



THE ROLE OF AUTOPHAGY IN NEUROTOXICITY CAUSED BY EXTRACELLULAR ASYN

ULOGA AUTOFAGIJE U NEUROTOKSIČNOM DELOVANJU VANĀELIJSKOG ALFA SINUKLEINA NA SH-SY5Y ĀELIJE HUMANOG NEUROBLASTOMA

Andrija Đuranović¹, Marija Jeremić¹, Nevena Zogović², Gordana Tovilović Kovačević², Marija Dulović³

¹ University of Belgrade, Faculty of Medicine, Serbia

² Institute for Biological Research "Sinisa Stankovic", Belgrade, Serbia

³ University of Belgrade, Faculty of Medicine, Institute of Medical and Clinical Biochemistry, Serbia

Correspondence: djuranovic.andrija@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: The accumulation of alpha-synuclein (ASYN) in susceptible neurons is considered to be a major contributing factor in pathogenesis of Parkinson's disease. Although ASYN was considered as an intracellular protein, recent data suggest that it can be detected extracellularly. Autophagy plays an important role in ASYN degradation; therefore, impairment of autophagy could be an important contributor to ASYN accumulation. ATG (autophagy-related genes) proteins function at several physiologically continuous steps in autophagy, and ATG7 is considered as essential in autophagosome formation and maturation.

Aim: The aim of this study was to investigate the role of autophagy in neurotoxicity, caused by extracellular ASYN.

Material and methods: All experiments were conducted in *all-trans* retinoic acid-differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells, that were exposed to extracellular ASYN. The presence of extracellular ASYN and the expression of autophagy markers, beclin-1 and LC3-II, were monitored using immunoblotting. Transfection, with small interfering RNA (siRNA), was used to knock down ATG7 gene. Cell viability was assessed using crystal violet dye exclusion assay.

Results: Extracellular ASYN caused significant loss of viability in differentiated SH-SY5Y cells, accompanied by the increase in expression of beclin-1 and in conversion of LC3-I to autophagosome-associated LC3-II. The RNA interference-mediated knock-down of ATG7 increased the sensitivity of SH-SY5Y cells to the extracellular ASYN-induced toxicity.

Conclusion: Extracellular ASYN caused loss of viability in differentiated SH-SY5Y cells accompanied by autophagy induction. Having in mind that inhibition of autophagy, through ATG7 knock-down increased cell death, we can conclude that autophagy could have a protective role in the harmful effect of extracellular ASYN.

Key words:

α-synuclein,
autophagy,
ATG7,
SH-SY5Y,
neurotoxicity

SAŽETAK

Uvod. U osnovi patogenetskog mehanizma Parkinsonove bolesti leži povećano nakupljanje proteina α -sinukleina (ASYN) u dopaminergičkim neuronima *substantiae nigrae*, što, između ostalog, dovodi i do smrti ćelija. Iako je ranije smatran isključivo unutarćelijskim proteinom, novijim istraživanjima je pokazano da se ASYN nakuplja i u vanćelijskom prostoru. Do nakupljanja ASYN može da dođe usled oštećenja sistema za razgradnju proteina, od kojih je najznačajniji mehanizam autofagija. Autofagija je regulisana proizvodima ATG gena (engl. *autophagy-related genes*). Jedan od njih, ATG7, ima bitnu ulogu u formiranju i sazrevanju autofagozoma.

Cilj. Cilj ovog rada je bio da se ispita uloga autofagije u neurotoksičnosti vanćelijskog ASYN na SH-SY5Y ćelije humanog neuroblastoma, diferentovanih u neuronski fenotip.

Materijali i metode. Svi eksperimenti su rađeni na SH-SY5Y ćelijskoj liniji humanog neuroblastoma. Ćelije su diferentovane „all-trans“ retinoičnom kiselinom i tretirane medijumom koji sadrži vanćelijski ASYN. Imunoblot metodom je potvrđeno prisustvo vanćelijskog ASYN i praćena promena ekspresije markera autofagije, proteina LC3-II i beclin-1. Metodom transfekcije sa malom interferirajućom RNK inhibirana je ekspresija ATG7 proteina. Vijabilitet i broj ćelija određeni su kristal violet testom.

Rezultati. Vanćelijski ASYN dovodi do značajnog smanjenja vijabiliteta SH-SY5Y ćelija, što je praćeno povećanjem nivoa markera autofagije, proteina LC3-II i beclin-1. Analizom ćelijskog vijabiliteta primećen je značajan pad u broju živih ćelija kod kojih je utišan gen za ATG7, a koje su gajene u prisustvu vanćelijskog ASYN.

Zaključak. Vanćelijski ASYN dovodi do smanjenog preživljavanja SH-SY5Y ćelija diferentovanih u neuronski fenotip, što je praćeno indukcijom autofagije. Inhibicija autofagije preko utišavanja ATG7 gena dovela je do povećane osetljivosti ćelija gajenih u prisustvu vanćelijskog ASYN, što ukazuje na moguću protektivnu ulogu autofagije u neurotoksičnosti, izazvanoj nagomilavanjem ASYN u vanćelijskom prostoru.

Keywords:

α -sinuklein,
autofagija,
ATG7,
SH-SY5Y,
neurotoksičnost

UVOD

Parkinsonova bolest (PB) karakteriše se progresivnom degeneracijom i izumiranjem dopaminergičkih neurona u *pars compacta substantiae nigrae* mezencefalona, a osnovni patohistološki supstrat bolesti su nakupljanje proteina alfa sinukleina (ASYN) u zahvaćenim neuronima i formiranje Levijevih tela (1, 2). Najnovija istraživanja pokazuju da ASYN nije isključivo unutarćelijski protein, kao što se ranije smatralo, već da promene u koncentraciji ovog proteina mogu da se otkriju i u cerebrospinalnoj tečnosti obolelih od PB (3). Pokazano je i da se ASYN može preneti sa neurona na neuron (4), što ukazuje na to da je mogući mehanizam širenja PB sličan patogenetskom mehanizmu širenja prionskih proteina (5, 6). Molekularni mehanizam degeneracije i smrti dopaminergičkih neurona, kao i način širenja patoloških promena duž nervnog sistema, ipak još uvek nisu pouzdano utvrđeni (7).

Do nakupljanja ASYN u zahvaćenim neuronima može da dođe usled prekomerne sinteze i/ili usled smanjenog kapaciteta za uklanjanje i razgradnju. Najnovija istraživanja pokazuju da je osnovni mehanizam razgradnje ASYN lizozomalnim mehanizmima - autofagijom posredovanom šaperonima (engl. *chaperone-mediated autophagy*, CMA) i makroautofagijom. Pokazano je da prekomerna količina ASYN nepovoljno utiče na pomenute lizozomalne sisteme razgradnje proteina, kao i da smanjenje funkcije bilo kog od lizozomalnih sistema za razgradnju proteina može da doprinese nakupljanju ASYN u ćeliji (8).

Makroautofagija je katabolički proces, posredovan

lizozomima. Ima ulogu u razgradnji i reciklaži oštećenih ili nefunkcionalnih citoplazmatskih komponenti ili organela i oštećenih proteina, kao i u adaptaciji ćelija na različite nokse (9). Autofagija je regulisana proizvodima ATG gena (gena povezanih sa autofagijom, engl. *autophagy related genes*) i može se opisati karakterističnim sledom faza: indukcijom autofagije, stvaranjem autofagozoma (nukleacija i elongacija), sazrevanjem autofagozoma, fuzijom autofagozoma i lizozoma i razgradnjom sadržaja (10, 11). Serin-treonin kinaza ATG1 predstavlja glavni enzim koji inicira autofagiju. Tokom ćelijskog i metaboličkog stresa dolazi do aktivacije ATG1 unutar ATG1-ATG13 kompleksa i inicijacije autofagije. Nakon toga, ATG1 stimuliše translokaciju kompleksa fosfoinozimid 3-kinaze (PI3K) na membranu endoplazmatskog retikuluma, umesto formiranja autofagozoma. Nukleacija i elongacija autofagozoma kontrolisane su kompleksom PI3K, koji obuhvata i ATG14 i beclin-1 (ATG6) protein. U kasnijem procesu rasta i sazrevanja autofagozoma učestvuju dva konjugaciona sistema slična ubikvitinu: jedan čine ATG12-ATG5-ATG16 proteini, a drugi je sastavljen od proteaze ATG4 i LC3 proteina (engl. *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*). Protein LC3 kod sisara, čiji je homolog ATG8 kod kvasca, proteolitički se obrađuje pomoću ATG3, ATG4 i ATG7 enzima, formirajući solubilnu formu LC3-I. Uz posredovanje kompleksa ATG12-ATG5-ATG16, LC3-I se dalje konjuguje sa fosfatidiletanolaminom, stvarajući LC3-II koji se specifično vezuje za autofagozomalnu membranu. Stvaranje ovog kompleksa omogućavaju ATG7 i ATG10. Tokom procesa sazrevanja citoplazmatski sadržaj

se pakuje u dvomembranski autofagozom. Kada je stvaranje autofagozoma završeno, on se spaja sa lizozomom, stvarajući jednomembranski autofagolizozom u kome se vrši digestija makromolekuskog sadržaja pod dejstvom kiselih hidrolaza lizozoma (12-14).

Nije još uvek u potpunosti jasno da li se u procesu neurodegeneracije autofagija nalazi mehanizam koji poboljšava šanse da ćelije prežive ili mehanizam koji doprinosi oštećenju i smrti ćelije, bilo da deluje nezavisno, bilo da funkcioniše u sadejstvu sa apoptozom i nekrozom. S tim u vezi, autofagija se često naziva mačem sa dve oštrice jer, iako može da ima protektivnu ulogu, može da doprinese i degeneraciji i smrti ćelija (15).

Cilj ovog rada je bio da se ispita uloga autofagije u neurotoksičnom delovanju vanćelijskog ASYN na SH-SY5Y ćelije humanog neuroblastoma, diferentovanih u neuronski fenotip.

MATERIJAL I METODE

Kultura ćelija i reagensi

Za potrebe ovog istraživanja korišćena je komercijalna SH-SY5Y ćelijska linija humanog neuroblastoma. Izabrana ćelijska linija pokazuje neke karakteristike dopaminergičkih neurona – mogućnost sinteze dopamina i noradrenalina usled ekspresije dopamin- i tirozin- β -hidroksilaze (16) i ekspresiju transportera dopamina (DAT) na membrani (17). Diferencijacija ćelija do neurona izvršena je „*all-trans*“ retinoičnom kiselinom (engl. *retinoic acid*, RA) (štok 20 mM), u periodu od 6 dana (10 μ l RA po 1 ml medijuma), prema podacima iz literature (18). Ćelije su uzgajane u RPMI 1640 medijumu, obogaćenom sa 10% fetalnog goveđeg seruma, L-glutaminom (2 mM), uz dodatak smeše antibiotik/antimikotik (1%) (sve od PAA, Austrija), na 37 °C, u vlažnoj atmosferi, sa 5% ugljen-dioksida (CO₂).

Priprema medijuma koji sadrži vanćelijski ASYN (engl. *conditioned medium*, CM)

Da bismo dobili vanćelijski sekretovan ASYN, koristili smo SH-SY5Y ćelije, transfekovane genom za nemutiranu formu (engl. *wild type*, wt) ASYN, dobijene kao poklon od prof. dr Leonidasa Stefanisa, sa Medicinskog fakulteta Univerziteta u Atini. Ćelije su gajene u Petrijevim šoljama, prečnika 60 mm, u RPMI 1640 medijumu obogaćenom sa 10% fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS), u prisustvu i odsustvu doksiciklina (DOX, 1 μ g/ml) do gustine od 70-80%. Nakon 7 dana od ukidanja doksiciklina iz medijuma, ćelije su počele prekomerno da sintetišu ASYN (α -syn- ćelije). Ćelije su potom gajene 48 sati u medijumu koji sadrži 2% FBS, jer je ranije opisano da α -syn⁻ ćelije pojačano sekretuju ASYN u uslovima nedostatka hranljivih materija (19). Nakon isteka ovog perioda medijum je prikupljen, vraćen na 10% FBS,

a potom centrifugiran na 4000 g, tokom 10 minuta na 4 °C, kako bi se uklonio ćelijski debris. Prikupljeni medijum (engl. *conditioned medium*, CM) dalje je korišćen za eksperimente kao izvor vanćelijskog ASYN. Na isti način su prikupljeni medijumi iz Petrijevih šolja u kojima su gajene ćelije u prisustvu doksiciklina, tj. kojima nije uključen gen za ASYN (α -syn⁺ ćelije sa 2% i 10% FBS), kao i ćelije koje prekomerno proizvode ASYN (α -syn⁻ ćelije), a koje su sve vreme gajene u medijumu sa 10% FBS. Kako bismo analizirali sadržaj ASYN u različitim medijumima, izvršena je liofilizacija medijuma do suve materije (CHRIST, Alpha 2-4 LD plus, pritisak 0.0089 mbar, temperatura 65 °C), a potom tehnika imunoblota na dobijenim liofilizatima.

Tehnika imunoblota (*Western blot*)

Tehnika imunoblota (*Western blot*) metoda je koja služi za otkrivanje proteina u uzorku. Zasnovana je na razdvajanju proteina elektroforezom i njihovom otkrivanju zasnovanom na reakciji antigen-antitelo. Primenjuje se antitelo specifično za protein, tj. antigen.

Imunoblot tehnika je korišćena za potvrdu prisustva vanćelijskog ASYN u liofilizatima različitih medijuma, dobijenih sakupljanjem iz Petrijevih šolja u kojima su gajene ćelije koje prekomerno proizvode ASYN (α -syn⁻ ćelije sa 2% i 10% FBS), kao i kontrolne ćelije kojima nije uključen gen za ASYN (α -syn⁺ ćelije sa 2% i 10% FBS). Uz to, tehnika imunoblota je korišćena kako bi se utvrdio nivo proteina LC3 i beclin-1, koji se koriste kao najčešći pokazatelji indukcije autofagije. Za potrebe ovog eksperimenta ćelije su gajene u Petrijevim šoljama prečnika 10 cm (SARSTEDT, Nemačka), 1 x 10⁶ ćelija u 10 ml medijuma po svakoj Petrijevoj šolji i diferentovane sa RA (10 μ L/mL) tokom 6 dana. Ćelije su potom gajene još 48 sati u medijumu koji sadrži sekretovan ASYN (CM). Nakon isteka ovog inkubacionog perioda ćelije su lizirane na ledu 30 minuta puferom za liziranje (engl. *lysis buffer*) koji se sastoji od: 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM natrijum-hlorida (NaCl), 1% NP-40, 1 mM fenilmetilsulfonilfluorida i koktela inhibitora proteaza (engl. *proteasis inhibitor cocktail*, PIC). Ćelije su potom centrifugirane na 14.000 g, 15 min na 4 °C, posle čega je pokupljen supernatant. Nakon liziranja ćelija određivana je koncentracija proteina u svakom uzorku metodom po Bradfordu. Princip ove metode je da proteini reaguju sa bojom *Comassie Brilliant Blue* i prevode je u anjonski oblik, tako da se boja menja od smeđecrvene u plavu boju. Intenzitet dobijene plave boje proporcionalan je koncentraciji proteina u uzorku. Koncentracije proteina u uzorcima određene su na osnovu standardne krive, koja se dobija u reakciji albumina iz seruma govečeta (engl. *bovine serum albumin*, BSA) u koncentraciji od 5, 10, 15 i 20 mg/ml. Apsorbanca je očitana na čitaču za mikrotitarske ploče (TECAN Sunrise) na 570 nm. Proteini u uzorcima su razdvojeni elektroforezom u denaturišućim uslovima (SDS-PAGE) na 12% i 10% poliakrilamidnom gelu, a potom su prenete na nitrocelulozne membrane (*Bio-Rad, Marnes-la-Coquette*, Francuska), po-

moću aparature za polusubi transfer (TE 70 *Semi-dry transfer unit*, Amersham Biosciences, SAD). Kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela za membranu, membrana je inkubirana 1 sat na sobnoj temperaturi u 5% rastvoru mleka u TBS-T (TBS i 0,05% Tween 20). Membrane su potom tokom noći bile potopljene u rastvor primarnog antitela za α -sinuklein (ASYN, razblaženje od 1:1000), aktin (β -actin, 1:5000), beclin-1 (1:1000) i LC3 (1:900) u mleku (5% rastvor mleka u TBS-T) (sve od *Cell Signaling Technology*, SAD). Nakon ispiranja primarnog antitela u rastvoru TBS-T, dodato je sekundarno antitelo obeleženo peroksidazom (engl. *anti-rabbit IgG-HRP At*, 1:5000, *Jackson IP Laboratories*, SAD), takođe rastvoreno u mleku (5% rastvor mleka u TBS-T). Nalivanjem hemiluminiscentnog supstrata za peroksidazu (*ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ*, SAD) na nitrocelulozne membrane i vizuelizacijom signala na rendgenskom filmu dobijeni su kvalitativni podaci o prisustvu određenog proteina.

Transfekcija sa malom interferirajućom RNK (engl. *small interfering RNA*, siRNA)

Da bi se inhibirala ekspresija ATG7 proteina u SH-SY5Y ćelijama rađena je transfekcija sa malom interferirajućom RNK (engl. *small interfering RN*, siRNA). Ćelije su gajene u 90 mm Petrijevim šoljama u RPMI medijumu sa 5% goveđeg seruma, bez antibiotika. Nakon 24 sata, kada su ćelije bile 60% konfluentne, transfekovane su sa ATG7 siRNA i kontrolnom siRNA (*Santa Cruz Biotechnology*, CA, SAD). Oligomeri siRNA su prethodno rastvoreni u Opti-MEM medijumu sa redukovanim serumom u odsustvu antibiotika i inkubirani 5 minuta. Inkubiran je i lipofektamin 2000 (Invitrogen, CA, SAD) 5 minuta u Opti-MEM medijumu sa redukovanim serumom u odsustvu antibiotika. Iste zapremine razblaženog lipofektamina i siRNA zatim su pomešane i inkubirane 20 minuta radi formiranja kompleksa oligomer-lipofektamin. Ćelijama je promenjen medijum (RPMI+5% seruma) i dodat siRNA-lipofektamin 2000 kompleks, tako da je finalna koncentracija siRNA bila 100 nM, a lipofektamin je 600 puta razblažen, kako je preporučeno od strane proizvođača. Ćelije su inkubirane 8 sati sa medijumom za transfekciju i nakon toga je promenjen medijum i sipan normalan medijum za kultivaciju ćelija (RPMI + 5% goveđeg seruma + antibiotici). Nakon 24 sata od početka transfekcije ćelije su presađene u ploče sa 96 bunara i ostavljene još 24 sata. Nakon toga su određivani vijabilitet i broj ćelija kristal violet testom.

Kristal violet metoda (*Crystal violet*)

Kristal violet metodu koristili smo za određivanje broja živih ćelija. Princip metode jeste da se boja (kristal violet) vezuje za proteine živih ćelija, tako da intenzitet dobijene plave boje korelira sa brojem živih ćelija. Ćelije su zasejavane u mikrotitarske ploče sa 96 bunara (2 x 10⁴ ćelija u 100 μ l medijuma po svakom bunaru) i tretirane u

triplikatu.

Nakon tretmana i inkubacije, ćelijama je odliven medijum, oprane su PBS-om (puferovani fiziološki rastvor) i u svaki bunar je dodato po 50 μ l metanola. Ploče su potom stajale na sobnoj temperaturi 10 minuta. Na ovaj način je izvršena fiksacija ćelija. Odliven je metanol i dodat je rastvor kristal violet boje (1:10 u fosfatnom puferu - PBS-u), po 50 μ l u svaki bunar. Posle 10 minuta je odlivena boja i ćelije su isprane u posudi sa vodom. U svaki bunar je dodato po 50 μ l 33% rastvora sirćetne kiseline. Kristal violet se pod dejstvom sirćetne kiseline rastvara i rastvor postaje plave boje. Apsorbanca je očitana na čitaču za mikrotitarske ploče (TECAN Sunrise) na 570 nm. Procenti su izraženi u odnosu na vijabilitet diferentovanih (RA) netretiranih SH-SY5Y ćelija (vijabilitet 100%).

Statistička analiza

Za poređenje rezultata je korišćen Studentov t-test za dva mala nezavisna uzorka. Kao kriterijumi značajnosti uzeti su $p < 0,05$ (razlika je statistički značajna) i $p < 0,01$ (razlika je statistički veoma značajna).

REZULTATI

Ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y koje prekomerno proizvode ASYN sekretuju ga u medijum u kom su gajene

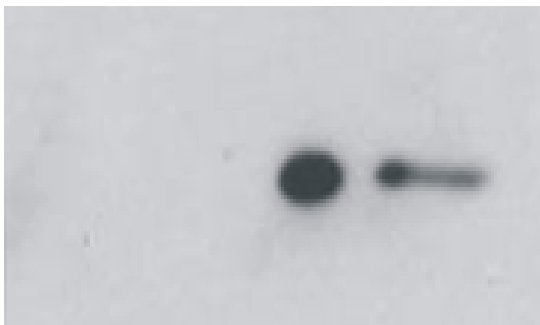
Prisustvo ASYN u liofilizatima različitih medijuma, dobijenih sakupljanjem iz Petrijevih šolja u kojima su gajene ćelije koje prekomerno proizvode ASYN (α -syn⁻ ćelije sa 2% i 10% FBS), kao i kontrolne ćelije kojima nije „uključen“ gen za ASYN (α -syn⁺ ćelije sa 2% i 10% FBS), verifikovali smo koristeći tehniku imunoblota. Najznačajnije povećanje nivoa ASYN primećeno je u liofilizatu medijuma dobijenog sakupljanjem iz Petrijevih šolja u kojima su gajene ćelije koje prekomerno proizvode ASYN (α -syn⁻ ćelije), a koje su gajene u medijumu sa 2% FBS (**slika 1**). Stoga možemo zaključiti da transfekovane SH-SY5Y ćelije koje prekomerno proizvode ASYN (α -syn⁻ ćelije), sekretuju ovaj protein u vanćelijski prostor u uslovima smanjenja hranljivih materija, tj. manje koncentracije FBS, kao što je ranije opisano (19).

Vanćelijski sekretovan ASYN dovodi do povećane zastupljenosti markera autofagije

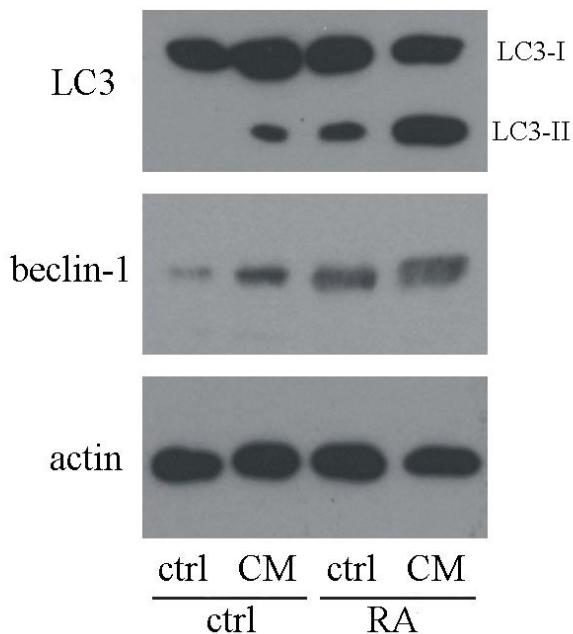
Dalje je ispitivana konverzija solubilnog LC3-I u LC3-II formu proteina koja je konjugovana sa fosfatidil-etanolaminom. Protein LC3-II se naročito inkorporira u membranu autofagozoma i autofagolizozoma (20). Beclin-1 (ATG6) je neophodan za proces inicijalnog formiranja autofagozomne membrane. Tačnije, pri indukciji autofagije očekujemo porast ekspresije beclin-1 i konverzije LC3-I u LC3-II (21). Imajući u vidu da je β -aktin kon-

stitutivno eksprimiran u ćelijama, a njegova ekspresija je korišćena kao kontrola nanetog uzorka ćelijskog lizata.

Uz pomoć imunoblot tehnike pokazali smo da dolazi do povećanja nivoa proteina LC3-II i beclin-1 nakon tretmana medijumom koji sadrži vanćelijski sekretovan ASYN (CM) kod nediferentovanih SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma (ctrl). To povećanje je, međutim, bilo prominentnije kod SH-SY5Y ćelija diferentovanih u neuronski fenotip (RA) (slika 2). Dobijeni rezultati ukazuju na to da indukcija autofagije može da bude značajan korak u neurotoksičnom delovanju vanćelijski sekretovanog ASYN.



Slika 1. Imunoblot analiza prisustva vanćelijski sekretovanog ASYN u liofilizatima medijuma prikupljenim od α -syn⁺ ćelija (CM asyn+) i α -syn⁻ ćelija koje prekomerno proizvode ASYN (CM asyn-). Medijumi su sadržali FBS (engl. fetal bovine serum) u različitim koncentracijama (2% i 10%).

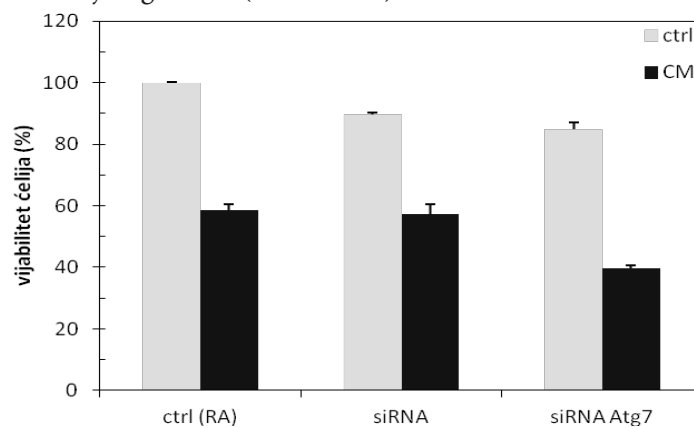


Slika 2. Uticaj vanćelijski sekretovanog ASYN na zastupljenost markera autofagije u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y diferentovanih u neuronski fenotip (RA), kao i kod kontrolnih, nediferentovanih ćelija (ctrl). Diferentovane ćelije (RA) su gajene 48 sati u prisustvu medijuma koji sadrži vanćelijski sekretovan ASYN (CM), nakon čega su imunoblot analizom otkriveni nivoi proteina markera autofagije (protein beclin-1 i konverzija LC3-I u LC3-II oblik proteina), kao i nivo proteina β -aktina (aktin).

Na imunoblotu za LC3 protein gornja traka predstavlja LC3-I formu, a donja traka LC3-II formu proteina. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz 3 nezavisna eksperimenta.

Vanćelijski sekretovan ASYN dovodi do smanjenog preživljavanja SH-SY5Y ćelija kod kojih je utišan gen za ATG7

Kao što je ranije pomenuto, ATG7 je jedan od proteina bitnih za formiranje i sazrevanje autofagozoma, tako da je, ukoliko nema ATG7, inhibiran proces autofagije (22-26). Da bismo utvrdili da li je autofagija u našem modelu protektivna ili pomaže umiranju ćelija, ekspresija ATG7 proteina je inhibirana transfekcijom sa malom interferirajućom RNK (siRNA) u SH-SY5Y ćelijama. Rezultati dobijeni kristal violet testom pokazuju da vanćelijski ASYN dovodi do očekivanog pada vijabilitea SH-SY5Y ćelija diferentovanih u neuronski fenotip. Pokazan je i statistički značajan ($p < 0,05$) pad vijabilitea (na $39,5 \pm 1,2\%$) u ćelijama kod kojih je utišan gen za ATG7 (siRNA ATG7), a koje su gajene u medijumu u kom je prisutan vanćelijski ASYN (CM), u odnosu na kontrolno transfekovane ćelije (siRNA) koje su takođe gajene u CM (vijabilitet $84,8 \pm 2,4\%$), kao i u odnosu na ćelije kod kojih je utišan gen ATG7 ali su gajene u odustvu vanćelijskog ASYN (vijabilitet $58,5 \pm 2,1\%$). Ovi podaci ukazuju na moguću protektivnu ulogu koju ima autofagija u neurotoksičnosti vanćelijskog ASYN (**Grafikon 1**).



Grafikon 1. Uticaj vanćelijskog ASYN na vijabilitet SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma kod kojih je utišan gen ATG7. Ćelije SH-SY5Y kontrolno su transfekovane (siRNA) i pomoću siRNA za utišavanje ATG7 gena (siRNA ATG7), a potom su diferentovane retinoičnom kiselinom (RA) u periodu od 6 dana i gajene 48 sati u običnom medijumu (ctrl) ili medijumu koji sadrži vanćelijski sekretovan ASYN (CM). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost triplikata iz 3 reprezentativna uzorka \pm S.D.

*označava $p < 0,05$ kada se porede ćelije koje su gajene u CM, u odnosu na ćelije koje su gajene u običnom medijumu (ctrl); #označava $p < 0,05$ kada se porede ćelije kod kojih je utišan gen ATG7 (siRNA ATG7), a gajene su u CM, u odnosu na kontrolno transfekovane ćelije (siRNA), koje su takođe gajene u CM.

DISKUSIJA

Kao što je već prethodno pomenuto, prekomerno nakupljanje ASYN je važan etiopatogenetski faktor u nastanku PB (2). Do prekomernog nakupljanja ovog proteina može doći usled njegove povećane sinteze ili zbog smanjenih mogućnosti ćelije za razgradnju proteina, gde centralnu ulogu ima lizozomalna razgradnja – autofagija (27, 28). Alfa sinuklein se do skoro smatrao unutarćelijskim proteinom, da bi novije studije pokazale da ćelije procesom egzocitoze oslobađaju ASYN i da upravo taj vanćelijski ASYN dovodi do neurodegeneracije (29). Štaviše, najnovija istraživanja pokazuju da se promene u koncentraciji ASYN mogu uočiti i u cerebrospinalnoj tečnosti obolelih od PB, što otvara mogućnost korišćenja ASYN kao specifičnog biomarkera u dijagnozi i praćenju PB (3).

U ovom istraživanju smo koristili ćelije humanog neuroblastoma SH-SY5Y, koje smo diferencirali pomoću RA do neuronskog fenotipa. Analizom ćelija pomoću svetlosne mikroskopije uz primenu faznog kontrasta uočeni su manja gustina diferenciranih ćelija, kao i znaci izmenjene morfologije ćelija (gubitak tipičnog poligonalnog oblika i pojava dugih nastavaka) (30). Ćelije su tretirane medijumom koji sadrži vanćelijski ASYN, što je uzrokovalo povećanje nivoa markera autofagije, proteina LC3-II i beclin-1, što indirektno pokazuje da vanćelijski ASYN dovodi do indukcije autofagije. Imajući u vidu da autofagija može imati dvojnu ulogu u ćeliji – kao mehanizam koji poboljšava šanse za preživljavanje, ili, kao mehanizam koji doprinosi oštećenju i smrti ćelije, genetskom manipulacijom smo utišali gen za ATG7, protein koji ima značajnu ulogu u stvaranju autofagozoma, i na taj način inhibirali proces autofagije, a sve u cilju ispitivanja uloge autofagije u neurotoksičnosti vanćelijskog ASYN. Dobijeni rezultati pokazuju da vanćelijski ASYN dovodi do smanjenja vijabilnosti SH-SY5Y ćelija diferenciranih u neuronski fenotip, a utišavanje gena za ATG7 protein dovodi do još veće osetljivosti ćelija na toksično delovanje vanćelijskog ASYN. Iz ovih rezultata možemo zaključiti da autofagija može da bude mehanizam kojim se ćelija brani od prekomernog nakupljanja ASYN u vanćelijskom prostoru.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da prekomerna količina ASYN u vanćelijskom prostoru nepovoljno utiče na ćelije neuroblastoma koje su diferencirane u neuronski fenotip (30), kao i da smanjena funkcija lizozomalnog sistema za razgradnju proteina, autofagije, dovodi ne samo do nagomilavanja ASYN unutar ćelija već i do sekrecije ASYN u vanćelijski prostor i prenosa ASYN sa ćelije na ćeliju (31). Štaviše, primena farmakološkog inhibitora autofagije, 3-metiladenina (3-MA), dovodi do nakupljanja ASYN, što potvrđuje nepovoljan efekat inhibicije autofagije i njen značaj u metabolizmu ASYN (32). Tačan molekularni mehanizam, međutim, i dalje ostaje nepoznanica. Kao što je ranije rečeno, autofagija je regulisana proizvodima ATG gena, a jedan od njih, ATG7,

ima bitnu ulogu u formiranju i sazrevanju autofagozoma (22-26). Postoji nekoliko istraživanja o povezanosti ATG7 gena i procesa neurodegeneracije. Pokazano je da nakon delecije ATG7 gena u neuronima miševa dolazi do degeneracije i smrti neurona usled povećane akumulacije ASYN (22-25). Pored ovoga, u neuronima nije registrovan nijedan autofagozom, što nesumnjivo govori o značaju autofagije za funkcionisanje neurona i uklanjanje viška ASYN (26). U prilog ovome govori istraživanje u kom je inhibicija autofagije putem delecije ATG7 dovela do povećane sekrecije ASYN u vanćelijski prostor i prenošenja ASYN u susedne ćelije, što je uzrokovalo smrt ovih ćelija (31). Najnovija istraživanja, koja su sprovedena na uzorcima pacijenata obolelih od Parkinsonove bolesti, ukazuju na značaj heterozigotnih mutacija koje dovode do smanjenja transkripcione aktivnosti promotora za ATG7 (33). Treba spomenuti i da postoje otkrića koja govore o tome da postoji i autofagija nezavisna od delovanja ATG5/ATG7 proteina (34), što otvara vrata novim ispitivanjima u ovom istraživačkom polju.

Iz ovog istraživanja možemo izvesti zaključak da vanćelijski ASYN dovodi do smanjenog preživljavanja SH-SY5Y ćelija diferenciranih u neuronski fenotip, što je praćeno indukcijom autofagije. Inhibicija autofagije preko utišavanja ATG7 gena dovela je do povećane osetljivosti ovih ćelija na toksični efekat vanćelijskog ASYN, što ukazuje na moguću protektivnu ulogu autofagije u neurotoksičnosti izazvanoj nagomilavanjem ASYN u vanćelijskom prostoru. Neophodna su, međutim, dalja ispitivanja molekularnog mehanizma kojim autofagija ostvaruje svoju ulogu u neurotoksičnosti izazvanoj vanćelijskim nagomilavanjem ASYN.

Literatura

1. Vinay K, Abul KA, Jon CA, editors. Robbins basic pathology. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders 2013.
2. Thomas B, Beal MF. Parkinson's disease. Hum Mol Genet. 2007; 16: 183–194.
3. Gao L, Tang H, Nie K, Wang L, Zhao L, Gan R, et al. Cerebrospinal fluid alpha-synuclein as a biomarker for Parkinson's disease diagnosis: a systematic review and meta-analysis. Int J Neurosci. 2015; 125(9):645-54.
4. Desplats P, Lee HJ, Bae EJ, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. Proc Natl Acad Sci USA. 2009; 106(31):13010.
5. Olanow C.W, Brundin P. Parkinson's disease and alpha synuclein: is Parkinson's disease a prion-like disorder? Mov Disord. 2013; 28(1):31-40.
6. Sato H, Kato T, Arawaka S. Potential of Cellular and Animal Models Based on a Prion-Like Propagation of α -Synuclein for Assessing Antiparkinson Agents. Mol Neurobiol. 2015; 52(1):226-35.
7. Lau LM, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM. Serum cholesterol levels and the risk of Parkinson's disease. Am J Epidemiol. 2006; 164(10):998-1002.
8. Lee HJ, Khoshaghideh F, Patel S, Lee SJ. Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal

- degradation pathway. *J Neurosci*. 2004; 24(8):1888-96.
9. Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat. Cell Biol*. 2013; 15, 713–720.
 10. Kung CP, Budina A, Balaburski G, Bergenstock MK, Murphy M. Autophagy in tumor suppression and cancer therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Exp*. 2011; 21(1):71-100.
 11. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, et al. A Unified Nomenclature for Yeast Autophagy-Related Genes. *Dev Cell*. 2003; 5(4) 539–545.
 12. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011; 27:107-32.
 13. Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res*. 2012; 22(1):43-61.
 14. Todde V, Veenhuis M, van der Klei IJ. Autophagy: Principles and significance in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009; 1792: 3–13.
 15. Shintani, T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*. 2004; 306: 990-995.
 16. Oyarce AM, Fleming PJ. Multiple forms of human dopamine beta-hydroxylase in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys*. 1991. 290(2):503–510.
 17. Takahashi T, Deng Y, Maruyama W, Dostert P, Kawai M, Naoi M. Uptake of a neurotoxin-candidate, (R)-1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells by dopamine transport system. *J Neural Transm Gen Sect*. 1994; 98(2):107–118.
 18. Joshi S, Guleria R, Pan J, DiPette D, Singh US. Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Oncogene*. 2006; 25(2):240–247.
 19. Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH, et al. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J Neurosci*. 2010; 30(20):6838–6851.
 20. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*. 2008; 445: 77-88.
 21. Bjorkoy G, Lamark T, Pankiv S, Øvervatn A, Brech A, Johansen T. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods in Enzymology*. 2009; 452: 181-197.
 22. Friedman LG, Lachenmayer ML, Wang J, He L, Poulou SM, Komatsu H, et al. Disrupted autophagy leads to dopaminergic axon and dendrite degeneration and promotes presynaptic accumulation of α -synuclein and LRRK2 in the brain. *J Neurosci*. 2012; 32(22): 7585–7593.
 23. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 2006; 441(7095):880-4.
 24. Chang CF, Huang HJ, Lee HC, Hung KC, Wu RT, Lin AM. Melatonin attenuates kainic acid-induced neurotoxicity in mouse hippocampus via inhibition of autophagy and a-synuclein aggregation. *J Pineal Research*. 2012; 52(3):312-21.
 25. Ahmed I, Liang Y, Schools S, Dawson VL, Dawson TM, Savitt JM. Development and characterization of a new Parkinson disease model resulting from impaired autophagy. *J Neurosci*. 2012; 32(46): 16503–16509.
 26. Komatsu M, Wang QJ, Holstein GR, Friderich VL Jr, Iwata J, Kominami E, et al. Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(36), 14489–94
 27. Ebrahimi-Fakhari D, Wahlster L, McLean PJ. Protein degradation pathways in Parkinson's Disease – Curse or Blessing. *Acta Neuropathol*. 2012; 124(2):153–172.
 28. Xilouri M, Stefanis L. Autophagic pathways in Parkinson disease and related disorders. *Expert Rev Mol Med*. 2011; 13:e8.
 29. Lee HJ, Bae EJ, Lee SJ. Extracellular α -synuclein – a novel and crucial factor in Lewy body diseases. *Nature Reviews Neurology*. 2014; 10(2):92-98.
 30. Dulovic M, Jovanovic M, Xilouri M, Stefanis L, Harhaji-Trajkovic L, Kravic-Stevovic T, et al. The protective role of AMP-activated protein kinase in alpha-synuclein neurotoxicity in vitro. *Neurobiol Dis*. 2014;63:1–11.
 31. Lee HJ, Cho ED, Lee KW, Kim JH, Cho SG, Lee SJ. Autophagic failure promotes the exocytosis and intercellular transfer of a-synuclein. *Experimental & Molecular Medicine*. 2013; 45, e22;
 32. Winslow AR, Chen CW, Corrochano S, Acevedo-Arozena A, Gordon DE, Peden AA et al. α -synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J Cell Biol*. 2010; 190(6):1023-37.
 33. Crews L, Spencer B, Desplats P, Patrick C, Paulino A, Rockenstein E, et al. Selective molecular alterations in the autophagy pathway in patients with Lewy body disease and in models of alpha-synucleinopathy. *PloS One*. 2010; 5(2):e9313.
 34. Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, et al. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*. 2009; 461(7264):654-8.