smatrane su statisti ki zna ajnim.

REZULTATI su predstavljeni na 42 strane, u 6 odeljaka i sadrže 33 slike, kao i propratna objašnjenja koja se odnose na podatke prikazane na slikama.

U prvom odeljku ovog poglavlja teze prikazan je uticaj prekomerne sinteze alfa-sinukleina na preživljavanje elija u kulturi humanog neuroblastoma SH-SY5Y. Prikazani su rezultati ispitivanja zastupljenosti morfoloških i ultrastrukturnih promena u elijama, fragmentacija DNK molekula, i aktivacije kaspaza, kao posledica citotoksi nog delovanja alfa-sinukleina.

Zatim su, u drugom odeljku, izloženi rezultati ispitivanja molekularnih mehanizma neurotoksi nog delovanja alfa-sinukleina u kulturi elija humanog neuroblastoma SH-SY5Y, i, s tim u vezi, uloga signalnog puta protein kinaze aktivirane adenzin monofosfatom (LKB1/AMPK/Raptor) u uslovima prekomernog nakupljanja alfa-sinukleina. U cilju što boljeg razumevanja molekularnog mehanizma, analiziran je energetska naboj elije (unutar elijski nivo adenzin trifosfata) u uslovima prekomernog nagomilavanja alfa-sinukleina, pošto je promena nivoa ATP-a najvažiji fiziološki signal koji uzorkuje aktivaciju AMPK. S tim u vezi, ispitivana i je promena ekspresije gena koji kodiraju proteine koji imaju ulogu u regulaciji aktivnosti AMPK: kalcijum/kalmodulin-zavisne kinaze, sestrina 1 i 2, i protein fosfataze 2A. Tako e, ispitana je mogu a neuroprotektivna uloga AMPK primenom farmakoloških aktivatora, 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonukleotida (AICAR) i N,N-dimetilimidodikarbonimidi nog diamid hidrohlorida (metformin), a poseban segment ovog odeljka se odnosi na ispitivanje signalnog puta protein kinaze B (Akt) i mogu e povezanosti sa neuroprotektivnim efektima aktivacije AMPK u diferentovanim elijama humanog neuroblasoma SH-SY5Y.

Tre i odeljak se odnosi na ispitivanje zastupljenosti i uloge autofagije u neuroprotektivnom delovanju AMPK u uslovima prekomerne sinteze alfa-sinukleina.

Potom se ispituje uloga AMPK u uslovima nagomilavanja van elijskog alfa-sinukleina kod elija humanog neuroblastoma SH-SY5Y, u etvrtom odeljku, i elija feohromocitoma pacova (PC12), u petom odeljku. Posebna pažnja je posve ena ispitivanju mogu eg neuroprotektivnog delovanja farmakoloških aktivatora AMPK u uslovima primene van elijskog alfa-sinukleina, po analogiji sa ispitivanjem efekata unutra elijskog sinukleina. Poseban segment se odnosi na ispitivanje neurotoksi nog delovanja van elijskog alfa-sinukleina u uslovima smanjene ekspresije gena koji kodira AMPK, koriš enjem male ukosni aste RNK (engl. *short hairpin RNA*, shRNA).

U poslednjem, šestom odeljku, prikazani su rezultati koji ukazuju na protektivnu ulogu AMPK u uslovima prisustva humanog rekombinantnog sunukleina (monomera i oligomera) u van elijskoj te nosti, kao i njegovih modifikovanih oblika (nitrozilirana forma i forma alfa-sinukleina izmenjena metabolizmom dopamina) kod SH-SY5Y elija.

Svaki rezultat je analiziran na odgovaraji i primeren na in, i na osnovu njega je izveden jasan i logi an zaklju ak.

U poglavlju **DISKUSIJA**, koje je izloženo na 15 strana i ima 3 celine, rezultati istraživanja su razmatrani na sveobuhvatan na in i tuma eni u skladu sa podacima iz literature. Prva celina se odnosi na ispitivanje neurotoksi nog delovanja prekomerne sinteze alfa-sinukleina na elije humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovane u neuronski fenotip, da bi u drugoj celini bio prikazan molekularni mehanizam neurotoksi nog delovanja alfa-sinukleina. Pokazano je da je jedan od mogu ih mehanizama koji dovodi do ošte anja neurona smanjenje aktivnosti signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor. Zna aj ovog signalnog puta u ošte enju elija izazvanim sinukleinom je potvr en injenicom da je farmakološka aktivacija AMPK imala neuroprotektivni efekat, koji nije bio pra en aktivacijom Akt signalnog puta, niti indukcijom autofagije. Tre a celina se odnosi na ispitivanje mehanizama neurotoksi nog delovanja alfa-sinukleina prisutnog u van elijskoj te nosti, kao i uloge AMPK u tom procesu. I u slu aju delovanja van elijskog sinukleina, pokazano je smanjenje aktivnosti AMPK signalnog puta, i, još zna ajnije, neuroprotektivni efekat aktivacije AMPK kako na elijama neuroblastoma, tako i na elijama feohromocitoma pacova.

U poglavlju **ZAKLJU AK** kandidatkinja je iz svojih rezultata izvela jasne i nedvosmislene zaklju ke, koji su u potpunosti odgovorili na postavljene ciljeve istraživanja.

U poglavlju **LITERATURA** navedene su 279 referenci po abecednom redu, koje su u disertaciji citirane harvardskim stilom.

B. Opis postignutih rezultata

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da prekomerna ekspresija alfa-sinukleina dovodi do smrti elija humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanih u neuronski fenotip. Mehanizam toksi nog delovanja alfa-sinukleina je pra en morfološkim i ultrastrukturnim promenama koje odgovaraju apoptozi (smanjivanje elijskog volumena, zaokrugljivanje elija i gubitak elijskih produžetaka, vakuolizacija citoplazme, ošte enje mitohondrija i kondenzacija hromatina), emu u prilog govore i aktivacija kaspaza i fragmentacija DNK. Nakupljanje alfa-sinukleina u elijama uzrokovalo je smanjenje aktivnosti AMPK i ushodne kinaze LKB1, koja aktivira AMPK, sa posledici smanjenjem fosforilacije i nishodne kinaze Raptor. Nije pokazana promena u ekspresiji gena koji kodiraju druge proteine koji su uklju eni u kontrolu aktivnosti AMPK (kalcijum/kalmodulin-zavisne kinaze, sestrina 1 i 2, i protein fosfataze 2A). Primena farmakoloških aktivatora AMPK, kao što su 5-amino-imidazol-4-karboksiamid ribonukleotid (AICAR) i N,N-dimetilimidodikarbonimidi nog diamid hidrohlorid (metformin), dovela je do zna ajnog poboljšanja preživljavanja elija u uslovima prekomerne ekspresije alfa-sinukleina, što je bilo pra eno aktivacijom signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor, bez uticaja na nivo alfa-sinukleina u elijama.

Rezultati izneti u ovoj tezi su tako e pokazali da prekomerna ekspresija alfa-sinukleina smanjuje i aktivnost signalnog puta protein kinaze B (Akt)/Src koji je aktiviran fosfatifilinozitol-3-kinazom (PI3K), kao i da u elijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanim u neuronski fenotip ona dovodi do porasta zastupljenosti vezikula kiselog sadržaja sli nih autofagozomima, što je pokazatelj autofagije. Indukcija autofagije je bila pra ena prelaskom lakog lanca proteina udruženog sa mikrotubulima (engl. *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) iz citosolnog oblika (LC3-I) u oblik vezan za fosfatidil-etanolamin u membrani autofagozoma (LC3-II), i pove anjem autofagnog fluksa u elijama. Me utim, neuroprotektivno delovanje aktivacije AMPK nije bilo udruženo sa aktivacijom signalnog puta protein kinaze B (Akt), niti sa indukcijom autofagije.

Pored neurotoksi nog delovanja prekomerne sinteze unutar elijskog alfa sinukleina, u ovoj studiji je pokazan citotoksi ni efekat sekretovanog van elijskog alfa-sinukleina, kako na elijama humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanim u

neuronski fenotip, tako i na elijama feohromocitoma pacova PC12. Dobijeni rezultati ukazuju na to da je citotoksično dejstvo van elijskog alfa-sinukleina tako e pr eno smanjenjem aktivnosti signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor; kao i da aktivatori AMPK, AICAR i metformin, poboljšavaju preživljavanje elija uz skoro potpun oporavak aktivnosti sva tri ispitivana enzima (LKB1/AMPK/Raptor). Primena male ukosni aste RNK (engl. *short hairpin RNA*, shRNA) koja spre ava ekspresiju gena koji kodira AMPK, dodatno je pospešila toksi no delovanje van elijskog alfa-sinukleina na SH-SY5Y elije diferentovane u neuronski fenotip, što je potvrdilo zna aj AMPK signalnog puta u neurotoksi nom delovanju van elijskog alfa-sinukleina. I u uslovima primene humanog rekombinantnog sinukleina i njegovih modifikovanih oblika (dopaminski modifikovan alfa-sinuklein i nitrozilirani oblik alfa-sinukleina), smanjeno preživljavanje neurona je bilo pr eno smanjenjem aktivnosti AMPK, dok je aktivacija AMPK imala neuroprotektivni efekat.

Iz svega navedenog, možemo zaklju iti da prekomerno nakupljanje kako unutar elijskog, tako i van elijskog alfa-sinukleina dovodi do smanjenja aktivnosti signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor. Farmakološka aktivacija AMPK ima neuroprotektivno dejstvo, te bi s toga modulacija signalnog puta kinaze aktivirane adenzin monofosfatom mogla da bude jedna od strategija za postizanje neuroprotekcije kod Parkinsonove bolesti.

C. Uporedna analiza rezultata kandidatkinje sa rezultatima literature

Rezultati ove teze su potvrdili da prekomerna ekspresija nemutiranog alfa-sinukleina dovodi do smrti elija humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanih u neuronski fenotip, što je pr eno morfološkim i ultrastrukturnim promenama elija, koje odgovaraju apoptozi (smanjivanje elijskog volumena, vakuolizacija citoplazme, ošte enje mitohondrija i kondenzacija hromatina), uz aktivaciju kaspaza i fragmentaciju DNK, što je u skladu sa podacima iz literature. Naime, u razli itim *in vitro* modelima je pokazano da pove anje nivoa alfa-sinukleina korelira sa pojavom pokazatelja apoptoze, kako u neuronima u kulturi, tako i u limfocitima dobijenim iz periferne krvi pacijenata obolelih od Parkinsonove bolesti. Na elijama neuroblastoma je pokazano da prekomerna sinteza sinukleina uzrokuje ošte enje mitohondrija i posledi no osloba anja citohroma c u citosol, usled ega dolazi do apoptotske smrti elija mehanizmom koji ne uklju uje aktivaciju kaspaza. Rezultati ovog istraživanja su pokazali i da alfa-sinuklein sekretovan u van elijsku te nost smanjuje vijabilitet, kako kod elija humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanih u neuronski fenotip, tako i kod elija feohromocitoma pacova

PC12, a primena rekombinantnog nemutiranog alfa-sinukleina i njegovih modifikovanih oblika je imala isti efekat. Ovaj nalaz je u skladu sa prethodno objavljenim podacima, da alfa-sinuklein prisutan u van elijskoj te nosti može narušiti homeostazu neurona i uzrokovati njihovu smrt, ak i u niskim koncentracijama, koje odgovaraju koncentracijama izmerenim u telesnim te nostima.

Promene u aktivnosti AMPK signalnog puta su pokazane u više modela neurodegeneracije, uklju uju i Alchajmerovu i Hantingtonovu bolest. Me utim, uloga AMPK u ošte enju neurona u Parkinsonovoj bolesti i dalje nije razjašnjena u potpunosti. Pokazano je da je aktivacija AMPK imala neuroprotektivni efekat u modelu Parkinsonove bolesti izazvanom delovanjem neurotoksina MPP+. U elijskom modelu prekomerne sinteze alfa-sinukleina, pokazano je da farmakološki aktivator signalnog puta AMPK/SIRT, rezveratrol, pospešuje razgradnju nemutiranog oblika alfa-sinukleina u lizozomima, ukazuju i da aktivacija AMPK ima neuroprotektivni efekat. Uz to, nedavno je pokazano da metformin u kulturi elija i u animalnom modelu smanjuje zastupljenost fosforilisanog oblika alfa sinukleina, najzastupljenije forme sinukleina unutar patoloških neuronalnih inkluzija, Levijevih tela. Nasuprot tome, postoje podaci i da aktivacija AMPK pospešuje fosforilaciju alfa-sinukleina, što vodi skra enju dužine aksona i govori u prilog štetnog delovanja ovog enzima, ali nije pokazan direktan uticaj aktivacije ovog enzima na smanjeno preživljavanje neurona.

Rezultati ispitivanja neurotoksi nog delovanja nagomilavanja unutar elijskog i van elijskog alfa-sinukleina u ovoj tezi su po prvi put pokazali da dolazi do smanjenja u aktivnosti signalnog puta LKB1/AMPK/Raptor, što je potvrdila i injenica da su u uslovima smanjenja ekspresije AMPK, elije humanog neuroblastoma SH-SY5Y bile osetljivije na štetno delovanje van elijskog alfa-sinukleina. Primena farmakoloških aktivatora AMPK u uslovima prekomerne sinteze alfa-sinukleina dovela je do zna ajnog poboljšanja preživljavanja elija, uz porast aktivnosti LKB1/AMPK/Raptor signalnog puta, ali ovaj efekat nije bio pra en smanjenjem nivoa alfa-sinukleina u elijama, indukcijom autofagije, niti aktivacijom signalnog puta protein kinaze B/Akt. Protektivna uloga aktivacije AMPK je pokazana i u uslovima delovanja van elijskog alfa-sinukleina sekretovanog u medijum, kao i kod rekombinantnog alfa-sinukleina i njegovih modifikovanih oblika. Dobijeni podaci o neuroprotektivnim efektima aktivacije AMPK koji su pokazani na svim ispitivanim elijskim modelima, imaju izuzetni zna aj, i u saglasnosti su sa podacima iz literature da primena metformina smanjuje rizik od oboljevanja od Parkinsonove bolesti kod obolelih od dijabetesa tipa 2.

Iako u literaturi postoje podaci o povezanosti ošte enja neurona u Parkinsonovoj bolesti i promene aktivnosti AMPK, ovo istraživanje po prvi put nedvosmisleno pokazuje

da smanjenje aktivnosti signalnog puta kinaze aktivirane AMP-om ima značajnu ulogu u oštećenju neurona usled toksičnog delovanja alfa-sinukleina. Uz to, rezultati prikazani u ovoj tezi po prvi put pokazuju da aktivacija AMPK ima neuroprotektivnu ulogu u uslovima prekomernog nagomilavanja kako unutar elijskog, tako i van elijskog alfa-sinukleina, kao i njegovih modifikovanih formi, što ukazuje da bi jedan od mogućih pristupa za postizanje neuroprotektivnih efekata Parkinsonovoj bolesti mogao biti modulacija aktivnosti signalnog puta AMPK.

D. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo teze

1) Dulovic M, Jovanovic M, Xilouri M, Stefanis L, Harhaji-Trajkovic L, Kravic-Stevovic T, Paunovic V, Ardah MT, El-Agnaf OM, Kostic V, Markovic I, Trajkovic V. The protective role of AMP-activated protein kinase in alpha-synuclein neurotoxicity in vitro. *Neurobiol Dis.* 2014; 63:1-11. (IF = 5,202)

ZAKLJUČAK (Obrazloženje naučnog doprinosa disertacije):

Rezultati ovog istraživanja predstavljaju značajan naučni doprinos istraživača da objasni molekularne mehanizme koji leže u osnovi neurotoksičnog delovanja proteina alfa-sinukleina, sa posebnim osvrtom na neuroprotektivnu ulogu kinaze aktivirane adenozin monofosfatom (AMPK). Sveobuhvatni pristup sagledavanju neurotoksičnog dejstva je uključio kako analizu morfoloških promena, tako i analizu promena aktivnosti signalnih puteva LKB1/AMPK/Raptor i Akt u elijskoj korišćenjem raznovrsnih i savremenih molekularno-bioloških tehnika. Zbog toga je ova disertacija primer temeljnog i dobro osmišljenog istraživanja molekularnih mehanizama uključenih u oštećenje neurona u Parkinsonovoj bolesti, sa posebnim osvrtom na neuroprotektivnu ulogu protein kinaze aktivirane adenozin monofosfatom. Rezultati ovog istraživanja doprinose razjašnjavanju mehanizama koji se nalaze u osnovi oštećenja i smrti dopaminergičkih neurona, i dodatno ukazuju na moguće pravce za ostvarivanje neuroprotekcije, što bi moglo doprineti razvoju novih terapijskih strategija u Parkinsonovoj bolesti.

F. PREDLOG KOMISIJE ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija „Uloga kinaze aktivirane adenozin monofosfatom u neurotoksi nom delovanju alfa-sinukleina *in vitro*“, kandidatkinje dr Marije Dulovi , predstavlja originalan nau ni doprinos u razjašnjavanju uloge protein kinaze aktivirane adenozin monofosfatom (AMPK) u ošte enju neurona molekularnim mehanizmima uklju enim u neurotoksi no delovanje proteina alfa-sinukleina. Rezultati dobijeni u ovom radu su izuzetno zanimljivi i mogu imati zna ajan uticaj na strategije u prevenciji neurodegeneracije u Parkinsonovoj bolesti. Po svom sadržaju i formi, dobro napisanom uvodnom delu, jasno postavljenim istraživa kim ciljevima, dobro osmišljenoj metodologiji, precizno iznetim rezultatima rada, razložnoj diskusiji i dobro formulisanim zaklju cima ispunjava sve kriterijume dobro napisanog nau nog rada, pa ova komisija predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziuteta u Beogradu da usvoji pozitivan izveštaj o doktorskoj disertaciji dr Marije Dulovi , i da odobri njenu javnu odbranu.

Mentor:

prof. dr Ivanka Markovi

Komentor:

prof. dr Vladimir Kosti

lanovi Komisije

prof. dr Aleksandra Isakovi

prof. dr Vladimir Trajkovi

prof. dr Silvana Andri

Beograd, 2. april 2015. godine