

**Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej**

**im. Mirosława Mossakowskiego**

**Polska Akademia Nauk**

**Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału**

**Anna Kaźmierczak**

**Znaczenie alfa-synukleiny w stresie  
oksydacyjnym, toksyczności peptydów  
amyloidu beta oraz w mechanizmie śmierci  
komórek**

**Praca doktorska wykonana pod kierunkiem**

**Prof. dr hab. Joanny B. Strosznajder**

**Warszawa 2010**



*Pragnę serdecznie podziękować:*

*Pani prof. dr hab. Joannie Strosznajder – promotorowi mojej pracy, za jej entuzjazm i przychylność, które skłoniły mnie do podjęcia studiów doktoranckich w Zakładzie Komórkowej Transdukcji Sygnału, a także za stworzenie warunków rozwoju naukowego oraz opiekę naukową podczas całego okresu pracy*

*Pani dr Agacie Adamczyk za nieocenioną pomoc w trudnych początkach mojej pracy doświadczalnej oraz merytoryczne wsparcie w rozwiązywaniu naukowych problemów*

*Chciałabym podziękować także wszystkim Koleżankom i Kolegom z Zakładu Komórkowej Transdukcji Sygnału za stworzenie miłej atmosfery pracy.*

*Szczególne podziękowania kieruję do dr Magdaleny Cąkały, mgr Urszuli Radeckiej, oraz do pań: Magdaleny Kudlik i Marii Kacprzak za pomoc w realizacji doświadczeń, a także do dr. Grzegorza Czapskiego za owocne dyskusje i wnikliwe przeczytanie manuskryptu.*

*Anna Kaźmierczak*



*Niniejszą pracę dedykuję moim wspaniałym  
Rodzicom i Babci, którzy zawsze we mnie wierzyli i  
wspierali mnie w każdej sytuacji.*



Większość przedstawionych w tej pracy wyników stanowi treść następujących publikacji::

- Adamczyk A., Czapski G.A., **Kaźmierczak A.**, Strosznajder J.B. *Effect of N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor antagonists on  $\alpha$ -synuclein-evoked neuronal nitric oxide synthase activation in the rat brain.* Pharmacological Reports 2009, 61 (6): 1078-1085 (IF 2,167).
- Adamczyk A, **Kaźmierczak A.** *Alpha-synuclein inhibits poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) activity via NO-dependent pathway.* Folia Neuropathol. 2009;47(3):247-51. (IF 1,095)
- **Kaźmierczak A**, Strosznajder JB, Adamczyk A. *alpha-Synuclein enhances secretion and toxicity of amyloid beta peptides in PC12 cells.* Neurochem Int. 2008; 53: 263-269. (IF 2,975)

*Badania, których wyniki przedstawiono w tej pracy były częściowo finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach promotorskiego projektu badawczego nr N N401 024236.*





# Spis treści

<b>SPIS TREŚCI</b> .....	<b>1</b>
<b>SPIS RYCIN</b> .....	<b>5</b>
<b>SPIS TABEL</b> .....	<b>7</b>
<b>OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY</b> .....	<b>9</b>
<b>WSTĘP</b> .....	<b>15</b>
BUDOWA $\alpha$ -SYNUKLEINY .....	16
MODYFIKACJE POSTTRANSLACYJNE $\alpha$ -SYNUKLEINY .....	19
REGULACJA POZIOMU $\alpha$ -SYNUKLEINY W KOMÓRCIE.....	20
FIZJOLOGICZNA ROLA $\alpha$ -SYNUKLEINY.....	22
ZNACZENIE $\alpha$ -SYNUKLEINY W PATOLOGII CHOROÓB NEURODEGENERACYJNYCH.....	30
MECHANIZMY TOKSYCZNOŚCI $\alpha$ -SYNUKLEINY .....	33
ZNACZENIE STRESU OKSYDACYJNEGO W TOKSYCZNOŚCI $\alpha$ -SYNUKLEINY .....	36
SEKRECJA I DZIAŁANIE ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ $\alpha$ -SYNUKLEINY.....	41
ZNACZENIE $\alpha$ -SYNUKLEINY W PATOLOGII CHOROBY ALZHEIMERA .....	45
<b>ZAŁOŻENIA I CEL PRACY</b> .....	<b>49</b>
<b>MATERIAŁY I METODY</b> .....	<b>53</b>
ZWIERZĘTA DOŚWIADCZALNE.....	53
<i>Przygotowanie materiału do doświadczeń i analiz</i> .....	53
<i>Preparatyka skrawków</i> .....	53
<i>Przygotowanie homogenatu</i> .....	53
<i>Preparatyka frakcji synaptozomalno-mitochondrialnej</i> .....	54
KOMÓRKOWE MODELE BADAWCZE.....	54
<i>Immortalizowane mysie komórki hipokampa (HT22)</i> .....	54
<i>Komórki pheochromocytoma (PC12)</i> .....	55
<i>Zastosowane warunki doświadczalne</i> .....	55
<i>Przygotowanie materiału do oznaczeń immunochemicznych</i> .....	56
<i>Otrzymywanie ekstraktu komórkowego</i> .....	56
PRZYGOTOWANIE $\alpha$ -SYNUKLEINY I PEPTYDU NAC ORAZ OCENA STRUKTURY DRUGORZĘDOWEJ $\alpha$ -SYNUKLEINY .....	56
<i>Przygotowanie <math>\alpha</math>-synukleiny i peptydu NAC</i> .....	56
<i>Ocena agregacji <math>\alpha</math>-synukleiny na podstawie elektroforezy w warunkach denaturujących i immunodetekcji metodą Western Blot</i> .....	57

<i>Ocena fibrylizacji (agregacji) <math>\alpha</math>-synukleiny przy użyciu tioflawiny-T</i> .....	59
CHARAKTERYSTYKA I WZORY CHEMICZNE STOSOWANYCH ZWIĄZKÓW .....	59
METODY RADIOCHEMICZNE OZNACZANIA AKTYWNOŚCI ENZYMÓW .....	64
<i>Oznaczenie aktywności polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP)</i> .....	64
<i>Przygotowanie materiału do oznaczenia aktywności syntazy tlenku azotu (NOS)</i> .....	64
<i>Oznaczenie aktywności syntazy tlenku azotu (NOS)</i> .....	65
METODY SPEKTROFOTOMETRYCZNE .....	66
<i>Oznaczenie zawartości białka</i> .....	66
<i>Analiza przeżywalności komórek za pomocą testu MTT</i> .....	66
METODY SPEKTROFLUORYMETRYCZNE.....	67
<i>Analiza poziomu wolnych rodników w cytozolu przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF</i> .....	67
<i>Badanie aktywności kaspazy-3</i> .....	68
METODY IMMUNOCHEMICZNE .....	68
<i>Immunochemiczna detekcja białek metodą Western Blot</i> .....	68
<i>Oznaczenie poziomu amyloidu beta 1-40 przy użyciu metody ELISA</i> .....	70
<i>Oznaczenie poziomu ciętego PARP (Asp214) przy użyciu testu ELISA</i> .....	70
ANALIZA EKSPRESJI GENÓW .....	71
<i>Izolacja RNA</i> .....	71
<i>Reakcja odwrotnej transkrypcji</i> .....	71
<i>Reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR)</i> .....	72
<i>Real-time PCR</i> .....	73
OZNACZANIE APOPTOZY KOMÓREK IN VITRO METODĄ MIKROSKOPII FLUORESCENCYJNEJ.....	73
STATYSTYCZNE OPRACOWANIE WYNIKÓW .....	74
<b>WYNIKI</b> .....	<b>75</b>
BADANIE WPŁYWU ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ $\alpha$ -SYNUKLEINY I PEPTYDU NAC W PROCESACH UWALNIANIA NO ORAZ MODULACJI AKTYWNOŚCI PARP-1 W WYBRANYCH CZĘŚCIACH MÓZGU SZCZURA W WARUNKACH IN VITRO .....	75
<i>Badanie udziału receptora NMDA w zależnej od ASN i NAC aktywacji NOS</i> .....	75
BADANIE INDUKCJI STRESU OKSYDACYJNEGO I MODULACJI AKTYWNOŚCI PARP-1 PRZEZ ASN I NAC .....	78
OKREŚLENIE WPŁYWU DŁUGOTRWAŁEGO DZIAŁANIA ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ ASN NA AKTYWNOŚĆ NOS ORAZ MODULACJĘ POZIOMU BIAŁKA PARP-1 W KOMÓRKACH HT22.....	81
<i>Badanie wpływu <math>\alpha</math>-synukleiny i peptydu NAC na aktywność i ekspresję syntazy tlenku azotu (NOS)</i> .....	82
<i>Badanie wpływu NO na poziom białka PARP-1 w komórkach HT22 poddanych działaniu <math>\alpha</math>-synukleiny</i> .....	83
BADANIE MECHANIZMÓW TOKSYCZNOŚCI $\alpha$ -SYNUKLEINY I PEPTYDU NAC W KOMÓRKACH DOPAMINERGICZNYCH PC12 ORAZ ANALIZA DZIAŁANIA WYBRANYCH ZWIĄZKÓW O CHARAKTERZE CYTOPROTEKCYJNYM.....	89

---

<i>Analiza przeżywalności i identyfikacja apoptozy w komórkach poddanych działaniu ASN i NAC90</i>	
<i>Ocena udziału wolnych rodników w toksyczności ASN i peptydu NAC komórkach PC12 .....</i>	<i>93</i>
<i>Analiza udziału syntaz tlenku azotu w toksyczności ASN i peptydu NAC w komórkach PC12 .....</i>	<i>94</i>
<i>Wpływ inhibitora megakanalów mitochondrialnych na zaburzenie funkcji mitochondriów przez zewnątrzkomórkową ASN i peptyd NAC.....</i>	<i>95</i>
<i>Udział kaspazy-3 w programowanej śmierci komórek PC12 wywołanej działaniem <math>\alpha</math>-synukleiny i peptydu NAC.....</i>	<i>96</i>
<i>Wpływ zewnątrzkomórkowej <math>\alpha</math>-synukleiny i peptydu NAC na aktywację szlaku zależnego od białka p53.....</i>	<i>98</i>
<b>BADANIE ZNACZENIA ASN W UWALNIANIU I TOKSYCZNOŚCI PEPTYDÓW AMYLOIDU BETA.....</b>	<b>102</b>
<i>Wpływ zewnątrzkomórkowej ASN i peptydu NAC na uwalnianie peptydów <math>A\beta</math>.....</i>	<i>103</i>
<i>Analiza wpływu <math>\alpha</math>-synukleiny na toksyczność peptydów <math>A\beta</math>.....</i>	<i>104</i>
<i>Ocena znaczenia stresu oksydacyjnego w tym roli NO w toksyczności <math>\alpha</math>-synukleiny w komórkach transfekowanych APP.....</i>	<i>107</i>
<i>Wpływ zewnątrzkomórkowej ASN na otwarcie megakanalów mitochondrialnych w komórkach transfekowanych APP.....</i>	<i>109</i>
<i>Aktywacja kaspazy-3 w komórkach transfekowanych APP traktowanych ASN.....</i>	<i>110</i>
<b>DYSKUSJA.....</b>	<b>113</b>
<b>PODSUMOWANIE I WNIOSKI .....</b>	<b>137</b>
<b>STRESZCZENIE.....</b>	<b>139</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>143</b>



# Spis rycin

RYCINA 1 STRUKTURA CZĄSTECZKI $\alpha$ -SYNUKLEINY (ZMODYFIKOWANO WG RECCHIA I WSP., 2004). .....	17
RYCINA 2 KONFORMACJA KTÓRĄ PRZYJMUJE ASN W WYNIKU WIĄZANIA Z MICELLAMI (CHANDRA I WSP., 2003). .....	19
RYCINA 3 PROCES DEGRADACJI $\alpha$ -SYNUKLEINY PRZEZ SYSTEM PROTEASOMALNY Z UDZIAŁEM PARKINY (PARK) (ZMODYFIKOWANO WG McNAUGHT I WSP., 2001).....	21
RYCINA 4 ROLA ASN W FIZJOLOGII UKŁADU DOPAMINERGICZNEGO (ZMODYFIKOWANO WG LOTHARIUS I BRUNDIN, 2002).....	26
RYCINA 5 UDZIAŁ ASN W REGULACJI AKTYWNOŚCI HYDROKSYLAZY TYROZYNOWEJ W WARUNKACH FIZJOLOGICZNYCH (PEREZ I WSP, 2002). .....	29
RYCINA 6 CIAŁA LEWY'EGO W MÓZGU (CHU I WSP., 2000). .....	31
RYCINA 7 DYNAMIKA MOLEKULARNEJ AGREGACJI ASN (CREWS I WSP., 2009). .....	33
RYCINA 8 PEPTYD NAC JEST ODPOWIEDZIALNY ZA TWORZENIE STRUKTURY $\beta$ -KARTKI I AGREGACJĘ ASN (BISAGLIA I WSP., 2006).....	34
RYCINA 9 BŁĘDNE KOŁO INTERAKCJI POMIĘDZY ASN A UKŁADEM DOPAMINERGICZNYM (WG SIDHU I WSP., 2004). .....	36
RYCINA 10 PROCES AGREGACJI ASN Z UDZIAŁEM JONÓW METALI PRZEJŚCIOWYCH (WG TABNER I WSP., 2002). .....	38
RYCINA 11 UDZIAŁ PROCESU UTLENIANIA I NITRACJI W TWORZENIU STABILNYCH AGREGATÓW $\alpha$ -SYNUKLEINY (WG NORRIS I WSP., 2003). .....	40
RYCINA 12 HIPOTEZA DOTYCZĄCA UWALNIANIA I DZIAŁANIA ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ ASN (LEE I WSP., 2008). .....	44
RYCINA 13 WIĄZANIE ASN Z $A\beta$ POPRZEZ DOMENĘ NAC (ZMODYFIKOWANO WG YOSHIMOTO I WSP., 1995). .....	46
RYCINA 14 INTERAKCJE ASN Z $A\beta$ PROWADZĄ DO WYTWORZENIA PORÓW W MEMBRANIE (CREWS I WSP., 2009). .....	48
RYCINA 15 ANALIZA WESTERN-BLOT OLIGOMERÓW $\alpha$ -SYNUKLEINY. ....	58
RYCINA 16 OZNACZANIE STOPNIA FIBRYLIZACJI $\alpha$ -SYNUKLEINY. ....	59
RYCINA 17 WZORY CHEMICZNE ZWIĄZKÓW UŻYTYCH W BADANIACH. ....	60
RYCINA 18 WZORY CHEMICZNE ANTAGONISTÓW RECEPTORA NMDA UŻYTYCH W BADANIACH. ....	61
RYCINA 19 WZORY CHEMICZNE INHIBITORÓW NOS UŻYTYCH W BADANIACH. ....	62
RYCINA 20 WZORY CHEMICZNE INHIBITORÓW I ANTYOKSYDANTÓW UŻYTYCH W BADANIACH. ....	64
RYCINA 21 WPŁYW $\alpha$ -SYNUKLEINY (ASN), $\beta$ -SYNUKLEINY (BSN) ORAZ PEPTYDU NAC NA AKTYWNOŚĆ SYNTAZY TLENKU AZOTU.....	76
RYCINA 22 WPŁYW ASN ORAZ NAC NA AKTYWNOŚĆ POSZCZEGÓLNYCH IZOFORM NOS. ....	77
RYCINA 23 UDZIAŁ RECEPTORA NMDA W ZALEŻNEJ OD ASN I NAC AKTYWACJI NOS. ....	78
RYCINA 24 POZIOM WOLNYCH RODNIKÓW W SYNAPTOSOMACH PODDANYCH DZIAŁANIU ASN, NAC I $FeCl_2$ .....	79
RYCINA 25 WPŁYW ASN I NAC NA AKTYWNOŚĆ PARP-1. ....	80
RYCINA 26 WPŁYW INHIBITORA NOS (NNLA) NA OBNIŻONĄ PRZEZ ASN AKTYWNOŚĆ PARP-1 W MÓZGU SZCZURA... ..	81
RYCINA 27 WPŁYW ASN NA AKTYWNOŚĆ NOS W KOMÓRKACH HT22. ....	82
RYCINA 28 WPŁYW ASN NA EKSPRESJĘ POSZCZEGÓLNYCH IZOFORM NOS W KOMÓRKACH HT22. ....	83
RYCINA 29 ZALEŻNY OD CZASU WPŁYW ASN I SNP NA IMMUNOREAKTYWNOŚĆ PARP-1 W KOMÓRKACH HT22. ....	84

## Spis rycin i tabel

---

RYCINA 30 WPŁYW ASN I SNP NA AKTYWNOŚĆ KASPAZY-3 W KOMÓRKACH HT22.....	85
RYCINA 31 WPŁYW ASN I STS NA POZIOM 89 kDA FRAGMENTU PARP-1 W KOMÓRKACH HT22. ....	86
RYCINA 32 WPŁYW INHIBITORA NOS (NNLA) NA AKTYWACJĘ KASPAZY-3 WYWOŁANĄ PRZEZ ASN W KOMÓRKACH HT22. ....	87
RYCINA 33 WPŁYW INHIBITORA NOS (NNLA) I KASPAZY-3 (Z-DEVD-FMK) NA POZIOM BIAŁKA PARP-1 W KOMÓRKACH HT22 PODDANYCH DZIAŁANIU ASN. ....	88
RYCINA 34 ZALEŻNY OD CZASU WPŁYW ASN NA EKSPRESJĘ GENU KODUJĄCEGO PARP-1 W KOMÓRKACH HT22.....	89
RYCINA 35 ZALEŻNY OD STĘŻENIA I STOPNIA AGREGACJI WPŁYW ASN ORAZ PEPTYDU NAC NA PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK PC12. ....	90
RYCINA 36 PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK PODDANYCH DZIAŁANIU ASN, PEPTYDU NAC ORAZ STS. ....	91
RYCINA 37 ZALEŻNA OD CZASU APOPTOZA WYWOŁANA DZIAŁANIEM ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ ASN I PEPTYDU NAC W KOMÓRKACH PC12. ....	92
RYCINA 38 POZIOM WOLNYCH RODNIKÓW W KOMÓRKACH PC12 PODDANYCH DZIAŁANIU ASN I PEPTYDEM NAC. ....	93
RYCINA 39 WPŁYW INHIBITORÓW SYNTAZY TLENKU AZOTU (NOS) NA TOKSYCZNOŚĆ ASN (A) I PEPTYDU NAC (B) W KOMÓRKACH PC12. ....	94
RYCINA 40 WPŁYW INHIBITORA MPT NA TOKSYCZNOŚĆ ASN I PEPTYDU NAC W KOMÓRKACH PC12.....	95
RYCINA 41 WPŁYW $\alpha$ -SYNUKLEINY I PEPTYDU NAC NA AKTYWNOŚĆ KASPAZY-3 (A) I POZIOM BIAŁKA PARP (B) W KOMÓRKACH PC12. ....	97
RYCINA 42 WPŁYW INHIBITORA KASPAZY-3 (Z-DEVD-FMK) NA TOKSYCZNOŚĆ ASN I PEPTYDU NAC W KOMÓRKACH PC12. ....	98
RYCINA 43 WPŁYW INHIBITORA P53 ( $\alpha$ -PIFITHRIN) NA TOKSYCZNOŚĆ $\alpha$ -SYNUKLEINY I PEPTYDU NAC W KOMÓRKACH PC12. ....	99
RYCINA 44 WPŁYW PEPTYDU NAC NA EKSPRESJĘ BIAŁKA P53 W KOMÓRKACH PC12.....	100
RYCINA 45 WPŁYW PEPTYDU NAC NA EKSPRESJĘ GENU KODUJĄCEGO CDK5 W KOMÓRKACH PC12.....	101
RYCINA 46 WPŁYW PEPTYDU NAC NA EKSPRESJĘ GENU KODUJĄCEGO P35 I P39 W KOMÓRKACH PC12.....	101
RYCINA 47 WPŁYW INHIBITORA CDK-5 (BML-259) NA TOKSYCZNOŚĆ PEPTYDU NAC W KOMÓRKACH PC12.....	102
RYCINA 48 WPŁYW $\alpha$ -SYNUKLEINY I PEPTYDU NAC NA UWALNIANIE A $\beta$ 1-40 Z KOMÓREK PC12 KONTROLNYCH I TRANSFEKOWANYCH APPSW. ....	103
RYCINA 49 WPŁYW ASN NA ZALEŻNĄ OD STĘŻENIA PEPTYDÓW A $\beta$ PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK APPWT I APPSW. ...	104
RYCINA 50 ZALEŻNA OD CZASU APOPTOZA WYWOŁANA DZIAŁANIEM ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ ASN W KOMÓRKACH PC12 KONTROLNYCH I APPWT. ....	105
RYCINA 51 ZALEŻNA OD CZASU APOPTOZA WYWOŁANA DZIAŁANIEM ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ ASN W KOMÓRKACH PC12 KONTROLNYCH I APPSW. ....	106
RYCINA 52 POZIOM WOLNYCH RODNIKÓW W KOMÓRKACH PC12, APPWT I APPSW TRAKTOWANYCH ASN.....	107
RYCINA 53 WPŁYW INHIBITORÓW SYNTAZY TLENKU AZOTU (NOS) NA TOKSYCZNOŚĆ $\alpha$ -SYNUKLEINY W KOMÓRKACH APPWT I APPSW. ....	108

RYCINA 54 WPŁYW INHIBITORA MPT NA TOKSYCZNOŚĆ ASN W KOMÓRKACH APPWT I APPSW. .... 109

RYCINA 55 WPŁYW ASN NA AKTYWNOŚĆ KASPAZY-3 W KOMÓRKACH PC12, APPWT I APPSW. .... 110

RYCINA 56 WPŁYW INHIBITORA KASPAZY-3 (Z-DEVD-FMK) NA TOKSYCZNOŚĆ  $\alpha$ -SYNUKLEINY W KOMÓRKACH APPWT I APPSW. .... 111

RYCINA 57 MECHANIZMY TOKSYCZNEGO DZIAŁANIA ASN WG DANYCH UZYSKANYCH W NINIEJSZEJ PRACY. .... 138

## Spis tabel

TABELA 1 BIAŁKA, KTÓRE WCHODZĄ W BEZPOŚREDNIĄ INTERAKCJĘ Z  $\alpha$ -SYNUKLEINĄ. .... 23

TABELA 2 SCHEMAT OBLICZEŃ AKTYWNOŚCI POSZCZEGÓLNYCH IZOFORM NOS W SKRAWKACH Z MÓZGU SZCZURA: ..... 66

TABELA 3 WARUNKI REAKCJI IMMUNOCHEMICZNEJ DLA POSZCZEGÓLNYCH OZNACZEŃ ..... 69





# Objaśnienia skrótów stosowanych w pracy

$\cdot O_2^-$	anionorodnik ponadtlenkowy
<b>7-NI</b>	7-nitroindazol
<b>Ac-DEVD-AMC</b>	acetylo-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metylokumaryna
<b>AD</b>	choroba Alzheimerera
<b>AIF</b>	czynnik indukujący apoptozę
<b>ALS</b>	stwardnienie zanikowe boczne ang. <i><b>A</b>myotrophic <b>L</b>ateral <b>S</b>clerosis</i>
<b>AMC</b>	amido-4-metylokumaryna
<b>APP</b>	białko prekursorowe amyloidu beta (ang. <i><math>\beta</math>-<b>a</b>myloid <b>p</b>recursor protein</i> )
<b>APPsw</b>	komórki transfekowane genem dla APP z mutacją typu szwedzkiego
<b>APPwt</b>	komórki transfekowane genem dla APP dzikiego typu
<b>APV</b>	kwask DL-2-Amino-5-fosfonowalerianowy
<b>ASN</b>	$\alpha$ -synukleina
<b>ATP</b>	adenozynotryfosforan
<b>A<math>\beta</math></b>	amyloid beta
<b>BER</b>	naprawa poprzez wycinanie zasad ang. <i><b>B</b>ase <b>E</b>xcision <b>R</b>epair</i>
<b>BFGF</b>	czynnik wzrostu fibroblastów
<b>BML-259</b>	N-(5-izopropylotiazol-2-yl)fenyloacetamid
<b>BSA</b>	albumina bydlęca surowicza
<b>BSN</b>	$\beta$ -synukleina

<b>CaMK II</b>	kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny II
<b>CDK</b>	kinaza cyklinozależna (ang. <i>cyclin dependent kinase</i> )
<b>ChP</b>	choroba Parkinsona
<b>CK1</b>	kinaza kazeinowa 1
<b>CK2</b>	kinaza kazeinowa 2
<b>cNOS</b>	konstytutywna izoforma syntazy tlenku azotu
<b>CsA</b>	cyklosporyna A
<b>CSP-<math>\alpha</math></b>	ang. <i>Cysteine-String Protein-<math>\alpha</math></i>
<b>DA</b>	dopamina
<b>DAA</b>	dekarboksylaza aromatycznych aminokwasów
<b>DAT</b>	transporter dopaminy
<b>DCF</b>	2',7'-dwuchlorofluoresceina
<b>DCFH</b>	2',7'-dwuchlorofluorescyna
<b>DMEM</b>	pożywka Dulbecco zmodyfikowana przez Eagle'a (ang. <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> )
<b>DMSO</b>	dimetylosulfotlenek
<b>DTT</b>	ditiotreitol
<b>EDTA</b>	sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego
<b>EGTA</b>	kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N' tetraoctowy
<b>eNOS</b>	śródbłonkowa izoforma syntazy tlenku azotu
<b>ER</b>	siateczka śródplazmatyczna
<b>FABP</b>	białko wiążące kwasy tłuszczowe ang. <i>fatty acid binding protein</i>
<b>FCS</b>	plodowa surowica cielęca
<b>g</b>	przyspieszenie ziemskie (grawitacja)
<b>GICs</b>	cytoplazmatyczne wtręty gleju

---

<b>GSK-3</b>	kinaza 3 syntazy glikogenu
<b>GTP</b>	guanozynotrójfosforan
<b>H<sub>2</sub>DCF</b>	2',7'-dwuchlorodwuhydrofluoresceina
<b>H<sub>2</sub>DCF-DA</b>	dwuoctan 2',7'-dichlorodwuhydrofluoresceiny
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	nadtlenek wodoru
<b>H<sub>4</sub>B</b>	tetrahydrobiopteryna
<b>Hdm2</b>	czynnik odpowiedzialny za degradację p53 ang. <i>human double minute-2</i>
<b>HEPES</b>	kwask 2-[4-(2-hydroksetylo)-1-piperazyno]etanosulfonowy
<b>HS</b>	surowica końska
<b>HT</b>	hydroksylaza tyrozynowa
<b>HT22</b>	unieśmiertelnione mysie komórki hipokampa
<b>ICAM-1</b>	białko adhezji komórkowej ang. <i>intercellular adhesion molecule-1</i>
<b>iNOS</b>	indukowana izoforma syntazy tlenku azotu
<b>KA</b>	kwask arachidonowy
<b>KRBS</b>	bufor Krebs-Henseleit
<b>LB</b>	ciała Lewy'ego
<b>LBD</b>	otępienie z ciałami Lewy'ego
<b>LBV</b>	wariant choroby Alzheimera z ciałami Lewy'ego
<b>LN<sub>s</sub></b>	neuryty Lewy'ego
<b>LPS</b>	lipopolisacharyd
<b>LTP</b>	długotrwałe pobudzenie synaptyczne
<b>MAPK</b>	kinaza MAP
<b>MK-801</b>	dizocilpine (maleinian (+)-5-metylo-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyklohepten-5,10-iminy
<b>MPTP</b>	1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydyna

<b>MPT</b>	megakanał mitochondrialny ang. <i>mitochondrial permeability transition</i>
<b>MSA</b>	zanik wieloukładowy ang. <i>multiple system atrophy</i>
<b>MTT</b>	bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowy
<b>NAAN</b>	(4S)-N-(4-amino-5[aminoetylo]aminopentylo)-N'-nitroguanidyna
<b>NAC</b>	niebędący białkiem $\beta$ -amyloidowym składnik płytek starczych ang. <i>Non-amyloid <math>\beta</math> component of Alzheimer disease plaques,</i>
<b>NAD</b>	dinukleotyd nikotynamidoadeninowy
<b>NFT</b>	zwyrodnienia włókienkowe (ang. <i>neurofibrillary tangles</i> )
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	czynnik jądrowy kappa B ang <i>nuclear factor kappa B</i>
<b>NGF</b>	czynnik wzrostu neuronów ang. <i>neuronal growth factor,</i>
<b>NMDA</b>	N-metylo-D-asparaginian
<b>NNLA</b>	N <sup>G</sup> nitro-L-arginina
<b>nNOS</b>	neuronalna izoforma syntazy tlenu azotu
<b>NO</b>	tlenek azotu
<b>NOS</b>	syntaza tlenu azotu
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	nadtlenoazotyn
<b>OUN</b>	ośrodkowy układ nerwowy
<b>PAR</b>	polimery poli(ADP-rybozy)
<b>PARP</b>	polimeraza poli(ADP-rybozy)
<b>PBS</b>	bufor fosforanowy – buforowany roztwór soli fizjologicznej
<b>PARK</b>	parkina
<b>PC12</b>	komórki chromochłonne guza nadnerczy

---

	(ang. <i>Pheochromocytoma</i> )
<b>PCR</b>	Reakcja łańcuchowa polimerazy ang. <i>polymerase chain reaction</i> ,
<b>PJ-43</b>	chlorowodorek N-(6-Okso-5,6-dihydrofenantrydyn-2-yl)-(N,N-dimetylamino)acetamidu
<b>PKC</b>	kinaza białkowa C
<b>PKC<math>\delta</math></b>	kinaza białkowa C $\delta$
<b>PLD<sub>2</sub></b>	fosfolipaza D2
<b>PMR</b>	płyn mózgowo-rdzeniowy
<b>PVDF</b>	polifluorek winylidenu
<b>ROS</b>	reaktywne formy tlenu ang. <i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>SDS</b>	dodecylosiarczan sodowy
<b>SEM</b>	błąd standardowy średniej
<b>Ser</b>	seryna
<b>SNARE</b>	ang. <i>SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptors</i>
<b>SNCA</b>	nazwa genu kodującego $\alpha$ -synukleinę
<b>SNP</b>	nitroprusydek sodu
<b>SNPs</b>	polimorfizmy pojedynczych nukleotydów ang. <i>single nucleotide polymorphisms</i>
<b>STS</b>	staurosporyna
<b>TBS</b>	bufor o składzie 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH doprowadzone kwasem solnym do 7,6
<b>TCA</b>	kwas trójchlorooctowy
<b>Th-T</b>	tioflawina-T
<b>Tris</b>	tris(hydroksymetylo)aminometan
<b>Tyr</b>	tyrozyna

## Skróty

---

<b>UCH-L1</b>	ligaza ubikwityny 1
<b>VMAT<sub>2</sub></b>	pęcherzykowy transporter dopaminy
<b>Z-DEVD-FMK</b>	keton Z-Asp(O-Me)-Glu(O-Me)-Val-Asp(O-Me)fluorometylowy

# Wstęp

Choroby neurodegeneracyjne są grupą zaburzeń, o charakterze progresywnym, w których dochodzi do zmian w strukturze i funkcjonowaniu neuronów, co w większości przypadków prowadzi do ich śmierci (szczególnie w późnych stadiach choroby). Etiologia przeważającej części chorób neurodegeneracyjnych nie jest znana. Wskazuje się, że kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za neurodegenerację jest pojawianie się agregatów białkowych zarówno wewnątrz neuronów, jak i w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Powstawanie tego rodzaju zróżnicowanych molekularnie wtrętów o podobnych fizyko-chemicznych właściwościach spowodowane jest zmianami konformacji i oligomeryzacją wielu białek. Spośród nich na szczególną uwagę zasługuje  $\alpha$ -synukleina (ASN), białko prekursorowe peptydu NAC będącego drugim, po amyloidzie  $\beta$ , składnikiem blaszek starczych w chorobie Alzheimera. Wykazano, że ASN jest jednym z głównych elementów cytoplazmatycznych wtrętów w mózgu zwanych ciałami Lewy'ego, będących markerami choroby Parkinsona (ChP) (Trojanowski i Lee, 1998). Wiele badań wskazuje, że zaburzenia prawidłowej struktury białka ASN mają istotne znaczenie nie tylko w patogenezie ChP, ale również w chorobie Alzheimera z ciałami Lewy'ego, atrofii wielosystemowej, chorobie otępiennej z ciałami Lewy'ego (LBD) (Spillantini i Goedert, 2000) oraz innych chorobach neurodegeneracyjnych zbiorczo nazwanych synukleinopatiami. Odkrycie zależności pomiędzy występowaniem dziedzicznej postaci ChP a mutacjami A30P, A53T oraz E46K w genie kodującym ASN (Polymeropoulos i wsp., 1997; Kruger i wsp., 1998; Zarranz i wsp., 2004) zainicjowało liczne badania nad znaczeniem tego białka w patogenezie ChP i innych chorób neurodegeneracyjnych. Do chwili obecnej nie udało się ustalić dokładnie roli  $\alpha$ -synukleiny w patologii ChP i innych zaburzeń, jak również w pełni określić jej znaczenia w procesach fizjologicznych.

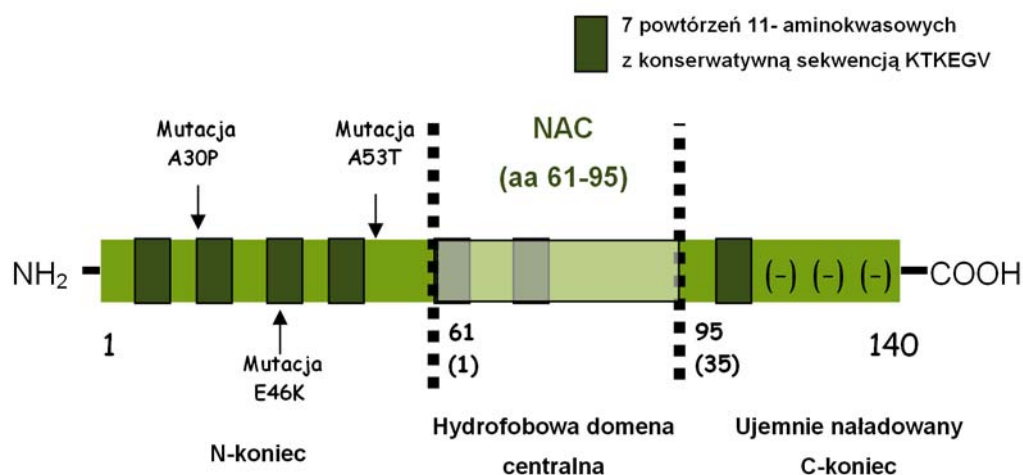
$\alpha$ -synukleina została odkryta w 1988 roku. Białko to znaleziono w pęcherzykach cholinergicznych wyizolowanych z narządu elektrycznego gatunku *Torpedo Californica* (Maroteaux i wsp., 1988). Swoją nazwę zawdzięcza ono swojej lokalizacji, pierwotnie stwierdzonej w synapsach i jądrze neuronów. Obecnie wiadomo, że  $\alpha$ -synukleina należy do większej

rodziny białek występujących wyłącznie u strunowców (Clayton i George, 1998; Lavedan, 1998). Do rodziny synuklein zalicza się  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -synukleiny oraz synoretinę. Są one białkami rozpuszczalnymi, o masie cząsteczkowej ok. 14 kDa. Wszystkie synukleiny są bogato reprezentowane w układzie nerwowym, szczególnie zaś z zakończeniach presynaptycznych neuronów (Maroteaux i wsp., 1988; Clayton i George, 1998). Ekspresja synuklein u kręgowców rozpoczyna się w późnym stadium rozwoju embrionalnego, osiągając maksimum około 15 dnia po urodzeniu.  $\alpha$ - i  $\beta$ -synukleina występują głównie w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), podczas gdy  $\gamma$ -synukleina jest obecna przede wszystkim w synapsach neuronów obwodowych (Abeliovich i wsp., 2000; Ninkina i wsp., 2003).  $\alpha$ -synukleina ulega wysokiej ekspresji w ośrodkowym układzie nerwowym, głównie w zakończeniach presynaptycznych neuronów kory mózgowej i hipokampa, zawoju zębatego, opuszki węchowej, wzgórza i mózdzku oraz w zakończeniach neuronów dopaminergicznych w prążkowie (George, 2002; Totterdell i Meredith, 2005). Występowanie  $\alpha$ -synukleiny stwierdzono również w płytkach krwi, komórkach hematopoetycznych oraz w mięśniu sercowym (Shin i wsp., 2000).

### ***Budowa $\alpha$ -synukleiny***

Ludzki gen kodujący  $\alpha$ -synukleinę (SNCA) składa się z 117 pz, znajduje się na chromosomie 4q21 (PARK-1) i posiada 6 egzonów kodujących 140 aminokwasowe białko. (Polymeropoulos i wsp., 1996).  $\alpha$ -Synukleina występuje w postaci monomeru, o bardzo charakterystycznej strukturze pierwszorzędowej, którą można podzielić na trzy domeny (**Rycina 1**): amfipatyczny, wysoce konserwowany region N-końcowy (aminokwasy 1-60) składający się z 7-krotnych powtórzeń sekwencji KTKEGV o strukturze  $\alpha$ -helisy, centralny region hydrofobowy (aminokwasy 61-95), który stanowi sekwencja NAC (ang. *Non-amyloid  $\beta$  component of Alzheimer disease plaques*, czyli niebędący białkiem  $\beta$ -amyloidowym składnik płytek starczych) oraz region C-końcowy o strukturze nieuporządkowanej (aminokwasy 96-140) (Recchia i wsp., 2004).





Rycina 1 Struktura cząsteczki  $\alpha$ -synukleiny (zmodyfikowano wg Recchia i wsp., 2004).

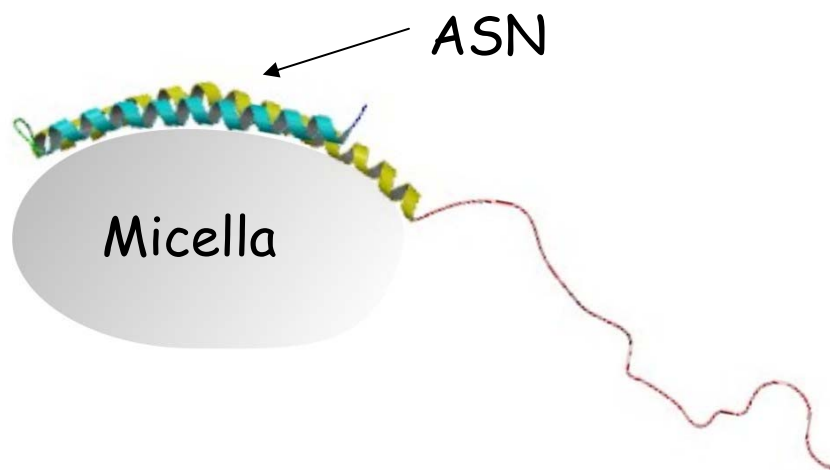
Budowa  $\alpha$ -synukleiny nadaje jej specyficzne biofizyczne właściwości. W roztworach wodnych białko to przyjmuje strukturę kłębka statystycznego (Weinreb i wsp., 1996; Eliezer i wsp., 2001). W wyniku wiązania z lipidami  $\alpha$ -synukleina przyjmuje określoną strukturę drugorzędową, która składa się z 2 amfipatycznych, antyparalelnych  $\alpha$ -helis z nieuporządkowanym regionem C-końcowym (Chandra i wsp., 2003; Ulmer i wsp., 2005) (**Rycina 2**). Za zdolność ASN do wiązania się z lipidami odpowiada jej N-końcowy fragment (Cookson, 2005). W tym regionie znajdują się miejsca lokalizacji trzech mutacji punktowych białka  $\alpha$ -synukleiny zidentyfikowanych w dziedzicznych chorobach neurodegeneracyjnych. Mutacje A30P i A53T są odpowiedzialne za powstawanie genetycznie uwarunkowanej choroby Parkinsona (Kruger i wsp., 1998; Polymeropoulos i wsp., 1997), natomiast mutacja E46K zidentyfikowana została w dziedzicznym otępieniu z ciałami Lewy'ego (Zarranz i wsp., 2004). Mutacje E46K oraz A53T potęgują wiązanie z lipidami i fibrylizację, podczas gdy mutacja A30P zmniejsza zdolność wiązania lipidów i spowalnia proces tworzenia fibryli (Choi i wsp., 2004).

Region C-końcowy obfituje w prolinę oraz aminokwasy kwaśne, które nadają mu ujemny ładunek, co warunkuje przyjmowanie przez białko struktury nieuporządkowanej na tym odcinku (Recchia i wsp., 2004). Posiada on kilka miejsc fosforylacji: Tyr 125, 133 i 136 oraz Ser 129. Około 90%  $\alpha$ -synukleiny wyizolowanej z mózgow chorych na synukleinopatii jest ufosforylowanych na Ser 129 (Fujiwara i wsp., 2002). Region C-końcowy ma właściwości hamujące agregację  $\alpha$ -synukleiny (Murray i wsp., 2003).

Region NAC pierwotnie został wyizolowany z płytek starczych mózgow Alzheimerowskich jako jeden z głównych obok amyloidu beta ( $A\beta$ ) ich składników. Wyłącznie ASN posiada domenę NAC. Obecność tego hydrofobowego fragmentu sprzyja tworzeniu przez ASN struktury  $\beta$ -kartki, która inicjuje proces agregacji i powstawania rozpuszczalnych oligomerów (Ding i wsp., 2002). Oligomery te wykazują tendencję do dalszej agregacji i tworzenia nierozpuszczalnych złożeń odkładanych w postaci ciał Lewy'ego (Bodles i wsp., 2001; Giasson i wsp., 2001).

Ważną cechą pierwszorzędowej struktury  $\alpha$ -synukleiny jest obecność nieregularnie powtarzających się, siedmiu jedenasto-aminokwasowych motywów w obrębie pierwszych 95 aminokwasów. Taka struktura występuje także w innych białkach wiążących odwracalnie lipidy i umożliwia wiązanie  $\alpha$ -synukleiny do fosfolipidów błonowych, co wydaje się mieć kluczowe znaczenie dla jej funkcji (Bussell i Eliezer, 2003; Payton i wsp., 2004). W strukturze  $\alpha$ -synukleiny występują ponadto dwa regiony (2-19 oraz 123-140) wykazujące znaczne podobieństwo do sekwencji charakterystycznych dla cytozolowych białek FABP (z ang. *fatty acid binding protein*) wiążących kwasy tłuszczowe, co sugeruje, że  $\alpha$ -synukleina może należeć do rodziny tych białek (Sharon i wsp., 2001).

Plastyczność strukturalna białka  $\alpha$ -synukleiny umożliwia jej dostosowanie konformacji do warunków środowiskowych oraz umożliwia interakcję z wieloma mikro- i makromolekułami, dlatego też ASN uzyskała miano białkowego „kameleona” (Uversky, 2003). Istnieje wiele badań dotyczących różnych rodzajów konformacji przyjmowanej przez  $\alpha$ -synukleinę *in vitro*, niestety do tej pory nie wiadomo, jaką formę przyjmuje to białko w żywej komórce.



Rycina 2 Konformacja którą przyjmuje ASN w wyniku wiązania z micellami (Chandra i wsp., 2003).

### ***Modyfikacje posttranslacyjne $\alpha$ -synukleiny***

Dotychczasowo opisano kilka modyfikacji posttranslacyjnych  $\alpha$ -synukleiny, takich jak proteoliza, fosforylacja, utlenienie, nitracja, czy ubikwitynacja.  $\alpha$ -Synukleina jest konstytutywnie ufosforylowana na resztach serynowych, głównie na Ser 129 (Okochi i wsp., 2000). Drugim najczęściej ufosforylowanym miejscem w cząsteczce  $\alpha$ -synukleiny jest Ser 87. Liczne dane wskazują, że proces fosforylacji ASN jest ściśle regulowany i zachodzi *in vivo*. Głównymi kinazami odpowiedzialnymi za ufosforylowanie  $\alpha$ -synukleiny na Ser 129 oraz Ser 87 są kinazy kazeinowe CK-1 i CK-2 (Bennett i wsp., 1993; Gross i wsp., 1995). Kolejnym enzymem biorącym udział w modyfikacji ASN jest kinaza receptorów sprzężonych z białkiem G (Pronin i wsp., 2000). Aktywacja kinaz białkowych A i C nie wpływa na proces ufosforylowania  $\alpha$ -synukleiny (Okochi i wsp., 2000). Fosforylacja  $\alpha$ -synukleiny na Ser129 przyspiesza agregację tego białka, wobec tego postuluje się udział tej posttranslacyjnej modyfikacji w tworzeniu ciał Lewy'ego (Smith i wsp., 2005; Chen i Feany, 2005; Fujiwara i wsp., 2002; Nishie i wsp., 2004).

$\alpha$ -Synukleina może być również fosforylowana przez specyficzne kinazy tyrozynowe z rodziny kinaz Src (Nakamura i wsp., 2002; Ellis i wsp., 2001). Reszty tyrozynowe  $\alpha$ -synukleiny w warunkach stresu oksydacyjnego

lub nitrozacyjnego mogą ulegać oksydacji do o,o'-dityrozyny lub 3-nitrozylacji. Obydwie modyfikacje znacznie zwiększają zdolność  $\alpha$ -synukleiny do agregacji. W tym aspekcie fosforylacja reszt tyrozynowych ASN chroni je przed działaniem stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego oraz zapobiega jej agregacji (Tetsuya i wsp., 2002).  $\alpha$ -Synukleina podlega również procesom O-glikozylacji. W zdrowym mózgu ta forma białka występuje w bardzo niskich stężeniach. O-glikozylowana  $\alpha$ -synukleina ulega ubikwitynacji, a następnie jest degradowana na drodze proteasomalnej (Shimura i wsp, 2001).

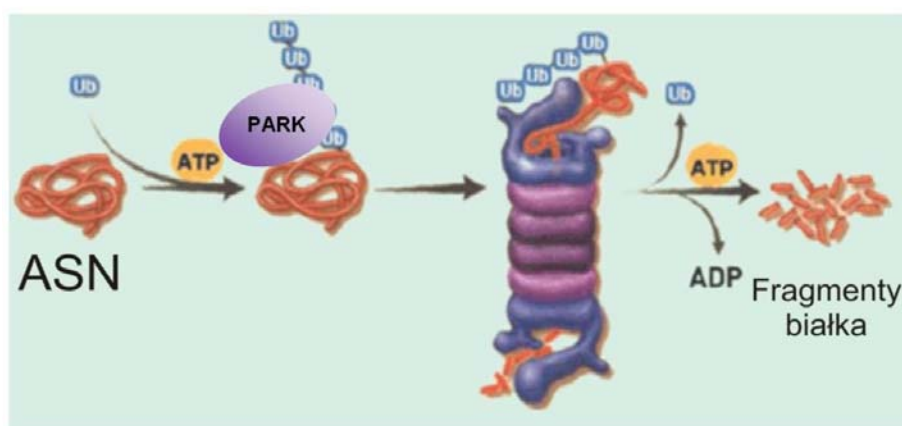
### ***Regulacja poziomu $\alpha$ -synukleiny w komórce***

Ekspresja genu i poziom białka  $\alpha$ -synukleiny zmienia się zarówno z rozwojem ośrodkowego układu nerwowego, jak i w procesie starzenia mózgu (Alves da Costa 2003; Petersen i wsp., 1999; Adamczyk i wsp., 2005). Liczne czynniki wpływają na jej ekspresję. Promotor genu SNCA, który nie posiada sekwencji TATA (Liang i Carr, 2006), może być regulowany poprzez aktywację szlaku kinaz MAP wywołaną między innymi przez czynnik wzrostu neuronów (NGF), czy czynnik wzrostu fibroblastów (BFGF) (Clough i Stefanis, 2007). Ponadto zidentyfikowano liczne czynniki transkrypcyjne, które zwiększają ekspresję genu dla  $\alpha$ -synukleiny, między innymi białko wiążące region wzmacniający CCAAT  $\beta$  (Gomez-Santos i wsp., 2005), czy Nurr-1 (Yang i Latchman, 2008). Do białek obniżających ekspresję  $\alpha$ -synukleiny należy polimeraza poli-ADP rybozy (PARP), która wywiera swoje hamujące działanie poprzez wiązanie się z sekwencją Rep1 (Chiba-Falek i wsp., 2005).

Okres półtrwania  $\alpha$ -synukleiny, który wynosi ok. 24 godzin, dodatkowo wydłuża się w neuronach wraz ze starzeniem się organizmu (Li i wsp., 2004). Wskazuje to, że obroty metaboliczne tego białka w warunkach fizjologicznych nie są dynamicznym procesem. Nie mniej jednak degradacja ASN jest procesem ściśle kontrolującym jej stężenie wewnątrz komórki. Do chwili obecnej mechanizmy usuwania  $\alpha$ -synukleiny z cytoplazmy nie są do końca wyjaśnione.

Większość danych sugeruje udział systemu ubikwityna – proteasom w metabolizmie  $\alpha$ -synukleiny w komórce (McNaught i wsp., 2001) (**Rycina 3**). Selektywne inhibitory enzymów proteasomalnych, jak  $\beta$ -lakton

czy epoksomycyna hamują proces degradacji ASN w hodowlach tkankowych (Bennett i wsp., 1999; Webb i wsp., 2003). Co więcej, zablokowanie aktywności proteasomalnej wskutek mutacji punktowych, czy poprzez zastosowanie selektywnych inhibitorów prowadzi do akumulacji  $\alpha$ -synukleiny wewnątrz komórki i tworzenie wtrętów podobnych do ciał Lewy'ego (McNaught i wsp., 2002; Hyun i wsp., 2003; Li i wsp., 2004b). Chociaż wykazano, że  $\alpha$ -synukleina może ulegać procesowi ubikwitynacji w warunkach *in vitro* (Liu i wsp., 2002), a w mózгах pacjentów z ciałami Lewy'ego można znaleźć poli-ubikwitynowane formy tego białka (Hasegawa i wsp., 2002), modyfikacja ta wydaje się być tylko jednym z procesów biorących udział w degradacji ASN przez proteasomy (Tofaris i wsp., 2001; Liu i wsp., 2003). Co ciekawe,  $\alpha$ -synukleina ma zdolność do specyficznego wiązania się z podjednostkami kompleksu proteasomalnego, takimi jak S6' (Snyder i wsp., 2003), czy białko wiążące Tat-1 (Ghee i wsp., 2000). Wiązanie to skutkuje silnym zahamowaniem aktywności proteasomalnej (Lindersson i wsp., 2004). W procesie degradacji  $\alpha$ -synukleiny przez system proteasomalny istotną rolę odgrywa parkina (**Rycina 3**). Należy ona do rodziny białek E3, których głównym zadaniem jest przyłączanie reszt ubikwitynowych do białek degradowanych przez proteasomy (Shimura i wsp., 2000). W przeciwieństwie do grup E1 i E2, białka E3 charakteryzuje wysoka specyficzność substratowa (Ciechanover, 2005). Wykazano, że w warunkach fizjologicznych parkina wiąże się z  $\alpha$ -synukleina, ponadto kolokalizację tych dwóch białek wykryto również w ciałach Lewy'ego (Choi i wsp., 2001).



**Rycina 3** Proces degradacji  $\alpha$ -synukleiny przez system proteasomalny z udziałem parkiny (PARK) (zmodyfikowano wg McNaught i wsp., 2001).

Istnieją dane wskazujące na istotną rolę autofagii w degradacji  $\alpha$ -synukleiny. Aktywacja procesu makroautofagii w komórkach PC12 wywołuje przeniesienie  $\alpha$ -synukleiny z cytosolu do lizosomów i jej degradację (Webb i wsp., 2003). Zahamowanie funkcji lizosomów prowadzi do nadmiernej akumulacji  $\alpha$ -synukleiny wewnątrz komórki (Webb i wsp., 2003; Lee i wsp., 2004). W translokacji i degradacji  $\alpha$ -synukleiny w lizosomach stwierdzono udział białek opiekuńczych (Cuervo i wsp., 2004, Vogiatzi i wsp., 2008). Zmutowane formy  $\alpha$ -synukleiny blokują receptory dla tych białek na powierzchni lizosomów, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania degradacji nie tylko zmutowanej i natywnej  $\alpha$ -synukleiny, ale również innych białek degradowanych przez lizosomy (Cuervo i wsp., 2004).

Dodatkowo, pojedyncze badania wskazują, że  $\alpha$ -synukleina może być cięta przez różnorodne proteazy takie jak: neurozyna, kalpaina, czy metaloproteinazy (Iwata i wsp., 2003; Mishizen-Eberz i wsp., 2003; Sung i wsp., 2005). Enzymy te wykazują zdolność do degradacji zarówno monomerów  $\alpha$ -synukleiny, jak i zagregowanych form tego białka.

### ***Fizjologiczna rola $\alpha$ -synukleiny***

Obecnie trwają intensywne badania zmierzające do wyjaśnienia fizjologicznych właściwości  $\alpha$ -synukleiny. Ze względu na specyficzną lokalizację oraz zdolność do wiązania się z błonami lipidowymi, postuluje się udział ASN w funkcji zakończeń synaptycznych, w uwalnianiu neurotransmiterów, w kształtowaniu plastyczności synaptycznej oraz w regulacji funkcji układu dopaminergicznego (Abeliovich i wsp., 2000; Murphy i wsp., 2000; Cabin i wsp., 2002; Larsen i wsp., 2006; Sidhu i wsp., 2004). Ponadto wiele badań wskazuje, że  $\alpha$ -synukleina może również wpływać pośrednio i bezpośrednio na procesy pro- i antyapoptotyczne (Seo i wsp., 2002; Alves da Costa i wsp., 2002; Hashimoto i wsp., 2002).

Lokalizacja  $\alpha$ -synukleiny w części presynaptycznej zakończeń nerwowych sugeruje jej udział w kształtowaniu plastyczności synaptycznej (Steidl i Gomez 2003). Badania prowadzone na zwierzętach wykazały, że ekspresja  $\alpha$ -synukleiny w hipokampie i korze mózgu wzrasta wraz z postępującym rozwojem embrionalnym (Alves da Costa 2003), jest najwyższa po urodzeniu, po czym ulega obniżeniu u osobników dorosłych (Petersen i wsp., 1999). Doświadczenia prowadzone na hodowli komórek

hipokampa sugerują również rolę ASN w utrzymaniu funkcji synaps już utworzonych (Murphy i wsp., 2000).

$\alpha$ -synukleina wykazuje znaczącą homologię w budowie cząsteczki z białkami 14-3-3 oraz, podobnie jak one pełni funkcję białka opiekuńczego (Ostrerova i wsp., 1999). Oddziaływania białko-białko często mają istotne znaczenie w prawidłowym funkcjonowaniu wielu ścieżek sygnalizacyjnych w komórce. Wykazano, że  $\alpha$ -synukleina może wchodzić w interakcje z licznymi białkami oraz regulować ich aktywność i funkcje biologiczne (**Tabela 1**):

**Tabela 1** Białka, które wchodzi w bezpośrednią interakcję z  $\alpha$ -synukleina.

Białko	Odniesienie literaturowe
Fosfolipaza D <sub>2</sub> (PLD <sub>2</sub> )	Jenco i wsp., 1998; Payton i wsp., 2004
Ligaza ubikwityny 1 (UCH-L1)	Liu i wsp., 2002
Parkina	Choi i wsp., 2001; Shimura i wsp., 2001; Oluwatasin-Chigbu i wsp., 2003
Białka 14-3-3	Ostrerova i wsp., 1999
BAD	Ostrerova i wsp., 1999
ERK	Ostrerova i wsp., 1999
Kinaza białkowa C (PKC)	Ostrerova i wsp., 1999
Kinaza MAP (MAPK)	Iwata i wsp., 2001
Tubulina	Alim i wsp., 2002
Oksydaza cytochromowa – kompleks IV	Elkon i wsp., 2002
Transporter dopaminy	Kobayashi i wsp., 2004; Sidhu i wsp., 2004; Wersinger 2003
A $\beta$ , Tau	Yoshimoto i wsp., 1995; Jensen i wsp., 1997
Kalmodulina	Lee i wsp., 2002; Martinez i wsp., 2003
Kinaza białkowa C $\delta$ (PKC $\delta$ )	Kaul i wsp., 2005
PP2A	Peng i wsp., 2005

Stwierdzono, że  $\alpha$ -synukleina uczestniczy w ścieżce metabolicznej białek CSP- $\alpha$  (ang. **C**ysteine-**S**tring **P**rotein- $\alpha$ ) oraz kompleksu SNARE (ang. **S**NAP (Soluble NSF Attachment Protein) **R**Eceptors), przez co może chronić

zakończenia nerwowe przed uszkodzeniem (Chandra i wsp., 2005). W badaniach tych udowodniono, że ASN przeciwdziała procesowi neurodegeneracji wywołanemu brakiem CSP- $\alpha$  co sugeruje, że  $\alpha$ -synukleina jest białkiem efektorowym CSP- $\alpha$  i odgrywa istotną rolę w utrzymaniu kompleksu SNARE. Inne badania wykazały, że  $\alpha$ -synukleina może ochraniać komórki przed czynnikami apoptotycznymi oraz opóźniać ich obumieranie wywołane usunięciem surowicy z pożywki hodowlanej (Alves da Costa i wsp., 2002; Lee i wsp., 2001). Hashimoto i wsp. (2002) wykazali, że  $\alpha$ -synukleina wykazuje właściwości antyoksydacyjne, poprzez aktywację kinazy c-Jun, która odgrywa istotną rolę w odpowiedzi komórki na stres wolnorodnikowy. W stężeniu nanomolarnym  $\alpha$ -synukleina hamuje również procesy apoptotyczne między innymi poprzez aktywację ścieżki PI3 kinaza/Akt, zwiększenie ekspresji białek antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2 (Seo i wsp., 2002) oraz hamowanie apoptozy wywołanej aktywacją białka p53 (Alves da Costa i wsp., 2002). Dane ostatnich lat wskazują na istotne znaczenie  $\alpha$ -synukleiny w procesie różnicowania i przeżywalności komórek dopaminergicznych myszy (Michell i wsp., 2007), jak również ludzkich komórek progenitorowych *in vitro* (Schneider i wsp., 2007).

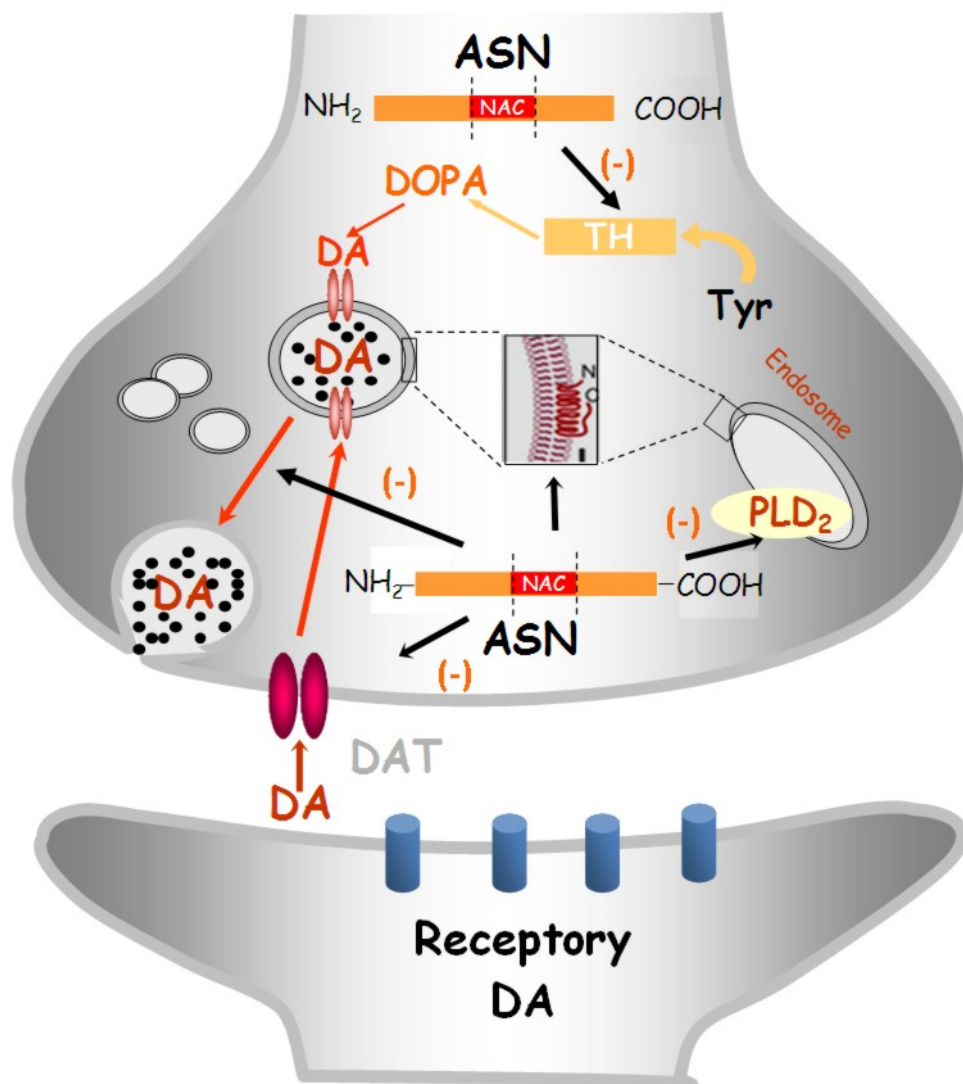
$\alpha$ -Synukleina odgrywa znaczącą rolę w regulacji funkcji układu dopaminergicznego. W warunkach fizjologicznych jest ona zaangażowana w niemalże wszystkie procesy związane z metabolizmem dopaminy (**Rycina 4**). Reguluje jej biosyntezę, magazynowanie i uwalnianie z pęcherzyków synaptycznych, jak również wychwyt zwrotny DA za pośrednictwem transportera dopaminy DAT (Sidhu i wsp., 2004b). ASN reguluje stężenie DA w zakończeniach synaptycznych i pośrednio chroni komórki przed uwalnianiem wysoce reaktywnych wolnych rodników tlenowych.

W syntezie dopaminy kluczowym enzymem jest hydroksylaza tyrozynowa (HT), która reguluje szybkość przemiany tyrozyny do L-DOPA, przekształcanej następnie do dopaminy przez dekarboksylazę aminokwasów aromatycznych. Zarówno u myszy transgenicznych, jak i w komórkach transfekowanych genem ASN, stwierdzono znaczne obniżenie aktywności HT oraz wewnątrzkomórkowego stężenia DA (Perez i wsp., 2002). Sugeruje to, że w warunkach fizjologicznych ASN hamuje aktywność HT (**Rycina 5**). Tezę tę potwierdzono poprzez badania, które wykazały, że aktywność hydroksylazy tyrozynowej, wyizolowanej z nadnerczy szczura, jest



bezpośrednio hamowana przez rekombinowaną ludzką  $\alpha$ -synukleinę w warunkach *in vitro* (Perez i wsp., 2002).

ASN może wpływać na HT bezpośrednio, poprzez interakcję białko-białko lub pośrednio, wskutek aktywacji specyficznych fosfataz lub hamowanie kinaz regulujących aktywność hydroksylazy tyrozynowej, która jest aktywna wyłącznie w formie ufosforylowanej (Kumer i Vrana 1996). Od niedawna sugeruje się, że w regulacji aktywności HT może odgrywać rolę oddziaływanie pomiędzy ASN a białkiem 14-3-3 (Xu i wsp., 2002). Opiekuńcze białko 14-3-3 wiąże się z ufosforylowaną formą hydroksylazy tyrozynowej, aby zapewnić jej maksymalną fosforylację (Maguire-Zeiss i wsp., 2005). Białko 14-3-3 zapobiega również defosforylacji HT i zwiększa okres półtrwania zaktywowanego enzymu w neuronach (Toska i wsp., 2002).  $\alpha$ -Synukleina działa odwrotnie. Wiąże się ona z nieufosforylowaną formą HT i utrzymuje enzym w formie nieaktywnej, co powoduje znaczne obniżenie syntezy DA (Maguire-Zeiss i wsp., 2005). Stwierdzono, że białko 14-3-3 zwiększa aktywność kinazy ERK, należącej do rodziny kinaz MAP (Dhillon i wsp., 2003), oraz kinazy białkowej C (Dai i Murakami, 2003). W przeciwieństwie do 14-3-3, ASN hamuje aktywność ERK, poprzez bezpośrednie wiązanie z MAP kinazą (Iwata i wsp., 2001a; Iwata i wsp., 2001b). Podobne działanie ASN zaobserwowano również w przypadku kinazy zależnej od wapnia i kalmoduliny (CaMK II) oraz kinazy białkowej C (PKC), co w rezultacie powoduje zahamowanie aktywności HT (Lee i wsp., 2002; Okochi i wsp., 2000).



**Rycina 4 Rola ASN w fizjologii układu dopaminergicznego (zmodyfikowano wg Lotharius i Brundin, 2002).**

*W warunkach fizjologicznych  $\alpha$ -synukleina (ASN), w formie rozpuszczalnej, utrzymuje homeostazę dopaminy (DA) w ośrodkowym układzie nerwowym. ASN obniża biosyntezę DA poprzez hamujący wpływ na aktywność hydroksylazy tyrozynowej (HT). Reguluje również proces uwalniania i transportu DA do pęcherzyków synaptycznych jak również obniża aktywność fosfolipazy D<sub>2</sub> (PLD<sub>2</sub>), przez co może hamować tworzenie pęcherzyków synaptycznych. ASN wpływa również na wychwyt zwrotny DA za pośrednictwem transportera (DAT). Utrzymanie odpowiedniego stężenia DA w zakończeniach synaptycznych przez wymienione mechanizmy, zabezpiecza przed jej niekontrolowaną przemianą prowadzącą do powstania toksycznych semichinonów i chinonów oraz wolnych rodników.*

Najnowsze dane wykazały, że transfekcja komórek dopaminergicznych natywnym genem ASN wpływa na zahamowanie ekspresji genów białek odpowiedzialnych za syntezę dopaminy (Baptista i wsp., 2003). Należą do nich cyklohydrolaza GTP, HT i dekarboksylaza aminokwasów aromatycznych. W komórkach transfekowanych ASN zaobserwowano również obniżenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego Nurr1, który inicjuje transkrypcję HT (Toska i wsp., 2002). Wynika z tego, że ASN nie tylko hamuje aktywność HT, ale również zmniejsza ekspresję genu dla tego enzymu na poziomie białka (Yu i wsp., 2004).

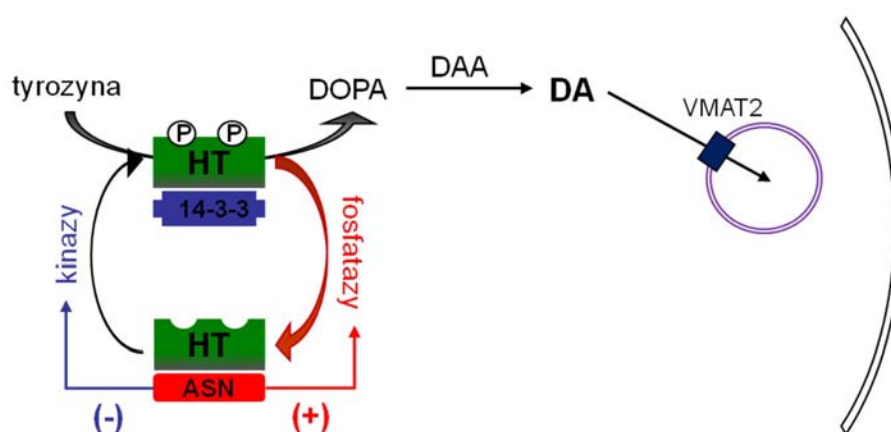
Ostatnie dane wskazują, że ASN bierze istotny udział w regulacji metabolizmu DA oraz w procesie jej magazynowania i uwalniania z pęcherzyków synaptycznych. Zahamowanie ekspresji ASN zmniejsza zapasową pulę tego przekaźnika w pęcherzykach synaptycznych neuronów hipokampa i powoduje zaburzenie długotrwałego pobudzenia synaptycznego (LTP) w tej strukturze (Cabin i wsp., 2002). Zwierzęta z wyłączonym genem kodującym ASN wykazywały istotne zaburzenia w przekaźnictwie dopaminergicznym (Sidhu i wsp., 2004). U zwierząt tych zauważono również zmniejszoną ekspresję synapsyny, białka istotnego w procesie przemian pęcherzyków synaptycznych.

Badania *in vitro* wykazały, że ASN ma zdolność do bezpośredniego wiązania się zarówno z syntetycznymi fosfolipidami, jak i z naturalnymi lipidami błony neuronów. Interakcja ta zachodzi poprzez N-końcową domenę tego białka, prowadząc do stabilizacji jego struktury drugorzędowej (Chandra i wsp., 2003; Ulmer i wsp., 2005). ASN wchodzi w interakcję z polarną powierzchnią pęcherzyków, ale również, za pośrednictwem swojej centralnej domeny NAC, tworzy hydrofobowe wiązania z apolarnym wnętrzem micelli. Ponadto ASN oddziałuje na pęcherzyki synaptyczne, w tym dopaminergiczne, poprzez regulację aktywności fosfolipazy D<sub>2</sub> (PLD<sub>2</sub>), która pełni istotną rolę w tworzeniu i przemianach metabolicznych pęcherzyków synaptycznych (Yu i wsp., 2004; Lotharius i Brundin, 2002) **(Rycina 4)**. Fosfolipaza D<sub>2</sub> jest enzymem transbłonowym, znajdującym się głównie w błonie komórkowej oraz w błonach endosomów. Katalizuje ona hydrolizę fosfolipidów do kwasu fosfatydowego i zasady w odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe. Kwas fosfatydowy powstały w wyniku działania PLD<sub>2</sub> inicjuje tworzenie pęcherzyków synaptycznych z błon

plazmatycznych (Liscovitch i wsp., 2000). Aktywność PLD<sub>2</sub> może być również istotna w regulacji przemian metabolicznych pęcherzyków synaptycznych w odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe (Lotharius i wsp., 2002; Lotharius i Brundin, 2002b). ASN wiąże się poprzez swoją N-kończącą domenę z PLD<sub>2</sub>, obniżając jej aktywność (Ahn i wsp., 2002), przez co może hamować tworzenie pęcherzyków synaptycznych w okresie niskiej aktywności neuronów. Fosforylacja ASN obniża jej zdolność do hamowania aktywności PLD<sub>2</sub> i znosi jej powinowactwo do fosfolipidów (Lotharius i Brundin, 2002, Yoshida i wsp., 2003). Dzięki temu, że ufosforylowana ASN traci zdolność inhibicji PLD<sub>2</sub>, może stymulować przemiany metaboliczne pęcherzyków synaptycznych w okresie wysokiej aktywności neuronalnej. Uważa się, że ASN należy do grupy białek wiążących kwasy tłuszczowe, tzw. FABP (ang. *Fatty Acid Binding Protein*), i również przez to wpływa na przemiany metaboliczne pęcherzyków synaptycznych (Sharon i wsp., 2001). Amfipatyczny N-końcowy region ASN jest homologiczny z apolipoproteina A<sub>2</sub>, która uczestniczy w transporcie lipidów (Lavedan, 1998). Sugeruje to, że dzięki tym właściwościom ASN może transportować kwasy tłuszczowe do obszarów tworzenia pęcherzyków synaptycznych (np. do wczesnych endosomów). ASN jako „białko opiekuńcze lipidów”, może regulować metabolizm wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w procesie endocytozy (Golovko i wsp., 2006). Nasze ostatnie badania wykazały, że ASN hamuje proces wbudowywania kwasu arachidonowego (KA) do fosfolipidów błon zakończeń synaptycznych (Adamczyk i wsp., 2007). Poprzez hamujący wpływ na kluczowy enzym odpowiedzialny za proces wbudowywania KA do lipidów, ASN może w istotny sposób wpływać na poziom wolnych nienasyconych kwasów tłuszczowych. Poza tym sugeruje się udział ASN w aksonalnym transporcie pęcherzyków synaptycznych (Lucking i Brice, 2000) poprzez interakcję z białkami cytoszkieletu komórki (Alim i wsp., 2002; Ishizawa i wsp., 2003; Jensen i wsp., 2000; D'Andrea i wsp., 2001; Chung i wsp., 2001; Sharma i wsp., 2001).

Istotną rolę w funkcji układu dopaminergicznego oraz innych układach neuroprzekaźnikowych odgrywają jony wapnia. Badania Adamczyk i Strosznajder (2006) wykazały, że ASN zwiększa napływ jonów Ca<sup>2+</sup> poprzez kanały wapniowe zależne od potencjału. Jony wapnia z kolei odgrywają istotną rolę w procesie regulacji uwalniania dopaminy do przestrzeni synaptycznej za pośrednictwem ASN (Abeliovich i wsp., 2000).

Martinez i wsp. (2003) udowodnili, że zarówno w formie prawidłowej, jak i zmutowanej, ASN wiąże się z kalmoduliną w sposób zależny od jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , co powoduje odłączenie się ASN od liposomów, z którymi pierwotnie była związana (Lee i wsp. 2002). Sugeruje to, że interakcja pomiędzy  $\alpha$ -synukleina a kalmoduliną może wpływać na regulację ilości ASN związanej z błonami komórkowymi i przyspieszać jej oligomeryzację (Martinez i wsp., 2003).



**Rycina 5** Udział ASN w regulacji aktywności hydroksylazy tyrozynowej w warunkach fizjologicznych (Perez i wsp, 2002).

Dopamina powstaje z aminokwasu tyrozyny na drodze wielostopniowego procesu. Początkowo tyrozyna przekształcana jest przez ufosforylowaną hydroksylazę tyrozynową (HT) do 3,4-dihydroksyfenyloalaniny (DOPA), z której potem w wyniku działania dekarboksylazy aromatycznych aminokwasów (DAA) powstaje dopamina (DA). Białko opiekuńcze 14-3-3 wiąże się z ufosforylowaną formą HT, natomiast  $\alpha$ -synukleina (ASN) z formą nieufosforylowaną. Częsteczki te wykazują antagonistyczne działanie w regulacji aktywności HT, co prowadzi do utrzymania optymalnego stężenia dopaminy w komórce. Z cytozolu DA jest natychmiast przenoszona do pęcherzyków synaptycznych za pomocą jednej z izoform pęcherzykowego transportera amin katecholowych - VMAT 2 (ang. Vesicular Monoamine Transporter). ASN hamuje aktywność HT bezpośrednio, poprzez wiązanie się z częścią enzymu, albo pośrednio, poprzez aktywację (+) fosfataz i inhibicję (-) kinaz.

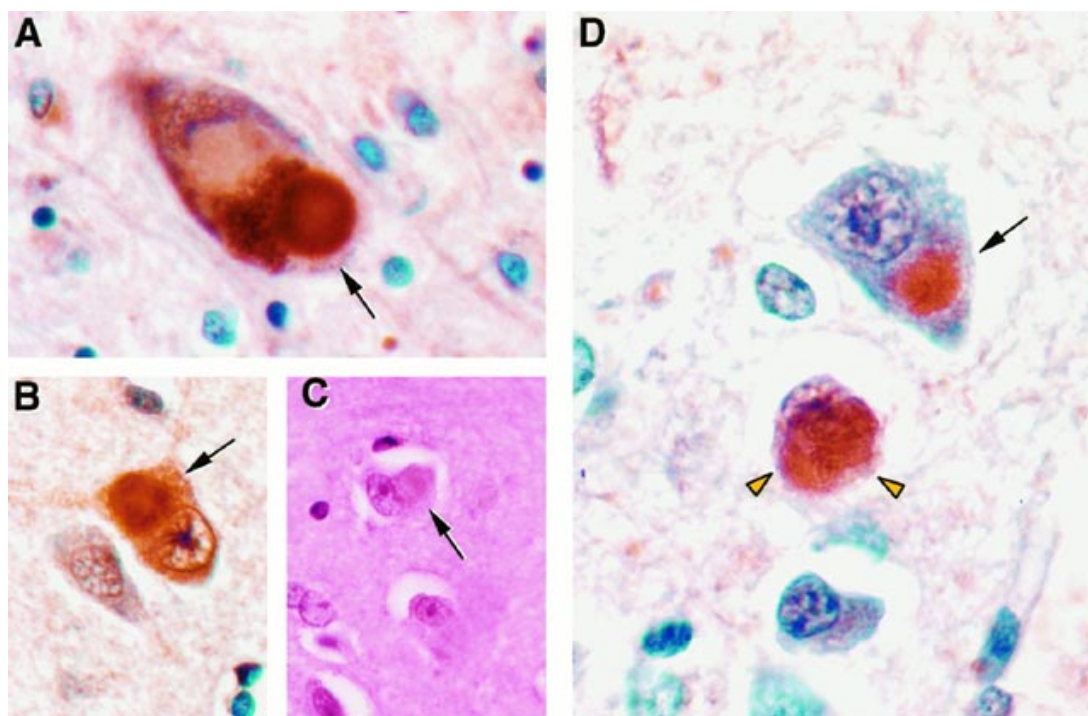
Dopamina, po aktywacji specyficznych receptorów w błonie postsynaptycznej i przekazaniu sygnału, jest wychwytywana z przestrzeni synaptycznej do cytozolu części presynaptycznej zakończeń nerwowych przez białko transportujące DAT (ang. Dopamine Transporter) (Hitri i wsp., 1994). Wychwyt zwrotny neuroprzekaźników za pośrednictwem DAT jest bardzo szybkim procesem, dlatego zmiany w funkcjonowaniu transportera powodują nagły wzrost lub spadek stężenia dopaminy w przestrzeni

synaptycznej. Aktywność DAT wpływa bezpośrednio na poziom wewnątrzkomórkowej dopaminy i indukcję stresu oksydacyjnego (Sidhu i wsp., 2004). Zaobserwowano, że ASN hamuje aktywność DAT w zakończeniach synaptycznych neuronów dopaminergicznych, w związku z powyższym poprzez regulację tego procesu może pośrednio wpływać na wewnątrzkomórkowej poziom DA i ROS (**Rycina 4**). Stwierdzono, że ASN powoduje obniżenie szybkości wychwytu zwrotnego, ale nie wpływa na powinowactwo transportera do dopaminy (Lotharius i Brundin, 2002). Wyniki naszych ostatnich badań wykazały, że ASN obniża aktywność DAT we frakcji synaptosomalnej prażkowie (w badaniu *in vitro*), a za jej działanie jest odpowiedzialny tlenek azotu (NO) (Adamczyk i wsp., 2006). Z kolei badania Sidhu i wsp. (2004) sugerują bezpośrednią interakcję ASN z białkiem transportera. W wyniku takiej interakcji może dochodzić do zmiany konformacji białka i jego dysfunkcji lub translokacji w obrębie zakończeń synaptycznych. ASN przejawia zdolność do wiązania się za pośrednictwem sekwencji NAC z C-końcowym regionem transportera dopaminy (Lee i wsp. 2001). Interakcja ta może prowadzić do zmniejszenia ilości transportera na powierzchni błony synaptycznej i, w konsekwencji, do zahamowania wychwytu zwrotnego dopaminy (Wersinger i wsp., 2003b).

### ***Znaczenie $\alpha$ -synukleiny w patologii chorób neurodegeneracyjnych***

Istotny wpływ na badania nad znaczeniem  $\alpha$ -synukleiny w chorobach neurodegeneracyjnych miało odkrycie Polymeropoulos i wsp. (1997), którzy udowodnili, że mutacja punktowa (G209A) w genie SNCA, powodująca substytucję alaniny przez treoninę w pozycji 53 ASN (A53T) wywołuje autosomalnie dominującą dziedziczną chorobę Parkinsona. Choć mutację tę wykryto w bardzo małej populacji chorych, to jej pojawieniu się towarzyszyło zawsze występowanie objawów charakterystycznych dla choroby Parkinsona i to u ludzi bardzo młodych (Polymeropoulos i wsp., 1997). Wkrótce po tym odkryciu potwierdzono obecność  $\alpha$ -synukleiny w ciałach Lewy'ego wyizolowanych *post mortem* z mózgów chorych na idiopatyczną ChP (Spillantini i wsp., 1997) (**Rycina 6**). Początkowo bardzo sceptycznie odnoszono się do hipotezy, że  $\alpha$ -synukleina może być czynnikiem patogennym wpływającym na powstawanie i rozwój ChP. Za argument miały służyć badania, które wykazywały, że u ludzi z idiopatyczną

ChP brak mutacji w genie SNCA (Chan i wsp., 1998a, 1998b). Co więcej, u gryzoni w warunkach fizjologicznych wykryto ekspresję białka ASN z tyrozyną w pozycji 53 (Mezey i wsp., 1998a). Ponadto sugerowano, że obecność  $\alpha$ -synukleiny w ciałach Lewy'ego może po prostu wynikać z jej występowania w dużej ilości w cytoplazmie neuronów. Sugestie te zostały obalone, kiedy udowodniono że ASN jest głównym składnikiem budującym ciała Lewy'ego zarówno w dziedzicznej jak i idiopatycznej chorobie Parkinsona (Spillantini i wsp., 1997; Wakabayashi i wsp., 1997; Baba i wsp., 1998; Mezey i wsp., 1998b), co wskazuje że powstawanie tych inkluzji jest ściśle związane z agregacją ASN. Po roku wykryto kolejną mutację punktową w genie SNCA, związaną z występowaniem dziedzicznej ChP, w której dochodzi do zamiany alaniny w prolinę w pozycji 30 (A30P; Kruger i wsp., 1998). W ostatnich latach opisano trzecią mutację w genie  $\alpha$ -synukleiny występującą u chorych z otępieniem z ciałami Lewy'ego, gdzie dochodzi do substytucji glutaminianu do lizyny w pozycji 46 (E46K), (Zarranz i wsp., 2004).



**Rycina 6** Ciała Lewy'ego w mózgu (Chu i wsp., 2000).

(A) Typowe dojrzałe ciało Lewy'ego (strzałka) w neuronie dopaminergicznym istoty czarnej (B) Ciało Lewy'ego w neuronach kory mózgowej (C) Ciało Lewy'ego barwione eozyną i hematoksyliną (D) Różnice pomiędzy zwojami globoidalnymi (żółte strzałki) – fibrylarnymi wtrętami w cytoplazmie małych neuronów, a ciałami Lewy'ego (czarna strzałka)

Dane ostatnich lat wskazują, że również podwojenie i potrojenie genu SNCA są odpowiedzialne za rozwój dziedzicznej ChP (Singleton i wsp., 2003; Chartier-Harlin i wsp., 2004; Ibanez i wsp., 2004; Ross i wsp., 2008). Potrojenie allelu SNCA skutkuje występowaniem zwiększonej ilości mRNA oraz białka  $\alpha$ -synukleiny (Miller i wsp., 2004). Pacjenci, u których wykryto te genetyczne nieprawidłowości wykazywali dużo wcześniejsze objawy kliniczne charakterystyczne dla choroby Parkinsona, włączając również zaburzenia poznawcze (Farrer i wsp., 2004). Ponadto u osób tych zauważono szybszy rozwój choroby niż u chorych na idiopatyczną ChP. Badania *post mortem* wykazały duże skupiska ciał Lewy'ego głównie w istocie czarnej i jądrze sinawym, z którymi związany był proces degeneracji i obumierania neuronów (Muentner i wsp. 1998, Farrer i wsp., 2004). Co więcej, osoby które posiadały trzy kopie genu SNCA zamiast dwóch wykazywały objawy ChP identyczne z chorymi na idiopatyczną postać tej choroby (Chartier-Harlin i wsp., 2004; Ibanez i wsp., 2004). Osoby ze zwiększoną ilością kopii genu SNCA dostarczają niepodważalnego dowodu, że zaburzenia ASN są istotną przyczyną powstawania i rozwoju tej choroby. U pacjentów z podwójną kopią genu pierwsze objawy pojawiały się około 50 roku życia, natomiast osoby z potrojonym genem zaczynały chorować już po 30 roku życia (Chartier-Harlin i wsp., 2004). Ponadto zwiększona ilość genu dla ASN skutkuje znacznie krótszym czasem przeżycia od wystąpienia pierwszych symptomów oraz obecnością silniejszych objawów patologicznych (Ikeuchi i wsp., 2008).

Znaczącym czynnikiem ryzyka wystąpienia ChP okazał się polimorfizm regionu promotorowego (Rep1) genu SNCA (Xia i wsp., 1996; Farrer i wsp., 2001; Mellick i wsp., 2005). Wykazano, że zwiększona długość Rep1 jest związana z wcześniejszym występowaniem objawów ChP (Kay i wsp., 2008) oraz skutkuje zwiększeniem ilości mRNA ASN (Chiba-Falek i wsp., 2003). Pojedyncze badania wskazują także na znaczenie polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNPs), zwłaszcza w rejonie 3' genu ASN jako istotnego czynnika ryzyka rozwoju ChP (Mueller i wsp., 2005; Mizuta i wsp., 2006).

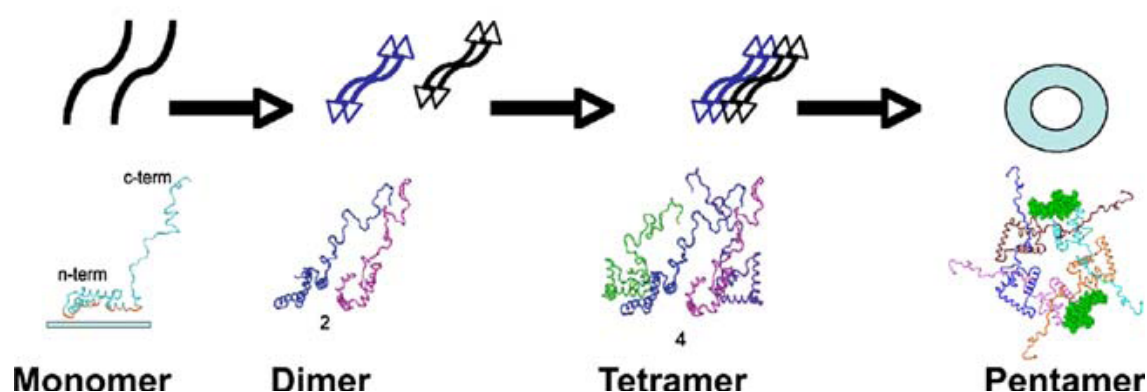
Wszystkie te odkrycia dostarczają mocnych dowodów na istotną rolę  $\alpha$ -synukleiny w patogenezie ChP. Obecnie wiadomo, że ciała Lewy'ego występują nie tylko w chorobie Parkinsona, ale również w wielu innych



chorobach neurodegeneracyjnych takich jak: otępienie z ciałami Lewy'ego (DLB; Baba i wsp., 1998; Spillantini i wsp., 1998), zanik wieloukładowy (MSA; Arima i wsp., 1998a; Fujiwara i wsp., 2002), stwardnienie zanikowe boczne (ALS; Mezey i wsp., 1998a), czy syndrom Hallervordena-Spatz'a (Saito i wsp., 2000). Zbiorczo patologie te nazwano synukleinopatiami i w chwili obecnej postuluje się znaczenie  $\alpha$ -synukleiny nie tylko jako wskaźnika tych chorób, ale również jako istotnego czynnika patogennego.

### **Mechanizmy toksyczności $\alpha$ -synukleiny**

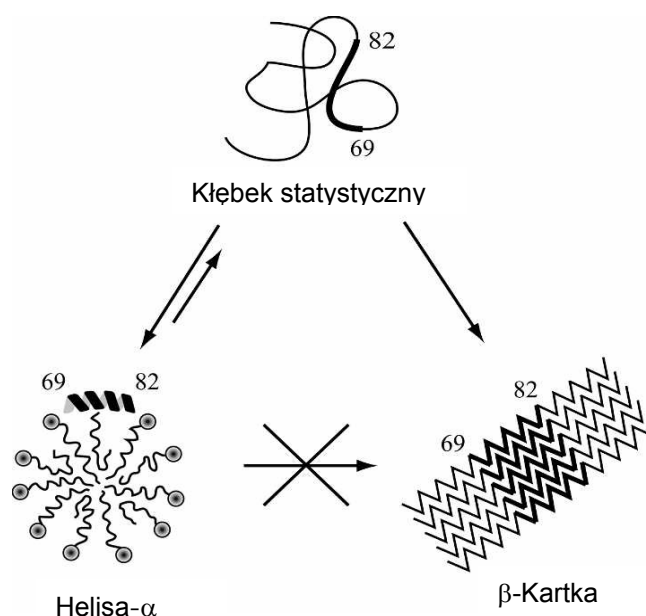
Neurotoksyczne działanie  $\alpha$ -synukleiny jest związane z przyjmowaniem przez nią nieprawidłowej konformacji, co w konsekwencji prowadzi do jej oligomeryzacji, fibrylizacji i agregacji (**Rycina 7**). Uważa się, że za powstawanie szkodliwych form tego białka odpowiada centralny jego odcinek (**Rycina 8**). Zmiana struktury NAC w postać  $\beta$ -harmonijki jest początkowym etapem agregacji, w którym powstają rozpuszczalne oligomery ASN – protofibryle (Ding i wsp., 2002), które wchodzi w interakcje z błonami pęcherzyków synaptycznych, powodując powstawanie porów i uwalnianie neuroprzekaźników do cytoplazmy (Lashuel i wsp., 2002). Postępująca agregacja może być swoistym mechanizmem chroniącym komórkę przed szkodliwym działaniem oligomerów i prowadzi do powstawania ciał Lewy'ego oraz mechanicznego uszkodzenia komórki (Jellinger, 2002).



**Rycina 7** Dynamika molekularnej agregacji ASN (Crews i wsp., 2009).

Podatność ASN na agregację w znacznym stopniu zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia. Wyniki badań wykazują, że tworzenie agregatów *in vivo* jest związane z osiągnięciem przez ASN krytycznego stężenia w cytozolu

(Shtilerman i Ding, 2002). Wykazano również, że w komórkach istoty czarnej podlegających degeneracji w chorobie Parkinsona ma miejsce wzrost ekspresji ASN na poziomie mRNA (Rockenstein i wsp., 2001). Istnieje kilka czynników, które prawdopodobnie powodują zaburzenie funkcji oraz agregację tego białka. Należą do nich m.in. związane z dziedziczną chorobą Parkinsona oraz DLB mutacje punktowe genu SNCA (typ A30P, A53T lub E46K), toksyny środowiskowe oraz starzenie. Agregacji  $\alpha$ -synukleiny sprzyja również stres oksydacyjny.

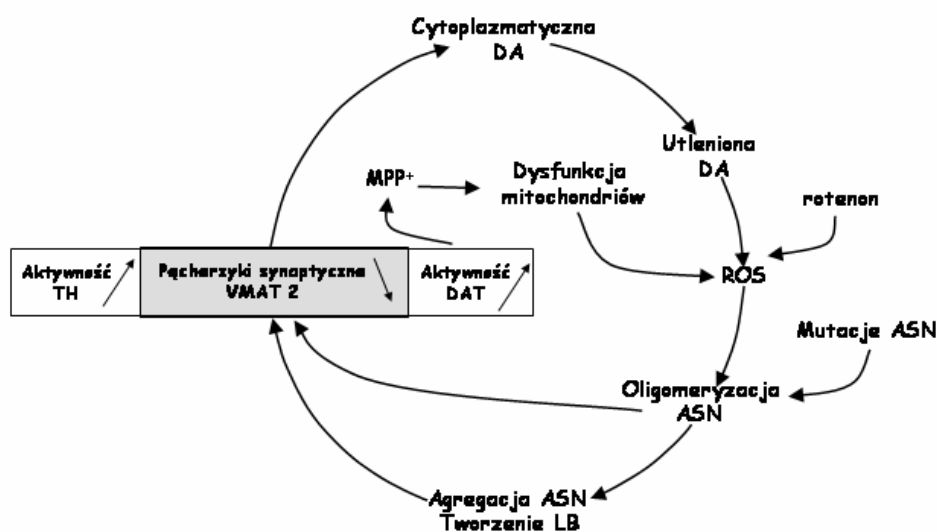


**Rycina 8 Peptyd NAC jest odpowiedzialny za tworzenie struktury  $\beta$ -kartki i agregację ASN (Bisaglia i wsp., 2006).**

Zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia ASN może być również wywołane zaburzeniem procesu jej degradacji. Mutacje w genie kodującym parkinę, wywołujące autosomalnie dominującą ChP, prowadzą do nadmiernego gromadzenia O-glikozyłowanej  $\alpha$ -synukleiny w neuronach. Zmiana zależnej od parkiny degradacji O-glikozyłowanej  $\alpha$ -synukleiny może być kluczowym czynnikiem prowadzącym do śmierci neuronów dopaminergicznych (Burke, 2001). Ponadto zaobserwowano, że zmutowana ASN (A53T) zaburza funkcję systemu proteasomalnego, co prowadzi do tworzenia ubikwitynowanych agregatów białkowych i w konsekwencji do śmierci komórek PC12 (Stefanis i wsp., 2001). Indukowana ekspresja zmutowanej ASN zwiększa ponadto wrażliwość komórek PC12 na proapoptotyczne działanie inhibitora proteasomu (Tanaka i wsp., 2001). Co

więcej, inhibicja proteasomu w komórkach nietransfekowanych również prowadzi do nadmiernego nagromadzenia agregatów białkowych zawierających ASN i do śmierci komórek (Rideout i wsp., 2001). Prawidłowe działanie proteasomu jest również zaburzone w przypadku działania natywnej ASN zarówno w formie monomerycznej jak i oligomerycznej, a nawet zagregowanej, ale pod warunkiem, że osiągnie ona wysokie stężenie wewnątrz komórki (Snyder i wsp., 2003).

Agregacja ASN może również powodować utratę fizjologicznych właściwości tego białka, co może zwiększać efekt cytotoksyczny. Wzrost stężenia, oligomeryzacja i agregacja ASN prowadzi do zaburzenia homeostazy układu dopaminergicznego. Zagregowana ASN traci hamujący wpływ na aktywność HT (Perez i Hastings, 2004) oraz zaburza funkcję transportera dopaminy (Sidhu i wsp., 2004), co prowadzi do zaburzenia homeostazy DA. Jednocześnie obniżona zdolność ASN do wiązania się z lipidami pęcherzykowymi (Jo i wsp., 2002) oraz wywołane jej agregacją zmniejszenie ilości pęcherzykowego transportera dopaminy, VMAT2, powoduje zwiększenie stężenia DA w cytoplazmie i wytwarzanie toksycznych związków, takich jak  $H_2O_2$ , rodniki tlenowe, semichinony i chinony (Lotharius i Brundin, 2002; Sidhu i wsp., 2004). Ponadto agregacja ASN może prowadzić do zaburzenia jej funkcji białka opiekuńczego i antyapoptotycznego. Stres oksydacyjny wywołany przez zaburzenie fizjologicznej funkcji ASN i jej przekształcanie się w protofibryle może dodatkowo wzmacniać jej agregację. Mamy więc do czynienia z tworzeniem się błędnego koła, gdzie agregacja ASN, zaburzenia metabolizmu dopaminy i stres oksydacyjny oddziałują ze sobą prowadząc w końcu do degeneracji i obumierania neuronów **(Rycina 9)**.



Rycina 9 Błędne koło interakcji pomiędzy ASN a układem dopaminergicznym (wg Sidhu i wsp., 2004).

Tworzenie oligomerów i agregacja  $\alpha$ -synukleiny (ASN) oraz stres oksydacyjny wywołany przez niekontrolowaną przemianę cytoplazmatycznej dopaminy (DA) w neuronach może być samopodtrzymującym się cyklicznym procesem, który ostatecznie może powodować degenerację neuronów dopaminergicznycy istoty czarnej w chorobie Parkinsona. Wiele dobrze znanych czynników etiologicznych tej choroby (np. rotenon, MPTP metabolizowany do MPP<sup>+</sup>) może oddziaływać na różne etapy tego cyklu albo bezpośrednio zwiększając powstawanie wolnych rodników (ROS) lub zmieniając fizjologiczne właściwości ASN, powodując jej agregację (np. mutacje ASN).

### Znaczenie stresu oksydacyjnego w toksyczności $\alpha$ -synukleiny

W 2001 roku dwa niezależne zespoły badawcze wykazały, że podczas agregacji ASN lub jej toksycznego fragmentu NAC *in vitro* w obecności jonów żelaza (II) dochodzi do tworzenia rodników hydroksylowych ( $\cdot OH$ ) (Masliah, 2000; Turnbull, 2001). Zarówno  $\beta$ - jak i  $\gamma$ -synukleina nie posiadają takich właściwości (Uversky, 2001). Sugeruje się, że etapem pośrednim w tworzeniu rodnika  $\cdot OH$  jest uwalnianie nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) w czasie oligomeryzacji ASN. W procesie tym ważną rolę odgrywają jony metali przejściowych o aktywności redoks ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$ , itp.). Związanie metalu do cząsteczki ASN powoduje przyłączenie tlenu, który następnie tworzy

specyficzne mostki tlenowe (Tabner 2001). Tego typu połączenia są często spotykane w rozmaitych kompleksach białek z metalami, jak chociażby w metaloproteazach. Zmiany natywnej konformacji ASN prowadzące do jej agregacji mogą spowodować zniekształcenie struktury przestrzennej, destabilizację mostka tlenowego i jego zerwanie. Skutkuje to uwolnieniem anionorodnika nadtlenkowego, który następnie ulega przekształceniu do nadtlenu wodoru:

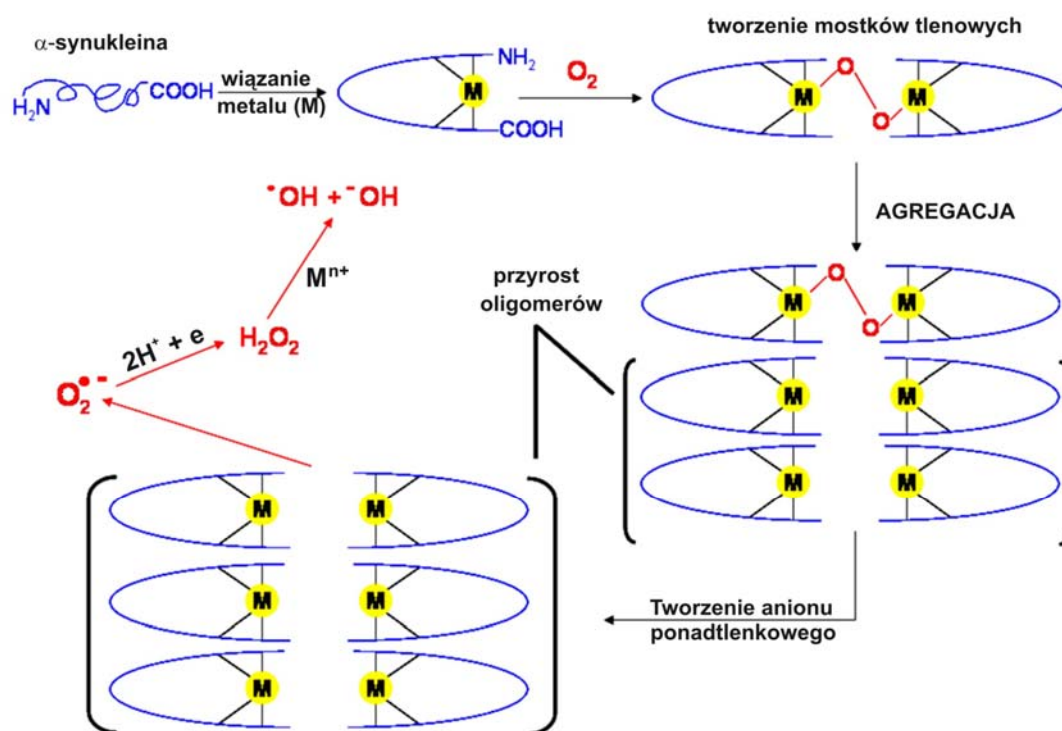


Powstały w ten sposób nadtlenek wodoru reagując z jonami żelaza(II), tworzy rodnik hydroksylowy, zgodnie z reakcją Fentona (Floyd 1990):



Hipotezę tę potwierdzają badania z zastosowaniem katalazy, która całkowicie blokuje agregację ASN i uwalnianie rodnika  $^{\bullet}\text{OH}$  w roztworze zawierającym jony  $\text{Fe}^{2+}$  (Tabner, 2002; Paik, 1999).

Wykazano jednocześnie, że synteza nadtlenu wodoru oraz agregacja  $\alpha$ -synukleiny są hamowane przez związki specyficznie chelatujące jony żelaza i miedzi. Jony metali przejściowych, w tym żelaza i miedzi, indukują powstawanie agregatów ASN (Uversky, 2001). Dodanie jonów żelaza (II) do hodowli komórek transfekowanych genem dla  $\alpha$ -synukleiny powoduje jej wewnątrzkomórkową agregację, a efekt ten jest wzmocniony, jeśli komórki zawierają zmutowaną (A53T) formę tego białka (Ostrerova-Golts, 2000). Na podstawie powyższych danych Tabner i wsp. (2002) zaproponowali mechanizm agregacji ASN w obecności jonów metali o aktywności redoks **(Rycina 10)**:



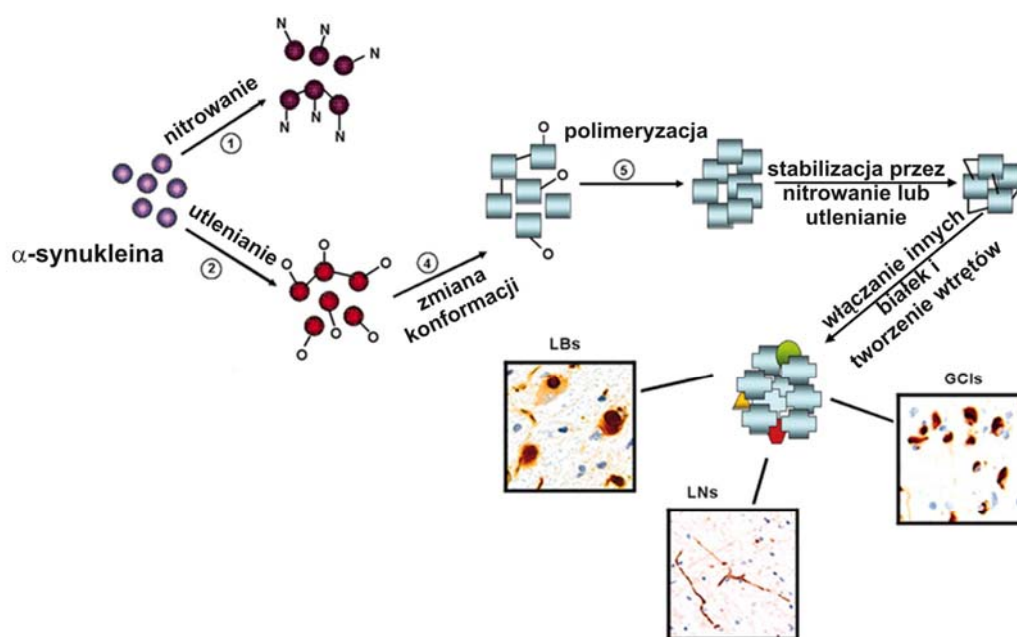
Rycina 10 Proces agregacji ASN z udziałem jonów metali przejściowych (wg Tabner i wsp., 2002).

Również toksyczny fragment ASN, peptyd NAC, może pobudzać tworzenie reaktywnych form tlenu poprzez inhibicję kompleksu II (dehydrogenazy bursztynianowej) łańcucha oddechowego. Wzrost poziomu wolnych rodników tlenowych i stresu oksydacyjnego mogą następnie prowadzić do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NFκB, indukcji genów proapoptotycznych i obumierania neuronów (Tanaka i wsp., 2002).

Agregacja ASN w specyficznych warunkach indukuje tworzenie wolnych rodników. Z kolei stres oksydacyjny może być jednym z istotnych czynników pobudzających tworzenie polimerów tego białka (**Rycina 11**). Po raz pierwszy udowodniono tę hipotezę, kiedy odkryto, że podawanie zwierzętom MPTP (1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyny) stymuluje oksydacyjną modyfikację i agregację  $\alpha$ -synukleiny (Konwall i wsp., 2000). Podobne do MPTP działanie wykazują również inhibitor kompleksu I – rotenon (Diaz-Corrales i wsp., 2005) oraz silny utleniacz, parakwat (Bove i wsp., 2005) (**Rycina 9**). Badania *in vitro* wykazały, że również oksydanty, takie jak  $H_2O_2$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$ , powodują oligomeryzację ASN i jej agregację oraz odkładanie w formie nierozpuszczalnych złogów. Do dnia dzisiejszego nie

odkryto, które reszty aminokwasowe w cząsteczce ASN są odpowiedzialne za tworzenie jej agregatów pod wpływem działania czynników utleniających. Prawdopodobnie istotną rolę w tworzeniu oligomerów w warunkach stresu oksydacyjnego odgrywa C-końcowa domena ASN, ponieważ pozbawione jej białko nie agreguje pod wpływem działania nadtlenu wodoru oraz jonów miedzi (Paik i wsp., 2000).

Ważną rolę w procesach wolnorodnikowych prowadzących do neurodegeneracji odgrywa nadtlenoazotyn (ONOO<sup>-</sup>), który powstaje z tlenku azotu (NO) w obecności anionorodnika ponadtlenu ( $^{\bullet}O_2^-$ ). Związek ten, pomimo krótkiego okresu półtrwania, jest niezwykle reaktywny, może powodować nitrowanie związków organicznych, w tym białek i lipidów oraz indukować tworzenie nowych rodników. Wykrycie nitrowanych cząsteczek  $\alpha$ -synukleiny w mózгах osób z chorobą Parkinsona, atrofią wielosystemową, demencją z ciałkami Lewy'ego i innymi synukleinopatiami, wskazuje na znaczenie reaktywnych form azotu w procesie agregacji tego białka (Giasson i wsp., 2000). Udowodniono, że modyfikacja reszt tyrozynowych w cząsteczce  $\alpha$ -synukleiny pod wpływem działania ONOO<sup>-</sup> skutkuje tworzeniem wysoce stabilnych oligomerów *o,o'*-dityrozynowych. Formowanie takich kowalencyjnych wiązań wewnątrz jednej i pomiędzy wieloma cząsteczkami ASN w filamentach sprawia, że są one niezwykle odporne na działanie czynników denaturujących (Souza i wsp., 2000). Nitracja reszt tyrozynowych w cząsteczce  $\alpha$ -synukleiny, mimo iż indukuje powstanie jej dimerów, hamuje dalszą agregację tego białka do protofibrili (**Rycina 11**). Utleniona ASN jest natomiast zdolna do całkowitej polimeryzacji. Chociaż nitrowanie reszt tyrozynowych i tworzenie specyficznych kowalencyjnych wiązań zapobiega procesowi agregacji, może jednakże mieć kluczowe znaczenie w procesie stabilizacji już powstałych oligomerów  $\alpha$ -synukleiny (Norris i wsp., 2003). Wykrycie nitrowanych cząsteczek tego białka w złogach charakterystycznych dla synukleinopatii wydaje się potwierdzać tę hipotezę.



Rycina 11 Udział procesu utleniania i nitracji w tworzeniu stabilnych agregatów  $\alpha$ -synukleiny (wg Norris i wsp., 2003).

*LBs*- ciała Lewy'ego; *LNs*-neuryty Lewy'ego; *GCIs*-cytoplazmatyczne wtręty gleju

W wyniku stresu oksydacyjnego może dojść do zmian przepuszczalności, a nawet ciągłości błony jądrowej i translokacji  $\alpha$ -synukleiny z cytoplazmy do jądra (Sangchot i wsp., 2002). Dokładna analiza pozwoliła określić sposób i dynamikę przemieszczenia ASN w warunkach stresu oksydacyjnego, począwszy od jej C-końcowego fragmentu o wielkości ok. 10 kDa, a następnie, w przypadku zaburzenia integralności błony jądrowej, translokacji całej cząsteczki ASN (Xu i wsp., 2006). Mechanizm przemieszczenia C-końca oraz całego białka ASN nie został jeszcze dokładnie zbadany. Wiadomo, że stres oksydacyjny powoduje zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, przez co może dochodzić do aktywacji kalpajny I (Ding i wsp., 2002). Istnieje więc możliwość, że C-końcowy fragment ASN w jądrze może powstawać w wyniku działania tego enzymu.

Indukcja stresu oksydacyjnego i jądrowa translokacja ASN może również skutkować uszkodzeniem DNA. W odpowiedzi nawet na bardzo małe uszkodzenia DNA dochodzi do natychmiastowej aktywacji polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP) (Virag i wsp., 1999). W warunkach fizjologicznych ten jądrowy enzym bierze udział w procesie naprawy DNA, jako jeden ze



składników kompleksu BER (Piskunova i wsp., 2008). Natomiast w warunkach wzmożonego stresu oksydacyjnego i genotoksycznego może dochodzić do nadekspresji oraz hiperaktywacji tego enzymu, zużycia  $\beta$  NAD<sup>+</sup> i ATP, co skutkuje wyczerpaniem energii w komórce oraz jej obumieraniem na drodze nekrozy. Ostatnie badania wskazują, że nadmierna aktywność PARP-1 prowadzi również do śmierci komórek na drodze innego, specyficznego mechanizmu nazwanego „parthanatos” (Andrabi i wsp., 2008). W mechanizmie tym istotnym mediatorem są polimery poli (ADP-rybozy) (PAR). W wyniku translokacji PAR do mitochondriów dochodzi do uwalniania czynnika indukującego apoptozę (AIF) i jego translokacji do jądra, co powoduje obumieranie komórek na drodze niezależnej od kaspaz (Wang i wsp., 2009). Ten mechanizm śmierci komórek różni się od procesów apoptozy, nekrozy, czy autofagii i zachodzi w każdej tkance, również nerwowej (David i wsp., 2009). Chociaż pokazano, że aktywacja PARP-1 towarzyszy patologii wielu chorób OUN takich jak niedokrwienie, czy PD, dokładna rola tego enzymu w toksyczności ASN nie została zbadana.

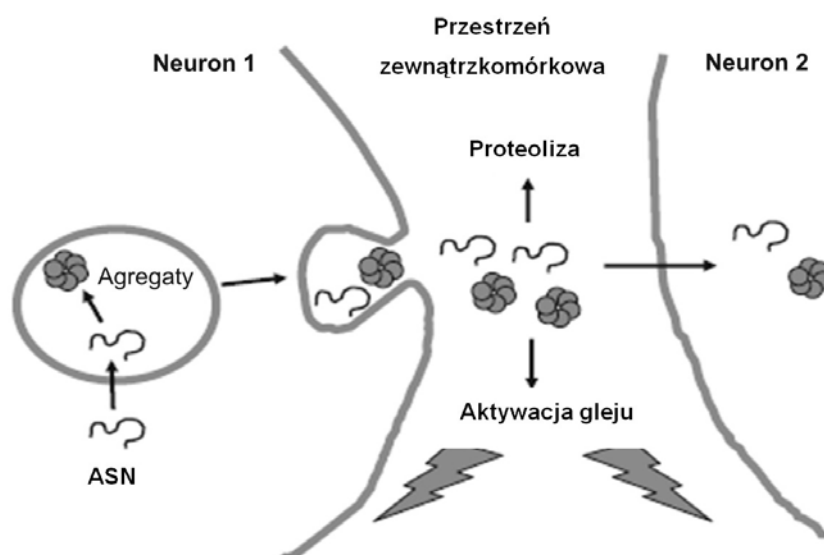
### ***Sekrecja i działanie zewnątrzkomórkowej $\alpha$ -synukleiny***

Badania mające na celu opracowanie odpowiedniego biochemicznego wskaźnika choroby Parkinsona doprowadziły do wykrycia  $\alpha$ -synukleiny w płynie mózgowo-rdzeniowym zarówno ludzi zdrowych, jak i dotkniętych ChP (Borghini i wsp., 2000). Dalsze badania, wykorzystujące zarówno technikę Western Blot jak i immunoprecypitację, umożliwiły ilościowe oznaczenie białka ASN na poziomie nanomolarnym w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) oraz osoczu (El-Agnaf i wsp., 2003). Wyniki powyższych eksperymentów nie wykazały znaczącej różnicy w poziomie zewnątrzkomórkowej ASN między osobami zdrowymi a ludźmi z ChP. Opracowanie i użycie specyficznej metody ELISA, która pozwoliła na dokładniejsze oznaczenia stężenia ASN u osób z ChP i atrofią wielosystemową wykazały znaczący wzrost stężenia tego białka w porównaniu z ludźmi zdrowymi (Lee i wsp., 2006). Ponadto El-Agnaf i wsp. (2006) wykazali znaczący wzrost poziomu rozpuszczalnych oligomerów  $\alpha$ -synukleiny w osoczu i PMR w przypadku chorych z ChP. Badania Tokuda i wsp. (2006) wykazały natomiast istotny spadek poziomu  $\alpha$ -synukleiny w płynie mózgowo-rdzeniowym osób z ChP. Rozbieżność dotychczasowych wyników sprawia, że na obecnym etapie nie można rozpatrywać poziomu

zewnątrzkomórkowej  $\alpha$ -synukleiny jako istotnego wskaźnika choroby Parkinsona. Jednakże badania te jednoznacznie wykazały obecność ASN w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co sugeruje udział tej puli ASN w procesie neurodegeneracji i daje nowe spojrzenie na etiologię i rozwój synukleinopatii.

Do chwili obecnej trwają intensywne badania mające prowadzić do odkrycia i opisanego mechanizmu uwalniania ASN do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Sekrecja tego białka nie zależy prawdopodobnie od jego poziomu wewnątrzkomórkowego, co wykazały badania z użyciem ASN transfekowanej trwale i przejściowo (El-Agnaf i wsp., 2003; Sung i wsp., 2005; Lee i wsp., 2005). Uwalnianie ASN nie jest również wywołane rozpadem obumierających komórek, gdyż równocześnie nie zauważono w płynie zewnątrzkomórkowym obecności innych małych białek cytozolowych (Lee i wsp., 2005). Ostatnie przeprowadzone przez nas badania zademonstrowały, że pod wpływem stresu oksydacyjnego ASN może być uwalniana z zakończeń synaptycznych (Adamczyk i wsp., 2007). Niestety nie można całkowicie wykluczyć, że ASN przedostaje się do przestrzeni pozakomórkowej w wyniku uszkodzenia i degeneracji komórek, jednak wydaje się, że głównym źródłem puli zewnątrzkomórkowej tego białka jest jego sekrecja. Uwalnianie ASN z komórek jest zahamowane w niskiej temperaturze, co pozwala przypuszczać, że to proces egzocytozy pęcherzykowej może być głównym mechanizmem jej sekrecji (Lee i wsp., 2005). Skoro ASN normalnie występuje przede wszystkim w cytoplazmie, musi istnieć mechanizm translokacji tego białka do pęcherzyków wydzielniczych. Niewielką ilość  $\alpha$ -synukleiny wyizolowano z wnętrza pęcherzyków uzyskanych z homogenatu mózgu szczura, neuronów z hodowli pierwotnej, czy ludzkich komórek neuroblastoma (Lee i wsp., 2005). Wiadomo, że ASN ma zdolność wiązania się do fofolipidów błonowych, a interakcja ta jest niezwykle dynamiczna w żywej komórce (Fortin i wsp., 2005; Kim i wsp., 2006). Jest więc wysoce prawdopodobne, że w procesie izolacji pęcherzyków związana z nimi ASN zostaje odłączona. Pozwala to przypuszczać, że białko ASN wyizolowane z pęcherzyków, w znaczącym stopniu stanowi pulę wewnątrzpęcherzykową. Przypuszczenia te dodatkowo potwierdzają badania w mikroskopie elektronowym, w których dodatkowo udowodniono, że pęcherzyki zawierające  $\alpha$ -synukleinę wykazują morfologię i właściwości zbliżone do pęcherzyków wydzielniczych (Lee i wsp., 2005). ASN

nie posiada sekwencji sygnalizacyjnej białka wydzielniczego, która umożliwia kierowanie peptydów do wnętrza siateczki śródplazmatycznej (ER) (Lee i wsp., 2005). Sugeruje to, że mechanizm sekrecji ASN nie zależy od konwencjonalnej drogi ER - aparat Golgiego - pęcherzyki wydzielnicze (**Rycina 12**). W ostatnich latach wykazano, że wiele białek cytozolowych, podobnie jak  $\alpha$ -synukleina, jest wydzielanych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej na drodze nieznanego dokładnie mechanizmu. Należą do nich cytokiny, czynniki wzrostu, białka szoku cieplnego, składniki cytoszkieletu (Fevrier i Raposo, 2004; Nickel, 2003). Droga wydzielania tych peptydów nie jest do końca poznana, sugeruje się, że mechanizm ich uwalniania jest bardzo złożony, ale z pewnością obejmuje wydzielanie pęcherzykowe (Nickel, 2003). Istnieje przypuszczenie, że proces egzocytozy pęcherzykowej jest jednym ze sposobów na pozbycie się z wnętrza komórki białek uszkodzonych (Lee i wsp., 2005). Ponadto wykazano, że również zagregowane formy  $\alpha$ -synukleiny mogą być wydzielane z komórki na drodze zależnej od egzocytozy, a sekrecja monomerycznej i zagregowanej  $\alpha$ -synukleiny zwiększa się w wyniku działania czynników prowadzących do uszkodzenia i akumulacji białek (Lee i wsp., 2005). Możliwe jest również, że za zewnątrzkomórkowe uwalnianie  $\alpha$ -synukleiny mogą być odpowiedzialne inne mechanizmy, jak na przykład modyfikacje post-translacyjne tego białka. Podatność na agregację pęcherzykowej  $\alpha$ -synukleiny może być nie tylko spowodowana zaburzeniem konformacji tego białka, ale również specyficznym mikrośrodowiskiem panującym wewnątrz pęcherzyków. Wysokie stężenie jonów wapnia (Lowe i wsp., 2004), niskie pH (Hoyer i wsp., 2002) oraz obecność glikozaminoglikanów takich jak heparyna (Cohlberg i wsp., 2002) mogą przyspieszać proces agregacji  $\alpha$ -synukleiny.



**Rycina 12 Hipoteza dotycząca uwalniania i działania zewnątrzkomórkowej ASN (Lee i wsp., 2008).**

Zarówno zewnątrzkomórkowa  $\alpha$ -synukleina, jak i jej centralny hydrofobowy fragment NAC, wykazują działanie cytotoksyczne w badaniach *in vitro* (Albani i wsp., 2004; Bodles i wsp., 2000; Du i wsp., 2003; Seo i wsp., 2002; Sung i wsp., 2001). Mechanizm działania tych peptydów do dzisiaj nie został w pełni wyjaśniony. Badania przeprowadzone na syntetycznych błonach fosfolipidowych pokazały, że oligomery zewnątrzkomórkowej  $\alpha$ -synukleiny układają się w kształt walca (Volles i Lansbury, 2003), a po połączeniu z błoną, tworzą struktury podobne do porów (Volles i wsp., 2001; Kayed i wsp., 2004). Jeśli taka sytuacja miałaby miejsce *in vivo*, to utworzenie podobnych struktur przez oligomery  $\alpha$ -synukleiny mogłoby być bardzo niebezpieczne dla komórki.

Inny potencjalny mechanizm toksyczności zewnątrzkomórkowej  $\alpha$ -synukleiny, a zwłaszcza jej form zagregowanych zakłada aktywację gleju i wywołanie odpowiedzi zapalnej. Zewnątrzkomórkowa ASN aktywuje *in vitro* komórki mikrogleju, które w odpowiedzi uwalniają wolne rodniki ( $\text{ONOO}^-$ ,  $\cdot\text{O}_2^-$ ) oraz eikozanoidy, w tym prostaglandynę E2 (Zhang i wsp., 2005). Badacze ci udokumentowali, że zewnątrzkomórkowa  $\alpha$ -synukleina zwiększa obumieranie komórek dopaminergicznych w hodowli mieszanej neurony/mikroglej, a pozostaje bez wpływu na przeżywalność samych neuronów (Zhang i wsp., 2005). Badania te wskazują, że oddziaływanie ASN z mikroglejem powoduje aktywację tych komórek, co skutkuje

neurotoksycznością. Inne badania wykazały, że ASN stymuluje uwalnianie czynników prozapalnych, takich jak ICAM-1 (ang. *intercellular adhesion molecule*) oraz interleukina-6 z ludzkich astrocytów i ludzkich nowotworowych komórek astrocytoma (U-373MG) (Klegeris i wsp., 2006).

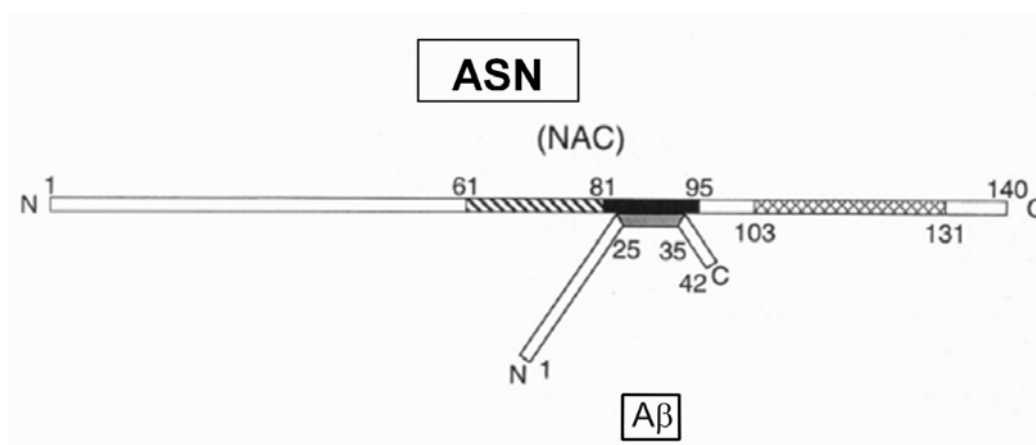
Zewnątrzkomórkowa  $\alpha$ -synukleina jest usuwana z przestrzeni zewnątrzkomórkowej na drodze dwóch mechanizmów. Pierwszy z nich polega na proteolitycznej degradacji tego białka przez zewnątrzkomórkowe enzymy. ASN uwolniona z komórek jest cięta przez metaloproteazy występujące w macierzy zewnątrzkomórkowej (Sung i wsp., 2005). Prowadzi to do powstawania krótkich peptydów, które indukują agregację i zwiększają toksyczność  $\alpha$ -synukleiny. Drugim sposobem na usunięcie zewnątrzkomórkowej puli  $\alpha$ -synukleiny jest jej wychwyt zwrotny. W badaniach przeprowadzonych *in vitro* udowodniono, że  $\alpha$ -synukleina jest pobierana zarówno przez neurony, jak i komórki mikrogleju (Ahn i wsp., 2006; Sung i wsp., 2001; Zhang i wsp., 2005). Mechanizm tego zjawiska nie jest do końca sprecyzowany. Podczas gdy jedne badania sugerują, że wychwyt  $\alpha$ -synukleiny zachodzi na drodze endocytozy zależnej od białka Rab5A (Sung i wsp., 2001), inne wskazują na internalizację nie-endocytarną (Ahn i wsp., 2006). Lee i wsp., (2008) uważają, że wychwyt zwrotny zewnątrzkomórkowej ASN zależy od stopnia agregacji tego białka. Oligomery i agregaty są pobierane na drodze endocytozy, a formy monomeryczne mogą swobodnie dyfundować do komórki przez błonę komórkową.

### ***Znaczenie $\alpha$ -synukleiny w patologii choroby Alzheimera***

W roku 1993 z płytek starczych mózgów pacjentów z chorobą Alzheimera oprócz  $A\beta$  wyizolowano również 35-cio aminokwasowy peptyd NAC, który stanowi centralny fragment białka  $\alpha$ -synukleiny (Ueda i wsp., 1993). Badania immunohistochemiczne wykazały, że peptyd NAC odkładany jest w centralnej części blaszek starczych, podczas gdy  $A\beta$  występuje zarówno w ich centrum jak i w części peryferyjnej (Masliah i wsp., 1996). Stosunek NAC do  $A\beta$  w blaszkach starczych oszacowano na mniejszy niż 1:10 (Ueda i wsp., 1993). W kolejnych badaniach stwierdzono, że peptyd NAC wykazuje silną tendencję do tworzenia struktury  $\beta$ -harmonijki i włókien amyloido-podobnych (Iwai i wsp., 1995). W badaniach *in vitro* zarówno ASN, jak i peptyd NAC, wchodzi w bezpośrednią interakcję z

peptydami A $\beta$  i zwiększają ich agregację (Han et al., 1995; Yoshimoto et al., 1995). ASN poprzez C-kończącą część domeny NAC (aa 81-95) (Yoshimoto et al., 1995) (**Rycina 13**), jak również poprzez domenę N-kończącą (Jensen i wsp., 1997) wiąże się z A $\beta$  1-38. Ostatnie dane pokazały, że A $\beta$  i ASN koloalizują we frakcjach pęcherzykowych i błonowych, a A $\beta$  stabilizuje oligomery ASN, co skutkuje tworzeniem struktur przypominających pory (Tsigielny i wsp., 2008) (**Rycina 14**).

Obecności peptydu NAC w blaszkach starczych, u rodzin dotkniętych AD nie towarzyszyły zmiany w genie kodującym  $\alpha$ -synukleinę (Brookes i St. Clair, 1994; Campion i wsp., 1995). Na podstawie wszystkich wyników sugerowano, że peptyd NAC może brać udział w procesie agregacji A $\beta$ , ale nie jest pierwotnym czynnikiem przyczyniającym się do powstawania blaszek starczych (Ueda i wsp., 1993).



**Rycina 13** Wiązanie ASN z A $\beta$  poprzez domenę NAC (zmodyfikowano wg Yoshimoto i wsp., 1995).

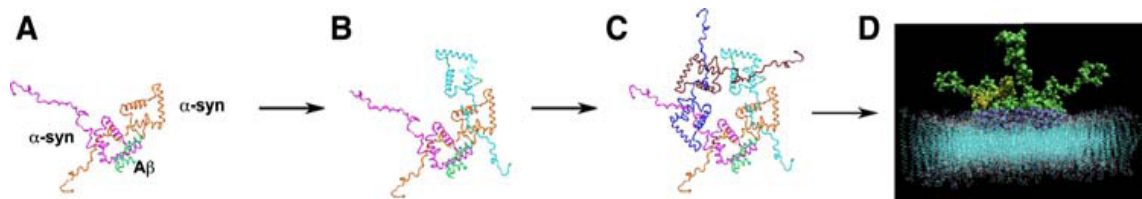
Badania immunohistochemiczne potwierdzają obecność NAC w blaszkach starczych, ASN jest natomiast obecna w synapsach oraz zdegenerowanych neurytach otaczających blaszki starcze (Masliah i wsp., 1996; Ueda i wsp., 1993). Do chwili obecnej nie w pełni wyjaśnioną kwestią pozostaje, na jakiej drodze peptyd NAC jest uwalniany i nagromadza się w przestrzeni pozakomórkowej. Badania ostatnich lat wskazują, że związana z błoną komórkową  $\alpha$ -synukleina może wchodzić w interakcje z zewnątrzkomórkowym A $\beta$ , a w wyniku tej interakcji dochodzi do aktywacji procesów prowadzących do uwalniania peptydu NAC (Mandal i wsp., 2006).

Ponadto ASN uwolniona do przestrzeni zewnątrzkomórkowej może być również cięta przez metaloproteazy z uwolnieniem peptydu NAC (Sung i wsp., 2005).

Podczas gdy akumulacja NAC w blaszkach starczych wydaje się być stosunkowo późnym zdarzeniem, patologiczne zmiany  $\alpha$ -synukleiny mogą zachodzić w początkowym stadium choroby i dotyczą głównie zwiększenia ekspresji tego białka we wczesnym etapie rozwoju niektórych form AD (Iwai i wsp., 1996). W przeciwieństwie do ASN, poziom innych synaptycznych białek (np. synaptofizyny) obniża się stopniowo wraz z rozwojem choroby, co sugeruje, że utrata zakończeń nerwowych jest wczesnym i niezwykle istotnym objawem patologii AD (Iwai i wsp., 1996; Masliah i wsp., 1996). Ponadto warto zauważyć, że podczas, gdy peptyd NAC, produkt degradacji ASN występuje w znacznych ilościach w rdzeniu blaszek starczych, nie stwierdzono tam obecności innych białek synaptycznych.

W przeciągu ostatnich lat doniesienia wielu grup badawczych pokazują, że u ponad 60% chorych z idiopatyczną chorobą Alzheimera wykrywa się ciała Lewy'ego w mózgu, głównie w jądrze migdałowatym (Mikolaenko i wsp., 2005; Jellinger, 2004). Analiza pacjentów z zespołem Downa wykazała, że ponad połowa badanych przypadków charakteryzuje się obecnością LB, które towarzyszą uszkodzonym zakończeniom synaptycznym również w obszarze jądra migdałowatego (Lippa i wsp., 1999). Obecnie formę otępienia, którą charakteryzuje obecność zarówno blaszek starczych, jak i LB w mózgu nazywamy wariantem choroby Alzheimera z ciałami Lewy'ego (LBV) (Petersen i wsp., 1998). Chociaż stopień zaburzenia poznawczego u pacjentów z LBV jest porównywalny z obserwowanym w AD, to jednak obecność LB przyspiesza rozwój objawów ze strony układu pozapiramidowego (Lopez i wsp., 2000). Badania histopatologiczne mózgow pacjentów z LBV wykazały obecność LB nie tylko w zdegenerowanych neurytach otaczających blaszki starcze, ale również stwierdziły występowanie agregatów ASN w ciele neuronu (Wirhth i wsp., 2000). Ponadto Szpak i wsp. (2001) pokazali, że LB są obecne również w pniu i korze mózgu większości zbadanych pacjentów z AD. Oprócz ciał Lewy'ego, w mózgach chorych zarówno na AD jak i LBV zidentyfikowano również inne wtręty zawierające ASN, charakteryzujące się odmiennymi właściwościami. W przeciwieństwie do LB były mniejsze, miały niejednorodną powierzchnię

oraz nie zawierały ubikwityny (Mukaetova-Ladinska i wsp., 2000). Występowanie tego typu agregatów ASN stwierdzono głównie w komórkach hipokampa osób z AD (Arai i wsp., 2001).



**Rycina 14** Interakcje ASN z A $\beta$  prowadzą do wytworzenia porów w membranie (Crews i wsp., 2009).



# Założenia i cel pracy

Współczesna hipoteza dotycząca chorób neurodegeneracyjnych zakłada, że kluczową rolę w powstawaniu i rozwoju tych zaburzeń odgrywają zmiany konformacyjne białek. W wyniku działania licznych czynników może dochodzić do zmiany prawidłowej struktury alfa na formę  $\beta$ -kartki. Zmiany konformacji białek zwiększają ich oporność na działanie enzymów proteolitycznych i przyczyniają się do ich oligomeryzacji, fibrylizacji i w konsekwencji do tworzenia nierozpuszczalnych złożeń. Uważa się, że dimery i trimery stanowią najbardziej toksyczne formy. Oligomery białkowe mogą mieć różny skład i lokalizację w neuronie. Do chwili obecnej mechanizm procesu „oligomeryzacji” nie jest poznany. Charakterystycznymi złożami odkładanymi w chorobie Parkinsona są ciała Lewy’ego, których głównym składnikiem jest  $\alpha$ -synukleina. Agregaty  $\alpha$ -synukleiny towarzyszą również innym chorobom neurodegeneracyjnym. Występują przede wszystkim w chorobie Alzheimer’a, ale również w otępieniu starczym z ciałami Lewy’ego, w chorobie Hallervordena-Spatza, w zaniku wieloukładowym i w innych chorobach zwanych synukleinopatiami. Dane ukazujące się na przestrzeni ostatnich 20 lat pokazały, że w patologii tych ASN jest nie tylko markerem, ale przede wszystkim istotnym czynnikiem patogennym. Wcześniejsze badania skupiały jednakże uwagę wyłącznie na patologicznym działaniu wewnątrzkomórkowej ASN, gdyż jest ona typowym białkiem cytozolowym, a jej patologiczne wtręty występują przede wszystkim wewnątrzkomórkowo. Przełom w dziedzinie synukleinopatii stanowiły badania Borghi i wsp. (2000) oraz El-Agnafa i wsp. (2003), w których wykazano obecność ASN w przestrzeni pozakomórkowej, zarówno w płynie mózgowo-rdzeniowym, jak i w osoczu krwi. Faktem jest, że w miarę rozwoju neurodegeneracji patologia ciał Lewy’ego rozszerza się na poszczególne regiony mózgu. Istnieje zatem prawdopodobieństwo, że uwolniona zewnątrzkomórkowo ASN może mieć istotny udział w rozprzestrzenianiu się i w rozwoju nowych ognisk chorobowych w mózgu.

Wiadomo, że zewnątrzkomórkowe podanie  $\alpha$ -synukleiny działa neurotoksycznie, jednakże mechanizm jej działania nie został poznany. Nasze poprzednie dane pokazały, że ASN działająca zewnątrzkomórkowo

powodowała zaburzenie przekaźnictwa dopaminergicznego. Istnieje więc prawdopodobieństwo, że białko to może wpływać na liczne procesy zależne od aktywacji receptorów w błonie komórkowej. Ostatnie dane sugerują również prionowe właściwości ASN. Uwolniona w wyniku egzocytozy, lub procesu neurodegeneracji ASN łatwo przyjmuje konformację  $\beta$ -kartyki i może działać zewnątrzkomórkowo oraz przedostawać się do wnętrza zarówno neuronów jak i komórek glijowych na drodze dwóch mechanizmów zależnych od jej stężenia i stopnia agregacji. Jeśli ASN osiągnie odpowiednio wysokie stężenie wewnątrz neuronu, może dochodzić do powstawania toksycznych oligomerów, które mogą powodować obumieranie komórek. Odkrycie peptydu NAC jako drugiego, po A $\beta$  składnika blaszek starczych w chorobie Alzheimera wskazuje, że zarówno zewnątrzkomórkowy NAC jak i jego białko prekursorowe,  $\alpha$ -synukleina mogą mieć istotne znaczenie w procesie neurodegeneracji.

Dane ostatnich lat wskazują, że uwalnianie ASN do przestrzeni zewnątrzkomórkowej może stanowić kluczowy mechanizm odpowiedzialny za rozprzestrzenianie się i rozwój patologicznych zmian w mózgu (Desplats et al., 2009). W związku z tym poznanie zewnątrzkomórkowego działania ASN może przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmu jej działania i zaproponowania punktu uchwytu dla opracowania skuteczniejszej terapii chorób neurodegeneracyjnych.

Celem prezentowanej pracy było:

**Zbadanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za toksyczne działanie zewnątrzkomórkowej  $\alpha$ -synukleiny, ze szczególnym uwzględnieniem jej wpływu na procesy wolnorodnikowe i funkcję mitochondriów oraz na uwalnianie i toksyczność peptydów amyloidu beta.**

Cel ten został realizowany poprzez następujące zadania szczegółowe:

1. Zbadanie wpływu zewnątrzkomórkowej ASN w aktywacji stresu nitrozacyjnego i w mechanizmach uwalniania NO w skrawkach i we frakcji zakończeń synaptycznych kory z hipokampem mózgu szczura oraz w komórkach hipokampa HT22, z uwzględnieniem zmian w aktywności i ekspresji poszczególnych izoform syntazy tlenu azotu (NOS).

2. Zbadanie wpływu ASN i peptydu NAC działających zewnątrzkomórkowo na poziom wolnych rodników, w tym NO, oraz aktywność i poziom białka polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP), funkcję mitochondriów oraz mechanizm obumierania komórek dopaminergicznych PC12.

3. Zbadanie znaczenia ASN w uwalnianiu i toksyczności peptydów amyloidu beta w komórkach PC12 transfekowanych ludzkim genem dla białka prekursorowego amyloidu beta (APP).

4. Zbadanie działania wybranych związków o działaniu protekcyjnym w zapobieganiu toksyczności ASN i NAC.



# Materiały i metody

## *Zwierzęta doświadczalne*

Do doświadczeń używano dorosłych samców szczurów szczepu Wistar, w wieku 3 miesięcy i masie ciała około 250 g. Zwierzęta pochodziły z hodowli prowadzonej w IMDiK PAN, w Warszawie. Zwierzęta hodowano w warunkach stabilnej temperatury, wilgotności oraz wolnego dostępu do wody i pożywienia. Doświadczenia z udziałem zwierząt były wykonywane zgodnie z zasadami prawa etycznego, zgodnego z Konwencją Europejską na podstawie zezwolenia wydanego przez IV Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach, z siedzibą w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie.

### **Przygotowanie materiału do doświadczeń i analiz**

Zwierzęta dekapitowano, izolowano mózg, a następnie na schłodzonej do temperatury 4°C szalce Petriego preparowano półkule mózgowe w celu usunięcia opon, naczyń oraz istoty białej. Następnie izolowano korę mózgu, hipokamp i prążkowie.

### **Preparatyka skrawków**

Z wyizolowanych części mózgu (kora mózgu i hipokamp) otrzymano skrawki o wymiarach 0,35 x 0,35 mm na stoliku schłodzonym do temperatury 4°C przy użyciu aparatu Mc Illwaina. Następnie skrawki zawieszano w buforze Krebs-Henseleit (KRBS) o składzie: 120 mM NaCl; 5 mM KCl; 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>; 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25 mM NaHCO<sub>3</sub> i 10 mM glukoza, równoważonym karbogenem (mieszanina 95%O<sub>2</sub> i 5%CO<sub>2</sub>) do uzyskania pH 7,4 i używano do odpowiednich doświadczeń z udziałem ASN i peptydu NAC.

### **Przygotowanie homogenatu**

Wyizolowaną korę mózgową z hipokampem lub prążkowie dorosłych szczurów homogenizowano ręcznie w temperaturze 4°C w szklanym homogenizatorze Dounce'a (czternaście przesuwów tłoka, typ B) w medium izolacyjnym zawierającym 0,25 M sacharozę, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA,

1 mM DTT, inhibitory proteaz (Complete™) oraz 10 mM bufor Tris-HCl, pH 7,4. Otrzymany 10% homogenat używano do doświadczeń.

### **Preparatyka frakcji synaptozomalno-mitochondrialnej**

Frację synaptozomalną otrzymywano metodą flotacyjną, opisaną przez Morel i wsp. (1998). Wyizolowaną korę mózgową z hipokampem homogenizowano ręcznie w temperaturze 4°C, w medium izolacyjnym zawierającym 0,32 M sacharozę, 1 mM EDTA, oraz 10 mM bufor Tris-HCl pH 7,4. Homogenizację przeprowadzono w szklanym homogenizatorze Dounce'a, typ A (czternaście przesuwów tłoka). Otrzymany homogenat 10% wirowano dwukrotnie przez 10 min przy 1300 x g w temperaturze 4°C. Następnie osad (P1) odrzucano, a uzyskany nadsącz wirowano 17 min przy 17000 x g w temperaturze 4°C. Nadsącz odrzucano, a otrzymany osad stanowiący frakcję synaptozomalno- mitochondrialną używano do dalszych badań.

### ***Komórkowe modele badawcze***

Materiał do badań stanowiły hodowane *in vitro* unieśmiertelnione mysie komórki hipokampa (HT22) oraz komórki szczurzego guza chromochłonnego (Pheochromocytoza, PC12). Linie te, dzięki dużej stabilności fenotypu i praktycznie nieograniczonej zdolności proliferacji stanowią uznane modele w badaniach *in vitro*.

### **Immortalizowane mysie komórki hipokampa (HT22)**

Immortalizowane mysie komórki hipokampa HT22 uzyskano od Prof. Davida Schuberta z Salk Institute for Biological Studies, La Jolla. Komórki HT22 otrzymuje się z mysich neuronów hipokampa unieśmiertelnionych w wyniku inkubacji z onkogenem wrażliwym na temperaturę. W temperaturze 39°C działanie tegoż onkogeny zostaje wyeliminowane, a komórki zachowują charakterystyczne cechy zróżnicowanych neuronów (Frederiksen i McKay, 1988). Linia ta hodowana była w standardowej pożywce DMEM (Eagle'a) (Sigma) z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej (FCS) inaktywowanej w 56°C, zawierającej 2 mM glutaminę i antybiotyki (50 jednostek/ml penicyliny, 50 µg/ml streptomycyny). Hodowle prowadzono w sterylnych jednorazowych plastikowych szalkach lub płytkach

zawierających 24 dołki (Falcon), w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze nasyconej parą wodną i zawierającej 5% CO<sub>2</sub>.

### **Komórki pheochromocyoma (PC12)**

Komórki szczurzego guza chromochłonnego (pheochromocyoma, PC12) uzyskano z Zakładu Farmakologii Biocentrum Uniwersytetu w Frankfurcie nad Menem w Niemczech. Komórki te były stabilnie transfekowane ludzkim genem białka prekursorowego amyloidu  $\beta$  (APP) dzikiego typu (APPwt) lub z mutacją typu szwedzkiego (APPsw, K670M/N671L), a w przypadku komórek kontrolnych, samym wektorem. Transfekcję wykonano przy użyciu techniki FUGENE (Roche Diagnostics GmbH). Gen kodujący APP znajdował się pod kontrolą promotora CMV. Wektor zawierał również geny oporności na gentamycynę. W przypadku komórek PC12, taka transfekcja powoduje wzrost ekspresji białka prekursorowego APP ludzkiego i produkcji A $\beta$ , którego poziom jest podwyższony ok. 3-krotnie w komórkach APPwt i ok. 5-krotnie w komórkach APPsw (Chalimoniuk i wsp., 2007). Komórki APPwt, APPsw i kontrolne hodowane były w standardowej pożywce DMEM (Eagle'a) (Sigma) z dodatkiem inaktywowanych w 56°C surowic: 10% płodowej cielęcej (FBS) i 5% końskiej (HS), 2 mM glutaminy i antybiotyków (50 jednostek/ml penicyliny, 50  $\mu$ g/ml streptomycyny i 400  $\mu$ g/ml G418). Hodowle prowadzono w sterylnych jednorazowych plastikowych szalkach lub płytkach zawierających 24 dołki (Falcon), w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze nasyconej parą wodną i zawierającej 5% CO<sub>2</sub>.

Morfologię komórek w trakcie hodowli, a następnie po podaniu czynników farmakologicznych obserwowano w mikroskopie świetlnym Olympus CKX41.

Bank komórek przechowywano w stanie zamrożonym w temperaturze -80°C (do bieżącego użytku) oraz w ciekłym azocie (w celu dłuższego przechowywania), w pożywce o składzie: 50% FBS, 40% DMEM, 10% DMSO.

### **Zastosowane warunki doświadczalne**

Do momentu rozpoczęcia eksperymentu komórki pasażowano co 4 dni. Przy pasażowaniu komórek stosowano 0,25% roztwór trypsyny z 0,02% EDTA (Sigma). Do zaplanowanego doświadczenia komórki wysiewano z

gęstością 1-1,5 x 10<sup>6</sup> komórek na szalkę o średnicy 10 cm lub 0,5 x 10<sup>6</sup> komórek na szalkę o średnicy 3,5 cm lub 1 x 10<sup>5</sup> komórek do dołka na płytkach 24-dołkowych. W 24 godz. po wysianiu pożywki hodowlane wymieniano na pożywki zawierające 2% FCS oraz 2 mM glutaminę i antybiotyki w stężeniach takich jak w mediach hodowlanych. Następnie komórki traktowano badanymi związkami i inkubowano przez 4, 6, 8, 24, lub 48 h w 37°C. W celu farmakologicznej modyfikacji reakcji komórek na dodane czynniki do medium dodawano odpowiednie związki lub inhibitory.

### **Przygotowanie materiału do oznaczeń immunochemicznych**

Komórki na szalkach płukano dwukrotnie za pomocą PBS, zawieszano w buforze Tris-HCl o pH 7,4 zawierającym inhibitory proteaz Complete (Roche Diagnostics GmbH), zeskrobywano z szalek i sonifikowano. Tak przygotowany materiał przechowywano w -20°C i używano do oznaczeń immunochemicznych (Western Blot).

### **Otrzymywanie ekstraktu komórkowego**

Komórki hodowane na szalkach o średnicy 3,5 cm trzykrotnie płukano buforem PBS, zeskrobywano, a następnie zawieszano w 150µl buforu do lizy o składzie 50 mM HEPES, pH 7,4; 5 mM CHAPS, 5 mM DTT, homogenizowano strzykawką i inkubowano przez 20 minut w 4°C. Uzyskany w ten sposób homogenat odwirowywano przy 14000 x g przez 15 min. Uzyskany supernatant będący ekstraktem komórkowym przechowywano w -70°C i używano do oznaczeń aktywności kaspazy-3, natomiast osad wykorzystano do oznaczeń Western Blot.

### ***Przygotowanie $\alpha$ -synukleiny i peptydu NAC oraz ocena struktury drugorzędowej $\alpha$ -synukleiny***

#### **Przygotowanie $\alpha$ -synukleiny i peptydu NAC**

$\alpha$ -Synukleinę (ASN, rPeptide) i peptyd NAC (Sigma) rozpuszczano w wodzie dejonizowanej i bidestylowanej w stężeniu 100 µM i używano bezpośrednio do doświadczeń. Dodatkowo ASN rozpuszczano w buforze fosforanowym pH 7,5 i poddawano agregacji w temperaturze 37°C przez 14 dni.

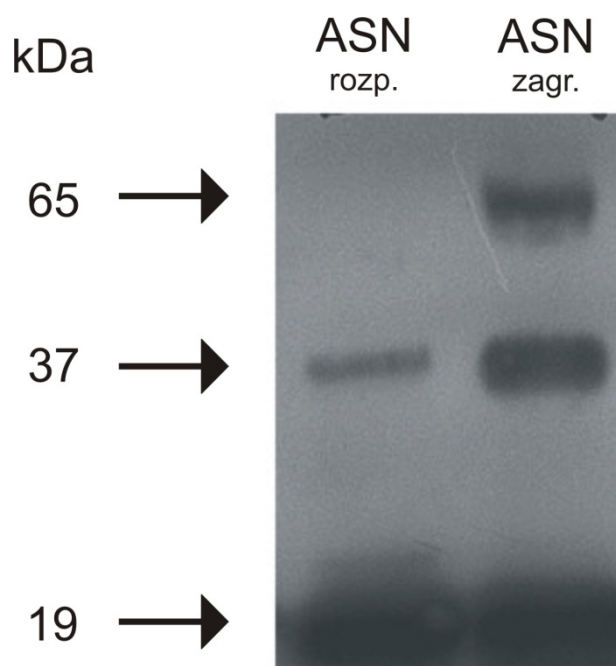


## Ocena agregacji $\alpha$ -synukleiny na podstawie elektroforezy w warunkach denaturujących i immunodetekcji metodą Western Blot

Rozdział elektroforetyczny  $\alpha$ -synukleiny w warunkach denaturujących prowadzono według metody Schäggera i von Jagowa (1987) używając aparatu do elektroforezy firmy BIO-RAD. Białka nie agregowane lub poddane agregacji mieszano z taką samą objętością buforu Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20 % glicerol, 2% SDS, 100 mM DTT oraz 0,2 mM błękit bromofenolu) i umieszczano na 5 min w bloku grzejnym w temperaturze 95°C. Po schłodzeniu, niewielką ilość próby zawierającą 5  $\mu$ g peptydu nanoszono do studzienek elektroforetycznych w żelu poliakrylamidowym i przeprowadzono elektroforezę. Używano żeli poliakrylamidowych o grubości 1 mm. Do rozdziału peptydów używano akrylamidu zawierającego 3% bis-akrylamid jako czynnik sieciujący. Żel rozdzielający zawierał 15% akrylamidu, 1 M Tris-HCl, pH 8,43 oraz 0,1 % SDS. Żel zagęszczający składał się z 4% akrylamidu, 0,1 % SDS oraz 0,74 M Tris-HCl, pH 6,8. Inicjację reakcji polimeryzacji uzyskiwano dodając nadsiarczan amonowy i TEMED (odpowiednio 33,3 mg i 33  $\mu$ l w przeliczeniu na 100 ml roztworu). Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 30 V przez jedną godzinę, a następnie przy napięciu 90V przez 2 godziny. Po elektroforezie białka przenoszono na błonę z polifluorku winylidenu (PVDF, Amersham Pharmacia Biotech). Po wykonaniu barwienia białek za pomocą roztworu PonceauS, membranę płukano w buforze fosforanowym z dodatkiem 0,1% Tween (PBS-T), a następnie inkubowano w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w 0,3% PBS-T w temperaturze pokojowej przez 1 godz. w celu zablokowania niespecyficznego wiązania się przeciwciał. Następnie błonę inkubowano przez noc w 4 °C w 1% roztworze BSA w 0,1% PBS-T zawierającym poliklonalne przeciwciało pierwszorzędowe przeciw  $\alpha$ -synukleinie (Sigma) w rozcieńczeniu 1:1000. Nadmiar przeciwciała odpłukiwano 3-krotnie przez 10 minut w PBS-T, a następnie błonę inkubowano 1 godz. w 1% roztworze BSA z 5% odtłuszczonym mlekiem w PBS-T zawierającym drugorzędowe przeciwciało anty-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową w rozcieńczeniu 1:8000. Niezwiązane specyficznie przeciwciało usuwano 3-krotnie płuczając błonę przez 10 min w PBS-T. Następnie błonę poddawano reakcji chemiluminescencyjnej przy użyciu

zestawu firmowego ECL (Amersham Pharmacia Biotech) i wizualizowano naświetlając światłoczuły film (Hyperfilm-Kodak, Sigma).

Analiza Western-Blot wykazała, że  $\alpha$ -synukleina niepoddana agregacji w większości pozostaje w formie monomerycznej (masa molekularna około 19 kDa), ale w niewielkim stopniu tworzy dimery o masie molekularnej 37 kDa.  $\alpha$ -Synukleina poddana agregacji częściowo pozostaje w formie monomerycznej, ale również tworzy dimery i oligomery o masie molekularnej ok. 65 kDa (**Rycina 15**).



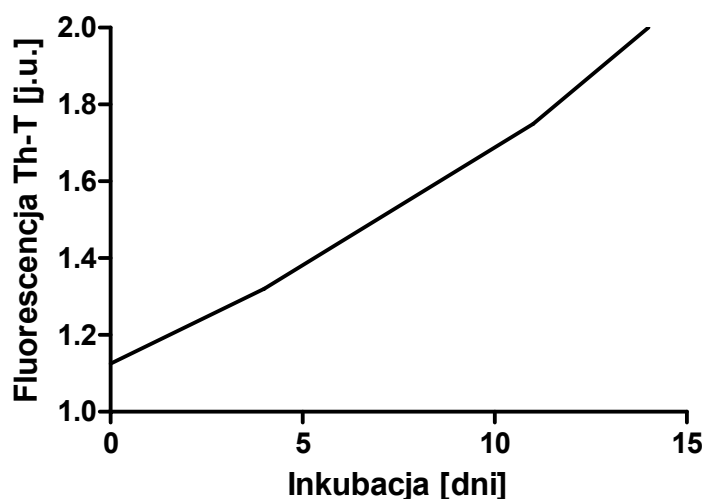
**Rycina 15** Analiza Western-Blot oligomerów  $\alpha$ -synukleiny.

$\alpha$ -synukleinę rozpuszczano w wodzie dejonizowanej lub PBS w stężeniu 100  $\mu$ M i poddawano „starzeniu” przez 14 dni w temperaturze 37°C. Do elektroforezy i immunodetekcji Western-Blot używano ASN bezpośrednio po rozpuszczeniu (ASNrozp.) lub poddanej 14-dniowej inkubacji (ASNzagr.).

W związku z tym w dalszej pracy w stosunku do  $\alpha$ -synukleiny poddanej agregacji używa się określenia „zagregowana”, natomiast białko niepoddane agregacji określa się jako „rozpuszczalne” bądź „niezagregowane”.

### Ocena fibrylizacji (agregacji) $\alpha$ -synukleiny przy użyciu tioflawiny-T

Spektrofluorymetrię z użyciem tioflawiny-T (Th-T) zastosowano do półilościowej oceny tworzenia włókien zawierających strukturę  $\beta$ -kartki przez  $\alpha$ -synukleinę i peptyd NAC. Badane peptydy poddawano agregacji w sposób opisany powyżej, po czym w odpowiednim przedziale czasowym 10  $\mu$ l roztworu tych peptydów dodawano do 3  $\mu$ M Th-T w końcowej objętości 300  $\mu$ l 50 mM buforu fosforanowego, pH 6,0. Pomiary fluorescencji Th-T wykonywano używając spektrofluorymetru LS 50 B (Perkin Elmer) przy długości fali światła pobudzającego 450 nm i długości fali światła emitowanego 482 nm. Fluorescencję Th-T badano przez 300 sek., a średnia wyników po 280 sek., 290 sek. i 300 sek. stanowiła końcowy wynik dla danej próbki. Każdą inkubację wykonywano w trzech powtórzeniach **(Rycina 16)**



Rycina 16 Oznaczanie stopnia fibrylizacji  $\alpha$ -synukleiny.

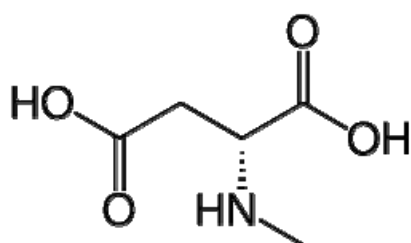
*$\alpha$ -synukleinę rozpuszczano w wodzie bidestylowanej i dejonizowanej lub PBS w stężeniu 100  $\mu$ M i poddawano „starzeniu” przez 14 dni w temperaturze 37°C w obecności Th-T. W wybranym punkcie czasowym 0, 4, 7, 11, 14 dni oznaczano fluorescencję tioflawiny wykazującą ilość włókien ASN.*

### Charakterystyka i wzory chemiczne stosowanych związków

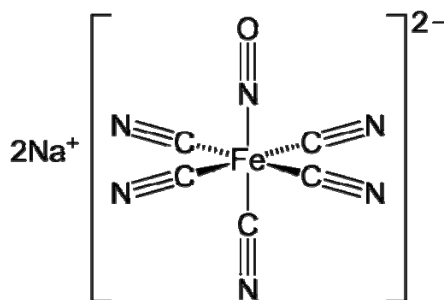
W prowadzonych badaniach stosowano następujące związki:

1.  $\alpha$ -synukleina (**ASN**, rPeptide) – zagregowana i niezagregowana. Stosowana w stężeniach **1, 5 i 10  $\mu$ M**

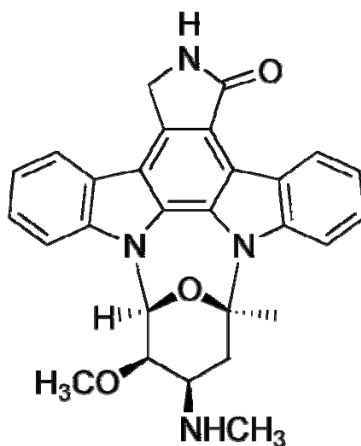
2. Peptyd **NAC** (Sigma) – niezagregowany (patrz: Rozdział III.2).  
Stosowany w stężeniach **1, 5 i 10  $\mu\text{M}$**
3. Kwas N-metylo-D-asparaginowy (**NMDA**, Sigma) - agonista receptora NMDA. Rozpuszczalny w wodzie, stosowany w stężeniu **100  $\mu\text{M}$** .
4. Nitroprusydek sodu (**SNP**, Sigma) – donor tlenku azotu. Rozpuszczalny w wodzie, stosowany w stężeniu **100  $\mu\text{M}$** .
5. Staurosporyna (**STS**, Sigma) – naturalny antybiotyk wyizolowany z bakterii *Streptomyces staurosporeus*. Efekty biologiczne staurosporyny wynikają z jej zdolności inhibicji kinaz białkowych, przez uniemożliwienie związania ATP przez białko enzymu. Stosowana *in vitro* w celu aktywacji apoptozy komórek. Rozpuszczalna w wodzie, stosowana w stężeniu **1  $\mu\text{M}$** .



**NMDA**



**SNP**



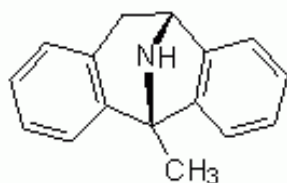
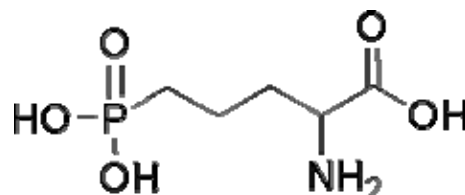
**Staurosporyna (STS)**

Rycina 17 Wzory chemiczne związków użytych w badaniach.

W celu modulowania odpowiedzi komórek na badane peptydy zastosowano następujące grupy związków:

1. Antagoniści receptora NMDA:

- a). Dizocilpina (maleinian (+)-5-metylo-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyklohepten-5,10-iminy, **MK-801**, Sigma) – niekompetycyjny antagonist receptor NMDA. Rozpuszczalny w wodzie, stosowany w stężeniu **10 μM**.
- b). Kwas DL-2-amino-5-fosfonowalerianowy (**APV**, Sigma) – selektywny, kompetycyjny antagonist receptor NMDA. Rozpuszczalny w wodzie, stosowany w stężeniu **10 μM**.

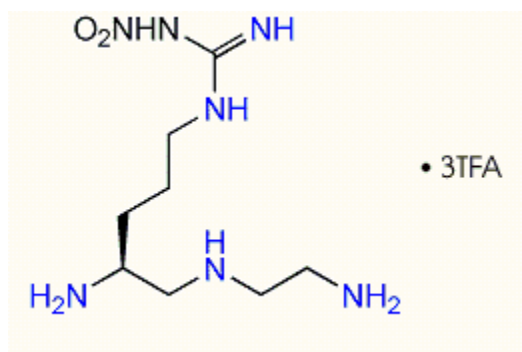
**MK-801**· C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>**APV**

Rycina 18 Wzory chemiczne antagonistów receptora NMDA użytych w badaniach.

## 2. Inhibitory syntazy tlenku azotu (NOS):

- a). 7-nitroindazol (**7-NI**, Sigma) - inhibitor neuronalnej izoformy NOS (K<sub>i</sub> = 710 nM). Słaby inhibitor indukowanej izoformy NOS (K<sub>i</sub> = 20 μM). Rozpuszczalny w wodzie, stosowany w stężeniu **10 μM**.
- b). N<sup>G</sup>nitro-L-arginina (**NNLA**, Sigma) – inhibitor konstytutywnych izoform NOS (K<sub>i</sub> = 25 nM dla nNOS; K<sub>i</sub> = 90 nM dla eNOS). Słabo hamuje również iNOS (K<sub>i</sub> = 8,1 mM). Rozpuszczalny w wodzie, stosowany w stężeniu **100 μM**.
- c). (4S)-N-(4-amino-5[aminoetylo]aminopentylo)-N'-nitroguanidyna (**NAAN**, Calbiochem) – selektywny inhibitor nNOS (K<sub>i</sub> = 120 nM). Rozpuszczalny w DMSO, stosowany w stężeniu **50 μM**.

**7-NI****NNLA**



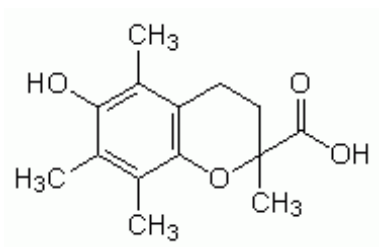
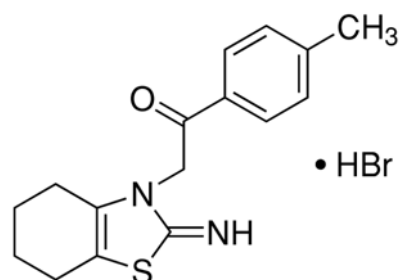
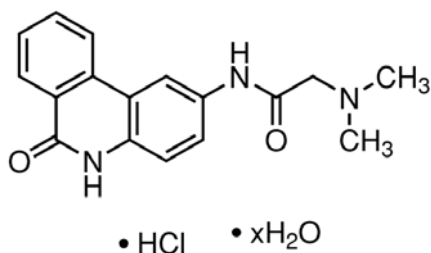
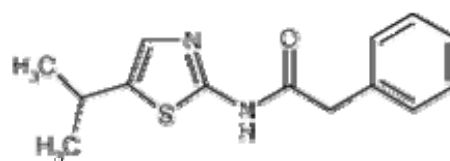
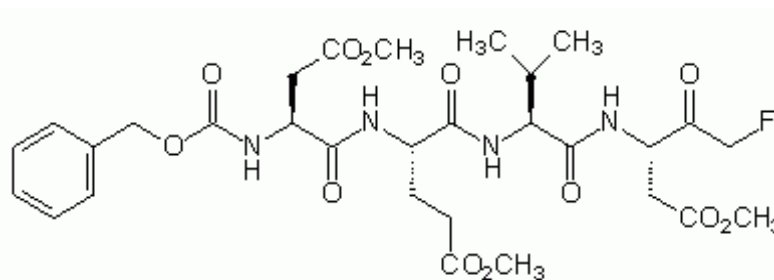
### NAAN

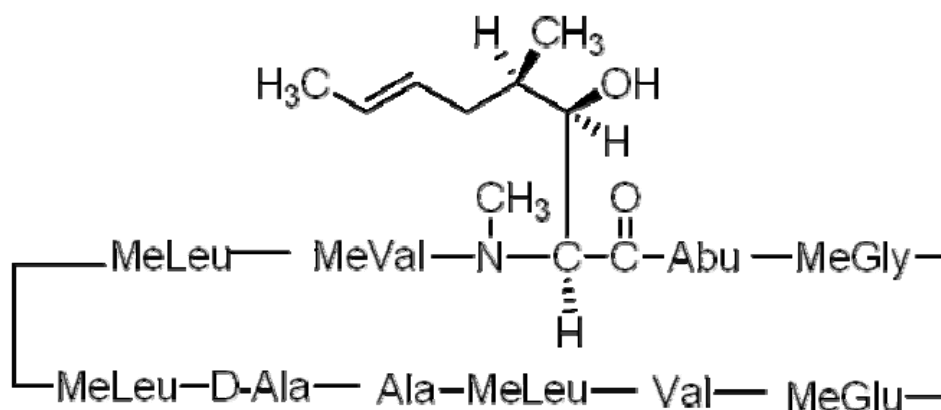
Rycina 19 Wzory chemiczne inhibitorów NOS użytych w badaniach.

3. kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochroman-2-karboksyłowy (**Trolox**), – pochodna witaminy E, silny zmiatacz wolnych rodników. Zapobiega stresowi oksydacyjnemu wywołanemu przez nadtlenoazotyn. Rozpuszczalny w etanolu, stosowany w stężeniu **1 mM**.
4. Keton Z-Asp(O-Me)-Glu(O-Me)-Val-Asp(O-Me)fluorometyłowy (**Z-DEVD-FMK**, Sigma) – nieodwracalny inhibitor kaspazy-3. Hamuje również niespecyficznie kaspazę 6, 7, 8 i 10. Rozpuszczalny w DMSO, stosowany w stężeniu **100 μM**.
5. **Cyklosporyna A** ((E)-14,17,26,32-tetrabutyl-5-etylo-8-(1-hydroksy-2-metyloheks-4-enylo) -1,3,9,12,15,18,20,23,27 - nonametylo-11,29-dipropyl-1,3,6,9,12,15,18,21,24,27,30 - undekaazacyklodotriakontan-2,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undekanon, Sigma) – związek o działaniu immunosupresyjnym, również bloker megakanałów mitochondrialnych. Rozpuszczalny w etanolu, stosowany w stężeniu **2 μM**.
6. **α-Pifithrin** (bromowodorek 2-(2-imino-4,5,6,7-tetrahydrobenzotiazol-3-yl)-1-p-toliloetanonu, Sigma) – specyficzny inhibitor białka p53 (Ki=2,2 nM). Rozpuszczalny w DMSO, stosowany w stężeniu **20 μM**.
7. Chlorowodorek N-(6-okso-5,6-dihydrofenantrydyn-2-yl)-(N,N-dimetylamino)acetamidu (**PJ-43**, Sigma) – silny, specyficzny inhibitor polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP; Ki=20 nM). W zakresie stężeń od 1 μM do 10 mM nie wykazuje działania

antyoksydacyjnego. Rozpuszczalny w wodzie, stosowany w stężeniu **20  $\mu\text{M}$** .

8. N-(5-Izopropylotiazol-2-yl)fenyloacetamid (**BML-259**, Biomol) - silny inhibitor Cdk5/p25 ( $K_i=64$  nM). Hamuje również Cdk2 ( $K_i=98$  nM). Rozpuszczalny w DMSO, stosowany w stężeniu **10  $\mu\text{M}$** .

**Trolox** **$\alpha$ -Pifithrin****PJ-34****BML-259****Z-DEVD-FMK**



### Cyklosporyna A

Rycina 20 Wzory chemiczne inhibitorów i antyoksydantów użytych w badaniach.

### *Metody radiochemiczne oznaczania aktywności enzymów*

#### **Oznaczanie aktywności polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP)**

Udział ASN i peptydu NAC w modulacji aktywności PARP-1 badano w homogenacie z kory mózgu i hipokampa oraz prądkowia zwierząt dorosłych. Homogenat inkubowano z badanymi peptydami przez 30 minut w łaźni wodnej w temperaturze 37°C. Po inkubacji oznaczano aktywność PARP przy użyciu radioaktywnego substratu [<sup>14</sup>C]dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD). Mieszanina reakcyjna w końcowej objętości 100 µl zawierała 200 µM (4 × 10<sup>5</sup> dpm) [Ade-U <sup>14</sup>C] NAD (specyficzna aktywność: 248mCi/mmol), 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT oraz 200 µg białka. Reakcję przeprowadzono przez 1 minutę w temperaturze 37°C. Reakcję zatrzymywano 0,8 ml 25% zimnego kwasu trójchlorooctowego (TCA). Następnie próby przesączano pod ciśnieniem stosując filtry Whatman GF/B i pięciokrotnie przepłukiwano 3 ml 5% TCA. Radioaktywność włączonej poli(ADP-rybozy) w białkach zatrzymanych na filtrach oznaczano w scyntylatorze Bray'a w liczniku scyntylacyjnym LKB Wallac 1409 stosując czas zliczania 5 minut.

#### **Przygotowanie materiału do oznaczenia aktywności syntazy tlenu azotu (NOS)**

Udział α-synukleiny, peptydu NAC oraz NMDA w modulacji aktywności NOS badano na skrawkach z kory mózgu i hipokampa zwierząt



dorosłych. Skrawki równoważono w buforze Krebs-Henseleit (KRBS) z 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, bez jonów Ca<sup>2+</sup> w środowisku karbogenu przez 90 minut w łaźni wodnej z wytrząsaniem o temperaturze 37°C w celu przywrócenia równowagi metabolicznej. Skrawki po stabilizacji były dwukrotnie przepłukiwane i zawieszono w buforze Krebs-Henseleit (KRBS) z 2 mM CaCl<sub>2</sub>, bez jonów Mg<sup>2+</sup>. Następnie skrawki inkubowano z badanymi związkami 30 min w 37°C. W eksperymentach z użyciem antagonistów receptora NMDA dodatkowo prowadzono 5 minutową pre-inkubację przed dodaniem badanych związków. Po inkubacji skrawki odwirowywano przy 1731 x g przez 10 min w 4°C, homogenizowano w zimnym buforze do lizy pH 7,2 (Tris-HCl 50 mM, sacharoza 320 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, inhibitory proteaz Complete).

W celu zbadania aktywności NOS w badanych liniach komórkowych, komórki wysiewano na szalki 3,5 cm. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z niską zawartością surowicy (2% FCS) i dodawano badane związki. Po 8h inkubacji komórki płukano trzykrotnie buforem PBS i homogenizowano w buforze do lizy identycznym jak w przypadku skrawków.

### **Oznaczanie aktywności syntazy tlenu azotu (NOS)**

Aktywność syntazy NO oznaczano poprzez pomiar radioaktywnej [<sup>14</sup>C]L-cytruliny powstającej w equi-molarnych ilościach z NO ze znakowanej [<sup>14</sup>C]L-argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę NO w obecności kofaktorów wg metody opisanej przez Bredta i Syndera (1990) i zmodyfikowanej przez Hekera i wsp. (1994).

Homogenat ze skrawków i komórek (300 µg białka) inkubowano w środowisku zawierającym 100 µM [<sup>14</sup>C]L-argininę [0,1µCi], 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM NADPH, 15 µM FAD, 10 µM tetrahydrobiopterynę (H<sub>4</sub>B), 1 µM kalmodulinę, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, w końcowej objętości 300 µl. Próby zerowe nie zawierały białka. Inkubację prowadzono przez 30 min w 37°C. W celu oznaczania aktywności poszczególnych izoform NOS w skrawkach mózgu szczura, po homogenizacji każdą próbę rozdzielano na 3 części i każdą z nich pre-inkubowano przez 5 min w innych warunkach:

- A). Inkubacja w buforze bez inhibitorów NOS w celu oznaczenia całkowitej aktywności enzymu
- B). Inkubacja w obecności 10  $\mu\text{M}$  7-nitroindazolu (7-NI) w celu zahamowania aktywności neuronalnej izoformy NOS (nNOS)
- C). Inkubacja w obecności 2 mM EGTA i 100  $\mu\text{M}$  N<sup>G</sup>nitro-L-argininy w buforze bez jonów Ca<sup>2+</sup> w celu zahamowania konstytutywnych izoform NOS (nNOS i eNOS)

Następnie reakcję przerywano przez dodanie 1 ml zimnego buforu 100 mM Tris-HCl z 10 mM EGTA, pH 5.5. Po odwirowaniu przy 3000 x g przez 10 min, nadsącz (0,5 ml) nanoszono na kolumnę zawierającą 0,5ml Dowex™ 50WX-8 (w formie Na<sup>+</sup>) i przemywany dwukrotnie 1 ml wody. Radioaktywność [<sup>14</sup>C]L-cytruliny w eluacie mierzono w scyntylicznej liczniku scyntylicyjnym LKB Wallac 1409 stosując czas zliczania 5 minut. Ilość powstającej radioaktywnej L-cytruliny w wyniku reakcji NOS-u obliczano w nmol/mg białka.

Aktywność poszczególnych izoform NOS obliczano poprzez odjęcie od siebie wyników dla poszczególnych wariantów eksperymentalnych A, B lub C. Sposób kalkulacji przedstawiono poniżej (Tabela 2):

**Tabela 2 Schemat obliczeń aktywności poszczególnych izoform NOS w skrawkach z mózgu szczura:**

Izoforma NOS	Metoda obliczenia aktywności
nNOS	A-B
eNOS	B-C
iNOS	C

### ***Metody spektrofotometryczne***

#### **Oznaczanie zawartości białka**

Zawartość białka w preparacie oznaczano metodą Lowry'ego przy użyciu fenolowego odczynnika Folina (Lowry i wsp., 1951).

#### **Analiza przeżywalności komórek za pomocą testu MTT**

Test MTT jest ilościowym kolorymetrycznym testem, który opiera się na fakcie, że tylko żywe, aktywne metabolicznie komórki, mogą

przekształcać w swoich mitochondriach sole tetrazoliowe (bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowego, MTT) o zabarwieniu żółtym do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu o zabarwieniu fioletowym. Powstałe kryształy rozpuszczane są w DMSO. Intensywność zabarwienia tak otrzymanego roztworu jest wprost proporcjonalna do ilości żywych komórek w badanym materiale. Komórki PC12 wysiewano na szalki 24-dołkowe pokryte polietylenoiminą. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z niską zawartością surowicy (2% FCS) i dodawano badane związki oraz odpowiednie inhibitory. Po 48 h pożywkę wymieniano ponownie na pożywkę pozbawioną surowicy, dodawano MTT (0,25 mg/ml) i inkubowano przez 2 h w 37°C. Następnie pożywkę usuwano, a komórki rozpuszczano w DMSO i mierzono absorbancję przy długości fali 595 nm.

### ***Metody spektrofluorymetryczne***

#### **Analiza poziomu wolnych rodników w cytozolu przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF**

Poziom wolnych rodników badano w oparciu o reakcję przekształcenia dwuocianu 2',7-dichlorodihydrofluoresceiny (H<sub>2</sub>DCF-DA), na skutek wewnątrzkomórkowej deacetylacji, do 2',7-dichlorodihydrofluorescyny (H<sub>2</sub>DCF), która następnie jest utleniana przez wolne rodniki do fluorescencyjnej 2',7-dichlorofluoresceiny (DCF). Test ten pozwala analizować wewnątrzkomórkowy poziom wolnych rodników tlenowych (Royall i Ischiropoulos, 1993).

Świeżo wyizolowane synaptoneurozomy były inkubowane z badanymi związkami w obecności H<sub>2</sub>DCF-DA (15 μM) w buforze Locke'a pH 7,2 (NaCl, 154 mM; KCl, 5,6 mM; CaCl<sub>2</sub>, 2,3 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1,0 mM; NaHCO<sub>3</sub>, 3,6 mM; Hepes, 5 mM; glukoza, 5 mM) przez 30 min., w 37°C w ciemności. Następnie mieszaninę inkubacyjną wirowano przy 14000 obr./min przez 5 min. i ponownie zawieszano w buforze Locke'a. Synaptosomy inkubowano w obecności α-synukleiny oraz NAC w końcowej objętości 200 μl przez 30min., w atmosferze karbogenu, w 37°C, w ciemności. Fluorescencję DCF oznaczano przed i po inkubacji przy użyciu spektrofluorymetru LS-50B, przy długości fali pobudzającej 488nm i emitowanej 530nm .

Komórki PC12 wysiewano na szalki 24-dołkowe pokryte polietylenoiminą. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z niską

zawartością surowicy (2% FCS) i dodawano badane związki. Po 4 h inkubacji do pożywki dodawano 10 $\mu$ M H<sub>2</sub>DCF-DA (Sigma) i inkubowano przez 50 min w 37°C. Następnie komórki płukano trzykrotnie buforem PBS. Fluorescencję DCF mierzono przy użyciu spektrofluorymetru Perkin Elmer LS 50B przy długości fali pobudzenia 488 nm i emisji 525 nm. Wynik wyrażono jako intensywność fluorescencji.

### **Badanie aktywności kaspazy-3**

Aktywność kaspazy-3 analizowano metodą fluorymetryczną z użyciem zestawu CASP-3-F firmy Sigma. Metoda wykorzystuje pseudosubstrat acetylo-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metylokuumarynę (Ac-DEVD-AMC; odwzorowujący miejsce cięcia w PARP: Asp-Glu-Val-Asp) i specyficzny inhibitor kaspazy-3 (Ac-DEVD-CHO). Frakcję cytozolową z komórek (około 300  $\mu$ g białka) inkubowano 120 min. w obecności Ac-DEVD-AMC (16,66  $\mu$ M) w roztworze zawierającym 5 mM DTT, 2 mM EDTA, 0,1 % CHAPS, 20 mM HEPES pH 7,4 w temperaturze pokojowej. Równolegle z próbą badaną wykonywano oznaczenie w obecności inhibitora kaspazy 3 (Ac-DEVD-CHO; 2  $\mu$ M). Pomiar stężenia fluorescencyjnego produktu uwolnionego w wyniku reakcji katalizowanej przez kaspazę 3 (7-amido-4-metylokuumaryna) przeprowadzono po zakończonej inkubacji za pomocą spektrofluorymetru Perkin-Elmer LS50B przy długości fali pobudzającej Ex: 360 nm i emitowanej Em: 460 nm. Aktywność kaspazy 3 wyliczano na podstawie krzywej wzorcowej AMC.

## ***Metody immunochemiczne***

### **Immunochemiczna detekcja białek metodą Western Blot**

Immunochemiczną metodą Western Blot oznaczano poziom białka PARP, Bid oraz  $\beta$ -aktyny. Homogenat lub zgrubną frakcję jądrowo-mitochondrialną (40  $\mu$ g białka) mieszano z buforem denaturująco-obciążającym Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20 % glicerol, 2% SDS, 100 mM DTT oraz 0,2 mM błękit bromofenolu). Próbki następnie ogrzewano przez 5 min w temp. 95°C. Białka rozdzielano na żelu poliakrylamidowym i przenoszono na błonę z polifluorku winylidenu (PVDF, Amersham Pharmacia Biotech). Po wykonaniu barwienia białek za pomocą roztworu Ponceau S, membranę płukano w odpowiednim buforze, a następnie inkubowano w roztworze odtłuszczonego mleka lub BSA (Sigma) w

temperaturze pokojowej przez 60 min w celu zablokowania niespecyficznego wiązania się przeciwciał (szczegółowe warunki reakcji dla poszczególnych białek podano w Tabeli 3). Następnie błonę inkubowano przez noc w 4 °C w roztworze zawierającym odpowiednie przeciwciało pierwszorzędowe. Nadmiar przeciwciała odpłukiwano 3-krotnie przez 10 minut w odpowiednim buforze, a następnie błonę inkubowano 1 godz. w roztworze drugorzędowego przeciwciała sprzężonego z peroksydazą chrzanową. Niezwiązane specyficznie przeciwciała usuwano 3-krotnie płuczając błony przez 10 min w odpowiednim buforze. Następnie błonę poddawano reakcji chemiluminescencyjnej przy użyciu zestawu firmowego ECL (Amersham Pharmacia Biotech) i wizualizowano naświetlając światłoczuły film (Hyperfilm-Kodak, Sigma). Klisze poddawano analizie densytometrycznej przy pomocy oprogramowania TotalLab v1.11 (Non Linear Dynamics). Błony wykorzystane uprzednio inkubowano 30 min. w roztworze 1% SDS i 50 mM glicyny-HCl o pH 2,0 w celu usunięcia związanych przeciwciał i płukano 3 x 15 min w TBS-Tween, po czym używano do kolejnych oznaczeń immunochemicznych.

**Tabela 3** Warunki reakcji immunochemicznej dla poszczególnych oznaczeń.

Oznaczone białko	Gęstość żelu	Bufor	Blokowanie	Przeciwciało 1-rzędowe		Przeciwciało 2-rzędowe
PARP-1	7,5%	PBS-Tween	1% BSA	Mysie, monoklonalne, przeciw PARP-1 (C-2-10), Sigma P248	1:500 w 0,5% BSA w PBS-Tween	Antymysie Amersham Pharmacia Biotech NA931V 1:2500
β-aktyna	7,5% lub 10%	TBS-Tween	5% mleko odtłuszczone	Mysie, monoklonalne (C4), MP Biomedicals, 69100	1:400 w 0,1% BSA w PBS-Tween	Antymysie Amersham Pharmacia Biotech NA931V 1:1000

**TBS-Tween** – bufor Tris o składzie 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,6; **PBS-Tween** – bufor fosforanowy o składzie 140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Tween-20 0,1%, pH 7,4; **BSA** - albumina z surowicy bydłowej, wolna od kwasów tłuszczowych

### **Oznaczenie poziomu amyloidu beta 1-40 przy użyciu metody ELISA**

Komórki hodowano na szalkach 35-mm, a następnie poddawano działaniu  $\alpha$ -synukleiny lub peptydu NAC. Po upływie 48-godzin medium komórkowe zostało przeniesione do probówek i odwirowane 10000 x g przez 5 min. Stężenie A $\beta$  1-40 w medium komórkowym oznaczano metodą ELISA z użyciem odpowiedniego zestawu (The Genetics Company) zgodnie z zaleceniami producenta. A $\beta$  1-40 wiąże się z przeciwciałem umieszczonym na płytce, które selektywnie rozpoznaje i wiąże N-koniec peptydu A $\beta$  1-40. Powstały koniugat jest następnie związany przez kompleks Biotyna-Streptawidyna-Enzym. W końcowym etapie reakcji ELISA związany enzym przeprowadza bezbarwny substrat w kolorowy produkt, którego absorbancję mierzono w ciągu 30 min za pomocą czytnika mikroplitek Bio-rad 3550-UV przy długości fali 450 nm. Stężenie A $\beta$  wyrażone w pg/ml wyliczano na podstawie krzywej wzorcowej sporządzonej z syntetycznego A $\beta$ .

### **Oznaczenie poziomu ciętego PARP (Asp214) przy użyciu testu ELISA**

Komórki hodowano na szalkach o średnicy 35-mm, a następnie poddawano działaniu  $\alpha$ -synukleiny. Po upływie 24-godzin komórki płukano buforem PBS a następnie zawieszano w 150 $\mu$ l buforu do lizy o składzie 20 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% Triton-X-100, 2,5 mM pirofosforan sodu, 1 mM fosforan  $\beta$ -glicerolu, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ g/ml leupeptyna (Cell Signalling) i inkubowano przez 5 min w 4°C. Uzyskaną w ten sposób zawiesinę zeskrobywano, sonifikowano i odwirowywano z prędkością 1000 x g przez 10 min.

Stężenie 89-kDa fragmentu PARP (Asp 214) w uzyskanym nadsączu oznaczano metodą ELISA z użyciem odpowiedniego zestawu (Cell Signalling) zgodnie z zaleceniami producenta. Fragment ten wiąże się z przeciwciałem umieszczonym na płytce, które je selektywnie rozpoznaje. Powstały koniugat jest związany przez specyficzne p-ciało pierwszorzędowe, a powstały kompleks jest następnie łączony z drugorzędowym przeciwciałem sprzężonym z peroksydazą chrzanową. W końcowym etapie reakcji ELISA związany enzym przeprowadza bezbarwny substrat w kolorowy produkt, którego absorbancję mierzono w ciągu 30 min za pomocą czytnika mikroplitek Bio-rad 3550-UV przy długości fali 450 nm. Stężenie 85-kDa PARP wyrażono w procentach kontroli.

## ***Analiza ekspresji genów***

### **Izolacja RNA**

Całkowite RNA izolowano z komórek w warunkach sterylnych, zmodyfikowaną metodą Chomczyńskiego i Sacchi (1987), używając odczynnika TRI-reagent (Sigma). Komórki rosnące na szalkach o średnicy 35 mm płukano dwukrotnie buforem PBS, a następnie zawieszano w 1 ml odczynnika TRI-reagent i odstawiano na 5 minut. Następnie, do 1 ml homogenatu dodawano 200  $\mu$ l chloroformu, energicznie mieszano przez 15 sek., pozostawiano na 15 min w temperaturze pokojowej i wirowano przy obrotach 12000 g przez 10 min w 4°C. Górną fazę wodną zawierającą RNA przenoszono do nowej probówki, dodawano 500  $\mu$ l zimnego izopropanolu, delikatnie mieszano, pozostawiano na 5 min w temperaturze pokojowej i wirowano przez 10 min przy obrotach 12000 g w 4°C. Osad przemywano trzykrotnie 1 ml 75% etanolu. Po kilkuminutowym odparowaniu etanolu z próbek, osad RNA zawieszano w 30  $\mu$ l wody pozbawionej RNAz (Promega Corporation). Następnie mierzono ilość otrzymanego RNA metodą spektrofotometryczną przy długości fali 260 nm, oraz zanieczyszczenie RNA białkami i DNA przy długości fali 280 nm. Stosunek OD260/OD280 wynosił od 1,7 do 2,0. Ilość RNA oznaczano w aparacie spektrofotometrycznym NanoDrop.

W celu oczyszczenia wyizolowanego wcześniej mRNA z pozostałości DNA komórkowego do probówek 1,5 ml przenoszono 5  $\mu$ g mRNA i uzupełniano odczynnikami do trawienia DNA firmy Promega Corporation do 10  $\mu$ l. Po przygotowaniu mieszaninę reakcyjną inkubowano 15 min w RT. Następnie dodano 1  $\mu$ l Stop solution i dalej prowadzono inkubację przez 10 min w 70°C. Po zakończeniu reakcji próbki przenoszono do lodu.

### **Reakcja odwrotnej transkrypcji**

Całkowite wyizolowane RNA (1  $\mu$ g) było matrycą dla działania odwrotnej transkryptazy. W reakcji odwrotnej transkrypcji otrzymywano DNA komplementarne (cDNA) do mRNA. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano w 42°C przez 15 min przy użyciu zestawu odczynników firmy Promega Corporation, w końcowej objętości 20  $\mu$ l. W celu inaktywacji odwrotnej transkryptazy, po zakończeniu reakcji, mieszaninę reakcyjną

inkubowano przez 5 min w 90°C, a następnie schładzano przez 5 min w lodzie.

### **Reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction, PCR*)**

Uzyskane cDNA (1µg) amplifikowano metodą PCR używając starterów dla eNOS, iNOS i nNOS wykonanych przez firmę Oligo.pl według sekwencji komplementarnych do sekwencji uzyskanych z badań poprzednich zespołów. Jednocześnie analizowano poziom mRNA kodującego konstytutywne białko β-aktyne. Mieszanina do wielokrotnego powielania sekwencji DNA (mieszanina PCR) zawierała następujące składniki: 20 µl Taq PCR Master MIX Kit (Qiagen, Valencia CA); 1 µg cDNA oraz 20 pmoli każdego ze starterów:

- 1) nNOS (powielają fragment 400 par zasad) (De Sanctis i wsp., 1997):
  - 5'-CCTTAGAGAATAAGGAAGGGGGCGGG-3'
  - 5'-GGGCCGATCATTGACGGCGAGAATGATG-3';
- 2) eNOS (powielają fragment 260 par zasad) (Strosznajder i wsp., 2004):
  - 5'- GGGCTCCCTCCTTCCGGCTGC-3'
  - 5'- GGATCCCTGGAAAAGGCG-3'
- 3) iNOS (powielają fragment 370 par zasad) (Baylis i wsp., 1999):
  - 5'-GCCTCATGCCATTGAGTTCATCAACC-3'
  - 5'-GAGCTGTGAATTCCAGAGCCTGAAG-3'
- 4) β-aktyna (powielają fragment 350 par zasad) (Song i wsp., 1999):
  - 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'
  - 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

Każdą próbkę uzupełniano wodą do objętości 50 µl. Próbki cDNA z mieszaniną PCR były inkubowane w aparacie GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) w następujących warunkach: wstępna denaturacja (5 min, 94°C, 1 cykl), denaturacja (1 min, 94°C), asocjacja starterów (2 min, 60°C) i wydłużanie łańcucha (3min, 72°C) 35 cykli i faza końcowego wydłużania łańcucha (7 min, 72°C). Produkty PCR (10 µl) poddawano elektroforezie w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydy w buforze TBE (45mM Tris-boran, 0,1 mM EDTA) przy natężeniu 100V. Poziom ekspresji genu badano w



odniesieniu do ekspresji genu kodującego białko  $\beta$ -aktyny. Obraz zapisywano przy użyciu systemu Nucleovision firmy Nucleotech, zaś analizę densytometryczną prążków przeprowadzano przy pomocy programu GelExpert 4.0.

### **Real-time PCR**

Zmiany poziomu mRNA genów kodujących białka p53, Cdk-5, p35 oraz p39 analizowano za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*). Na matrycy cDNA uzyskanej z 1  $\mu$ g RNA przeprowadzono reakcję PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu odpowiednich sond Taq-Man (Applied Biosystems). Zastosowano następujące warunki reakcji: (94°C-30 s, 63°C – 30 sek, 72°C – 45 sek.) x 40 cykli amplifikacji. Każdą próbkę cDNA amplifikowano w trzech powtórzeniach. Poziom mRNA wyrażano jako względny stosunek próbki badanej do próbki referencyjnej (kalibratora), po uprzedniej normalizacji obydwu względem genu referencyjnego (ACTB).

Real-time PCR wykonywano przy pomocy aparatu ABI PRISM 7500 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems). Wyniki analizy przedstawiono jako % kontroli.

### ***Oznaczanie apoptozy komórek in vitro metodą mikroskopii fluorescencyjnej.***

Apoptozę wykrywano przy użyciu barwnika fluorescencyjnego Hoechst 33342 (Sigma). Barwienie jąder komórkowych za pomocą tego barwnika pozwala na wizualizację kondensacji i agregacji DNA charakterystycznych dla apoptozy. Komórki wysiewano na szalki o średnicy 35 mm pokryte polietylenoiminą. Po inkubacji z badanymi związkami komórki płukano zimnym buforem PBS, a następnie pozostawiano w metanolu na 30 min. w -20°C. Barwienie wykonywano poprzez inkubację z barwnikiem Hoechst 33342 o stężeniu 1 ng/ml w buforze fosforanowym przez 30 min w temperaturze pokojowej. Następnie komórki płukano w buforze PBS. Wybarwione jądra analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym Olympus IX71 i fotografowano z użyciem kamery cyfrowej Olympus U-CMAD3 zintegrowanej z mikroskopem przy długości fali pobudzającej Ex: 340 nm i emitowanej Em: 510 nm przy użyciu 40-krotnego powiększenia.

### ***Statystyczne opracowanie wyników***

Każde oznaczenie wykonywano w co najmniej trzech powtórzeniach. Za ostateczny wynik przyjmowano wartość średnią  $\pm$  błąd standardowy średniej (SEM) obliczone z indywidualnych pomiarów (średnich z powtórzeń). W celu ustalenia wiarygodności zaistniałych różnic w badaniach porównawczych, wartości z poszczególnych eksperymentów weryfikowano jednoczynnikową bądź wieloczynnikową analizą wariancji (ANOVA) z użyciem testów post-hoc Bonferroniego lub Newmana-Keulsa. Wyniki uznawano za znamienne statystycznie przy poziomie istotności  $p$  poniżej 0,05.

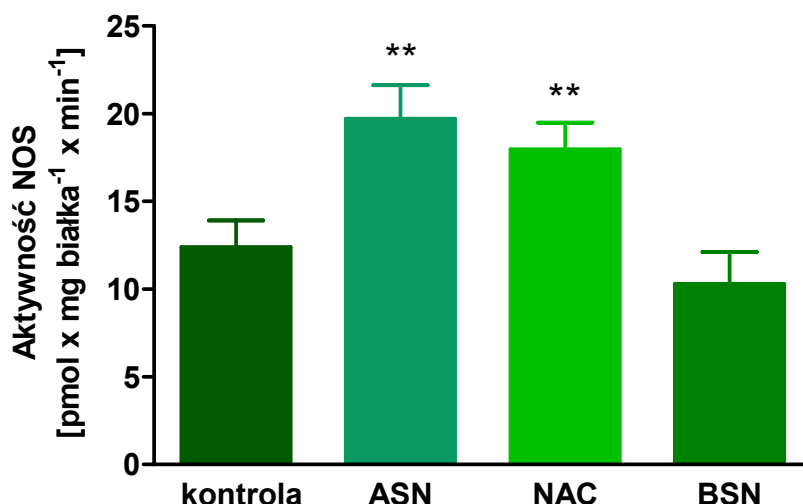
# WYNIKI

## *Badanie wpływu zewnątrzkomórkowej $\alpha$ -synukleiny i peptydu NAC w procesach uwalniania NO oraz modulacji aktywności PARP-1 w wybranych częściach mózgu szczura w warunkach in vitro*

### **Badanie udziału receptora NMDA w zależnej od ASN i NAC aktywacji NOS**

Prowadzone badania miały na celu określenie roli zewnątrzkomórkowej ASN i peptydu NAC w zależnej od receptora NMDA aktywacji syntazy tlenku azotu (NOS). Zbadano wpływ ASN i NAC na proces uwalniania tlenku azotu (NO) w mózgu w wyniku aktywacji poszczególnych izoform NOS: nNOS, eNOS, iNOS. Ponadto analizowano zależną od NO modulację aktywności PARP-1, jądrowego odbiorcy sygnału. Badania prowadzono na skrawkach izolowanych z kory mózgowej wraz z hipokampem dorosłych szczurów Wistar. Zastosowanie powyższego modelu badawczego umożliwia badanie znaczenia receptora NMDA w uwalnianiu NO przez zewnątrzkomórkową  $\alpha$ -synukleinę i NAC.

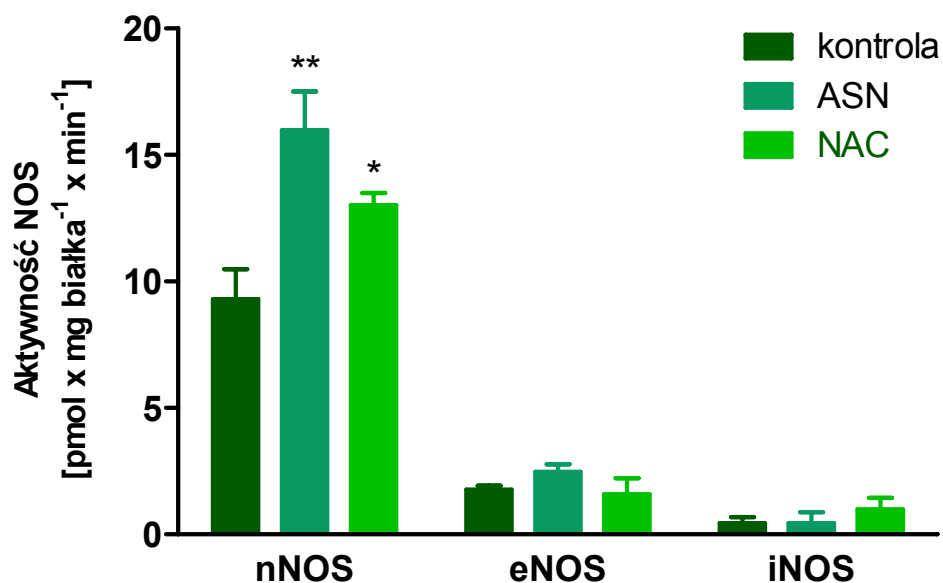
W pierwszej kolejności zbadano wpływ zewnątrzkomórkowej ASN (10  $\mu$ M) i peptydu NAC (10  $\mu$ M) na całkowitą aktywność NOS. Aktywność tę badano w skrawkach otrzymywanych z kory z hipokampem mózgu szczura metodą radiochemiczną z użyciem znakowanej [ $^{14}$ C]L-argininy. Otrzymane wyniki wskazują, że w trakcie 30-minutowego działania, zarówno ASN, jak i jej toksyczny fragment NAC znacząco stymulują aktywność NOS (**Rycina 21**).  $\beta$ -synukleina (BSN, 10  $\mu$ M), izoforma nieposiadająca regionu NAC, pozostała bez wpływu na aktywność NOS. Wyniki te wskazują, że efekt działania na aktywność NOS jest zależny od obecności domeny NAC w strukturze białka (**Rycina 21**).



**Rycina 21** Wpływ  $\alpha$ -synukleiny (ASN),  $\beta$ -synukleiny (BSN) oraz peptydu NAC na aktywność syntazy tlenu azotu.

Skrawki kory z hipokampem mózgu szczura po 30-minutowej inkubacji z ASN, BSN, NAC (każdy w stężeniu 10  $\mu$ M) homogenizowano i w uzyskanych homogenatach mierzono aktywność NOS. Wyniki wyrażono w pmol/mg białka/min. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z pięciu niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach  $\pm$  SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Bonferroni. \*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli  $p < 0,01$ .

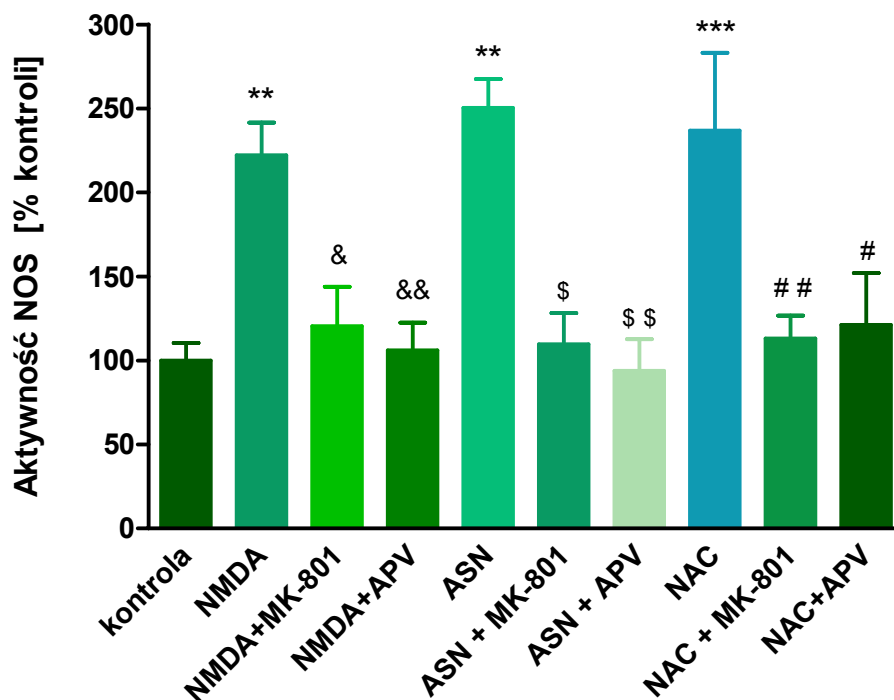
Następnie badano wpływ  $\alpha$ -synukleiny i NAC na aktywność poszczególnych izoform NOS przy użyciu specyficznych inhibitorów. Sposób przeprowadzenia pomiaru i kalkulacja zostały przedstawione w rozdziale Materiały i Metody. Wykazano, że ASN i NAC wpływały wyłącznie na aktywność konstytutywnej, neuronalnej izoformy NOS (nNOS), natomiast nie miały wpływu na izoformę śródbłonkową (ang. *endothelial NOS*, eNOS), ani na izoformę indukowaną (iNOS). ASN i NAC stymulowały nNOS odpowiednio o 70% i 40% (**Rycina 22**).



**Rycina 22** Wpływ ASN oraz NAC na aktywność poszczególnych izoform NOS.

Skrawki kory z hipokampem mózgu szczura po 30-minutowej inkubacji z ASN, BSN, NAC (każdy w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ ) homogenizowano i w uzyskanych homogenatach mierzono aktywność NOS. Wyniki wyrażono w pmol/mg białka/min. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach  $\pm$  SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Bonferroni. \*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli  $p < 0,01$ ; \* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli  $p < 0,05$ .

W związku z tym, że główna pula nNOS w komórce związana jest fizycznie i funkcjonalnie z receptorem NMDA, w następnej kolejności badano znaczenie tego receptora w aktywacji nNOS wywołanej przez ASN i NAC. Zastosowanie dwóch antagonistów receptora NMDA: niekompetycyjnego MK-801 i kompetycyjnego APV, zapobiegało aktywacji NOS wywołanej przez ASN i NAC (**Rycina 23**). Efekt  $\alpha$ -synukleiny i NAC porównano z działaniem kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDA). Uzyskane wyniki wskazują, że pobudzenie receptora NMDA jest odpowiedzialne za aktywację NOS przez  $\alpha$ -synukleinę i NAC.



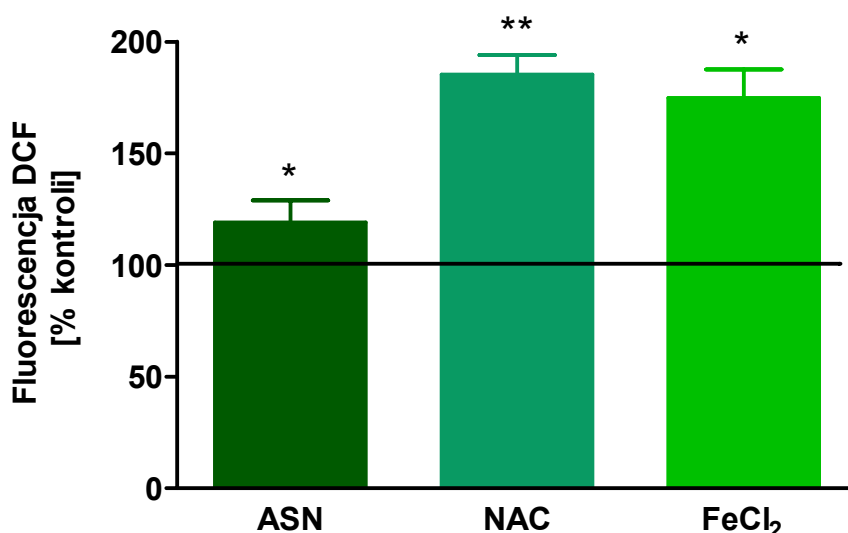
Rycina 23 Udział receptora NMDA w zależnej od ASN i NAC aktywacji NOS.

Skrawki kory z hipokampem mózgu szczura po 30-minutowej inkubacji z ASN, BSN, NAC (każdy w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ ) lub NMDA (100 $\mu\text{M}$ ) oraz jednym z wybranych antagonistów receptora NMDA: MK-801 10  $\mu\text{M}$  lub APV 10  $\mu\text{M}$  homogenizowano i w uzyskanych homogenatach mierzono aktywność NOS. Wyniki wyrażono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z trzech do ośmiu niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach  $\pm$  SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Bonferroni. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli; &  $p < 0,05$ , &&  $p < 0,01$  - Różnica istotna statystycznie w stosunku do NMDA; \$  $p < 0,05$ , \$\$  $p < 0,01$  - Różnica istotna statystycznie w stosunku do ASN; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  - Różnica istotna statystycznie w stosunku do NAC.

### **Badanie indukcji stresu oksydacyjnego i modulacji aktywności PARP-1 przez ASN i NAC**

NO jest słabym wolnym rodnikiem, ale może wchodzić w reakcję z anionem ponadtlenkowym, co prowadzi do wytworzenia nadtlenoazotynu, który wykazuje silne właściwości pooksydacyjne i prowadzi do aktywacji kaskady wolnorodnikowej. Zdolność  $\alpha$ -synukleiny i NAC do indukcji stresu oksydacyjnego badano we frakcji synaptozomalnej otrzymywanej z kory i hipokampa mózgu szczura. Poziom wolnych rodników badano poprzez pomiar utleniania sondy dichlorodihydrofluoresceiny ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ). Stwierdzono, że po 30-minutowej inkubacji zewnątrzkomórkowa  $\alpha$ -synukleina (ASN, 10  $\mu\text{M}$ ) powoduje 20% wzrost poziomu wolnych

rodników, natomiast 10  $\mu\text{M}$  peptyd NAC stymuluje produkcję wolnych rodników aż o 80% (**Rycina 24**). Efekt wywołany działaniem NAC jest nawet silniejszy niż spowodowany przez 250 $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_2$ , związek utleniający powszechnie używany w badaniach *in vitro* w celu indukcji stresu oksydacyjnego.



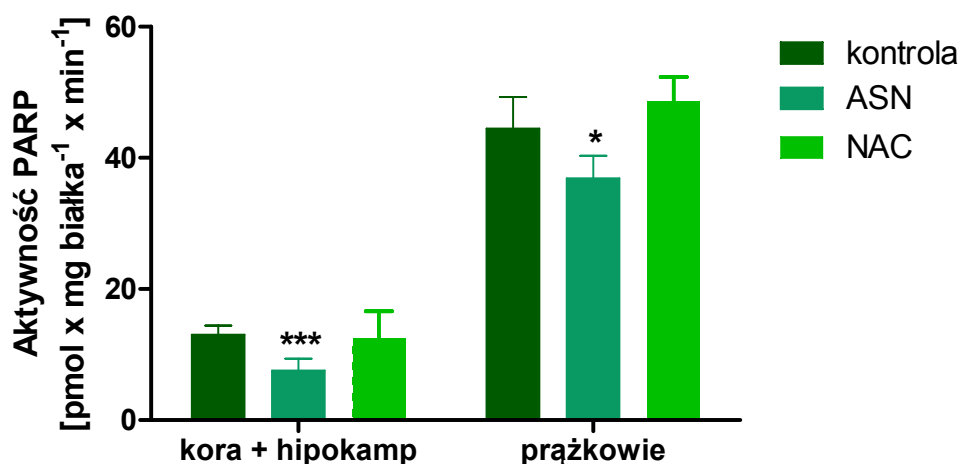
**Rycina 24** Poziom wolnych rodników w synaptosomach poddanych działaniu ASN, NAC i  $\text{FeCl}_2$ .

*Frakcję synaptosomalną izolowaną z kory z hipokampem mózgu szczura poddano 30-minutowej inkubacji z ASN, NAC (każdy w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ ). Poziom wolnych rodników oznaczano metodą fluorymetryczną z zastosowaniem DCF. Wyniki wyrażono jako procent kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń  $\pm$  SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Bonferroni. \*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli  $p < 0,01$ ; \* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli  $p < 0,05$ .*

Indukcja stresu oksydacyjnego i zwiększenie syntezy NO prowadzić może do utlenienia makrocząsteczek, uszkodzenia mitochondriów i DNA oraz do zmian aktywności jądrowego enzymu PARP-1.

W związku z indukcją przez  $\alpha$ -synukleinę stresu oksydacyjnego w mózgu szczura, w dalszym etapie badań analizowano wpływ tego białka na aktywność polimerazy poli(ADP-rybozy). Aktywność tę badano w homogenacie otrzymanym z kory z hipokampem oraz prądkowia mózgu szczura metodą radiochemiczną z użyciem radioaktywnego substratu [ $^{14}\text{C}$ ]

dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD). ASN powodowała około 30% spadek aktywności PARP-1 w badanych częściach mózgu (**Rycina 25**). Wstępne badania z użyciem NAC wykazały natomiast, że peptyd ten nie wywiera wpływu na aktywność PARP-1 zarówno w korze z hipokampem, jak i prążkowie. Wyniki te wskazują, że NAC nie zawsze aktywuje te same molekularne mechanizmy, co ASN.

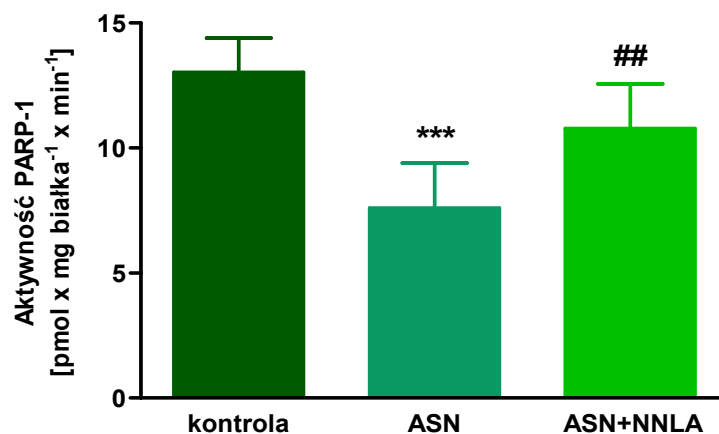


**Rycina 25** Wpływ ASN i NAC na aktywność PARP-1.

Aktywność PARP mierzono w homogenacie kory z hipokampem oraz prążkowie mózgu szczura po 30-minutowej inkubacji z ASN lub NAC (każdy w stężeniu 10  $\mu$ M). Wyniki wyrażono w pmol/mg białka/min. Wyniki badań stanowią średnią arytmetyczną z 2-4 niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach  $\pm$  SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Bonferroni. \*\*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli  $p < 0,001$ ; \* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli  $p < 0,05$ .

W celu zbadania udziału NO w modulacji aktywności białka PARP wskutek działania ASN, w dalszych badaniach zastosowano inhibitor NOS: N<sup>G</sup>-nitro-L-argininę (NNLA, 100  $\mu$ M). Inhibitor ten częściowo zapobiegał hamowaniu PARP-1 wywołanej działaniem ASN (**Rycina 26**)





**Rycina 26** Wpływ inhibitora NOS (NNLA) na obniżoną przez ASN aktywność PARP-1 w mózgu szczura.

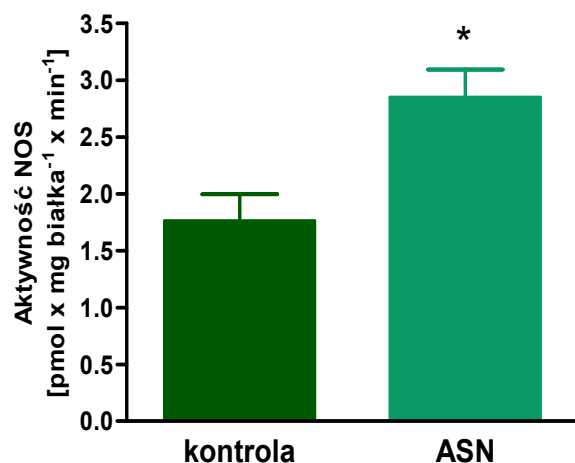
Aktywność PARP-1 mierzono w homogenacie kory z hipokampem mózgu szczura po 30-minutowej inkubacji z ASN (10  $\mu$ M) lub ASN i NNLA (100  $\mu$ M). Wyniki wyrażono w pmol/mg białka/min. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach  $\pm$  SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Bonferroni. \*\*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli  $p < 0,001$ ; ## - Różnica istotna statystycznie w stosunku do ASN  $p < 0,01$ .

### **Określenie wpływu długotrwałego działania zewnątrzkomórkowej ASN na aktywność NOS oraz modulację poziomu białka PARP-1 w komórkach HT22**

Badania przeprowadzone na skrawkach kory i hipokampa mózgu szczura wykazały, że w wyniku krótkotrwałej ekspozycji na zewnątrzkomórkową  $\alpha$ -synukleinę dochodzi do stymulacji zależnej od receptora NMDA syntezy NO oraz do obniżenia aktywności PARP-1. W następnej kolejności zbadano wpływ ASN na aktywację długotrwałych procesów odpowiedzialnych za uwalnianie NO. Badano ekspresję poszczególnych izoform NOS: nNOS, iNOS i eNOS. Ponadto analizowano zależną od NO modulację poziomu białka PARP-1 oraz aktywność kaspazy-3. W celu lepszego porównania wyników z danymi uzyskanymi na materiale izolowanym z kory z hipokampem mózgu szczura badania prowadzono na nieśmiertelnych mysich neuronach hipokampa (HT22).

### Badanie wpływu $\alpha$ -synukleiny i peptydu NAC na aktywność i ekspresję syntazy tlenku azotu (NOS)

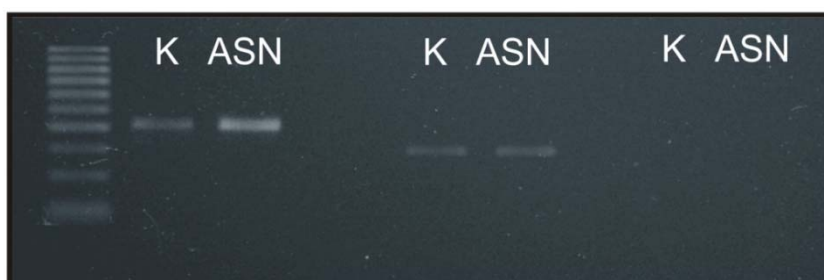
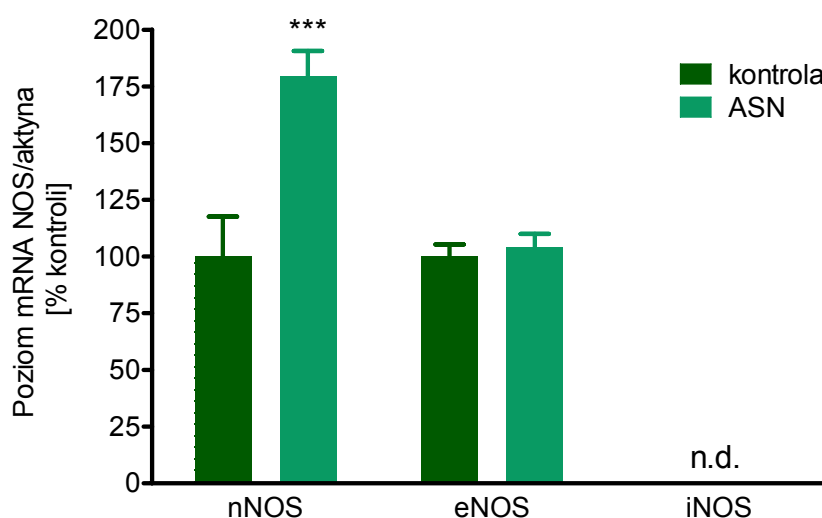
Analizę długotrwałego efektu  $\alpha$ -synukleiny na aktywność syntazy tlenku azotu badano metodą radiochemiczną. Otrzymane wyniki wskazują, że w trakcie 8-godzinnej inkuacji, ASN zwiększa o 63% aktywność NOS w komórkach HT22 (**Rycina 27**).



**Rycina 27** Wpływ ASN na aktywność NOS w komórkach HT22.

Aktywność NOS mierzono w komórkach HT22 po 8-godzinnej inkubacji z ASN w stężeniu 10  $\mu$ M. Wyniki wyrażono w pmol/mg białka/min. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach  $\pm$  SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Bonferroni. \* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli  $p < 0,05$ ;

Badano również wpływ długotrwałej inkubacji komórek HT22 z ASN na poziom mRNA poszczególnych izoform NOS. Wykazano, że w wyniku 8-godzinnej inkuacji ASN nie dochodzi do istotnych zmian ekspresji poszczególnych izoform NOS (dane nie prezentowane). Natomiast dłuższa 24-godzinna inkuacja komórek HT22 zwiększała ekspresję konstytutywnej, neuronalnej izoformy NOS (nNOS). W tym czasie nie stwierdzono zmian ekspresji genu dla izoformy śródbłonkowej (eNOS), ani na izoformy indukowanej (iNOS) (**Rycina 28**).



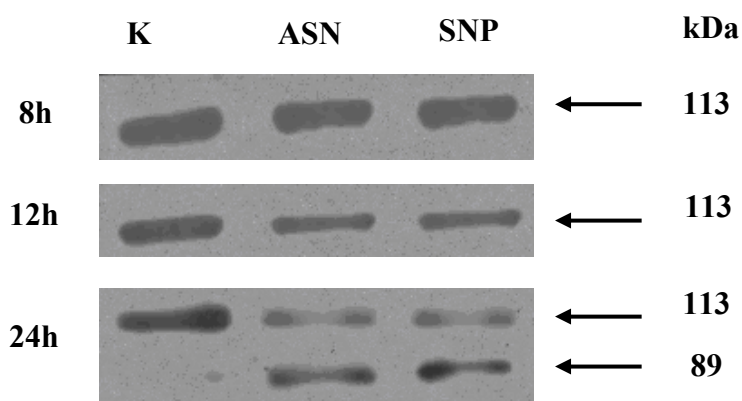
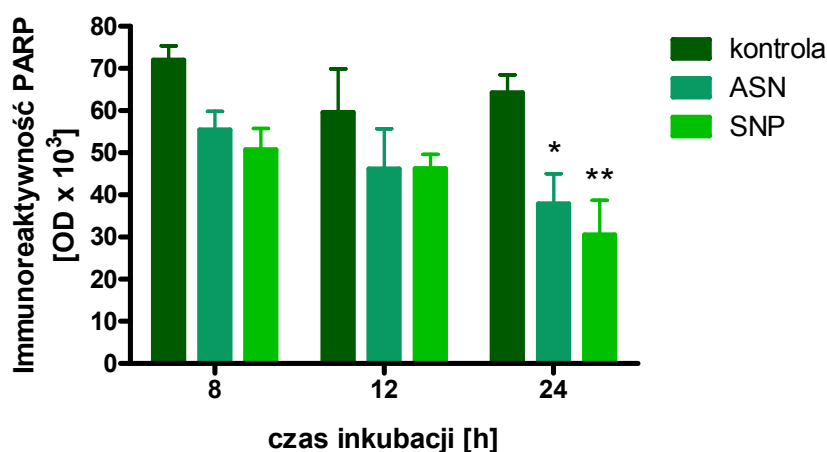
**Rycina 28** Wpływ ASN na ekspresję poszczególnych izoform NOS w komórkach HT22.

Ekspresję genu dla poszczególnych izoform NOS badano metodą RT-PCR po 24-godzinnej inkubacji z 10  $\mu$ M ASN. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem  $\beta$ -aktyny i stanowią średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń  $\pm$  SEM. Pod wykresem zamieszczono przykładowe wyniki RT-PCR. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Bonferroni. \*\*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych,  $p < 0,001$ .

### **Badanie wpływu NO na poziom białka PARP-1 w komórkach HT22 poddanych działaniu $\alpha$ -synukleiny**

Poprzednie wyniki wskazują, że krótkotrwałe działanie zewnątrzkomórkowej  $\alpha$ -synukleiny skutkuje obniżeniem aktywności PARP-1. Celem kolejnych badań, było określenie zależnego od czasu wpływu  $\alpha$ -synukleiny na ekspresję i poziom białka tego enzymu w komórkach HT22.

Analiza Western Blot wskazuje, że ASN powoduje zależne od czasu obniżenie poziomu białka PARP-1 w stosunku do kontroli. Po 24-godzinnej inkubacji z zewnątrzkomórkową  $\alpha$ -synukleina zaobserwowano znamienne spadki ilości białka PARP-1 o 50% (**Rycina 29**). ASN wykazywała porównywalne działanie z wywołanym przez donor NO, nitroprusydek sodu (SNP, 100  $\mu$ M). Podobnie jak w przypadku ASN, w układzie zawierającym SNP zaobserwowano statystycznie znamienne obniżenie poziomu białka PARP-1 po 24-godzinnej inkubacji (**Rycina 29**).

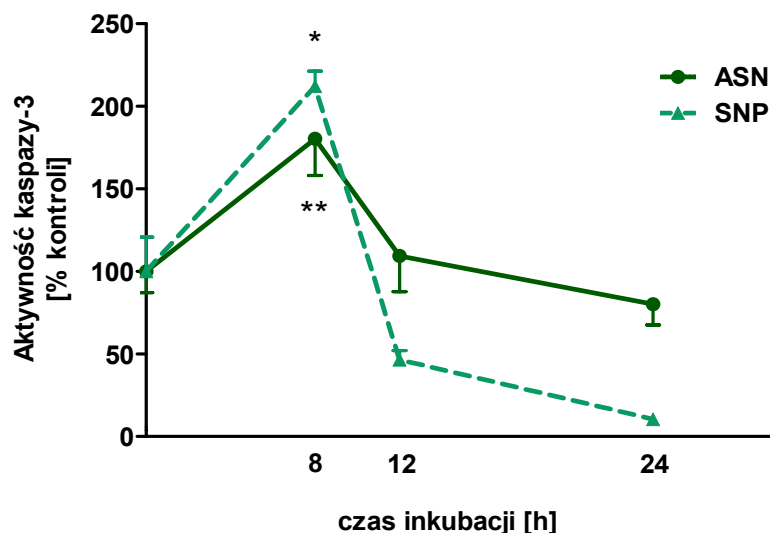


**Rycina 29** Zależny od czasu wpływ ASN i SNP na immunoreaktywność PARP-1 w komórkach HT22.

Immunoreaktywność PARP-1 badano metodą Western Blot. Wykres przedstawia wyniki analizy densytometrycznej, które stanowią średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń  $\pm$  SEM. Pod wykresem zamieszczono przykładowy wynik Western Blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Bonferroniego. \*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli,  $p < 0,01$ ; \* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli,  $p < 0,05$ .

Stwierdzona w analizie Western Blot obecność 89-kDa fragmentu PARP-1 wskazuje, że w wyniku działania ASN dochodzi do obniżenia poziomu PARP-1 wskutek jego degradacji. Wiadomo, że PARP-1 jest klasycznym substratem kaspazy-3. Aktywacja tego enzymu skutkuje pojawianiem się produktów degradacji PARP o masie cząsteczkowej 89-kDa i 21 kDa. Aktywacja kaspaz, skutkująca pojawianiem się produktów proteolizy jej substratów, jest skutkiem zaburzenia funkcji mitochondriów i uwalniania czynników proapoptotycznych. Uruchomienie kaskady kaspaz jest powszechnie uznawanym zjawiskiem programowanej śmierci komórki.

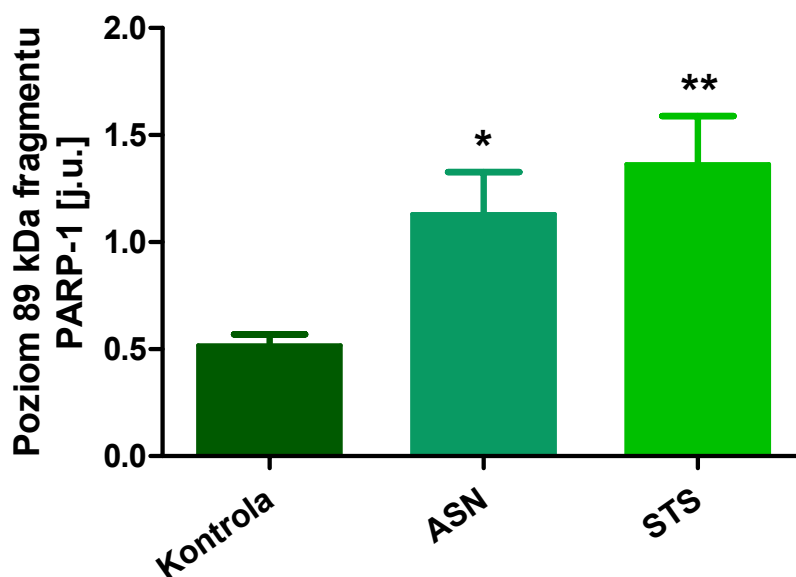
Aktywność kaspazy-3 analizowano metodą fluorymetryczną z użyciem zestawu CASP-3-F firmy Sigma. Przeprowadzone badania wskazują, że zewnątrzkomórkowa ASN (10  $\mu$ M) powoduje aktywację tego enzymu po 8 godzinach inkubacji w komórkach HT22. Podobny efekt uzyskano w przypadku komórek HT22 poddanych działaniu SNP (100  $\mu$ M) (**Rycina 30**). Dodatkowe badania z użyciem specyficznego testu ELISA, pozwoliły stwierdzić, że w przypadku działania ASN dochodzi do istotnego zwiększenia ilości produktu kaspazy-3, 89-kDa fragmentu PARP-1. W badaniach tych jako pozytywnej kontroli użyto 1  $\mu$ M STS, która aktywuje kaspazę-3 i prowadzi do cięcia PARP-1 (**Rycina 31**).



**Rycina 30** Wpływ ASN i SNP na aktywność kaspazy-3 w komórkach HT22.

Komórki HT22 inkubowano z 10  $\mu$ M ASN lub 100  $\mu$ M SNP przez 8, 12 i 24h. Aktywność kaspazy-3 analizowano metodą fluorymetryczną. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z czterech niezależnych doświadczeń w dwóch powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test

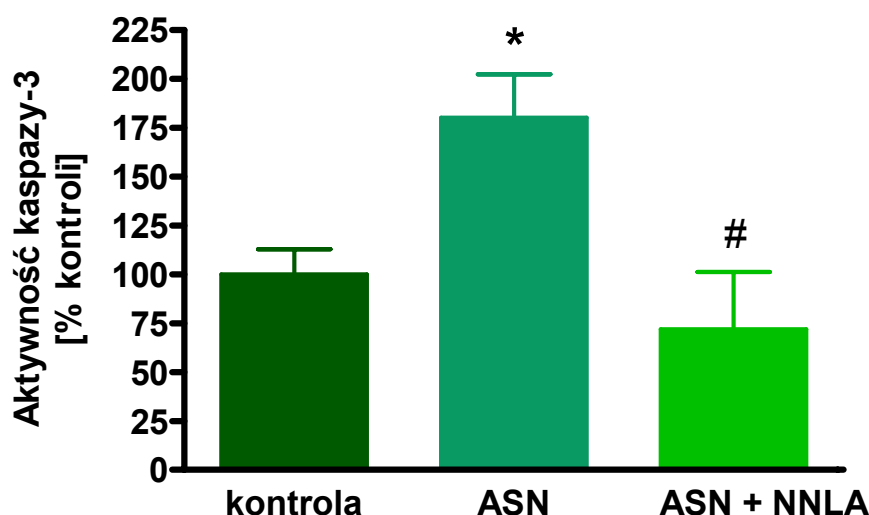
post-hoc Bonferroni. \* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli,  $p < 0,05$ ; \*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli,  $p < 0,01$ .



**Rycina 31** Wpływ ASN i STS na poziom 89 kDa fragmentu PARP-1 w komórkach HT22.

Komórki HT22 inkubowano z  $10 \mu\text{M}$  ASN lub  $1 \mu\text{M}$  STS przez 24h. Poziom fragmentu PARP-1 (Asp 214) analizowano z użyciem specyficznego testu ELISA. Wyniki przedstawiono w jednostkach umownych. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z czterech niezależnych doświadczeń w dwóch powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Bonferroni. \* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli,  $p < 0,05$ ; \*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli,  $p < 0,01$ .

W niniejszej pracy pokazano, że w wyniku działania NO uwolnionego z SNP dochodzi do aktywacji kaspazy-3 i obniżenia poziomu PARP-1. Dlatego dalsze badania miały na celu określenie, czy NO bierze również udział w modulacji aktywności kaspazy-3 wskutek działania ASN. Zastosowanie inhibitora NOS: N<sup>G</sup>-nitro-L-argininy (NNLA,  $100 \mu\text{M}$ ) całkowicie zapobiegało aktywacji kaspazy-3 wywołanej 8-godzinnym działaniem ASN (**Rycina 32**).

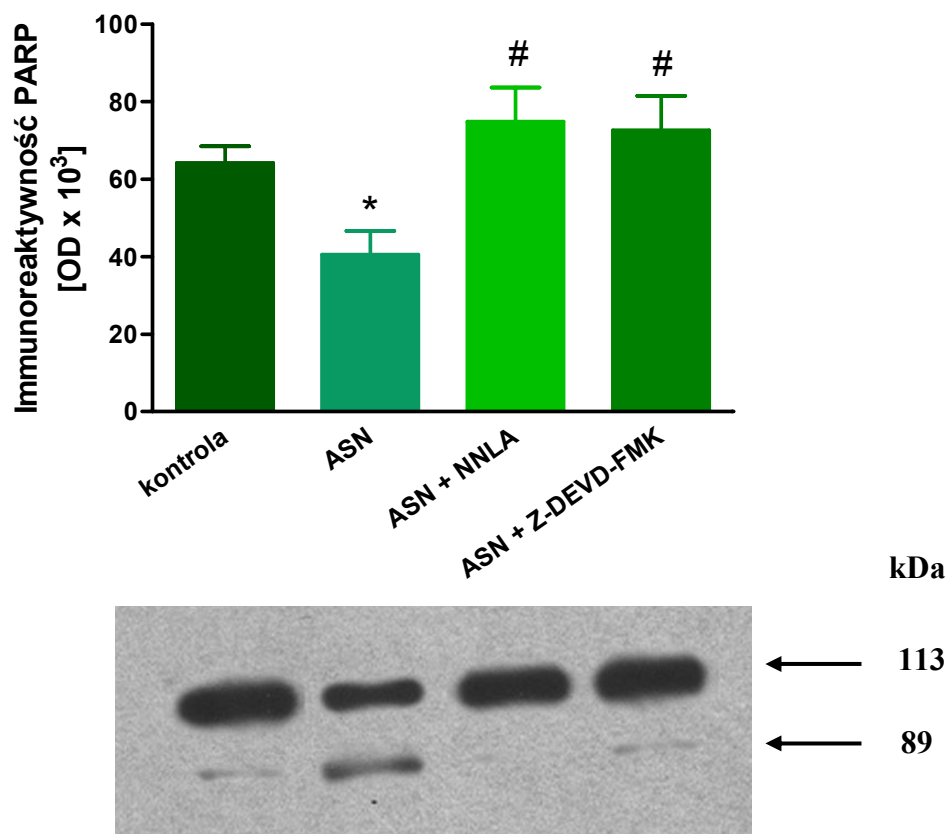


**Rycina 32** Wpływ inhibitora NOS (NNLA) na aktywację kaspazy-3 wywołaną przez ASN w komórkach HT22.

Aktywność kaspazy-3 mierzono w komórkach HT22 po 8-godzinnej inkubacji z ASN (10  $\mu\text{M}$ ) lub ASN i NNLA (100  $\mu\text{M}$ ). Wyniki wyrażono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń w dwóch powtórzeniach  $\pm$  SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Bonferroni. \*- Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli  $p < 0,05$ ; #- Różnica istotna statystycznie w stosunku do ASN  $p < 0,05$ .

Powyższe badania wskazują, że NO uwolniony w wyniku działania ASN powoduje aktywację kaspazy-3 w komórkach HT22.

Z poprzednich doświadczeń wynika, że ASN powoduje zależną od NO aktywację kaspazy-3 w komórkach HT22. W związku z tym zbadano udział NO w obniżeniu poziomu białka PARP-1 wywołanym przez ASN. W tym celu badano wpływ specyficznych inhibitorów NOS (NNLA, 100  $\mu\text{M}$ ) i kaspazy-3 (Z-DEVD-FMK 100  $\mu\text{M}$ ) na poziom białka PARP-1 w komórkach HT22. Zastosowane inhibitory całkowicie znosiły inhibicyjny efekt ASN na poziom immunoreaktywności PARP-1 w badanej linii komórkowej (**Rycina 33**).

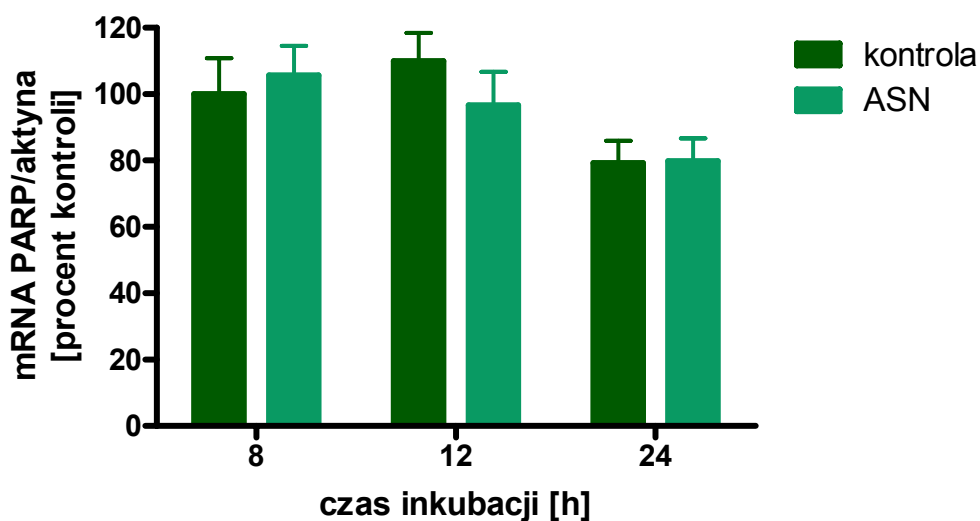


**Rycina 33** Wpływ inhibitora NOS (NNLA) i kaspazy-3 (Z-DEVD-FMK) na poziom białka PARP-1 w komórkach HT22 poddanych działaniu ASN.

Immunoreaktywność PARP-1 badano metodą Western Blot. Wykres przedstawia wyniki analizy densytometrycznej, które stanowią średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń  $\pm$  SEM. Pod wykresem zamieszczono przykładowy wynik Western Blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Bonferroniego. \* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli,  $p < 0,05$ ; # - Różnica istotna statystycznie w stosunku do ASN  $p < 0,05$ .

W wyniku działania ASN może również dochodzić do obniżenia ekspresji mRNA kodującego białko PARP-1. Analiza poziomu mRNA PARP-1 przeprowadzona metodą Real-time PCR wykazała jednakże, że ASN nie wpływa na zmianę ekspresji PARP-1 w żadnym z badanych przedziałów czasowych (**Rycina 34**).





Rycina 34 Zależny od czasu wpływ ASN na ekspresję genu kodującego PARP-1 w komórkach HT22.

Ekspresję genu dla PARP-1 badano metodą Real-time PCR. Wykres przedstawia wyniki analizy normalizowane względem  $\beta$ -aktyny i stanowią średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń  $\pm$  SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Bonferroniego.

### **Badanie mechanizmów toksyczności $\alpha$ -synukleiny i peptydu NAC w komórkach dopaminergicznych PC12 oraz analiza działania wybranych związków o charakterze cytoprotekcyjnym**

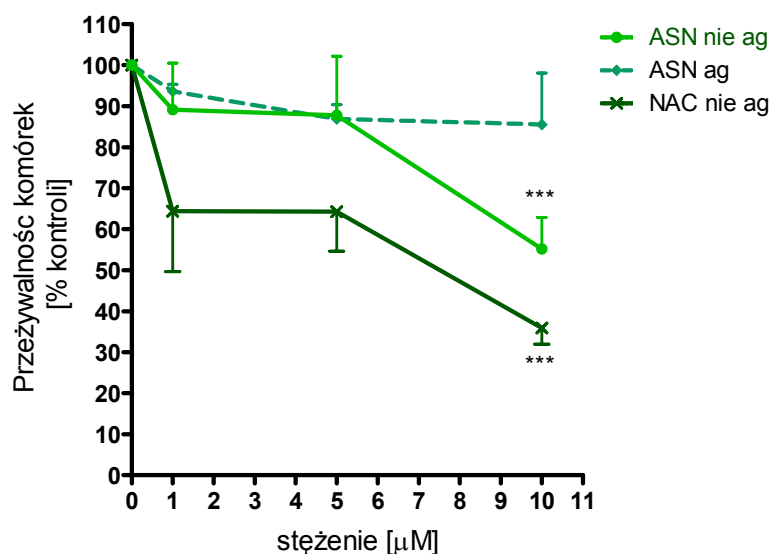
Dotychczasowe dane wskazują, że ASN wywiera najsilniejsze cytotoksyczne działanie na komórki dopaminergiczne, a wywołana odkładaniem się ciał Lewy'ego degeneracja neuronów szlaku czarnoprażkowiowego jest odpowiedzialna za zaburzenia funkcji motorycznych obserwowanych w ChP. Kolejne badania miały więc na celu określenie molekularnych mechanizmów toksyczności ASN w komórkach dopaminergicznych PC12. Szczegółowo badano udział zewnątrzkomórkowej ASN oraz jej centralnego fragmentu, peptydu NAC w zaburzeniu funkcji mitochondriów i aktywacji apoptozy, z uwzględnieniem roli NO, białka p53 oraz aktywności enzymu PARP-1. Ponadto określono wpływ badanych peptydów na aktywność kaspazy-3.

## Analiza przeżywalności i identyfikacja apoptozy w komórkach poddanych działaniu ASN i NAC

Wpływ zewnątrzkomórkowej ASN i peptydu NAC zarówno w formie rozpuszczalnej jak i zagregowanej na przeżywalność komórek PC12 oceniano testem metabolizmu MTT.

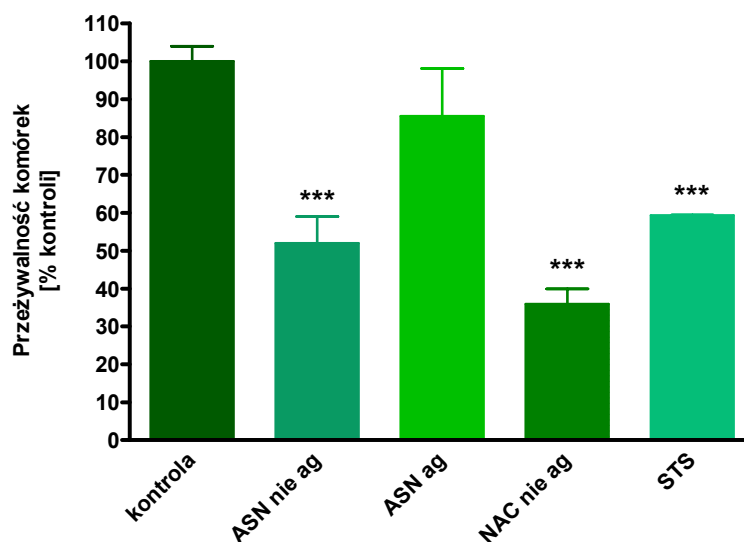
W celu doboru odpowiedniego stężenia ASN i NAC, zbadano kinetykę zmian żywotności komórek PC12 po podaniu badanych związków w zakresie stężeń 0-10  $\mu\text{M}$ . Wykazano, że ASN w sposób zależny od stężenia oraz stopnia agregacji wywołuje obumieranie komórek PC12. Stwierdzono, że po 48 godzinach inkubacji w obecności rozpuszczalnej ASN (10  $\mu\text{M}$ ) przeżywało około 50% komórek. ASN podawana w niższym stężeniu (1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ ) oraz zagregowana pozostawała bez wpływu na przeżywalność badanej linii komórkowej (**Rycina 35**, **Rycina 36**).

Centralny fragment ASN, peptyd NAC, w formie rozpuszczalnej również wykazywał zależną do stężenia cytotoksyczność, przy czym w stężeniu 10 $\mu\text{M}$  wykazywał silniejsze od ASN działanie, powodując obumieranie ok.70% komórek (**Rycina 35**). Wykazano ponadto, że cytotoksyczny efekt wywołany przez ASN jest zbliżony do działania inhibitora kinaz białkowych, 1  $\mu\text{M}$  staurosporyny, która w różnych typach komórek indukuje obumieranie na drodze apoptozy (**Rycina 36**).



Rycina 35 Zależny od stężenia i stopnia agregacji wpływ ASN oraz peptydu NAC na przeżywalność komórek PC12.

Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT po 48-godzinnej inkubacji z wybranymi związkami. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z pięciu niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keuls. \*\*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych,  $p < 0,001$ .



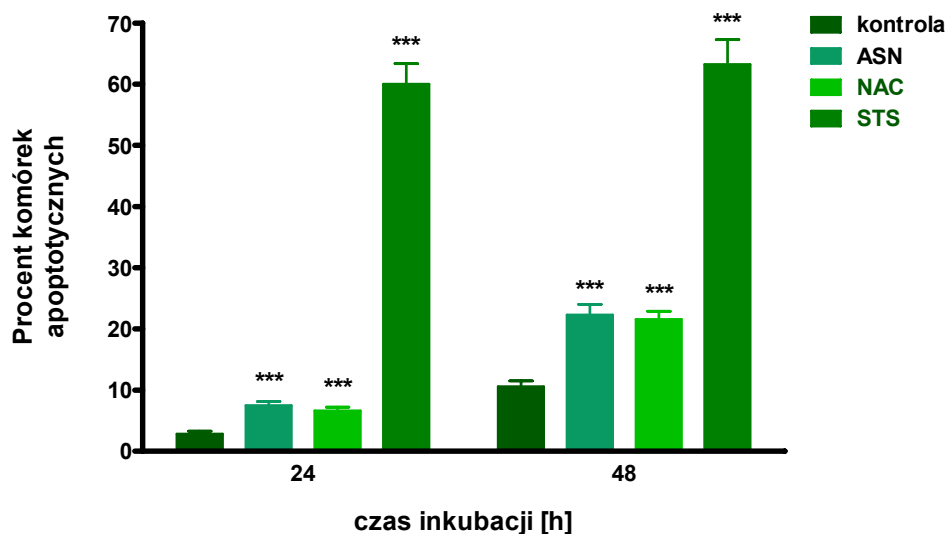
**Rycina 36** Przeżywalność komórek poddanych działaniu ASN, peptydu NAC oraz STS.

Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT po 48-godzinnej inkubacji z ASN, NAC (oba w stężeniu  $10 \mu\text{M}$ ) oraz STS ( $1 \mu\text{M}$ ). Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z pięciu niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keuls. \*\*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych,  $p < 0,001$

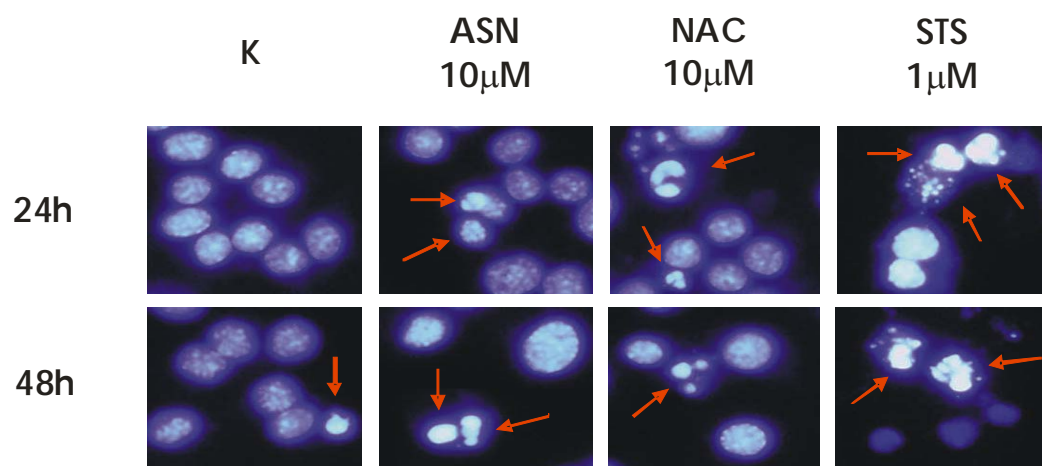
Ocena żywotności komórek testem MTT nie pozwala wnioskować, czy obserwowany spadek liczby żywych komórek po podaniu ASN i NAC, w porównaniu do kontroli jest spowodowany obumieraniem na drodze apoptozy, czy innym rodzajem śmierci. Dlatego w dalszej kolejności przeprowadzono badania morfologii jąder komórkowych pod kątem cech apoptotycznych. Badania w mikroskopie fluorescencyjnym z użyciem barwnika Hoechst 33342 wykazały, że ASN i peptyd NAC wywołują zależny od czasu wzrost odsetka komórek apoptotycznych (**Rycina 37**). 24-godziny po inkubacji z zewnątrzkomórkową ASN ( $10 \mu\text{M}$ ) i peptydem NAC ( $10 \mu\text{M}$ ) u około 10% komórek zaobserwowano zmiany morfologiczne charakterystyczne dla procesu apoptozy (zagęszczenie chromatyny, jądra pyknotyczne, fragmentacja jądra komórkowego oraz powstawanie tzw. ciałek apoptotycznych), natomiast po 48-godzinnej inkubacji liczba ta

wzrosła do około 20%. Odsetek komórek apoptotycznych powstałych w wyniku działania ASN i NAC jest jednak znacznie mniejszy w porównaniu z efektem wywołanym przez 1  $\mu$ M staurosporynę. Wyniki te wskazują, że pod wpływem ASN i NAC dochodzić może do obumierania komórek również na drodze innych form programowanej śmierci, jak również nekrozy.

**A**



**B**



**Rycina 37** Zależna od czasu apoptoza wywołana działaniem zewnątrzkomórkowej ASN i peptydu NAC w komórkach PC12.

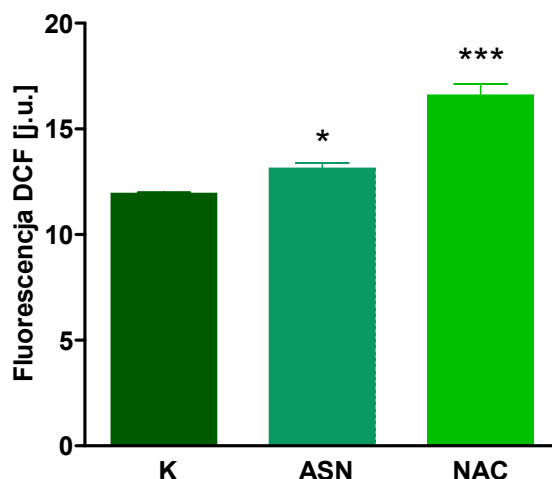
Po 24- i 48-godzinnej ekspozycji komórek PC12 na ASN, NAC (10  $\mu$ M) oraz staurosporynę (STS, 1  $\mu$ M) wykonano barwienie sondą fluorescencyjną Hoechst 33342, po czym liczono procent komórek

apoptotycznych. *Staurosporyna* została użyta jako pozytywna kontrola. Wartości zostały wyrażone w procentach komórek apoptotycznych (A). Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z pięciu niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keuls. \*\*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych,  $p < 0,001$ . (B) Przykładowe zdjęcia komórek barwionych sondą fluorescencyjną Hoechst 33342. Strzałki pokazują komórki o cechach morfologicznych typowych dla procesu apoptozy (kondensacja chromatyny, jądra pyknotyczne, fragmentacja chromatyny i tworzenie ciałek apoptotycznych).

### Ocena udziału wolnych rodników w toksyczności ASN i peptydu NAC komórkach PC12

W celu zbadania zdolności ASN i NAC do indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach PC12, badano wpływ tych związków na poziom wolnych rodników.

Poziom wolnych rodników w komórkach PC12 badano poprzez pomiar utleniania sondy dichlorodihydrofluoresceiny ( $H_2DCF$ -DA). Stwierdzono, że po 4-godzinnej inkubacji z ASN ma miejsce niewielki, lecz statystycznie zamienny wzrost poziomu wolnych rodników w komórkach PC12, natomiast 10  $\mu$ M peptyd NAC stymuluje produkcję wolnych rodników o 40% (**Rycina 38**).



**Rycina 38** Poziom wolnych rodników w komórkach PC12 poddanych działaniu ASN i peptydem NAC.

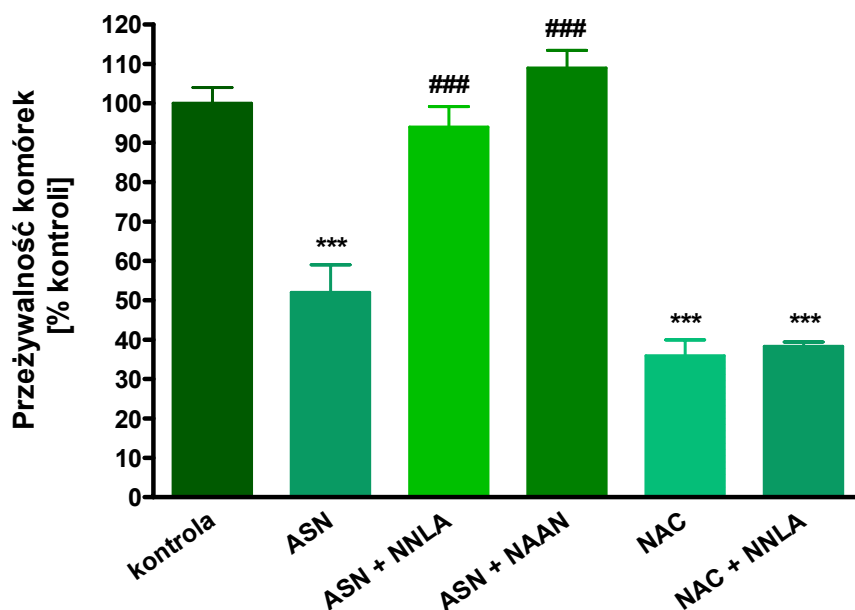
Poziom wolnych rodników oznaczano metodą fluorymetryczną z zastosowaniem DCF. Wyniki wyrażono jako intensywność fluorescencji. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń  $\pm$  SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową

analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keuls. \*\*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli  $p < 0,001$ ; \* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli  $p < 0,05$ .

### Analiza udziału syntaz tlenu azotu w toksyczności ASN i peptydu NAC w komórkach PC12

Przeprowadzone badania miały na celu określić, czy zahamowanie konstytutywnych izoform syntaz NO jest w stanie zapobiec toksyczności ASN i peptydu NAC.

Badania z użyciem testu MTT wykazały, że zastosowanie nieselektywnego inhibitora NOS (NNLA, 100  $\mu\text{M}$ ) oraz specyficznego inhibitora nNOS (NAAN, 50  $\mu\text{M}$ ) powoduje statystycznie znamiennej wzrost przeżywalności komórek poddanych działaniu ASN (**Rycina 39**). Inhibitor konstytutywnych izoform NOS (cNOS), NNLA nie miał wpływu na przeżywalność komórek PC12 poddanych działaniu peptydu NAC (**Rycina 39**).



**Rycina 39** Wpływ inhibitorów syntazy tlenu azotu (NOS) na toksyczność ASN (A) i peptydu NAC (B) w komórkach PC12.

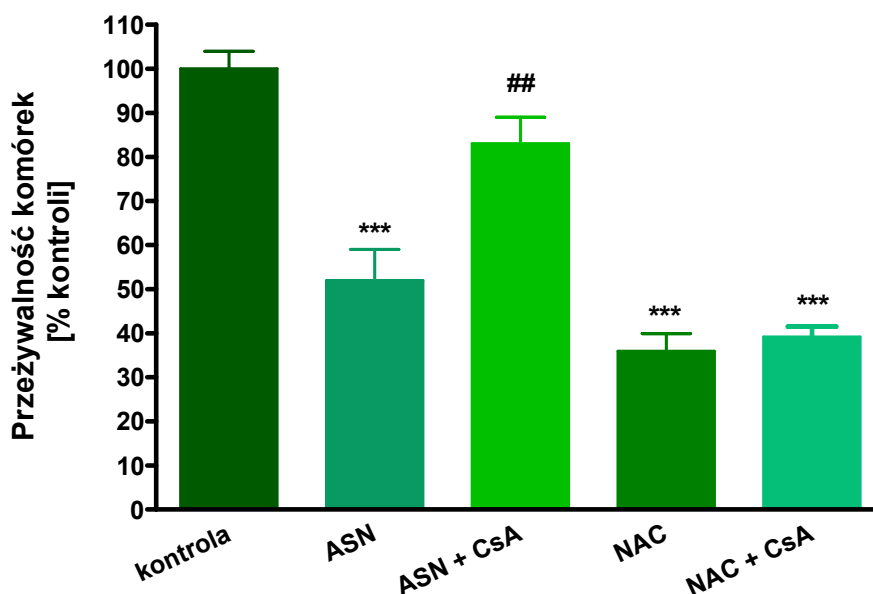
Komórki PC12 inkubowano z 10  $\mu\text{M}$  ASN (A) lub 10  $\mu\text{M}$  peptydem NAC (B) oraz jednym z wybranych inhibitorów NOS: NNLA (100  $\mu\text{M}$ ), NAAN (50  $\mu\text{M}$ ) przez 48h. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z czterech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc

Newmana-Keuls. \*\*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych,  $p < 0,001$ ; ## - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek poddanych działaniu ASN  $p < 0,001$ .

Z uzyskanych danych wynika, że zwiększenie syntezy NO jest głównym mechanizmem odpowiedzialnym za toksyczność zewnątrzkomórkowej ASN, ale nie wolnego peptydu NAC w komórkach PC12.

### Wpływ inhibitora megakanałów mitochondrialnych na zaburzenie funkcji mitochondriów przez zewnątrzkomórkową ASN i peptyd NAC

Wpływ ASN i NAC na otwarcie megakanałów mitochondrialnych oznaczano pośrednio z użyciem specyficznego inhibitora MPT cyklosporyny A (CsA, 2  $\mu$ M), za pomocą testu MTT. Zastosowanie CsA powodowało statystycznie znamiennej wzrost przeżywalności komórek poddanych działaniu  $\alpha$ -synukleiny, ale pozostało bez wpływu na toksyczność peptydu NAC (**Rycina 40**).



Rycina 40 Wpływ inhibitora MPT na toksyczność ASN i peptydu NAC w komórkach PC12.

Komórki PC12 inkubowano z 10  $\mu$ M ASN lub 10  $\mu$ M peptydem NAC oraz 2  $\mu$ M cyklosporyną A (CsA) przez 48h. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z czterech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keuls. \*\*\* - Różnica istotna

statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych,  $p < 0,001$ ; # - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek poddanych działaniu ASN  $p < 0,01$ .

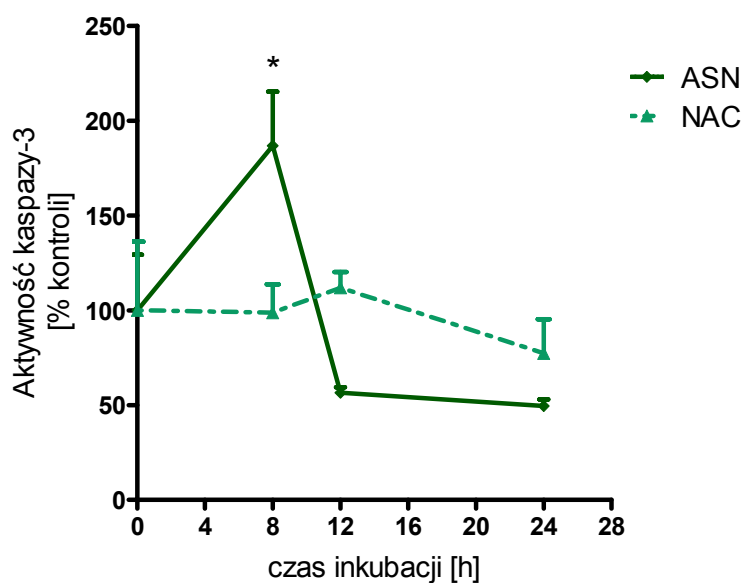
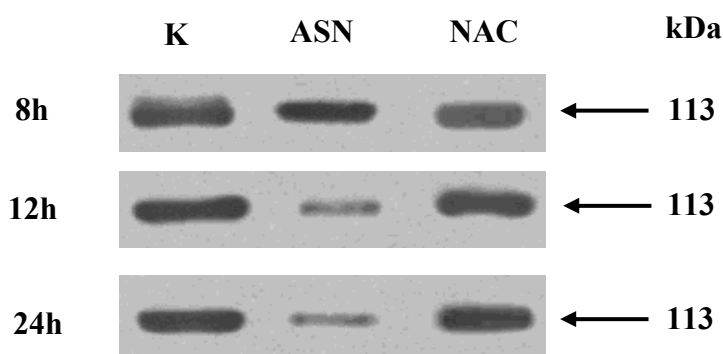
Otrzymane wyniki wykazują, że działanie ASN na komórki PC12 prowadzi do otwarcia MPT w mitochondriach, co wskazuje na znaczenie zaburzeń mitochondriów w mechanizmie śmierci tych komórek. Mechanizm ten nie jest jednak odpowiedzialny za toksyczność peptydu NAC.

### **Udział kaspazy-3 w programowanej śmierci komórek PC12 wywołanej działaniem $\alpha$ -synukleiny i peptydu NAC**

W tej części pracy zbadano wpływ ASN jak również działanie peptydu NAC na aktywację kaspazy-3, która w kaskadzie kaspaz pełni rolę kaspazy egzekutorowej. Analogicznie jak w przypadku komórek HT22, aktywność tego enzymu analizowano metodą fluorymetryczną z użyciem zestawu CASP-3-F firmy Sigma. Z przeprowadzonych badań wynika, że zewnątrzkomórkowa ASN powoduje aktywację kaspazy-3 po 8 godzinach inkubacji, natomiast peptyd NAC pozostaje bez wpływu na aktywność tego enzymu (**Rycina 41A**).

Po podaniu zewnątrzkomórkowym ASN dochodziło także do obniżenia poziomu klasycznego preferencyjnego substratu kaspazy 3, PARP, natomiast immunoreaktywność PARP-1 nie uległa zmianie pod wpływem działania peptydu NAC (**Rycina 41B**).

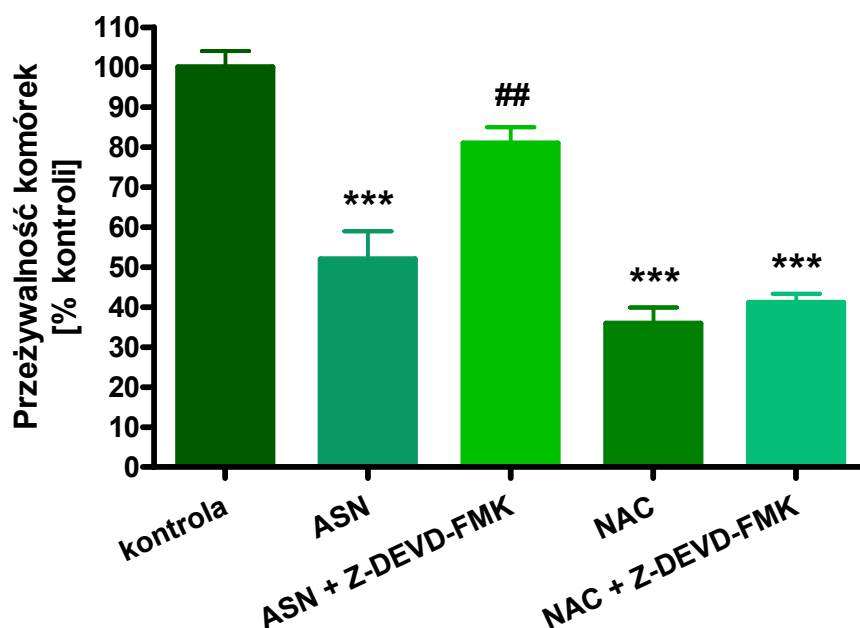


**A****B**

**Rycina 41** Wpływ  $\alpha$ -synukleiny i peptydu NAC na aktywność kaspazy-3 (A) i poziom białka PARP (B) w komórkach PC12.

Komórki PC12 inkubowano z 10  $\mu$ M ASN lub 10  $\mu$ M peptydem NAC przez 8 h. (A) Aktywność kaspazy-3 analizowano metodą fluorymetryczną. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z trzech niezależnych doświadczeń w dwóch powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newman-Keuls. \* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych,  $p < 0,05$ ; (B) Immunoreaktywność PARP-1 badano metodą Western Blot. Wykres przedstawia przykładowy wynik, który jest reprezentatywny dla 3 do 6 niezależnych doświadczeń.

Zastosowanie selektywnego inhibitora kaspazy-3 (Z-DEVD-FMK, 100 $\mu$ M), powodowało protekcyjne działanie jedynie w przypadku komórek PC12 poddanych działaniu ASN, natomiast pozostało bez wpływu na przeżywalność komórek poddanych działaniu peptydem NAC (**Rycina 42**).



Rycina 42 Wpływ inhibitora kaspazy-3 (Z-DEVD-FMK) na toksyczność ASN i peptydu NAC w komórkach PC12.

Komórki PC12 inkubowano z 10  $\mu\text{M}$  ASN lub 10  $\mu\text{M}$  peptydem NAC oraz 100  $\mu\text{M}$  Z-DEVD-FMK przez 48h. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z czterech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keuls. \*\*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych,  $p < 0,001$ ; ## - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek poddanych działaniu ASN  $p < 0,01$ .

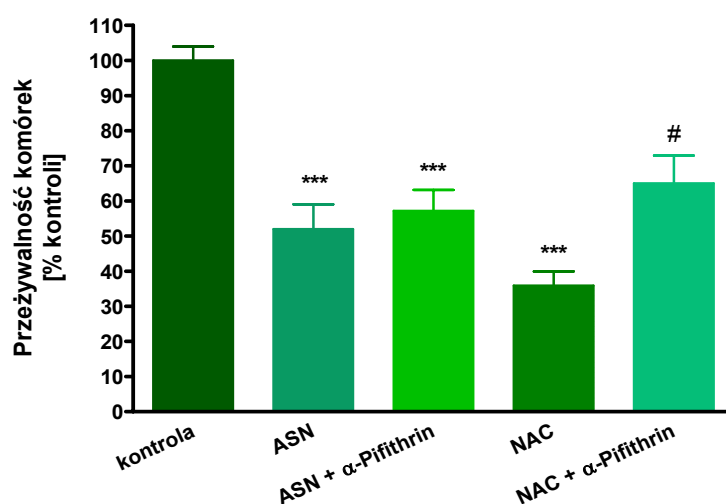
Aktywacja kaspazy-3 przez  $\alpha$ -synukleinę w komórkach PC12 wskazuje, że komórki te ulegają programowanej śmierci, na co wskazywały opisane wcześniej zmiany morfologii jąder komórkowych. Aktywacja kaspazy-3 nie jest jednak odpowiedzialna za toksyczność peptydu NAC. Wyniki te jednoznacznie wskazują na istnienie rozbieżności szlaków toksycznego działania ASN i NAC.

### Wpływ zewnątrzkomórkowej $\alpha$ -synukleiny i peptydu NAC na aktywację szlaku zależnego od białka p53

Prezentowane wcześniej dane wskazują, że peptyd NAC jest znacznie silniejszym induktorem stresu oksydacyjnego niż ASN. Wysoki poziom wolnych rodników może prowadzić do aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej zależnej od białka p53 - czynnika transkrypcyjnego o własnościach supresora nowotworowego. Ponieważ nadekspresja białka p53 powoduje

obumieranie komórek na drodze apoptozy, zbadano również efekt zahamowania tej ścieżki na przeżywalność komórek pod wpływem działania ASN i peptydu NAC.

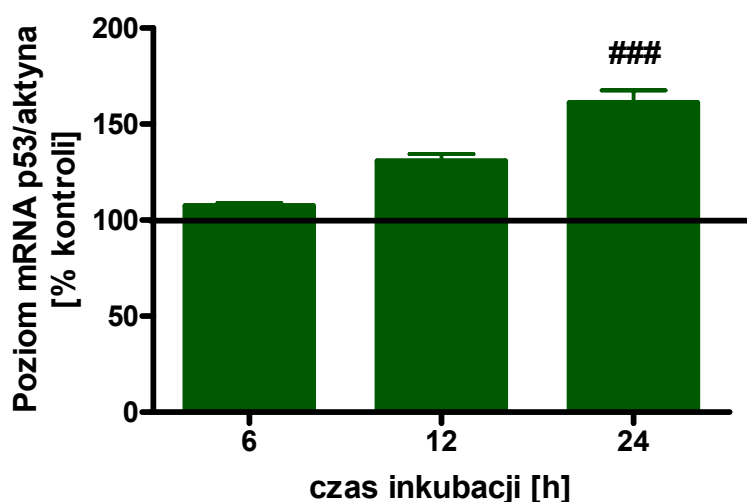
Uzyskane wyniki wskazują, że inhibitor p53 (20  $\mu$ M pifithrin) hamował toksyczne działanie peptydu NAC, pozostawał natomiast bez wpływu na przeżywalność komórek poddanych działaniu ASN (**Rycina 43**).



**Rycina 43** Wpływ inhibitora p53 ( $\alpha$ -Pifithrin) na toksyczność  $\alpha$ -synukleiny i peptydu NAC w komórkach PC12.

Komórki PC12 inkubowano z 10  $\mu$ M ASN lub 10  $\mu$ M peptydem NAC oraz  $\alpha$ -Pifithrinem (20  $\mu$ M) przez 48h. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z czterech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keuls. \*\*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych,  $p < 0,001$ ; # - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek poddanych działaniu NAC  $p < 0,05$ .

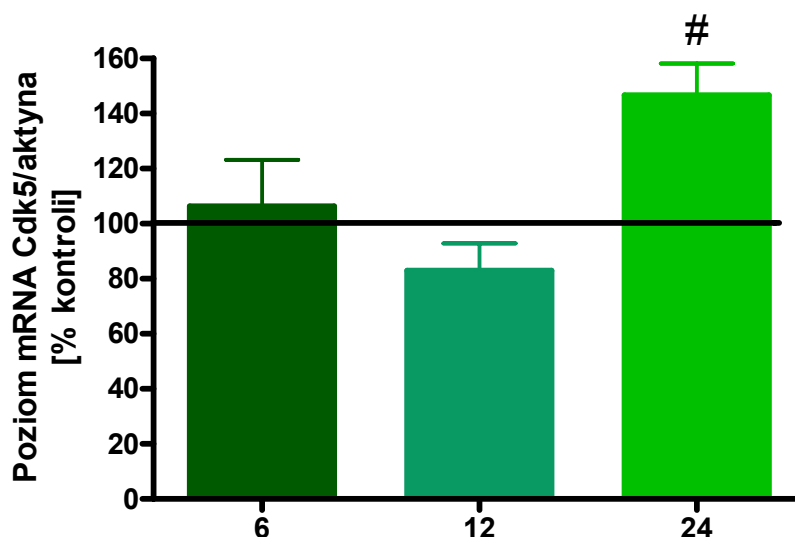
W związku z otrzymanymi w teście MTT danymi, w dalszej kolejności postanowiono zbadać efekt peptydu NAC na ekspresję genu białka p53. Poziom mRNA p53 w komórkach PC12 poddanych działaniu peptydem NAC zwiększał się wraz z czasem inkubacji i po 24-godzinnym traktowaniu osiągnął 160% poziomu kontroli (**Rycina 44**).



Rycina 44 Wpływ peptydu NAC na ekspresję białka p53 w komórkach PC12.

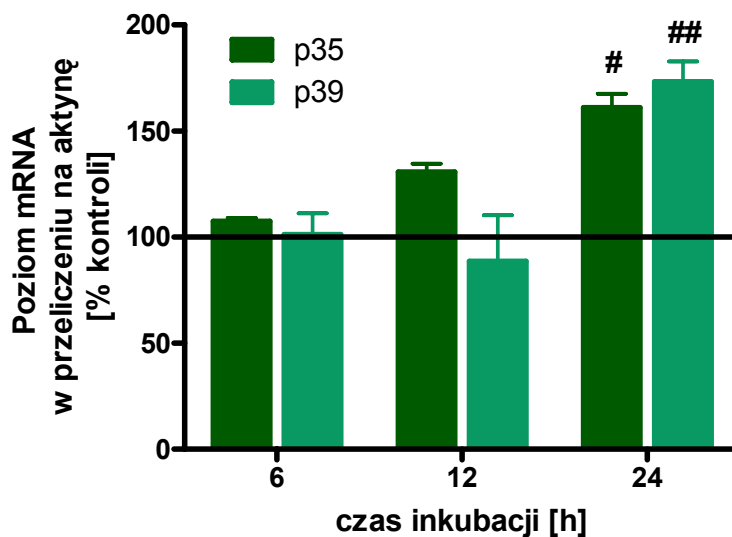
Komórki PC12 inkubowano z 10  $\mu$ M peptydem NAC przez 6h, 12h i 24h. Ekspresję genu badano za pomocą real-time PCR. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keuls. ### - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych,  $p < 0,001$ .

Jednym z istotnych enzymów biorących udział w regulacji poziomu i aktywności p53 jest cyklozależna kinaza 5 (Cdk5). Przeprowadzone badania wykazały, że 24-godzinna inkubacja komórek PC12 z peptydem NAC również skutkuje zwiększeniem ekspresji genu dla Cdk5 (**Rycina 45**). Cdk5 w formie monomerycznej nie posiada aktywności enzymatycznej i w celu aktywowania wymaga przyłączenia jednego z białek regulujących, p35 lub p39. Białka te są jedynymi aktywatorami Cdk5 w OUN. Uzyskane wyniki wskazują, że poziom ekspresji obydwu białek, zarówno p35 jak i p39 (**Rycina 46**), jest podwyższony w komórkach PC12 po 24-godzinnym traktowaniu NAC.



Rycina 45 Wpływ peptydu NAC na ekspresję genu kodującego Cdk5 w komórkach PC12.

Komórki PC12 inkubowano z 10  $\mu$ M peptydem NAC przez 6, 12 i 24h. Ekspresję genu badano za pomocą real-time PCR. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keuls. <sup>#</sup> - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych,  $p < 0,05$ .

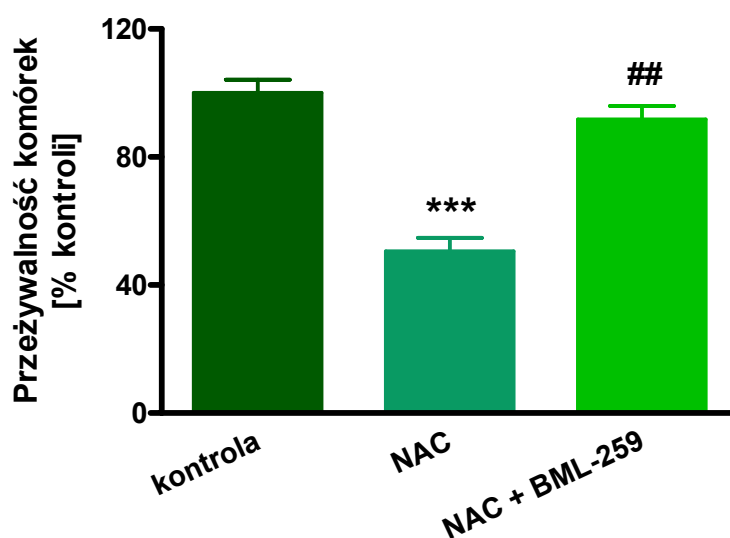


Rycina 46 Wpływ peptydu NAC na ekspresję genu kodującego p35 i p39 w komórkach PC12.

Komórki PC12 inkubowano z 10  $\mu$ M peptydem NAC przez 6h, 12h i 24h. Ekspresję genów badano za pomocą real-time PCR. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc

Newmana-Keuls. # - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych,  $p < 0,05$ . ## - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych,  $p < 0,01$ .

Zastosowanie specyficznego inhibitora Cdk5 (BML-259,  $10\mu\text{M}$ ) powodowało statystycznie znamiennej wzrost przeżywalności komórek poddanych działaniu peptydem NAC (**Rycina 47**).



**Rycina 47** Wpływ inhibitora Cdk-5 (BML-259) na toksyczność peptydu NAC w komórkach PC12.

Komórki PC12 inkubowano z  $10\mu\text{M}$  peptydem NAC oraz BML-259 ( $10\mu\text{M}$ ) przez 48h. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z czterech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keuls. \*\*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych,  $p < 0,001$ ; ## - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek poddanych działaniu NAC  $p < 0,01$ .

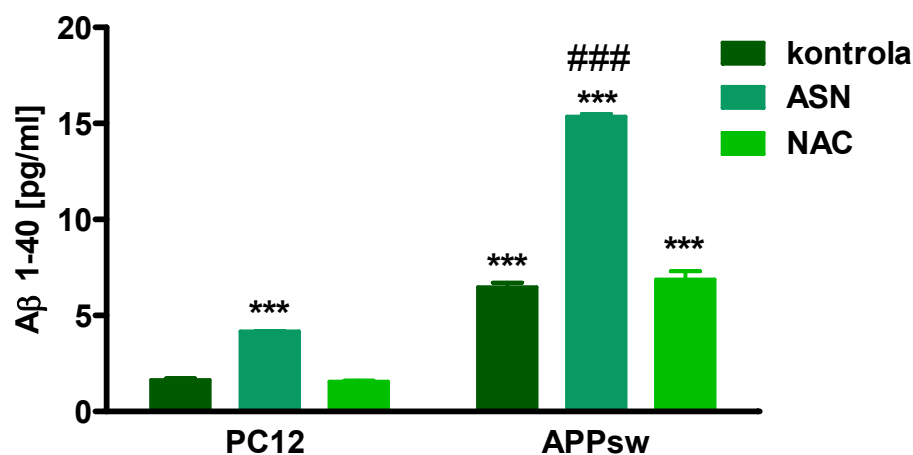
### **Badanie znaczenia ASN w uwalnianiu i toksyczności peptydów amyloidu beta**

Prowadzone badania miały na celu uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy zewnątrzkomórkowa ASN może wpływać na uwalnianie peptydów A $\beta$  produkowanego przez komórki PC12 oraz na toksyczność A $\beta$ . Doświadczenia prowadzono na komórkach transfekowanych genem białka prekursorowego A $\beta$ , typu dzikiego (APPwt) lub z podwójną szwedzką mutacją (APPsw, K670M/N671L), produkujących, odpowiednio, 2,8 i 4,8 razy więcej A $\beta$  niż komórki kontrolne (Chalimoniuk i wsp., 2007,

**Rycina 48).** Badano udział ASN w uwalnianiu A $\beta$  oraz analizowano jej wpływ na toksyczność tych peptydów, ze szczególnym uwzględnieniem roli wolnych rodników, w tym NO, w zaburzeniu funkcji mitochondriów i w mechanizmie śmierci komórek.

### Wpływ zewnątrzkomórkowej ASN i peptydu NAC na uwalnianie peptydów A $\beta$

Wpływ ASN i NAC na uwalnianie peptydów A $\beta$  badano w komórkach PC12 kontrolnych i transfekowanych ludzkim genem białka prekursorowego A $\beta$ , z podwójną szwedzką mutacją. Ilość uwolnionego zewnątrzkomórkowo A $\beta$  1-40 oznaczano metodą ELISA. Z przeprowadzonych badań wynika, że zewnątrzkomórkowa ASN powoduje ponad dwukrotne zwiększenie uwalniania peptydów A $\beta$  1-40 zarówno w komórkach kontrolnych, jak i transfekowanych APPsw (**Rycina 48**). Peptyd NAC nie miał wpływu na uwalnianie A $\beta$  1-40 zarówno w komórkach PC12 kontrolnych, jak i transfekowanych (Rycina 48).



**Rycina 48** Wpływ  $\alpha$ -synukleiny i peptydu NAC na uwalnianie A $\beta$  1-40 z komórek PC12 kontrolnych i transfekowanych APPsw.

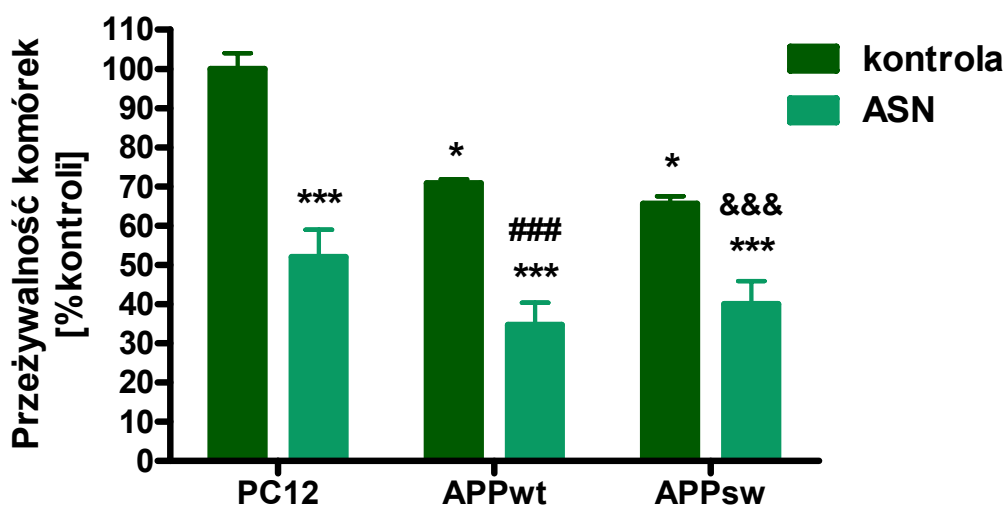
Komórki PC12 i APPsw inkubowano z 10  $\mu$ M ASN lub peptydem NAC przez 48h. Ilość uwolnionego zewnątrzkomórkowo A $\beta$  1-40 oznaczano metodą ELISA. Wyniki przedstawiono w pg/ml. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z trzech niezależnych doświadczeń. Do oceny statystycznej wyników zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newman-Keuls. \*\*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek PC12 kontrolnych,  $p < 0,001$ ; ### - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek APPsw kontrolnych (niepoddanych działaniu)  $p < 0,001$ .

### Analiza wpływu $\alpha$ -synukleiny na toksyczność peptydów A $\beta$

Przeprowadzone badania miały na celu określić, czy zewnątrzkomórkowa ASN potęguje toksyczny efekt peptydów A $\beta$  w komórkach PC12. Ponieważ peptyd NAC pozostawał bez wpływu na poziom A $\beta$  w środowisku zewnątrzkomórkowym, w dalszym toku badań zrezygnowano z analizowania jego działania.

Badanie przeżywalności za pomocą testu MTT prowadzono na komórkach PC12 kontrolnych, transfekowanych APP dzikim oraz APP z mutacją szwedzką (APPsw).

Uzyskane wyniki wskazują, że zwiększone uwalnianie A $\beta$  w komórkach APPwt i APPsw skutkuje obniżeniem ich przeżywalności względem komórek PC12 kontrolnych odpowiednio o 30% i 35%. Toksyczny efekt A $\beta$  był znacząco spotęgowany w wyniku działania zewnątrzkomórkowej ASN (**Rycina 49**).



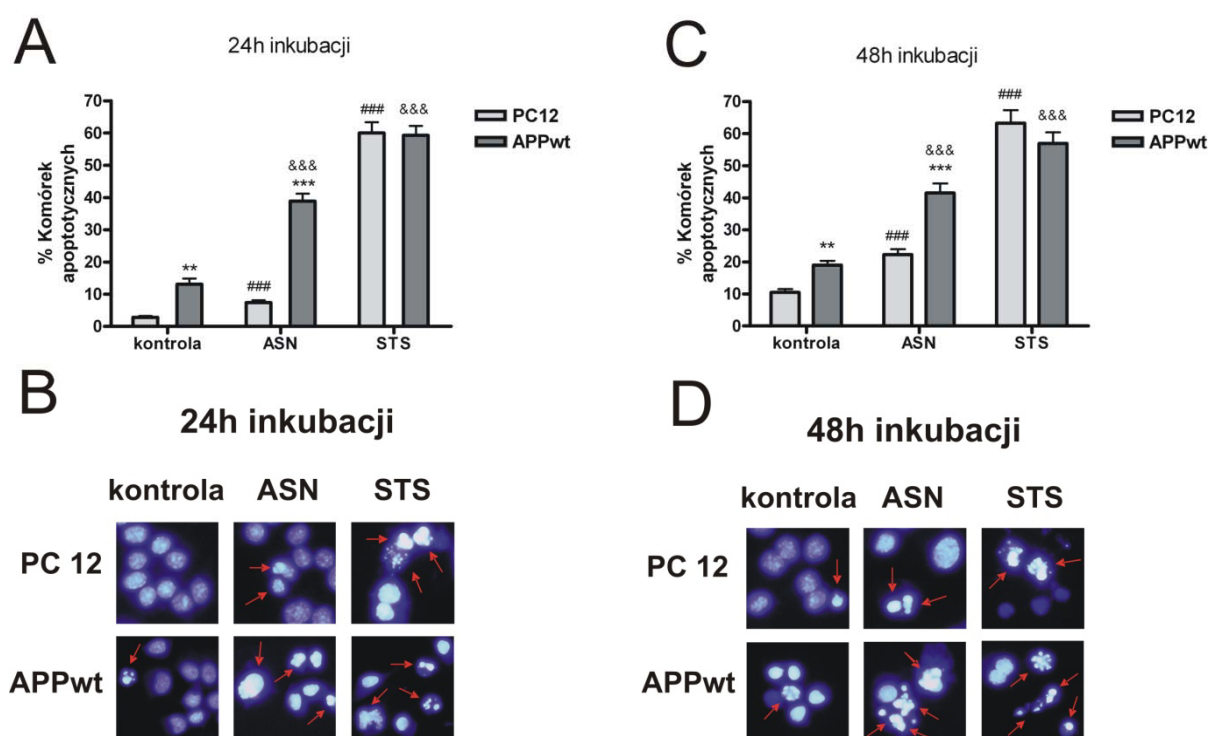
Rycina 49 Wpływ ASN na zależną od stężenia peptydów A $\beta$  przeżywalność komórek APPwt i APPsw.

Komórki inkubowano z 10  $\mu$ M ASN przez 48h. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z czterech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newman-Keuls.\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek PC12 kontrolnych,  $p < 0,05$ ; \*\*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek PC12 kontrolnych,  $p < 0,001$ ; ### - Różnica istotna



statystycznie w stosunku do komórek APPwt kontrolnych (niepoddanych działaniu)  $p < 0,001$ ;  $\&\&\&$  - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek APPsw kontrolnych (niepoddanych działaniu)  $p < 0,001$ ; .

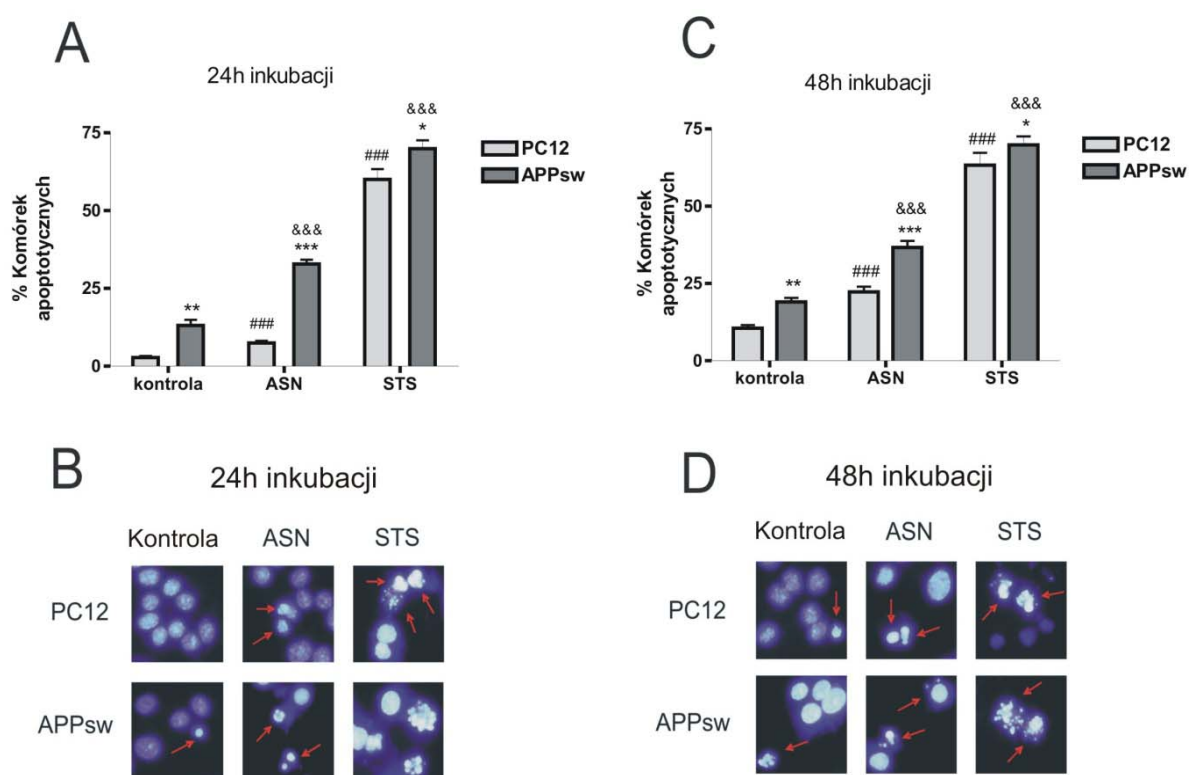
Konsekwentnie przeprowadzono badania morfologii jąder komórkowych pod kątem cech apoptotycznych. Badania w mikroskopie fluorescencyjnym z użyciem barwnika Hoechst 33342 wykazały, że odsetek komórek apoptotycznych w linii APPwt i APPsw był większy w porównaniu z linią PC12 kontrolną, zarówno po 24-, jak i 48-godzinach inkubacji. Ponadto zewnątrzkomórkowa ASN (10  $\mu$ M) zwiększa obumieranie na drodze apoptozy zarówno komórek transfekowanych APP dzikim, jak i zmutowanym. Podobnie jak w przypadku komórek PC12 kontrolnych efekt działania ASN jest mniejszy niż wywołany 1  $\mu$ M staurosporyną (**Rycina 50, Rycina 51**).



**Rycina 50** Zależna od czasu apoptoza wywołana działaniem zewnątrzkomórkowej ASN w komórkach PC12 kontrolnych i APPwt.

Po 24-(A,B) i 48-godzinnej (C,D) ekspozycji komórek PC12 i APPwt na 10  $\mu$ M ASN oraz staurosporynę (STS, 1  $\mu$ M) wykonano barwienie sondą fluorescencyjną Hoechst 33342, po czym liczono procent komórek apoptotycznych. Staurosporyna została użyta jako pozytywna kontrola.

Wartości zostały wyrażone w procentach komórek apoptotycznych (A,C). Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z pięciu niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keuls. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  - Różnica istotna statystycznie APPwt w stosunku do komórek PC12; ####  $p < 0,001$  - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontrolnych (niepoddanych działaniu) komórek PC12; &&&  $p < 0,001$  - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontrolnych (nietraktowanych) komórek APPwt. (B, D) Przykładowe zdjęcia komórek barwionych sondą fluorescencyjną Hoechst 33342. Strzałki pokazują komórki o cechach morfologicznych typowych dla procesu apoptozy (kondensacja chromatyny, jądra pyknotyczne, fragmentacja chromatyny i tworzenie ciałek apoptotycznych).



**Rycina 51** Zależna od czasu apoptoza wywołana działaniem zewnątrzkomórkowej ASN w komórkach PC12 kontrolnych i APPsw.

Po 24-(A,B) i 48-godzinnej (C,D) ekspozycji komórek PC12 i APPsw na 10  $\mu$ M ASN oraz staurosporynę (STS, 1  $\mu$ M) wykonano barwienie sondą fluorescencyjną Hoechst 33342, po czym liczono procent komórek apoptotycznych. Staurosporyna została użyta jako pozytywna kontrola. Wartości zostały wyrażone w procentach komórek apoptotycznych (A,C). Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z pięciu niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keuls. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  - Różnica istotna statystycznie APPsw w stosunku do

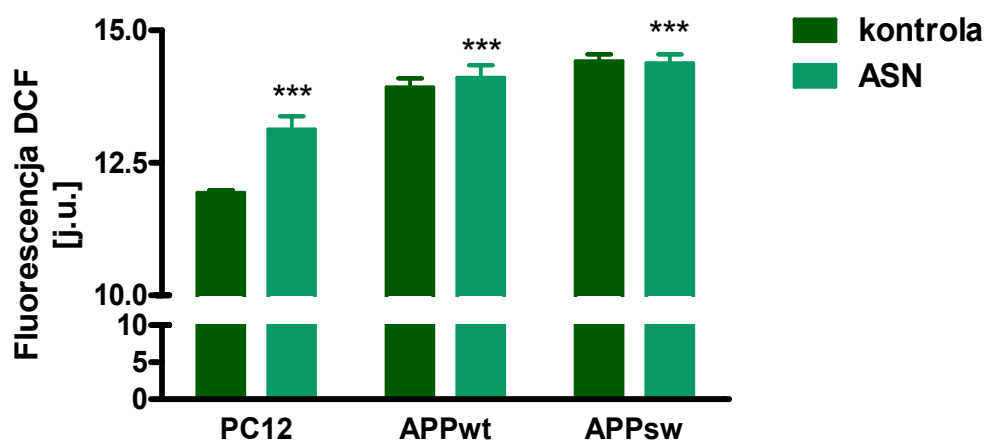
komórek PC12; <sup>###</sup> $p < 0,001$  - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontrolnych (nietraktowanych) komórek PC12; <sup>&&&</sup> $p < 0,001$  - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontrolnych (nietraktowanych) komórek APPsw. (B, D) Przykładowe zdjęcia komórek barwionych sondą fluorescencyjną Hoechst 33342. Strzałki pokazują komórki o cechach morfologicznych typowych dla procesu apoptozy (kondensacja chromatyny, jądra piknotyczne, fragmentacja chromatyny i tworzenie ciałek apoptotycznych).

### Ocena znaczenia stresu oksydacyjnego w tym roli NO w toksyczności $\alpha$ -synukleiny w komórkach transfekowanych APP

Poziom wolnych rodników w komórkach PC12, APPwt i APPsw badano poprzez pomiar utleniania sondy fluorescencyjnej (H<sub>2</sub>DCF-DA).

Otrzymane wyniki pokazały, że poziom wolnych rodników wzrastał wraz ze wzrostem poziomu A $\beta$  w komórkach. Po 4-godzinnej inkubacji w medium o obniżonej zawartości surowicy poziom ten był wyższy o 16% w komórkach APPwt, natomiast w komórkach APPsw o 20% w stosunku do komórek kontrolnych (**Rycina 52**).

ASN nie miała wpływu na znamienne podwyższenie w wyniku działania A $\beta$  poziomu wolnych rodników zarówno w komórkach APPwt, jak i APPsw, natomiast wykazywała ona znaczące działanie w komórkach PC12 (**Rycina 52**).



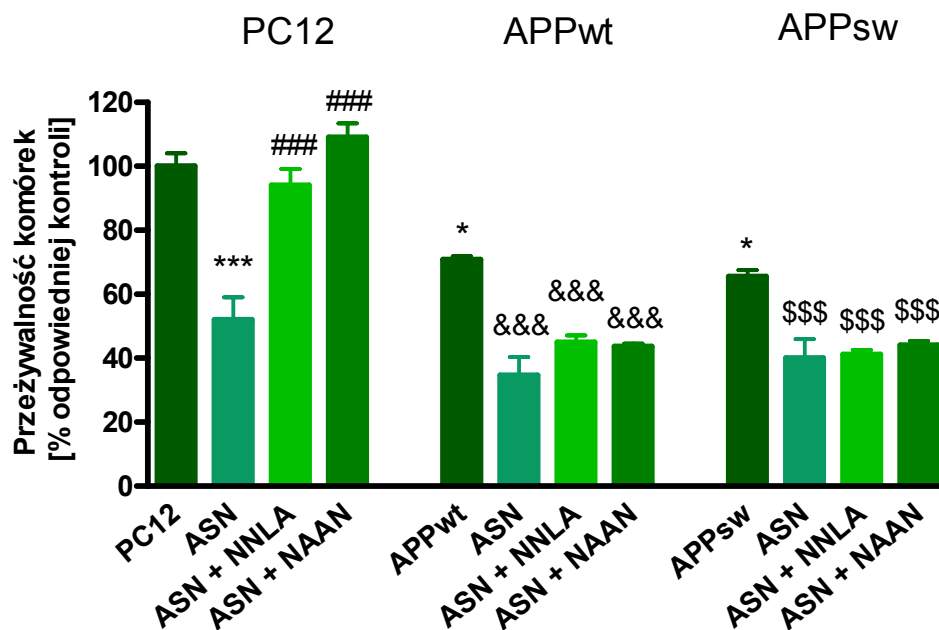
**Rycina 52** Poziom wolnych rodników w komórkach PC12, APPwt i APPsw traktowanych ASN.

Poziom wolnych rodników oznaczano metodą fluorymetryczną z zastosowaniem DCF. Wyniki wyrażono jako intensywność fluorescencji. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń  $\pm$  SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano wieloczynnikową

analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keuls. \*\*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli  $p < 0,001$ .

Kolejne badania miały na celu określenie, czy w stresie oksydacyjnym wywołanym działaniem  $A\beta$  oraz ASN w komórkach APPwt i APPsw jest zaangażowany, podobnie jak w komórkach PC12, tlenek azotu powstały w wyniku działania NOS.

Badania z użyciem testu MTT wykazały, że zastosowanie nieselektywnego inhibitora NOS (NNLA, 100  $\mu\text{M}$ ) oraz specyficznego inhibitora nNOS (NAAN, 50  $\mu\text{M}$ ) nie zapobiegało toksycznemu działaniu  $\alpha$ -synukleiny w komórkach APPwt, ani w komórkach APPsw (**Rycina 53**). Związki te wykazywały jednak cytoprotekcyjne działanie w komórkach PC12 kontrolnych poddanych działaniu ASN.

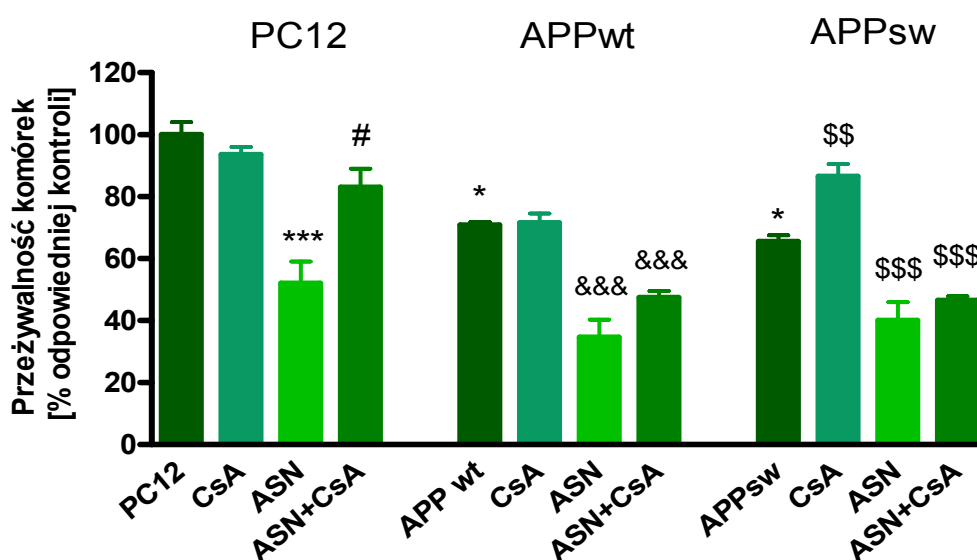


**Rycina 53** Wpływ inhibitorów syntazy tlenku azotu (NOS) na toksyczność  $\alpha$ -synukleiny w komórkach APPwt i APPsw.

Komórki inkubowano z 10  $\mu\text{M}$  ASN oraz jednym z wybranych inhibitorów NOS: NNLA (100  $\mu\text{M}$ ), NAAN (50  $\mu\text{M}$ ) przez 48h. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z czterech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keuls. \*\*\* - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych.

### Wpływ zewnątrzkomórkowej ASN na otwarcie megakanałów mitochondrialnych w komórkach transfekowanych APP

Wpływ ASN na otwarcie megakanałów mitochondrialnych oznaczano pośrednio za pomocą testu MTT z użyciem specyficznego inhibitora MPT cyklosporyny A (CsA, 2  $\mu$ M). Inhibitor ten zapobiegał toksycznemu działaniu A $\beta$  w komórkach APPsw, ale nie APPwt. Zastosowanie CsA powodowało również statystycznie znamiennej wzrost przeżywalności komórek PC12, ale pozostało bez wpływu na przeżywalność komórek APPwt i APPsw traktowanych  $\alpha$ -synukleina (Rycina 54).

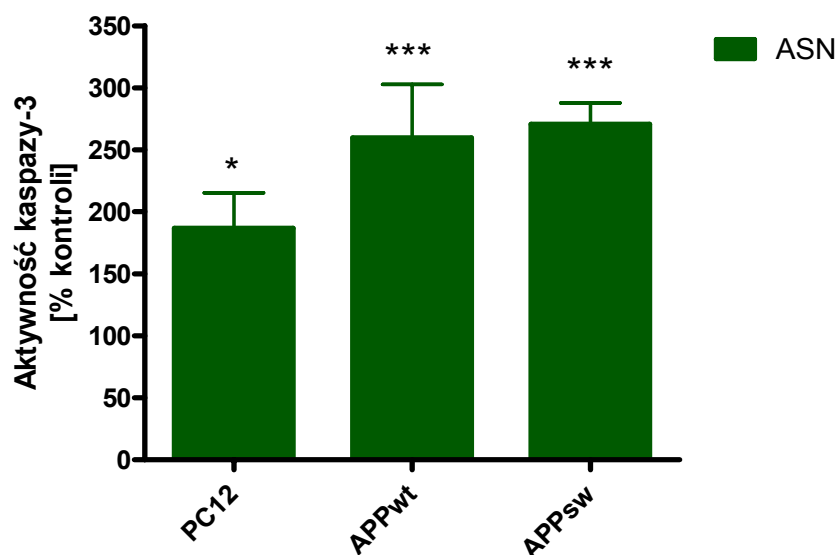


Rycina 54 Wpływ inhibitora MPT na toksyczność ASN w komórkach APPwt i APPsw.

Komórki inkubowano z 10  $\mu$ M ASN oraz cyklosporyną A (CsA, 2  $\mu$ M) przez 48h. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z czterech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keuls. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek PC12 kontrolnych (nietraktowanych); &&&  $p < 0,001$ - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek APPwt kontrolnych (nietraktowanych);  $^{ss}$   $p < 0,01$ ;  $^{sss}$   $p < 0,001$  - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek APPsw kontrolnych (nietraktowanych); #  $p < 0,05$ - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek PC12 traktowanych ASN.

### Aktywacja kaspazy-3 w komórkach transfekowanych APP traktowanych ASN

Aktywność kaspazy-3 analizowano metodą fluorymetryczną z użyciem zestawu CASP-3-F firmy Sigma. Ponieważ z przeprowadzonych wcześniej badań wynika, że maksimum aktywności kaspazy-3 obserwuje się w 8 godzinie po podaniu zewnątrzkomórkowej ASN, w doświadczeniach z komórkami transfekowanymi ograniczono się do analizy aktywności w tym konkretnym punkcie czasowym. Z przeprowadzonych badań wynika, że zewnątrzkomórkowa ASN powoduje istotne zwiększenie aktywności kaspazy-3 zarówno w komórkach kontrolnych, jak i transfekowanych APPwt i APPsw (**Rycina 55**).

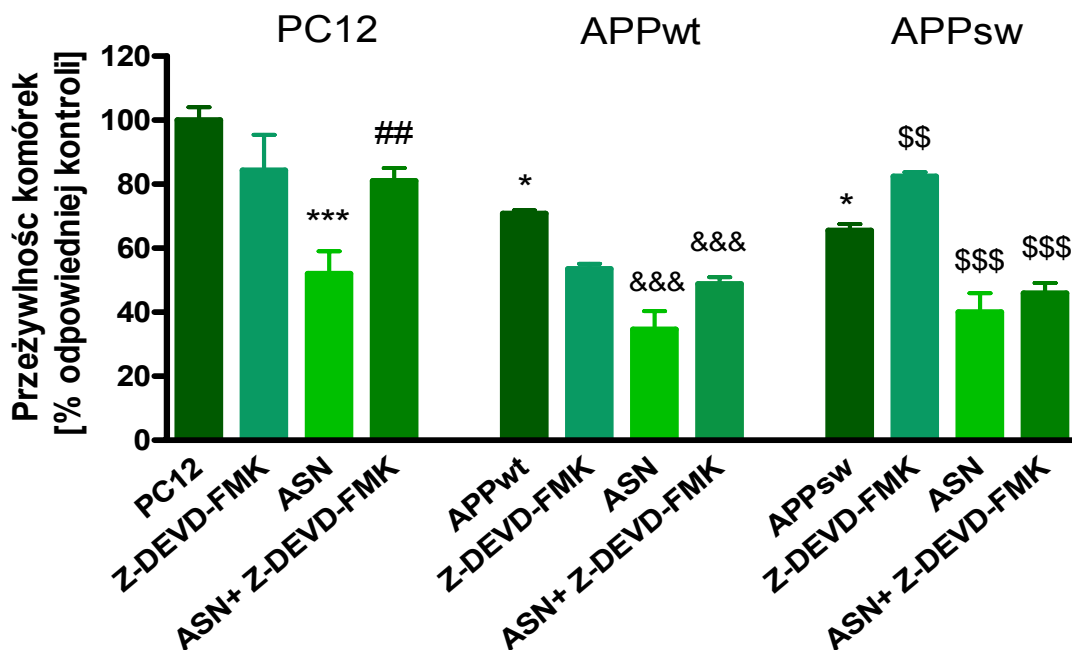


**Rycina 55** Wpływ ASN na aktywność kaspazy-3 w komórkach PC12, APPwt i APPsw.

*Komórki inkubowano z 10  $\mu$ M ASN przez 8h. Aktywność kaspazy-3 analizowano metodą fluorymetryczną. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z trzech niezależnych doświadczeń w dwóch powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keuls. \*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$  - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek PC12 kontrolnych (nietraktowanych).*

Zastosowanie selektywnego inhibitora kaspazy-3 (Z-DEVD-FMK, 100  $\mu$ M) powodowało protekcyjne działanie jedynie w przypadku komórek PC12 traktowanych ASN, natomiast pozostało bez wpływu na przeżywalność komórek APPwt i APPsw traktowanych tym białkiem. Co więcej, inhibitor

ten zapobiegał toksycznemu działaniu A $\beta$  w komórkach APPsw, ale nie APPwt (**Rycina 56**).



**Rycina 56** Wpływ inhibitora kaspazy-3 (Z-DEVD-FMK) na toksyczność  $\alpha$ -synukleiny w komórkach APPwt i APPsw.

Komórki APPwt i APPsw inkubowano z 10  $\mu$ M ASN oraz 100  $\mu$ M Z-DEVD-FMK przez 48h. Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z czterech niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newman-Keuls. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek PC12 kontrolnych (nietraktowanych); &&&  $p < 0,001$ - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek APPwt kontrolnych (nietraktowanych); \$\$  $p < 0,01$ ; \$\$\$  $p < 0,001$  - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek APPsw kontrolnych (nietraktowanych); ##  $p < 0,01$ - Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek PC12 traktowanych ASN.





# Dyskusja

$\alpha$ -Synukleina jest typowym białkiem cytozolowym, dlatego zakładano, że wywiera ona swój patologiczny efekt wyłącznie wewnątrzkomórkowo. Badania ostatnich lat wykazują, że białko to znajduje się również w przestrzeni pozakomórkowej, zarówno w płynie mózgowo-rdzeniowym jak i w osoczu (Borghini i wsp., 2000; El-Agnaf i wsp., 2006; Lee i wsp., 2006; Tokuda i wsp., 2006). Mechanizm sekrecji ASN z komórki nie został do końca wyjaśniony. Ostatnie dane pokazują, że ASN może być uwalniana z synaptoneurozomów podczas stresu oksydacyjnego (Adamczyk i wsp., 2007) i neurodegeneracji (Lee i wsp., 2006), co powoduje wzrost jej stężenia w przestrzeni synaptycznej. Zewnątrzkomórkowa ASN działa neurotoksycznie na drodze różnorodnych mechanizmów (Albani i wsp., 2004; Du i wsp. 2003; Seo i wsp. 2002; Sung i wsp., 2001). Stwierdzono, że ASN hamuje aktywność transportera dopaminy (Adamczyk i wsp., 2006) oraz zaburza homeostazę wapnia poprzez zwiększenie jego napływu do wnętrza komórki (Adamczyk i Strosznajder, 2006). Wykazano, że czynnikiem odpowiedzialnym za patologiczne działanie ASN może być nadmierne uwalnianie NO (Adamczyk i wsp., 2006; Seo i wsp., 2002). W związku z tym, poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za zwiększony poziom NO wydaje się być istotne dla zrozumienia działania ASN. Wobec powyższego prowadzone przez nas badania dotyczyły roli ASN w aktywacji syntazy NO. Uwolniona do przestrzeni pozakomórkowej w procesie neurodegeneracji ASN może przedostawać się do cytoplazmy komórek i działać na aktywność NOS poprzez bezpośrednią interakcję z enzymem, ale również może działać zewnątrzkomórkowo poprzez aktywację odpowiednich receptorów i kanałów jonowych w błonie komórkowej. Nasze badania prowadzone na skrawkach kory mózgowej z hipokampem po raz pierwszy pokazują, że zewnątrzkomórkowa ASN oraz jej fragment, peptyd NAC aktywują syntezę NO zależną od pobudzenia receptora NMDA. Prowadzenie eksperymentów na skrawkach mózgu umożliwiło badanie udziału receptorów glutaminianergicznych w zależnym od ASN uwalnianiu NO. Ponadto ten model badawczy stosunkowo najlepiej odzwierciedla warunki panujące w mózgu ssaków *in vivo*.

Interesującym spostrzeżeniem jest, że  $\beta$ -synukleina, izoforma pozbawiona centralnego fragmentu NAC, pozostaje bez wpływu na aktywność NOS. Sugeruje to, że domena NAC w strukturze białka synukleiny jest niezbędne dla jej interakcji z receptorem NMDA. Wyniki te korespondują z opublikowanymi wcześniej danymi, które pokazują, że większość toksycznego działania ASN jest zależna od obecności tego właśnie fragmentu (Adamczyk i wsp., 2006; Adamczyk i Stoszajder 2006; El-Agnaf i Irvine, 2002).

Działanie ASN nie dotyczy wyłącznie komórek neuronalnych. Ostatnie badania wskazują, że wysokie zewnątrzkomórkowe stężenie ASN pobudza komórki glejowe do wytwarzania NO (Seo i wsp., 2002; Zhang i wsp., 2005). Tlenek azotu uwolniony z mikrogleju przekształca się w nadtlendioazotyn i nitruje  $\alpha$ -synukleinę w neuronach, co zwiększa jej cytotoxycywność (Seo i wsp., 2002). Przedstawione przez nas wyniki pokazują, że w wyniku 30-minutowego działania ASN i NAC dochodzi do aktywacji wyłącznie neuronalnej izoformy NOS (nNOS). W badanym czasie nie zaobserwowaliśmy aktywacji izoformy indukowanej (iNOS) ani zmian izoformy endotelialnej (eNOS). nNOS występuje konstytutywnie nie tylko w neuronach, ale również w komórkach gleju (Bhat i Feinstein 2006; Togashi i wsp., 1997; Kawakamia i wsp., 1998). W astrocytach, oligodendrocytach i mikrogleju występują również funkcjonalne receptory NMDA (Verkhratsky i wsp., 2007). Ponadto komórki glejowe odpowiadają na stres i czynniki prozapalne aktywacją zarówno konstytutywnej jak i indukowanej izoformy NOS (Bhat i Feinstein 2006). W związku z powyższym trudno określić, czy w stosowanym przez nas układzie eksperymentalnym ASN działa wyłącznie na neurony pomimo, że do badań używano oczyszczoną z istoty białej kory mózgowej i hipokamp.

Produktem reakcji katalizowanej przez NOS jest NO, ale w specyficznych warunkach (niski poziom substratu, argininy lub kofaktora, tetrahydrobiopteryny) enzym ten może również wytwarzać anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^-$ ) lub nadtlendioek wodoru ( $H_2O_2$ ). Tlenek azotu jest wolnym rodnikiem charakteryzującym się niską reaktywnością. Jednakże równoczesna produkcja NO i  $O_2^-$  w warunkach stresu oksydacyjnego prowadzi do wytworzenia nadtlendioazotynu (ONOO $^-$ ) (Koppenol i wsp., 1992). Związek ten jest bardzo silnym utleniaczem, który może modyfikować

białka, lipidy oraz kwasy nukleinowe, powodować uszkodzenia mitochondriów i śmierć neuronów (Kilbourn i wsp., 2000). Badania *post mortem* mózgow osób z chorobami neurodegeneracyjnymi wykazują obecność nitrowanych białek, których powstawanie jest wynikiem działania ONOO<sup>-</sup> (Good i wsp., 1998). Nasze badania pokazują, że zarówno ASN, jak i jej centralny fragment, zwiększają stres oksydacyjny, co może prowadzić do powstawania ONOO<sup>-</sup>. Poprzednio uzyskane dane wskazują, że inkubacja skrawków mózgu szczura z peptydem NAC skutkuje fragmentacją DNA, która może być wynikiem nadmiernego wytwarzania ONOO<sup>-</sup> (Adamczyk i wsp., 2005). Ponadto udokumentowano, że zarówno NO jak i ONOO<sup>-</sup> mogą hamować aktywność poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego w mitochondriach, prowadząc do zaburzenia równowagi energetycznej komórki (Ebadi i Sharma, 2003). Nadtlenoazotyn oraz inne reaktywne formy azotu modyfikują działanie wielu białek poprzez ich nitrację lub S-nitrozylację (Gu i wsp., 2002; Cho i wsp., 2009; Nakamura i Lipton, 2009). Taka modyfikacja reszt aminokwasowych może zaburzać prawidłową strukturę białek, prowadzić do ich oligomeryzacji i zaburzenia funkcji, co bezpośrednio łączy stres nitrozacyjny ze zmianami molekularnymi wykrytymi w chorobach neurodegeneracyjnych (Good i wsp., 1998). Wydaje się, że aktywacja uwalniania NO przez ASN może zapoczątkowywać proces cytotoksyczności i neurodegeneracji. W przedstawionych w tej pracy wynikach, 30-minutowa inkubacja skrawków w obecności ASN inicjuje kaskadę zdarzeń prowadzących do uwalniania nadmiernej ilości NO, procesów nitracji i S-nitrozylacji, wzrostu poziomu wolnych rodników i stresu oksydacyjnego, co w konsekwencji powoduje obumieranie komórek.

Ostatnie badania zademonstrowały, że ASN może stymulować aktywność NOS w mitochondriach oraz prowadzić do zwiększenia wewnątrzmitochondrialnego stężenia jonów wapnia (Parihar i wsp., 2008). Nasze wyniki pokazują, że zablokowanie receptora NMDA przez specyficznych antagonistów MK-801 oraz APV zapobiega stymulacji NOS wywołanej działaniem ASN i NAC. Mechanizm zależnej od receptora NMDA aktywacji nNOS przez ASN związany jest prawdopodobnie ze zwiększonym wewnątrzkomórkowym poziomem Ca<sup>2+</sup>. W warunkach patologicznych pobudzenie receptorów NMDA skutkuje nadmiernym napływem jonów Ca<sup>2+</sup>, co może inicjować szereg procesów prowadzących do cytotoksyczności (Bojarski i wsp., 2008). Wcześniejsze badania wskazują, że

zewnątrzkomórkowa ASN stymuluje również otwarcie zależnych od potencjału kanałów wapniowych typu N (Adamczyk i Strosznajder, 2006). Zwiększone wewnątrzkomórkowe stężenie  $Ca^{2+}$  prowadzi do aktywacji wielu zależnych od wapnia enzymów, w tym nNOS. Poprzednie wyniki pokazują, że ASN może, poprzez swoją domenę NAC, wiązać się z białkami błonowymi, co skutkuje modulacją funkcji zakończeń synaptycznych (Wersinger i wsp., 2003). Na podstawie powyższych danych można sugerować, że zewnątrzkomórkowa ASN wchodzi w interakcję z błoną komórkową lub bezpośrednio z kanałami jonowymi i aktywuje receptor NMDA, prowadząc do jego otwarcia i napływu jonów  $Ca^{2+}$ , co w konsekwencji doprowadza do aktywacji nNOS. Zarówno kompetytywny jak i nie kompetytywny antagonistą receptora NMDA zapobiegają aktywacji NOS wywołanej przez ASN. Uzyskane wyniki sugerują więc bezpośrednią interakcję ASN z receptorem NMDA i zmiany w jego konformacji. Podobne niespecyficzne działanie na receptory glutaminianergiczne zaobserwowano w przypadku oligomerów A $\beta$  (Pellistri i wsp., 2008). Peptydy A $\beta$  pobudzają również uwalnianie glutaminianu, hamują jego wychwyty zwrotny oraz prowadzą do zwiększenia ilości metabotropowych receptorów dla tego neuroprzekaźnika (Kabogo i wsp., 2008; Matos i wsp., 2008, Li i wsp., 2009; Casley i wsp., 2009). Nasze poprzednie wyniki pokazały, że zewnątrzkomórkowa ASN obniża wychwyty zwrotne DA (Adamczyk i wsp., 2006). Zademonstrowano również, że nadekspresja ASN skutkuje obniżeniem poziomu transportera norepinefryny (Jeannotte i wsp., 2007). Chociaż nie wykazano działania ASN na wychwyty glutaminianu, istnieje możliwość, że może ona również oddziaływać na receptor NMDA poprzez regulację zewnątrzkomórkowego poziomu tego neuroprzekaźnika.

Przekaznictwo informacji na drodze glutaminianergicznej z udziałem receptorów NMDA i nNOS może prowadzić do stresu oksydacyjnego i przzerwania ciągłości nici DNA (Pieper i wsp., 2000). Jednym z najczulszych wskaźników takiego uszkodzenia jest aktywacja polimerazy poli (ADP-rybozy). W tym kontekście PARP spełniałby rolę odbiorcy sygnału od receptora NMDA przy udziale NO, w tym też poprzez przejściowe uszkodzenie DNA (Strosznajder i wsp., 2000). Wcześniejsze dane pokazują, że aktywacja receptora NMDA prowadzi do zaburzenia funkcji mitochondriów oraz stresu oksydacyjnego, co skutkuje aktywacją PARP (Duan i wsp., 2007). Ponadto wykazano, że NO może stymulować poli-ADP

rybozylację PARP i prowadzić do nadmiernej aktywacji tego enzymu, a w konsekwencji do obumierania komórek w wyniku wyczerpania ATP (Zhang i wsp., 1994). Badania Strosznajder i wsp., (2000) wykazały, że NO oraz inne wolne rodniki są odpowiedzialne za wywołaną działaniem A $\beta$  aktywację PARP-1 w hipokampie. Kolejne eksperymenty na hodowli komórek PC12 wykazały zmiany aktywności PARP uwarunkowane ilością uwalnianych peptydów A $\beta$  oraz obecnością mutacji w białku APP. W zależności od tych parametrów, z którymi korelował również wzrost poziomu NO, zaobserwowano wzrost aktywności PARP-1 w komórkach transfekowanych genem dla APP typu dzikiego oraz dramatyczne obniżenie aktywności PARP-1 w komórkach transfekowanych APP z podwójną mutacją szwedzką (Strosznajder i wsp., dane nieopublikowane). Uzyskane przez nas wyniki pokazują, że inkubacja z zewnątrzkomórkową ASN prowadzi do znaczącego obniżenia aktywności PARP-1 zarówno w korze z hipokampem, jak i w prążkowie. NO wydaje się być częściowo odpowiedzialny za ten efekt. W zgodzie z naszymi wynikami są dane pokazujące, że NO może hamować aktywność PARP-1 poprzez wpływ na domenę palca cynkowego tego enzymu, przez co uniemożliwia jego wiązanie z DNA (Sidorkina i wsp., 2003). Badania Pytlowany i wsp. (2008) pokazują, że donator NO nitroprusydek sodu (SNP) również prowadzi do znacznego obniżenia aktywności PARP w komórkach PC12. Inne dane literaturowe wykazują z kolei stymulujący wpływ aktywowanej przez NO kaskady wolnorodnikowej na zależną od uszkodzenia DNA aktywność PARP-1 (Zhang i wsp., 1994). Zjawisko inhibicji PARP-1 przez ASN, SNP i A $\beta$  w komórkach APPsw jest bardzo ważne, ale nie w pełni zrozumiałe. Ponieważ PARP-1 jest najlepszym dla siebie substratem, istnieje duże prawdopodobieństwo, że w wyniku działania powyższych czynników ulega on autorybozylacji, co prowadzi do zahamowania jego aktywności. Zjawisko przejściowej aktywacji, a następnie inhibicji PARP-1 obserwowano również w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem jonów żelaza II na frakcję jądrową uzyskiwaną z hipokampa mózgu szczura (Strosznajder i wsp., 2005). Prezentowane w tej pracy wyniki otrzymane na skrawkach mózgu szczura wskazują, że już krótkotrwała, trzydziestominutowa inkubacja z ASN powoduje obniżenie aktywności PARP-1. Specyficzny inhibitor konstytutywnych izoform NOS (NNLA) częściowo zapobiega temu zjawisku. Dokładny mechanizm działania ASN na aktywność PARP-1 nie jest znany. Ponieważ podczas krótkotrwałej

inkubacji skrawków z ASN nie zaobserwowano aktywacji kaspazy-3, jak również zmian poziomu PARP-1 (dane nie pokazane) wydaje się, że do obniżenia aktywacji PARP-1 w wyniku krótkotrwałego działania ASN dochodzi na drodze niezależnej od jego degradacji. Wcześniejsze badania wskazują, że nadmiar powstającego w komórkach NO może bezpośrednio S-nitrylować PARP-1, a przez to hamować aktywność tego enzymu. Sugeruje się, że ta modyfikacja może stanowić negatywne sprzężenie zwrotne (Zhiyuan Yu i wsp., 2006). Na podstawie powyższych danych można wnioskować, że w przypadku działania ASN, NO uwolniony w nadmiernej ilości może wchodzić w bezpośrednią interakcję z białkiem PARP-1 i prowadzić do zahamowania aktywności tego enzymu. Interesującym spostrzeżeniem jest, że centralny fragment struktury ASN, peptyd NAC w formie wolnej nie wywiera wpływu na aktywność PARP. Ponieważ wcześniejsze dane pokazują, że fragment ten jest odpowiedzialny za aktywację NOS, wskazuje to, że w naszym układzie badawczym nitrozylacja PARP nie jest jedynym czynnikiem prowadzącym do obniżenia aktywności tego enzymu. Skoro inhibitor konstytutywnych izoform NOS (NNLA) tylko częściowo zapobiega działaniu ASN na PARP, nie można wykluczyć, że za inhibicję tego enzymu może być również odpowiedzialna bezpośrednia interakcja całej cząsteczki ASN z PARP-1. Hipotezę tę częściowo potwierdzają nasze wstępne wyniki, które wskazują translokację ASN do jądra komórkowego neuronów.

Wyniki uzyskane z badań prowadzonych na materiale izolowanym z mózgu szczura prezentują, że krótkotrwałe działanie zewnątrzkomórkowej ASN może prowadzić do zwiększenia poziomu NO na drodze zależnej od pobudzenia receptora NMDA. Z kolei eksperymenty przeprowadzone na linii unieśmiertelnionych neuronów hipokampa (HT22) wskazują, że w wyniku długotrwałego oddziaływania ASN dochodzi nie tylko do zwiększenia aktywności NOS, ale również do zmiany ekspresji genu dla tego enzymu. Sugeruje to, że zewnątrzkomórkowa ASN może powodować trwałe zmiany w aktywności NOS i poziomie NO, co może powodować zaburzenia funkcjonowania neuronów.

$\alpha$ -Synukleina jest bogato reprezentowana w neuronach hipokampa, zarówno w części presynaptycznej jak i somatodendrytycznej (Andringa i wsp., 2003). Ponadto w tej części mózgu zaobserwowano, że nadekspresja

ASN towarzyszy procesom patologicznym (Galvin i wsp., 1999), a potrojenie genu SNCA w dziedzicznej PD skutkuje obumieraniem głównie neuronów hipokampa (Farrer i wsp., 2004). W niniejszej pracy wykazano, że podana zewnątrzkomórkowo ASN może, poprzez zwiększenie aktywności i ekspresji NOS, wywierać niekorzystne działanie na komórki hipokampalne. Poprzednie dane pokazały, że tlenek azotu jest jednym z kluczowych czynników odpowiedzialnych za obumieranie istotnej puli komórek hipokampa po niedokrwieniu mózgu (Strosznajder i wsp., 1994; Chalimoniuk i Strosznajder, 1998; Culmsee i wsp., 2005). Zwiększenie stężenia NO w tych warunkach jest wynikiem aktywacji neuronalnej izoformy NOS (nNOS) (Chalimoniuk i Strosznajder, 1998). Systemowe podawanie inhibitora neuronalnej izoformy NOS, 7-nitroindazolu (7-NI) zmniejsza rozmiar lezji wywołanej domózgowym wstrzykiwaniem kwasu malonowego. W warunkach tych 7-NI hamuje powstawanie mleczanu, rodnika hydroksylowego oraz 3-nitrotyrozyny w mózgu (Schulz i wsp. 1997).

Uzyskane przez nas dane pokazują, że w wyniku długotrwałego, 24-godzinnego działania ASN dochodzi do istotnego zwiększenia ekspresji nNOS, podczas gdy ekspresja pozostałych izoform NOS nie ulega zmianie. Wcześniejsze dane pokazują, że w procesie starzenia dochodzi do zmian ekspresji poszczególnych izoform NOS w mózgu. Podczas gdy poziom neuronalnej izoformy (nNOS) jest obniżony, ekspresja eNOS znacznie się zwiększa (Jesko i wsp., 2003; Strosznajder i wsp., 2004). Z kolei w mózгах osób z AD dochodzi do zwiększenia poziomu wszystkich izoform NOS. Podczas gdy zaburzenia ekspresji nNOS zaobserwowano głównie w neuronach, immunoreaktywność iNOS i eNOS była zwiększona zarówno w neuronach jak i komórkach gleju (Luth i wsp., 2002). Badania Stepanichev i wsp. (2008) pokazały, że A $\beta$  powoduje istotne zwiększenie aktywności nNOS w neuronach hipokampa, ale nie wpływa na ekspresję tego enzymu. Ponadto zaobserwowano zwiększoną ekspresję iNOS w neuronach i astrocytach otaczających złoże amyloidowe (Rodrigo i wsp., 2004). Modulacja poziomu i aktywności nNOS i iNOS jest obserwowana również w PD. Sugeruje się, że w tej chorobie dochodzi do nadmiernej ekspresji iNOS w wyniku proliferacji i aktywacji mikrogleju i makrofagów, co skutkuje obumieraniem neuronów istoty czarnej (Iravani i wsp., 2002). Zademonstrowano, że 7-NI hamuje neurotoksyczne działanie MPTP na neurony dopaminergiczne i zapobiega zaburzeniom neurologicznym u

myszy, co wskazuje również na istotny udział nNOS w patologii PD (Watanabe i wsp., 2008). Chociaż nasze wyniki na mózgu szczura i w komórkach HT22 wskazują, że zarówno 30-minutowa jak i 8- oraz 24-godzinna inkubacja z ASN nie wpływa na aktywność i ekspresję iNOS, to jednak nie wiemy, czy do aktywacji tej izoformy nie dochodzi w innym punkcie czasowym. Ostatnie badania przeprowadzone w naszym Zakładzie pokazały, że w wyniku dootrzewnowego podawania LPS dochodzi do wielokrotnego zwiększenia ekspresji iNOS w hipokampie 3 godziny po iniekcji, po czym już w 6 godzinie obserwuje się całkowity spadek ilości mRNA dla tej izoformy (Czapski i wsp., 2009). W innych badaniach zaobserwowano, że długotrwałe podawanie A $\beta$  skutkuje zwiększeniem zarówno ekspresji jak i aktywności iNOS w hipokampie (Tran i wsp., 2001).

Ostatnie badania pokazały, że działanie wolnych rodników, w tym NO, może prowadzić do akumulacji ASN wewnątrz jąder komórkowych (Gentile i wsp., 2008; Specht i wsp., 2005). Może to stanowić istotną przyczynę neurodegeneracji zarówno neuronów jak i oligodendrocytów, co pokazują badania *post mortem* mózgow chorych na atrofię wielosystemową (Lin i wsp., 2004). Wykazano, że w wyniku działania stresu oksydacyjnego dochodzi do translokacji C-końcowego, 10 kDa fragmentu ASN do jądra komórek dopaminergicznych (Xu i wsp., 2006). W badaniach *in vitro* stwierdzono, że stres oksydacyjny może również prowadzić do translokacji ASN w wyniku przerwania ciągłości błony jądrowej (Sangchot i wsp., 2002). Ponadto po dootrzewnowym podaniu myszom herbicydu paraquatu zaobserwowano istotne zwiększenie immunoreaktywności ASN zarówno w cytozolu jak i jądrach neuronów istoty czarnej (Goers i wsp., 2003). Pokazano, że w jądrze komórkowym ASN może tworzyć specyficzne kompleksy z histonami, co zwiększa jej oligomeryzację do nierozpuszczalnych fibryli (Goers i wsp., 2003). Jądrowa lokalizacja ASN jest zwiększona w przypadku mutacji A30P oraz A53T i skutkuje neurotoksycznością, poprzez zahamowanie acetylacji histonów (Kontopoulos i wsp., 2006). Zademonstrowano, że ASN zlokalizowana w jądrze ma właściwości czynnika transkrypcyjnego i powoduje obniżenie ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2 oraz zwiększenie poziomu mRNA dla kinazy syntazy glikogenu-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) (Yuan i wsp., 2008). Istnieje prawdopodobieństwo, że również w naszym układzie badawczym dochodzi do translokacji ASN i jej bezpośredniego wpływu na ekspresję genu dla nNOS, jednakże hipoteza ta wymaga weryfikacji.



Nasze wyniki uzyskane z mózgu szczura pokazują, że zewnątrzkomórkowa ASN w istotny sposób obniża aktywność jednego z jądrowych enzymów PARP-1. Analogicznie jak w przypadku NOS szukaliśmy odpowiedzi na pytanie, czy ASN wpływa również na ekspresję i poziom białka dla tego enzymu. Uzyskane przez nas dane wskazują, że w wyniku działania ASN dochodzi do stopniowego, zależnego od czasu inkubacji, obniżenia immunoreaktywności PARP-1 we frakcji jądrowej. W wyniku działania ASN nie dochodzi jednak do zmiany ekspresji genu PARP-1, co wskazuje, że obniżenie poziomu tego białka jest wynikiem wyłącznie jego degradacji. Wiadomo, że PARP-1 jest preferencyjnym substratem dla kaspazy-3. W wyniku aktywacji tego enzymu dochodzi do cięcia PARP-1 z powstaniem fragmentów o wielkości 89-kDa i 21-kDa (Ferrer i Planas, 2003; Chaitanya i Babu, 2009). Uważa się, że obecność 89-kDa produktu degradacji PARP-1 w cytoplazmie jest najwcześniejszym wskaźnikiem procesu apoptozy zależnej od kaspaz. Nasze wyniki wskazują, że w wyniku działania ASN w komórkach hipokampa HT22 dochodzi do aktywacji kaspazy-3 i degradacji PARP z powstawaniem produktu o masie cząsteczkowej 89-kDa. Wyniki te korespondują z wcześniejszymi danymi, które pokazują, że toksyczne działanie zewnątrzkomórkowej ASN wyraża się poprzez zależną od NO aktywację kaspazy-3 w neuronach (Seo i wsp., 2002; Desplats i wsp., 2009). Ponadto w warunkach, w których dochodzi do zwiększenia poziomu ASN wewnątrz neuronów, również obserwuje się aktywację kaspazy-3 (Li i wsp., 2010; Kalivendi i wsp., 2004). Obecność aktywnej kaspazy-3 stwierdzono w zdegenerowanych neuronach istoty czarnej w modelu choroby Parkinsona wywołanej podaniem 6-OHDA (Marinova-Mutafchieva i wsp., 2009; da Costa i wsp., 2009), jak również w hodowlach pierwotnych neuronów poddanych działaniu A $\beta$  (Liang i wsp., 2009). W rozważanych wcześniej badaniach zademonstrowaliśmy, że NO powstały w wyniku działania ASN jest częściowo odpowiedzialny za inhibicję PARP-1. Praca Svobody i wsp. (2009) pokazuje, że aktywacja NOS i powstawanie NO może przyczynić się do aktywacji kaspazy-3 w komórkach gleju poddanych działaniu L-glutaminy. W innych badaniach wykazano, że donor NO, nitroprusydek sodu (SNP) wywołuje obumieranie komórek neuroblastoma SH-SY5Y na drodze apoptozy zależnej od kaspazy-3 (Park i wsp., 2009). Ponadto zademonstrowano, że wśród licznych procesów patologicznych towarzyszących niedokrwieniu mózgu czy PD, jednym z

istotnych elementów odpowiedzialnych za degenerację neuronów jest zwiększenie ekspresji i aktywności iNOS lub/i nNOS oraz aktywacja kaspazy-3 (Tu i wsp., 2009; Lam i wsp., 2008). Nasze badania są zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych i pokazują, że nadmierna ilość NO powstałego w wyniku zwiększenia aktywności NOS jest odpowiedzialna za aktywację kaspazy-3 i przez to pośrednio wpływa na obniżenie poziomu PARP-1.

W naszych badaniach stwierdziliśmy, że chociaż maksymalną aktywność kaspazy-3 obserwuje się w 8 godzinie działania ASN, produkt jej proteolitycznego działania, 89-kDa fragment PARP-1, osiąga wysoki poziom dopiero po 24-godzinnym działaniu ASN. Chociaż trudno wyjaśnić przyczynę tego zjawiska, to jednak dodatkowe badania przeprowadzone za pośrednictwem testu ELISA oraz pozytywny efekt inhibitora Z-DEVD-FMK, potwierdzają, że w warunkach działania ASN dochodzi do proteolitycznego cięcia PARP-1 wyłącznie przez kaspazę-3. Podobny efekt zaobserwowano również w innych badaniach. W hodowli pierwotnej neuronów poddanych działaniu etanolu maksimum aktywności kaspazy-3 przypadał na 6 godzinę inkubacji, podczas gdy największą ilość ciętego PARP-1 wykryto po 24-godzinach (Cherian i wsp., 2009). Etopozyd, inhibitor topoizomerazy II, wywierał podobne działanie w komórkach nowotworowych MCF7 (Benjamin i wsp., 1998).

Wiele badań wskazuje, że proteolityczne cięcie PARP-1 przez kaspazę-3 jest zjawiskiem cytoprotekcyjnym (Williams i wsp., 2008; Cherian i wsp., 2009). Fibroblasty produkujące białko PARP-1 odporne na proteolityczną degradację wykazywały zwiększoną wrażliwość na działanie czynników toksycznych (Herceg i Wang, 1999). Wysoki poziom cynku w neuronach zawoju zębatego u ludzi zakażonych wirusem choroby Borna powodował hamowanie aktywności kaspazy-3 oraz hiperaktywację PARP-1 przez co ułatwiał neurodegenerację. Zjawiska takiego nie zaobserwowano w astrocytach, w których aktywność kaspazy-3 była wysoka (Williams i wsp., 2008). Wyniki te sugerują, że proteolityczne cięcie PARP działa protekcyjnie, ale tylko w warunkach hiperaktywacji tego enzymu. Nasze badania na mózgu szczura wykazały, że w wyniku działania ASN dochodzi do zahamowania aktywności PARP-1. W tym układzie dodatkowe obniżenie poziomu tego białka w wyniku aktywacji kaspazy może w istotny sposób

zaburzać fizjologiczne procesy, w których PARP-1 bierze udział i przez to działać niekorzystnie.

Dotychczasowe dane wskazują, że najbardziej wrażliwe na toksyczne działanie ASN są komórki dopaminergiczne (Sidhu i wsp., 2004; Wersinger i wsp., 2004). W związku z tym badania dotyczące mechanizmu śmierci komórek prowadzono na linii pheochromocytoza PC12, charakteryzującej się syntezą amin katecholowych, w tym dopaminy. Do chwili obecnej jest to jedna z najlepiej scharakteryzowanych linii komórkowych, oraz model badawczy szeroko stosowany w doświadczeniach *in vitro* dotyczących toksyczności A $\beta$  oraz  $\alpha$ -synukleiny (Qian i wsp., 2008; Girigoswami i wsp., 2008; Hu i wsp., 2008), jak również wykorzystywany w badaniu cytotoksycznego efektu wielu innych substancji (Piga i wsp., 2007).

Dane prezentowane w tej pracy pokazują, że zewnątrzkomórkowa ASN powoduje zaburzenie funkcji mitochondriów oraz aktywuje programowaną śmierć komórek PC12. Wyniki te korespondują z pracą Seo i wsp. (2002), w której zaprezentowano, że zewnątrzkomórkowa ASN prowadzi do nadekspresji białka Bax, obniżenia poziomu Bcl-xL, zmian w mitochondriach oraz uwolnienia cytochromu c. Konsekwencją tych zdarzeń jest uruchomienie kaskady kaspaz, co prowadzi do obumierania komórek (Seo i wsp., 2002). Zewnątrzkomórkowa ASN w formie zagregowanej aktywuje również mikrogleję, co skutkuje uwolnieniem znacznej ilości wolnych rodników i śmiercią neuronów dopaminergicznych (Zhang i wsp., 2005). Na podstawie otrzymanych przez nas wyników trudno jednoznacznie określić, jaki typ śmierci zachodzi w wyniku działania ASN. Zaobserwowaliśmy, że połowa obumarłych komórek wykazuje morfologiczne zmiany charakterystyczne dla procesu apoptozy, jak kondensacja chromatyny, czy fragmentacja jądra. Istnieje możliwość, że pozostałe komórki mogą umierać na drodze innych form programowanej śmierci, jak również nekrozy. Wyniki poprzednich badań wskazują, że  $\alpha$ -synukleina może wywoływać śmierć komórek zarówno na drodze apoptozy (Seo i wsp., 2002; El-Agnaf i wsp., 1998; Du i wsp., 2003; Flower i wsp., 2005), jak i nekrozy oraz innych mechanizmów programowanej śmierci (Buttner i wsp., 2008; Vekrellis i wsp., 2009).

Wiele danych podkreśla znaczenie zarówno monomerycznej jak i zagregowanej ASN w patologii chorób neurodegeneracyjnych (Hashimoto i

Maslah, 1999; Mandal i wsp., 2006). Nadprodukcja i/lub nadmierna akumulacja ASN w komórkach hodowanych *in vitro* powodowała selektywną degenerację neuronów dopaminergicznych (Xu i wsp., 2002). Ponadto u myszy z ekspresją zmutowanej ASN (A53T) zaobserwowano wczesne procesy neurodegeneracji oraz agregację ASN w mózgu (Lee i wsp., 2002). Zmutowana, zagregowana ASN lub peptyd NAC podawane zewnątrzkomórkowo zwiększały obumieranie komórek neuroblastoma (SH-SY5Y) w warunkach *in vitro* (El-Agnaf i wsp., 1998; Sung i wsp., 2001). Ekspresja normalnej (natywnej) oraz zmutowanej (A53T, A30P) ASN w mysich komórkach zwoju dolnego nerwu błędnego skutkuje aktywacją procesu apoptozy (Saha i wsp., 2000). Zwiększone stężenie ASN koreluje z wystąpieniem cech apoptotycznych również w komórkach gleju (Stefanova i wsp., 2001) oraz limfoblastach (Kim i wsp., 2004). Uzyskane przez nas wyniki prezentują, że zagregowana forma ASN pozostaje bez wpływu na przeżywalność komórek PC12. To zgadza się z ostatnio opublikowanymi danymi biochemicznymi, w których zwraca się uwagę na istotne znaczenie protofibrilarnych form białek w procesie neurodegeneracji, podczas gdy powstawanie nierozpuszczalnych agregatów uznawane jest za formę obrony komórki przed toksycznością oligomerów (Chen i Feany, 2005; Shults, 2006). Jako poparcie powyższej hipotezy mogą służyć dane uzyskane przez Lee i wsp. (2008), które pokazują, że agregaty zewnątrzkomórkowej ASN przedostają się do wnętrza komórki na drodze endocytozy zależnej od receptora i są natychmiast degradowane w lizosomach. Natomiast monomeryczne formy ASN mogą swobodnie przechodzić przez błonę komórkową, ale nie są we wnętrzu komórki degradowane i mogą wywierać efekt cytotoksyczny (Lee i wsp., 2008).

Wyniki badań przeprowadzonych na hodowlach komórkowych w warunkach *in vitro* wskazują na istnienie wielu mechanizmów odpowiedzialnych za toksyczność ASN. Należą do nich między innymi zaburzenia funkcji mitochondriów, siateczki śródplazmatycznej oraz aktywacja procesu autofagii (Hsu i wsp., 2000; Stefanis i wsp., 2001; Smith i wsp., 2005a). W komórkach drożdży, u których wyindukowano ekspresję natywnej i zmutowanej ASN, zaobserwowano charakterystyczne cechy procesu apoptozy, takie jak kondensacja chromatyny, fragmentacja jądra oraz uwalnianie cytochromu c z mitochondriów (Flower i wsp., 2005). Ponadto ASN wywoływała aktywację kinaz MAP i translokację czynnika

transkrypcyjnego NFκB (Seo i wsp., 2002). Dokładny mechanizm obumierania komórek w wyniku działania ASN nie został jednakże do końca poznany. W warunkach sprzyjających jej agregacji, ASN zwiększa podatność komórek na działanie neurotoksyn. Nadekspresja zmutowanej (A30P i A53T), jak również pozbawionej domeny C-końcowej α-synukleiny w komórkach neuroblastoma (SH-SY5Y) znamienne zwiększała stres oksydacyjny oraz obumieranie komórek wywołane przez MPP+ czy nadtlenek wodoru (Kanda i wsp., 2000). Jednoczesna ekspresja natywnej lub zmutowanej (A30P) ASN z transporterem dopaminy wywoływała śmierć komórek wskutek zaburzenia potencjału błony komórkowej, uszkodzenia mitochondriów i stresu oksydacyjnego wywołanego przez nadmierne nagromadzenie wewnątrzkomórkowej dopaminy (Moussa i wsp., 2004). Nasze dane pokazują, że ASN może nie tylko potęgować działanie neurotoksyn, ale sama, działając zewnątrzkomórkowo, powoduje aktywację stresu oksydacyjnego i istotne zaburzenia funkcji mitochondriów. Wewnątrzkomórkowa akumulacja ASN jest związana z wolnorodnikowym uszkodzeniem białek i lipidów (Bossy-Wetzel i wsp., 2004; Lin i Beal, 2006), a oksydacyjne modyfikacje makromolekuł mogą odgrywać istotną rolę w neurotoksyczności wywołanej przez to białko.

Dane literaturowe wskazują, że ASN może wchodzić w bezpośrednią interakcję z mitochondriami, a efekt ten wydaje się być zależny do stężenia tego białka (Parihar i wsp., 2009). Inne badania pokazują, że zarówno rekombinowana (Ding i wsp., 2002) jak i zmutowana ASN może łączyć się z błonami organelli komórkowych (Smith i wsp., 2005), a interakcja ta wydaje się być istotnym elementem toksyczności tego białka (Volles i Lansbury, 2007). Mitochondria to również główne miejsce neurotoksycznego działania ASN w komórce (Perier i wsp., 2007). Co więcej, wykazano, że ASN może być do mitochondriów translokowana (Cole i wsp., 2008; Liu i wsp., 2009). Udowodniono, że N-końcowy 32-aminokwasowy fragment ASN zawiera sygnał lokalizacji mitochondrialnej, co umożliwia jej przedostawanie się do tych organelli, ponadto ASN zaimportowana do mitochondriów lokalizuje się w pobliżu wewnętrznej błony mitochondrialnej (Devi i wsp., 2008). Skoro zewnątrzkomórkowa ASN ma zdolność do przechodzenia do wnętrza komórki w nieograniczony sposób (Lee i wsp., 2008), to jest możliwe, że w naszym układzie eksperymentalnym białko to działa raczej poprzez bezpośrednią interakcję z mitochondriami. Interesujące dane *in vitro* (Liu i

wsp. 2009; Devi i wsp., 2008) oraz badania *post mortem* na mózgach chorych na PD (Devi i wsp., 2008) pokazują, że postępująca akumulacja ASN w mitochondriach zaburza funkcjonowanie kompleksu I łańcucha oddechowego oraz powoduje podwyższenie stresu oksydacyjnego w całej komórce, również wewnątrz mitochondriów. Z danych tych wynika, że stres oksydacyjny wywołany przez ASN jest procesem wtórnym wynikającym z uszkodzenia mitochondriów.

Nasze badania prowadzone na materiale uzyskanym z mózgu szczura oraz na komórkach HT22 wykazały, że zewnątrzkomórkowa ASN doprowadza do zwiększenia syntezy NO i indukcji stresu nitrozacyjnego. Według poprzednich danych zwiększony poziom NO może być odpowiedzialny za proapoptotyczne działanie ASN (Giasson i wsp., 2000). Udowodniono, że główne miejsce nitracji białek w komórce stanowią mitochondria (Koeck i wsp., 2004). Ostatnie wyniki pokazują, że nadekspresja ASN powoduje nitrację dużej ilości białek mitochondrialnych, wynikającą z zaburzenia równowagi pomiędzy tworzeniem wolnych rodników, a procesami antyoksydacyjnymi (Parihar i wsp., 2009; Peluffo i Radi, 2007). Nasze wyniki pokazują, że inhibicja konstytutywnych izoform NOS znacząco hamuje toksyczne działanie ASN w komórkach PC12. Sugeruje to, że w wyniku działania ASN dochodzi do nadmiernej produkcji NO, co może prowadzić do uszkodzenia białek mitochondrialnych i zaburzenia funkcji tych organelli. W komórkach z nadekspresją ASN zaobserwowano, że stres oksydacyjny i uszkodzenia nitrozacyjne białek skutkują spadkiem potencjału mitochondrialnego (Parihar i wsp., 2009). Otrzymane przez nas wyniki z użyciem cyklosporyny A pokazują, że u podstaw neurotoksycznego działania ASN leży zaburzenie funkcjonowania mitochondriów, które skutkuje otwarciem megakanałów mitochondrialnych (ang. *Mitochondrial Permeability Transition*, MPT). Zjawisko to jest niezwykle istotne w procesach degeneracji i w konsekwencji prowadzi do obumierania komórek w wyniku wyczerpania energii (Stavrovskaya i Kristal, 2005). Otwarcie MPT powoduje nadprzepuszczalność mitochondriów, zwiększenie ciśnienia osmotycznego wewnątrz tych organelli oraz prowadzi do uszkodzenia zewnętrznej błony mitochondrialnej i uwolnienia cytochromu c (Büki i wsp., 2000) oraz aktywacji apoptozy zależnej od kaspaz (Wang i wsp., 1998). Nasze wyniki uzyskane na komórkach PC12 są zgodne z danymi otrzymanymi z eksperymentów na linii HT22 i pokazują, że w

wyniku działania zewnątrzkomórkowej ASN dochodzi do aktywacji kaspazy-3. Ponadto protekcyjne działanie specyficznego inhibitora kaspazy-3, Z-DEVD-FMK sugeruje, że efektem zaburzeń procesów wewnątrzkomórkowych wywołanych przez ASN jest aktywacja programowanej śmierci zależnej od kaspaz.

Uzyskane przez nas wyniki pokazują, że peptyd NAC powoduje, podobnie jak jego białko prekursorowe, obumieranie komórek PC12. Działanie NAC w naszym układzie eksperymentalnym jest jednak silniejsze niż to wywołane przez ASN, co można tłumaczyć łatwiejszym przyjmowaniem przez NAC konformacji  $\beta$ -kartki i jego szybszą oligomeryzacją (El-Agnaf i wsp., 1998). Neurotoksyczność NAC po raz pierwszy udowodniono w badaniach na linii komórek B12 (Liu i Schubert, 1998) oraz na komórkach neuroblastoma SH-SY5Y (El-Agnaf i wsp., 1998). Podobnie jak w przypadku ASN, trudno jednoznacznie określić, na jakiej drodze obumierają komórki PC12 traktowane NAC. Wcześniejsze dane pokazują, że peptyd NAC wywołuje śmierć komórek częściowo na drodze apoptozy, a częściowo w wyniku nekrozy (Tanaka i wsp., 2001). Inne badania wskazują, że NAC, poprzez aktywację astrocytów, indukuje śmierć neuronów na drodze apoptozy (Tanaka i wsp., 2002).

Wykrycie peptydu NAC jako drugiego po A $\beta$  składnika blaszek starczych w chorobie Alzheimera (Ueda i wsp., 1993) wskazuje, że w warunkach patologicznych dochodzi do cięcia ASN i uwolnienia jej centralnego fragmentu, który kolokalizuje z A $\beta$ . Zaobserwowano, że NAC może łączyć się z A $\beta$  (Jensen i wsp., 1997) oraz inicjować jego agregację, co ułatwia powstawanie nierozpuszczalnych zewnątrzkomórkowych złogów (Han i wsp., 1995). W wyniku działania NAC dochodzi do zwiększenia stresu oksydacyjnego i wewnątrzmitochondrialnego poziomu wolnych rodników zarówno w neuronach, jak i astrocytach (Tanaka i wsp., 2002). Nasze badania pozostają w zgodzie z tymi doniesieniami i pokazują, że zewnątrzkomórkowy peptyd NAC indukuje stres wolnorodnikowy i uszkodzenie mitochondriów skutkujące obumieraniem komórek PC12. Prezentowane wcześniej wyniki uzyskane na materiale z mózgu szczura pokazują, że NAC stymuluje aktywność nNOS. W komórkach PC12 inhibitor konstytutywnych izoform NOS nie zapobiega jednak toksycznemu działaniu tego peptydu. Może to świadczyć o tym, że zwiększenie syntezy NO nie jest

głównym mechanizmem odpowiedzialnym za toksyczność NAC w badanym modelu komórkowym.

Wiele danych, w tym również prezentowane w niniejszej pracy, wskazuje, że obecność peptydu NAC determinuje toksyczne działanie ASN (El-Agnaf i wsp., 1998; Bodles i wsp., 2000; Adamczyk i wsp., 2006; Adamczyk i Strosznajder, 2006). W badaniach tych NAC wykazuje działanie identyczne jak jego białko prekursorowe. Badania przeprowadzone na komórkach PC12 pokazują, że chociaż NAC prowadzi do zaburzenia funkcji mitochondriów, to w wyniku jego działania nie dochodzi do otwarcia megakanałów mitochondrialnych oraz aktywacji kaspazy-3. Wyniki te pokazują, że NAC nie zawsze aktywuje te same molekularne mechanizmy, co ASN. Podobne zjawisko obserwuje się w przypadku działania różnych fragmentów APP i A $\beta$ . W wyniku degradacji białka APP na drodze nieamyloidogennej powstaje produkt o masie cząsteczkowej 3 kDa, który może być przenoszony do jądra i pełnić funkcję czynnika transkrypcyjnego regulującego sygnalizację wapniową. Z kolei w wyniku cięcia APP na drodze amyloidogennej, powstają peptydy A $\beta$  o różnej długości, które wykazują tendencję do agregacji i neurotoksyczności, z czego najczęściej opisywanymi i najlepiej poznanymi są A $\beta$  1-39, A $\beta$  1-40, A $\beta$  1-42 (Di Carlo, 2009). Udowodniono, że toksyczność peptydów A $\beta$  1-39 i A $\beta$  1-40, jest mniejsza niż peptydów A $\beta$  1-42. Bodles i wsp. (2000) wykazali, że syntetyczny fragment A $\beta$  25-35 odpowiadający za niekorzystne działanie wymienionych peptydów w badaniach *in vitro* wykazuje wyższą toksyczność aniżeli cały peptyd zawierający sekwencję 25-35. Różne fragmenty NAC także charakteryzują się odmiennymi właściwościami. Podczas gdy NAC (8-18) i NAC (8-16) działają toksycznie na komórki SH-SY5Y, fragmenty NAC (12-18), NAC (9-16) oraz NAC (8-15) nie mają wpływu na przeżywalność tych komórek (Bodles i wsp., 2001).

Wcześniejsze dane pokazują, że ekspozycja zarówno neuronów jak i astrocytów na zewnątrzkomórkowy peptyd NAC powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B, jego translokację do jądra oraz zwiększa jego wiązanie z DNA. Zjawisko to wywołane jest zwiększonym, w wyniku działania NAC, stresem oksydacyjnym w mitochondriach (Tanaka i wsp., 2002). Wzrost immunoreaktywności NF $\kappa$ B w neuronach hipokampa, jak również jego jądrową translokację obserwuje się w przypadku choroby



Alzheimerera. Dane te sugerują udział czynnika NF $\kappa$ B we wczesnych stadiach choroby, w których dochodzi do tworzenia oligomerów A $\beta$ , ASN oraz NAC (Akama i Van Eldik 2000; Akama i wsp., 1998; Boissiere i wsp., 1997; Kitamura i wsp., 1997; Huang i wsp., 2005; Terai i wsp., 1996). Jednym z mechanizmów działania NF $\kappa$ B, w odpowiedzi na czynniki stresowe, jest zwiększenie ekspresji białka p53 (Wu i wsp., 1994). Wyniki przedstawione w niniejszej pracy pokazują, że zwiększona ekspresja i aktywacja p53 jest głównym mechanizmem toksycznego działania peptydu NAC w komórkach PC12. Zwiększenie aktywności czynnika p53 wywołane przez stres oksydacyjny prowadzi do aktywacji procesów apoptozy w neuronach i innych typach komórek (Haupt i wsp., 2003). Białko to jest czynnikiem odpowiedzialnym za obumieranie komórek nerwowych w licznych patologich takich jak niedokrwienie (Crumrine i wsp., 1994), ekscytotoksyczność (Lakkaraju i wsp., 2001) czy uszkodzenie DNA (Jonhson i wsp., 1999). W badaniach *post mortem* mózgow pacjentów z AD (de la Monte i wsp., 1997), jak również u myszy transgenicznnych z nadekspresją A $\beta$  1-42 (LaFerla i wsp., 1996), wykryto zwiększoną immunoreaktywność p53 w uszkodzonych neuronach, co sugeruje, że p53 może odgrywać istotną rolę w patogenezie AD. Uważa się, że PARP-1 jest odpowiedzialny za kontrolę ekspresji p53 na poziomie białka i regulację jego stabilności w komórce (Węsierska-Gądek i wsp., 1999). Poprzez tworzenie kompleksu z p53, PARP-1 zapobiega translokacji tego białka z jądra do cytoplazmy i następnie jego degradacji (Węsierska-Gądek i wsp., 2001). Zjawisko to może częściowo tłumaczyć rozbieżności wyników uzyskanych dla ASN i NAC. W przypadku działania ASN, gdy dochodzi do zahamowania aktywności i obniżenia poziomu PARP-1, czas półtrwania p53 w jądrze ulega znacznemu skróceniu, co uniemożliwia aktywację transkrypcji odpowiednich genów. W przeciwieństwie do ASN, NAC nie wpływa ani na podstawową aktywność, ani na poziom białka PARP-1, dlatego zwiększona ekspresja p53 skutkuje nagromadzeniem tego białka w jądrze i jego aktywacją. Hipotezę tę popierają dane uzyskane przez Gądek-Węsierską i wsp. (2000), które pokazują, że w komórkach o genotypie PARP-1<sup>-/-</sup> okres półtrwania p53 ulega ponad 10-krotnemu skróceniu.

Wiele danych wskazuje, że w wyniku aktywacji czynnika transkrypcyjnego p53 dochodzi do śmierci komórek na drodze apoptozy

zależnej od kaspaz (Culmsee i Mattson, 2005). Nasze wyniki pokazują, że chociaż peptyd NAC powoduje zwiększenie ekspresji i aktywności p53, w wyniku jego działania nie dochodzi do aktywacji kaspazy-3 w żadnym z badanych punktów czasowych. Dodatkowym dowodem na brak udziału kaspaz w obumieraniu komórek w wyniku działania NAC jest nieefektywność działania specyficznego inhibitora kaspazy, Z-DEVD-FMK. Zaobserwowano, że p53 może działać nie tylko poprzez aktywację transkrypcji genów, ale może również bezpośrednio wiązać się z mitochondrialnym białkiem Bax. Interakcja ta prowadzi do translokacji czynnika indukującego apoptozę (AIF) do cytoplazmy i wywołuje obumieranie na drodze niezależnej od kaspaz (Scharstuhl i wsp., 2009; Caballero i wsp., 2009). Istnieje możliwość, że peptyd NAC aktywuje ścieżkę zależną od AIF, ale by to potwierdzić należy przeprowadzić dodatkowe badania.

Interakcja pomiędzy kinazą cyklino-zależną 5 (Cdk5) a białkiem p53 jest jednym z procesów, które zachodzą w patologii chorób neurodegeneracyjnych (Schmid i wsp., 2006). Zademonstrowano, że w procesie apoptozy komórek PC12 dochodzi do równoczesnego zwiększenia poziomu p53 i Cdk5 (Zhang i wsp., 2002). Nasze badania są zgodne z tymi wynikami i pokazują, że w wyniku działania NAC w komórkach PC12 jednocześnie ze wzrostem poziomu p53 dochodzi do zwiększenia ekspresji i aktywności Cdk5. Wiele danych wskazuje, że w warunkach patologicznych, takich jak stres oksydacyjny, niedokrwienie, czy działanie A $\beta$ , dochodzi do zaburzenia regulacji aktywności tego enzymu i neurotoksyczności. W mózgach pacjentów z AD wykryto ponad dwukrotne zwiększenie aktywności Cdk5 w porównaniu z mózganiami zdrowych ludzi z tej samej grupy wiekowej (Lee i wsp., 1999). Zaburzenia aktywności Cdk5 obserwowane są również w chorobie Parkinsona, stwardnieniu zanikowym bocznym, czy w chorobie Niemann-Picka typu C (Nguyen i wsp., 2001; Bu i wsp., 2002; Borghi i wsp., 2002; Smith i wsp., 2003). Zaobserwowaliśmy, że zwiększonej ekspresji Cdk5 w komórkach PC12 towarzyszyło podwyższenie ilości mRNA dla obydwu ko-faktorów tego enzymu, białek p35 i p39. W warunkach stresu oksydacyjnego dochodzi do cięcia p35 z powstaniem białka p25, które tworzy stabilny kompleks z Cdk5, przez co wydłuża okres półtrwania tego enzymu oraz powoduje jego hiperaktywację (Kusakawa i wsp., 2000; Patrick i wsp., 1999). Poprzednie dane wskazują, że A $\beta$  jest silnym aktywatorem

kompleksu Cdk5/p25. W neuronach hodowli pierwotnej A $\beta$  stymulował cięcie peptydu p35 (Lee i wsp., 2000), ponadto u myszy z mutacją APP, charakteryzujących się zwiększonym wytwarzaniem A $\beta$  1-42, zaobserwowano wewnątrzkomórkowe nagromadzenie czynnika p25 (Otth i wsp., 2002). Zahamowanie aktywności Cdk5 znacząco osłabiało uwalnianie i toksyczność A $\beta$  (Lee i wsp., 2000; Lee i wsp., 2003). Jak pokazali Zhang i wsp. (2002), w wyniku nadekspresji Cdk5 dochodzi do zwiększenia poziomu i aktywności białka p53. Udowodniono, że aktywny kompleks Cdk5/p25 ma zdolność wiązania się z p53 indukując fosforylację i acetylację tego białka, jak również znosi działanie Hdm2 (ang. *human double minute-2*), czynnika odpowiedzialnego za degradację p53. W efekcie dochodzi do akumulacji p53 w jądrze i jego aktywacji jako czynnika transkrypcyjnego (Lee i wsp., 2007). Zgodnie z przedstawionymi danymi, nasze wyniki z użyciem specyficznego inhibitora kompleksu Cdk5/p25 (BML-259) wskazują, że w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem peptydu NAC, zaktywowana Cdk5 może wspomagać proces apoptozy poprzez fosforylację i aktywację p53.

W ostatnich latach przedmiotem intensywnych badań naukowych stało się wyjaśnienie znaczenia interakcji ASN z A $\beta$  w chorobach neurodegeneracyjnych. Dlatego dalsze eksperymenty miały na celu zbadanie udziału zewnątrzkomórkowej  $\alpha$ -synukleiny w uwalnianiu i toksyczności peptydów A $\beta$ . Badania prowadzono na komórkach PC12 transfekowanych ludzkim genem dla APP, dzikim lub z podwójną mutacją szwedzką. Komórki te charakteryzuje zwiększone wytwarzanie i uwalnianie peptydów A $\beta$  w porównaniu do komórek kontrolnych (Chalimoniuk i wsp., 2007). Wyniki uzyskane w tej pracy wykazują, że poziom A $\beta$  uwalnianego przez komórki APPsw jest 5-krotnie większy w porównaniu z komórkami PC12 kontrolnymi. W niniejszej pracy po raz pierwszy stwierdzono, że zewnątrzkomórkowa ASN zwiększa uwalnianie i toksyczność peptydów A $\beta$ , co prowadzi do zaburzenia funkcji mitochondriów, i w konsekwencji, do obumierania komórek. Nasze wyniki korespondują z badaniami pokazującymi, że  $\alpha$ -synukleina wchodzi w interakcję z peptydami A $\beta$  (Mandal i wsp., 2006) oraz potęguje ich agregację w warunkach *in vitro* (Yoshimoto i wsp., 1995). Uzyskane przez nas dane poszerzają istniejącą wiedzę dotyczącą mechanizmu zewnątrzkomórkowego działania ASN.

Znaczenie ASN w patologii choroby Alzheimera i w toksyczności peptydów A $\beta$  jest niezwykle interesującym i nie do końca wyjaśnionym zagadnieniem. Publikowane w ostatnich latach doniesienia wielu grup badawczych pokazują, że u ponad 60% przypadków chorych z idiopatyczną chorobą Alzheimera wykrywa się ciała Lewy'ego w różnych częściach mózgu (Mikolaenko i wsp., 2005; Jellinger, 2004), ponadto u pacjentów tych zaobserwowano szybszy rozwój objawów pozapiramidowych (Lopez i wsp., 2000). W dodatku, ostatnie badania wskazują na obecność ASN w zdegenerowanych aksonach otaczających blaszki starcze w korze mózgowej u osób z AD przy jednoczesnym braku typowych ciał Lewy'ego. Liczba danych wskazujących, że A $\beta$  może być zaangażowany w procesy oligomeryzacji, akumulacji oraz toksyczności ASN rośnie (Masliah i wsp., 2001; Hunya i wsp., 2008). Badania przeprowadzone *postmortem* sugerują, że istnienie patologii AD potęguje objawy chorób związanych z obecnością ciał Lewy'ego (Wakisaka i wsp., 2003). Ponadto wykazano, że zwiększona liczba ciał Lewy'ego i zdegenerowanych neurytów w korze mózgowej ściśle koreluje z obecnością złogów A $\beta$  (Pletnikova i wsp., 2005). Analiza biochemiczna mózgow pacjentów z AD oraz DLB również wskazuje na związek pomiędzy A $\beta$  a akumulacją ASN (Deramecourt i wsp., 2006). Co więcej, u myszy transgenicznych z ekspresją zarówno zmutowanego APP jak i preseniliny-1 zaobserwowano zwiększoną akumulację ufosforylowanej ASN (Kurata i wsp., 2007). Uzyskane przez nas wyniki uzupełniają powyższe dane pokazując, że nie tylko A $\beta$  może nasilać patologię synukleinopatii, ale również zewnątrzkomórkowa ASN uwalniana w procesie neurodegeneracji może przyczyniać się do zwiększonej sekrecji A $\beta$  i wchodzić w interakcję z tymi peptydami prowadząc do zwiększonego obumierania komórek. Niestety przedstawione dane nie pozwalają na dokładne wyjaśnienie mechanizmu, przez który ASN prowadzi do zwiększenia uwalniania i toksyczności A $\beta$ . Oligomeryzacja i nadmierna akumulacja ASN może wpływać na metabolizm APP lub A $\beta$ , co może skutkować nadmiernym wydzielaniem i akumulacją amyloidu. Zewnątrzkomórkowa ASN może wywierać cytotoksyczny efekt nie tylko poprzez zwiększenie sekrecji A $\beta$ , ale również sama może wywoływać obumieranie komórek na drodze niezależnej od amyloidu. Nasze badania pokazują, że przeżywalność komórek PC12 kontrolnych poddanych działaniu ASN jest niższa niż przeżywalność nietraktowanych komórek

APPwt i APPsw. Ponieważ ASN zwiększa uwalnianie A $\beta$  również w komórkach kontrolnych, należy uważać, że śmierć tych komórek jest wywołana działaniem zarówno A $\beta$  uwalnianego przez ASN, jak i samej ASN. Skoro A $\beta$  jest uwalniany z komórek również w warunkach fizjologicznych, zewnątrzkomórkowa ASN może także wchodzić w interakcję z peptydem już uwolnionym. W tym kontekście ASN może również prowadzić do zaburzenia usuwania nadmiernie nagromadzonego A $\beta$  z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Sugerujemy, że zaobserwowana wyższa toksyczność A $\beta$  w obecności ASN jest wynikiem nadprodukcji amyloidu, jak również nakładającego się efektu tych dwóch peptydów, i może prowadzić do nieodwracalnego uszkodzenia funkcji mitochondriów, obserwowanego w uszkodzeniu zakończeń nerwowych, utraty synaps oraz zaburzeń poznawczych (Iwai, 2000; Obi i wsp., 2007).

Wcześniejsze badania wskazują, że oligomeryzacja zarówno ASN jak i A $\beta$  prowadzi do powstawania wolnych rodników (Tabner i wsp., 2002; Paik i wsp., 1999; Huang i wsp., 1999a,b; Adamczyk i wsp., 2006). Ponadto wewnątrzkomórkowa akumulacja A $\beta$  prowadzi do nadprodukcji NO, zmian czynnościowych mitochondriów (Keil i wsp., 2004; Chalimoniuk i wsp., 2007) oraz zwiększonej apoptozy (Luth i Arendt, 1997; Luth i wsp., 2001; Lahiri i wsp., 2003). Również w tej pracy zademonstrowano, że nadmierna produkcja peptydów A $\beta$  w komórkach APPwt i APPsw skutkowałą zwiększeniem ilości komórek wchodzących na drogę programowanej śmierci. Poprzednie dane uzyskane w naszym laboratorium, jak również wyniki badań przedstawione w tej pracy wskazują, że zewnątrzkomórkowa ASN zwiększa aktywność NOS w skrawkach kory i hipokampa, w komórkach HT22 oraz w komórkach PC12 i wskazują one w każdym przypadku na istotną rolę nNOS oraz NO w zaburzeniu funkcji mitochondriów i śmierci komórek wywołanych przez ASN. Inhibicja NOS w komórkach transfekowanych APP, w przeciwieństwie do komórek kontrolnych, nie zapobiegała toksycznemu działaniu ASN. To podkreśla znaczenie interakcji ASN-A $\beta$  prowadzącej do nieodwracalnych zmian komórek w warunkach równoczesnego działania ASN i A $\beta$ .

Wreszcie, w niniejszej pracy pokazano, że ASN zwiększa dysfunkcję mitochondriów oraz aktywność kaspazy-3 wywołaną działaniem A $\beta$  zarówno w komórkach APPwt, jak i APPsw. Nasze dane wskazują, że traktowanie

komórek cyklosporyną A może częściowo zapobiec toksyczności ASN i A $\beta$ , ale tylko w przypadku, kiedy każdy z tych czynników działa osobno. W przypadku współdziałania tych peptydów cyklosporyna A pozostaje bez widocznego ochronnego wpływu. Dowodzi to, że zaburzenie funkcji mitochondriów wywołane przez ASN i A $\beta$  prowadzi do nieodwracalnego otwarcia mega kanałów mitochondrialnych (MPT). Spośród wielu czynników prowadzących do otwarcia MPT na uwagę zasługuje nadtlendioazotyn. Okazuje się, że nadtlendioazotyn powoduje obrzęk mitochondriów (Gadella i wsp., 1997) oraz zwiększa zużycie tlenu przy jednoczesnym braku ADP, a cyklosporyna A nie jest w stanie zapobiec temu działaniu (Brookes i wsp., 1998). To może potwierdzać hipotezę, że zwiększony w komórkach APPwt i APPsw stres oksydacyjny może prowadzić do szybkiego tworzenia nadtlendioazotynu wskutek działania ASN. Dodatkowo zaobserwowaliśmy, że zastosowanie specyficznego inhibitora kaspazy 3 zapobiega obumieraniu komórek wywołanemu przez A $\beta$  w komórkach APPsw, jak również hamuje toksyczne działanie ASN w kontrolnych komórkach PC12. Natomiast w przypadku zarówno komórek APPwt jak i APPsw traktowanych ASN, specyficzna inhibicja kaspazy-3 nie przyniosła spodziewanych pozytywnych rezultatów. Na podstawie uzyskanych wyników sugeruje się, że zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondriów wywołane przez działające razem oba toksyczne peptydy były zbyt duże, aby im przeciwdziałać.

Wyniki uzyskane na linii komórek PC12 transfekowanych APP wskazują, że zewnątrzkomórkowa ASN zwiększa uwalnianie i toksyczność peptydów A $\beta$  prowadząc, za pośrednictwem NO, do nieodwracalnego zaburzenia funkcji mitochondriów i programowanej śmierci komórek zależnej od kaspaz. To dodatkowo pokazuje, jak istotne może być znaczenie interakcji ASN i A $\beta$  w patologii AD. Zmiany konformacyjne obu białek i ich toksyczność może leżeć u podstaw nieodwracalnych zmian, czemu trzeba koniecznie przeciwdziałać na możliwie najwcześniejszym etapie rozwoju choroby. Poznanie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw działania białek „toksycznych” i interakcji między nimi ma fundamentalne znaczenie nie tylko poznawcze, ale winno się przyczynić do opracowania i udoskonalenia strategii terapeutycznej.

Podsumowując, nasze badania pokazały, że zewnątrzkomórkowa ASN wywiera toksyczne działanie w różnych typach komórek, na drodze wielu

mechanizmów. Działanie tego białka zależy od jego struktury i stopnia agregacji. Na podstawie uzyskanych danych wydaje się, że NO jest mediatorem patogennego działania zewnątrzkomórkowej ASN.





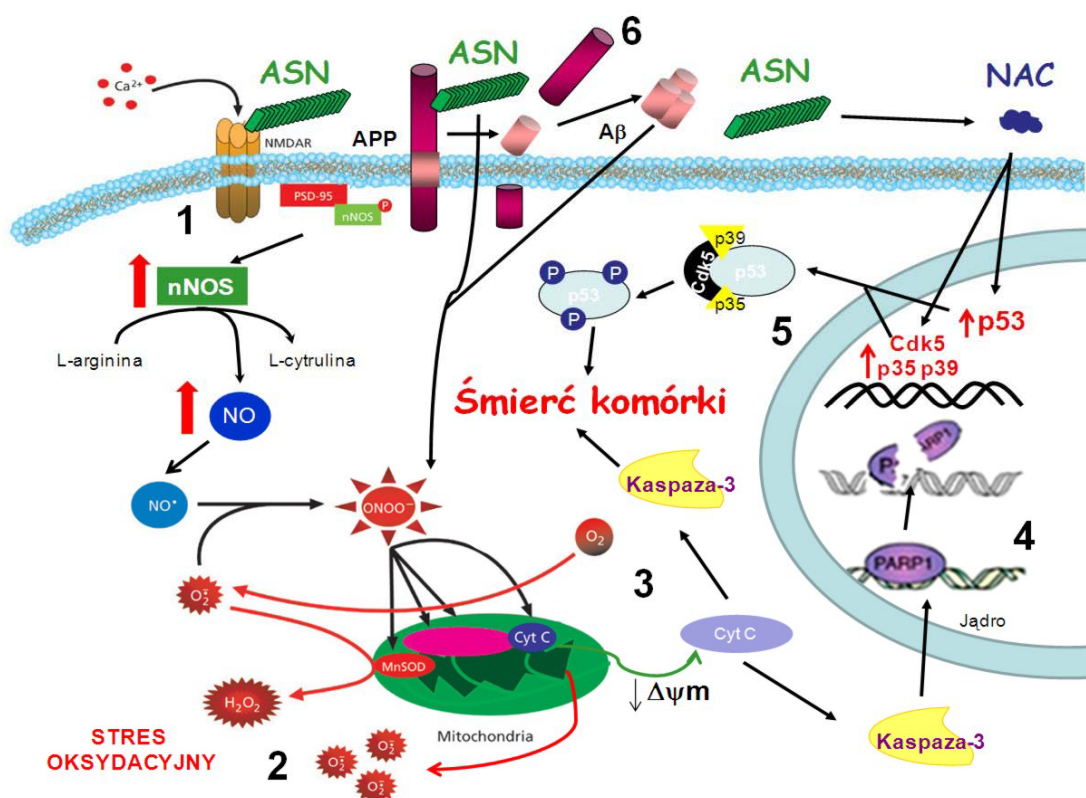
# Podsumowanie i wnioski

1. Stwierdzono, że tylko oligomeryczno-monomeryczna, a nie zagregowana forma ASN podawana egzogennie wywiera działanie toksyczne.
2. W molekularnych mechanizmach toksyczności monomeryczno-oligomerycznej ASN istotną rolę odgrywa NO. Egzogenna ASN prowadzi do zwiększenia syntezy NO na drodze różnych mechanizmów. Krótkotrwałe (30-min) działanie ASN stymuluje zależną od receptora NMDA aktywność nNOS prawdopodobnie w wyniku bezpośredniej interakcji ASN poprzez domenę NAC z białkiem receptora. Długotrwałe (8-24 godzin) działanie ASN prowadzi natomiast do aktywacji nNOS i do zwiększenia ekspresji genu dla tego enzymu.
3. Aktywacja NOS i uwalnianie NO stanowi potencjalny mechanizm, przez który zewnątrzkomórkowa ASN prowadzi do zaburzenia działania PARP-1. Krótkotrwałe działanie ASN skutkuje obniżeniem aktywności PARP-1, za które może częściowo odpowiadać NO. Możliwe jest jednak istnienie innych mechanizmów odpowiedzialnych za hamowanie PARP-1 (np. bezpośrednia interakcja ASN i PARP-1). Długotrwałe działanie ASN prowadzi do zwiększenia zależnej od NO aktywacji kaspazy-3, co w konsekwencji prowadzi do cięcia PARP-1 i obniżenia poziomu tego białka i tym samym jego aktywności.
4. ASN powoduje zależne od NO zaburzenie funkcji mitochondriów, co skutkuje śmiercią komórek na drodze zależnej od aktywacji kaspazy-3. Cyklosporyna A, inhibitory syntazy NO i kaspazy-3 w istotny sposób zapobiegają toksyczności ASN.
5. Fragment NAC uwolniony z cząsteczki ASN wywiera toksyczny efekt poprzez aktywację innych mechanizmów niż jego białko prekursorowe. W warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem tego peptydu dochodzi do nadekspresji czynnika transkrypcyjnego p53. Ponadto peptyd NAC zwiększa ekspresję i aktywność Cdk5 poprzez

wzrost ekspresji białek aktywujących: p35 i p39, co przyczynia się do aktywacji proapoptotycznego szlaku zależnego od p53.

6. Zewnątrzkomórkowa  $\alpha$ -synukleina zwiększa uwalnianie i potęguje toksyczność peptydów A $\beta$  prowadząc, za pośrednictwem NO, do nieodwracalnego zaburzenia funkcji mitochondriów i programowanej śmierci komórek zależnej od kaspaz. Uzyskane wyniki pokazują, jak istotne może być znaczenie interakcji ASN i A $\beta$  w patologii AD.

7. Wnioski wynikające z niniejszej pracy można przedstawić w postaci poniższego schematu:



Rycina 57 Mechanizmy toksycznego działania ASN wg danych uzyskanych w niniejszej pracy.

1. Stymulacja zależnej od receptora NMDA aktywności nNOS oraz zwiększenie ekspresji tego enzymu
2. Aktywacja stresu wolnorodnikowego
3. Zależne od NO zaburzenie funkcji mitochondriów i aktywacja kaspazy-3
4. Obniżenie aktywności i degradacja PARP
5. Zwiększenie ekspresji i aktywacja białka p53 przez toksyczny fragment ASN, peptyd NAC
6. Zwiększenie uwalniania i toksyczności peptydów A $\beta$ , prowadzące do nieodwracalnych zaburzeń funkcji mitochondriów

# Streszczenie

$\alpha$ -Synukleina (ASN) jest niskocząsteczkowym (140-aminokwasowym) cytozolowym białkiem występującym w ośrodkowym układzie nerwowym, głównie w zakończeniach presynaptycznych neuronów. Białko to wyizolowano po raz pierwszy w roku 1988 z narządu elektrycznego morskiej ryby z gatunku *Torpedo californica* i nazwano "synukleina" ze względu na jej obecność w synapsach i w jądrze komórkowym. Sugeruje się, że ASN w formie monomerycznej, w stężeniu nanomolarnym pełni funkcję białka opiekuńczego, uczestniczy w kształtowaniu plastyczności synaptycznej, regulacji transportu pęcherzykowego oraz w przekaźnictwie dopaminergicznym. Ponadto wykazuje ona działanie antyoksydacyjne i antyapoptotyczne, głównie poprzez aktywację szlaku PI3K/Akt oraz zwiększenie ekspresji białek antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2. Stwierdzono, że w warunkach patologicznych ASN wykazuje tendencję do zmiany konformacji i samoistnego formowania rozpuszczalnych oligomerów, które wykazują działanie neurotoksyczne. Postępująca agregacja może być mechanizmem chroniącym komórkę przed szkodliwym działaniem oligomerów, a jednocześnie prowadzi do powstania nierozpuszczalnych złogów, tzw. ciał Lewy'ego, które uszkadzają komórki w sposób mechaniczny. Najprawdopodobniej za agregację i toksyczność ASN odpowiada centralna 35-aminokwasowa domena w jej strukturze, tzw. peptyd NAC (ang. *non-amyloid  $\beta$  component of Alzheimer's disease plaques*), oryginalnie odkryty jako jeden ze składników zewnątrzkomórkowych płytek starczych w ludzkich mózgach alzheimerowskich. Wewnątrzkomórkowe agregaty ASN występują w wielu chorobach neurodegeneracyjnych, głównie w chorobie Parkinsona, ale również w chorobie Alzheimera oraz w otępieniu starczym z ciałami Lewy'ego, jak również w innych chorobach neurodegeneracyjnych zwanych synukleinopatiami.

Dane ostatnich lat wskazują, że uwalnianie ASN do przestrzeni zewnątrzkomórkowej może stanowić kluczowy mechanizm odpowiedzialny za rozprzestrzenianie się i rozwój patologicznych zmian w mózgu. Badania *in vitro* wykazały, że w wyniku działania stresu oksydacyjnego lub uszkodzenia neuronów dochodzi do wydzielania ASN na drodze egzocytozy, co może inicjować obumieranie sąsiednich komórek. Nieliczne dotychczasowe prace

dotyczące działania zewnątrzkomórkowej ASN wykazały, że hamuje ona aktywność transportera dopaminy oraz zaburza homeostazę wapnia poprzez zwiększenie jego napływu do wnętrza komórki. Istnieje więc prawdopodobieństwo, że białko to może wpływać na liczne procesy zależne od aktywacji receptorów w błonie komórkowej. Wykazano, że jednym z czynników odpowiedzialnych za patologiczne działanie zewnątrzkomórkowej ASN, a zwłaszcza jej form oligomerycznych może być aktywacja gleju i wywołanie odpowiedzi zapalnej. Inny potencjalny mechanizm toksyczności zewnątrzkomórkowej ASN zakłada indukcję stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego, które prowadzą do modyfikacji lipidów, białek i DNA, co może przyczyniać się do zaburzenia działania enzymów jądrowych i mitochondrialnych. Zademonstrowano również, że zewnątrzkomórkowa ASN aktywuje procesy apoptotyczne w neuronach.

Identyfikacja peptydu NAC w blaszkach starczych sugeruje, że uwolniona zewnątrzkomórkowo ASN może również wpływać na oligomeryzację i toksyczność amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ). Obecnie wiadomo, że u ok. 60% pacjentów oprócz zewnątrzkomórkowych blaszek starczych występują również ciała Lewy'ego. Lepsze poznanie udziału ASN w rozwoju choroby Alzheimera oraz identyfikacja mechanizmów prowadzących do uwalniania i agregacji peptydów amyloidu  $\beta$  mogą być pomocne dla opracowania efektywnej terapii, która pomoże opóźnić lub zahamować postęp choroby. Dotychczasowe badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* wykazały jedynie, że związana z błonami ASN może wchodzić w interakcje z uwolnionymi zewnątrzkomórkowo peptydami  $A\beta$ , co skutkuje ich agregacją.

Podjęte w niniejszej pracy zagadnienia badawcze miały na celu poznanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za toksyczne działanie zewnątrzkomórkowej ASN, ze szczególnym uwzględnieniem jej oddziaływania na procesy wolnorodnikowe i proapoptotyczne, funkcję mitochondriów oraz na uwalnianie i toksyczność peptydów  $A\beta$ . Cel badań dotyczył również określenia wpływu zewnątrzkomórkowej ASN na aktywność i poziom białka syntazy tlenku azotu (NOS) oraz polimerazy poli(ADP-rybozy)-1 (PARP-1). Ponadto postanowiono zbadać działanie wyselekcjonowanych inhibitorów oraz antyoksydantów w zapobieganiu toksyczności ASN.

Badania prowadzono na trzech modelach doświadczalnych *in vitro*:

1. Skrawkach i frakcji synaptozomalno-mitochondrialnej oraz homogenacie uzyskiwanych z kory mózgu, hipokampa oraz prążkowie dorosłych szczurów szczepu Wistar;
2. Unieśmiertelnionych mysich komórkach hipokampa (HT22);
3. Komórkach szczurzego guza chromochłonnego (pheochromocytoma, PC12) stabilnie transfekowanych ludzkim genem białka prekursorowego amyloidu  $\beta$  (APP) dzikiego typu (APPwt) lub z mutacją typu szwedzkiego (APPsw, K670M/N671L) albo transfekowanych pustym wektorem.

Stopień agregacji (fibrylizacji) ASN oceniano na podstawie elektroforezy na żelu poliakrylamidowym oraz spektrofotometrycznie z użyciem tioflawiny-T. W badaniach aktywności NOS i PARP-1 stosowano metody radiochemiczne. Do badania poziomu wolnych rodników, funkcji mitochondriów oraz aktywności kaspazy-3 używano metod spektrofotometrycznych i spektrofotometrycznych. Ekspresję genu na poziomie białka oznaczano metodami immunochemicznymi, natomiast na poziomie mRNA przy użyciu metod RT-PCR oraz PCR w czasie rzeczywistym. Analizę morfologicznych cech apoptozy przeprowadzono w mikroskopie fluorescencyjnym Olympus.

W badaniach prowadzonych na skrawkach mózgu szczura po raz pierwszy zademonstrowano, że w wyniku krótkotrwałego działania ASN dochodzi do stymulacji zależnej od receptora NMDA aktywności neuronalnej izoformy NOS. Z kolei  $\beta$ -synukleina, izoforma pozbawiona centralnego fragmentu NAC, pozostaje bez wpływu na aktywność NOS. Wyniki te sugerują, że aktywacja NOS jest prawdopodobnie skutkiem bezpośredniej interakcji ASN poprzez domenę NAC z białkiem receptora. Aktywacja NOS i uwalnianie tlenu azotu stanowi potencjalny mechanizm, przez który zewnątrzkomórkowa ASN prowadzi do zaburzenia działania PARP-1. Krótkotrwała ekspozycja na ASN skutkuje obniżeniem aktywności PARP-1, za które może być odpowiedzialne działanie NO, trudno jednak wykluczyć bezpośrednią interakcję ASN i PARP-1.

Stwierdzono, że długotrwała ekspozycja komórek HT22 na zewnątrzkomórkową ASN skutkuje aktywacją nNOS w wyniku zwiększenia ekspresji genu dla tego enzymu. W modelu tym zademonstrowano po raz

pierwszy, że ASN prowadzi do zwiększenia zależnej od NO aktywności kaspazy-3, co w konsekwencji prowadzi do cięcia PARP-1 i obniżenia poziomu tego białka i tym samym jego aktywności.

Zaobserwowano, że zewnątrzkomórkowa ASN w formie monomeryczno-oligomerycznej w sposób zależny od stężenia wywołuje stres wolnorodnikowy i zależne od tlenku azotu zaburzenie funkcji mitochondriów, co skutkuje śmiercią komórek PC12 na drodze zależnej od kaspazy-3. Zagregowana ASN nie wpływa na przeżywalność komórek w żadnym badanym stężeniu. Ponadto zademonstrowano, że inhibitor MPT, cyklosporyna A oraz inhibitory syntazy NO i kaspazy-3 w istotny sposób zapobiegają toksyczności ASN.

Wykazano ponadto, że fragment NAC uwolniony z cząsteczki ASN wywiera toksyczny efekt poprzez aktywację innych mechanizmów niż jego białko prekursorowe. W warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem NAC dochodzi do nadekspresji czynnika transkrypcyjnego p53. Ponadto peptyd NAC zwiększa ekspresję i aktywność Cdk5, co przyczynia się do aktywacji proapoptotycznego szlaku zależnego od p53.

W prezentowanej pracy po raz pierwszy udowodniono, że zewnątrzkomórkowa ASN zwiększa uwalnianie i potęguje toksyczność peptydów A $\beta$  prowadząc, za pośrednictwem NO, do nieodwracalnego zaburzenia funkcji mitochondriów i programowanej śmierci komórek zależnej od kaspaz.

Podsumowując, opisane w rozprawie badania pokazały, że zewnątrzkomórkowa ASN wywiera toksyczne działanie na drodze wielu różnorodnych mechanizmów, a właściwości tego białka zależą od jego struktury i stopnia agregacji. Uzyskane dane wskazują, że NO jest głównym mediatorem patologicznego działania zewnątrzkomórkowej ASN.

# Literatura

- Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25(1):239-52.
- Adamczyk A, Kacprzak M, Kaźmierczak A (2007). Alpha-synuclein decreases arachidonic acid incorporation into rat striatal synaptoneurosomes. *Folia Neuropathol.* 45(4):230-5.
- Adamczyk A, Kazmierczak A, Strosznajder JB (2006). alpha-Synuclein and its neurotoxic fragment inhibit dopamine uptake into rat striatal synaptosomes Relationship to nitric oxide. *Neurochem Int* 49:407-12.
- Adamczyk A, Solecka J, Strosznajder JB (2005). Expression of alpha-synuclein in different brain parts of adult and aged rats. *J Physiol Pharmacol.* 56(1):29-37
- Adamczyk A, Strosznajder JB (2006). Alpha-synuclein potentiates Ca<sup>2+</sup> influx through voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuroreport* 17:1883-6.
- Ahn BH, Rhim H, Kim SY, Sung YM, Lee MY, Choi JY, Wolozin B, Chang JS, Lee YH, Kwon TK, Chung KC, Yoon SH, Hahn SJ, Kim MS, Jo YH, MIN DO S (2002). alpha-Synuclein interacts with phospholipase D isozymes and inhibits pervanadate-induced phospholipase D activation in human embryonic kidney-293 cells. *J Biol Chem.* 277:12334-42.
- Ahn KJ, Paik SR, Chung KC, Kim J (2006). Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of alpha-synuclein. *J Neurochem.* 97(1):265-79.
- Akama KT, Albanese C, Pestell RG, Van Eldik LJ (1998). Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NFkappaB-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5795–5800.
- Akama KT, Van Eldik LJ (2000). Beta-amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin-1 $\beta$ - and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-dependent, and involves a TNF $\alpha$  receptor associated factor- and NFkappaB-inducing kinase-dependent signaling mechanism. *J Biol Chem.* 275: 7918– 7924.;
- Albani D, Peverelli E, Rametta R, Batelli S, Veschini L, Negro A, Forloni G (2004). Protective effect of TAT-delivered alpha-synuclein: relevance of the C-terminal domain and involvement of HSP70. *FASEB J.* 18(14):1713-5.
- Alim MA, Hossain MS, Arima K, Takeda K, Izumiyama Y, Nakamura M, Kaji H, Shinoda T, Hisanaga S, Ueda K (2002). Tubulin seeds alpha-synuclein fibril formation. *J Biol Chem.* 277:2112-7.
- Alves da Costa C (2003). Recent Advances on alpha-Synuclein Cell Biology: Functions and Dysfunctions. *Curr Mol Med.* 3: 17-24.

- Alves Da Costa C, Paitel E, Vincent B, Checler F (2002). Alpha-synuclein lowers p53-dependent apoptotic response of neuronal cells. Abolishment by 6-hydroxydopamine and implication for Parkinson's disease. *J Biol Chem.* 277(52):50980-4.
- Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL (2008). Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Ann N Y Acad Sci.* 1147:233-41.
- Andringa G, Du F, Chase TN, Bennett MC (2003). Mapping of rat brain using the Synuclein-1 monoclonal antibody reveals somatodendritic expression of alpha-synuclein in populations of neurons homologous to those vulnerable to Lewy body formation in human synucleopathies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 62(10):1060-75.
- Arai Y, Yamazaki M, Mori O, Muramatsu H, Asano G, Katayama Y (2001). Alpha-synuclein-positive structures in cases with sporadic Alzheimer's disease: morphology and its relationship to tau aggregation. *Brain Res.* 12;888(2):287-296.
- Arima K, Ueda K, Sunohara N, Arakawa K, Hirai S, Nakamura M, Tonzuka-Uehara H, Kawai M (1998). NACP/alpha-synuclein immunoreactivity in fibrillary components of neuronal and oligodendroglial cytoplasmic inclusions in the pontine nuclei in multiple system atrophy. *Acta Neuropathol.* 96(5):439-44.
- Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, Trojanowski JQ, Iwatsubo T (1998). Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol.* 152(4):879-84.
- Baptista MJ, O'farrell C, Daya S, Ahmad R, Miller Dw, Hardy J, Farrer MJ, Cookson MR (2003). Co-ordinate transcriptional regulation of dopamine synthesis genes by alpha-synuclein in human neuroblastoma cell lines. *J Neurochem* 85:957-68.
- Baylis SA, Strijbos PJ, Sandra A, Russell RJ, Rijhsinghani A, Charles IG, Weiner CP (1999). Temporal expression of inducible nitric oxide synthase in mouse and human placenta. *Mol. Hum. Reprod.* 5(3): 277-286.
- Behl C., F. Lezoualc'h, M. Widmann, R. Rupprecht, F. Holsboer (1996). Oxidative stress-resistant cells are protected against haloperidol toxicity *Brain Res.* 717, 1-2, 193-195
- Benjamin CW, Hiebsch RR, Jones DA (1998). Caspase activation in MCF7 cells responding to etoposide treatment. *Mol Pharmacol.* 53(3):446-50.
- Bennett MC, Bishop JF, Leng Y, Chock PB, Chase TN, Mouradian MM (1999). Degradation of alpha-synuclein by proteasome. *J Biol Chem.* 274(48):33855-8.
- Bennett MK, Miller KG, Scheller RH (1993). Casein kinase II phosphorylates the synaptic vesicle protein p65. *J Neurosci.* 13(4):1701-7.
- Bhat Narayan R., Feinstein Douglas L (2006). NO and Glial Cell Biology *Antioxidants & Redox Signaling.* 8(5-6): 869-872.
- Bisaglia M, Trolia A, Bellanda M, Bergantino E, Bubacco L, Mammi S (2006). Structure and topology of the non-amyloid-beta component fragment of human alpha-synuclein bound to micelles: implications for the aggregation process. *Protein Sci.* 15(6):1408-16.



- Bodles AM, Guthrie DJ, Greer B, Irvine GB (2001). Identification of the region of non-Abeta component (NAC) of Alzheimer's disease amyloid responsible for its aggregation and toxicity. *J Neurochem.* 78(2):384-95.
- Bodles AM, Guthrie DJ, Harriott P, Campbell P, Irvine GB (2000). Toxicity of non-abeta component of Alzheimer's disease amyloid, and N-terminal fragments thereof, correlates to formation of beta-sheet structure and fibrils. *Eur J Biochem.* 267(8):2186-94.
- Boissiere F, Hunot S, Faucheux B, Duyckaerts C, Hauw JJ, Agid Y, Hirsch EC (1997). Nuclear translocation of NF-kappaB in cholinergic neurons of patients with Alzheimer's disease. *Neuroreport* 8: 2849-2852.;
- Bojarski L, Herms J, Kuznicki J (2008). Calcium dysregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* , 52, 621-633.
- Borghi R, Giliberto L, Assini A, Delacourte A, Perry G, Smith MA, Stocchi P, Zaccheo D, Tabaton M (2002). Increase of cdk5 is related to neurofibrillary pathology in progressive supranuclear palsy. *Neurology.* 58(4):589-92.
- Borghi R, Marchese R, Negro A, Marinelli L, Forloni G, Zaccheo D, Abbruzzese G, Tabaton M (2000). Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neurosci Lett.* 287(1):65-7.
- Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA (2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med.* 10 Suppl:S2-9.
- Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S (2005). Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx.* 2(3):484-94.
- Bredt DS, Snyder SH (1990). Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 682-685
- Brookes AJ, St Clair D (1994). Synuclein proteins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 17(10):404-5.
- Brookes PS, Land JM, Clark JB, Heales SJ (1998). Peroxynitrite and brain mitochondria: evidence for increased proton leak. *J. Neurochem.* 70, 2195- 2202.
- Brown DR, Schmidt B, Kretschmar HA (1997). Effects of oxidative stress on prion protein expression in PC12 cells. *Int J Dev Neurosci.* 15(8):961-72.
- Bu B, Li J, Davies P, Vincent I (2002). Deregulation of cdk5, hyperphosphorylation, and cytoskeletal pathology in the Niemann-Pick type C murine model. *J Neurosci.* 22(15):6515-25.
- Büki A, Okonkwo DO, Wang KKW, and Povlishock JT (2000). Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury. *J. Neurosci.* 20(8), 2825-2834.
- Burke RE (2001). alpha-Synuclein and parkin: coming together of pieces in puzzle of Parkinson's disease. *Lancet.* 358(9293):1567-8.
- Bussell R Jr, Eliezer D (2003). A structural and functional role for 11-mer repeats in alpha-synuclein and other exchangeable lipid binding proteins. *J. Mol. Biol.* 329: 763-778.

- Büttner S, Bitto A, Ring J, Augsten M, Zabrocki P, Eisenberg T, Jungwirth H, Hutter S, Carmona-Gutierrez D, Kroemer G, Winderickx J, Madeo F (2008). Functional mitochondria are required for alpha-synuclein toxicity in aging yeast. *J Biol Chem.* 283(12):7554-60.
- Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernández C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D, Tolivia D, Pallás M, Camins A, Rodríguez-Colunga MJ, Coto-Montes A (2009). Melatonin alters cell death processes in response to age-related oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice. *J Pineal Res.* 46(1):106-14.
- Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, Orrison B, Chen A, Ellis CE, Paylor R, Lu B, Nussbaum RL (2002). Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci.* 22: 8797-807.
- Campion D, Martin C, Heilig R, Charbonnier F, Moreau V, Flaman JM, Petit JL, Hannequin D, Brice A, Frebourg T (1995). The NACP/synuclein gene: chromosomal assignment and screening for alterations in Alzheimer disease. *Genomics.* 26(2):254-7.
- Casley CS, Lakics V, Lee HG, Broad LM, Day TA, Cluett T, Smith MA, O'Neill MJ, Kingston AE (2009). Up-regulation of astrocyte metabotropic glutamate receptor 5 by amyloid-beta peptide. *Brain Res*, (Epub ahead of print).
- Chaitanya GV, Babu PP (2008). Activation of calpain, cathepsin-b and caspase-3 during transient focal cerebral ischemia in rat model. *Neurochem Res.* 33(11):2178-86.
- Chalimoniuk M, Stolecka A, Cakała M, Hauptmann S, Schulz K, Lipka U, Leuner K, Eckert A, Muller WE, Strosznajder JB (2007). Amyloid beta enhances cytosolic phospholipase A2 level and arachidonic acid release via nitric oxide in APP-transfected PC12 cells. *Acta Biochim Pol.* 54(3):611-23.
- Chalimoniuk M, Strosznajder J (1998). NMDA receptor-dependent nitric oxide and cGMP synthesis in brain hemispheres and cerebellum during reperfusion after transient forebrain ischemia in gerbils: effect of 7-Nitroindazole. *J Neurosci Res.* 54(5):681-90.
- Chan P, Jiang X, Forno LS, Di Monte DA, Tanner CM, Langston JW (1998). Absence of mutations in the coding region of the alpha-synuclein gene in pathologically proven Parkinson's disease. *Neurology.* 50(4):1136-7.
- Chan P, Tanner CM, Jiang X, Langston JW (1998). Failure to find the alpha-synuclein gene missense mutation (G209A) in 100 patients with younger onset Parkinson's disease. *Neurology.* 50(2):513-4.
- Chandra S, Chen X, Rizo J, Jahn R, Südhof TC (2003). A broken alpha -helix in folded alpha -Synuclein. *J Biol Chem.* 278(17):15313-8.
- Chandra S, Gallardo G, Fernández-Chacón R, Schlüter OM, Südhof TC. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration (2005). *Cell.* 123(3):383-96
- Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destée A

- (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*. 364(9440):1167-9.
- Chen L, Feany MB (2005). Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Nat Neurosci*. 8:657-63.
- Cherian PP, Schenker S, Henderson GI (2008). Ethanol-mediated DNA damage and PARP-1 apoptotic responses in cultured fetal cortical neurons. *Alcohol Clin Exp Res*. 32(11):1884-92.
- Chiba-Falek O, Kowalak JA, Smulson ME, Nussbaum RL (2005). Regulation of alpha-synuclein expression by poly (ADP ribose) polymerase-1 (PARP-1) binding to the NACP-Rep1 polymorphic site upstream of the SNCA gene. *Am J Hum Genet*. 76(3):478-92.
- Chiba-Falek O, Touchman JW, Nussbaum RL (2003). Functional analysis of intra-allelic variation at NACP-Rep1 in the alpha-synuclein gene. *Hum Genet*. 113(5):426-31.
- Cho DH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, Lipton S.A. (2009). S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science*. 324(5923):102-5.
- Choi P, Golts N, Snyder H, Chong M, Petrucelli L, Hardy J, Sparkman D, Cochran E, Lee JM, Wolozin B (2001). Co-association of parkin and alpha-synuclein. *Neuroreport*. 12(13):2839-43.
- Choi W, Zibae S, Jakes R, Serpell LC, Davletov B, Crowther RA, Goedert M (2004). Mutation E46K increases phospholipid binding and assembly into filaments of human alpha-synuclein. *FEBS Lett*. 576(3):363-8.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162: 156-159.
- Chu CT, Caruso JL, Cummings TJ, Ervin J, Rosenberg C, Hulette CM (2000). Ubiquitin immunochemistry as a diagnostic aid for community pathologists evaluating patients who have dementia. *Mod Pathol*. 13(4):420-6.
- Chung KK, Zhang Y, Lim KL, Tanaka Y, Huang H, Gao J, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM (2001). Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med*. 7:1144-50
- Ciechanover A (2005). Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(1):79-87.
- Clayton DF, George JM (1998). The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci*. 21:249-54.
- Clough RL, Stefanis L (2007). A novel pathway for transcriptional regulation of alpha-synuclein. *FASEB J*. 21(2):596-607.
- Cohlberg JA, Li J, Uversky VN, Fink AL (2002). Heparin and other glycosaminoglycans stimulate the formation of amyloid fibrils from alpha-synuclein in vitro. *Biochemistry*. 41(5):1502-11.
- Cole NB, Dieuliis D, Leo P, Mitchell DC, Nussbaum RL (2008). Mitochondrial translocation of alpha-synuclein is promoted by intracellular acidification. *Exp Cell Res*. 314(10):2076-89.

- Cookson MR (2005). The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem.* 74:29-52.
- Crews L, Tsigelny I, Hashimoto M, Masliah E (2009). Role of synucleins in Alzheimer's disease. *Neurotox Res.* 16(3):306-17.
- Crumrine RC, Thomas AL, Morgan PF (1994). Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 14(6):887-91.
- Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science.* 305(5688):1292-5.
- Culmsee C, Mattson MP (2005). p53 in neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 331(3):761-77.
- Culmsee C, Zhu C, Landshamer S, Becattini B, Wagner E, Pellecchia M, Blomgren K, Plesnila N (2005). Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *J Neurosci.* 25(44):10262-72.
- Czapski GA, Jacewicz M, Cakała M, Gajkowska B, Strosznajder JB (2009). Genetical and biochemical alterations in the brain during systemic inflammation. *Pharmacol Rep.* 61, 1224-25
- da Costa CA, Sunyach C, Giaime E, West A, Corti O, Brice A, Safe S, Abou-Sleiman PM, Wood NW, Takahashi H, Goldberg MS, Shen J, Checler F (2009). Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. *Nat Cell Biol.* 11(11):1370-5.
- Dai JG, Murakami K (2003). Constitutively and autonomously active protein kinase C associated with 14-3-3 zeta in the rodent brain. *J Neurochem.* 84:23-34.
- D'andrea MR, Ilyin S, Plata-Salaman CR (2001). Abnormal patterns of microtubule-associated protein-2 (MAP-2) immunolabeling in neuronal nuclei and Lewy bodies in Parkinson's disease substantia nigra brain tissues. *Neurosci Lett* 306:137-40.
- David KK, Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL (2009). Parthanatos, a messenger of death. *Front Biosci.* 14:1116-28.
- de la Monte SM, Sohn YK, Wands JR (1997). Correlates of p53- and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 152(1):73-83.
- De Sanctis GT, Mehta S, Kobzik L, Yandava C, Jiao A, Huang PL, Drazen JM (1997). Contribution of type I NOS to expired gas NO and bronchial responsiveness in mice. *Am. J. Physiol.* 273(4 Pt 1): L883-888.
- Deramecourt V, Bombois S, Maurage CA, Ghestem A, Drobecq H, Vanmechelen E, Lebert F, Pasquier F, Delacourte A (2006). Biochemical staging of synucleinopathy and amyloid deposition in dementia with Lewy bodies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 278-288.
- Desplats P, Lee HJ, Bae EJ, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, Spencer B, Masliah E, Lee SJ (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(31):13010-5.

- Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK (2008). Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem.* 283(14):9089-100.
- Dhillon AS, Meikle S, Peyssonnaud C, Grindlay J, Kaiser C, Steen H, Shaw PE, Mischak H, Eychene A, Kolch W (2003). A Raf-1 mutant that dissociates MEK/extracellular signal-regulated kinase activation from malignant transformation and differentiation but not proliferation. *Mol Cell Biol.* 23:1983-93.
- Di Carlo M (2009). Beta amyloid peptide: from different aggregation forms to the activation of different biochemical pathways. *Eur Biophys J.* (Epub ahead of print).
- Diaz-Corrales FJ, Asanuma M, Miyazaki I, Miyoshi K, Ogawa N (2005). Rotenone induces aggregation of gamma-tubulin protein and subsequent disorganization of the centrosome: Relevance to formation of inclusion bodies and neurodegeneration. *Neuroscience.* 133(1), 117-35
- Ding TT, Lee SJ, Rochet JC, Lansbury PT Jr (2002). Annular alpha-synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes. *Biochemistry.* 41(32):10209-17.
- Du HN, Tang L, Luo XY, Li HT, Hu J, Zhou JW, Hu HY (2003). A peptide motif consisting of glycine, alanine, and valine is required for the fibrillization and cytotoxicity of human alpha-synuclein. *Biochemistry.* 42(29):8870-8.
- Duan Y, Gross RA, Sheu SS (2007). Ca<sup>2+</sup>-dependent generation of mitochondrial reactive oxygen species serves as a signal for poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during glutamate excitotoxicity. *J Physiol* 585, 741-558
- Ebadi M, Sharma SK (2003). Peroxynitrite and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal.* 5: 319-335.
- El-Agnaf OM, Irvine GB (2000). Review: formation and properties of amyloid-like fibrils derived from alpha-synuclein and related proteins. *J Struct Biol.* 130: 300-9.
- El-Agnaf OM, Jakes R, Curran MD, Middleton D, Ingenito R, Bianchi E, Pessi A, Neill D, Wallace A (1998). Aggregates from mutant and wild-type alpha-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of beta-sheet and amyloid-like filaments. *FEBS lett.* 440, 71-5.
- El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, Curran MD, Court JA, Mann DM, Ikeda S, Cookson MR, Hardy J, Allsop D (2003). Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J.* 17(13):1945-7.
- El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Curran MD, Gibson MJ, Court JA, Schlossmacher MG, Allsop D (2006). Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J.* 20(3):419-25.

- Eliezer D, Kutluay E, Bussell R Jr, Browne G (2001). Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J Mol Biol.* 307(4):1061-73.
- Elkon H, Don J, Melamed E, Ziv I, Shirvan A, Offen D (2002). Mutant and wild-type alpha-synuclein interact with mitochondrial cytochrome C oxidase. *J Mol Neurosci.* 18(3):229-38.
- Ellis CE, Schwartzberg PL, Grider TL, Fink Dw, Nussbaum RL (2001). alpha-synuclein is phosphorylated by members of the Src family of protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 276:3879-84.
- Farrer M, Kachergus J, Forno L, Lincoln S, Wang DS, Hulihan M, Maraganore D, Gwinn-Hardy K, Wszolek Z, Dickson D, Langston JW (2004). Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol.* 55(2):174-9.
- Farrer M, Kachergus J, Forno L, Lincoln S, Wang DS, Hulihan M, Maraganore D, Gwinn-Hardy K, Wszolek Z, Dickson D, Langston JW (2004). Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol.* 55(2):174-9.
- Farrer M, Maraganore DM, Lockhart P, Singleton A, Lesnick TG, de Andrade M, West A, de Silva R, Hardy J, Hernandez D (2001). alpha-Synuclein gene haplotypes are associated with Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 10(17):1847-51.
- Ferrer I, Planas AM (2003). Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol.* 62(4):329-39.
- Février B, Raposo G (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol.* 16(4):415-21
- Flower TR, Chesnokova LS, Froelich CA, Dixon C, Witt SN (2005). Heat shock prevents alpha-synuclein-induced apoptosis in a yeast model of Parkinson's disease. *J Mol Biol.* 351(5):1081-100.
- Floyd R A (1990). Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 4, 2587-2597
- Fortin DL, Nemani VM, Voglmaier SM, Anthony MD, Ryan TA, Edwards RH (2005). Neural activity controls the synaptic accumulation of alpha-synuclein. *J Neurosci.* 25(47):10913-21.
- Frederiksen K, McKay RD (1988). Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci.* 8(4):1144-51.
- Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T (2002). alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol.* 4(2):160-4.
- Gadelha FR, Thomson L, Fagian MM, Costa AD, Radi R, Vercesi AE (1997). Ca<sup>2+</sup>-independent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by peroxynitrite is mediated by membrane protein thiol cross-linking and lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 345, 243-250.

- Galvin JE, Uryu K, Lee VM, Trojanowski JQ (1999). Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia hippocampus contains alpha-, beta-, and gamma-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23):13450-5.
- Gentile A, Amadoro G, Corsetti V, Ciotti MT, Serafino A, Calissano P (2008). Spontaneous aggregation and altered intracellular distribution of endogenous alpha-synuclein during neuronal apoptosis. *J Alzheimers Dis.* 13(2):151-60.
- George JM (2002). The synucleins. *Genome Biol.* 3: 3002.1–3002.6
- Ghee M, Fournier A, Mallet J (2000). Rat alpha-synuclein interacts with Tat binding protein 1, a component of the 26S proteasomal complex. *J Neurochem.* 75(5):2221-4.
- Giasson BI, Duda JE, Murray IV, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science.* 290(5493):985-9.
- Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM (2001). A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem.* 276(4):2380-6.
- Girigoswami K, Ku SH, Ryu J, Park CB (2008). A synthetic amyloid lawn system for high-throughput analysis of amyloid toxicity and drug screening. *Biomaterials* 29, 2813–2819
- Goers J, Manning-Bog AB, McCormack AL, Millett IS, Doniach S, Di Monte DA, Uversky VN, Fink AL (2003). Nuclear localization of alpha-synuclein and its interaction with histones. *Biochemistry.* 42(28):8465-71.
- Golovko MY, Rosenberger TA, Faergeman NJ, Feddersen S, Cole NB, Pribill I, Berger J, Nussbaum RL, Murphy EJ (2006). Acyl-CoA synthetase activity links wild-type but not mutant alpha-synuclein to brain arachidonate metabolism. *Biochemistry.* 45(22):6956-66.
- Gómez-Santos C, Barrachina M, Giménez-Xavier P, Dalfó E, Ferrer I, Ambrosio S (2005). Induction of C/EBP beta and GADD153 expression by dopamine in human neuroblastoma cells. Relationship with alpha-synuclein increase and cell damage. *Brain Res Bull.* 65(1):87-95.
- Good PF, Hsu A, Werner P, Perl DP, Olanow CW (1998). Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 57(4):338-42.
- Gross SD, Hoffman DP, Fisette PL, Baas P, Anderson RA (1995). A phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-sensitive casein kinase I alpha associates with synaptic vesicles and phosphorylates a subset of vesicle proteins. *J Cell Biol.* 130(3):711-24.
- Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA (2002). S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science.* 297(5584):1186-90.
- Han H, Weinreb PH, Lansbury PT Jr (1995). The core Alzheimer's peptide NAC forms amyloid fibrils which seed and are seeded by beta-amyloid: is NAC a common trigger or target in neurodegenerative disease? *Chem Biol.* 2(3):163-9.

- Hasegawa M, Fujiwara H, Nonaka T, Wakabayashi K, Takahashi H, Lee VM, Trojanowski JQ, Mann D, Iwatsubo T (2002). Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. *J Biol Chem.* 277(50):49071-6.
- Hashimoto M, Hsu LJ, Rockenstein E, Takenouchi T, Mallory M, Masliah E (2002). alpha-Synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells. *J Biol Chem.* 277(13):11465-72.
- Hashimoto M, Masliah E (1999). Alpha-synuclein in Lewy body disease and Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 9, 707-20.
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y (2003). Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci.* 116(Pt 20):4077-85.
- Hecker M, Mulsch A, Busse R (1994). Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem.* 62, 1524-1529.
- Herceg Z, Wang ZQ (1999). Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 19:5124-5133.
- Hitri A, Hurd YL, Wyatt RJ, Deutsch SI (1994). Molecular, functional and biochemical characteristics of the dopamine transporter: regional differences and clinical relevance. *Clin Neuropharmacol.* 17: 1-22
- Hoyer W, Antony T, Cherny D, Heim G, Jovin TM, Subramaniam V (2002). Dependence of alpha-synuclein aggregate morphology on solution conditions. *J Mol Biol.* 322(2):383-93.
- Hsu LJ, Sagara Y, Arroyo A, Rockenstein E, Sisk A, Mallory M, Wong J, Takenouchi T, Hashimoto M, Masliah E (2000). alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. *Am J Pathol.* 157(2):401-10.
- Hu M, Waring JF, Gopalakrishnan M, Li J (2008). Role of GSK-3 beta activation and alpha7 nAChRs in Abeta (1-42)-induced tau phosphorylation in PC12 cells. *J Neurochem.* 106(3):1371-7.
- Huang X, Atwood CS, Hartshorn MA, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Cuajungco MP, Gray DN, Lim J, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI (1999a). The Abeta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* 38, 7609-7616.
- Huang X, Cuajungco MP, Atwood CS, Hartshorn MA, Tyndall JD, Hanson GR, Stokes KC, Leopold M, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Saunders AJ, Lim J, Moir RD, Glabe C, Bowden EF, Masters CL, Fairlie DP, Tanzi RE, Bush AI (1999b). Cu(II) potentiation of Alzheimer Abeta neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. *J. Biol. Chem.* 274, 37111-37116.
- Huang Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2005). NF-kappaB precursor, p105, and NF-kappaB inhibitor, IkappaBgamma, are both elevated in Alzheimer disease brain. *Neurosci Lett* 373: 115-118.



- Hunya A, Földi I, Szegedi V, Soós K, Zarándi M, Szabó A, Zádori D, Penke B, Datki ZL (2008). Differences between normal and alpha-synuclein overexpressing SH-SY5Y neuroblastoma cells after Abeta(1-42) and NAC treatment. *Brain Res Bull.* 75(5):648-54.
- Hyun DH, Lee M, Halliwell B, Jenner P (2003). Proteasomal inhibition causes the formation of protein aggregates containing a wide range of proteins, including nitrated proteins. *J Neurochem.* 86(2):363-73.
- Ibáñez P, Bonnet AM, Débarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Dürr A, Brice A (2004). Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet.* 364(9440):1169-71.
- Ikeuchi T, Kakita A, Shiga A, Kasuga K, Kaneko H, Tan CF, Idezuka J, Wakabayashi K, Onodera O, Iwatsubo T, Nishizawa M, Takahashi H, Ishikawa A (2008). Patients homozygous and heterozygous for SNCA duplication in a family with parkinsonism and dementia. *Arch Neurol.* 65(4):514-9.
- Iravani MM, Kashefi K, Mander P, Rose S, Jenner P (2002). Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neuroscience* 110 49-58.
- Ishizawa T, Mattila P, Davies P, Wang D, Dickson DW (2003). Colocalization of tau and alpha-synuclein epitopes in Lewy bodies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 62:389-97
- Iwai A, Masliah E, Sundsmo MP, DeTeresa R, Mallory M, Salmon DP, Saitoh T (1996). The synaptic protein NACP is abnormally expressed during the progression of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 720(1-2):230-4.
- Iwai A, Yoshimoto M, Masliah E, Saitoh T (1995). Non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid (NAC) is amyloidogenic. *Biochemistry.* 34(32):10139-45.
- Iwai, A (2000). Properties of NACP/alpha-synuclein and its role in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1502, 95-109.
- Iwata A, Maruyama M, Akagi T, Hashikawa T, Kanazawa I, Tsuji S, Nukina N (2003). Alpha-synuclein degradation by serine protease neurosin: implication for pathogenesis of synucleinopathies. *Hum Mol Genet.* 12(20):2625-35.
- Iwata A, Maruyama M, Kanazawa I, Nukina N (2001). alpha-Synuclein affects the MAPK pathway and accelerates cell death. *J Biol Chem.* 30;276:45320-9.
- Iwata A, Miura S, Kanazawa I, Sawada M, Nukina N (2001). alpha-Synuclein forms a complex with transcription factor Elk-1. *J Neurochem.* 77:239-52.
- Jeannotte AM, Sidhu A (2007). Regulation of the norepinephrine transporter by alpha-synuclein-mediated interactions with microtubules. *Eur J Neurosci.* 26(6):1509-20.
- Jellinger KA (2002). Recent developments in the pathology of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* (62):347-76.
- Jellinger KA (2004). Lewy body-related alpha-synucleinopathy in the aged human brain. *J. Neural Transm.* 111, 1219-1235.

- Jenco JM, Rawlingson A, Daniels B, Morris AJ (1998). Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. *Biochemistry*. 37(14):4901-9.
- Jensen PH, Hojrup P, Hager H, Nielsen MS, Jacobsen L, Olesen OF, Gliemann J, Jakes R (1997). Binding of Abeta to alpha- and beta-synucleins: identification of segments in alpha-synuclein/NAC precursor that bind Abeta and NAC. *Biochem J*. 323 (Pt 2):539-46.
- Jensen PH, Islam K, Kenney J, Nielsen MS, Power J, Gai WP (2000). Microtubule-associated protein 1B is a component of cortical Lewy bodies and binds alpha-synuclein filaments. *J Biol Chem*. 275: 21500-7.
- Jesko H, Chalimoniuk M, Strosznajder JB (2003). Activation of constitutive nitric oxide synthase(s) and absence of inducible isoform in aged rat brain. *Neurochem Int*. 42(4):315-22.
- Jo E, Fuller N, Rand RP, St George-Hyslop P, Fraser PE (2002). Defective membrane interactions of familial Parkinson's disease mutant A30P alpha-synuclein. *J Mol Biol*. 315:799-807
- Johnson MD, Kinoshita Y, Xiang H, Ghatan S, Morrison RS (1999). Contribution of p53-dependent caspase activation to neuronal cell death declines with neuronal maturation. *J Neurosci*. 19(8):2996-3006.
- Kabogo D, Rauw G, Amritraj A, Baker G, Kar S (2008). beta-Amyloid-related peptides potentiate K(+)-evoked glutamate release from adult rat hippocampal slices. *Neurobiol Aging* (Epub ahead of print).
- Kalivendi SV, Cunningham S, Kotamraju S, Joseph J, Hillard CJ, Kalyanaraman B (2004). Alpha-synuclein up-regulation and aggregation during MPP+-induced apoptosis in neuroblastoma cells: intermediacy of transferrin receptor iron and hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 279(15):15240-7.
- Kanda S, Bishop JF, Eglitis MA, Yang Y, Mouradian MM (2000). Enhanced vulnerability to oxidative stress by alpha-synuclein mutations and C-terminal truncation. *Neuroscience*. 97(2):279-84.
- Kaul S, Anantharam V, Kanthasamy A, Kanthasamy AG (2005). Wild-type alpha-synuclein interacts with pro-apoptotic proteins PKCdelta and BAD to protect dopaminergic neuronal cells against MPP+-induced apoptotic cell death. *Brain Res Mol Brain Res*. 139(1):137-52.
- Kawakamia S, Ichikawab M, Yokosukab M, Tsukamura H, Maedaa K (1998). Glial and neuronal localization of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity in the median eminence of female rats *Brain Res*. 789(2), 322-326
- Kay DM, Factor SA, Samii A, Higgins DS, Griffith A, Roberts JW, Leis BC, Nutt JG, Montimurro JS, Keefe RG, Atkins AJ, Yearout D, Zabetian CP, Payami H (2008). Genetic association between alpha-synuclein and idiopathic Parkinson's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 147B(7):1222-30.

- Kayed R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE, Glabe CG (2004). Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J Biol Chem.* 279(45):46363-6.
- Keil U, Bonert A, Marques CA, Scherping I, Weyermann J, Strosznajder JB, Muller-Spahn F, Haass Ch, Czech Ch, Paradier L, Muller WE, Eckert A (2004). Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 50310–50320.
- Kilbourn MR, Kuszpit K, Sherman P (2000). Rapid and differential losses of in vivo dopamine transporter (DAT) and vesicular monoamine transporter (VMAT2) radioligand binding in MPTP-treated mice. *Synapse.* 35(4):250-5.
- Kim S, Jeon BS, Heo C, Im PS, Ahn TB, Seo JH, Kim HS, Park CH, Choi SH, Cho SH, Lee WJ, Suh YH (2004). Alpha-synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocyte in Parkinson's disease. *FASEB J.* 18(13):1615-7.
- Kim YS, Laurine E, Woods W, Lee SJ (2006). A novel mechanism of interaction between alpha-synuclein and biological membranes. *J Mol Biol.* 360(2):386-97.
- Kitamura Y, Shimohama S, Ota T, Matsuoka Y, Nomura Y, Taniguchi T (1997). Alteration of transcription factors NF-kappaB and STAT1 in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Lett* 237: 17-20.;
- Klegeris A, Giasson BI, Zhang H, Maguire J, Pelech S, McGeer PL (2006). Alpha-synuclein and its disease-causing mutants induce ICAM-1 and IL-6 in human astrocytes and astrocytoma cells. *FASEB J.* 20(12): 2000-8.
- Kobayashi H, Ide S, Hasegawa J, Ujike H, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Shen HW, Ikeda K, Sora I (2004). Study of association between alpha-synuclein gene polymorphism and methamphetamine psychosis/dependence. *Ann N Y Acad Sci.* 1025:325-34.
- Koeck T, Fu X, Hazen SL, Crabb JW, Stuehr DJ, Aulak KS (2004). Rapid and selective oxygen-regulated protein tyrosine denitration and nitration in mitochondria. *J Biol Chem.* 279(26):27257-62.
- Kontopoulos E, Parvin JD, Feany MB (2006). Alpha-synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Hum Mol Genet.* 15(20):3012-23.
- Konwall NW, Hantraye P, Brouillet E, Beal MF, McKee AC, Ferrante RJ (2000). MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *NeuroReprt* 11, 211-213
- Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS (1992). Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol.* 5(6):834-42.
- Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet.* 18(2):106-8.
- Kumer SC, Vrana KE (1996). Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 67:443-62.

- Kurata T, Kawarabayashi T, Murakami T, Miyazaki K, Morimoto N, Ohta Y, Takehisa Y, Nagai M, Ikeda M, Matsubara E, Westaway D, Hyslop PS, Harigaya Y, Kamiya T, Shoji M, Abe K (2007). Enhanced accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in double transgenic mice expressing mutant beta-amyloid precursor protein and presenilin-1. *J. Neurosci. Res.* 85, 2246–252.
- Kusakawa, G. et al. (2000) Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J. Biol. Chem.* 275, 17166–17172
- LaFerla FM, Hall CK, Ngo L, Jay G (1996). Extracellular deposition of beta-amyloid upon p53-dependent neuronal cell death in transgenic mice. *J Clin Invest.* 98(7):1626-32.
- Lahiri DK, Chen D, Ge YW, Farlow M, Kotwal G, Kanthasamy A, Ingram DK, Greig NH (2003). Does nitric oxide synthase contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease? Effects of beta-amyloid deposition on NOS in transgenic mouse brain with AD pathology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1010, 639–642.
- Lakkaraju A, Dubinsky JM, Low WC, Rahman YE (2001). Neurons are protected from excitotoxic death by p53 antisense oligonucleotides delivered in anionic liposomes. *J Biol Chem.* 276(34):32000-7.
- Lam PY, Cadenas E (2008). Compromised proteasome degradation elevates neuronal nitric oxide synthase levels and induces apoptotic cell death. *Arch Biochem Biophys.* 478(2):181-6.
- Larsen KE, Schmitz Y, Troyer MD, Mosharov E, Dietrich P, Quazi AZ, Savalle M, Nemani V, Chaudhry FA, Edwards RH, Stefanis L, Sulzer D (2006). Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. *J Neurosci.* 26(46):11915-22
- Lashuel HA, Petre BM, Wall J, Simon M, Nowak RJ, Walz T, Lansbury PT (2002). Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J Mol Biol.* 322:1089-102.
- Lavedan C (1998). The synuclein family. *Genome Res.* 8 :871-80
- Lee D, Lee SY, Lee EN, Chang CS, Paik SR (2002). alpha-Synuclein exhibits competitive interaction between calmodulin and synthetic membranes. *J Neurochem.* 82:1007-17.
- Lee FJ, Liu F, Pristupa ZB, Niznik HB (2001). Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J.* 15:916-26.
- Lee HJ, Khoshaghideh F, Patel S, Lee SJ (2004). Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway. *J Neurosci.* 24(8):1888-96.
- Lee HJ, Patel S, Lee SJ (2005). Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J Neurosci.* 25(25):6016-24.
- Lee HJ, Suk JE, Bae EJ, Lee JH, Paik SR, Lee SJ (2008). Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(9):1835-49.
- Lee JH, Kim HS, Lee SJ, Kim KT (2007). Stabilization and activation of p53 induced by Cdk5 contributes to neuronal cell death. *J Cell Sci.* 120(13):2259-71

- Lee KY, Clark AW, Rosales JL, Chapman K, Fung T, Johnston RN (1999). Elevated neuronal Cdc2-like kinase activity in the Alzheimer disease brain. *Neurosci. Res.* 34, 21–29
- Lee M, Hyun D, Halliwell B, Jenner P (2001). Effect of the overexpression of wild-type or mutant alpha-synuclein on cell susceptibility to insult. *J Neurochem.* 76(4):998-1009.
- Lee MK, Stirling W, Xu Y, Xu X, Qui D, Mandir AS, Dawson TM, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL (2002). Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(13):8968-73.
- Lee MS, Kao SC, Lemere CA, Xia W, Tseng HC, Zhou Y, Neve R, Ahljianian MK, Tsai LH (2003). APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *J. Cell Biol.* 163, 83–95
- Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH (2000). Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405, 360–364;
- Lee PH, Lee G, Park HJ, Bang OY, Joo IS, Huh K (2006). The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neural Transm.* 113(10):1435-9.
- Lee SJ (2008). Origins and effects of extracellular alpha-synuclein: implications in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci.* 34(1):17-22.
- Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D (2009). Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* 62, 788-801
- Li W, Lesuisse C, Xu Y, Troncoso JC, Price DL, Lee MK (2004). Stabilization of alpha-synuclein protein with aging and familial parkinson's disease-linked A53T mutation. *J Neurosci.* 24(33):7400-9.
- Li Y, Sun L, Cai T, Zhang Y, Lv S, Wang Y, Ye L (2010). alpha-Synuclein overexpression during manganese-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res Bull.* 81(4-5):428-33
- Li Z, Arnaud L, Rockwell P, Figueiredo-Pereira ME (2004b). A single amino acid substitution in a proteasome subunit triggers aggregation of ubiquitinated proteins in stressed neuronal cells. *J Neurochem.* 90(1):19-28.
- Liang JH, Du J, Xu LD, Jiang T, Hao S, Bi J, Jiang B (2009). Catalpol protects primary cultured cortical neurons induced by Abeta(1-42) through a mitochondrial-dependent caspase pathway. *Neurochem Int.* 55(8):741-6.
- Liang T, Carr LG (2006). Regulation of alpha-synuclein expression in alcohol-preferring and -non preferring rats. *J Neurochem.* 99(2):470-82.
- Lin MT, Beal MF (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 443(7113):787-95.
- Lin WL, DeLucia MW, Dickson DW (2004). Alpha-synuclein immunoreactivity in neuronal nuclear inclusions and neurites in multiple system atrophy. *Neurosci Lett.* 354(2):99-102

- Lindersson E, Beedholm R, Højrup P, Moos T, Gai W, Hendil KB, Jensen PH (2004). Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. *J Biol Chem.* 279(13):12924-34.
- Lippa CF, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ (1999). Antibodies to alpha-synuclein detect Lewy bodies in many Down's syndrome brains with Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 45(3):353-7.
- Liscovitch M, Czarny M, Fiucci G, Tang X (2000). Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J.* 345 :401-15.
- Liu CW, Corboy MJ, DeMartino GN, Thomas PJ (2003). Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science.* 299(5605):408-11.
- Liu G, Zhang C, Yin J, Li X, Cheng F, Li Y, Yang H, Uéda K, Chan P, Yu S (2009). alpha-Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neurosci Lett.* 454(3):187-92.
- Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT Jr (2002). The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell.* 111(2):209-18.
- Liu Y, Schubert D (1998). Steroid hormones block amyloid fibril-induced 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) formazan exocytosis: Relationship to neurotoxicity. *J. Neurochem.* 71, 2322–2329.
- Lopez OL, Wisniewski S, Hamilton RL, Becker JT, Kaufer DI, DeKosky ST (2000). Predictors of progression in patients with AD and Lewy bodies. *Neurology* 54, 1774–1779
- Lotharius J, Barg S, Wiekop P, Lundberg C, Raymon HK, Brundin P (2002). Effect of mutant alpha-synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line. *J Biol Chem* 277:38884-94
- Lotharius J, Brundin P (2002). Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 11:2395-407.
- Lowe R, Pountney DL, Jensen PH, Gai WP, Voelcker NH (2004). Calcium(II) selectively induces alpha-synuclein annular oligomers via interaction with the C-terminal domain. *Protein Sci.* 13(12):3245-52.
- Lucking CB, Brice A (2000). Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci.* 57:1894-908.
- Luth HJ, Arendt T (1997). Co-expression of APP with cNOS but not iNOS after cortical injury in rat. *Neuroreport* 8, 2321–2324.
- Luth HJ, Holzer M, Gartner U, Staufenbiel M, Arendt T (2001). Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology. *Brain Res.* 913, 57–67.
- Luth HJ, Münch G, Arendt T (2002). Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation. *Brain Res.* 953(1-2):135-43.

- Maguire-Zeiss KA, Short DW, Federoff HJ (2005). Synuclein, dopamine and oxidative stress: co-conspirators in Parkinson's disease? *Brain Res Mol Brain Res.* 134:18-23.
- Mandal PK, Pettegrew JW, Masliah E, Hamilton RL, Mandal R (2006). Interaction between A $\beta$  Peptide and  $\alpha$ -Synuclein: Molecular Mechanisms in Overlapping Pathology of Alzheimer's and Parkinson's in Dementia with Lewy Body Disease. *Neurochem. Res.* 31, 1153-1162
- Marinova-Mutafchieva L, Sadeghian M, Broom L, Davis JB, Medhurst AD, Dexter DT (2009). Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: a time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 110(3):966-75.
- Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci.* 8(8):2804-15.
- Martinez J, Moeller I, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Luring B (2003). Parkinson's disease-associated alpha-synuclein is a calmodulin substrate. *J Biol Chem.* 278:17379-87.
- Masliah E, Sisk A, Mallory M, Mucke L, Schenk D, Games D (1996). Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein and Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 16(18):5795-811.
- Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, Sagara Y, Sisk A, Mucke, L (2000). Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287, 1265-1269.
- Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Sagara Y, Malloiry M, Hashimoto M, Mucke L (2001).  $\beta$ -Amyloid peptides enhance  $\alpha$ -synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1998. pp. 12245-12250.
- Matos M, Augusto E, Oliveira CR, Agostinho P (2008). Amyloid-beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: involvement of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase cascades. *Neuroscience*, 156, 898-910.
- McNaught KS, Mytilineou C, Jnobaptiste R, Yabut J, Shashidharan P, Jennert P, Olanow CW (2002). Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *J Neurochem.* 81(2):301-6.
- McNaught KS, Olanow CW, Halliwell B, Isacson O, Jenner P (2001). Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2(8):589-94.
- Mellick GD, Maraganore DM, Silburn PA (2005). Australian data and meta-analysis lend support for alpha-synuclein (NACP-Rep1) as a risk factor for Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 375(2):112-6.
- Mezey E, Dehejia A, Harta G, Papp MI, Polymeropoulos MH, Brownstein MJ (1998a). Alpha synuclein in neurodegenerative disorders: murderer or accomplice? *Nat Med.* 4(7):755-7.
- Mezey E, Dehejia AM, Harta G, Tresser N, Suchy SF, Nussbaum RL, Brownstein MJ, Polymeropoulos MH (1998b). Alpha synuclein is present in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease. *Mol Psychiatry.* 3(6):493-9.

- Michell AW, Tofaris GK, Gossage H, Tyers P, Spillantini MG, Barker RA (2007). The effect of truncated human alpha-synuclein (1-120) on dopaminergic cells in a transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Cell Transplant.* 16(5):461-74.
- Mikolaenko I, Pletnikova O, Kawas CH, O'Brien R, Resnick SM, Crain B, Troncoso JC (2005). Alpha-synuclein lesions in normal aging, Parkinson disease, and Alzheimer disease: evidence from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 156-162.
- Miller DW, Hague SM, Clarimon J, Baptista M, Gwinn-Hardy K, Cookson MR, Singleton Aß (2004). Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology.* 62(10):1835-8.
- Mishizen-Eberz AJ, Guttman RP, Giasson BI, Day GA 3rd, Hodara R, Ischiropoulos H, Lee VM, Trojanowski JQ, Lynch DR (2003). Distinct cleavage patterns of normal and pathologic forms of alpha-synuclein by calpain I in vitro. *J Neurochem.* 86(4):836-47.
- Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose Y, Nagai Y, Oka A, Inoko H, Fukae J, Saito Y, Sawabe M, Murayama S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T (2006). Multiple candidate gene analysis identifies alpha-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 15(7):1151-8.
- Morel P, Fauconneau B, Page G, Mirbeau T, Huguet F (1998). Inhibitory effects of ascorbic acid on dopamine uptake by rat striatal synaptosomes: relationship to lipid peroxidation and oxidation of protein sulfhydryl groups. *Neurosci. Res.* 32, 171-179.
- Moussa CE, Wersinger C, Tomita Y, Sidhu A (2004). Differential cytotoxicity of human wild type and mutant alpha-synuclein in human neuroblastoma SH-SY5Y cells in the presence of dopamine. *Biochemistry.* 43(18):5539-50.
- Mueller JC, Fuchs J, Hofer A, Zimprich A, Lichtner P, Illig T, Berg D, Wüllner U, Meitinger T, Gasser T (2005). Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 57(4):535-41.
- Muenter MD, Forno LS, Hornykiewicz O, Kish SJ, Maraganore DM, Caselli RJ, Okazaki H, Howard FM Jr, Snow BJ, Calne DB (1998). Hereditary form of parkinsonism--dementia. *Ann Neurol.* 43(6):768-81.
- Mukaetova-Ladinska EB, Hurt J, Jakes R, Xuereb J, Honer WG, Wischik CM (2000). Alpha-synuclein inclusions in Alzheimer and Lewy body diseases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 59(5):408-17.
- Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VM (2000). Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 20: 3214-3220.)
- Murray IV, Giasson BI, Quinn SM, Koppaka V, Axelsen PH, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM (2003). Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. *Biochemistry.* 42(28):8530-40.



- Nakamura T, Lipton SA (2009). Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Apoptosis*. 14(4):455-68.
- Nakamura T, Yamashita H, Nagano Y, Takahashi T, Avraham S, Avraham H, Matsumoto M, Nakamura S (2002). Activation of Pyk2/RAFTK induces tyrosine phosphorylation of alpha-synuclein via Src-family kinases. *FEBS Lett*. 521:190-4.
- Nguyen MD, Larivière RC, Julien JP (2001). Deregulation of Cdk5 in a mouse model of ALS: toxicity alleviated by perikaryal neurofilament inclusions. *Neuron* 30: 135-147;
- Nickel W (2003). The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem*. 270(10): 2109-19.
- Ninkina N, Papachroni K, Robertson DC, Schmidt O, Delaney L, O'Neill F, Court F, Rosenthal A, Fleetwood-Walker SM, Davies AM, Buchman VL (2003). Neurons expressing the highest levels of gamma-synuclein are unaffected by targeted inactivation of the gene. *Mol Cell Biol*. 23(22): 8233-45.
- Nishie M, Mori F, Fujiwara H, Hasegawa M, Yoshimoto M, Iwatsubo T, Takahashi H, Wakabayashi K (2004). Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in the brain and peripheral ganglia of patients with multiple system atrophy. *Acta Neuropathol*. 107(4):292-8.
- Norris EH, Giasson BI, Ischiropoulos H, Lee VM (2003). Effects of oxidative and nitrative challenges on alpha-synuclein fibrillogenesis involve distinct mechanisms of protein modifications. *J Biol Chem*. 278(29): 27230-40.
- Obi K, Akiyama H, Kondo H, Shimomura Y, Hasegawa M, Iwatsubo T, Mizuno Y, Mochizuki H (2007). Relationship of phosphorylated alpha-synuclein and tau accumulation to Abeta deposition in the cerebral cortex of dementia with Lewy bodies. *Exp. Neurol*. 210: 409-420.
- Okochi M, Walter J, Koyama A, Nakajo S, Baba M, Iwatsubo T, Meijer L, Kahle PJ, Haass C (2000). Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. *J Biol Chem*. 275:390-7.
- Oluwatosin-Chigbu Y, Robbins A, Scott CW, Arriza JL, Reid JD, Zysk JR (2003). Parkin suppresses wild-type alpha-synuclein-induced toxicity in SHSY-5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 309(3):679-84.
- Ostrerova N, Petrucelli L, Farrer M, Mehta N, Choi P, Hardy J, Wolozin B (1999). alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J Neurosci*. 19(14):5782-91.
- Ostrerova-Golts N, Petrucelli L, Hardy J, Lee JM, Farrer M, Wolozin B (2000). The A53T alpha-synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity. *J. Neurosci*. 20, 6048-6054.
- Otth C, Concha II, Arendt T, Stieler J, Schliebs R, González-Billault C, Maccioni RB (2002). APP induces cdk5-dependent tau hyperphosphorylation in transgenic mice Tg2576. *J. Alzheimers Dis*. 4, 417-430
- Paik SR, Shin HJ, Lee JH (2000). Metal-catalyzed oxidation of alpha-synuclein in the presence of Copper(II) and hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys*. 378, 269-277

- Paik SR, Shin HJ, Lee JH, Chang CS, Kim J (1999). Copper(II)-induced self-oligomerization of alpha-synuclein. *Biochem. J.* 340, 821-828.
- Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M, Ghafourifar P (2008). Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cell Mol Life Sci* 65: 1272-1284.
- Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M, Ghafourifar P (2009). Alpha-synuclein overexpression and aggregation exacerbates impairment of mitochondrial functions by augmenting oxidative stress in human neuroblastoma cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 41(10):2015-24.
- Park SJ, Nam KW, Lee HJ, Cho EY, Koo U, Mar W (2009). Neuroprotective effects of an alkaloid-free ethyl acetate extract from the root of *Sophora flavescens* Ait. against focal cerebral ischemia in rats. *Phytomedicine.* 16(11):1042-51.
- Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402, 615-622
- Payton JE, Perrin RJ, Woods WS, George JM (2004). Structural Determinants of PLD2 Inhibition by alpha-Synuclein. *J Mol Biol* 337: 1001-1009.
- Pellistri F, Bucciantini M, Relini A, Nosi D, Gliozzi A, Robello M, Stefani M (2008). Nonspecific interaction of prefibrillar amyloid aggregates with glutamatergic receptors results in Ca<sup>2+</sup> increase in primary neuronal cells. *J Biol Chem.* 31, 29950-29960
- Peluffo G, Radi R (2007). Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res.* 75(2):291-302.
- Peng X, Tehranian R, Dietrich P, Stefanis L, Perez RG (2005). Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *J Cell Sci.* 118 (Pt 15):3523-30.
- Perez RG, Hastings TG (2004). Could a loss of alpha-synuclein function put dopaminergic neurons at risk? *J Neurochem.* 89:1318-24.
- Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JC, Guo F, Zigmond Mj (2002). A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci.* 22:3090-9
- Perier C, Bové J, Wu DC, Dehay B, Choi DK, Jackson-Lewis V, Rathke-Hartlieb S, Bouillet P, Strasser A, Schulz JB, Przedborski S, Vila M (2007). Two molecular pathways initiate mitochondria-dependent dopaminergic neurodegeneration in experimental Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(19):8161-6.
- Petersen K, Olesen OF, Mikkelsen JD (1999). Developmental expression of  $\alpha$ -synuclein in rat hippocampus and cerebral cortex. *Neuroscience* 91: 651-659
- Petersen RC (1998). Clinical subtypes of Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 9 Suppl 3:16-24.
- Pieper AA, Blackshaw S, Clements EE, Brat DJ, Krug DK, White AJ, Pinto\_Garcia P, Favitt A, Conover JR, Snyder SH, Verma A (2000). Poly(ADP-ribosylation) basally activated by DNA strand breaks reflects glutamate-nitric oxide neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97 (4) 1845-1850.

- Piga R, Saito Y, Yoshida Y, Niki E (2007). Cytotoxic effects of various stressors on PC12 cells: involvement of oxidative stress and effect of antioxidants. *Neurotoxicology* 28, 167-75.
- Piskunova TS, Yurova MN, Ovsyannikov AI, Semenchenko AV, Zabezhinski MA, Popovich IG, Wang ZQ, Anisimov VN (2008). Deficiency in Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Accelerates Aging and Spontaneous Carcinogenesis in Mice. *Curr Gerontol Geriatr Res.*:754190
- Pletnikova O, West N, Lee MK, Rudow GL, Skolasky RL, Dawson TM, Marsh L, Troncoso JC (2005). Abeta deposition is associated with enhanced cortical alpha-synuclein lesions in Lewy body diseases. *Neurobiol. Aging* 26, 1183-1192.
- Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC (1996). Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science*. 274(5290):1197-9.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 276(5321):2045-7.
- Pronin AN, Morris AJ, Surguchov A, Benovic JL (2000). Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem*. 275(34):26515-22.
- Pytlowany M, Strosznajder JB, Ješko H, Cakała M, Strosznajder RP (2008). Molecular mechanism of PC12 cell death evoked by sodium nitroprusside, a nitric oxide donor. *Acta Biochim Pol*; 55: 339-347
- Qian J, Chenga Y, Yang Y, Mao C, Qin Z, Li K, Liu C (2008). Differential effects of overexpression of wild-type and mutant human  $\alpha$ -synuclein on MPP<sup>+</sup>-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 435, 142-146
- Recchia A, Debetto P, Negro A, Guidolin D, Skaper SD, Giusti P (2004). Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *FASEB J*. 18(6):617-26.
- Rideout HJ, Larsen KE, Sulzer D, Stefanis L (2001). Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/alpha-synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells. *J Neurochem*. 78(4):899-908
- Rockenstein E, Hansen LA, Mallory M, Trojanowski JQ, Galasko D, Masliah E (2001). Altered expression of the synuclein family mRNA in Lewy body and Alzheimer's disease. *Brain Res*. 914(1-2):48-56.
- Rodrigo J, Fernandez-Vizarra P, Castro-Blanco S, Bentura ML, Nieto M, Gomez-Isla T, Martinez-Murillo R, Martinez A, Serrano J, Fernandez AP (2004). Nitric oxide in the cerebral cortex of amyloid-precursor protein (SW) Tg2576 transgenic mice. *Neuroscience* 128, 73-89.
- Ross OA, Braithwaite AT, Skipper LM, Kachergus J, Hulihan MM, Middleton FA, Nishioka K, Fuchs J, Gasser T, Maraganore DM, Adler CH, Larvor L, Chartier-Harlin MC, Nilsson C,

- Langston JW, Gwinn K, Hattori N, Farrer MJ (2008). Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism. *Ann Neurol.* 63(6):743-50.
- Royall JA, Ischiropoulos H (1993). Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 302: 348-355.
- Saha AR, Ninkina NN, Hanger DP, Anderton BH, Davies AM, Buchman VL (2000). Induction of neuronal death by alpha-synuclein. *Eur J Neurosci.* 12(8):3073-7.
- Saito Y, Kawai M, Inoue K, Sasaki R, Arai H, Nanba E, Kuzuhara S, Ihara Y, Kanazawa I, Murayama S.J (2000). Widespread expression of alpha-synuclein and tau immunoreactivity in Hallervorden-Spatz syndrome with protracted clinical course. *Neurol Sci.* 177(1):48-59.
- Sangchot P, Sharma S, Chetsawang B, Porter J, Govitrapong P, Ebadi M (2002). Deferoxamine attenuates iron-induced oxidative stress and prevents mitochondrial aggregation and alpha-synuclein translocation in SK-N-SH cells in culture. *Dev Neurosci.* 24(2-3), 143-53.
- Sangchot P, Sharma S, Chetsawang B, Porter J, Govitrapong P, Ebadi M (2002). Deferoxamine attenuates iron-induced oxidative stress and prevents mitochondrial aggregation and alpha-synuclein translocation in SK-N-SH cells in culture. *Dev Neurosci.* 24(2-3):143-53.
- Schägger H, von Jgow G (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
- Scharstuhl A, Mutsaers HA, Pennings SW, Russel FG, Wagener FA (2009). Involvement of VDAC, Bax and ceramides in the efflux of AIF from mitochondria during curcumin-induced apoptosis. *PLoS One.* 4(8):e6688.
- Schmid G, Strosznajder JB, Wesierska-Gadek J (2006). Interplay between the p53 tumor suppressor protein family and Cdk5: novel therapeutic approaches for the treatment of neurodegenerative diseases using selective Cdk inhibitors. *Mol Neurobiol.* 34(1):27-50.
- Schneider BL, Seehus CR, Capowski EE, Aebischer P, Zhang SC, Svendsen CN (2007). Overexpression of alpha-synuclein in human neural progenitors leads to specific changes in fate and differentiation. *Hum Mol Genet.* 16(6):651-66.
- Schulz J, Matthews R, Klockgether T, Dichgans J, Beal M (1997). The role of mitochondrial dysfunction and neuronal nitric oxide in animal models of neurodegenerative disease. *Mol Cell Biochem* 174, 193-197.
- Seo JH, Rah JC, Choi SH, Shin JK, Min K, Kim HS, Park CH, Kim S, Kim EM, Lee SH, Lee S, Suh SW, Suh YH (2002). Alpha-synuclein regulates neuronal survival via Bcl-2 family expression and PI3/Akt kinase pathway. *FASEB J.* 16:1826-8.
- Sharma N, Hewett J, Ozelius LJ, Ramesh V, Mclean PJ, Breakefield XO, Hyman BT (2001). A close association of torsinA and alpha-synuclein in Lewy bodies: a fluorescence resonance energy transfer study. *Am J Pathol* 159:339-44

- Sharon R, Goldberg MS, Bar-Josef I, Betensky RA, Shen J, Selkoe DJ (2001). alpha-Synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight complexes, binds fatty acids, and shows homology to the fatty acid-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9110-5.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet.* 25(3):302-5.
- Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N (2001). Ubiquitination of a new form of alpha - synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 293: 263-269.
- Shin EC, Cho SE, Lee DK, Hur MW, Paik SR, Park JH, Kim J (2000). Expression patterns of alpha-synuclein in human hematopoietic cells and in *Drosophila* at different developmental stages. *Mol Cells.* 10(1):65-70
- Shtilerman MD, Ding TT, Lansbury PT Jr (2002). Molecular crowding accelerates fibrillization of alpha-synuclein: could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease? *Biochemistry.* 41(12):3855-60.
- Shults CW (2006). Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1661-1668.
- Sidhu A, Wersinger C, Vernier P (2004a). alpha-Synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 565:1-5.
- Sidhu A, Wersinger C, Vernier P (2004b). Does alpha-synuclein modulate dopaminergic synaptic content and tone at the synapse? *FASEB J.* 18(6):637-47.
- Sidorikina O, Espey MG, Miranda KM, Wink DA, Laval J (2003). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. *Free Radic Biol Med.* 35: 1431-1438.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science.* 302(5646):841.
- Smith WW, Jiang H, Pei Z, Tanaka Y, Morita H, Sawa A, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA (2005). Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Hum Mol Genet.* 14(24):3801-11.
- Smith WW, Margolis RL, Li X, Troncoso JC, Lee MK, Dawson VL, Dawson TM, Iwatsubo T, Ross CA (2005). Alpha-synuclein phosphorylation enhances eosinophilic cytoplasmic inclusion formation in SH-SY5Y cells. *J Neurosci.* 25(23):5544-52.
- Smith PD, Crocker SJ, Jackson-Lewis V, Jordan-Sciutto KL, Hayley S, Mount MP, O'Hare MJ, Callaghan S, Slack RS, Przedborski S, Anisman H, Park DS (2003). Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13650-13655

- Snyder H, Mensah K, Theisler C, Lee J, Matouschek A, Wolozin B (2003). Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function. *J Biol Chem.* 278(14):11753-9.
- Song DK, Im YB, Jung JS, Suh HW, Huh SO, Park SW, Wie MB, Kim YH (1999). Differential involvement of central and peripheral norepinephrine in the central lipopolysaccharide-induced interleukin-6 responses in mice. *J. Neurochem.* 72(4): 1625-1633.
- Souza JM, Giasson B I, Chen Q, Lee V, Ischiropoulos H (2000). Dityrosine cross-linking promotes formation of stable alpha -synuclein polymers. Implication of nitrative and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies. *J. Biol. Chem.* 275, 18344–18349
- Specht CG, Tigaret CM, Rast GF, Thalhammer A, Rudhard Y, Schoepfer R (2005). Subcellular localisation of recombinant alpha- and gamma-synuclein. *Mol Cell Neurosci.* 28(2):326-34.
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998). alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(11):6469-73.
- Spillantini MG, Goedert M. The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 920:16-27.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 388(6645):839-40.
- Stavrovskaya IG, Kristal BS (2005). The powerhouse takes control of the cell: Is the mitochondrial permeability transition a viable therapeutic target against neuronal dysfunction and death? *Free Radic. Biol. Med.* 38(6): 687-697.
- Stefanis L, Larsen KE, Rideout HJ, Sulzer D, Greene LA (2001). Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J Neurosci.* 21(24):9549-60.
- Stefanova N, Klimaschewski L, Poewe W, Wenning GK, Reindl M (2001). Glial cell death induced by overexpression of alpha-synuclein. *J Neurosci Res.* 65(5):432-8.
- Steidl JV, Gomez T (2003). Altered short – term hippocampal synaptic plasticity in mutant alpha – synuclein transgenic mice. *Neuroreport.* 14: 219 – 223
- Stepanichev MY, Onufriev MV, Yakovlev AA, Khrenov AI, Peregud DI, Vorontsova ON, Lazareva NA, Gulyaeva NV (2008). Amyloid-beta (25-35) increases activity of neuronal NO-synthase in rat brain. *Neurochem Int.* 52(6):1114-24.
- Strosznajder J, Chalimoniuk M, Samochocki M, Gadamski R (1994). Nitric oxide: a potent mediator of glutamatergic neurotoxicity in brain ischemia. *Ann N Y Acad Sci.* 723:429-32.
- Strosznajder JB, Ješko H, Strosznajder RP (2000). Effect of amyloid bet peptide on poly(ADP-ribose)polymerase activity in adult and aged rat hippocampus. *Acta Biochim. Pol.* 47: 847-854.

- Strosznajder JB, Jesko H, Zambrzycka A, Eckert A, Chalimoniuk M (2004). Age-related alteration of activity and gene expression of endothelial nitric oxide synthase in different parts of the brain in rats. *Neurosci. Lett.* 370(2-3): 175-179.
- Strosznajder JB, Ješko H, Zambrzycka A, Eckert A, Chalimoniuk M (2004). Age-related alteration of activity and gene expression of endothelial nitric oxide synthase in different parts of the brain in rats. *Neurosci Lett.* 370(2-3):175-9.
- Strosznajder RP, Jesko H, Adamczyk A (2005). Effect of aging and oxidative/genotoxic stress on poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity in rat brain. *Acta Biochim Pol.* 52(4):909-14.
- Sung JY, Kim J, Paik SR, Park JH, Ahn YS, Chung KC (2001). Induction of neuronal cell death by Rab5A-dependent endocytosis of alpha-synuclein. *J Biol Chem.* 276(29):27441-8.
- Sung JY, Park SM, Lee CH, Um JW, Lee HJ, Kim J, Oh YJ, Lee ST, Paik SR, Chung KC (2005). Proteolytic cleavage of extracellular secreted {alpha}-synuclein via matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 280(26):25216-24.
- Svoboda N, Kerschbaum HH (2009). l-Glutamine-induced apoptosis in microglia is mediated by mitochondrial dysfunction. *Eur J Neurosci.* 30(2):196-206.
- Szpak GM, Lewandowska E, Lechowicz W, Bertrand E, Wierzba-Bobrowicz T, Gwiazda E, Pasennik E, Kosno-Kruszewska E, Lipczyńska-Lojkowska W, Bochyńska A, Fiszer U (2001). Lewy body variant of Alzheimer's disease and Alzheimer's disease: a comparative immunohistochemical study. *Folia Neuropathol.* 39(2):63-71.
- Tabner B.J., Turnbull S., El-Agnaf O.M., Allsop D (2002). Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from Ab and a-synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med.* 32(11), 1076-83
- Tabner BJ, Turnbull S, El-Agnaf O, Allsop D (2001). Production of reactive oxygen species from aggregating proteins implicated in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Curr Top Med Chem.* 1(6), 507-17
- Tanaka S., Takehashi M., Matoh N., Iida S., Suzuki T., Futaki S., Hamada H (2002). Generation of reactive oxygen species and activation of NF-kappaB by non-Abeta component of Alzheimer's disease amyloid. *J. Neurochem.* 82, 305-15
- Tanaka S, Takehashi M, Matoh N, Ueda K (2001).  $\alpha$ -Synuclein/NACP and neurodegeneration. *Neuroscientific Basis of Dementia (Tanaka C, McGeer PL, Ihara Y)*, 137-141. Birkhauser-Verlag, Basel.
- Tanaka Y, Engelender S, Igarashi S, Rao RK, Wanner T, Tanzi RE, Sawa A, Dawson V, Dawson TM, Ross CA (2001). Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet.* 10(9):919-26.
- Terai K, Matsuo A, McGeer PL (1996). Enhancement of immunoreactivity for NF-kappa B in the hippocampal formation and cerebral cortex of Alzheimer's disease. *Brain Res* 735: 159-168.
- Tetsuya T, Hiroshi Y (2002). Tyrosine 125 of a-synuclein plays a critical role for dimerization following nitrative stress. *Brain Res.* 938: 73-80.

- Tofaris GK, Layfield R, Spillantini MG (2001). alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Lett.* 509(1):22-6.
- Togashi H, Sasaki M, Frohman E, Taira E, Ratan RR, Dawson TM, Dawson VL (1997). Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(6):2676-80.
- Tokuda T, Salem SA, Allsop D, Mizuno T, Nakagawa M, Qureshi MM, Locascio JJ, Schlossmacher MG, El-Agnaf OM (2006). Decreased alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 349(1):162-6.
- Toska K, Kleppe R, Armstrong CG, Morrice NA, Cohen P, Haavik J (2002). Regulation of tyrosine hydroxylase by stress-activated protein kinases. *J Neurochem.* 83:775-83.
- Totterdell S, Meredith GE (2005). Localization of alpha-synuclein to identified fibers and synapses in the normal mouse brain. *Neuroscience.* 135:907-13.
- Tran, MH, Yamada K, Olariu A, Mizuno M, Ren XH, Nabeshima T (2001). Amyloid beta-peptide induces nitric oxide production in rat hippocampus: association with cholinergic dysfunction and amelioration by inducible nitric oxide synthase inhibitors. *FASEB J.* 15, 1407-1409
- Trojanowski JQ, Lee VM (1998). Aggregation of neurofilament and alpha-synuclein proteins in Lewy bodies: implications for the pathogenesis of Parkinson disease and Lewy body dementia. *Arch Neurol.* 55:151-2.
- Tsigelny IF, Crews L, Desplats P, Shaked GM, Sharikov Y, Mizuno H, Spencer B, Rockenstein E, Trejo M, Platoshyn O, Yuan JX, Masliah E (2008). Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases. *PLoS ONE* 3:e3135
- Tu XK, Yang WZ, Shi SS, Wang CH, Chen CM (2009). Neuroprotective effect of baicalin in a rat model of permanent focal cerebral ischemia. *Neurochem Res.* 34(9):1626-34.
- Turnbull S, Tabner BJ, El-Agnaf O, Moore S, Davies Y Allsop D (2001). alpha-Synuclein implicated in Parkinson's disease catalyses the formation of hydrogen peroxide in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1163-1170.
- Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA C, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90,1 1282-11286.
- Ulmer TS, Bax A, Cole NB, Nussbaum RL (2005). Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. *J Biol Chem.* 280(10):9595-603.
- Uversky VN (2003). A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders. *J Biomol Struct Dyn.* 21(2):211-34.
- Uversky VN, Li J, Fink AL (2001). Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 500, 105-108.



- Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Stefanis L (2009). Inducible over-expression of wild type alpha-synuclein in human neuronal cells leads to caspase-dependent non-apoptotic death. *J Neurochem.* 109(5):1348-62.
- Verkhatsky A (2007). NMDA Receptors in Glia. *Neuroscientist.* 13(1): 28-37;
- Virag L, Scott GS, Antal-Szalmas P, O'Connor M., Ohshima H, Szabo C (1999). Requirement of intracellular calcium mobilization for peroxynitrite-induced poly(ADP-ribose)synthetase activation and cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.* 56 (4) 824-833
- Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L (2008). Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem.* 283(35):23542-56.
- Volles MJ, Lansbury PT Jr (2007). Relationships between the sequence of alpha-synuclein and its membrane affinity, fibrillization propensity, and yeast toxicity. *J Mol Biol.* 366(5):1510-22.
- Volles MJ, Lee SJ, Rochet JC, Shtilerman MD, Ding TT, Kessler JC, Lansbury PT Jr (2001). Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry.* 40(26):7812-9.
- Volles, M.J., Lansbury, Pt. Jr (2002). Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry.* 41, 4595-4602.
- Wakabayashi K, Matsumoto K, Takayama K, Yoshimoto M, Takahashi H (1997). NACP, a presynaptic protein, immunoreactivity in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 239(1):45-8.
- Wakisaka, Y, Furuta A, Tanizaki Y, Kiyohara Y, Iida M, Iwak T (2003). Age associated prevalence and risk factors of Lewy body pathology in a general population: the Hisayama study. *Acta Neuropathol.* 106, 374-382.
- Wang KK, Posmantur R, Nadimpalli R, Nath R, Mohan P, Nixon RA, Talanian RV, Keegan M, Herzog L, Allen H (1998). Caspase mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin Turing apoptosis. *Arch Biochem Biophys.* 356:187-196.
- Wang Y, Dawson VL, Dawson TM (2009). Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol.* 218(2):193-202.
- Watanabe Y, Kato H, Araki T (2008). Protective action of neuronal nitric oxide synthase inhibitor in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Metab Brain Dis.* 23(1):51-69.
- Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC (2003). Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem.* 278(27):25009-13.
- Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT Jr (1996). NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry.* 35(43):13709-15.
- Wersinger C, Prou D, Vernier P, Niznik HB, Sidhu A (2003a). Mutations in the lipid-binding domain of alpha-synuclein confer overlapping, yet distinct, functional properties in the regulation of dopamine transporter activity. *Mol Cell Neurosci;* 24:91-105.

- Wersinger C, Prou D, Vernier P, Sidhu A (2003b). Modulation of dopamine transporter function by alpha-synuclein is altered by impairment of cell adhesion and by induction of oxidative stress. *FASEB J.* 17:2151-3.
- Wersinger C, Vernier P, Sidhu A (2004). Trypsin disrupts the trafficking of the human dopamine transporter by alpha-synuclein and its A30P mutant. *Biochemistry.* 43:1242-53.
- Wesierska-Gadek J, Bohrn E, Herceg Z, Wang ZQ, Wurzer G (2000). Differential susceptibility of normal and PARP knock-out mouse fibroblasts to proteasome inhibitors. *J Cell Biochem.* 78(4):681-96.
- Wesierska-Gadek J, Schmid G (2001). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the stability of the wild-type p53 protein. *Cell Mol Biol Lett.* 6(2):117-40.
- Wesierska-Gadek J, Wang ZQ, Schmid G (1999). Reduced stability of regularly spliced but not alternatively spliced p53 protein in PARP-deficient mouse fibroblasts. *Cancer Res.* 59(1):28-34.
- Williams BL, Hornig M, Yaddanapudi K, Lipkin WI (2008). Hippocampal poly(ADP-Ribose) polymerase 1 and caspase 3 activation in neonatal bornavirus infection. *J Virol.* 82(4):1748-58.
- Wirhth O, Weickert S, Majtenyi K, Havas L, Kahle PJ, Okochi M, Haass C, Multhaup G, Beyreuther K, Bayer TA (2000). Lewy body variant of Alzheimer's disease: alpha-synuclein in dystrophic neurites of A beta plaques. *Neuroreport.* 11(17):3737-41.
- Wu H, Lozano G (1994). NF-kappa B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J Biol Chem.* 269(31):20067-74.
- Xia Y, Rohan de Silva HA, Rosi BL, Yamaoka LH, Rimmler JB, Pericak-Vance MA, Roses AD, Chen X, Masliah E, DeTeresa R, Iwai A, Sundsmo M, Thomas RG, Hofstetter CR, Gregory E, Hansen LA, Katzman R, Thal LJ, Saitoh T (1996). Genetic studies in Alzheimer's disease with an NACP/alpha-synuclein polymorphism. *Ann Neurol.* 40(2):207-15.
- Xu J, Kao SY, Lee FJ, Song W, Jin LW, Yankner BA (2002). Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat Med.* 8:600-6
- Xu J, Kao SY, Lee FJ, Song W, Jin LW, Yankner BA (2002). Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat Med.* 8(6):600-6.
- Xu S, Zhou M, Yu S, Cai Y, Zhang A, Ueda K, Chan P (2006). Oxidative stress induces nuclear translocation of C-terminus of alpha-synuclein in dopaminergic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 342(1), 330-5.
- Xu S, Zhou M, Yu S, Cai Y, Zhang A, Ueda K, Chan P (2006). Oxidative stress induces nuclear translocation of C-terminus of alpha-synuclein in dopaminergic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 342(1):330-5.
- Yang YX, Latchman DS (2008). Nurr1 transcriptionally regulates the expression of alpha-synuclein. *Neuroreport.* 19(8):867-71.

- Yoshida N, Haga K, Haga T (2003). Identification of sites of phosphorylation by G-protein-coupled receptor kinase 2 in beta-tubulin. *Eur J Biochem.* 270:1154-63.
- Yoshimoto M, Iwai A, Kang D, Otero DA, Xia Y, Saitoh T (1995). NACP, the precursor protein of the non-amyloid beta/A4 protein (A beta) component of Alzheimer disease amyloid, binds A beta and stimulates A beta aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(20):9141-5.
- Yu S, Zuo X, Li Y, Zhang C, Zhou M, Zhang YA, Ueda K, Chan P (2004). Inhibition of tyrosine hydroxylase expression in alpha-synuclein-transfected dopaminergic neuronal cells. *Neurosci Lett.* 367:34-9.
- Yuan Y, Jin J, Yang B, Zhang W, Hu J, Zhang Y, Chen NH (2008). Overexpressed Alpha-Synuclein Regulated the Nuclear Factor-kappaB Signal Pathway. *Cell Mol Neurobiol.* 28:21-33
- Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atarés B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Muñoz DG, de Yebenes JG (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol.* 55(2):164-73.
- Zhang J, Krishnamurthy PK, Johnson GV (2002). Cdk5 phosphorylates p53 and regulates its activity. *J Neurochem.* 81(2):307-13.
- Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH (1994). Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity *Science* 263(5147): 687 – 689
- Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, Wilson B, Zhang W, Zhou Y, Hong JS, Zhang J (2005). Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J.* 19(6):533-42.
- Zhiyuan YG, Kuncewicz T, Dubinsky WP, Konel BC (2006). Nitric Oxide-dependent Negative Feedback of PARP-1 trans-Activation of the Inducible Nitric-oxide Synthase. *J Biol. Chem.* 281(14): 9101-9109,
- Zhuo M, Yu FR, Xu DH, Sun LY, Liu XY (2003). Baculovirus p35 gene greatly enhances PC12 cell's resistance against oxidative stress. *J Neurol Sci.* 216(1):135-41.