

Mgr Anna Magdalena Lenkiewicz

**Udział parkiny w molekularnych mechanizmach
toksyczności egzogennej α -synukleiny
w komórkach dopaminergicznych PC12**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w dyscyplinie: biologia medyczna

Promotor: dr hab. Agata Adamczyk, prof. IMDiK

Promotor pomocniczy: dr Anna Wilkaniec



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2018

*Niniejszą pracę dedykuję
mojemu wspaniałemu
Mężowi i Dzieciom*

*Dziękuję Halinie i Kazimierzowi Lenkiewicz,
za zrozumienie dla wybranej przeze mnie ścieżki kariery
i okazaną pomoc bez której nie mogłabym łączyć
pracy naukowej z macierzyństwem*

*Promotorowi mojej pracy dr hab. Agacie Adamczyk, prof. IMDiK
składam serdeczne podziękowania
za możliwość realizacji tak interesującej pracy badawczej,
ukierunkowanie mojego rozwoju naukowego,
a także za cenne uwagi udzielone
w trakcie realizacji niniejszej rozprawy*

*Pragnę serdecznie podziękować dr Annie Wilkaniec
za nieocenioną pomoc merytoryczną
i wsparcie na każdym etapie prowadzenia badań,
za zaufanie i możliwość uczenia się na błędach
oraz za ciągle motywowanie do rozwijania wiedzy naukowej
i umiejętności badawczych*

*Pragnę serdecznie podziękować
wszystkim Koleżankom i Kolegom
z Zakładu Komórkowej Transdukcji Sygnału
za stworzenie życzliwej atmosfery pracy
i pomoc w realizacji badań*

Wykaz publikacji autorki:

1. Wilkaniec, A. *, **Lenkiewicz, A. M. ***, & Adamczyk, A. (2018). Extracellular alpha-synuclein oligomers induce parkin S-nitrosylation: relevance to sporadic Parkinson's disease etiopathology. *Molecular Neurobiology* (IF: 6.190), praca przyjęta do druku.
* autor równorzędny
2. Jęsko, H., **Lenkiewicz, A. M.**, & Adamczyk, A. (2017). Treatments and compositions targeting α -synuclein: a patent review (2010-2016). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* (IF: 3.041), 27(4), 427-438.
3. Dominiak, A., Wilkaniec, A., Jęsko, H., Czapski, G. A., **Lenkiewicz, A. M.**, Kurek, E., Wroczyński, P., Adamczyk, A. (2017). Selol, an organic selenium donor, prevents lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammatory reaction in the rat brain. *Neurochemistry International* (IF: 3.137), 108, 66-77.
4. **Lenkiewicz, A. M.**, Czapski, G. A., Jęsko, H., Wilkaniec, A., Szypuła, W., Pietrosiuk, A., Uszyńska, A. M., Adamczyk, A. (2016). Potent effects of alkaloid-rich extract from *Huperzia selago* against sodium nitroprusside-evoked PC12 cells damage via attenuation of oxidative stress and apoptosis. *Folia Neuropathologica* (IF: 1.093), 54(2), 156-166.
5. Gąssowska, M., Czapski, G. A., Pająk, B., Cieślik, M., **Lenkiewicz, A. M.**, & Adamczyk, A. (2014). Extracellular α -synuclein leads to microtubule destabilization via GSK-3 β -dependent Tau phosphorylation in PC12 cells. *PLOS ONE* (IF: 3.234), 9(4), e94259.

Wyniki prac prezentowane były w formie licznych komunikatów na konferencjach krajowych i zagranicznych

Autorka uzyskała środki finansowe w ramach:

Stypendium RAT finansowane ze środków Zadania 3. Realizacja programu stypendialnego dla najlepszych studentów, doktorantów i młodych doktorów oraz programu staży „Razem dla Europy” Projektu POKL.04.03.00-00-060/12 „Nowoczesne metody, leki i terapie dla ochrony zdrowia i gospodarki Europy XXI wieku - interdyscyplinarne kształcenie w obszarze nauk biomedycznych na studiach II i III stopnia”

Badania w niniejszej pracy finansowano z projektów badawczych Narodowego Centrum Nauki:

nr 2012/05/B/NZ3/02047

nr 2013/09/D/NZ3/01359

SPIS TREŚCI

1. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM.....	5
2. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM - ABSTRACT	9
3. INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY	14
4. OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY	15
5. WYKAZ RYCIN.....	21
6. WYKAZ TABEL	24
7. WSTĘP	25
7.1. Choroba Parkinsona.....	25
7.1.1. Charakterystyka kliniczna i leczenie	26
7.1.2. Charakterystyka neuropatologiczna.....	27
7.1.3. Molekularne podłoże choroby	28
7.2. Udział α-synukleiny w patomechanizmie choroby Parkinsona.....	31
7.3. Parkina w chorobie Parkinsona	38
7.3.1. Struktura, mechanizm działania i regulacja aktywności parkiny	38
7.3.2. Udział parkiny w regulacji homeostazy białek.....	43
7.3.3. Znaczenie parkiny w regulacji funkcji i cyklu życiowego mitochondriów.....	46
8. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY.....	55
9. MATERIAŁY I METODY	57
9.1. Przygotowanie monomerów, oligomerów i agregatów α-synukleiny.....	57
9.2. Charakterystyka i wzory chemiczne stosowanych związków.....	58
9.3. Modele badawcze i warunki doświadczalne.....	59
9.3.1. Komórki szczurzego guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy (pheochromocytoma, PC12)	59
9.3.2. Komórki PC12 ze stabilną nadekspresją parkiny	59
9.3.2.1. Przygotowanie konstruktów	59
9.3.3. Komórki PC12 z częściowym wyciszeniem parkiny	61
9.3.3.1. Transfekcja komórek PC12 z zastosowaniem siRNA	61
9.3.4. Komórki PC12 z przejściową nadekspresją białek ro1GFP, pRA306 oraz pRA304.....	62
9.3.4.1. Komórki PC12 z przejściową nadekspresją białek ro1GFP oraz pRA306.....	62
9.3.4.2. Komórki PC12 z przejściową nadekspresją białka pRA304	63
9.3.4.3. Transfekcja komórek PC12 metodą elektroporacji	64

9.3.5. Warunki hodowli komórek PC12 i izolacja mitochondriów	66
9.3.5.1 Hodowla i traktowanie komórek PC12.....	66
9.3.5.2. Izolacja mitochondriów	67
9.4. Metody spektrofotometryczne	68
9.4.1. Oznaczanie zawartości białka w ekstrakcie komórkowym	68
9.4.2. Analiza przeżywalności komórek za pomocą testu MTT.....	68
9.5. Metody spektrofluorymetryczne	69
9.5.1. Ocena oligomeryzacji/agregacji α -synukleiny w obecności fluorescencyjnego barwnika Tioflawiny-T (test tioflawinowy)	69
9.5.2. Pomiar poziomu jonów wapnia w cytosolu komórek przy użyciu sondy fluorescencyjnej FLUO-4 AM	69
9.5.3. Pomiar poziomu tlenu azotu w komórkach przy użyciu sondy fluorescencyjnej DAF-2 DA.....	70
9.5.4. Pomiar poziomu wolnych rodników tlenowych w komórkach przy użyciu sondy fluorescencyjnej H ₂ DCF-DA.....	70
9.5.5. Pomiar poziomu mitochondrialnego rodnika ponadtlenkowego w komórkach przy użyciu sondy fluorescencyjnej MitoSOX.....	71
9.5.6. Pomiar zmian mitochondrialnego potencjału błonowego	71
9.5.7. Analiza ilości mitochondriów w komórkach przy użyciu barwnika MitoTracker Green.....	72
9.6. Metody luminescencyjne	73
9.6.1. Pomiar poziomu wewnątrzkomórkowego ATP z zastosowaniem metody luminescencyjnej	73
9.7. Metody immunochemiczne	74
9.7.1. Przygotowanie materiału komórkowego do oznaczeń immunochemicznych	74
9.7.2. Koimmunoprecypitacja parkiny	74
9.7.3. Oznaczanie autoubikwitynacji parkiny <i>ex vivo</i>	75
9.7.4. Analiza S-nitrozylacji parkiny z zastosowaniem techniki podstawienia biotynowego.....	75
9.7.5. Immunochemiczna detekcja białek metodą Western blot	76
9.8. Metody chromatograficzne	83
9.8.1. Pomiar stężenia aminokwasów z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej.....	83
9.9. Analiza poziomu ekspresji genów	84
9.9.1. Izolacja RNA	84
9.9.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji	84

9.9.3. Izolacja DNA	85
9.9.4. Łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkryptazą (ang. reverse transcriptase PCR).....	85
9.9.5. Łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (ang. quantitative real-time PCR).....	87
9.10. Metody mikroskopowe	89
9.10.1. Ocena morfologii α -synukleiny z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej	89
9.10.2 Analiza lokalizacji α -synukleiny w komórkach PC12 <i>in vitro</i> z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej	89
9.10.3. Ocena struktury i morfologii α -synukleiny z zastosowaniem mikroskopii sił atomowych.....	90
9.10.4. Badanie apoptozy komórek <i>in vitro</i> przy użyciu metody TUNEL z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej	90
9.10.5. Badanie apoptozy komórek <i>in vitro</i> przy użyciu barwnika Hoechst 33342 z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej	91
9.10.6. Ocena morfologii mitochondriów komórek <i>in vitro</i> z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej.....	92
9.10.7. Analiza kolokalizacji mitochondriów oraz lizosomów w komórkach <i>in vitro</i> z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej.....	92
9.11. Statystyczne opracowanie wyników	93
10. WYNIKI	94
10.1. Analiza strukturalna i morfologiczna oligomerów α-synukleiny oraz badanie mechanizmów ich toksyczności w komórkach dopaminergicznych PC12	94
10.1.1. Wpływ oligomerów α -synukleiny na poziom jonów wapnia w cytosolu oraz aktywację stresu nitrozacyjnego	97
10.1.2. Wpływ oligomerów α -synukleiny na aktywację stresu oksydacyjnego oraz na żywotność komórek dopaminergicznych PC12	104
10.2. Wpływ oligomerów α-synukleiny na ekspresję, aktywność oraz S-nitrozylację parkiny	113
10.3. Udział parkiny w zależnych od oligomerów α-synukleiny zaburzeniach dynamiki i funkcji mitochondriów w komórkach PC12	120
10.3.1. Wpływ obniżenia ekspresji parkiny na funkcje mitochondriów oraz przeżywalność komórek dopaminergicznych	120
10.3.2. Wpływ nadekspresji parkiny na zależne od oligomerów α -synukleiny zaburzenia funkcji mitochondriów i śmierć komórek PC12	128

10.3.3. Wpływ nadekspresji parkiny na wywołane przez oligomery α -synukleiny zaburzenia procesów fuzji i rozszczepienia mitochondriów	132
10.3.4. Wpływ nadekspresji parkiny na wywołane przez oligomery α -synukleiny zaburzenia mitofagii i biogenezy mitochondriów	138
11. DYSKUSJA	152
11.1. Molekularne mechanizmy toksyczności egzogennych oligomerów α-synukleiny	153
11.2. Wpływ egzogennych oligomerów α-synukleiny na ekspresję, aktywność i S-nitrozylację parkiny	155
11.3. Wpływ obniżenia ekspresji parkiny na funkcje mitochondriów	158
11.4. Znaczenie parkiny w dysfunkcji mitochondriów wywołanej przez oligomery α-synukleiny	161
11.4.1. Wpływ nadekspresji parkiny na zależne od oligomerów α -synukleiny uszkodzenie funkcji mitochondriów	161
11.4.2. Wpływ nadekspresji parkiny na wywołane przez oligomery α -synukleiny zaburzenia dynamiki mitochondriów	164
11.4.3. Wpływ nadekspresji parkiny na zależne od oligomerów α -synukleiny zaburzenia mitofagii i biogenezy mitochondriów	166
12. WNIOSKI I PODSUMOWANIE	171
13. LITERATURA	175

1. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Badania ostatniej dekady wskazują na kluczową rolę białek α -synukleiny (α -Syn) oraz parkiny w molekularnych mechanizmach zaangażowanych w procesy obumierania neuronów dopaminergicznych w chorobie Parkinsona (ChP). Mutacje w genie kodującym α -Syn są odpowiedzialne za rozwój rodzinnej ChP dziedziczonej w sposób autosomalny dominujący, natomiast mutacje w genie kodującym parkinę wpływają na rozwój choroby przekazywanej w sposób autosomalny recesywny. Czynniki wywołujące zmiany zwyrodnieniowe w ChP do chwili obecnej nie zostały ostatecznie określone, jednakże najnowsze badania sugerują, że oligomeryzacja α -Syn, a następnie agregacja i odkładanie się tego białka w cytoplazmie może mieć kluczowe znaczenie w patomechanizmie tej choroby. Udowodniono, że uwolnione do przestrzeni zewnątrzkomórkowej oligomery α -Syn wywierają najsilniejsze cytotoksyczne działanie na komórki dopaminergiczne szlaku czarno-prążkowiowego i prowadzą do zaburzeń funkcji motorycznych obserwowanych w ChP. Mechanizm cytotoksycznego działania zewnątrzkomórkowej α -Syn może obejmować zaburzenia przepuszczalności błony komórkowej i deregulację receptorów błonowych, co skutkuje zaburzeniem homeostazy wapniowej i zwiększonym uwalnianiem tlenku azotu (NO) oraz innych wolnych rodników tlenowych, jak również deregulacją mitochondriów oraz siateczki śródplazmatycznej (ang. endoplasmic reticulum - ER). W konsekwencji prowadzi to do zaburzenia funkcji synaps i neurodegeneracji.

Z kolei, udział parkiny w patomechanizmie sporadycznej ChP jest związany z zahamowaniem jej fizjologicznych funkcji wskutek mutacji lub modyfikacji wywołanych działaniem stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego. Parkina, jako ligaza ubikwitynowa E3, katalizuje ubikwitynację białek i jest enzymem o kluczowym znaczeniu dla prawidłowego funkcjonowania systemu ubikwityna-proteasom (ang. ubiquitin-proteasome system - UPS). Ponadto pełni ona istotną rolę w cyklu życiowym mitochondriów regulując ich biogenezę, fuzję, rozszczepienie oraz degradację na drodze mitofagii. Zaburzenie poziomu i aktywności parkiny, a w konsekwencji utrata jej funkcji fizjologicznych, może więc przyczyniać się do akumulacji nieprawidłowo pofałdowanych lub toksycznych białek oraz zaburzeń funkcji i cyklu życiowego mitochondriów. Pomimo iż zaburzenia funkcji parkiny, jak również oligomeryzacja i zewnątrzkomórkowe uwalnianie α -Syn są kluczowymi mechanizmami związanymi z powstawaniem i rozwojem ChP, niewiele badań wskazuje na funkcjonalne interakcje pomiędzy tymi białkami.

Ze względu na funkcję parkiny jako ligazy ubikwitynowej E3, zainteresowania naukowców skoncentrowane były wyłącznie na zbadaniu jej udziału w degradacji oraz akumulacji α -Syn w neuronach. Wykazano jednak, że gromadząca się w warunkach patologicznych α -Syn nie jest bezpośrednim substratem dla parkiny, a istotną rolę w jej usuwaniu pełni szlak autofago-lizosomalny. Z drugiej strony istnieją dane wskazujące, że w warunkach stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego, który towarzyszy oligomeryzacji/agregacji α -Syn, może dochodzić do modyfikacji potranslacyjnych parkiny, zaburzenia jej aktywności i utraty funkcji fizjologicznych związanych z usuwaniem nieprawidłowych dysfunkcyjnych białek. Ponieważ parkina jest istotnym białkiem w regulacji cyklu życiowego i kontroli jakości mitochondriów, zaburzenie jej funkcji może prowadzić do nieprawidłowości w funkcjonowaniu całej sieci mitochondrialnej, a w konsekwencji do śmierci neuronów. Jednak do chwili obecnej nie zidentyfikowano czynników odpowiedzialnych za dysfunkcję parkiny. Wobec powyższego **celem pracy** była weryfikacja **hipotezy badawczej**, że α -Syn w sposób zależny od NO i wolnych rodników tlenowych prowadzi do modyfikacji potranslacyjnych parkiny i zaburzeń jej funkcji, a w konsekwencji do uszkodzenia mitochondriów.

W niniejszych badaniach zastosowano model cytotoksycznego działania egzogennych oligomerów α -Syn (5 μ M) w komórkach dopaminergicznych guza chromochłonnego nadnerczy szczura (łac. *Pheochromocytoma* - PC12). Ponadto badania prowadzono na komórkach PC12 ze stabilną nadekspresją parkiny, traktowanych egzogennymi oligomerami α -Syn oraz na komórkach PC12 z częściowym wyciszeniem parkiny. Badania prowadzono w oparciu o metody spektrofotometryczne, spektrofluorymetryczne, luminescencyjne, immunochemiczne, chromatograficzne oraz mikroskopowe, wzbogacone o analizę poziomu ekspresji genów.

Prezentowane w niniejszej pracy wyniki wykazały, że inkubacja komórek z oligomerami α -Syn indukowała wzrost poziomu jonów wapnia (Ca^{2+}) w cytosolu oraz poziomu wolnych rodników tlenowych, w tym NO. Ponadto wykazano, że w wyniku działania egzogennej α -Syn dochodzi do zaburzenia potencjału oksydoredukcyjnego, aktywacji stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego, uszkodzenia DNA i indukcji programowanej śmierci komórek dopaminergicznych. Zaobserwowano również, że zahamowanie syntezy NO i innych wolnych rodników tlenowych zapobiega obumieraniu komórek w wyniku działania egzogennej α -Syn, co sugeruje istotne znaczenie stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego w molekularnych mechanizmach toksyczności tego białka.

Wykazano, że pod wpływem działania oligomerów α -Syn dochodzi do S-nitrozylacji, autoubikwitynacji, a następnie degradacji parkiny. Z kolei zastosowanie inhibitora syntazy NO (NNLA) lub zmiatacza wolnych rodników, N-acetylocysteiny (NAC) przeciwdziała zależnej od α -Syn dysfunkcji parkiny. Badania te wskazują, że oligomery α -Syn w sposób zależny od NO prowadzą do uszkodzenia funkcji parkiny i utraty jej cytoprotekcyjnych właściwości.

Badania niniejszej pracy wykazały, że obniżenie poziomu parkiny w wyniku wyciszenia ekspresji genu *Prkn* skutkuje obniżeniem mitochondrialnego potencjału błonowego, zwiększoną produkcją rodnika ponadtlenkowego oraz spadkiem poziomu wewnątrzkomórkowego ATP. Zaobserwowane w niniejszej pracy zaburzenia funkcji mitochondriów w wyniku zahamowania ekspresji parkiny nie wydają się być bezpośrednio związane z deregulacją dynamiki tych organelli, ponieważ nie wykazano istotnych zmian poziomu białek regulujących procesy fuzji i rozszczepienia mitochondriów. Jednakże wyciszenie ekspresji genu *Prkn* skutkowało znacznym obniżeniem poziomu czynnika transkrypcyjnego PGC-1 α , który jest głównym regulatorem biogenezy mitochondriów, oraz powodowało obumieranie komórek PC12. Wyniki te sugerują, że utrzymywanie prawidłowego poziomu parkiny jest niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania mitochondriów i żywotności komórek dopaminergicznych.

Uzyskane wyniki wskazują, że toksyczne działanie α -Syn w komórkach PC12 może nie być całkowicie zależne od deregulacji parkiny, bo chociaż zmniejszenie poziomu tego enzymu wywołuje znamienne obniżenie przeżywalności komórek, to efekt ten jest znacznie mniejszy w porównaniu z cytotoksycznością wywołaną przez oligomery α -Syn. Ponadto, zaobserwowano, że nadekspresja parkiny w komórkach PC12 tylko częściowo zapobiega toksyczności α -Syn, podczas gdy obniżenie poziomu wolnych rodników tlenowych przyczynia się do całkowitego zahamowania neurodegeneracji wywołanej działaniem tego białka.

W badaniach prowadzonych na komórkach PC12 z nadekspresją parkiny wykazano, że działanie α -Syn skutkuje obniżeniem mitochondrialnego potencjału błonowego, co wpływa na zwiększenie produkcji mitochondrialnego rodnika ponadtlenkowego oraz obniżenie poziomu wewnątrzkomórkowego ATP. Ponadto w wyniku inkubacji z oligomerami α -Syn dochodzi do zwiększenia mitochondrialnego potencjału oksydoredukcyjnego. Jednocześnie zaobserwowano protekcyjny wpływ nadekspresji parkiny na zależne od oligomerów α -Syn zaburzenie funkcji mitochondriów.

Zaobserwowano, że w wyniku działania egzogennych oligomerów α -Syn dochodzi do fragmentacji mitochondriów oraz obniżenia poziomu mitofuzyny-1 i mitofuzyny-2, białek regulujących fuzję tych organelli. α -Syn nie wpływała natomiast na poziom pozostałych białek regulujących dynamikę mitochondriów. W niniejszej pracy wykazano, że chociaż nadekspresja parkiny w istotny sposób zapobiega rozszczepieniu mitochondriów wywołanemu przez α -Syn, to nie wpływa na obniżenie poziomu mitofuzyn w wyniku działania tego białka. Ponadto nadekspresja parkiny wpływa na obniżenie poziomu mitofuzyn *per se*. W świetle tych danych można sugerować, że parkina zapobiega wywołanemu przez α -Syn rozszczepieniu mitochondriów w sposób niezależny od zmian w ilości białek regulatorowych procesu fuzji/rozszczepienia.

W wyniku inkubacji komórek dopaminergicznych z oligomerami α -Syn obserwowano nagromadzenie się pofragmentowanych mitochondriów na skutek zaburzenia ich degradacji w lizosomach. Jednocześnie uzyskane wyniki badań pokazują, że w wyniku działania egzogennej α -Syn dochodzi do zahamowania aktywności mTOR wskutek obniżenia fosforylacji tego enzymu na serynie 2448, co może przyczyniać się do aktywacji procesu autofagii. Obserwowane w niniejszej pracy zaburzenia procesu mitofagii wskutek działania α -Syn bezpośrednio wynikają z obniżenia poziomu parkiny w mitochondriach, co powoduje spadek ubikwitynacji białek mitochondrialnych. Z kolei nadekspresja parkiny całkowicie zapobiegała deregulacji mitofagii wywołanej przez α -Syn wskutek zwiększenia poziomu ubikwitynowanych białek mitochondrialnych. Ponadto α -Syn powodowała zaburzenia syntezy mitochondriów *de novo* poprzez zależne od parkiny obniżenie poziomu PGC-1 α . Uzyskane wyniki pokazują, że w warunkach działania egzogennej α -Syn obniżony poziom parkiny zaburza równowagę pomiędzy procesami biogenezy mitochondriów i mitofagii, co prowadzi do nagromadzenia uszkodzonych mitochondriów.

Podsumowując, wyniki uzyskane w tej pracy po raz pierwszy wykazały istotne znaczenie deregulacji parkiny w molekularnych mechanizmach toksyczności oligomerów α -Syn. Co więcej, w niniejszej pracy po raz pierwszy udokumentowano istnienie funkcjonalnych zależności pomiędzy α -Syn i parkiną, a zaburzeniami funkcji mitochondriów.

2. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM - ABSTRACT

Recent studies indicate the key role of α -synuclein (α -Syn) and parkin proteins in molecular mechanisms involved in the processes of dopaminergic neurons degeneration in Parkinson's disease (PD). Mutations in gene encoding α -Syn are responsible for the development of familial PD inherited in an autosomal dominant manner, while mutations in gene encoding parkin affect development of autosomal recessive PD. Factors responsible for degenerative changes in PD have not been conclusively determined, however, recent data suggest that α -Syn oligomerization followed by its aggregation and deposition in the cytoplasm may play a key role in pathomechanism of this disease. α -Syn oligomers released into the extracellular space were previously shown to be the most pathogenic species involved in degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons leading to disturbances in motor functions observed in PD. The mechanism of extracellular α -Syn oligomers cytotoxicity may negatively impact cells by inducing oxidative-nitrosative stress, mitochondrial alterations, endoplasmic reticulum stress, proteasomal defects and synaptic dysfunction.

On the contrary, the role of parkin in PD is explained mainly through functional inactivation due to nitrosative and oxidative stress, or its mutations. This seems to be particularly significant to PD pathogenesis, since the major function of parkin as an E3-ubiquitin ligase is involved in ensuring the quality control of protein conformation and mitochondrial function. In addition, parkin plays an important role in the mitochondria life cycle by regulating their biogenesis, fusion, fission and degradation through mitophagy. Deregulation of the level and activity of parkin, and consequently loss of its physiological functions, may thus contribute to the accumulation of impaired mitochondria or toxic proteins.

Although deregulation of parkin function, as well as oligomerization and secretion of α -Syn are the key mechanisms associated with the PD development, only a few studies indicate functional interactions between these proteins. Based on the genetic evidence and the established role of parkin as a ubiquitin ligase, the scientific interest was initially focused on investigating the link of parkin alterations to α -syn accumulation. However, it has been shown that increased intracellular α -syn burden is not a direct substrate for parkin mediated ubiquitination and degradation in ubiquitin-proteasome system (UPS). Instead, it is recruited mainly into the autophagy-lysosomal pathway. On the other hand, recent data indicate that under oxidative-nitrosative stress conditions post-translational modifications of parkin

and disturbances of its activity occur. Since parkin regulates mitochondria life cycle and mitochondrial quality, disruption of its function may lead to abnormalities of the entire mitochondrial network, and consequently to the death of neurons. However, till now molecular mechanisms responsible for parkin dysfunction have not been conclusively identified. Therefore, the aim of the study was to verify the hypothesis that α -Syn in a manner dependent on NO and free radicals leads to post-translational modification of parkin, disturbances of its function, and consequently to damage of mitochondria.

In this study, a model of exogenous α -Syn oligomers (5 μ M) cytotoxicity in rat dopaminergic pheochromocytoma (PC12) cells was used. Moreover, studies were carried out using PC12 cells stably overexpressing parkin treated with exogenous α -Syn oligomers and on PC12 cells with parkin silencing. The experiments were carried out using spectrophotometric, spectrofluorimetric, luminescent, immunochemical, chromatographic and microscopic methods enriched with the analysis of gene expression.

The results of this thesis showed that treatment of PC12 cells with α -Syn oligomers resulted in the elevation of the cytosolic calcium and increased the level of free radicals, including nitric oxide (NO). Moreover, it has been shown that exogenous α -Syn-dependent deregulation of redox homeostasis and activation of oxidative-nitrosative stress, leading to DNA damage and induction of programmed cell death. It was also observed that scavenging of free radicals, including NO, prevented exogenous α -Syn-dependent cell death, which suggests the importance of oxidative-nitrosative stress in the molecular mechanisms of this protein's toxicity. It has been shown that α -Syn oligomers induce S-nitrosylation, auto-ubiquitination and subsequent degradation of parkin. In turn, the inhibitor of NO synthase (NNLA) or a free radical scavenger, N-acetylcysteine (NAC), counteracted the α -Syn-dependent parkin dysfunction. These studies indicated that through elevation of NO level α -Syn oligomers lead to parkin dysfunction and loss of its cytoprotective properties.

The studies showed that silencing of parkin results in a decrease of mitochondrial membrane potential, increased superoxide anion production and decreased intracellular ATP level. The disturbances of mitochondrial function evoked by parkin silencing do not seem to be directly related to the deregulation of the mitochondrial fusion/fission, because no significant changes in the level of proteins regulating the mitochondrial dynamics were observed. However, *Prkn* gene knock-down resulted in a significant reduction in the level of the PGC-1 alpha, which is the main regulator of mitochondrial biogenesis. Moreover, upon parkin knock-down the elevated PC12 cell death was observed. These results suggest that

maintaining a physiological level of parkin is necessary for the proper functioning of mitochondria and viability of dopaminergic cells.

Of note, the deleterious effects of α -Syn may not be completely dependent on deregulation of parkin, as silencing of parkin expression in PC12 cells induced already significant cell loss. This effect on cell viability, however, was less profound compared to the cytotoxicity evoked by α -Syn oligomers. Moreover, it was observed that overexpression of parkin in PC12 cells only partially prevents α -Syn toxicity, while free radicals scavenging contributes to the complete inhibition of neurodegeneration induced by this protein.

Studies carried out in PC12 cells with parkin overexpression indicated that α -Syn treatment resulted in a decrease in the mitochondrial membrane potential, increased the mitochondrial superoxide level and decreased the level of intracellular ATP, followed by deregulation of redox potential. At the same time, a protective effect of parkin overexpression on α -Syn-dependent mitochondrial dysfunction was observed. Exogenous α -Syn oligomers induced mitochondrial fragmentation and decrease of fusion proteins: mitofusin-1 and mitofusin-2 level. α -Syn did not affect the level of other proteins regulating the mitochondria dynamics. Although parkin overexpression significantly prevented α -Syn-induced mitochondrial fragmentation, it did not change the level of mitofusins affected by α -Syn. In addition, overexpression of parkin decreased the level of mitofusin *per se*. In the light of these data, it might be suggested that parkin prevents α -Syn-induced mitochondrial fragmentation in a manner independent of fusion/fission proteins.

As a result of the incubation of dopaminergic cells with α -Syn oligomers, accumulation of fragmented mitochondria due to impaired lysosomal translocation was observed. At the same time, it has been shown that exogenous α -Syn oligomers suppress mTOR activity due to a decrease in its phosphorylation on serine 2448, which may contribute to the activation of autophagy. α -Syn-dependent disturbances of the mitophagy process are directly related to the reduction of parkin protein level in the mitochondria, which results in a decrease in the ubiquitination of the mitochondrial fraction. In turn, parkin overexpression completely prevented deregulation of mitophagy caused by α -Syn, leading to increase in ubiquitination of mitochondrial proteins. In addition, α -Syn caused disturbances in the mitochondrial biosynthesis *de novo*, due to parkin-dependent reduction of PGC-1 alpha protein. The obtained results show that α -Syn oligomers-induced decrease of parkin protein level disturbs the balance between the processes of mitochondrial biogenesis and mitophagy, which leads to the accumulation of damaged mitochondria.

Summarizing, the results obtained in this study showed for the first time the importance of parkin deregulation in the molecular mechanisms of α -Syn oligomers toxicity. Those new findings provide compelling evidence for direct association of parkin dysfunction to extracellular α -Syn-signalling as a critical phenomenon leading to mitochondrial impairment.

3. INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY

Przeprowadzone w ramach projektu innowacyjne badania wyjaśniły mechanizmy molekularne leżące u podstaw toksyczności α -Syn, głównego składnika ciał Lewy'ego w chorobie Parkinsona. Badania dowiodły udziału parkiny w mechanizmach toksyczności α -Syn w komórkach dopaminergicznych. Udokumentowano zależności pomiędzy funkcją α -Syn i parkiny, a zaburzeniami mitochondriów, takie jak:

- utrata fizjologicznych funkcji parkiny w wyniku jej S-nitrozylacji i degradacji wywołanych przez egzogenne oligomery α -Syn
- zmiany potencjału, dynamiki i biogenezy mitochondriów oraz mitofagii w odpowiedzi na indukowane α -Syn obniżenie poziomu parkiny
- przeciwdziałanie zależnym od α -Syn zaburzeniom mitochondriów poprzez zwiększenie ekspresji parkiny

Wyniki tych badań mogą posłużyć do opracowywania strategii zapobiegania neurodegeneracji w chorobie Parkinsona i innych proteinopatiach oraz ich leczenia. W szczególności badania te wskazują na celowość poszukiwania nowych związków cytoprotekcyjnych funkcjonujących jako inhibitory oligomeryzacji α -Syn.

4. OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

- AFM** – mikroskopia sił atomowych (ang. atomic force microscopy)
- ALS** – stwardnienie zanikowe-boczne (ang. amyotrophic lateral sclerosis)
- ARJP** – autosomalna recesywna choroba Parkinsona o wczesnym początku (ang. autosomal recessive juvenile parkinsonism)
- ATP** – adenozyntrifosforan (ang. adenosine triphosphate)
- A β** – amyloid beta
- BSA** - wolna od kwasów tłuszczowych albumina z surowicy bydłej (ang. bovine serum albumin)
- C431** – cysteina 431
- CCCP** – m-chlorofenylohydrazon cyjanku karbonylu (ang. Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone)
- cDNA** – komplementarne DNA (ang. complementary DNA)
- CHO** – linia komórek jajnika chomika chińskiego (ang. chinese hamster ovary)
- ChP** – choroba Parkinsona
- CKI** – kinaza kazeiny I (ang. casein kinase 1)
- COMT** – O-metylotransferaza katecholowa (ang. catechol-O-methyltransferase)
- DA** – dopamina
- DAF-2** – diaminofluoresceina (ang. diaminofluorescein)
- DAF-2 DA** – 4',5'- diaminofluoresceiny dioctan (ang. 4',5'-diaminofluorescein diacetate)
- DAF-2T** – 4',5'-diaminofluoresceiny triazol (ang. 4',5'-diaminofluorescein triazole)
- DAT** – transporter dopaminy (ang. dopamine transporter)
- DCF** - 2',7'-dichlorofluoresceina (ang. 2',7'-dichlorofluorescein)
- DJ-1** – deglikaza białkowa 1 (ang. protein deglycase 1)
- DLB** – otępienie z ciałami Lewy'ego (ang. dementia with Lewy bodies)
- DMEM** – pożywka Eagle'a zmodyfikowana przez Dulbecco (ang. Dulbecco Modified Eagle Medium)
- DMSO** – dimetylosulfotlenek (ang. dimethyl sulfoxide)
- Domena NAC** – niebędący białkiem β -amyloidowym składnik płytek starczych (ang. non-amyloid β component of Alzheimer disease plaques)
- DTT** – ditiotreitol
- EDTA** – sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
- ER** – retikulum endoplazmatyczne (ang. endoplasmatic reticulum)
- FCS** – cielęca surowica płodowa (ang. foetal calf serum)

- FITC** – fluoresceiny izotiocyanian (ang. fluorescein isothiocyanate)
- FITC-dUTP** – fluoresceiny izotiocyanian znakowany trifosforanami deoksyurydyny (ang. dUTP-fluorescein isothiocyanate)
- FLUO-4 AM** – ester acetoksymetylowy FLUO-4 (ang. FLUO-4 acetomethylester)
- G-418** – genetycyna 418
- GAPDH** – dehydrogenaza fosforanu aldehydu glicerynowego (ang. glyceraldehyde 3-phosphodehydrogenase)
- Gpx1** – peroksydaza glutationowa 1 (ang. glutathione peroxidase 1)
- GSH** – zredukowana forma glutationu
- GSK-3 β** – kinaza 3 β syntazy glikogenu (ang. glycogen synthase kinase 3 β)
- H₂DCF** – 2',7'-dichlorodihydrofluoresceina (ang. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein)
- H₂DCF-DA** – dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (ang. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)
- HBSS** –roztwór Hanks'a (ang. Hanks' balanced salt solution)
- HEPES** – kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazylo]etanosulfonowy (ang. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
- HS** – końska surowica (ang. horse serum)
- IBR** – motyw leżący pomiędzy domenami RING1 i RING2 (RING1-in-between-RING (IBR) -RING2)
- IP** – immunoprecypitacja (ang. immunoprecipitation)
- iPSC** – indukowane pluripotentne komórki macierzyste (ang. induced pluripotent stem cells)
- j.u.** – jednostka umowna
- JC-1** – jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazo-karbocyaniny (ang. tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide)
- LB** – ciała Lewy'ego (ang. Lewy bodies)
- L-DOPA** – levodopa, prekursor dopaminy
- L-Opa-1** – długie izoformy białka Opa-1 (ang. long Opa-1 isoforms)
- LRRK2** – związana z powtórzeniami bogatymi w leucynę kinaza 2 (ang. leucine-rich repeat kinase 2)
- LTP** – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. long-term potentiation)
- MAM** – powiązane ze sobą strukturalnie membrany mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej (ang. mitochondria-associated membranes)
- MEF** – mysie embrionalne fibroblasty (ang. mouse embryonic fibroblasts)
- Mfn-1** – mitofuzyna 1 (ang. Mitofusin-1)
- Mfn-2** – mitofuzyna 2 (ang. Mitofusin-2)
- MMTS** – S-metylometanotiosiarczan (ang. methyl methanethiosulfonate)

- mono** – monomery α -synukleiny
- MPTP** – 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyna
(ang. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)
- mRNA** – matrycowy kwas rybonukleinowy (ang. messenger RNA)
- MSA** – zanik wieloukładowy (ang. multiple system atrophy)
- MT-ATP6** – mitochondrialna ATP-aza (ang. mitochondria ATPase)
- mTOR** – ssacze białko docelowe dla rapamycyny (ang. mammalian target of rapamycin)
- mTORC1** – kompleks ssaczego białka docelowego dla rapamycyny
(ang. mammalian target of rapamycin complex 1)
- MTT** – bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowy
- NAC** – N-acetylocysteina (ang. N-acetylcysteine)
- NADH** – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, forma zredukowana
(ang. nicotinamide adenine dinucleotide)
- NMDA** – receptor N-metylo-D-asparagianu (ang. N-methyl-D-aspartate receptor)
- NNLA** – N ω -nitro-L-arginina (ang. N ω -nitro-L-arginine)
- nNOS** – neuronalna syntaza tlenku azotu (ang. neuronal nitric oxide synthase)
- NO** – tlenek azotu (ang. nitric oxide)
- NO₂** – grupa nitrowa
- NOS** – syntaza tlenku azotu (ang. nitric oxide synthase)
- NP-40** – Nonidet P-40
- Nrf-1** – jądrowy czynnik oddechowy 1 (ang. nuclear respiratory factor 1)
- nt** – nukleotydy
- O₂^{·-}** – mitochondrialny rodnik ponadtlenkowy
- oligo** – oligomery α -synukleiny
- ONOO⁻** – nadtlenoazotyn (ang. peroxynitrite)
- Opa-1** – białko 1 zaniku nerwu wzrokowego (ang. optic atrophy protein 1)
- OUN** – ośrodkowy układ nerwowy
- PAGE** – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (ang. polyacrylamide gel electrophoresis)
- PARIS** – białko substratowe dla parkiny (ang. parkin interacting substrate)
- PBS** – buforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. phosphate buffer saline)
- PBST** – PBS z Tween-20
- PC12** – komórki szczurzego guza chromochłonnego (łac. *Pheochromocytoma*)
- PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)
- PDI** – izomeraza disiarczkowa (ang. protein disulfide isomerase)
- PE** – fosfatydyloetanolamina (ang. phosphatidylethanolamine)
- PEI** – polietylenoimina (ang. polyethylenimine)

- PFA** – syndrom Bradbury’ego-Eggleston’a (ang. pure autonomic failure)
- PGC-1 α** – koaktywator receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (ang. peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha)
- PI** – jodek propidyny (ang. propidium iodide)
- PI3K** – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (ang. phosphoinositide 3-kinase)
- PI3P** – 3-fosforan fosfatydyloinozytolu (ang. phosphatidylinositol 3-phosphate)
- PINK-1** – kinaza fosfatazy fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforanu 1 (ang. phosphatase i tensin homolog induced putative kinase 1)
- PLK-1** – polo-kinaza 1 (ang. polo like kinase 1)
- PMSF** – fluorek fenylometylosulfonylu (ang. phenylmethylsulfonyl fluoride)
- p-mTOR** – ufosforylowana forma białka mTOR
- pRA304** – białko de4 posiadające sekwencję lokalizacji mitochondrialnej (ang. de4 with mitochondria targeting sequence)
- pRA306** – białko ro1GFP posiadające sekwencję lokalizacji mitochondrialnej (ang. ro1 with mitochondria targeting sequence)
- Prdx3** – peroksyredoksyna 3 (ang. peroxiredoxin 3)
- pre-mRNA** – RNA będący bezpośrednim produktem transkrypcji u eukariontów
- PRKN** – gen kodujący białko parkinę
- Prkn siRNA** – krótkie interferujące RNA dla szczurzego genu kodującego parkinę
- PTP** – megakanaly mitochondrialne (ang. permeability transition pore)
- p-ULK1** – ufosforylowana forma białka ULK1
- qRT-PCR** – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. quantitative real-time polymerase chain reaction)
- REP** – motyw represorowy (ang. repressor)
- WRT** – wolne rodniki tlenowe
- RING0** – unikalna domena parkiny (ang. unique parkin domain)
- RING1** – domena parkiny wchodząca w skład regionu RING box (ang. really interesting new gene finger 1)
- RING2** – domena parkiny wchodząca w skład regionu RING box (ang. really interesting new gene finger 2)
- RING-box region** – region w strukturze białka parkiny składający się z domen: RING1, RING2 oraz motywów IBR i REP
- ro1GFP** – wrażliwe na warunki redoks cytoplazmatyczne białko zielonej fluorescencji (ang. redox sensitive 1 green fluorescent protein)
- RT-PCR** – łańcuchowa reakcja PCR z odwrotną transkryptazą (ang. reverse transcriptase PCR)
- S101** – seryna 101

S131 – seryna 131

S147 – seryna 147

S2448 – seryna 2448

S378 – seryna 378

S555 – seryna 555

S65 – seryna 65

SDS – dodecylosiarczan sodowy (ang. sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE – rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS (ang. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

siRNA – krótkie interferujące RNA (ang. small interfering RNA)

SNARE – receptor SNAP

(ang. soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor)

SNCA – gen kodujący α -synukleinę

SNO-C – S-nitrozocysteina (ang. S-nitrosocysteine)

SOD – dysmutaza ponadtlenkowa

SOD2 – mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa 2 (ang. superoxide dismutase 2)

S-Opa-1 – krótkie izoformy białka Opa-1 (ang. short Opa-1 isoforms)

STI – inhibitor trypsyny z nasion soi (ang. soybean trypsin inhibitor)

TBS – bufor o składzie 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH doprowadzone kwasem solnym do 7,6

TBST – bufor TBS z Tween-20

TdT – terminalna transferaza deoksynukleotydomowa

(ang. terminal deoxynucleotidyl transferase)

TEM – transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. transmission electron microscopy)

TFAM – mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A

(ang. mitochondrial transcription factor A)

TH – hydroksylaza tyrozynowa (ang. tyrosine hydroxylase)

Th-T – tioflawina T (ang. thioflavin T)

TIM – translokaza błony wewnętrznej (ang. translocase of inner membrane)

TOM – translokaza błony zewnętrznej (ang. translocase of outer membrane)

Top1mt – topoizomeraza 1 mitochondrialna (ang. mitochondrial DNA topoisomerase)

TPCK – inhibitor proteaz (ang. N-*p*-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone)

Tris – tris(hydroksymetylo)aminometan

TUNEL – metoda znakowania wolnych końców DNA przy użyciu TdT oraz d-UTP

(ang. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated d-UTP Nick End-Labeling)

Txnrd1 – reduktaza tioredoksyny 1 (ang. thioredoxin reductase 1)

- UBL** – ubikwitynopodobna domena N-końcowa (ang. ubiquitin-like domain)
- ULK1** – kinaza serynowo-treoninowa uczestnicząca w inicjacji autofagii (ang. uncoordinated-51-like autophagy-activating kinase-1)
- UPD** – unikalna domena parkiny (ang. unique parkin domain)
- UPS** – system ubikwityna-proteasom (ang. ubiquitin-proteasome system)
- VDAC1** – kanał anionowy zależny od potencjału błonowego (ang. voltage-dependent anion-selective channel protein)
- VDCC** – kanał wapniowy zależny od napięcia (ang. voltage-dependent calcium channel)
- VMAT2** – pęcherzykowy transporter monoamin (ang. vesicular monoamine transporter)
- VPS34** – kinaza PI3K
- Y143** – tyrozyna 143
- Y145** – tyrozyna 145
- α -Syn** – α -synukleina
- $\Delta\Psi_m$** – potencjał mitochondrialny

5. WYKAZ RYCIN

Rycina 1. Molekularne mechanizmy patofizjologii choroby Parkinsona	30
Rycina 2. Budowa białka α -synukleiny wraz z zaznaczonymi miejscami mutacji.	32
Rycina 3. Schematyczne przedstawienie procesu oligomeryzacji i agregacji α -synukleiny. ...	34
Rycina 4. Proponowany model oddziaływań zewnątrzkomórkowych α -synukleiny	36
Rycina 5. Mechanizm degradacji białek zależny od proteasomu.	39
Rycina 6. Budowa parkiny wraz z domenami	40
Rycina 7. Rodzaje ubikwitynacji białek.	41
Rycina 8. Schematyczne przedstawienie roli parkiny w regulacji cyklu życiowego mitochondriów	49
Rycina 9. Schematyczne przedstawienie udziału parkiny w regulacji inicjacji mitofagii.....	51
Rycina 10. Schematyczne przedstawienie roli parkiny w regulacji powstawania fagoforów .	54
Rycina 11. Wzory chemiczne związków użytych w badaniach.	58
Rycina 12. Nadekspresja genu <i>PRKN</i> kodującego parkinę.	60
Rycina 13. Analiza struktury wybranych typów α -synukleiny.....	95
Rycina 14. Translokacja egzogennej α -synukleiny do wnętrza komórek dopaminergicznych PC12.	96
Rycina 15. Pomiar poziomu jonów wapnia w cytosolu komórek PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.....	98
Rycina 16. Pomiar poziomu tlenu azotu w komórkach PC12 poddanych działaniu oligomerów α -synukleiny.....	100
Rycina 17. Pomiar stężenia argininy, cytruliny oraz ornityny w komórkach PC12 poddanych działaniu oligomerów α -synukleiny.....	101
Rycina 18. Analiza immunoreaktywności nitrotyrozyny w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.....	103
Rycina 19. Pomiar poziomu wolnych rodników tlenowych w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.....	104
Rycina 20. Analiza poziomu ekspresji genów kodujących białka odpowiedzi na stres w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.	106
Rycina 21. Analiza immunoreaktywności białka PDI w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.....	108
Rycina 22. Pomiar potencjału oksydoredukcyjnego w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.....	109
Rycina 23. Analiza zależnej od oligomerów α -synukleiny fragmentacji DNA, indukcji programowanej śmierci oraz przeżywalności komórek PC12.	112

Rycina 24. Analiza S-nitrozylacji parkiny w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.....	114
Rycina 25. Analiza autoubikwitynacji parkiny w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.....	116
Rycina 26. Analiza ubikwitynacji białek w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.....	117
Rycina 27. Analiza ekspresji parkiny w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.....	119
Rycina 28. Analiza częściowego wyciszenia ekspresji genu <i>Prkn</i> kodującego parkinę w komórkach PC12.	122
Rycina 29. Analiza dysfunkcji mitochondriów w komórkach PC12 z częściowym wyciszeniem genu <i>Prkn</i>	123
Rycina 30. Analiza immunoreaktywności białek biorących udział w cyklu życiowym mitochondriów w komórkach PC12 z częściowym wyciszeniem genu <i>Prkn</i>	125
Rycina 31. Analiza immunoreaktywności białka PGC-1 α w komórkach PC12 z częściowym wyciszeniem genu <i>Prkn</i>	126
Rycina 32. Analiza przeżywalności komórek PC12 poddanych częściowemu wyciszeniu genu <i>Prkn</i> w obecności egzogennych oligomerów α -synukleiny.....	127
Rycina 33. Analiza nadekspresji genu <i>PRKN</i> kodującego parkinę w komórkach PC12.....	128
Rycina 34. Analiza dysfunkcji mitochondriów w komórkach PC12 z nadekspresją genu <i>PRKN</i> poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.....	130
Rycina 35. Analiza przeżywalności komórek PC12 z nadekspresją genu <i>PRKN</i> poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.....	131
Rycina 36. Analiza morfologii mitochondriów w komórkach PC12 z nadekspresją genu <i>PRKN</i> poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.....	133
Rycina 37. Analiza immunoreaktywności białka Opa-1 w komórkach PC12 z nadekspresją genu <i>PRKN</i> poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny. .	135
Rycina 38. Analiza immunoreaktywności białek Mfn-1 oraz Mfn-2 w komórkach PC12 z nadekspresją genu <i>PRKN</i> poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny. .	137
Rycina 39. Analiza immunoreaktywności białka Drp-1 w komórkach PC12 z nadekspresją genu <i>PRKN</i> poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.....	137
Rycina 40. Analiza kolokalizacji mitochondriów oraz lizosomów w komórkach PC12 z nadekspresją genu <i>PRKN</i> poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny. .	139
Rycina 41. Analiza poziomu mitochondrialnego pH w komórkach PC12 z nadekspresją genu <i>PRKN</i> poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.....	140
Rycina 42. Analiza immunoreaktywności białek biorących udział w regulacji inicjacji tworzenia autofagosomów w komórkach PC12 z nadekspresją genu <i>PRKN</i> poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.	144

Rycina 43. Analiza immunoreaktywności białek frakcji mitochondrialnej w komórkach PC12 z nadekspresją genu <i>PRKN</i> poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny. .	146
Rycina 44. Analiza ekspresji białek zaangażowanych w proces biogenezy mitochondriów w komórkach PC12 z nadekspresją genu <i>PRKN</i> poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.	148
Rycina 45. Analiza ilości mitochondriów w komórkach PC12 z nadekspresją genu <i>PRKN</i> traktowanych oligomerami α -synukleiny.	150
Rycina 46. Analiza poziomu mitochondrialnego oraz jądrowego DNA w komórkach PC12 z nadekspresją genu <i>PRKN</i> poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny. .	151
Rycina 47. Udział parkiny w molekularnych mechanizmach toksyczności egzogennych oligomerów α -synukleiny	174

6. WYKAZ TABEL

Tabela I Warunki reakcji immunochemicznej dla poszczególnych białek.**78**

7. WSTĘP

7.1. Choroba Parkinsona

Choroba Parkinsona (ChP) to jedna z najczęściej występujących chorób zwyrodnieniowych ośrodkowego układu nerwowego (OUN), będąca następstwem zaniku neuronów istoty czarnej śródmózgowia oraz dramatycznego spadku poziomu dopaminy (DA) w prążkowi (Friedman, 2005). Choć ChP została opisana po raz pierwszy ponad 200 lat temu i stale dokonuje się postęp w badaniach nad jej podłożem, do dziś nie udało się w pełni wyjaśnić molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za jej etiopatogenezę ani też opracować skutecznej metody leczenia. Dane epidemiologiczne wskazują, że ChP dotyka około 1-2% populacji osób powyżej 65 roku życia. Przypuszcza się, że w Polsce cierpi na tę chorobę około 80-120 tys. osób, nie przeprowadzono jednak dokładnych analiz epidemiologicznych (Mutschler i wsp., 2012; De Rijk i wsp., 2000). Ze względu na starzejące się społeczeństwo przewiduje się, że liczba chorych będzie się zwiększała (Hirsch i wsp., 2016). ChP występuje w dwóch formach, rodzinnej i sporadycznej (idiopatycznej) (Sławek 2011, 2014). Przeważającą większość zachorowań - 90-95%, stanowią osoby, u których zdiagnozowano formę sporadyczną; postać rodzinną diagnozuje się u 5-10% chorych (Gasser, 2009). Charakterystycznym objawem zarówno sporadycznej, jak i rodzinnej postaci ChP, jest obecność wewnątrzkomórkowych złogów białkowych, nazywanych ciałami Lewy'ego (ang. Lewy bodies - LB), których głównym składnikiem jest białko α -synukleina (α -Syn) (Oczkowska i wsp., 2014). Inne białka budujące LB to parkina, ubikwityna, białko tau oraz elementy cytoszkieletu komórkowego i fragmenty kompleksu ubikwityna-proteasom (Friedman, 2005).

Badania ostatnich dwóch dekad wykazały, że mutacje w genach kodujących główne białka LB, α -Syn i parkinę, są odpowiedzialne za powstawanie dziedzicznej postaci ChP (Polymeropoulos i wsp., 1997; Kitada i wsp., 1998). Mutacje w genie *SNCA* kodującym α -Syn są dziedziczone w sposób autosomalny dominujący, natomiast w genie *PRKN* kodującym parkinę są odpowiedzialne za powstanie autosomalnej recesywnej ChP o wczesnym początku (ang. autosomal recessive juvenile parkinsonism - ARJP) (Kitada i wsp., 1998). Mutacje w genach *SNCA* i *PRKN* powodują zmiany struktury i zaburzenie funkcji odpowiednio α -Syn i parkiny. W konsekwencji α -Syn ulega oligomeryzacji/agregacji i nabywa toksycznych właściwości, a parkina traci swoje funkcje fizjologiczne. Mutacje innych genów kodujących białka takie jak LRRK2 (ang. leucine-rich repeat kinase 2),

PINK-1 (ang. phosphatase and tensin homolog induced putative kinase 1) lub DJ-1 (ang. protein deglycase 1) również dają początek dziedzicznym postaciom ChP, jednak występują one ze znacznie mniejszą częstotliwością (Nardin i wsp., 2016). W ostatnich latach pojawiły się doniesienia wskazujące na wzajemne oddziaływania pomiędzy α -Syn i parkiną, co może mieć istotne znaczenie w mechanizmach neurodegeneracji w przebiegu ChP i innych proteinopatii. Wyjaśnienie mechanizmu wzajemnego oddziaływania pomiędzy α -Syn i parkiną może pomóc w zrozumieniu molekularnych procesów prowadzących do selektywnego uszkodzenia neuronów dopaminergicznych w przebiegu ChP.

7.1.1. Charakterystyka kliniczna i leczenie

Konsekwencją utraty neuronów dopaminergicznych w ChP są zaburzenia czynności motorycznych. Zgodnie z kryteriami stworzonymi przez Bank Mózgu Brytyjskiego Towarzystwa Choroby Parkinsona (ang. United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank) do głównych objawów motorycznych ChP należą: spowolnienie ruchowe (bradykinezja), drżenie spoczynkowe kończyn, sztywność mięśniowa oraz niestabilność posturalna. Ponadto, u pacjentów z ChP obserwuje się m.in.: mikrografię, hipomimikę, zaburzenia artykulacji (mowa dyzartryczna), chód szurający oraz pochyloną sylwetkę ciała. W obrazie klinicznym istotne znaczenie mają również objawy niemotoryczne takie jak zaburzenia węchowe i poznawcze, problemy ze snem, depresja, wzmożony ślinotok i łzawienie, zaparcia, czynnościowe zaburzenia pęcherza moczowego oraz zaburzenia seksualne, które często występują wcześniej, przed objawami motorycznymi, i mogą być ich zapowiedzią. Chociaż powyższe kryteria diagnostyczne dla ChP są nadal najczęściej stosowane, to towarzystwo International Parkinson and Movement Disorder Society nadal prowadzi prace nad udoskonaleniem zaproponowanych ponad 25 lat temu kryteriów (Postuma i wsp., 2015). Do chwili obecnej nie ma skutecznego leku pozwalającego na zatrzymanie rozwoju ChP. W ciągu ostatniej dekady, oprócz klasycznego leczenia farmakologicznego opartego na oddziaływaniu na przekaźnictwo dopaminergiczne z zastosowaniem prekursora dopaminy (lewodopy, L-DOPA) oraz inhibitorów O-metylotransferazy katecholowej (ang. catechol-O-methyltransferase - COMT) lub monoaminoooksydazy typu B (ang. monoaminoxidase B - MAO-B) odpowiedzialnych za jej rozkład, czy też agonistów receptorów dopaminergicznych (np. pramipeksolu), stosuje się stymulację struktur głębokich mózgu, a także różnego rodzaju ćwiczenia fizyczne mające

na celu poprawę sprawności ruchowej jak i złagodzenie objawów choroby oraz terapię zaburzeń mowy (Kozak-Putowska i wsp., 2015).

7.1.2. Charakterystyka neuropatologiczna

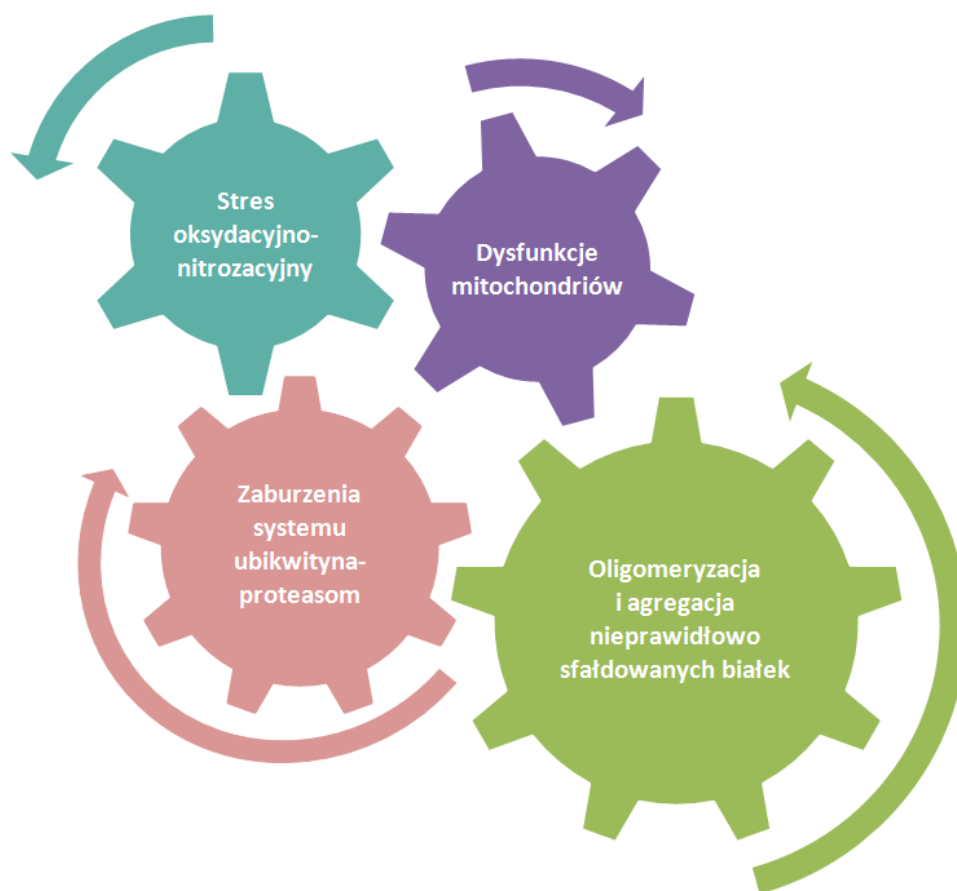
Głównym procesem patologicznym charakteryzującym ChP jest postępująca degeneracja i zanik neuronów dopaminergicznych szlaku czarno-prążkowiowego regulującego koordynację i napęd ruchowy oraz napięcie mięśni szkieletowych (Mutschler i wsp., 2012). Zaburzeniu ulegają również inne szlaki dopaminergiczne w mózgu, m.in. mezkortykolimbiczny regulujący czynności emocjonalne i motywacyjne oraz układ podwzgórzowo-przysadkowy - regulujący wydzielanie hormonów, szczególnie prolaktyny. Zmiany neurodegeneracyjne w ChP dotyczą także innych grup neuronalnych, takich jak noradrenergiczne i serotonergiczne. Jak już wcześniej opisano, markerem ChP jest występowanie wewnątrzneuronalnych, cytoplazmatycznych wtrętów, których głównym składnikiem jest α -Syn. Choroby, w których zaobserwowano zaburzenia ilości oraz fałdowania α -Syn, nazywane są synukleinopatiami i oprócz ChP należą do nich m.in.: neurodegeneracja związana z kinazą pantotenianową, zespół Bradbury'ego-Egglestona (ang. pure autonomic failure - PFA), stwardnienie zanikowe-boczne (ang. amyotrophic lateral sclerosis - ALS), choroba Gauchera, otępienie z ciałami Lewy'ego (ang. dementia with Lewy bodies - DLB) oraz zanik wieloukładowy (ang. multiple system atrophy - MSA). Analiza korelacji między stanem klinicznym pacjentów a rozmieszczeniem zagregowanej α -Syn oraz LB umożliwiła Braakowi i współpracownikom opracowanie teorii rozwoju ChP, która zakłada istnienie 6 faz rozwoju tej choroby, począwszy od zaburzeń w rdzeniu przedłużonym i nakrywce mostu aż do podatnych rejonów istoty szarej (Braak i wsp., 2003; Braak i wsp., 2004). Według tej teorii jako pierwsze ulega zwyrodnieniu grzbietowe jądro ruchowe nerwu błędnego, przylegająca do niego strefa siatkowata pośrednia oraz opuszka węchowa (stadium 1). W kolejnym, jeszcze przedobjawowym etapie, zmiany zwyrodnieniowe nasilają się i obejmują jądra szwu, jądro siatkowate olbrzymiokomórkowe oraz jądra miejsca sinawego (stadium 2). Proces degeneracyjny obejmuje kolejno część podstawną śródmózgowia i przodomózgowia oraz część zbitą istoty czarnej. Jednocześnie uszkodzeniu ulega ciało migdałowate, jądro konarowo-mostowe nakrywki, jądro przednie szwu i niektóre jądra podwzgórza (stadium 3). W kolejnej fazie proces patologiczny rozprzestrzenia się na korę skroniową (stadium 4), a w końcowych stadiach na całą korę nową (stadium 5 i 6). Późniejsze badania Braaka oraz innych grup badawczych, które wykazały obecność złożeń

α -Syn również w komórkach nerwowych układu pokarmowego sugerują, że ChP rozpoczyna się w jelitach, skąd α -Syn przedostaje się do mózgu (Braak i wsp., 2006; Corbillé i wsp., 2017; Cersosimo, 2015). Ponadto badania mikrobiologów z Kalifornijskiego Instytutu Technologicznego (Caltech), wykazały związek pomiędzy florą bakteryjną jelit a rozwojem ChP i postulują, że zaburzenia mikrobiomu mogą sprzyjać odkładaniu się w jelitach złogów α -Syn. Badacze sugerują, że zmiany we florze bakteryjnej jelit mogą zapoczątkowywać rozwój i rozprzestrzenianie się ChP (Sampson i wsp., 2016).

7.1.3. Molekularne podłoże choroby

W toku badań nad ChP powstały liczne teorie próbujące wyjaśnić jej przyczynę, jednak podobnie jak w innych chorobach neurodegeneracyjnych, patogenezę i molekularne mechanizmy neurodegeneracji nie są całkowicie poznane. Aktualna i powszechnie przyjęta teoria zakłada złożone mechanizmy prowadzące do degeneracji neuronów dopaminergicznych w ChP. Liczne dane wskazują na zaburzenia funkcjonowania mitochondriów, zarówno w sporadycznej, jak i genetycznej postaci ChP oraz na udział stresu oksydacyjnego-nitrozacyjnego (Bossy-Wetzel i wsp., 2004). Według tej teorii degeneracja neuronów dopaminergicznych, prowadząca do wystąpienia objawów ChP, związana jest z nieprawidłowym funkcjonowaniem kompleksu I łańcucha oddechowego i spowodowanym przez to stresem oksydacyjnym. Potwierdzeniem tej hipotezy są wyniki badań z użyciem związków MPTP (1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny) (Langston i wsp., 1983) oraz rotenonu (Tanner, 1992). Oba związki są inhibitorami I kompleksu łańcucha oddechowego i hamują aktywność dehydrogenazy NADH, co prowadzi do zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej i obniżenia produkcji ATP. Zahamowanie fosforylacji oksydacyjnej wywołuje wzrost syntezy wolnych rodników tlenowych oraz oksydacyjne uszkodzenia makromolekuł takich jak białka i DNA (Henchcliffe i Beal, 2008). W konsekwencji komórki kierowane są na drogę wewnętrznego szlaku apoptozy, zależnej od dysfunkcji mitochondriów i kaspaz. Inna hipoteza zakłada, że przyczyną ChP jest odkładanie się w określonych strukturach mózgu białek o nieprawidłowej konformacji przestrzennej. Dane literaturowe wyraźnie wskazują, że wynikające z mutacji lub modyfikacji potranslacyjnych zaburzenie ilości i uwalniania α -Syn, jej oligomeryzacja, a następnie agregacja może mieć kluczowe znaczenie w procesie neurodegeneracji (Xilouri i wsp., 2016; Calo i wsp., 2016). Według innej hipotezy w ChP dochodzi do uszkodzenia i śmierci neuronów w wyniku dysfunkcji systemu ubiquityna-proteasom (ang. Ubiquitin Proteasom System - UPS), który bierze udział

w rozpoznawaniu i usuwaniu nieprawidłowych i uszkodzonych białek (McKinnon i Tabrizi, 2014; Xilouri i wsp., 2013). Degradacja zbędnych białek przez proteasom stanowi istotny wewnątrzkomórkowy system kontroli, który zapobiega nagromadzeniu się nieprawidłowych, zdeformowanych lub toksycznych białek (Yang i Yang, 2013; Alvarez-Castelao i wsp., 2014). Białkiem o kluczowym znaczeniu dla prawidłowego funkcjonowania systemu UPS jest parkina - ligaza ubikwitynowa E3, która stymuluje wiązanie białek z ubikwityną kierując je do degradacji w proteasomie (Alvarez-Castelao i wsp., 2014). Wynikające z mutacji lub modyfikacji potranslacyjnych zaburzenie aktywności parkiny (Sharp i wsp., 2014; Im i Chung, 2015; Sunico i wsp., 2013), a w konsekwencji utrata jej funkcji fizjologicznych, może przyczyniać się do akumulacji nieprawidłowo funkcjonujących lub toksycznych białek. Żadna z zaproponowanych teorii: uszkodzenie funkcji mitochondriów i stres oksydacyjny, zaburzenie systemu UPS i odkładanie się uszkodzonych białek nie są w stanie samodzielnie wyjaśnić patogenezy ChP. Zjawiska te współistnieją w procesie neurodegeneracji i są zależne od siebie (**Ryc.1**). Ponadto zależna od czynników środowiskowych/genetycznych oligomeryzacja α -Syn może aktywować stres oksydacyjny i nitrozacyjny, prowadząc do zaburzenia aktywności parkiny (Xilouri i wsp., 2016; Calo i wsp., 2016; Sharp i wsp., 2014; Im i Chung, 2015; Sunico i wsp., 2013). W konsekwencji może dochodzić do uszkodzenia dynamiki i funkcji mitochondriów i nadmiernej produkcji wolnych rodników tlenowych, które stymulują oligomeryzację α -Syn, jej uwalnianie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i propagację procesów patologicznych. Podsumowując, istnieje wiele danych wskazujących, że oligomery α -Syn mogą mieć kluczowe znaczenie w patomechanizmie ChP i mogą być czynnikiem napędzającym i propagującym procesy neurodegeneracji w ChP i innych zaburzeniach neurozwyrodnieniowych.

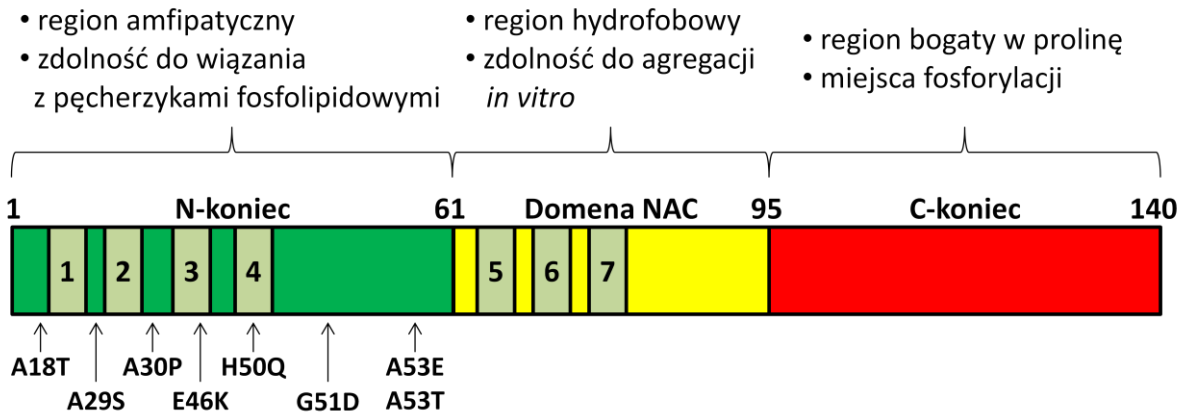


Rycina 1. Molekularne mechanizmy patofizjologii choroby Parkinsona (schemat autorski).

Najnowsza teoria dotycząca molekularnego podłoża choroby Parkinsona zakłada współistnienie patologicznych procesów, w tym uszkodzenia funkcji mitochondriów, aktywacji stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego, zaburzenia systemu ubikwityna-proteasom oraz odkładania się uszkodzonych, nieprawidłowo sfałdowanych białek.

7.2. Udział α -synukleiny w patomechanizmie choroby Parkinsona

α -Syn jest białkiem obficie reprezentowanym w części presynaptycznej neuronów istoty czarnej, hipokampa, kory, mózdzku, prążkowia oraz opuszki węchowej (Adamczyk i wsp., 2005). Jak już wcześniej wspomniano α -Syn, która jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania neuronów, w warunkach patologicznych ulega agregacji, tworząc LB. Struktury te odkładają się w mózgu chorych na ChP, DLB, MSA oraz inne choroby neurodegeneracyjne, które określa się wspólnym terminem „synukleinopatii”. Ludzki gen *SNCA* zlokalizowany na chromosomie 4q21, kodujący 140 aminokwasowe białko α -Syn o masie ~14 kDa, składa się z 117 par zasad i posiada 6 egzonów (Ariesandi i wsp., 2013). Do tej pory opisano cztery warianty α -Syn powstałe na skutek alternatywnego składania pre-mRNA: 98, 112, 126 oraz 140 aminokwasów (Beyer i wsp., 2008) i wykryto osiem mutacji punktowych typu podstawienia w genie *SNCA*: A53T, E46K, A30P, H50Q, A53E, A18T, A29S oraz G51D (Polymeropoulos i wsp., 1996, 2000; Krüger i wsp., 1998; Zarranz i wsp., 2004; Hoffman-Zacharska i wsp., 2013; Appel-Cresswell i wsp., 2013; Lesage i wsp., 2013; Proukakis i wsp., 2013). Ponadto wykryto di- i triplikacje genu *SNCA* (Chartier-Harlin i wsp., 2004; Singleton i wsp., 2003) oraz stwierdzono, że polimorfizmy genu kodującego α -Syn, jak również jego promotora, mogą zwiększać ryzyko powstania ChP (Sotiriou i wsp., 2009; Coppède, 2012). W strukturze α -Syn wyodrębnia się trzy główne domeny (**Ryc.2**). N-terminalny amfipatyczny region, obejmujący aminokwasy od 1 do 61, który zawiera cztery 11-aminokwasowe powtórzenia wysoce konserwowanej sekwencji KTKEGV odpowiada za wiązanie się α -Syn z pęcherzykami fosfolipidowymi (Perrin i wsp., 2000). Mutacje punktowe, o których była mowa powyżej, są zlokalizowane w tej właśnie domenie. Centralny hydrofobowy region, obejmujący od 62 do 95 aminokwasu, zawiera domenę NAC (ang. non-amyloid- β component) odpowiedzialną za zdolność α -Syn do agregacji *in vitro* (Han i wsp., 1995). Z kolei bogaty w prolinę C-koniec (między 96 a 140 aminokwasem) zawiera kilka miejsc fosforylacji (Ulmer i wsp., 2005).



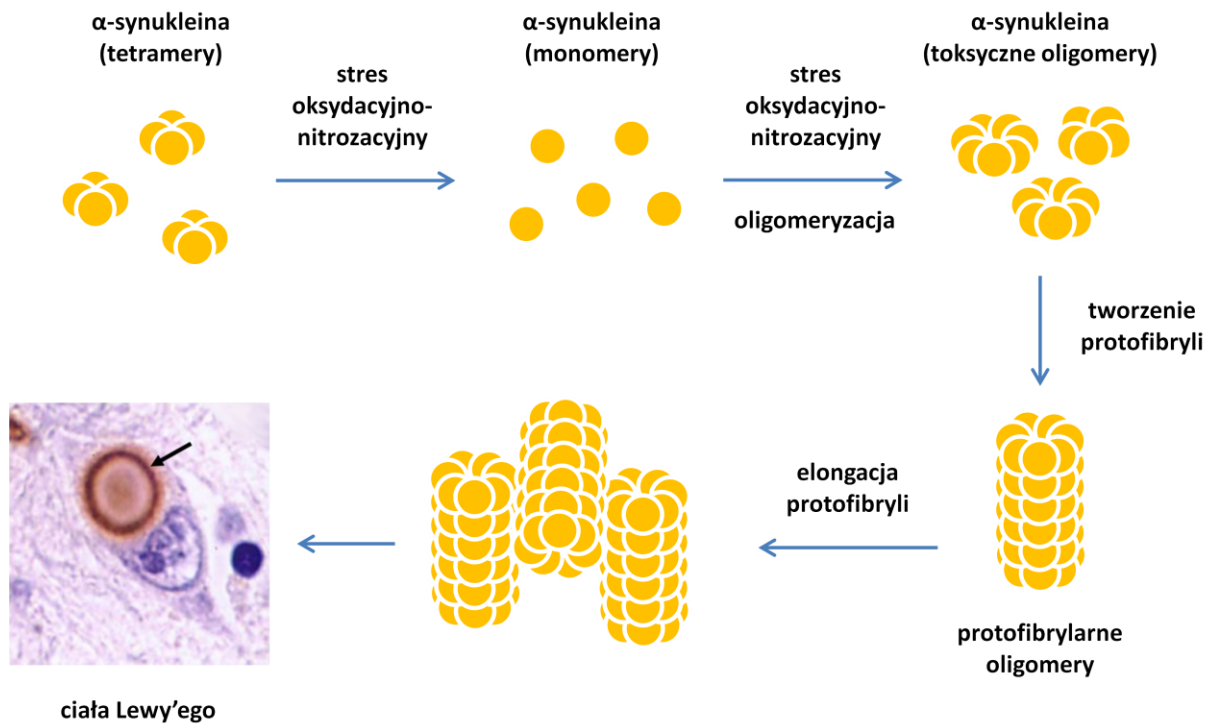
Rycina 2. Budowa białka α -synukleiny wraz z zaznaczonymi miejscami mutacji. Zmodyfikowano wg Butler i wsp. (2017).

W strukturze α -Syn można wyróżnić trzy regiony: N-terminalny amfipatyczny region, centralny hydrofobowy oraz bogaty w prolinę C-koniec. Każdy z regionów odpowiada za odmienną funkcję α -Syn. N-koniec wykazuje zdolność do wiązania z pęcherzykami fosfolipidowymi; zawiera cztery powtórzenia sekwencji KTKEGV oraz mutacje punktowe. Centralny region odpowiada za zdolność α -Syn do agregacji, w tym regionie występują trzy powtórzenia sekwencji KTKEGV. C-terminalny koniec zawiera kilka miejsc fosforylacji.

Pomimo intensywnych badań prowadzonych w wiodących ośrodkach naukowych na świecie, molekularne mechanizmy toksyczności α -Syn, jak również jej rola fizjologiczna, nie są w pełni wyjaśnione. Udział tego białka w utrzymaniu prawidłowej funkcji neuronów lub w procesie neurodegeneracji zależny jest od jego konformacji i stopnia agregacji oraz od lokalizacji wewnątrzkomórkowej i interakcji z błonami lipidowymi. Ponieważ białko to bardzo łatwo zmienia swoją strukturę w wyniku interakcji z dwuwarstwą lipidową oraz w warunkach stresu komórkowego, określa się je jako „białko kameleon” (Silva i wsp., 2013; Drescher i wsp., 2012). W warunkach fizjologicznych α -Syn bierze udział w utrzymaniu prawidłowej struktury i funkcji synaps oraz w kształtowaniu plastyczności synaptycznej. Wiąże się z błonami lipidowymi pęcherzyków synaptycznych, mitochondriów oraz aparatu Golgiego. Białko to, wchodząc w interakcję z białkami kompleksu SNARE (ang. soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor), reguluje transport pęcherzykowy oraz proces endo- i egzocytozy (Burre i wsp., 2015, 2010, 2014), jak również zależne od klatryny formowanie pęcherzyków synaptycznych (Abeliovich i wsp., 2000; Cabin i wsp., 2002). Ponadto w warunkach fizjologicznych α -Syn reguluje przekaznictwo dopaminergiczne na wielu etapach (Cabin i wsp., 2002; Lotharius i Brundin, 2002; Lee i wsp., 2001). Moduluje biosyntezę DA poprzez hamowanie aktywności

hydroksylazy tyrozynowej (ang. tyrosine hydroxylase - TH), wpływa na magazynowanie i uwalnianie tego neuroprzekaźnika z pęcherzyków synaptycznych poprzez wpływ na poziom pęcherzykowego transportera dopaminy VMAT2 (ang. Vesicular Monoamine Transporter 2) (Lotharius i Brundin, 2002) oraz reguluje wychwyt zwrotny DA (Lee i wsp., 2001). Pełni również funkcję białka opiekuńczego i antyapoptotycznego (Da Costa i wsp., 2002) oraz wpływa na dynamikę i funkcję mitochondriów - α -Syn poprzez domenę N-końcową wchodzi w interakcje z mitochondriami i jest transportowana do wnętrza tych organelli poprzez białko TOM40 (Devi i wsp., 2008).

Żywo diskutowanym tematem ostatniej dekady stało się zagadnienie fizjologicznej struktury α -Syn. Do niedawna sądzono, że α -Syn natywnie występuje jako monomer o konformacji kłębka statystycznego, który ma zdolność do fałdowania się w strukturę α -helisy podczas interakcji z dwuwarstwą lipidową, a w warunkach stresu komórkowego np. oksydacyjno-nitrozacyjnego przyjmuje strukturę β -kartki (Baba i wsp., 1998; Hurtig i wsp., 2000). W 2011 roku Dennis J. Selkoe wraz ze współpracownikami z Harvard Medical School odkryli, że w warunkach fizjologicznych α -Syn tworzy tetramer (~ 58 kDa) o budowie helisy (Bartels i wsp., 2011; Dettmer i wsp., 2013, 2015; Luth i wsp., 2014). Według naukowców z grupy Selkoe tetramery α -Syn pod wpływem stresu komórkowego ulegają rozpadowi do monomerów, które następnie ulegają oligomeryzacji i agregacji (Dettmer i wsp., 2013) (**Ryc.3**). Ponadto zaobserwowano, że w neuronach osób z mutacjami A53T oraz E46K dochodzi do spadku stosunku tetrametry:monomery oraz rozpuszczalności α -Syn, co indukuje jej oligomeryzację i toksyczne właściwości (Dettmer i wsp., 2013). Badania grupy Selkoe oraz innych naukowców popierają hipotezę, według której oligomery α -Syn są najbardziej toksyczną formą tego białka (Ingellson, 2016; Choi i wsp., 2013; Colla i wsp., 2012; Chen i wsp., 2007; Danzer i wsp., 2007). Wzrost poziomu oligomerów α -Syn w porównaniu do osób zdrowych wykazano w mózgach pacjentów z DLB (Paleologou i wsp., 2009) oraz w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z ChP (Park i wsp., 2011; Parnetti i wsp., 2014).

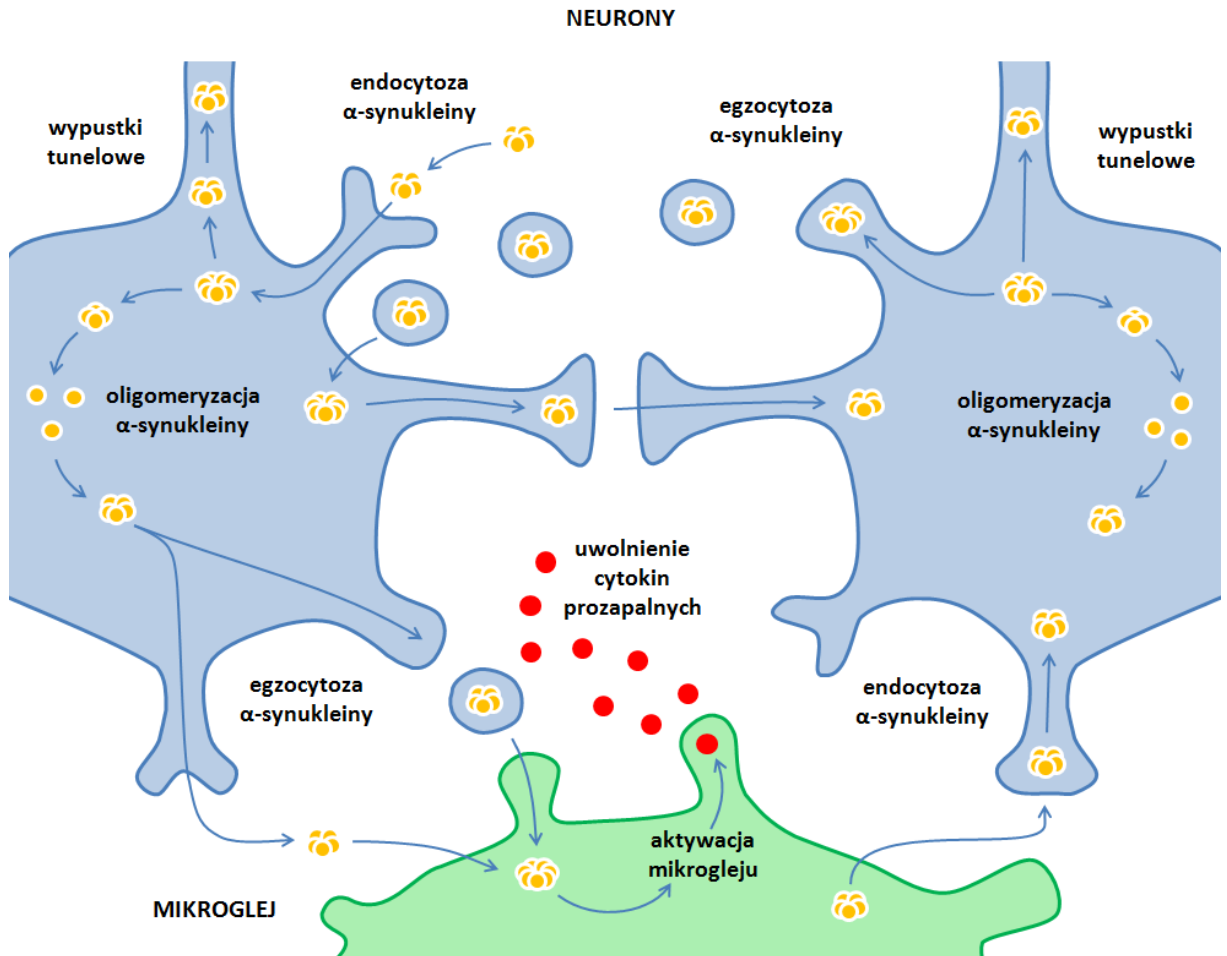


Rycina 3. Schematyczne przedstawienie procesu oligomeryzacji i agregacji α -synukleiny. Zmodyfikowano wg Roberts i Brown (2015). Zdjęcie pochodzi ze strony www.curedementia.com.

α -Syn o strukturze tetramerów w warunkach stresu komórkowego ulega rozpadowi do monomerów, które w procesie oligomeryzacji nabierają toksycznych właściwości. Oligomery α -Syn mogą tworzyć protofibryle, które następnie agregowane są w ciała Lewy'ego.

Badania ostatnich kilkunastu lat wykazały, że α -Syn jest uwalniana z komórek do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i że zewnątrzkomórkowe oligomery α -Syn mają kluczowe znaczenie w patomechanizmie ChP. Uwolnione z komórek w warunkach stresu oksydacyjnego oligomery α -Syn mogą działać zewnątrzkomórkowo poprzez oddziaływanie na błony komórkowe, aktywację komórek mikrogleju i uwalniania cytokin prozapalnych, inicjując w ten sposób proces neurodegeneracji (Danzer i wsp., 2007) (**Ryc.4**).

Dokładne mechanizmy uwalniania, przedostawania się do sąsiadujących komórek i propagacji toksyczności α -Syn nie zostały ostatecznie określone. Sugeruje się, że α -Syn może być wydzielana z komórek nerwowych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej jako swobodnie pływające białko, na drodze zależnej od egzosomów (Danzer i wsp., 2012) oraz przy udziale wypustek tunelowych (ang. tunneling nanotubes) (Abounit i wsp., 2016). Szereg prac wskazuje, że najbardziej podatną na uwalnianie formą α -Syn są oligomery i że to właśnie ta forma białka pełni kluczową rolę w rozprzestrzenianiu się synukleinopatii (Danzer i wsp., 2012). Wydzielona do przestrzeni zewnątrzkomórkowej α -Syn może dostawać się do sąsiadujących komórek na zasadzie endocytozy zależnej od klatryny (Oh i wsp., 2016) oraz od białka LAG3 (ang. lymphocyte-activation gene 3) (Mao i wsp., 2016). α -Syn pobierana jest przez sąsiadujące neurony oraz komórki mikrogleju i astrocyty, prowadząc do nadmiernej produkcji i uwalniania cytokin prozapalnych (Lee i wsp., 2010). Transfer α -Syn pomiędzy komórkami wykazano zarówno w modelach *in vitro* jak i *in vivo* (Desplats i wsp., 2009; Hansen i wsp., 2011; Luk i wsp., 2009, 2012a, 2012b; Volpicelli-Daley i wsp., 2011). Ponadto, w badaniach *post mortem* wykazano, że w wyniku transplantacji zdrowych neuronów do mózgu osób z ChP dochodzi do rozprzestrzenienia się α -Syn, tworzenia LB i neurodegeneracji w obrębie przeszczepionych komórek (Kordower i wsp., 2008; Li i wsp., 2008; Mendez i wsp., 2008). Istnieją również dane sugerujące, że α -Syn posiada właściwości białka prionowego i jest zdolna do rozprzestrzeniania się i indukowania oligomeryzacji endogennej puli tego białka (Danzer i wsp., 2007; Luk i wsp., 2009; Hansen i wsp., 2011; Luk i wsp., 2012b; Masuda-Suzukake i wsp., 2013; Rey i wsp., 2013). Wydzielanie, przedostawanie się do sąsiadujących komórek i propagacja α -Syn są zgodne z zaproponowaną przez Braaka teorią rozprzestrzeniania się patologii α -Syn w ChP (Braak i wsp., 2003).



Rycina 4. Proponowany model oddziaływań zewnątrzkomórkowych α -synukleiny. Zmodyfikowano wg Ingelsson (2016).

α -Syn może rozprzestrzeniać się pomiędzy komórkami jako swobodnie pływające białko na drodze zależnej od egzosomów lub za pomocą wypustek tunelowych. Sugeruje się, że α -Syn może działać zewnątrzkomórkowo poprzez oddziaływanie na błony komórkowe, aktywację komórek mikrogleju i uwalnianie cytokin prozapalnych.

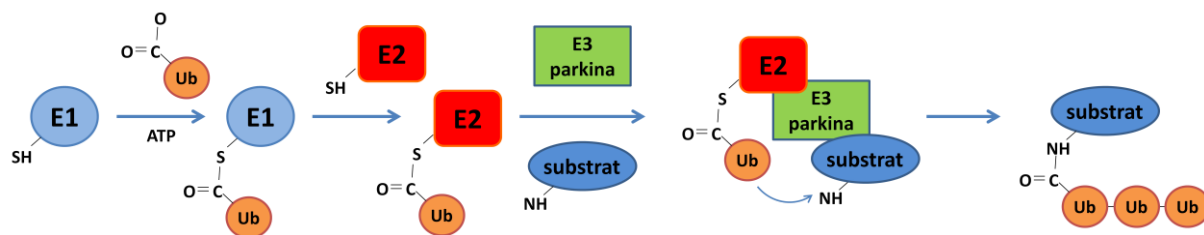
Zewnątrzkomórkowe oligomery α -Syn przedostają się do wnętrza komórek i tam wywierają swój toksyczny efekt, m.in. indukując oligomeryzację wewnątrzkomórkowej puli α -Syn (Danzer i wsp., 2012). Dotychczasowe badania wykazały, że egzogenna α -Syn hamuje aktywność transportera dopaminy (ang. dopamine transporter – DAT) (Adamczyk i wsp., 2006), zaburza homeostazę wapniową (Adamczyk i Strosznajder, 2006) oraz powoduje zależne od tlenku azotu (NO) zaburzenie funkcji mitochondriów i śmierć komórek na drodze zależnej od aktywacji kaspaz (Kazmierczak i wsp., 2008). Podana zewnątrzkomórkowo α -Syn wpływa na ekspresję białek pro- i antyapoptotycznych, zwiększa ekspresję białka Bax oraz obniża poziom Bcl-xL (Seo i wsp., 2002). Na szlaku toksycznego działania oligomerów α -Syn leżą również komórkowe systemy odpowiedzialne za degradację białek, UPS i ścieżka autofago-lizosomalna (Xilouri i wsp., 2013; Winslow i wsp., 2010; Tanik i wsp., 2013). Sugeruje się, że nieprawidłowości w funkcjonowaniu proteasomu w ChP mogą być zależne od α -Syn (Tanaka i wsp., 2001; Outeiro i Lindquist, 2003). Oligomeryzacja α -Syn prowadzi do utraty jej funkcji fizjologicznych związanych z utrzymaniem prawidłowej struktury i funkcji synaps. Oligomery α -Syn zaburzają funkcję kompleksu SNARE (Choi i wsp., 2013), w konsekwencji prowadząc do deregulacji uwalniania neurotransmiterów (Janežic i wsp., 2013; Nemani i wsp., 2010; Wang i wsp., 2014). Badania na skrawkach hipokampa wykazały, że egzogenne oligomery α -Syn zaburzają funkcję synaps i negatywnie wpływają na długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. long-term potentiation - LTP) poprzez aktywację receptora NMDA (ang. N-methyl-D-aspartate receptor) (Diógenes i wsp., 2012). Najnowsze badania z zastosowaniem techniki patch-clamp wykazały, że oligomery α -Syn zaburzają przewodnictwo neuronów (Kaufmann i wsp., 2016). Zależne od oligomerów α -Syn uszkodzenia synaps, zaburzenie homeostazy wapniowej, aktywacja stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego i stresu ER, jak również dysfunkcja mitochondriów, mogą prowadzić do programowanej śmierci komórki i neurodegeneracji (Yasuda i Mochizuki, 2010). Ponadto, oligomery α -Syn indukują dysfunkcje mitochondriów, zaburzenia interakcji mitochondriów z ER, oraz fragmentację aparatu Golgiego.

7.3. Parkina w chorobie Parkinsona

Parkina, wielofunkcyjna ligaza ubikwitynowa E3, bierze udział w naznaczaniu białek do degradacji w proteasomie i jest białkiem o kluczowym znaczeniu dla prawidłowego funkcjonowania systemu UPS. Jej istotną rolę w przeżyciu neuronów w ChP potwierdza fakt, że dysfunkcja tego białka jest nie tylko główną przyczyną rodzinnej postaci choroby, ale także jest czynnikiem ryzyka idiopatycznej formy ChP (Dawson i Dawson, 2014). Wykazano również znaczenie parkiny w procesie neurodegeneracji w chorobie Alzheimerera, stwardnieniu rozsianym i chorobie Huntingtona (Rosen i wsp., 2010; Hebron i wsp., 2014). Zaburzenie funkcji parkiny może być przyczyną dysfunkcji neuronów w ChP oraz w innych chorobach zwyrodnieniowych (Kubo i wsp., 2013), chociaż komórki dopaminergiczne wydają się być szczególnie wrażliwe na deregulację tego białka.

7.3.1. Struktura, mechanizm działania i regulacja aktywności parkiny

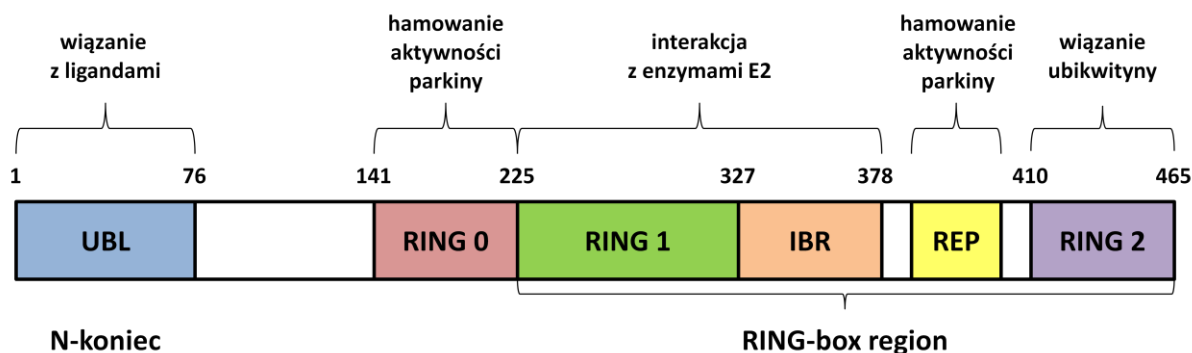
Gen *PRKN* kodujący parkinę zawiera 12 egzonów oddzielonych od siebie wydłużonymi intronami i ulega ekspresji w większości tkanek, w tym w mózgu (Stichel i wsp., 2000; Gu i wsp., 2000; D'agata i wsp., 2000; Kitada i wsp., 1998, 2000; Shimura i wsp., 1999). Wykryto, że gen *PRKN* może ulegać delecji, cięciu, nieprawidłowej rekombinacji oraz mutacjom punktowym, co prowadzi do degeneracji neuronów dopaminergicznych m.in. w istocie czarnej śródmózgowia (Oczkowska i wsp., 2013; Mizuno i wsp., 2001). Parkina zbudowana jest z 465 aminokwasów i posiada masę około 52 kDa (Bae i wsp., 2003; Kitada i wsp., 1998, 2000). Parkina jest jednym z enzymów biorących udział w regulacji degradacji białek na drodze zależnej od proteasomu, który jest jednym z najważniejszych mechanizmów obronnych zaangażowanych w ochronę komórek przeciwko nieprawidłowo sfałdowanym, uszkodzonym lub niepożądanym białkom. Aby białko zostało naznaczone i zdegradowane przez UPS musi przejść szereg reakcji (**Ryc.5**). Centrum katalityczne enzymu inicjującego E1 wiąże wiązaniem tioestrowym C-koniec ubikwityny w sposób zależny od ATP. Następnie, dochodzi do przekazania ubikwityny do centrum katalitycznego enzymu koniugującego E2. Parkina, jako ligaza ubikwitynowa E3, jest łącznikiem między enzymem koniugującym E2, a białkiem kierowanym do degradacji. Parkina wiąże się z enzymem E2 oraz substratem, dzięki czemu naznacza ubikwityną białka w konkretnym miejscu ich sekwencji (**Ryc.5**). Następnie dochodzi do dysocjacji zmodyfikowanego białka od kompleksu enzymów E2-parkina.



Rycina 5. Mechanizm degradacji białek zależny od proteasomu. Zmodyfikowano wg Seirafi i wsp. (2015).

Degradacja białek zależna od proteasomu opiera się na szeregu reakcji enzymatycznych. Pierwszym etapem jest zależne od ATP przyłączenie ubikwityny do centrum katalitycznego enzymu inicjującego E1. Następnie ubikwityna jest przenoszona do centrum katalitycznego enzymu koniugującego E2. Kolejno kompleks E2-ubikwityna łączy się z parkiną, która na drodze interakcji z substratem naznacza ubikwityną białko. Ostatnim etapem jest dysocjacja kompleksu enzymów E2-parkina od zmodyfikowanego białka.

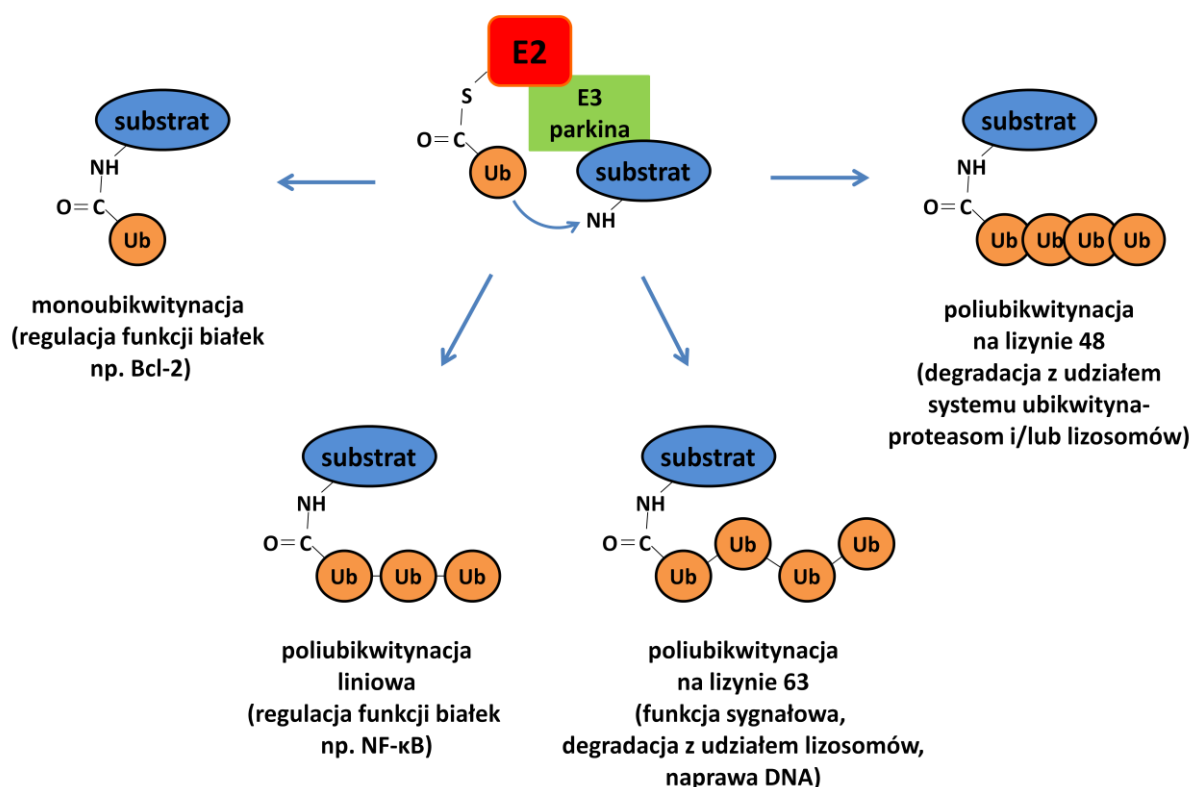
Parkinna zawiera szereg wysoce konserwowanych domen i motywów, które oddziałując ze sobą, regulują aktywność tego białka (**Ryc.6**) (Trempe i wsp., 2013; Hristova i wsp., 2009; Hampe i wsp., 2006). Domena ubikwitynopodobna (ang. ubiquitin-like domain - UBL) zawierająca 76 aminokwasów na N-końcu białka wiąże się z ligandami (Trempe i wsp., 2013). Dokładna funkcja motywu RING0, kiedyś określanego jako UPD (ang. unique parkin domain) (Wauer i Komander, 2013), zlokalizowanego między domenami UBL a RING1, nie jest do końca poznana. Wiadomo jednak, że jest to motyw unikalny dla parkiny (Hristova i wsp., 2009) i poprzez interakcję z domenami RING1 i 2 (ang. really interesting new gene finger 1 i 2) bierze udział w hamowaniu aktywności parkiny (Trempe i wsp., 2013). RING-box region, w skład którego wchodzi domeny RING1 i RING2 oraz motywy IBR (RING1-in-between-RING(IBR)-RING2) i REP (ang. repressor), zlokalizowany jest na C-końcu białka. Zmiany konformacji regionu RING-box umożliwiają interakcje parkiny z kofaktorami, substratami oraz rekrutację enzymów koniugujących E2 (Cookson, 2003; Joazeiro i Weissman, 2000; Imai i wsp., 2000, Zhang i wsp., 2000). Domena RING1 oraz motyw IBR odpowiedzialne są za interakcję z enzymami E2 - UbcH7 oraz UbcH8 (Olzmann i wsp., 2007), które to poprzez przyłączenie ubikwityny do centrum aktywnego domeny RING2 na cysteinie 431 (C431) katalizują transfer ubikwityny na substrat (Wenzel i wsp., 2011; Olzmann i wsp., 2007). Dokładny mechanizm działania motywu represorowego REP nie jest poznany. Wiadomo jednak, że wchodzi on w interakcję z domeną RING1, hamując aktywność parkiny (Wauer i Komander, 2013; Trempe i wsp., 2013).



Rycina 6. Budowa parkiny wraz z domenami (schemat autorski).

Parkina zawiera szereg wysoce konserwowanych domen i motywów, do których możemy zaliczyć zlokalizowaną na N-końcu domenę UBL odpowiadającą za wiązanie się parkiny z ligandami oraz motyw RING0 odpowiedzialny za regulację aktywności parkiny. Region RING-box, w skład którego wchodzi domeny RING1 i RING2 oraz motywy IBR i REP, zlokalizowany jest na C-końcu białka i umożliwia m.in. interakcje parkiny z kofaktorami i substratami. Domena RING1 oraz motyw IBR odpowiedzialne są za interakcję z enzymami E2, podczas gdy domena RING2 odpowiada za wiązanie ubikwityny. Motyw REP jest zaangażowany w regulację aktywności parkiny.

Ligazy E3, do których zaliczamy parkinę, mają kluczowe znaczenie dla UPS, ponieważ to właśnie te enzymy zapewniają wysoką specyficzność rozpoznawania substratów, wpływając na regulację ich aktywności poprzez ubikwitynację (Dye i Schulman, 2007). Ubikwitynacja, w zależności od miejsca przyłączenia ubikwityny do sekwencji substratu, może spełniać kilka funkcji (**Ryc.7**). Najbardziej znaną i najszerzej zbadaną jest ubikwitynacja na lizynie 48, odpowiadająca za kierowanie białek do degradacji w podjednostce 26S proteasomu lub przy udziale lizosomów (Randow i Youle, 2014). Ponadto ubikwitynacja może wpływać na aktywność i lokalizację białek (Komander i Rape, 2012). Parkina ubikwitynuje substraty na lizynie 63, 48, 11 oraz 6 (Ordureau i wsp., 2014; Shimura i wsp., 2001; Moore, 2006; Doss-Pepe i wsp., 2005) i cechuje ją dużą różnorodność substratowa (Chan i wsp., 2011; Sarraf i wsp., 2013; Kemeny i wsp., 2012). Parkina w procesie monoubikwitynacji oraz poliubikwitynacji liniowej wpływa na aktywność białek (Chen i wsp., 2010; Komander i Rape, 2012), a poprzez autoubikwitynację może regulować swoją aktywność jako ligazy ubikwityny E3 (Durcan i wsp., 2014). Potwierdzeniem istotnej roli zaburzeń parkiny w patomechanizmie ChP są wyniki prac pokazujące, że mutacje genu *PRKN* kodującego parkinę skutkują akumulacją szeregu nieprawidłowo sfałdowanych białek, w tym α -Syn (Shimura i wsp., 2001; Ko i wsp., 2005; Sul i wsp., 2013; Choi i wsp. 2003).



Rycina 7. Rodzaje ubikwitynacji białek. Zmodyfikowano wg Seirafi i wsp. (2015).

Zależna od parkiny ubikwitynacja, w zależności od miejsca przyłączenia ubikwityny do sekwencji substratu, może spełniać odmienne funkcje. Monoubikwitynacja i poliubikwitynacja liniowa biorą udział w regulacji funkcji białek. Poliubikwitynacja na lizynie 63 ma funkcję sygnałową a dodatkowo reguluje degradację z udziałem lizosomów oraz naprawę DNA. Poliubikwitynacja na lizynie 48 reguluje degradację z udziałem systemu ubikwityna-proteasom i/lub lizosomów.

W regulacji aktywności parkiny szczególną rolę pełnią modyfikacje potranslacyjne (Chakraborty i wsp., 2017; Chung i wsp., 2004; Yao i wsp., 2004). Fosforylacja parkiny na serynie 65 (S65) przez kinazę PINK-1 oraz na serynie 378 (S378) przez kinazę PLK-1 (ang. polo like kinase 1) zwiększa aktywność tego enzymu (Lee i wsp., 2015; Chen i Dorn, 2013), również neddyllacja przy udziale enzymu NEDD8 aktywuje parkinę, promując interakcje pomiędzy parkiną i enzymem E2 (Um i wsp., 2012; Choo i wsp., 2012). Podobnie sumoilacja oraz deubikwitynacja zwiększają aktywność tego enzymu (Durcan i wsp., 2014; Um i Chung, 2006). Istnieją jednak dane wskazujące na liczne modyfikacje potranslacyjne hamujące aktywność parkiny (Walden i Martinez-Torres, 2012). Fosforylacja przy udziale kinazy CDK5 (na S131) (Avraham i wsp., 2007), CKI (na S101 lub S378) (Yamamoto i wsp., 2005) czy c-ABL (na Y143) (Imam i wsp., 2011), jak również sulfonacja (Meng i wsp., 2011)

skutkują agregacją parkiny, obniżając jej aktywność. Badania na mysich embrionalnych fibroblastach (ang. mouse embryonic fibroblasts - MEF) wykazały, że serynowa proteaza HtrA2 odpowiedzialna jest za cięcie parkiny, co w konsekwencji zmniejsza aktywność tego białka (Park i wsp., 2009). Autoubikwitynacja kieruje parkinę do degradacji na drodze proteasomalnej (Shiba-Fukushima i wsp., 2012; Yao i wsp., 2004; Chung i wsp., 2004).

Szczególną rolę w regulacji funkcji parkiny pełnią modyfikacje potranslacyjne wywołane przez NO. Jedną z nich jest S-nitrozylacja, czyli bezpośrednia reakcja NO z resztami tiolowymi białka, głównie cysteiny. Z kolei nitracja jest modyfikacją polegającą na przyłączeniu grupy nitrowej (-NO₂) do aminokwasów aromatycznych, głównie tyrozyny. Przyjmuje się, że S-nitrozylacja, która prowadzi do powstania S-nitrozocysteiny (SNO-C), jest odwracalna i posiada cechy modyfikacji sygnałowej, natomiast nitracja uznawana jest za znacznik stresu nitrozacyjnego (Yao i wsp., 2004; Chung i wsp., 2004; Sunico i wsp., 2013; Nakamura i wsp., 2013; Ozawa i wsp., 2013). Dane dotyczące roli S-nitrozylacji w regulacji aktywności parkiny są sprzeczne. Do tej pory procesy S-nitrozylacji parkiny badały głównie dwie grupy badawcze – Dawsona oraz Liptona (Chung i wsp., 2004; Yao i wsp., 2004). Pierwsza wykazała, że zależna od NO S-nitrozylacja jest odpowiedzialna za hamowanie aktywności parkiny (Chung i wsp., 2004), podczas gdy badania Liptona wykazały, że S-nitrozylacja prowadzi do zwiększenia aktywności tego enzymu, a następnie do jego hamowania (Yao i wsp., 2004).

7.3.2. Udział parkiny w regulacji homeostazy białek

ChP oraz inne choroby neurozwyrodnieniowe związane są z patologią i akumulacją białek o nieprawidłowej konformacji. Dlatego każda komórka, aby prawidłowo funkcjonować musi zawierać mechanizmy chroniące ją przed negatywnymi skutkami powstawania oraz gromadzenia się zdegenerowanych białek o zaburzonej konformacji. Parkina jako ligaza ubikwitynowa E3 pełni kluczową rolę w proteolizie dysfunkcyjnych białek, zapewniając prawidłowe funkcjonowanie wielu istotnych procesów komórkowych (Zhang i wsp., 2016, 2017; Sassone i wsp., 2017). O tym jak ważne jest usuwanie białek z udziałem systemu UPS świadczy fakt, że w 2004 roku została przyznana Nagroda Nobla z chemii za odkrycie zależnej od ubikwityny degradacji białek.

Badania *in vitro* i *in vivo* wskazują na rolę parkiny w regulacji degradacji białek biorących udział w procesie apoptozy (Johnson i wsp., 2012; Charan i wsp., 2014; Kemeny i wsp., 2012; Ekholm-Reed i wsp., 2013; Carrol i wsp., 2014). Poprzez ubikwitynację proapoptotycznego białka Bax, parkina hamuje jego translokację i akumulację na zewnętrznej błonie mitochondrialnej (Johnson i wsp., 2012), dzięki czemu nie dochodzi do powstania megakanałów mitochondrialnych (ang. permeability transition pore - PTP). Mutacje w genie kodującym parkinę prowadzą do śmierci komórek zależnej od białka Bax (Charan i wsp., 2014). Parkina reguluje również poziom białek proapoptotycznych zawierających domenę BH3, Bid, Bim oraz PUMA (Berger i wsp., 2009). Ponadto zaobserwowano, że parkina hamuje zależne od ceramidu C2 uwalnianie cytochromu c z mitochondriów (Darios i wsp., 2003; Berger i wsp., 2009). Gdy dochodzi do nieodwracalnego masywnego uszkodzenia komórek, parkina może stymulować procesy proapoptotyczne. Ubikwitynując białko Mcl-1, parkina uruchamia proces odpowiedzialny za otwarcie kanałów zbudowanych z białek Bax/Bak i uwolnienie cytochromu c do cytoplazmy (Carrol i wsp., 2014). Ponadto parkina bierze udział w regulacji aktywności kaskady kaspaz, która zależy od inhibitorów apoptozy - białek z rodziny IAP (ang. inhibitor of apoptosis proteins), do których należy białko XIAP (ang. X-linked inhibitor of apoptosis protein) oraz aktywatorów apoptozy, do których zaliczamy białko ARTS (Sept4_i2), należące do rodziny septyn. Białko ARTS w odpowiedzi na czynnik indukujący apoptozę ulega translokacji z zewnętrznej błony mitochondrialnej do cytosolu, gdzie wiąże się z białkiem XIAP hamując jego aktywność. W konsekwencji dochodzi do aktywacji kaskady kaspaz i śmierci komórki na drodze apoptozy. Parkina, poprzez ubikwitynację białka ARTS, zapobiega aktywacji kaskady kaspaz i dalszym procesom towarzyszącym apoptozie (Kemeny i wsp., 2012). Jednocześnie wykazano,

że zaburzenie aktywności parkiny jako ligazy E3 hamuje degradację ARTS, skutkując jego nadmierną akumulacją i wzmożoną indukcją apoptozy (Kemeny i wsp., 2012). Parkina reguluje również aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (Henn i wsp., 2007). Zależna od parkiny ubikwitynacja białek IKK γ /NEMO (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells essential modifier) oraz TRAF2 (ang. tumor necrosis factor receptor-associated factor 2) umożliwia aktywację czynnika NF- κ B, który uczestniczy w regulacji ekspresji kilkuset genów istotnych nie tylko dla apoptozy, ale również proliferacji, odpowiedzi immunologicznej oraz reakcji zapalnych (Henn i wsp., 2007).

Ponadto najnowsze dane wskazują na rolę parkiny w regulacji mitozy i sugerują, że zahamowanie aktywności parkiny może istotnie przyczyniać się do inicjacji procesu nowotworzenia (Lee i wsp., 2015; Checler i Da Costa, 2014; Yeo i wsp., 2012). Zaburzenia parkiny prowadzą do akumulacji regulatorów mitozy - kinazy PLK-1, białek Aurora A, B, cykliny B (Lee i wsp., 2015) oraz cykliny E (Staropoli i wsp., 2003). W konsekwencji dochodzi do zaburzeń segregacji chromosomów, powstania mikrojąder i bipolarnych wrzecion podziałowych (Lee i wsp., 2015). Zaburzenia aktywności parkiny wynikające z mutacji w genie *PRKN* są wykrywane w około 30% nowotworów, w tym płuc, jelit oraz mózgu, a myszy pozbawione genu kodującego parkinę są bardziej podatne na powstawanie nowotworów (Viotti i wsp., 2014; Gong i wsp., 2014; Veeriah i wsp., 2010).

Parkina reguluje również ekspresję białek działając jako czynnik transkrypcyjny, m.in. jest represorem dla genu kodującego białko p53 (Da Costa i wsp., 2009). Domena RING1 parkiny wchodzi w bezpośrednią interakcję z promotorem dla genu kodującego p53, obniżając transkrypcję, poziom i aktywność tego białka, podczas gdy mutacje parkiny zwiększają ekspresję p53 (Da Costa i wsp., 2009). Ponadto parkina hamuje ekspresję i aktywność monoaminooksydaz A i B (Jiang i wsp., 2006). Wykazano, że u pacjentów z mutacją w genie *PRKN* dochodzi do zwiększonej transkrypcji monoaminooksydaz, indukcji stresu oksydacyjnego oraz deregulacji procesów uwalniania i wychwytu DA (Jiang i wsp., 2012). Co więcej, dane literaturowe wskazują, że parkina poprzez aktywację transkrypcji preseniliny-1 wpływa na degradację białka prekursorowego amyloidu beta (ang. amyloid precursor protein - APP) i uwalnianie amyloidu beta (A β) (Duplan i wsp., 2013), który jest głównym składnikiem blaszek starczych w chorobie Alzheimer'a.

Zależna od parkiny regulacja homeostazy białek ulega zaburzeniu w warunkach stresu oksydacyjnego. Wolne rodniki tlenowe prowadzą do modyfikacji potranslacyjnych parkiny i uszkodzenia jej funkcji jako ligazy ubikwitynowej E3 oraz agregacji (LaVoie i wsp., 2007, 2005; Wang i wsp., 2003, 2005). Wykazano, że neurotoksyny (MPP⁺, rotenon,

6-hydroksydopamina), parakwat, NO, DA oraz nadtlenek wodoru (H_2O_2), indukują agregację parkiny, co w konsekwencji prowadzi do utraty jej funkcji fizjologicznych i zaburzeń aktywności systemu UPS (Wang i wsp., 2005; Winklhofer i wsp., 2003). Jak już wcześniej wspomniano, istotne znaczenie w modulacji parkiny pełnią modyfikacje potranslacyjne zależne od NO, które prowadzą do zaburzeń aktywności tego enzymu, a w konsekwencji do zaburzeń homeostazy białkowej (Yao i wsp., 2004; Chung i wsp., 2004; Sunico i wsp., 2013; Nakamura i wsp., 2013; Ozawa i wsp., 2013). W mózgach pacjentów z ChP wykazano akumulację wielu białek – substratów parkiny, m.in. o-glikozyłowanej α -Syn, białka Pael-R, p53, AIMP2, Hsp60, PDCP2-1 (ang. programmed cell death-2 isoform 1 protein), cykliny E oraz białka PARIS (ZNF746) (ang. parkin interacting substrate) (Shimura i wsp., 2001; Imai i wsp., 2001; Choi i wsp., 2003; Shin i wsp., 2011; Sunico i wsp., 2013; Ko i wsp., 2005, 2006; Moore i wsp., 2008; Fukae i wsp., 2009; Staropoli i wsp., 2003). Zaburzenia poziomu i aktywności parkiny mogą prowadzić do aktywacji mechanizmów śmierci komórek dopaminergicznych zależnych od akumulacji dysfunkcyjnych lub niepotrzebnych białek w komórce. Wobec powyższego zakłada się, że utrzymanie aktywności parkiny na właściwym, fizjologicznym poziomie może działać protekcyjnie, zapobiegając akumulacji dysfunkcyjnych białek, w tym oligomerów α -Syn.

7.3.3. Znaczenie parkiny w regulacji funkcji i cyklu życiowego mitochondriów

Mitochondria pełnią kluczową rolę w procesie przeżycia i śmierci komórki. Jak już wcześniej wspomniano, dysfunkcje tych organelli towarzyszą patogenezie ChP oraz wielu innym chorobom neurodegeneracyjnym. Parkina jako ligaza ubikwitynowa E3 bierze udział w kontroli jakości mitochondriów i regulacji ich cyklu życiowego (**Ryc.8**).

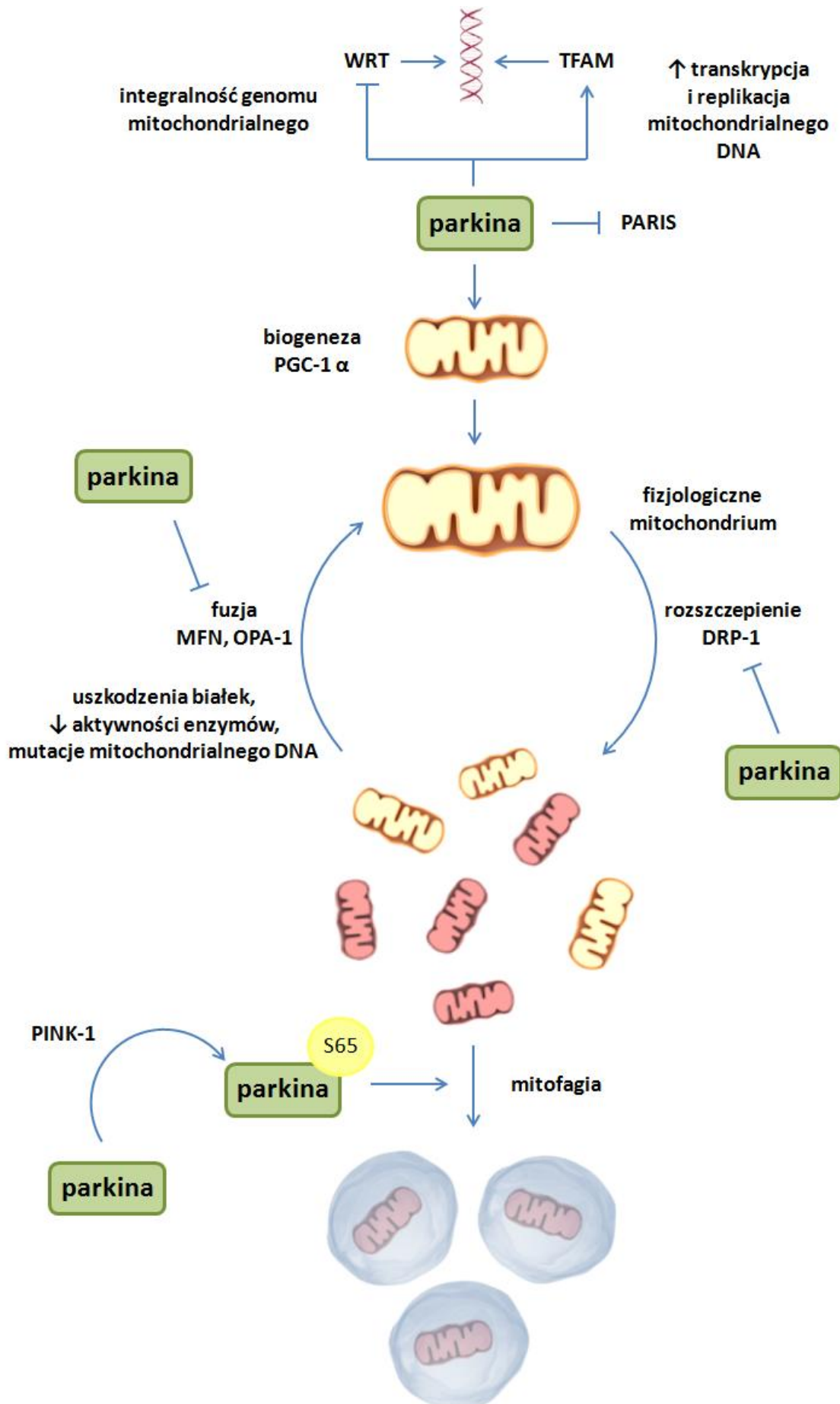
Parkina reguluje biogenezę mitochondriów poprzez ubikwitynację i kierowanie do degradacji czynnika transkrypcyjnego PARIS, który hamuje ekspresję białka PGC-1 α (koaktywator 1 α receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów; ang. peroxisome proliferator-activated receptor- coactivator-1 α) stymulującego biogenezę mitochondriów (Shin i wsp., 2011; Dawson i Dawson, 2014). Dodatkowo parkina wiążąc się z mitochondrialnym czynnikiem transkrypcyjnym A (ang. mitochondrial transcription factor A - TFAM), zwiększa transkrypcję i replikację mitochondrialnego DNA (Kuroda i wsp., 2006). Ponadto parkina w sposób bezpośredni wiąże się z mitochondrialnym DNA i chroni integralność genomu mitochondrialnego (Rothfuss i wsp., 2009).

Parkina reguluje dynamikę mitochondriów m.in. poprzez oddziaływanie z białkami zarządzającymi procesami fuzji i rozszczepienia (Glauser i wsp., 2011; Wang i wsp., 2011a). W warunkach patologicznych, gdy dochodzi do utraty mitochondrialnego potencjału błonowego, parkina ulega rekrutacji do dysfunkcyjnych mitochondriów, które następnie kieruje na drogę autofagii (mitofagii), zabezpieczając w ten sposób komórkę przed gromadzeniem się niepełnowartościowych organelli (Zhang i wsp., 2016).

Procesy fuzji i rozszczepienia mitochondriów są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania tych organelli, a zachwianie równowagi pomiędzy nimi prowadzi do zaburzenia funkcji całej sieci mitochondrialnej. Rozszczepienie zapewnia prawidłowy transport mitochondriów w komórce, ich równomierną segregację do komórek potomnych podczas podziału oraz jest niezbędne dla prawidłowego przebiegu mitofagii. W procesie fuzji, na drodze wymiany mitochondrialnego DNA i białek pomiędzy mitochondriami, możliwe jest odzyskanie fizjologicznych funkcji mitochondriów, dzięki czemu nie dochodzi do akumulacji wadliwych organelli. W warunkach stresu oksydacyjnego dochodzi do zmian dynamiki mitochondriów, a morfologia sieci mitochondrialnej komórek narażonych na stres jest odmienna w zależności od natężenia stresu. Uważa się, że w stresie o umiarkowanym natężeniu dochodzi do fuzji mitochondriów (Kamp i wsp., 2010), natomiast silny stres prowadzi do nadmiernej fragmentacji (Walczak i Szczepanowska, 2015), a w konsekwencji

do obniżenia mitochondrialnego potencjału błonowego, spadku poziomu ATP, wzrostu poziomu wolnych rodników mitochondrialnych i śmierci komórki.

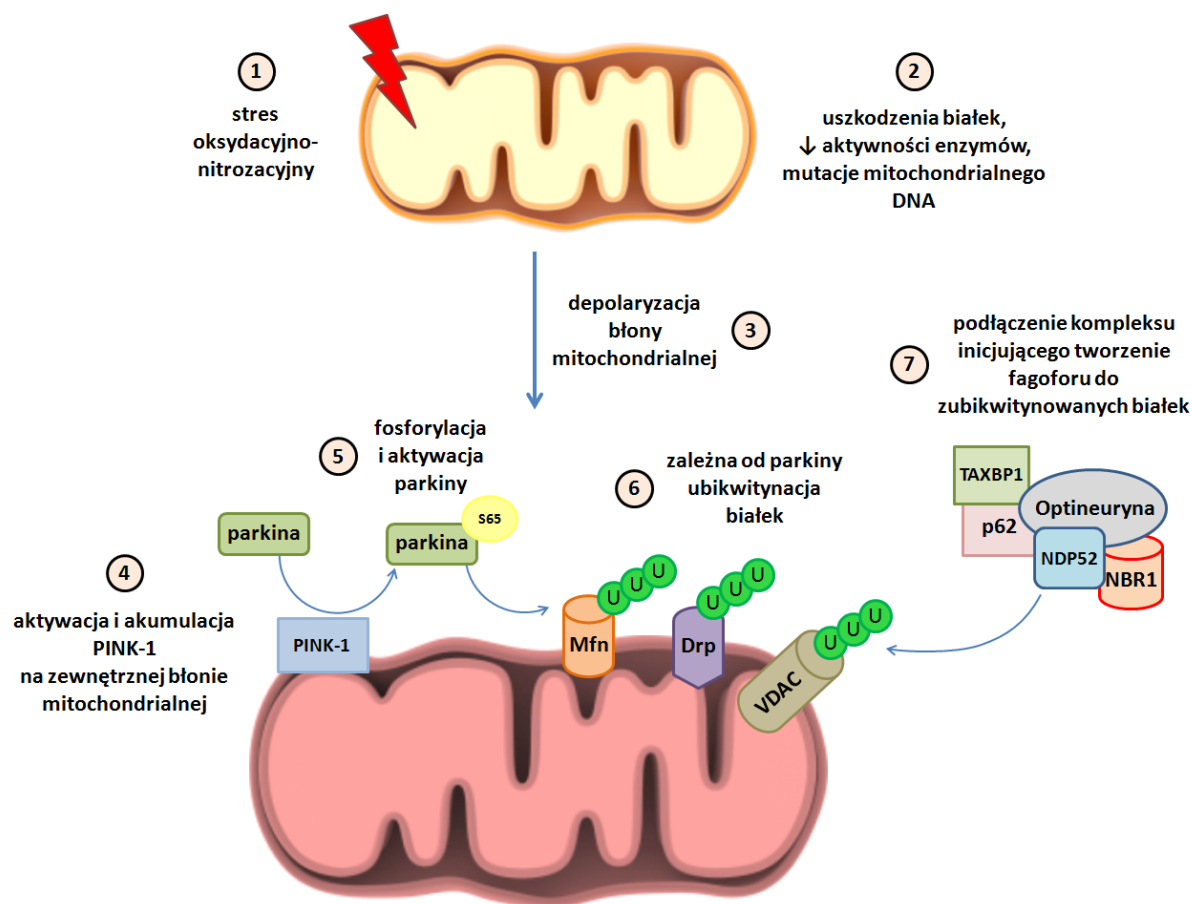
Proces fuzji mitochondriów regulują zakotwiczone w zewnętrznej błonie mitochondrialnej białka z rodziny mitofuzyn - mitofuzyna 1 (ang. mitofusin-1 - Mfn-1) i mitofuzyna 2 (ang. mitofusin-2 - Mfn-2) oraz zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej białko Opa-1 (ang. optic atrophy protein 1). W warunkach silnego stresu komórkowego, gdy dochodzi do masywnych uszkodzeń mitochondriów, parkina bierze udział w ubikwitynacji białek z rodziny mitofuzyn, hamując fuzję uszkodzonych mitochondriów (Glaser i wsp., 2011; Tanaka i wsp., 2010; Gegg i wsp., 2010; Ziviani i wsp., 2010; Poole i wsp., 2010) (**Ryc.8**). Dochodzi wówczas do fragmentacji sieci mitochondrialnej, który to proces pełni funkcję ochronną, umożliwiając usuwanie nieprawidłowo funkcjonujących mitochondriów. Jednakże nadmierna, długotrwała fragmentacja jest niekorzystna i prowadzi do uszkodzeń funkcji mitochondriów. W proces rozszczepienia mitochondriów zaangażowane jest cytoplazmatyczne białko Drp-1 (ang. dynamin-related protein 1). Białkami adaptorowymi dla Drp1 są Mff (ang. mitochondrial fission factor) oraz Fis1 (ang. mitochondrial fission protein 1). Białko Drp-1 wchodzi w interakcję z białkiem Fis-1 oraz innymi białkami receptorowymi na zewnętrznej błonie mitochondrialnej i ulega oligomeryzacji, tworząc pierścienie wokół mitochondriów. Zaciśnięcie pierścienia prowadzi do fragmentacji tych organelli. Parkina reguluje proces rozszczepienia poprzez ubikwitynację białka Drp-1 (Wang i wsp., 2011), dzięki czemu nie dochodzi do rozszczepienia w pełni sprawnych funkcjonalnych mitochondriów (**Ryc.8**). Efektem końcowym procesu rozszczepienia są dwie pule mitochondriów, część w pełni sprawna i gotowa do fuzji oraz część o obniżonym potencjale błonowym, która następnie ulega degradacji na drodze mitofagii (**Ryc.9**).



Rycina 8. Schematyczne przedstawienie roli parkiny w regulacji cyklu życiowego mitochondriów (schemat autorski).

Parkina jako ligaza ubikwitynowa E3 bierze udział w regulacji cyklu życiowego i kontroli jakości mitochondriów. Enzym ten poprzez ubikwitynację i kierowanie do degradacji czynnika transkrypcyjnego PARIS pośrednio reguluje biogenezę mitochondriów. Ponadto wykazano, że parkina poprzez interakcję z czynnikiem TFAM, zwiększa transkrypcję i replikację mitochondrialnego DNA, a w obecności wolnych rodników tlenowych (WRT), poprzez wiązanie się z mitochondrialnym DNA, zapewnia integralność genomu mitochondrialnego. Dzięki oddziaływaniu z białkami z rodziny Mfn, białkiem Opa-1 oraz Drp-1 parkina reguluje procesy fuzji i rozszczepienia mitochondriów. W warunkach fizjologicznych, gdy mitochondria spełniają swoje funkcje, proces rozszczepienia jest hamowany poprzez zależną od parkiny ubikwitynację białka Drp-1. Ponadto parkina poprzez ubikwitynację białek z rodziny Mfn oraz białka Opa-1 hamuje fuzję uszkodzonych mitochondriów. W warunkach utraty mitochondrialnego potencjału błonowego kinaza PINK-1 fosforyluje parkinę na serynie 65 (S65), tak zaktywowana parkina ubikwitynuje białka mitochondrialne prowadząc do inicjacji procesu mitofagii.

Liczne badania prowadzone *in vitro* oraz *in vivo* wskazują na kluczowe znaczenie parkiny i kinazy PINK-1 w regulacji inicjacji procesu mitofagii (**Ryc.9**) (Vincow i wsp., 2013; Geisler i wsp., 2010; Vives-Bauza i wsp., 2010; Matsuda i wsp., 2010; McWilliams i Muqit, 2017; Bingol i Sheng, 2016). W warunkach fizjologicznych kinaza PINK-1 wchodzi w interakcje z kompleksami translokaz zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej, odpowiednio TOM (ang. translocase of outer membrane) i TIM (ang. translocase of inner membrane) (Lazarou i wsp., 2012). W wyniku interakcji dochodzi do cięcia kinazy PINK-1 przy udziale proteaz i jej degradacji w proteasomie (Bingol i Sheng, 2016). W warunkach stresu oksydacyjnego i obniżonego mitochondrialnego potencjału błonowego nie dochodzi do cięcia kinazy PINK-1, natomiast do jej autofosforylacji, dimeryzacji i akumulacji na zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Następnie aktywna kinaza PINK-1 fosforyluje Mfn-2 (Chen i Dorn, 2013). Sugeruje się, że zarówno kinaza PINK-1 jak i zlokalizowana na zewnętrznej błonie mitochondrialnej ufosforylowana Mfn-2, stają się dla parkiny swoistymi receptorami, dzięki czemu białko to lokalizuje się w pobliżu uszkodzonych mitochondriów (Chen i Dorn, 2013; Kondapalli i wsp., 2012; Shiba-Fukushima i wsp., 2012). Kinaza PINK-1 fosforyluje parkinę na S65, co prowadzi do aktywacji tego białka jako ligazy E3 (Shiba-Fukushima i wsp., 2012; Chen i Dorn, 2013). W konsekwencji dochodzi do zależnej od parkiny ubikwitynacji białek, w tym Mfn-1, Mfn-2, Drp-1, Fis-1 oraz VDAC1 (ang. voltage-dependent anion-selective channel protein) (Ordureau i wsp., 2014; Sarraf i wsp., 2013; Geisler i wsp., 2010; Scarffe i wsp., 2014).

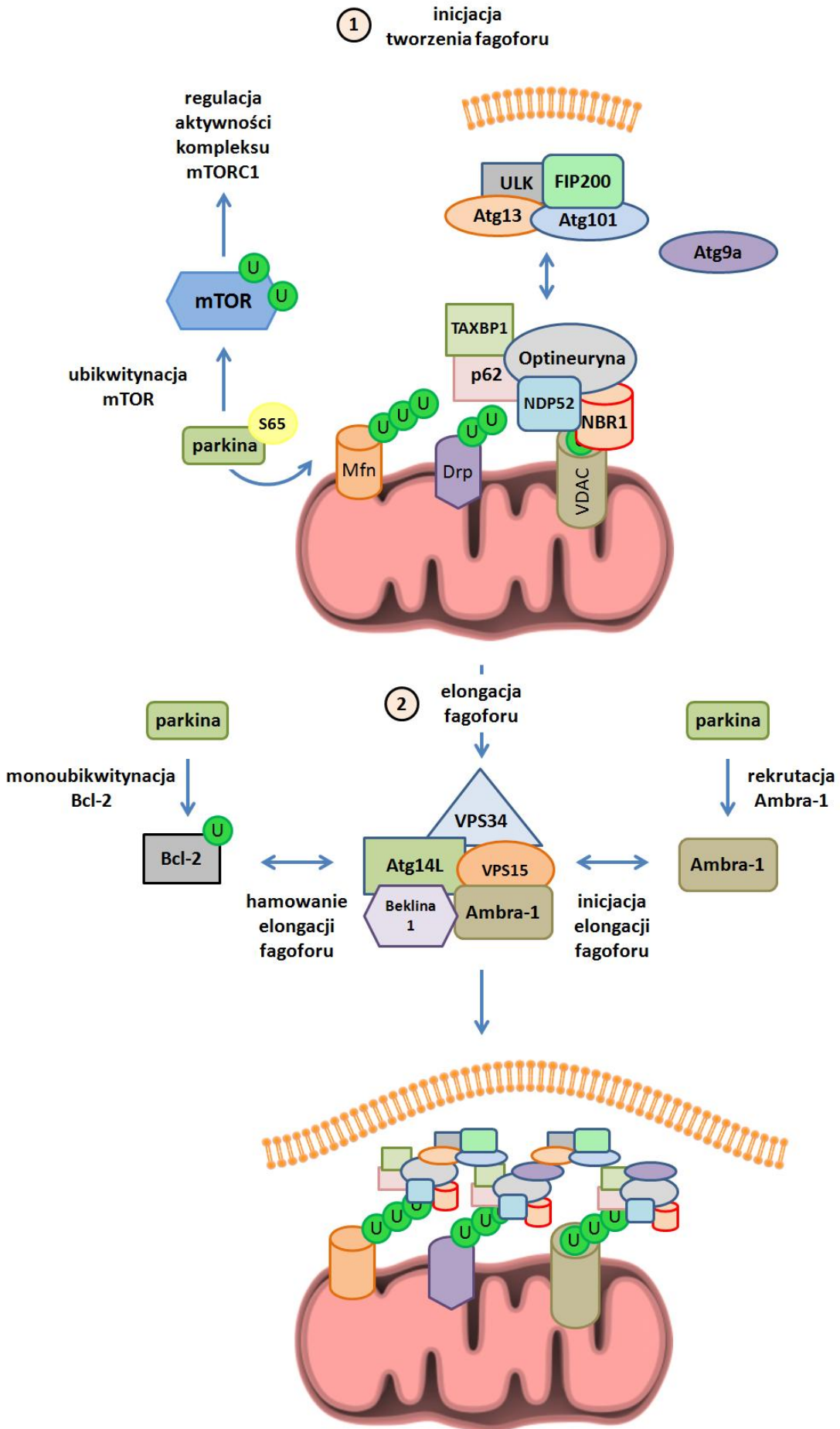


Rycina 9. Schematyczne przedstawienie udziału parkiny w regulacji inicjacji mitofagii (schemat autorski).

W wyniku *m.in.* stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego (1) dochodzić może do uszkodzenia i zmniejszonej aktywności białek oraz enzymów mitochondrialnych, jak również nagromadzenia się mutacji w mitochondrialnym DNA (2). Skutkiem tych patologicznych procesów jest depolaryzacja błony mitochondrialnej (3), która prowadzi do aktywacji i akumulacji kinazy PINK-1 na zewnętrznej błonie mitochondrialnej (4). W wyniku zależnej od kinazy PINK-1 fosforylacji na serynie 65 (S65), parkina ulega aktywacji (5), co prowadzi do ubikwitynacji białek zewnętrznej błony mitochondrialnej (6). Naznaczenie ubikwityną białek mitochondrialnych aktywuje proces podłączenia kompleksu inicjującego powstawanie fagoforu (7).

Masowa ubikwitynacja białek zlokalizowanych na zewnętrznej błonie mitochondrialnej jest czynnikiem inicjującym proces powstawania fagoforów (**Ryc.10**) (Youle i Narendra, 2011), który regulowany jest przez kinazy AMPK (ang. 5'AMP-activated protein kinase), mTOR (ang. mammalian target of rapamycin) oraz kinazę ULK1 (ang. unc-51-like autophagy-activating kinase 1) wchodzącą w skład kompleksu ULK1/2-Atg13-FIP200-Atg101 (Nguyen i wsp., 2016). Kinazy te regulowane są głównie

przez procesy fosforylacji. W odpowiedzi na stres komórkowy, między innymi spadek produkcji ATP, kinaza AMPK fosforyluje ULK1 na serynie 555 (S555), inicjując tworzenie się fagoforów (Tian i wsp., 2015). Z kolei kinaza mTOR w warunkach fizjologicznych hamuje proces autofagii (Jung i wsp., 2010). Parkina ubikwitynując kinazę mTOR zapewnia stabilną, minimalną aktywność kompleksu mTORC1, dzięki czemu utrzymuje homeostazę między procesami anabolicznymi i katabolicznymi w komórce (Park i wsp., 2014). W wyniku zależnej od parkiny ubikwitynacji białek mitochondrialnych dochodzi do rekrutacji receptorów autofagii, m.in. Optineuryny (ang. optineurin), białka NDP52 (ang. nuclear dot protein 52), p62, NBR1 (ang. neighbor of BRCA1 gene 1) oraz białka TAXBP1 (ang. tax1-binding protein 1) na powierzchni ubikwitynowanych białek (Heo i wsp., 2015). Zarówno optineuryna jak i NDP52 pośredniczą w inicjacji tworzenia fagoforów poprzez rekrutację kompleksu ULK-Atg13-FIP200-Atg101 oraz białka Atg9a (ang. autophagy-related protein 9a). Proces elongacji fagoforu odbywa się przy udziale złożonego kompleksu białkowego, w skład którego wchodzi: kinaza VPS34 (ang. phosphatidylinositol 3-kinase complex – PI3K), białko Atg14L, VPS15, białko Ambra-1 (ang. a Beclin-1 interacting protein) oraz Beklina 1. Wykazano, że parkina bierze udział w regulacji procesu elongacji fagoforu w dwojaki sposób, poprzez rekrutację białka Ambra-1 do zdepolaryzowanych mitochondriów indukuje elongację fagoforu (Strappazzon i wsp., 2015; Van Humbeeck, i wsp., 2011) lub hamuje proces elongacji poprzez monoubikwitynację białka Bcl-2 (Chen i wsp., 2010). Parkina ubikwitynując Bcl-2 zwiększa jego stabilność i poziom w komórce, dzięki czemu wchodzi ono w interakcję z Bekliną-1 hamując elongację fagoforów (Chen i wsp., 2010). Zarówno elongacja fagoforu jak i zamknięcie membrany wokół mitochondrium, czyli utworzenie autofagosomu, jest możliwe dzięki produkcji lipidu, 3-fosforanu fosfatydyloinozytolu (ang. phosphatidylinositol 3-phosphate - PI3P), jak również dzięki aktywności białek Atg2A/B, VMP1 oraz białka Atg12, które łącząc się z Atg5 i Atg16L1 tworzą kompleks wchodzący w interakcje z białkiem LC3 (ang. microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3) oraz fosfatydyloetanoliną (ang. phosphatidylethanolamine - PE). Białko LC3 przy udziale białek Atg 4, 7 i 3 przechodzi szereg zmian konformacyjnych, dzięki którym może wiązać się z PE, co jest niezbędne, aby doszło do ekspansji membrany wokół mitochondrium. Opisana kaskada zdarzeń prowadzi do zamknięcia się autofagosomu i jego fuzji z lizosomami.



Rycina 10. Schematyczne przedstawienie roli parkiny w regulacji powstawania fagoforów (schemat autorski).

Zależna od parkiny masowa ubikwitynacja białek mitochondrialnych aktywuje proces podłączenia kompleksu inicjującego powstawanie fagoforu (1), w skład którego wchodzi białka ULK, Atg13, FIP200 oraz Atg101, ponadto dochodzi do rekrutacji białka Atg9a. Dodatkowo parkina poprzez ubikwitynację kinazy mTOR reguluje aktywność kompleksu mTORC1, zapewniając homeostazę pomiędzy procesami anabolicznymi i katabolicznymi w komórce. Parkina bierze udział w procesie składania białkowego kompleksu złożonego z białek VPS34, Atg14L, VPS15, Ambra-1 oraz Bekliny 1, co prowadzi do regulacji elongacji fagoforu (2) w dwojaki sposób. Zależna od parkiny monoubikwitynacja białka Bcl-2 zwiększa interakcję tego białka z Bekliną 1, hamując proces elongacji fagoforu. W drugim przypadku poprzez rekrutację białka Ambra-1 do zdepolaryzowanych mitochondriów, parkina indukuje elongację fagoforu.

Parkina prócz regulacji procesów biogenezy, fuzji, rozszczepienia oraz mitofagii, bierze czynny udział w transporcie mitochondriów w obrębie komórki. Dzięki ubikwitynacji białka Miro-1 (ang. mitochondrial Rho GTPase protein 1), parkina hamuje transport aksonalny uszkodzonych mitochondriów (Wang i wsp., 2012b). Ponadto, białko to odgrywa istotną rolę w interakcjach między membranami mitochondriów i ER (ang. mitochondria-associated membranes - MAM) (Gautier i wsp., 2016; Schon i Przedborski, 2011). Wykazano, że nadekspresja parkiny zwiększa fizyczny kontakt między ER i mitochondriami, wspomagając transfer jonów wapnia (Ca^{2+}) między tymi organelami (Zheng i wsp., 2017; Gautier i wsp., 2016; Cali i wsp., 2013).

8. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Parkina i α -Syn to dwa kluczowe białka związane z patofizjologią ChP, a ich wzajemne oddziaływania uważane są za ważny czynnik stymulujący procesy neurodegeneracyjne, jednak do chwili obecnej molekularne mechanizmy patologicznych zależności między α -Syn i parkiną pozostawały nie wyjaśnione. Ze względu na funkcję parkiny jako ligazy ubikwitynowej E3, zainteresowania naukowców początkowo skoncentrowane były na zbadaniu jej udziału i UPS w degradacji oraz akumulacji α -Syn w neuronach. Wykazano jednak, że degradacja α -Syn na drodze zależnej od UPS zachodzi jedynie w warunkach fizjologicznych i bez udziału ubikwitynacji oraz, że podlega temu głównie glikozyłowana forma tego białka (Shimura i wsp., 2001; Tofaris i wsp., 2001; Xilouri i wsp., 2013). Dalsze badania dowiodły, że gromadząca się w warunkach patologicznych α -Syn nie jest bezpośrednim substratem dla parkiny - ligazy ubikwitynowej E3, a istotną rolę w jej usuwaniu pełni szlak autofagolizosomalny (Ebrahimi-Fakhari i wsp., 2011). Z drugiej strony istnieją dane wskazujące, że w warunkach stresu oksydacyjnego/nitrozacyjnego (Nakamura i Lipton, 2009; Sunico i wsp., 2013; Yao i wsp., 2004), który towarzyszy oligomeryzacji/agregacji α -Syn, może dochodzić do modyfikacji potranslacyjnych parkiny, zaburzenia jej aktywności i utraty funkcji fizjologicznych związanych z usuwaniem nieprawidłowych, dysfunkcyjnych białek. Ponieważ parkina jest istotnym białkiem w regulacji cyklu życiowego i kontroli jakości mitochondriów, zaburzenie jej funkcji może prowadzić do nieprawidłowości w funkcjonowaniu całej sieci mitochondrialnej, a w konsekwencji do śmierci neuronów. Jednak do chwili obecnej nie zidentyfikowano czynników odpowiedzialnych za dysfunkcję parkiny. Wobec powyższego **celem pracy** była weryfikacja **hipotezy badawczej**, że α -Syn w sposób zależny od NO i wolnych rodników tlenowych prowadzi do modyfikacji potranslacyjnych parkiny i zaburzeń jej funkcji, a w konsekwencji do uszkodzenia mitochondriów.

Cel ten realizowano prowadząc badania na modelu toksyczności α -Syn *in vitro* z wykorzystaniem komórek dopaminergicznych PC12.

Cele szczegółowe obejmowały:

- 1) Zbadanie wpływu egzogennych oligomerów α -Syn na poziom jonów Ca^{2+} w cytosolu oraz na aktywację stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego.
- 2) Zbadanie wpływu egzogennych oligomerów α -Syn na ekspresję, aktywność i zależne od NO modyfikacje potranslacyjne parkiny.
- 3) Zbadanie udziału parkiny w zależnych od oligomerów α -Syn zaburzeniach mitofagii oraz biogenezy i dynamiki mitochondriów.

9. MATERIAŁY I METODY

9.1. Przygotowanie monomerów, oligomerów i agregatów α -synukleiny

W celu uzyskania monomerów, ludzką rekombinowaną α -syn (rPeptide, Bogart, GA, USA) rozpuszczano w 50 mM buforze fosforanowym (pH 7,0) w stężeniu 100 μ M. Tak przygotowany roztwór przechowywano w temperaturze -20 °C.

Oligomery α -syn przygotowywano według Danzer i wsp. (2007) z modyfikacjami. Ludzką, rekombinowaną α -syn (100 μ M) rozpuszczano do końcowego stężenia 7 μ M w 50 mM buforze fosforanowym (pH 7,0) zawierającym 20% etanol, wytrząsano orbitalnie (1000 rpm, Thermomixer C, Eppendorf) przez 4 godz. w temperaturze pokojowej (RT) i liofilizowano przez noc. Następnie α -syn rozpuszczano w połowie początkowej objętości w 50 mM buforze fosforanowym (pH 7,0) zawierającym 10% etanol i mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego firmy WIGO typ ES21 (500 rpm) w sterylnych warunkach przez 24 godz. w probówce z otwartym wieczkiem.

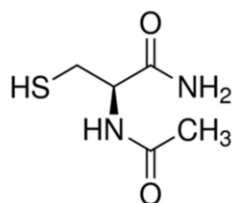
Agregaty α -syn uzyskiwano poprzez rozpuszczenie α -syn w 50 mM buforze fosforanowym (pH 7,0) w stężeniu 100 μ M. Próbkę inkubowano w temperaturze 37 °C przez 14 dni.

Stężenie uzyskanych monomerów, oligomerów i agregatów α -syn oznaczono przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

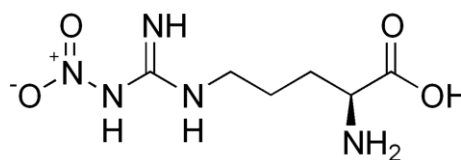
9.2. Charakterystyka i wzory chemiczne stosowanych związków

W prowadzonych badaniach stosowano następujące związki (**Ryc.11**):

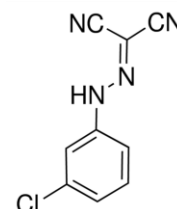
1. α -synukleina (α -Syn, rPeptide) - Rozpuszczalna w 50 mM buforze fosforanowym w formie monomerycznej, oligomerycznej i zagregowanej, stosowana w stężeniu 5 μ M.
2. N-acetylocysteina (NAC, Merck) - Rozpuszczalny w wodzie przeciwutleniacz, stosowany w stężeniu 1 mM.
3. N ω -nitro-L-arginina (NNLA, Merck) - Rozpuszczalny w wodzie nieselektywny inhibitor izoform NOS, stosowany w stężeniu 100 μ M.
4. m-chlorofenylohydrazon cyjanku karbonylu (CCCP, ang. carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, Merck) - Rozpuszczalny w wodzie związek rozprężający fosforylację oksydacyjną - powoduje odseparowanie procesu utleniania w łańcuchu oddechowym od fosforylacji, wskutek tego oddychanie przebiega w sposób niekontrolowany. Związek stosowany w stężeniu 50 μ M.



N-acetylocysteina (NAC)



N ω -nitro-L-arginina (NNLA)



m-chlorofenylohydrazon
cyjanku karbonylu (CCCP)

Rycina 11. Wzory chemiczne związków użytych w badaniach.

9.3. Modele badawcze i warunki doświadczalne

9.3.1. Komórki szczurzego guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy (pheochromocytoma, PC12)

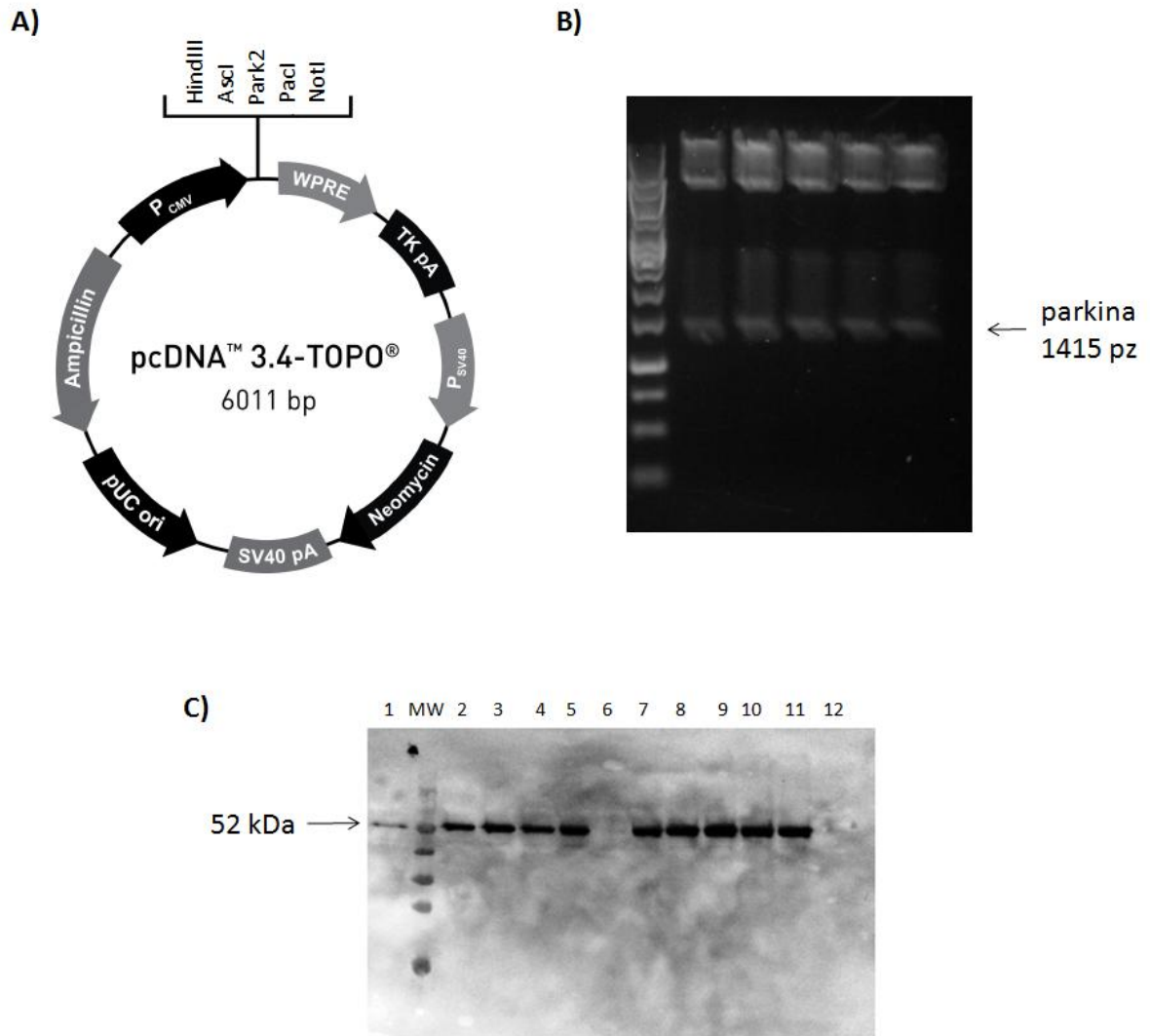
Materiał do badań stanowiły hodowane *in vitro* komórki szczurzego guza chromochłonnego (łac. *Pheochromocytoma*, PC12) pozyskane z Zakładu Farmakologii Biocentrum Uniwersytetu we Frankfurcie nad Menem w Niemczech. Ze względu na neuroektodermalne pochodzenie tych komórek oraz zdolność do fenotypowego różnicowania się w kierunku komórek nerwowych jest to linia rutynowo stosowana w badaniach dotyczących molekularnych mechanizmów procesów neurodegeneracji. Komórki PC12 posiadają cechy komórek dopaminergicznych; wykazują ekspresję DAT oraz TH, jak również syntetyzują i uwalniają DA.

9.3.2. Komórki PC12 ze stabilną nadekspresją parkiny

Ludzkie białko parkina używane do uzyskania nadekspresji tworzono zgodnie z sekwencją nukleotydową (NM_004562.2) oraz aminokwasową (NP_004553.2) ze strony National Center for Biotechnology Information (NCBI).

9.3.2.1. Przygotowanie konstruktów

Gen *PRKN* kodujący białko parkinę wstawiono do wektora pcDNA4.3Asc (pcDNA3.4TOPO z sekwencją kodującą miejsca cięcia restryktaz HindIII, AscI, PacI, NotI) w miejsca AscI/PacI (**Ryc.12.A**). Otrzymane klony analizowano restrykcyjnie po trawieniu enzymami AscI/PacI. We wszystkich uzyskanych klonach potwierdzono obecność fragmentu DNA o wielkości 1415 par zasad (pz), co odpowiada wielkości genu kodującego parkinę (**Ryc.12.B**). Poprawność otrzymanych wektorów ekspresyjnych zawierających gen parkiny analizowano w komórkach CHO (ang. chinese hamster ovary) poprzez przejściową nadekspresję. Transfekcję wykonano metodą chemiczną przy użyciu polyetylenimine "Max", (Mw 40,000) - PEI (Polysciences, nr kat. 9002-98-6). Ekspresję parkiny w komórkach CHO analizowano za pomocą metody Western blot przy użyciu specyficznych przeciwciał (**Ryc.12.C**).



Rycina 12. Nadekspresja genu *PRKN* kodującego parkinę.

A) Mapa plazmidu *pcDNA3.4TOPO* z sekwencją kodującą miejsca cięcia restryktaz *HindIII*, *AscI*, *PacI*, *NotI*. Gen *PRKN* kodujący białko parkinę wstawiono w miejsca *AscI/PacI*. **B)** Reprezentatywny elektroforegram analizy restrykcyjnej uzyskanych klonów *pcDNA3.4+PRKN*. Plazmidowe DNA dla każdego klonu izolowano z bakterii *E.coli* i trawiono enzymami restrykcyjnymi *AscI* oraz *PacI*. DNA rozdzielano elektroforetycznie na 1% żelu agarozowym, w obecności bromku etydyny i wizualizowano na trans iluminatorze UV. **C)** Immunoreaktywność parkiny w komórkach CHO po transfekcji plazmidem *pcDNA3.4+PRKN* oznaczano za pomocą metody Western blot. Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej, $n=4$. MW - marker wielkości, pz- pary zasad, 1- 5, 7-11 - klony DNA dla parkiny, 6 i 12 - kontrola negatywna.

9.3.2.2. Transfekcja komórek PC12 i selekcja klonalna

Komórki PC12 transfekowano plazmidem z genem *PRKN* lub pustym plazmidem za pomocą elektroporacji z wykorzystaniem elektroporatora BioRad Gene Pulser Xcell. Komórki PC12 w gęstości 5×10^6 umieszczono w kuwecie do elektroporacji w pożywce hodowlanej w objętości 0,5 ml, a następnie dodawano 10 μg DNA (pcDNA3.4+*PRKN*) lub 10 μg DNA (pcDNA3.4). Elektroporację prowadzono w kuwetach VWR (ECN:732—1137, 4 mm Gap) stosując napięcie 220 V i 1 puls długości 30 ms. Zawartość kuwety przeniesiono na płytkę o średnicy 10 cm do ogrzanej pożywki hodowlanej, którą następnie umieszczono w inkubatorze w 37 °C i 5% CO₂. Po procedurze elektroporacji komórki PC12 poddano selekcji na pożywce suplementowanej antybiotykiem genecytyną (G-418; Merck). Następnego dnia po transfekcji pożywkę z martwymi, pływającymi komórkami zmieniono na świeże medium hodowlane. Początkowe stężenie G-418 dla komórek transfekowanych plazmidami wynosiło 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i było stopniowo zwiększane do wartości 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Po uzyskaniu puli komórek PC12 ze stabilną nadekspresją parkiny lub kontrolnych przeprowadzono selekcję klonalną. Poszczególne klony namnożono i zamrożono w pożywce hodowlanej z dodatkiem 10% DMSO. Ekspresję parkiny w komórkach PC12 analizowano za pomocą metody Western blot przy użyciu specyficznych przeciwciał.

9.3.3. Komórki PC12 z częściowym wyciszeniem parkiny

Komórki PC12 z częściowym wyciszeniem (ang. knock-down) genu *Prkn* kodującego szczurze białko parkinę oraz komórki PC12 linii kontrolnej uzyskano przez zastosowanie mieszaniny krótkich interferujących RNA (siRNA - small interfering RNA). Użyta mieszanina siRNA jest komplementarna do sekwencji mRNA genu kodującego białko parkinę.

9.3.3.1. Transfekcja komórek PC12 z zastosowaniem siRNA

Komórki PC12 wysiewano na płytkę 24-dołkową w gęstości 1×10^5 komórek na dołek lub na płytkę 96-dołkową w gęstości 5×10^4 na dołek. Następnie odczynnik do transfekcji Lipofectamine RNAiMAX (13778-150; Invitrogen) oraz siRNA dla genu

kodującego parkinę (ON-TARGETplus Rat *Prkn* (56816) siRNA - L-090709-02; Dharmacon) lub siRNA kontrolne (ON-TARGETplus Non-targeting Pool - D-001810-10-05; Dharmacon) rozcieńczano w pożywce Optimem+GlutaMAX (51985-026; Gibco) odpowiednio, w stosunku 1:3 i 1:50. Komórki transfekowano roztworem Lipofectamine RNAiMAX w pożywce Optimem+GlutaMAX oraz roztworem siRNA w pożywce Optimem+GlutaMAX, w stosunku 1:1. Kontrolą dla obu układów badawczych były komórki traktowane roztworem Lipofectamine RNAiMAX w pożywce Optimem+GlutaMAX bez siRNA (ang. *vehicle* - *veh*). Końcowe stężenie siRNA wynosiło 20 nM, 40 nM lub 60 nM. Ekspresję parkiny analizowano po 48 godz. z zastosowaniem metody qRT-PCR oraz Western blot.

9.3.4. Komórki PC12 z przejściową nadekspresją białek ro1GFP, pRA306 oraz pRA304

9.3.4.1. Komórki PC12 z przejściową nadekspresją białek ro1GFP oraz pRA306

W celu analizy potencjału oksydoredukcyjnego komórek i mitochondriów, komórki PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddano transfekcji plazmidem pEGFP-N1 zawierającym gen reporterowy kodujący wrażliwe na warunki oksydoredukcyjne cytoplazmatyczne białko zielonej fluorescencji ro1GFP (ang. redox sensitive 1 green fluorescent protein) lub gen reporterowy kodujący białko ro1GFP posiadające sekwencję lokalizacji mitochondrialnej (pRA306).

Białka te charakteryzują się przyjmowaniem odmiennej konformacji w zależności od potencjału oksydoredukcyjnego środowiska. W warunkach zwiększonej oksydacji środowiska chromofor ulega protonacji, co skutkuje wytworzeniem się wiązania disiarczkowego i przyjmowaniem struktury przestrzennej, która jest pobudzana przez falę o długości $\lambda = 375$ nm. W środowisku redukującym nie dochodzi do protonacji chromoforu i tworzenia się wiązania disiarczkowego, wobec czego wzbudzenie białka następuje przy długości fali $\lambda = 500$ nm. Wobec powyższego, stosunek fluorescencji 375/500 nm wskazuje na zmiany potencjału oksydoredukcyjnego środowiska.

- Sekwencja aminokwasowa genu kodującego białko ro1GFP:

1	-	MVSKGEELFT	GVVPILVELD	GDVNGHKFSV	SGEGEGDATY	-	40
41	-	GKLTTLKFIST	TGKLPVPWPT	LVTTLSYGVQ	CFSRYPDHMK	-	80
81	-	QHDFFKSAMP	EGYVQERTIF	FKDDGNYKTR	AEVKFEGDTL	-	120
121	-	VNRIELKGID	FKEDGNILGH	KLEYNYNCHN	VYIMADKQKN	-	160
161	-	GIKVNFKIRH	NIEDGSVQLA	DHYQQNTPIG	DGPVLLPDNH	-	200
201	-	YLSTCSALSK	DPNEKRDHMV	LLEFVTAAGI	TLGMDELYK	-	239

- Sekwencja aminokwasowa genu kodującego białko pRA306 wraz z sekwencją mitochondrialną:

1	-	<u>MRKMLAAVSR</u>	<u>VLSGASQKPA</u>	<u>SRVLVASRNF</u>	<u>ANDATFLMVS</u>	-	40
41	-	KGEELFTGVV	PILVELDGDV	NGHKFSVSGE	GEGDATYGKL	-	80
81	-	TLKFISTTGK	LPVPWPTLVT	TLSYGVQCFS	RYPDHMKQHD	-	120
121	-	FFKSAMPEGY	VQERTIFFKD	DGNYKTRAEV	KFEGDTLVNR	-	160
161	-	IELKGIDFKE	DGNILGHKLE	YNYNCHNVYI	MADKQKNGIK	-	200
201	-	VNFKIRHNIE	DGSVQLADHY	QQNTPIGDGP	VLLPDNHYLS	-	240
241	-	TCSALSKDPN	EKRDMVLE	FVTAAGITLG	MDELYK	-	276

9.3.4.2. Komórki PC12 z przejściową nadekspresją białka pRA304

W celu analizy mitochondrialnego pH, komórki PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddano transfekcji plazmidem pEGFP-N1 zawierającym gen reporterowy kodujący wrażliwe na pH białko zielonej fluorescencji (pRA304). Białko to charakteryzuje się mitochondrialną lokalizacją oraz przyjmowaniem odmiennej konformacji w zależności

od pH środowiska. W środowisku o wysokim pH dochodzi do rearanżacji strukturalnych białka, tworzy się sieć wiązań wodorowych między resztą Y145 oraz S147 białka a chromoforem, co wspomaga jego protonację i skutkuje emitowaniem zielonej fluorescencji o długości fali $\lambda = 515$ nm. W warunkach obniżonego pH mitochondrialnego struktura białka nie tworzy sieci wiązań wodorowych, które mogłyby wspierać transfer protonu z chromoforu na akceptor, w związku z czym dochodzi do emisji niebieskiej fluorescencji o długości fali $\lambda = 460$ nm. Wzrost emisji niebieskiej fluorescencji w porównaniu do kontroli koreluje z alkalizacją środowiska.

- Sekwencja aminokwasowa genu kodującego białko pRA304 wraz z sekwencją mitochondrialną:

1	-	<u>MRKMLAAVSR</u>	<u>VLSGASQKPA</u>	<u>SRVLVASRNF</u>	<u>ANDATFLMVS</u>	-	40
41	-	KGEELFTGVV	PILVELDGDV	NGHKFSVSGE	GEGDATYGKL	-	80
81	-	TLKFICTTGK	LPVPWPTLVT	TLTYGVQCFS	RYPDHMKQHD	-	120
121	-	FFKSAMPEGY	VQERTIFFKD	DGNYKTRAEV	KFEGDTLVNR	-	160
161	-	IELKGIDFKE	DGNILGHKLE	YNYNSDNVYI	MADKQKNGIK	-	200
201	-	VNFKIRHNIE	DGSVQLADHY	QQNTPIGDGP	VLLPDNHYLS	-	240
241	-	TQSALSKDPN	EKRDHMVLE	FVTAAGITLG	MDELYK	-	276

9.3.4.3. Transfekcja komórek PC12 metodą elektroporacji

Komórki PC12 transfekowano plazmidem pEGFP-N1 z genem kodującym jedno z białek ro1GFP, pRA306, pRA304 lub pustym plazmidem z wykorzystaniem elektroporatora Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) oraz kompatybilnego z elektroporatorem zestawu odczynników (Thermo Fisher Scientific, MPK5000).

Komórki PC12 o gęstości 5×10^6 umieszczono w kuwecie do elektroporacji w buforze rozcieńczającym w objętości 0,1 ml, a następnie dodano 30 μ g DNA (pEGFP-N1+ro1GFP; pEGFP-N1+pRA306; pEGFP-N1+pRA304 lub pEGFP-N1). Elektroporację prowadzono w kuwetach stosując napięcie 1200 V i 1 puls długości 20 ms. Zawartość kuwety

przeniesiono do 10 ml ogrzanej pożywki hodowlanej bez antybiotyków i wysiano na odpowiednie szalki w zależności od typu eksperymentu. Po wysianiu komórki umieszczono w inkubatorze w 37 °C i 5% CO₂. Następnego dnia po transfekcji odciągnięto pożywkę z martwymi komórkami i dodano świeżą pożywkę hodowlaną z antybiotykiem G-418 (100 µg/ml). Następnie komórki PC12 z nadekspresją białek ro1GFP, pRA306, pRA304 analizowano za pomocą metod spektrofluorymetrycznych i mikroskopowych.

9.3.5. Warunki hodowli komórek PC12 i izolacja mitochondriów

9.3.5.1 Hodowla i traktowanie komórek PC12

Hodowlę komórek prowadzono w sterylnych jednorazowych plastikowych szalkach lub płytkach w inkubatorze w temperaturze 37 °C, w atmosferze nasyconej parą wodną i zawierającej 5% CO₂.

Komórki hodowane były w standardowej pożywce DMEM (ang. Dulbecco Modified Eagle Medium, Merck) z dodatkiem inaktywowanych w 56 °C surowic: płodowej cielęcej (ang. fetal calf serum - FCS, 10%) oraz końskiej (ang. horse serum - HS, 5%), 2 mM glutaminy, penicyliny (50 jednostek/ml) oraz streptomycyny (50 µg/ml). Komórki PC12 ze stabilną nadekspresją parkiny oraz komórki kontrolne hodowane były w pożywce z dodatkiem G-418 (100 µg/ml).

Do momentu rozpoczęcia eksperymentu komórki pasażowano co 4 dni. Przy pasażowaniu komórek stosowano 0,25% roztwór trypsyny z 0,02% EDTA (Merck). W 24 godz. po wysianiu komórek, medium hodowlane wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy (2% FCS, 2 mM glutamina, penicylina (50 jednostek/ml) oraz streptomycyna (50 µg/ml)) lub roztwór Hanks'a (ang. Hanks' balanced salt solution - HBSS) (CaCl₂ – 0,185 g/l, MgSO₄ – 0,09767 g/l, KCl – 0,4 g/l, KH₂PO₄ – 0,06 g/l, NaHCO₃ – 0,35 g/l, NaCl – 8,0 g/l, Na₂HPO₄ – 0,04788 g/l, D-Glukoza – 1,0 g/l). Następnie komórki traktowano α-syn, NAC, NNLA, CCCP i inkubowano przez określony czas w 37 °C.

Bank komórek przechowywano w ciekłym azocie, w pożywce o składzie: FCS (50%), DMEM (40%) oraz DMSO (10%).

Morfologię komórek w trakcie hodowli i podczas eksperymentu obserwowano w mikroskopie świetlnym Olympus CKX41.

9.3.5.2. Izolacja mitochondriów

Izolację mitochondriów przeprowadzono według Rhein i wsp. (2009) z modyfikacjami.

Komórki PC12 wysiewano w gęstości 1×10^6 komórek na szalki o średnicy 6 cm. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy i dodawano badane związki na 24 godz. Po tym czasie komórki inkubowano 15 min. w zimnym buforze lizującym (75 mM NaCl, 1 mM NaH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , 250 mM sacharoza, 1 mM PMSF, 0,05% Triton X-100, inhibitory proteaz Complete (Roche Diagnostics)), a następnie homogenizowano w szklanym homogenizatorze. Uzyskany homogenat wirowano przez 10 min. ($800 \times g$, 4°C). Nadsącz wirowano przez 15 min. ($20\,000 \times g$, 4°C). Nadsącz usuwano, a osad zawierający mitochondria rozpuszczono w zimnym buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) (140 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) i użyto do dalszych analiz.

9.4. Metody spektrofotometryczne

9.4.1. Oznaczanie zawartości białka w ekstrakcie komórkowym

Zawartość białka w ekstraktach komórkowych oznaczano metodą Lowry'ego przy użyciu fenolowego odczynnika Folina (Lowry i wsp., 1951) lub z zastosowaniem metody Bradforda (Bradford, 1976).

9.4.2. Analiza przeżywalności komórek za pomocą testu MTT

Przeżywalność badano w oparciu o zachodzącą w aktywnych metabolicznie komórkach reakcję przekształcenia soli tetrazoliowych (bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowego - MTT) o zabarwieniu żółtym do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu o zabarwieniu fioletowym. Otrzymane kryształy są rozpuszczalne w DMSO. Liczba żywych komórek w badanym materiale jest wprost proporcjonalna do intensywności zabarwienia otrzymanego roztworu, co pozwala na specyficzną analizę przeżywalności komórek (Berridge i wsp., 2005).

Komórki PC12 wysiewano na szalki 96-dołkowe pokryte kolagenem. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy i dodawano badane związki. Po 48 godz. do pożywki dodawano MTT (0,25 mg/ml) i inkubowano przez 2 godz. w 37 °C. Następnie usuwano pożywkę, a komórki rozpuszczano w DMSO. Absorbancję badano przy użyciu spektrofotometru FLUOstar Omega (BMG LABTECH) przy długości fali $\lambda = 595$ nm.

9.5. Metody spektrofluorymetryczne

9.5.1. Ocena oligomeryzacji/agregacji α -synukleiny w obecności fluorescencyjnego barwnika Tioflawiny-T (test tioflawinowy)

Półilościową ocenę procesu oligomeryzacji/agregacji α -Syn badano w oparciu o reakcję barwnika Tioflawiny-T (ang. Thioflavin T - Th-T), którego intensywność fluorescencji wzrasta po związaniu ze strukturami β -kardki białek amyloidogennych (Khurana i wsp., 2005).

Roztwory monomerów, oligomerów i agregatów α -syn (10 μ l) mieszano z Th-T (3 μ M) w 50 mM buforze fosforanowym (pH 6,0) w końcowej objętości 300 μ l i inkubowano przez 5 min w RT chroniąc przed światłem. Fluorescencję związaną ze strukturami β -kardki białka Th-T badano przy użyciu spektrofluorymetru FLUOstar Omega (BMG LABTECH) przy długości fali pobudzenia $\lambda = 450$ nm i emisji $\lambda = 482$ nm.

9.5.2. Pomiar poziomu jonów wapnia w cytosolu komórek przy użyciu sondy fluorescencyjnej FLUO-4 AM

Poziom jonów Ca^{2+} w cytosolu komórek badano w oparciu o reakcję przekształcenia estru acetoksymetylowego FLUO-4 (FLUO-4 AM, Invitrogen), na skutek wewnątrzkomórkowej deacetylacji, do FLUO-4 - związku, który wykazuje fluorescencję po związaniu jonów Ca^{2+} (Li i wsp., 2003).

Komórki PC12 wysiewano na szalki 96-dołkowe pokryte polietylenoiminą (PEI) w gęstości 1×10^5 komórek na dołek. Następnego dnia pożywkę wymieniało na bufor HBSS i przez 1 godz. inkubowano komórki w 37 °C z FLUO-4 AM (10 μ M). Następnie komórki płukano 3-krotnie buforem HBSS i inkubowano kolejne 30 min. w 37 °C w celu całkowitej de-estryfikacji sondy. Po tym czasie komórki ponownie płukano HBSS i dodawano badane związki. Fluorescencję FLUO-4 mierzono przez 6 min. co 15 sek. przy użyciu spektrofluorymetru FLUOstar Omega (BMG LABTECH) przy długości fali pobudzenia $\lambda = 488$ nm i emisji $\lambda = 530$ nm.

9.5.3. Pomiar poziomu tlenu azotu w komórkach przy użyciu sondy fluorescencyjnej DAF-2 DA

Poziom NO badano w oparciu o reakcję przekształcenia 4',5' - dioctanu diaminofluoresceiny (DAF-2 DA), na skutek wewnątrzkomórkowej deestryfikacji, do diaminofluoresceiny (DAF-2), która następnie jest utleniana przez NO do fluorescencyjnego triazolu 4',5'-diaminofluoresceiny (DAF-2T) (Kojima i wsp., 1998).

Komórki PC12 wysiewano na szalki 96-dołkowe pokryte PEI w gęstości 1×10^5 komórek na dołek. Następnego dnia pożywkę wymieniano na bufor HBSS i przez 20 min. w 37 °C inkubowano komórki z DAF-2 DA (5 μ M; Cayman Chemical Company). Następnie komórki płukano 3-krotnie buforem HBSS i dodawano badane związki. Fluorescencję DAF-2T mierzono po 8 i 24 godz. od traktowania badanymi związkami przy użyciu spektrofluorymetru FLUOstar Omega (BMG LABTECH) przy długości fali pobudzenia $\lambda = 488$ nm i emisji $\lambda = 530$ nm.

9.5.4. Pomiar poziomu wolnych rodników tlenowych w komórkach przy użyciu sondy fluorescencyjnej H₂DCF-DA

Poziom wolnych rodników tlenowych badano w oparciu o reakcję przekształcenia dioctanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCF-DA), na skutek wewnątrzkomórkowej deacetylacji, do 2',7'- dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCF), która następnie jest utleniana przez wolne rodniki tlenowe do fluorescencyjnej 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCF). Test ten pozwala analizować wewnątrzkomórkowy poziom wolnych rodników tlenowych (Pavelescu, 2015).

Komórki PC12 wysiewano na szalki 96-dołkowe pokryte PEI w gęstości 1×10^5 komórek na dołek. Następnego dnia pożywkę wymieniano na bufor HBSS i przez 50 min. w 37 °C inkubowano komórki z H₂DCF-DA (10 μ M; Merck). Następnie komórki płukano 3-krotnie buforem HBSS i dodawano badane związki. Fluorescencję DCF mierzono po 8 i 24 godz. od traktowania przy użyciu spektrofluorymetru FLUOstar Omega (BMG LABTECH) przy długości fali pobudzenia $\lambda = 488$ nm i emisji $\lambda = 530$ nm.

9.5.5. Pomiar poziomu mitochondrialnego rodnika ponadtlenkowego w komórkach przy użyciu sondy fluorescencyjnej MitoSOX

Poziom mitochondrialnego rodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) badano w oparciu o reakcję utleniania sondy MitoSOX (Invitrogen) przez $O_2^{\cdot-}$ (Kauffman i wsp., 2016).

Komórki PC12 wysiewano na szalki 96-dółkowe pokryte PEI w gęstości 1×10^5 komórek na dółek. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy i dodawano badane związki. Po 24-godzinnej inkubacji, pożywkę wymieniano na bufor HBSS i przez 10 min w $37^\circ C$ inkubowano komórki z MitoSOX ($2,5 \mu M$). Następnie komórki płukano 3-krotnie buforem HBSS. Fluorescencję MitoSOX badano przy użyciu spektrofluorymetru Infinite M1000 Pro (Tecan) przy długości fali pobudzenia $\lambda = 510$ nm i emisji $\lambda = 580$ nm.

9.5.6. Pomiar zmian mitochondrialnego potencjału błonowego

Mitochondrialny potencjał błonowy badano w oparciu o reakcję agregacji lipofilnego barwnika karbocyjaninowego, jodku 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazokarbocyjaniny (JC-1, Life Technologies). Selektywne nagromadzenie JC-1 w mitochondriach zależne jest od potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$). W przypadku wysokiego potencjału $\Delta\Psi_m$ barwnik JC-1 tworzy agregaty emitujące fluorescencję czerwoną ($\lambda_{ex} = 535$ nm, $\lambda_{em} = 580$ nm). Gdy dochodzi do depolaryzacji błony mitochondrialnej (spadku potencjału $\Delta\Psi_m$) barwnik ten na skutek translokacji do cytoplazmy przechodzi w formę monomeryczną, emitując fluorescencję zieloną ($\lambda_{ex} = 485$ nm, $\lambda_{em} = 530$ nm). Przejście JC-1 z postaci zagregowanej do monomerycznej wiąże się z przesunięciami w jego widmie fluorescencyjnym oraz ze zmianą fluorescencji czerwonej na zieloną. Te cechy sprawiają, że JC-1 jest czułym markerem zmian potencjału błony mitochondrialnej, a pomiar stosunku fluorescencji agregatów do monomerów, wygodnym i niezawodnym sposobem do oceny zmian potencjału błony mitochondrialnej w komórkach (Nuydens i wsp., 1999). Stosunek fluorescencji agregatów ($\lambda_{em} = 580$ nm) i monomerów ($\lambda_{em} = 530$ nm) odzwierciedla poziom uszkodzenia błon mitochondriów komórek.

Komórki PC12 wysiewano w ilości 1×10^6 komórek na szalki o średnicy 6 cm. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy

i dodawano badane związki. Kontrolą pozytywną były komórki traktowane CCCP (50 μ M) przez 15 min. (CCCP powoduje odseparowanie procesu utleniania w łańcuchu oddechowym od fosforylacji, wskutek tego oddychanie przebiega w sposób niekontrolowany, co prowadzi do spadku mitochondrialnego potencjału błonowego). Analizę poziomu mitochondrialnego potencjału błonowego prowadzono w cytometrze przepływowym FACSCantoII (Becton Dickinson) z zastosowaniem komercyjnego zestawu BD™ MitoScreen. W celu rozdzielania nakładających się na siebie widm fluorescencji dla agregatów i monomerów JC-1, przed każdym eksperymentem dokonano kompensacji dla kanałów FL-1 i FL-2 przy pomocy kulek kalibrujących CaliBRITE™ (BD; 349502). Po odpowiednim czasie komórki odrywano od podłoża z zastosowaniem akutazy i wirowano (400 \times g, 5 min., RT). Następnie osad komórek przepłukiwano PBS i ponownie wirowano (400 \times g, 5 min., RT). Do osadu komórek dodawano barwnik JC-1 i inkubowano przez 15 min w 37 °C. Następnie komórki 3-krotnie wirowano (400 \times g, 5 min., RT) i płukano buforem załączonym do zestawu.

9.5.7. Analiza ilości mitochondriów w komórkach przy użyciu barwnika MitoTracker Green

Ilość mitochondriów badano w oparciu o selektywną, niezależną od potencjału mitochondrialnego interakcję barwnika MitoTracker Green (Thermo Fischer Scientific) z mitochondriami.

Komórki PC12 wysiewano w ilości 2 \times 10⁵ komórek na szalki o średnicy 6 cm. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy i dodawano badane związki na 8, 24 lub 48 godz. Po odpowiednim czasie komórki odrywano od podłoża z zastosowaniem akutazy i wirowano (400 \times g, 5 min., RT). Osad komórek przepłukiwano buforem HBSS i ponownie wirowano (400 \times g, 5 min., RT). Komórki zawieszono w buforze HBSS z barwnikiem MitoTracker Green (100 nM) i inkubowano przez 45 min w 37 °C. Następnie komórki 3-krotnie płukano w buforze HBSS i wirowano (400 \times g, 5 min., RT). Analizę ilości mitochondriów prowadzono w cytometrze przepływowym FACSCantoII (Becton Dickinson).

9.6. Metody luminescencyjne

9.6.1. Pomiar poziomu wewnątrzkomórkowego ATP z zastosowaniem metody luminescencyjnej

Poziom wewnątrzkomórkowego ATP badano z zastosowaniem komercyjnego zestawu do oznaczeń metodą luminescencyjną (Via Light Plus Kit LT07-221, Lonza), w oparciu o emisję światła jako produktu reakcji przeprowadzanej przez rekombinowaną lucyferazę w obecności substratów D-lucyferyny, tlenu i ATP (Crouch i wsp., 1993).

Komórki PC12 wysiewano na szalki 96-dółkowe pokryte PEI w gęstości 1×10^5 komórek na dołek. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy i dodawano badane związki. Komórki poddawano lizie z zastosowaniem dołączonego do zestawu buforu lizującego i inkubowano 10 min. chroniąc przed światłem. Następnie, do każdego dołka dodawano odczynnik zawierający lucyferazę oraz lucyferynę i inkubowano 5 min. w ciemności. Bioluminescencję mierzono przy użyciu spektrofluorymetru FLUOstar Omega (BMG LABTECH) przy długości fali emisji $\lambda = 560$ nm.

9.7. Metody immunochemiczne

9.7.1. Przygotowanie materiału komórkowego do oznaczeń immunochemicznych

Komórki na szalkach o średnicy 3,5 bądź 6 cm płukano 2-krotnie za pomocą PBS, zawieszano w buforze Tris-HCl (pH 7,4) zawierającym inhibitory proteaz Complete (Roche Diagnostics GmbH), zeskrobywano z szalek i sonifikowano. Homogenat komórkowy odwirowywano przy $14\ 000 \times g$ przez 10 min w 4 °C. W uzyskanym nadsądczu oznaczano zawartość białka, mieszano z buforem denaturująco-obciążającym Laemmli'ego (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 20% glicerol, 2% SDS, 100 mM DTT, 0,2 mM błękit bromofenolu) i ogrzewano przez 5 min w temp. 95 °C. Homogenat komórkowy przechowywano w -20 °C i używano do oznaczeń immunochemicznych.

9.7.2. Koimmunoprecypitacja parkiny

Komórki PC12 wysiewano w gęstości 2×10^6 komórek na szalkę o średnicy 6 cm. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy i dodawano badane związki. Po 24 godz. komórki przemywano 3-krotnie sterylnym PBS i poddawano lizie z zastosowaniem buforu do koimmunoprecypitacji (50 mM Tris-HCl (pH 7,4); 0,25 M NaCl; 10 mM Benzamidyna; 0,1% v/v Nonidet P-40 (NP-40); 5 mM EDTA; 50 mM NaF; 1 mM Na_3VO_4 ; 1 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 50 µg/ml PMSF; 10 µg/ml TPCK; 10 µg/ml STI; 1 µg/ml aprotynina; 1 µg/ml leupeptyna). Poziom białka badano z zastosowaniem metody Bradforda. W celu wstępnego oczyszczenia prób z białek niespecyficznie wiążących się z kulkami, próbki mieszano z kulkami magnetycznymi Dynabeads (Life Technologies) przez 60 min w 4 °C. W celu immunoprecypitacji (ang. immunoprecipitation - IP) parkiny równą ilość białka z każdej próbki mieszano z kulkami magnetycznymi opłaszczonymi mysimi monoklonalnymi przeciwciałami przeciwko parkinie (2 µg/ml; Santa Cruz) w 4 °C. Po godz. magnetyczne kulki ze związaną parkiną 3-krotnie przemywano buforem do koimmunoprecypitacji, a następnie mieszano z buforem Laemmli'ego i denaturowano przez 5 min. w temp. 95 °C. Białka rozdzielano z zastosowaniem żeli poliakrylamidowych oraz elektroforezy denaturującej. Białka przenoszono z zastosowaniem transferu mokrego (1-2,5 godz., 50 V) na membranę nitrocelulozową (GE Healthcare). Po transferze białka barwiono za pomocą roztworu Ponceau

S i oznaczano ich immunoreaktywność metodą Western blot. Tabela I określa szczegółowe warunki reakcji immunochemicznej dla poszczególnych białek.

9.7.3. Oznaczanie autoubikwitynacji parkiny *ex vivo*

Aktywność parkiny jako ligazy ubikwitynowej E3 badano poprzez pomiar poziomu jej autoubikwitynacji według Yao i wsp. (2004) z modyfikacjami.

W tym celu po immunoprecypitacji parkiny (patrz punkt 9.7.2.) przeprowadzono reakcję enzymatyczną w 50 μ l buforu zawierającego 2 mM ATP, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM MgCl₂, 0,02 mg/ml ubikwityny oraz enzymy: Ube1 (5 nM) i UbcH4 (100 nM). Reakcję rozpoczęto przez dodanie kulek magnetycznych ze związaną parkiną i następnie po 30 min. inkubacji w 37 °C, reakcję zatrzymano poprzez dodanie 50 μ l 2-krotnie skoncentrowanego buforu Laemmli'ego i 5 min. denaturację w 95 °C. Za pomocą statywu z magnesem oddzielono kulki magnetyczne od lizatu białkowego, który następnie poddano analizie z zastosowaniem elektroforezy SDS-PAGE i metody Western blot. Tabela I określa szczegółowe warunki reakcji immunochemicznej dla poszczególnych białek.

9.7.4. Analiza S-nitrozylacji parkiny z zastosowaniem techniki podstawienia biotynowego

Technika podstawienia biotynowego służy do analizy S-nitrozylacji białek. Ta kilkuetapowa procedura wymaga metylacji niezmodyfikowanych grup tiolowych za pomocą S-metylometaanotiosiarczanu (ang. methyl methanethiosulfonate - MMTS), przekształcenia S-nitrozotiole w wolne grupy tiolowe dzięki zastosowaniu askorbinianu sodu oraz przyłączenia cząsteczki biotyny do nitrozylowanych reszt cysteinowych i ich detekcji na drodze chemiluminescencji (Jaffrey i Snyder, 2001).

Komórki PC12 wysiewano w gęstości 2×10^6 komórek na szalkę o średnicy 6 cm. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy i dodawano badane związki. Po 24 godz. komórki homogenizowano w buforze HEN (250 mM HEPES (pH 7,7); 1 mM EDTA; 0,1 mM neokuproina) i oznaczano poziom białka z zastosowaniem metody Bradforda. W celu ochrony przed zależną od światła degradacją nitrozotiole, dalszą preparatykę wykonywano w zaciemnionym miejscu. Do lizatów

białkowych dodano buforu blokującego wolne grupy tiolowe (20 mM MMTS w buforze HENS (250 mM HEN, 5% SDS) i inkubowano 20 min. w 50 °C, często mieszając. Następnie, białka wytrącono z użyciem acetonu i ponownie zawieszono w buforze HEN z 2,5% SDS. Każdą próbkę z wytrąconym białkiem podzielono na dwie równe porcje. Jedną część inkubowano ze świeżo przygotowanym askorbinianem sodu (5 mM) oraz biotyną-HPDP (5 µM). Drugą część inkubowano wyłącznie z biotyną-HPDP. Próbkę inkubowano przez 1 godz. w ciemności w RT. Następnie, białka wytrącano, ponownie zawieszano w tej samej objętości mieszaniny buforu HENS i 20 mM buforu Hepes (pH 7,7) z 100 mM NaCl oraz 1 mM EDTA, w stosunku 1:2 i inkubowano przez 1 godz. w RT z 50 µl agarozy z neutrawidyną (Pierce). Złóże przemywano 5-krotnie z użyciem buforu neutralizującego (20 mM Hepes (pH 7,7), 600 mM NaCl, 1 mM EDTA) i inkubowano przez 20 min. z buforem elucyjnym (50 mM DTT, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA) w RT. Do zebranego eluatu dodano buforu Laemmli'ego i przeprowadzono elektroforezę SDS-PAGE. Po transferze białka barwiono za pomocą roztworu Ponceau S i oznaczano immunoreaktywność parkiny metodą Western blot. W Tabeli I przedstawiono szczegółowe warunki reakcji immunochemicznej dla parkiny.

9.7.5. Immunochemiczna detekcja białek metodą Western blot

Immunochemiczną metodą Western blot oznaczano poziom: α -Syn, parkiny, S-nitrozo-cysteiny, nitrotyrozyny, mTOR, p-mTOR (S2448), ULK1, p-ULK1 (S555), TOM20, ubikwityny, PGC-1 α , Drp-1, Opa-1, Mfn-1, Mfn-2, PDI, β -aktyny oraz GAPDH.

Monomery i oligomery α -Syn (0,5-5 µg białka) rozdzielano na żelu niedenaturującym za pomocą elektroforezy natywnej. Natomiast homogenat komórkowy (20, 40 lub 60 µg białka) rozdzielano na żelu poliakrylamidowym z zastosowaniem elektroforezy denaturującej. α -Syn lub białka homogenatu komórkowego przenoszono na membranę nitrocelulozową (GE Healthcare) z zastosowaniem transferu mokrego (1,5-2,5 godz., 50 V). Po transferze białka barwiono za pomocą roztworu Ponceau S. Tabela I określa szczegółowe warunki reakcji immunochemicznej dla poszczególnych białek. Membrany płukano w odpowiednim buforze, a następnie w celu zablokowania niespecyficznego wiązania się przeciwciał inkubowano w roztworze odłuszczonego mleka lub BSA (Merck) w RT przez 60 min. Następnie membrany inkubowano przez noc w 4 °C w roztworze przeciwciała I-rzędowego. Po 3-krotnym płukaniu membran w odpowiednim buforze (10 min., RT), membrany

inkubowano w roztworze przeciwciała II-rzędowego sprzężonego z peroksydazą chrzanową (60 min., RT). Niezwiązane specyficznie przeciwciała usuwano 3-krotnie płuczając membrany w odpowiednim buforze (10 min., RT). Membrany poddawano reakcji chemiluminescencyjnej przy użyciu zestawu ECL (Amersham Pharmacia Biotech) i wizualizowano naświetlając światłoczuły film (Hyperfilm-Kodak, Merck). Klisze poddawano analizie densytometrycznej przy pomocy oprogramowania TotalLab v1.11 (Non Linear Dynamics).

Membrany wykorzystane uprzednio inkubowano w roztworze 1% SDS i 50 mM glicyny-HCl (pH 2,0) (30 min., RT) w celu usunięcia związanych przeciwciał i płukano 3-krotnie w 0,1% TBST (15 min., RT), po czym używano do kolejnych oznaczeń immunochemicznych.

Tabela I Warunki reakcji immunochemicznej dla poszczególnych białek.

Białko	Gęstość żelu	Bufory	Warunki blokujące	Rozcieńczenie i warunki inkubacji przeciwciała I-rzędowego	Rozcieńczenie i warunki inkubacji przeciwciała II-rzędowego
α -Syn	15%	0,1% PBST, 0,3% PBST oraz PBS	5% mleko w 0,3% PBST (1 godz., RT)	Królicze przeciwciała anty- α -synuclein 1% BSA w 0,1% PBST (noc, 4 °C) (1:1000) Merck S3062	Przeciwciała anty-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 1% BSA w 0,1% PBST (2 godz., RT) (1:8000) Merck A0545
parkina	10%	0,1% TBST oraz TBS	5% BSA w 0,1% TBST (1 godz., RT)	Mysie przeciwciała anty-parkin 1% BSA w 0,1% TBST (noc, 4 °C) (1:1000) Santa Cruz Sc-32282	Przeciwciała anty-mysie sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% mleko w 0,1% TBST (2 godz., RT) (1:2000) Amersham Biosciences GENXA931
			5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT)	Królicze przeciwciała anty-parkin 0,1% TBST (noc, 4 °C) (1:500) Cell Signaling 2132	Przeciwciała anty-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% mleko w 0,1% TBST (2 godz., RT) (1:4000) Merck A0545
S-nitrozo- cysteina	10%	0,1% TBST oraz TBS	5% BSA w 0,1% TBST (1 godz., RT)	Królicze przeciwciała anty-S-nitroso- cysteine (SNO-Cys) 0,1% TBST (noc, 4 °C) (1:2000) Merck N5411	Przeciwciała anty-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% mleko w 0,1% TBST (2 godz., RT) (1:8000) Merck A0545

Materiały i metody

nitro tyrozyna	10%	0,1% TBST oraz TBS	1% BSA w 0,1% TBST (1 godz., RT)	Mysie przeciwciało anti-nitrotyrosine 0,1% TBST (noc, 4 °C) (1:400) Santa Cruz Sc-32757	Przeciwciało anti-mysie sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT) (1:4000) Amersham Biosciences GENXA931
ubikwityna	15%	0,1% TBST oraz TBS	5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT)	Królicze przeciwciało anti-ubiquitin TBST (noc, 4 °C) (1:500) Millipore 07-375	Przeciwciało anti-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% mleko w 0,1% TBST (2 godz., RT) (1:4000) Merck A0545
GAPDH	15% lub 10%	0,1% TBST oraz TBS	5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT)	Królicze przeciwciało anti-GAPDH 5% mleko w 0,1% TBST (noc, 4 °C) (1:40000) Merck G9545	Przeciwciało anti-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% mleko w 0,1% TBST (2 godz., RT) (1:4000) Merck A0545
β-aktyna	15% lub 10%	0,1% TBST oraz TBS	5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT)	Mysie przeciwciało anti-β-actin 5% mleko w 0,1% TBST (noc, 4 °C) (1:1000) MP Biomedicals 0869100	Przeciwciało anti-mysie sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT) (1:4000) Amersham Biosciences GENXA931
PGC-1 α	10%	0,1% TBST oraz TBS	5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT)	Królicze przeciwciało anti-PGC-1 α 5% mleko w 0,1% TBST (noc, 4 °C) (1:1000) Santa Cruz sc-13067	Przeciwciało anti-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% mleko w 0,1% TBST (2 godz., RT) (1:8000) Merck A0545

Drp-1	10%	0,1% TBST oraz TBS	5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT)	Królicze przeciwciało anty-Drp-1 5% mleko w 0,1% TBST (noc, 4 °C) (1:1000) Santa Cruz sc-32898	Przeciwciało anti-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% mleko w 0,1% TBST (2 godz., RT) (1:8000) Merck A0545
Opa-1	10%	0,1% TBST oraz TBS	5% BSA w 0,1% TBST (1 godz., RT)	Królicze przeciwciało anty-Opa-1 5% mleko w 0,1% TBST (noc, 4 °C) (1:1000) Santa Cruz sc-367890	Przeciwciało anti-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% mleko w 0,1% TBST (2 godz., RT) (1:8000) Merck A0545
Mfn-1	10%	0,1% TBST oraz TBS	5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT)	Królicze przeciwciało anty-Mfn-1 2,5% mleko w 0,1% TBST (noc, 4 °C 1 godz., RT) (1:500) Abcam Ab104585	Przeciwciało anti-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% mleko w 0,1% TBST (2 godz., RT) (1:4000) Merck A0545
Mfn-2	10%	0,1% TBST oraz TBS	5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT)	Królicze przeciwciało anty-Mfn-2 5% mleko w 0,1% TBST (noc, 4 °C) (1:1000) Santa Cruz sc-50331	Przeciwciało anti-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% mleko w 0,1% TBST (2 godz., RT) (1:8000) Merck A0545
PDI	15%	0,1% TBST oraz TBS	5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT)	Królicze przeciwciało anty-PDI 5% mleko w 0,1% TBST (noc, 4 °C) (1:1000) Cell Signaling C81H6	Przeciwciało anti-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% mleko w 0,1% TBST (2 godz., RT) (1:8000) Merck A0545

Materiały i metody

TOM20	15%	0,1% TBST oraz TBS	5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT)	Królicze przeciwciało anty-TOM20 5% mleko w 0,1% TBST (1:1000) (noc, 4 °C) Cell Signaling 42406	Przeciwciało anti-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT) (1:4000) Merck A0545
mTOR	10%	0,1% TBST oraz TBS	5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT)	Królicze przeciwciało anty-mTOR (1:500) 0,1% TBST (noc, RT) Cell Signaling 2983	Przeciwciało anti-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT) (1:4000) Merck A0545
p-mTOR S2448	10%	0,1% TBST oraz TBS	5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT)	Królicze przeciwciało anty-p-mTOR S2448 (1:500) 0,1% TBST (noc, RT) Cell Signaling 5536	Przeciwciało anti-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT) (1:4000) Merck A0545
ULK1	10%	0,1% TBST oraz TBS	5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT)	Królicze przeciwciało anty-ULK1 (1:200) 0,1% TBST (noc, 4 °C) Cell Signaling 8054	Przeciwciało anti-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT) (1:4000) Merck A0545
p-ULK1 S555	10%	0,1% TBST oraz TBS	5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT)	Królicze przeciwciało anty-p-ULK1 S555 (1:200) 0,1% TBST (noc, 4 °C) Cell Signaling 5869	Przeciwciało anti-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% mleko w 0,1% TBST (1 godz., RT) (1:4000) Merck A0545

TBS - 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6

0,1% TBST - 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,6

0,1% PBST - 140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,1% Tween-20, pH 7,4

0,3% PBST - 140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,3% Tween-20, pH 7,4

BSA - wolna od kwasów tłuszczowych albumina z surowicy bydłowej (ang. bovine serum albumine)

9.8. Metody chromatograficzne

9.8.1. Pomiar stężenia aminokwasów z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej

Pomiar stężenia aminokwasów prowadzono z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej według Kilpatrick (1991).

Komórki PC12 wysiewano w gęstości 2×10^6 komórek na szalkę o średnicy 6 cm. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy i dodawano badane związki. Po 24 godz. komórki zebrano w 1 ml PBS, zwirowano ($4\,000 \times g$, 5 min., RT) i zawieszono w 100 μ l 45 mM buforu fosforanowego (pH 6,2) z 10% kwaśnym metanolem. Komórki poddano sonifikacji (10 cykli po 3 sek. każdy przy ustawieniu mocy na 10%; BioLogics 150V/T), a następnie wirowaniu przez 10 min. przy $13\,000 \times g$. Zebrany nadsącz przechowywano w $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Osad zawieszono w 0,5 ml 1 M NaOH do pomiaru stężenia białka metodą Bradforda. Analizę stężenia aminokwasów w nadsączu prowadzono z zastosowaniem wysokosprawnego chromatografu ciekowego połączonego z detektorem fluorescencyjnym, a ponieważ tylko niektóre aminokwasy wykazują samoistną fluorescencję, niezbędne było zastosowanie przedkolumnowej derywatywacji próbek z mieszaniną dialdehydu ortoftalowego i merkaptoetanolu. Dialdehyd ortoftalowy łączy się z pierwszorzędowymi grupami aminowymi, dając fluorescencyjną pochodną. Próbkę poddane derywatywacji (25 μ l) wstrzykiwano do kolumny Thermo Hypersil Gold BDS C18 (150 x 4,6 mm x 5 μ) w warunkach izokratycznych używając jako faz ruchomych 50 mM buforu fosforanowego ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) zawierającego 10% (v/v) metanol (pH 6,2) (faza A) i metanolu (faza B). Stężenie aminokwasów mierzono fluorymetrycznie przy długościach fali wzbudzenia $\lambda = 340\text{ nm}$ i emisji $\lambda = 455\text{ nm}$. Pomiaru każdorazowo przeprowadzano razem z wzorcami aminokwasów, które poddawano dokładnie takim samym procedurom jak próbki badane. Na ich podstawie wyznaczano krzywą standardową, według której określano stężenie w poszczególnych próbkach. Wyniki przedstawiano w przeliczeniu na zawartość białka w danej próbce. Badania prowadzono we współpracy z Zakładem Neurotoksykologii IMDiK PAN.

9.9. Analiza poziomu ekspresji genów

9.9.1. Izolacja RNA

Całkowite RNA izolowano z komórek w warunkach sterylnych, zmodyfikowaną metodą Chomczyńskiego i Sacchi (Chomczyński oraz Sacchi, 1987), używając odczynnika TRI-reagent (Merck).

Komórki PC12 wysiewano w gęstości 2×10^6 komórek na szalkę o średnicy 6 cm. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy i dodawano badane związki. Po 24 godz. komórki płukano 2-krotnie sterylnym buforem PBS, zawieszano w 1 ml odczynnika TRI-reagent, kilkakrotnie homogenizowano za pomocą strzykawki i odstawiano na 5 min. Następnie, do 1 ml homogenatu dodawano 200 μ l chloroformu i mieszano przez 15 sek. Uzyskaną mieszaninę pozostawiano na 15 min. w RT a następnie wirowano przy obrotach $12000 \times g$ (10 min., 4 °C). Górną fazę wodną zawierającą RNA przenoszono do nowej próbówki, dodawano 500 μ l zimnego izopropanolu, delikatnie mieszano, pozostawiano na 5 min. w RT i wirowano przy obrotach $12000 \times g$ (10 min., 4 °C). Osad przemywano 3-krotnie 1 ml 75% etanolu. Po odparowaniu etanolu z próbek osad RNA zawieszano w 20 μ l wody pozbawionej RNAz (Promega Corporation). Ilość otrzymanego RNA oznaczano w aparacie NanoDrop metodą spektrofotometryczną przy długości fali $\lambda = 260$ nm. Zanieczyszczenie RNA białkami i DNA oznaczano przy długości fali $\lambda = 280$ nm. Stosunek OD260/OD280 wynosił od 1,7 do 2,0.

W celu oczyszczenia wyizolowanego RNA, do nowych próbek przenoszono 1 μ g RNA i uzupełniano odczynnikami do trawienia DNA (Merck) do 10 μ l. Po przygotowaniu, mieszaninę reakcyjną inkubowano 15 min. w RT. Następnie dodawano 1 μ l odczynnika Stop solution i dalej prowadzono inkubację (10 min., 70 °C). Po zakończeniu reakcji próbki przenoszono do lodu.

9.9.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Całkowite wyizolowane RNA (1 μ g) było matrycą dla działania odwrotnej transkryptazy, której produktem jest komplementarne DNA (cDNA). Reakcję odwrotnej transkrypcji (25 °C - 10 min.; 37 °C - 120 min.; 85 °C - 5 min.) przeprowadzono przy użyciu

zestawu odczynników firmy Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) w końcowej objętości 20 μ l.

9.9.3. Izolacja DNA

Całkowite DNA izolowano z komórek w warunkach sterylnych z zastosowaniem komercyjnego zestawu Genomic Mini (A&A biotechnology; 0517, nr. katalogowy 116).

Komórki PC12 wysiewano w gęstości 2×10^6 komórek na szalkę o średnicy 6 cm. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy i dodawano badane związki. Po 24 godz. komórki zeskrobywano z szalek i wirowano ($17000 \times g$, 5 min., RT). Osad zawieszano w 100 μ l buforu TRIS (10 mM, pH 8,5), a następnie w mieszaninie 200 μ l roztworu lizującego oraz 20 μ l Proteinyzy K. Całość mieszano przez odwracanie próbek i inkubowano przez 20 min. w 37 °C. Następnie próbki inkubowano przez 5 min. w 70 °C, intensywnie mieszano przez 20 sek. oraz wirowano 3 min. przy $17000 \times g$. Uzyskany nadsącz naniesiono na mini kolumny i wirowano 1 min. przy $17000 \times g$. Minikolumny przepłukano 500 μ l roztworu płuczającego A1 i ponownie wirowano 1 min. przy $17000 \times g$. Minikolumny przeniesiono do nowych probówek o objętości 2 ml, dodano po 400 μ l roztworu płuczającego A1 i wirowano 2 min. przy $17000 \times g$. Osuszone minikolumny przeniesiono do nowych probówek o objętości 1,5 ml. Na złoża na dnie minikolumn naniesiono po 100 μ l buforu TRIS uprzednio ogrzanego do temp. 70 °C i inkubowano próbki przez 2 min. w RT. Następnie minikolumny wirowano przez 1 min. przy $17000 \times g$. Oczyszczone DNA znajdujące się w probówkach przechowywano w -20 °C do czasu dalszych analiz.

9.9.4. Łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkryptazą (ang. reverse transcriptase PCR)

Zmiany poziomu RNA analizowano za pomocą łańcuchowej reakcji PCR z odwrotną transkryptazą (ang. reverse transcriptase PCR – RT-PCR). Na matrycy RNA przeprowadzono reakcję PCR z odwrotną transkryptazą, używając starterów dla parkiny lub GAPDH wykonanych przez firmę Eurofins. Mieszanina reakcyjna zawierała następujące składniki: 1 μ l SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix oraz 12,5 μ l 2 x stężonego buforu reakcyjnego

z zestawu SuperScript III One step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Thermo Fischer Scientific), 250 ng RNA oraz 5 pmoli starterów (forward/reverse):

1) Parkina (powielają fragment 373 par zasad):

5'-CAGCATCTTCCAGCTCAAAGG-3'

5'-GCTGTGGTAGGTGGGTTTAG-3';

2) GAPDH (powielają fragment 294 par zasad):

5'- ATGCTGGTGCTGAGTATGTC-3'

5'- TCTTCTGAGTGGCAGTGATG-3'

Każdą próbkę uzupełniano wodą do objętości 25 µl. Próbki RNA z mieszaniną reakcyjną były inkubowane w aparacie TProfessional Standard PCR Thermocycler (Core Life Sciences) w następujących warunkach:

- dla Parkiny: wstępna denaturacja (1 min., 94 °C, 1 cykl), 28 cykli amplifikacji [denaturacja (45 sek., 94 °C), asocjacja starterów (45 sek., 54 °C) i wydłużanie łańcucha (45 sek., 68 °C)] i faza końcowego wydłużania łańcucha (5 min., 68 °C).

- dla GAPDH: wstępna denaturacja (1 min., 94 °C, 1 cykl), 28 cykli amplifikacji [denaturacja (45 sek., 94 °C), asocjacja starterów (45 sek., 53 °C) i wydłużanie łańcucha (45 sek., 68 °C)] i faza końcowego wydłużania łańcucha (5 min., 68 °C).

Każdą próbkę amplifikowano w trzech powtórzeniach. Produkty PCR poddawano elektroforezie w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny w buforze TAE (40 mM Tris, 20 mM kwas octowy oraz 1 mM EDTA) przy napięciu 100 V. Poziom ekspresji genu *Prkn* badano w odniesieniu do ekspresji referencyjnego genu *Gapdh*. Obraz zapisywano przy użyciu systemu Nucleovision firmy Nucleotech, zaś analizę densytometryczną prążków przeprowadzano przy pomocy programu GelExpert 4.0.

9.9.5. Łącuchowa reakcja polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (ang. quantitative real-time PCR)

Zmiany poziomu mRNA bądź DNA analizowano za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym (ang. quantitative real-time PCR – qRT-PCR). Na matrycy cDNA uzyskanej z 1 µg RNA bądź na matrycy DNA przeprowadzono reakcję PCR w czasie rzeczywistym z zastosowaniem TaqMan Master Mix (Applied Biosystems) bądź SYBR Green Master Mix (Thermo Fischer Scientific). Reakcję prowadzono odpowiednio przy użyciu sond TaqMan dla parkiny (*Prkn* Rn00571787_m1), peroksydazy glutationowej 1 (*Gpx1* Rn00577994_g1), reduktazy tioredoksyny 1 (*Txnrd1* Rn01503798_m1), TFAM (*Tfam* Rn00580051_m1), Nrf-1 (*Nrf-1* Rn01455958_m1), GAPDH (*Gapdh* Rn01775763_g1), mitochondrialnej ATPazy (*mt-Atp6* Rn03296710_s1), β-aktyny (*Actb* Rn01412977_g1) oraz starterów (forward/reverse) dla dysmutazy ponadtlenkowej 2 (*Sod2*), GADD45b (*Gadd45b*), peroxyredoksyny 3 (*Prdx3*) oraz topoizomerazy 1 mitochondrialnej (*Top1mt*) wykonanych przez firmę Oligo.pl:

1) Sod2

5'-CGCTGGCCAAGGGAGAT-3'
5'-CCCCGCCATTGAACTTCA-3';

2) GADD45

5'-CGGGACCGGGACATCTC-3'
5'-GGCACTTCAGGGCTTTCTCTT-3';

3) Prdx3

5'-GTGGATTCCCCTTCAGTCATCT-3'
5'-GTTTCATGTGGCCCAAACCA-3';

4) Top1mt

5'-CGACTGGCAGAAGGAAATGAC-3'
5'-AGTGCCTATGGATCTCCGAGAA-3'

Zastosowano następujące warunki reakcji:

- dla sond TaqMan: 50 °C - 2 min., 95 °C - 10 min., 40 cykli amplifikacji (95 °C - 15 sek., 60 °C - 1 min.)
- dla starterów wykonanych przez firmę Oligo.pl: 50 °C - 2 min., 95 °C - 10 min., 40 cykli amplifikacji (95 °C - 15 sek., 60 °C - 1 min.) wraz z krzywą topnienia

Każdą próbkę amplifikowano w trzech powtórzeniach. Poziom mRNA lub DNA wyrażano jako względny stosunek próbki badanej do próbki referencyjnej (kalibratora), po uprzedniej normalizacji obydwu względem genu referencyjnego (*Actb* lub *Gapdh*). Względny poziom mRNA obliczono metodą $\Delta\Delta Ct$. Real-time PCR wykonywano przy pomocy aparatu ABI PRISM 7500 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems).

9.10. Metody mikroskopowe

9.10.1. Ocena morfologii α -synukleiny z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej

Przygotowanie prób do analizy prowadzono w RT. 10 μ l próbek monomerów, oligomerów i agregatów α -syn (5 μ M) nakładano na pokrytą formwarem miedzianą siatkę i inkubowano przez 1 min. Następnie, siatkę płukano 3-krotnie wodą dejonizowaną i barwiono 2% wodnym roztworem octanu uranylu przez 1 min. W celu usunięcia nadmiaru barwnika miedzianą siatkę 3-krotnie przepłukano wodą dejonizowaną i pozostawiono do wyschnięcia. Ocenę morfologii α -syn przeprowadzono przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego firmy Zeiss LEO 912AB. Analizę wykonano we współpracy z Pracownią Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

9.10.2 Analiza lokalizacji α -synukleiny w komórkach PC12 *in vitro* z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej

Komórki PC12 wysiewano w gęstości 1×10^6 komórek na szalkę o średnicy 6 cm. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy i dodawano badane związki. Po 24 godz. komórki utrwalano w mieszaninie 4% paraformaldehydu oraz 0,1% aldehydu glutarowego w 0,1 M PBS (pH 7,4) przez 2 godz. w 4 °C. Następnie komórki płukano tym samym roztworem i utrwalano w 1% czterotlenku osmu przez 1 godz. Po odwodnieniu komórki zostały zatopione w Epon 812 i pocięte na ultracienkie skrawki. Skrawki naniesiono na miedziane siatki pokryte formwarem i umieszczono w 10% roztworze nadtlenu wodoru (H_2O_2) na 10 min. Siatki płukano w PBS (30 min.), a następnie inkubowano w 5% BSA w PBS przez 10 min. W celu wyznakowania α -syn użyto monoklonalnego przeciwciała anty-alpha-synuclein (Merck) rozpuszczonego w stosunku 1:20 w PBS. Po 24 godz. materiał płukano w PBS przez 30 min., a następnie inkubowano z II-rzędowym przeciwciałem anty-króliczym skoniugowanym z koloidalnym złotem o średnicy 18 nm (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) rozpuszczonym w stosunku 1:20 w PBS. Po godzinnej inkubacji w ciemności w RT, skrawki płukano przez 15 min. odpowiednio w PBS oraz w wodzie destylowanej, a następnie wysuszono. Skrawki

barwiono przez 10 min. 4,7% wodnym roztworem octanu uranylu, a następnie cytrynianem ołowiu przez 2 min. Skrawki były analizowane i fotografowane w transmisyjnym mikroskopie elektronowym JEOL 1011 (Jeol, Tokyo, Japan). Analizę wykonano we współpracy ze Środowiskowym Laboratorium Mikroskopii Elektronowej IMDiK PAN.

9.10.3. Ocena struktury i morfologii α -synukleiny z zastosowaniem mikroskopii sił atomowych

Próbki monomerów, oligomerów i agregatów α -syn przygotowano poprzez naniesienie 1 μ l danego roztworu na powierzchnię uprzednio oczyszczonej miki (Ted Pella, Redding, CA). Po 1-minutowej inkubacji powierzchnię przemyto 3-krotnie sterylną wodą w celu usunięcia soli i białek niezwiązanych przez powierzchnię miki. Pomiary wykonano w RT z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych MultiMode™ V (Veeco Instruments, Inc., USA), wyposażonego w skaner typu E. Do obrazowania wykorzystano dźwignie krzemowe (model RTESP; Veeco Instruments, Mannheim, Niemcy). Pomiary wykonano w trybie oscylacyjnym TappingMode™, z częstotliwością skanowania wynoszącą 0,5 Hz. Zdjęcia analizowane były przy użyciu dedykowanego oprogramowania Nanoscope (Veeco Instruments, Inc., USA). Analizę wykonano we współpracy z Pracownią Elektrochemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

9.10.4. Badanie apoptozy komórek *in vitro* przy użyciu metody TUNEL z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej

Apoptozę badano z zastosowaniem komercyjnego zestawu do oznaczeń metodą TUNEL (ang. Terminal Deoksynukleotydył Transferase Mediated dUTP Nick End-Labeling) (APO Direct; BD Pharmingen). Metoda TUNEL pozwala na detekcję komórek apoptotycznych w oparciu o wyznakowanie fragmentacji DNA (Gavrieli i wsp. 1992). Zastosowanie terminalnej transferazy deoksynukleotydowej (TdT) umożliwia przyłączenie znakowanych izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) trójfosforanów deoksyurydyny (FITC-dUTP) do wolnych 3' końców jedno- lub dwuniciowych pęknięć DNA i bezpośrednią analizę przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej.

Komórki PC12 wysiewano na szalki 12-dółkowe pokryte PEI w gęstości 1×10^6 komórek na dołek. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy i dodawano badane związki. Po 48 godz. komórki płukano zimnym buforem PBS, a następnie utrwalono w metanolu (30 min., $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Utrwalone komórki inkubowano przez 3 godz. w $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ z mieszaniną wiążącą DNA (TdT (15 jednostek/dołek), 40 pM FITC-dUTP. Reakcję przerwano poprzez kilkukrotne płukanie komórek w buforze TRIS-EDTA (10 mM TRIS, 1 mM EDTA) i przemycie PBS. Jądra komórkowe wybarwiano z zastosowaniem jodku propidyny (ang. propidium iodide – PI) (PI/RNase Staining Solution (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). PI barwi wszystkie jądra komórkowe, ale tylko komórki w późnej fazie programowanej śmierci są FITC-pozytywne. Jądra komórkowe analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym Olympus IX71 i fotografowano z użyciem kamery cyfrowej Olympus U-CMAD3 zintegrowanej z mikroskopem, przy użyciu 40-krotnego powiększenia. Wynik wyrażono jako procent komórek FITC-pozytywnych (stosunek liczby komórek FITC-pozytywnych oraz PI-pozytywnych).

9.10.5. Badanie apoptozy komórek *in vitro* przy użyciu barwnika Hoechst 33342 z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej

Apoptozę badano z zastosowaniem barwnika fluorescencyjnego Hoechst 33342 (Merck), który umożliwia wizualizację charakterystycznych dla apoptozy procesów kondensacji i agregacji jądrowego DNA.

Komórki PC12 wysiewano na szalki 96-dółkowe w gęstości 1×10^5 komórek na dołek. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy i dodawano badane związki. Po 48 godz. komórki płukano zimnym buforem PBS i utrwalano w metanolu (30 min., $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Następnie, komórki płukano zimnym PBS i inkubowano z barwnikiem Hoechst 33342 o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ w PBS (30 min., RT). Wybarwione jądra analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym Olympus IX71 i fotografowano z użyciem kamery cyfrowej Olympus U-CMAD3 zintegrowanej z mikroskopem przy długości fali pobudzenia $\lambda = 340\text{ nm}$ i emisji $\lambda = 510\text{ nm}$ przy użyciu 40-krotnego powiększenia.

9.10.6. Ocena morfologii mitochondriów komórek *in vitro* z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej

Komórki PC12 z przejściową nadekspresją białka pRA306 wysiewano na szalkę 4-dołkową ze szklanym dnem w gęstości 1×10^5 komórek na dołek. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy i dodawano badane związki. Po 24 godz. komórki analizowano przy pomocy mikroskopu konfokalnego LSM 510 (Zeiss) z użyciem lasera argonowego (Ar 488 nm). Zdjęcia wykonywano przy użyciu 63-krotnego powiększenia. Przy analizie danych korzystano z programu ZEN 2011 (Zeiss). Analizę wykonano we współpracy ze Środowiskowym Laboratorium Laserowych Techniek Mikroskopowych IMDiK PAN. Analizę morfologii mitochondriów (wskaźnik kolistości oraz wskaźnik fuzji mitochondrialnych) wykonano wg Dagda i wsp. (2009) w oparciu o program Image J (NIH, Bethesda, USA).

9.10.7. Analiza kolokalizacji mitochondriów oraz lizosomów w komórkach *in vitro* z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej

Komórki PC12 z nadekspresją parkiny wysiewano w gęstości 1×10^5 komórek na dołek na szalkę 4-dołkową ze szklanym dnem. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z obniżoną zawartością surowicy i dodawano badane związki. Po 24 godz. inkubacji komórki płukano buforem HBSS i barwiono za pomocą mieszaniny barwników fluorescencyjnych - MitoTracker Green (100 μ M; Thermo Fischer Scientific) i Lysotracker Red (100 μ M; Thermo Fischer Scientific) przez 1 godz. w 37 °C. Następnie komórki 3-krotnie płukano buforem HBSS i inkubowano z barwnikiem Hoechst 33342 o stężeniu 1 μ g/ml w PBS (5 min., 37 °C). Po 3-krotnym płukaniu w PBS komórki analizowano przy pomocy mikroskopu konfokalnego LSM 510 (Zeiss) z użyciem laserów: argonowego (Ar 488 nm), helowo-neonowego (HeNe 543 nm) oraz diody 405 nm. Zdjęcia wykonywano przy użyciu 63-krotnego powiększenia. Przy analizie danych korzystano z programu ZEN 2011 (Zeiss). Analizę wykonano we współpracy ze Środowiskowym Laboratorium Laserowych Techniek Mikroskopowych IMDiK PAN.

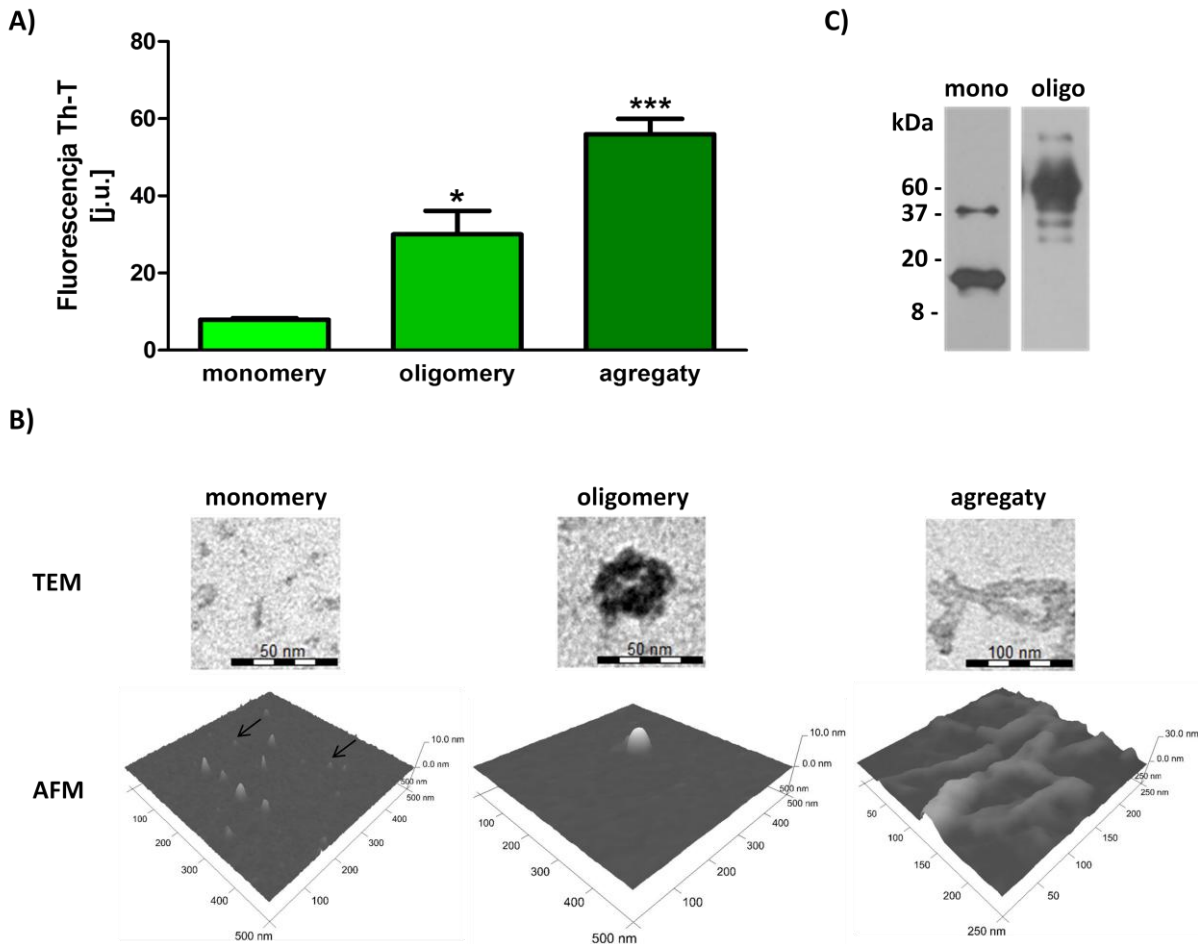
9.11. Statystyczne opracowanie wyników

Każde oznaczenie wykonywano w co najmniej trzech powtórzeniach. Wyniki wyrażano jako wartość średnią \pm błąd standardowy średniej (SEM) obliczone z indywidualnych pomiarów (średnich z powtórzeń). Wiarygodność różnic badano z zastosowaniem testu *t*-Studenta (dwie grupy eksperymentalne) bądź z zastosowaniem jednoczynnikowej lub wieloczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z użyciem testu post-hoc Bonferroniego (trzy lub więcej grup eksperymentalnych). Wyniki uznawano za znamienne statystycznie przy poziomie istotności $p < 0,05$. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o program GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

10. WYNIKI

10.1. Analiza strukturalna i morfologiczna oligomerów α -synukleiny oraz badanie mechanizmów ich toksyczności w komórkach dopaminergicznych PC12

Badania ostatnich kilkunastu lat wskazują na oligomery α -Syn jako kluczową formę w molekularnych mechanizmach toksyczności tego białka (Danzer i wsp., 2007; Colla i wsp., 2012; Klucken i wsp., 2012; Van Rooijen i wsp., 2010). Wobec powyższego do badań użyto rekombinowanego białka α -Syn poddanego procesowi oligomeryzacji zgodnie z procedurą, która została szczegółowo opisana w rozdziale Materiały i Metody. W celu ilościowego określenia stopnia oligomeryzacji α -Syn użyto Th-T, która wykazuje zwiększoną fluorescencję i charakterystyczne czerwone przesunięcie widma emisyjnego w wyniku wiązania się z białkami przyjmującymi strukturę β -kartki, jakimi są oligomery i włókna białek amyloidogennych. Stwierdzono 4-krotny wzrost fluorescencji Th-T dla oligomerów α -Syn w porównaniu do formy monomerycznej, który jednocześnie jest 2-krotnie mniejszy niż ten obserwowany dla protofibrili, czyli zagregowanych nierozpuszczalnych postaci tego białka (**Ryc.13.A**). Morfologiczną charakterystykę otrzymanych preparatów przeprowadzono z zastosowaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (ang. Transmission Electron Microscopy - TEM), a także mikroskopu sił atomowych (ang. Atomic Force Microscopy - AFM). Zaobserwowano, że w przeciwieństwie do monomerów, które charakteryzuje struktura amorficzna, oligomery α -Syn tworzą pierścieniowe struktury o średnicy 40-45 nm. Zgodnie z danymi literaturowymi, jest to charakterystyczna trójwymiarowa struktura tzw. „obwarzanka” (ang. donut structure) którą zwykle przyjmują oligomery α -Syn, umożliwiającą ich wbudowywanie się do błon komórkowych i tworzenie przepuszczalnych porów. Obecności takich oligomerycznych struktur nie stwierdzono dla zagregowanej α -Syn, którą charakteryzuje zwarta włóknista struktura (**Ryc.13.B**). Badania metodą Western blot potwierdziły obecność oligomerów α -Syn o masie 29-60 kDa, podczas gdy w próbie nie poddanej oligomeryzacji zaobserwowano głównie obecność monomerów o masie około 14 kDa oraz niewielki procent oligomerów o masie około 40 kDa (**Ryc. 13.C**).

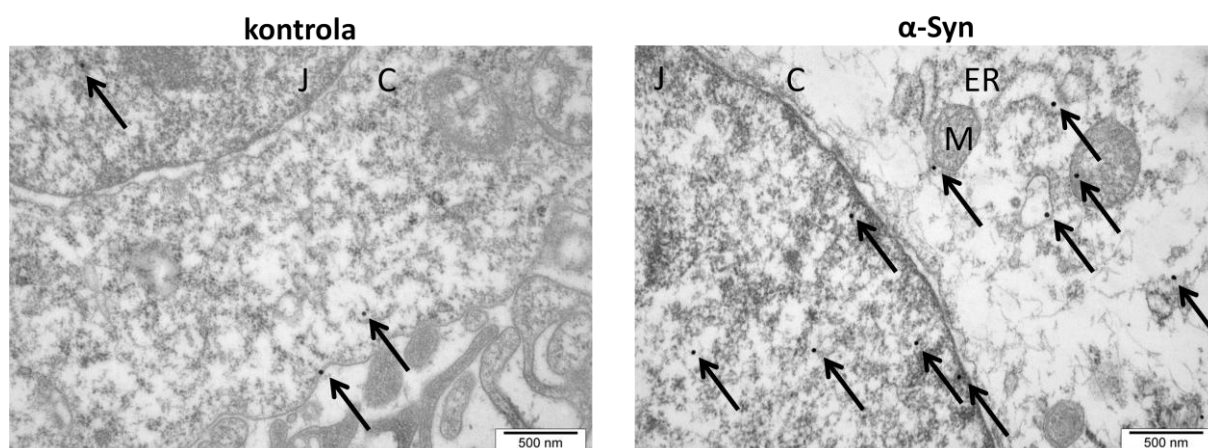


Rycina 13. Analiza struktury wybranych typów α -synukleiny.

A) Stopień wiązania Th-T do monomerów, oligomerów i agregatów α -Syn. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ w stosunku do monomerów α -Syn (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n=3$. **B)** Struktura monomerów, oligomerów i agregatów α -Syn analizowana przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) oraz mikroskopu sił atomowych (AFM). Czarne strzałki na reprezentatywnych mikro fotografiach wskazują monomery α -Syn. **C)** Reprezentatywny Western blot wybranych typów α -Syn. Monomery (mono) i oligomery (oligo) α -Syn (0,5 μ g) rozdzielono za pomocą elektroforezy natywnej i wyznakowano przy pomocy przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko α -Syn.

Dotychczasowe dane wskazują, że α -Syn wywiera najsilniejsze cytotoksyczne działanie na komórki dopaminergiczne szlaku czarno-prążkowiowego i prowadzi do zaburzeń funkcji motorycznych obserwowanych w ChP. W związku z tym badania zmierzające do określenia molekularnych mechanizmów toksyczności α -Syn prowadzono na linii szczurzych komórek guza chromochłonnego PC12. Komórki te posiadają cechy charakterystyczne dla neuronów dopaminergicznych, m.in. wykazują ekspresję TH i β -hydroksylazy DA. Są również szeroko stosowanym modelem badawczym nad mechanizmami toksyczności α -Syn (Kaźmierczak i wsp., 2008; Czapski i wsp., 2013; Gąsowska i wsp., 2014; Liu i wsp., 2011; Rideout i wsp., 2001).

Komórki PC12 poddano 24-godzinnej inkubacji z oligomerami α -Syn w stężeniu 5 μ M, w wyniku czego zaobserwowano istotne zwiększenie się endogennej puli tego białka (**Ryc.14**). Ponadto zaobserwowano, że w komórkach kontrolnych nie traktowanych oligomerami, α -Syn jest zlokalizowana głównie w cytosolu (C) oraz w jądrze komórkowym (J), natomiast w komórkach traktowanych α -Syn wykazano również obecność tego białka w mitochondriach (M) oraz w ER (**Ryc.14**).

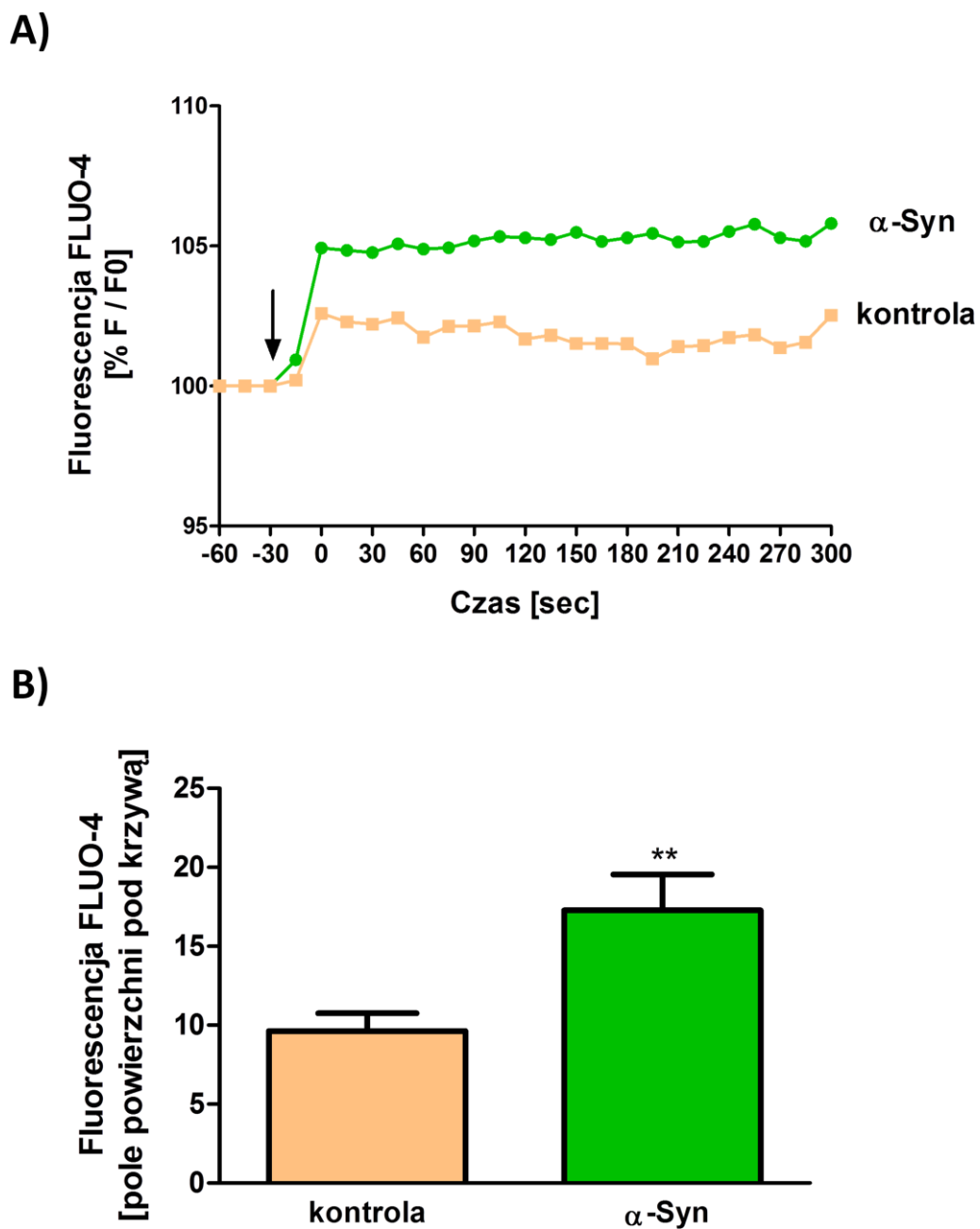


Rycina 14. Translokacja egzogennej α -synukleiny do wnętrza komórek dopaminergicznych PC12.

Poziom i lokalizację α -Syn analizowano przy pomocy mikroskopu elektronowego. Czarne strzałki na reprezentatywnych mikro fotografiach wskazują lokalizację α -Syn w poszczególnych strukturach komórki. M – mitochondrium, J – jądro komórkowe, ER – siateczka śródplazmatyczna, C – cytosol.

10.1.1. Wpływ oligomerów α -synukleiny na poziom jonów wapnia w cytosolu oraz aktywację stresu nitrozacyjnego

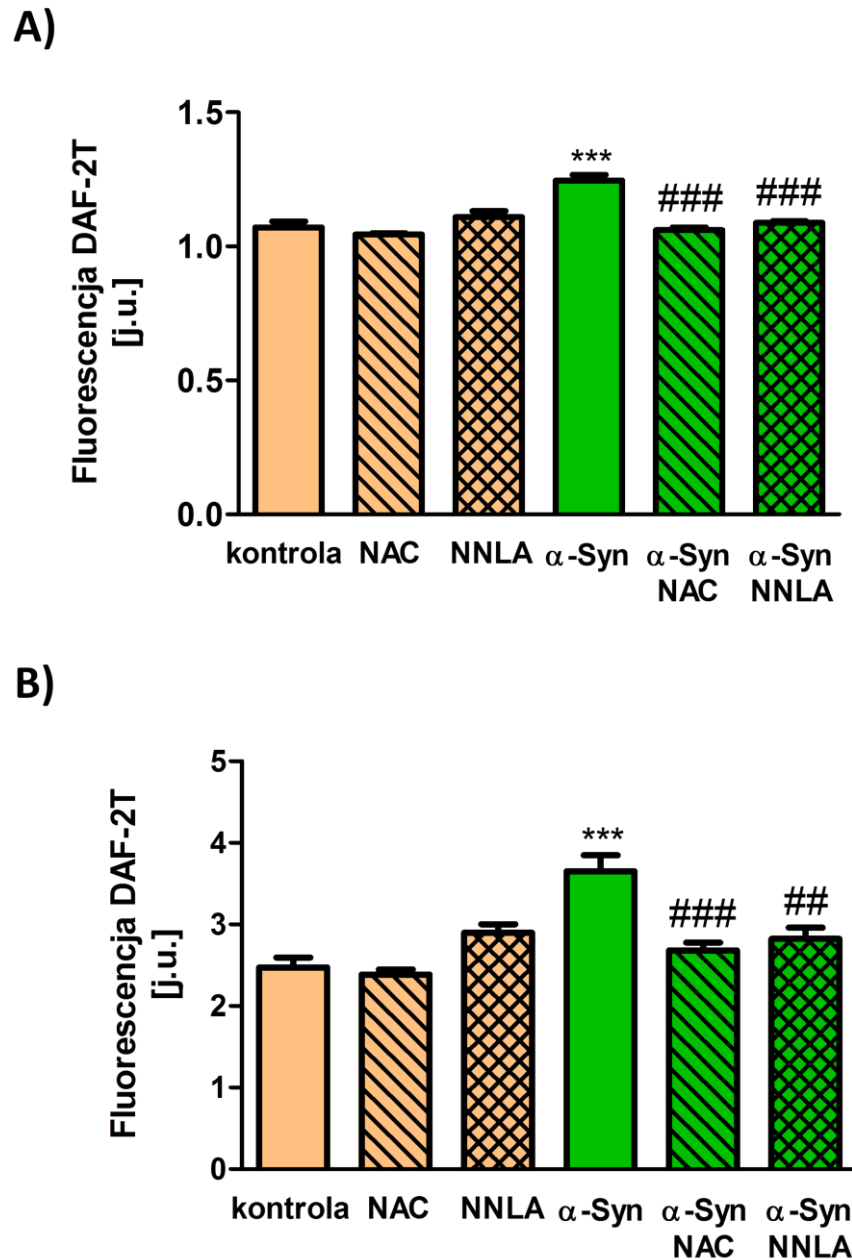
Jony Ca^{2+} są kluczowym przekaźnikiem sygnału w komórce, uczestniczącym w regulacji niemal wszystkich procesów życiowych. W związku z możliwością tworzenia porów w błonach komórkowych, oligomery α -Syn mogą indukować wzrost poziomu jonów Ca^{2+} w cytosolu i zaburzenia homeostazy wapniowej w komórce. W konsekwencji dochodzić może do uszkodzenia mitochondriów, obniżenia metabolizmu energetycznego i ostatecznie śmierci komórki. Wyniki badań uzyskane z użyciem specyficznej dla jonów Ca^{2+} sondy fluorescencyjnej FLUO-4 wykazały, że egzogenne oligomery α -Syn (5 μM) powodują natychmiastowe, utrzymujące się w czasie, zwiększenie poziomu jonów Ca^{2+} w cytosolu w porównaniu do grupy kontrolnej (**Ryc.15.A**). Na podstawie uzyskanych danych policzono pole powierzchni pod krzywą, co stanowiło zmienną dla analizy statystycznej, i wykazano, że wpływ α -Syn na poziom jonów Ca^{2+} w komórkach PC12 jest znamieny w porównaniu do kontroli (**Ryc.15.B**).



Rycina 15. Pomiar poziomu jonów wapnia w cytosolu komórek PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

A) Poziom jonów Ca^{2+} w cytosolu komórek PC12 po 5 minutowym traktowaniu oligomerami α -Syn ($5 \mu\text{M}$) mierzono przy użyciu sondy fluorescencyjnej FLUO-4 i wyrażono jako procentową zmianę intensywności fluorescencji w stosunku do poziomu początkowego w czasie pomiaru ($\% F / F_0$). Strzałka wskazuje moment podania substancji badanych, $n=14-16$. **B)** Fluorescencja sondy FLUO-4 przedstawiona jako pole powierzchni pod krzywą, $**p < 0,01$ w stosunku do kontroli (test t-Studenta), $n=14-16$.

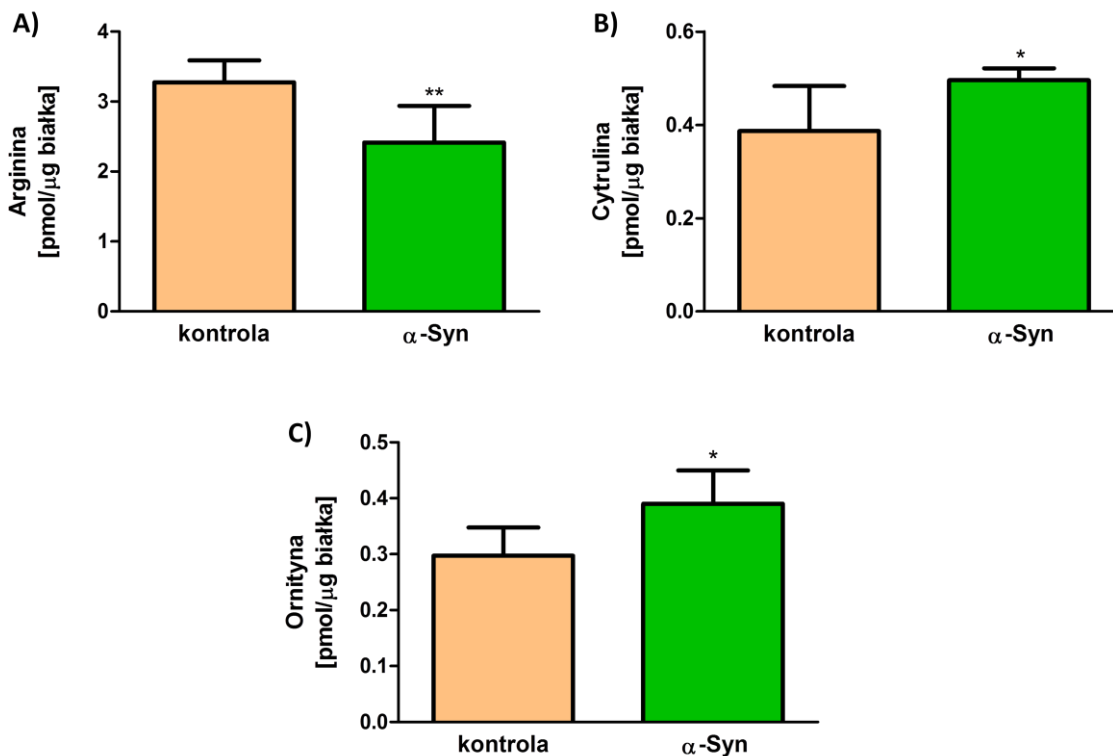
Wzrost poziomu jonów Ca^{2+} w cytosolu wpływa na aktywność kanałów jonowych, receptorów znajdujących się w ER oraz może być czynnikiem aktywującym wiele enzymów, w tym syntazy tlenku azotu (NOS). Wzrost aktywności NOS prowadzi do wzmożonej syntezy NO i aktywacji stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego w komórkach. W związku z powyższym zbadano, czy zależny od oligomerów α -Syn wzrost poziomu jonów Ca^{2+} w cytosolu w komórkach dopaminergicznych PC12 skutkuje zwiększonym powstawaniem NO. W tym celu komórki traktowano oligomerami α -Syn w obecności nieselektywnego inhibitora NOS N ω -nitro-L-argininy (NNLA, 100 μM) oraz przeciwutleniacza N-acetylocysteiny (NAC, 1 mM). Badania wykazały, że egzogenne oligomery α -Syn powodują zależne od czasu zwiększenie syntezy NO: 8 godzin po podaniu α -Syn poziom NO wzrastał o około 20% (**Ryc.16.A**), natomiast po 24 godzinach wzrost ten wynosił 45% (**Ryc.16.B**). Zaobserwowano, że zastosowanie zarówno inhibitora NOS, jak i przeciwutleniacza skutecznie obniża syntezę NO w komórkach PC12 zarówno po 8 jak i po 24 godzinach traktowania egzogenną α -Syn (**Ryc.16.A, B**).



Rycina 16. Pomiar poziomu tlenu azotu w komórkach PC12 poddanych działaniu oligomerów α -synukleiny.

Poziom tlenu azotu w komórkach PC12 po 8-godzinnej (A) i 24-godzinnej (B) inkubacji z oligomerami α -Syn ($5 \mu\text{M}$) w obecności 1 mM NAC lub $100 \mu\text{M}$ NNLA mierzony z zastosowaniem sondy fluorescencyjnej DAF-2 DA. *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli, ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ w stosunku do α -Syn (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n=3-4$.

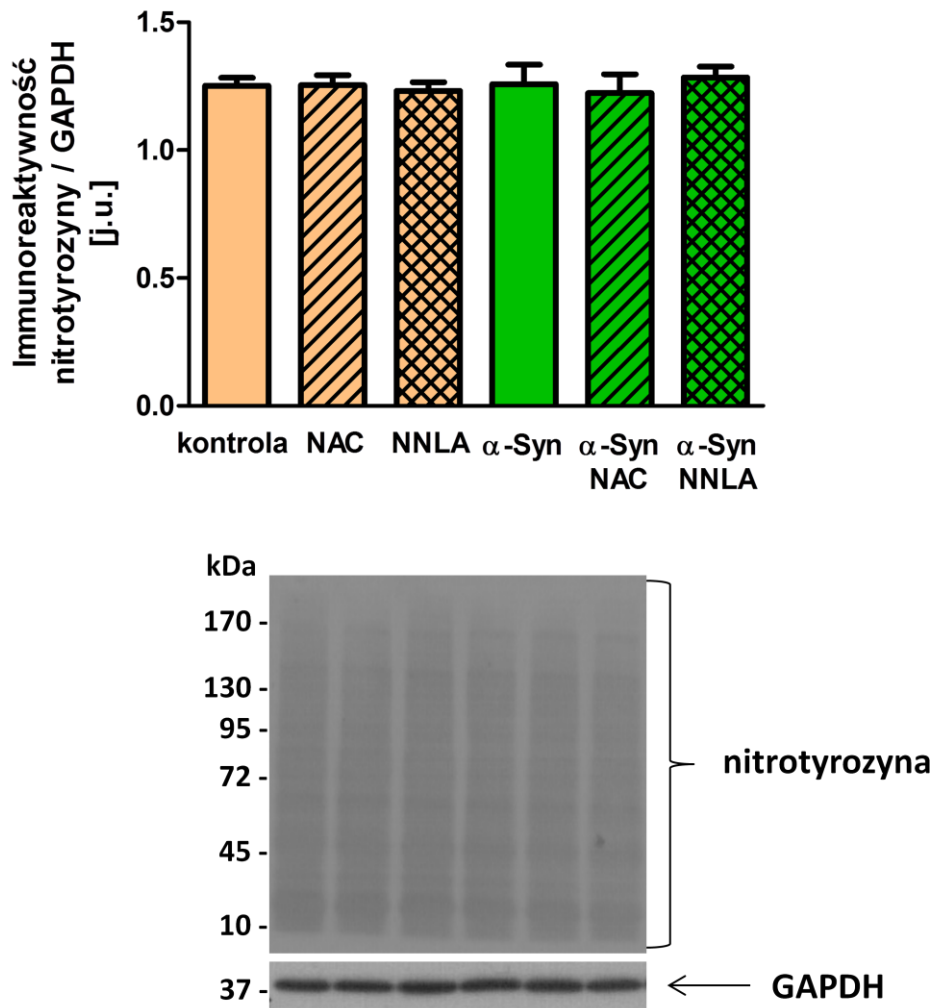
Ponadto przy użyciu wysokosprawnej chromatografii ciekowej dokonano ilościowej analizy poziomu argininy i cytruliny, będących odpowiednio substratem i produktem reakcji katalizowanej przez NOS. Badania wykazały, że po 24 godzinach od podania egzogennych oligomerów α -Syn w komórkach PC12 dochodzi do spadku stężenia argininy (**Ryc.17.A**) z jednoczesnym wzrostem stężenia cytruliny (**Ryc.17.B**). Wpływ na spadek poziomu wewnątrzkomórkowej argininy mogą mieć również arginazy, które katalizują hydrolytyczny rozpad argininy do mocznika i ornityny. Badania wykazały, że po podaniu egzogennych oligomerów α -Syn w komórkach PC12 dochodzi do około 30% wzrostu stężenia ornityny (**Ryc.17.C**), co wskazuje na zwiększoną aktywność arginaz i może sugerować obniżenie dostępności argininy jako substratu dla reakcji katalizowanej przez NOS.



Rycina 17. Pomiar stężenia argininy, cytruliny oraz ornityny w komórkach PC12 poddanych działaniu oligomerów α -synukleiny.

Stężenie argininy (A), cytruliny (B) oraz ornityny (C) w komórkach PC12 po 24-godzinnej inkubacji z oligomerami α -Syn (5 μ M) badano z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ w stosunku do kontroli (test *t*-Studenta), $n = 4-6$.

W warunkach niedoboru argininy lub kofaktorów NOS może oprócz NO produkować inne wolne rodniki takie jak O_2^- , który wchodzi w reakcję z NO, czego wynikiem jest powstawanie nadtlenoazotynu ($ONOO^-$). $ONOO^-$ powoduje uszkodzenia DNA i lipidów oraz nitrację białek (Nakamura i wsp., 2013). Poprzez oznaczenie poziomu nitrotyrozyny, która powstaje na skutek przyłączenia grupy $-NO_2$ do pierścienia aromatycznego tyrozyny zbadano, czy zależna od oligomerów α -Syn aktywacja syntezy NO prowadzi do nitracji białek w komórkach dopaminergicznych. W tym celu komórki PC12 traktowano oligomerami α -Syn w obecności NNLA oraz NAC przez 24 godziny (**Ryc.18**). Nitrację białek oznaczano za pomocą metody Western blot z zastosowaniem specyficznego przeciwciała skierowanego przeciwko nitrotyrozynie. Badania nie wykazały istotnych zmian immunoreaktywności w żadnej z analizowanych grup, co sugeruje, że egzogenne oligomery α -Syn nie wpływają na poziom nitrowanych białek (**Ryc.18**).

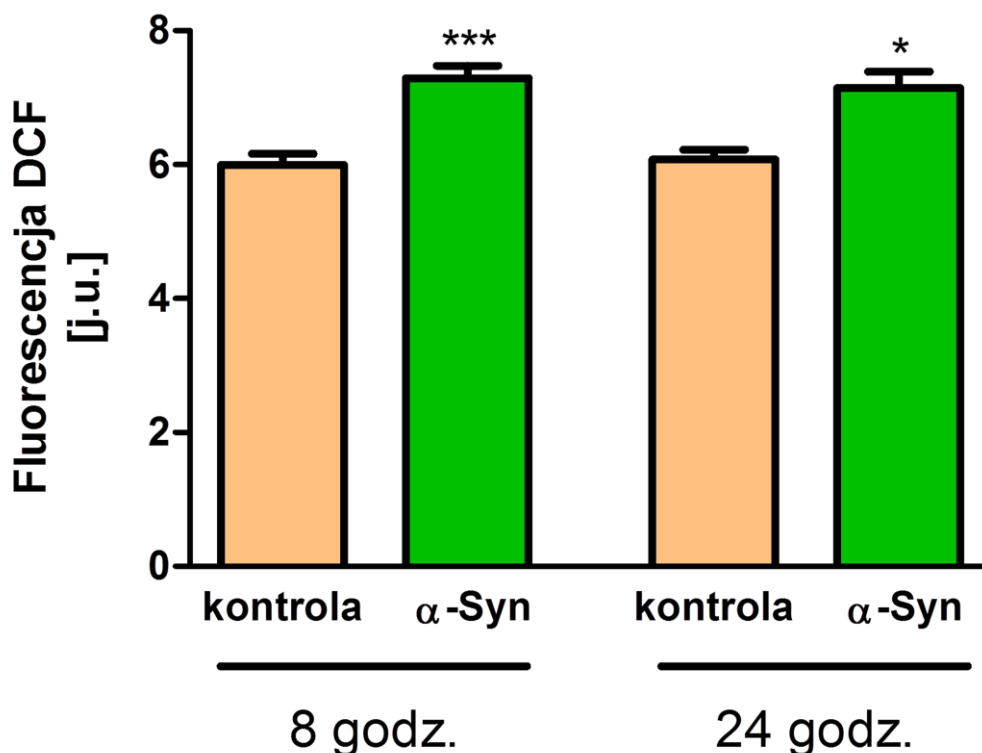


Rycina 18. Analiza immunoreaktywności nitrotyrozyny w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

Stosunek immunoreaktywności nitrotyrozyny do GAPDH w komórkach PC12 po 24-godzinnej inkubacji z oligomerami α -Syn ($5 \mu\text{M}$), w obecności 1 mM NAC lub $100 \mu\text{M}$ NNLA oznaczano za pomocą metody Western blot. Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej, $n=10-12$.

10.1.2. Wpływ oligomerów α -synukleiny na aktywację stresu oksydacyjnego oraz na żywotność komórek dopaminergicznych PC12

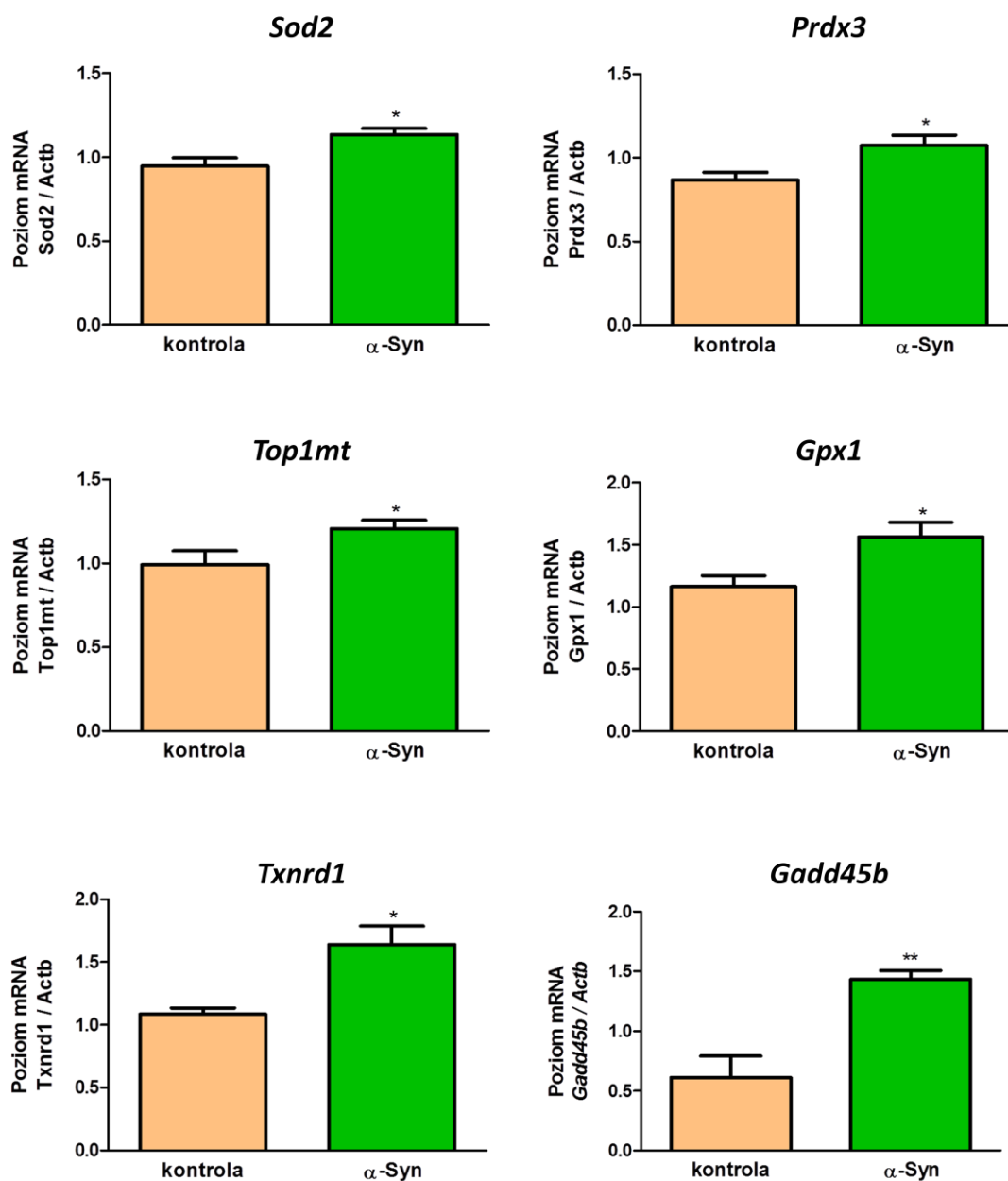
W celu określenia zdolności oligomerycznej formy α -Syn do indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach PC12, zbadano jej wpływ na poziom wolnych rodników tlenowych oraz na poziom ekspresji genów kodujących białka antyoksydacyjne. Poziom wolnych rodników tlenowych w komórkach PC12 badano poprzez pomiar utleniania sondy dichlorodihydrofluoresceiny (H_2DCF -DA). Wykazano, że zarówno podczas 8- jak i 24-godzinnej inkubacji z oligomerami α -Syn, fluorescencja sondy DCF wzrasta o 20%, co świadczy o zwiększonym uwalnianiu wolnych rodników tlenowych (Ryc.19).



Rycina 19. Pomiar poziomu wolnych rodników tlenowych w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

Uwalnianie wolnych rodników tlenowych w komórkach PC12 po 8- i 24-godzinnej inkubacji z oligomerami α -Syn ($5 \mu M$) mierzone z zastosowaniem sondy fluorescencyjnej H_2DCF -DA. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli (test *t*-Studenta), $n = 3-5$.

Ponadto stosując metodę ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy DNA w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) mierzono wpływ egzogennych oligomerów α -Syn na poziom ekspresji genów kodujących białka związane z obroną antyoksydacyjną komórki. Po podaniu oligomerów α -Syn zaobserwowano około 20% wzrost poziomu ekspresji genów kodujących białka odpowiedzi na stres, zlokalizowanych w mitochondriach: dysmutazy ponadtlenkowej 2 (*Sod2*), peroksyredoksyny 3 (*Prdx3*) i topoizomerazy I mitochondrialnej (*Top1mt*), jak również wzrost poziomu ekspresji genów kodujących białka cytosolowe: peroksydazy glutationowej 1 (*Gpx1*) oraz reduktazy tioredoksyny 1 (*Txnrd1*) odpowiednio o około 35% i 50% (**Ryc.20**). Ponadto, wykazano ponad dwukrotne zwiększenie poziomu mRNA dla białka GADD45 β (ang. Growth Arrest and DNA-Damage-inducible beta - *Gadd45b*), wskaźnika stresu komórkowego (**Ryc.20**).

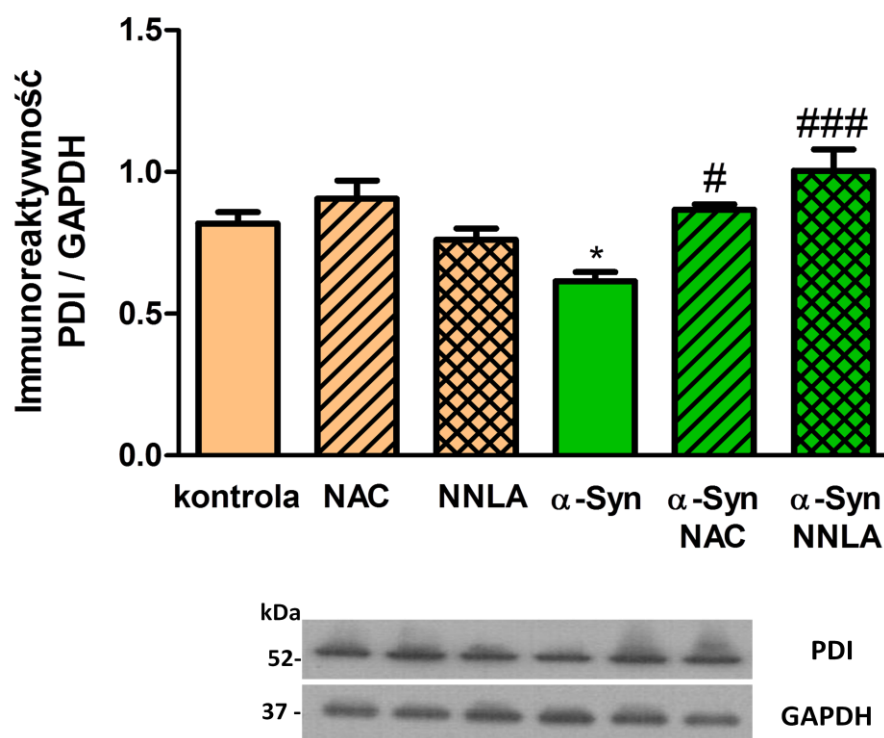


Rycina 20. Analiza poziomu ekspresji genów kodujących białka odpowiedzi na stres w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

Poziom ekspresji genów kodujących białka odpowiedzi na stres: *Sod2*, *Prdx3*, *Top1mt*, *Gpx1*, *Txnrd1* oraz *Gadd45b* w komórkach PC12 traktowanych przez 24 godziny oligomerami α -Syn ($5 \mu\text{M}$) mierzono z zastosowaniem metody qRT-PCR. Wyniki normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ w stosunku do kontroli (test t-Studenta), $n = 6-9$.

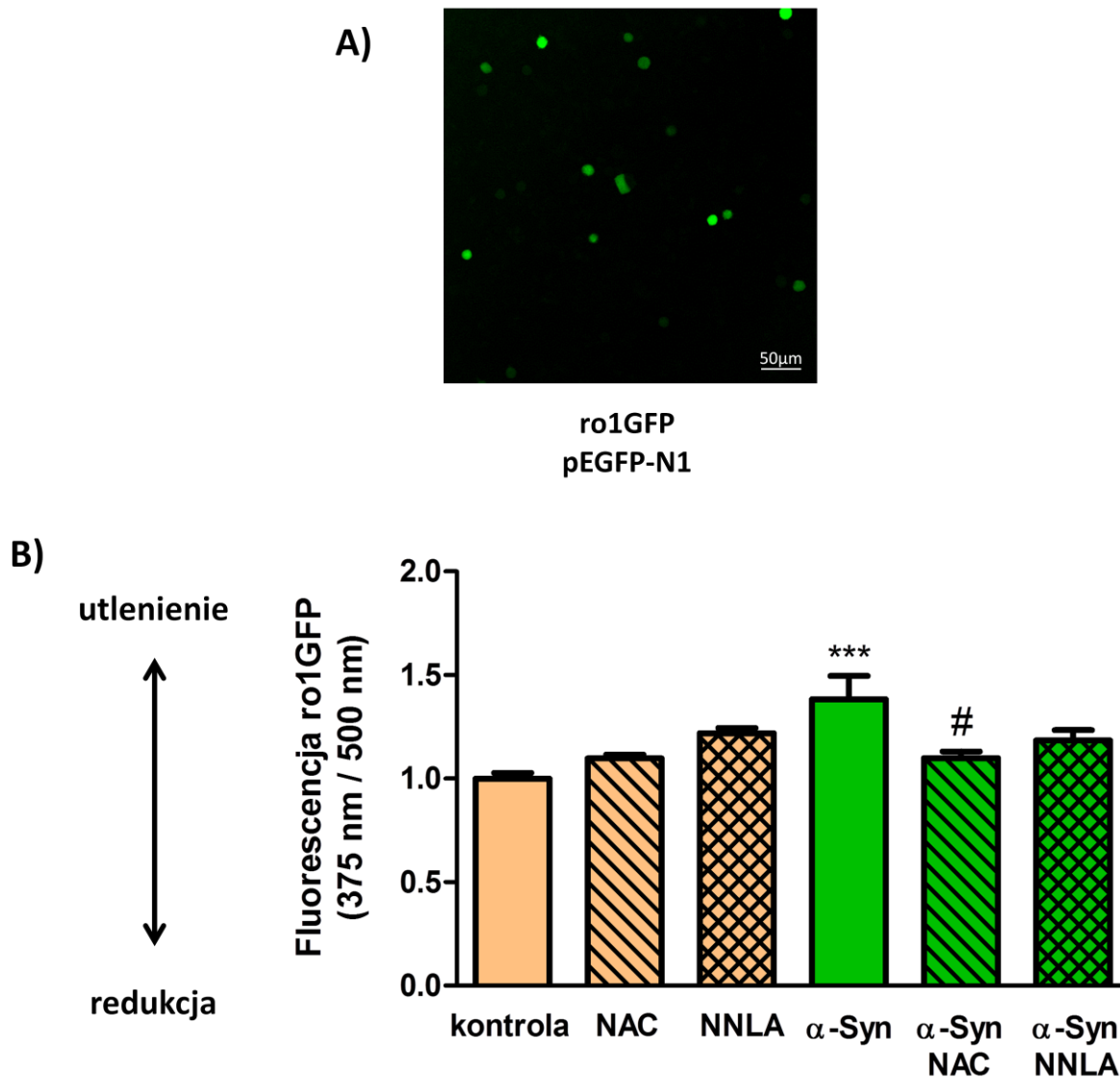
W celu określenia, czy zależna od oligomerów α -Syn aktywacja syntezy NO i innych wolnych rodników tlenowych, przy jednoczesnym wzroście poziomu ekspresji genów kodujących białka odpowiedzi na stres, wpływa na potencjał oksydoredukcyjny komórek, zbadano poziom białkowej izomerazy disiarczkowej (ang. protein disulfide isomerase - PDI) należącej do nadrodziny tioredoksyn. PDI wykazuje aktywność oksydoreduktazy, przeprowadzając reakcje tworzenia wolnych grup tiolowych oraz mostków disiarczkowych w białkach ulegających dojrzewaniu w obszarze światła ER. W związku z tym zmiany poziomu białka PDI mogą pośrednio wskazywać na zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej. Badania wykazały, że w komórkach PC12 dochodzi do zależnego od oligomerów α -Syn obniżenia immunoreaktywności białka PDI o około 25% (**Ryc.21**). Jednocześnie, zastosowanie przeciwutleniacza NAC lub niespecyficznego inhibitora NOS - NNLA zwiększało immunoreaktywność białka PDI odpowiednio o około 40 i 65% w stosunku do komórek traktowanych oligomerami α -Syn (**Ryc.21**).

Potencjał oksydoredukcyjny komórek badano również bezpośrednio z zastosowaniem metody spektrofluorymetrycznej. W tym celu dokonano transfekcji komórek PC12 plazmidem pEGFP-N1 zawierającym gen reporterowy kodujący wrażliwe na potencjał oksydoredukcyjny białko zielonej fluorescencji ro1GFP (**Ryc.22.A**). Białko to charakteryzuje przyjmowanie odmiennej konformacji w zależności od potencjału oksydoredukcyjnego środowiska. Dzięki temu może być wzbudzane przez dwie długości fali – 375 nm w warunkach zwiększonej oksydacji i 500 nm w warunkach redukujących. W związku z tym, stosunek fluorescencji 375/500 nm wskazuje na zmiany potencjału oksydoredukcyjnego w środowisku. W obecności oligomerów α -Syn zaobserwowano wzrost w/w stosunku o 40%, co świadczy o obniżonym potencjale oksydoredukcyjnym i zwiększonym stresie oksydacyjnym. Zastosowanie przeciwutleniacza NAC przywracało homeostazę potencjału oksydoredukcyjnego komórek, podczas gdy inhibitor NOS, NNLA nie miał wpływu na obniżony potencjał oksydoredukcyjny wywołany przez α -Syn (**Ryc.22.B**).



Rycina 21. Analiza immunoreaktywności białka PDI w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

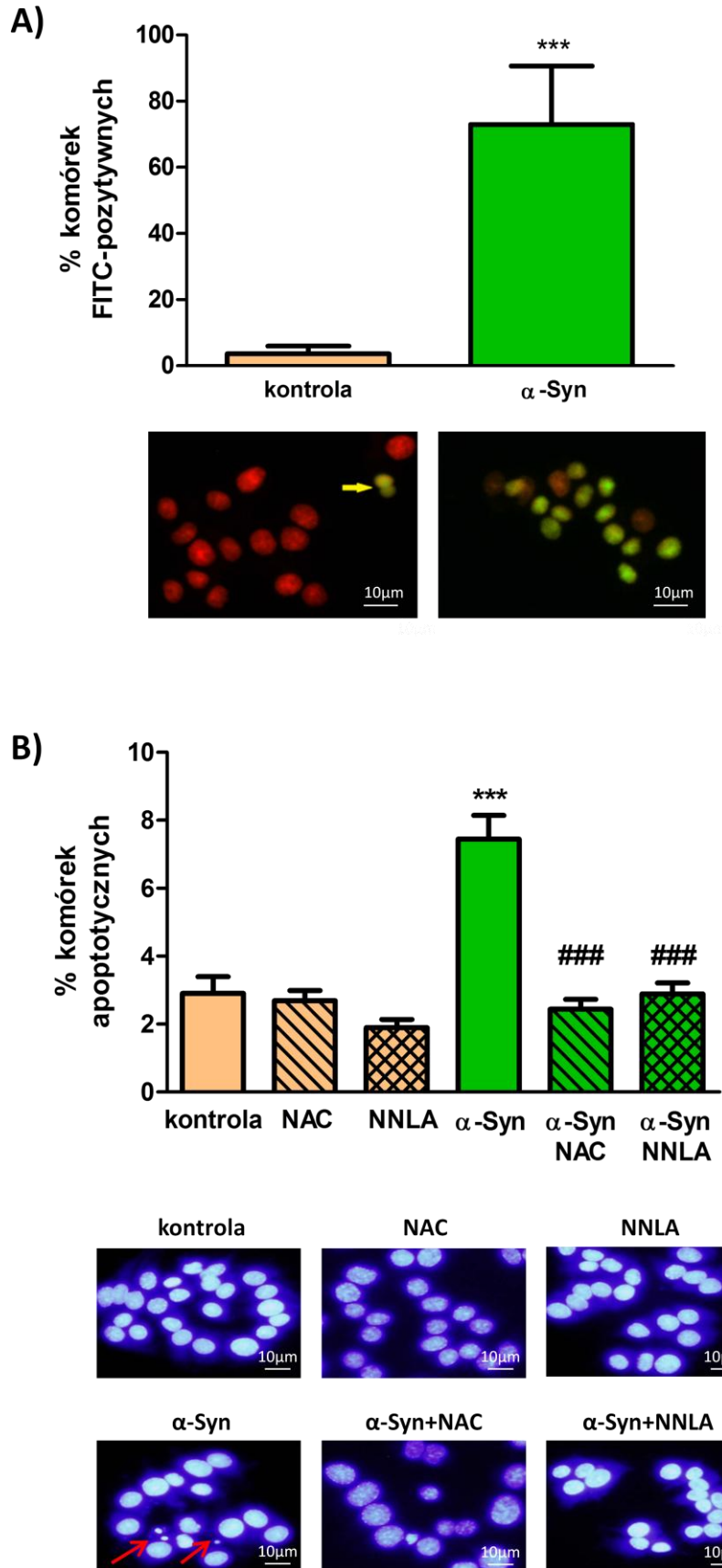
*Stosunek immunoreaktywności białka PDI do GAPDH w komórkach PC12 traktowanych 24 godziny egzogennymi oligomerami α -Syn (5 μ M) w obecności 1 mM NAC lub 100 μ M NNLA badano z zastosowaniem metody Western blot. Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli, # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ w stosunku do komórek traktowanych oligomerami α -Syn (jednoczynnikowa analiza wariacji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n = 6-8$.*

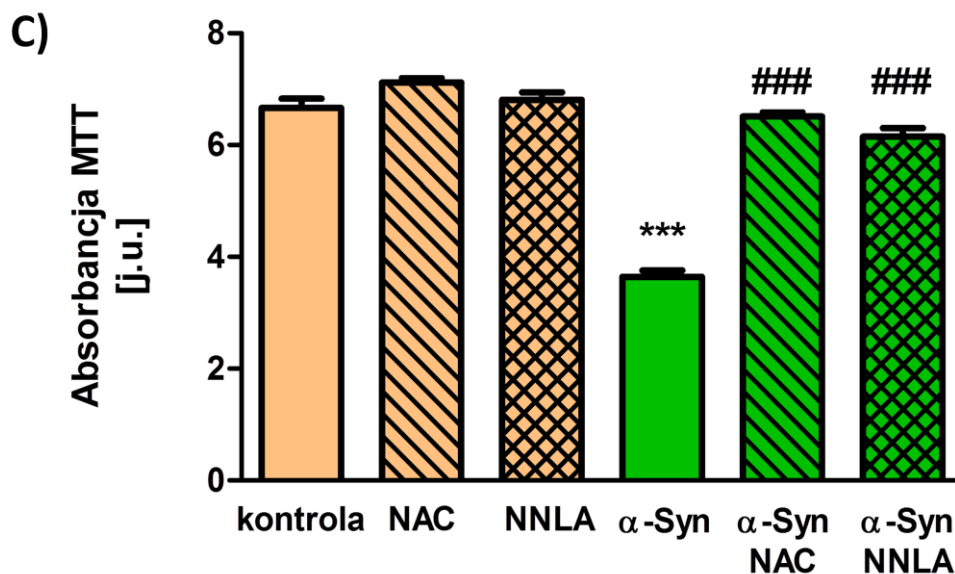


Rycina 22. Pomiar potencjału oksydoredukcyjnego w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

Potencjał oksydoredukcyjny wyrażony jako stosunek fluorescencji fali o długości 375/500 nm w komórkach PC12 transfekowanych genem kodującym białko ro1GFP po 24-godzinnej inkubacji z oligomerami α -Syn (5 μ M) w obecności 1 mM NAC lub 100 μ M NNLA mierzono z zastosowaniem białka rekombinowanego ro1GFP. **A)** Reprezentatywna mikrofotografia komórek PC12 po transfekcji wektorem pEGFP-N1 z genem kodującym białko ro1GFP. **B)** *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli, # $p < 0,05$ w stosunku do komórek traktowanych oligomerami α -Syn (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n=6-9$.

Zależna od oligomerów α -Syn aktywacja stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego może wywołać uszkodzenia makromolekuł, co w konsekwencji może prowadzić do śmierci komórek. Analiza w mikroskopie fluorescencyjnym z zastosowaniem metody barwienia TUNEL wykazała, że 48-godzinna inkubacja z egzogennymi oligomerami α -Syn wywołuje wzmoczoną fragmentację DNA w komórkach PC12 (**Ryc.23.A**). W celu określenia, czy zależne od oligomerów α -Syn uszkodzenia DNA zainicjują proces programowanej śmierci komórek PC12, przeprowadzono badania morfologii jąder komórkowych pod kątem cech apoptotycznych (zagęszczenie chromatyny, jądra pyknotyczne, fragmentacja jądra komórkowego). Badania w mikroskopie fluorescencyjnym z użyciem wiążącego DNA fluorochromu Hoechst 33342 wykazały, że w komórkach PC12 traktowanych oligomerami α -Syn liczba komórek apoptotycznych wzrasta ponad 2-krotnie (**Ryc.23.B**). Ponadto wykonano ilościową ocenę żywotności komórek testem MTT i stwierdzono, że 48-godzinna inkubacja w obecności oligomerycznej α -Syn (5 μ M) powoduje obumieranie ok. 50% komórek PC12 (**Ryc.23.C**). Zastosowanie NAC oraz NNLA powodowało statystycznie znaczne obniżenie poziomu komórek apoptotycznych (**Ryc.23.B**) i zapobiegało zależnej od oligomerów α -Syn śmierci komórek dopaminergicznych (**Ryc.23.C**).





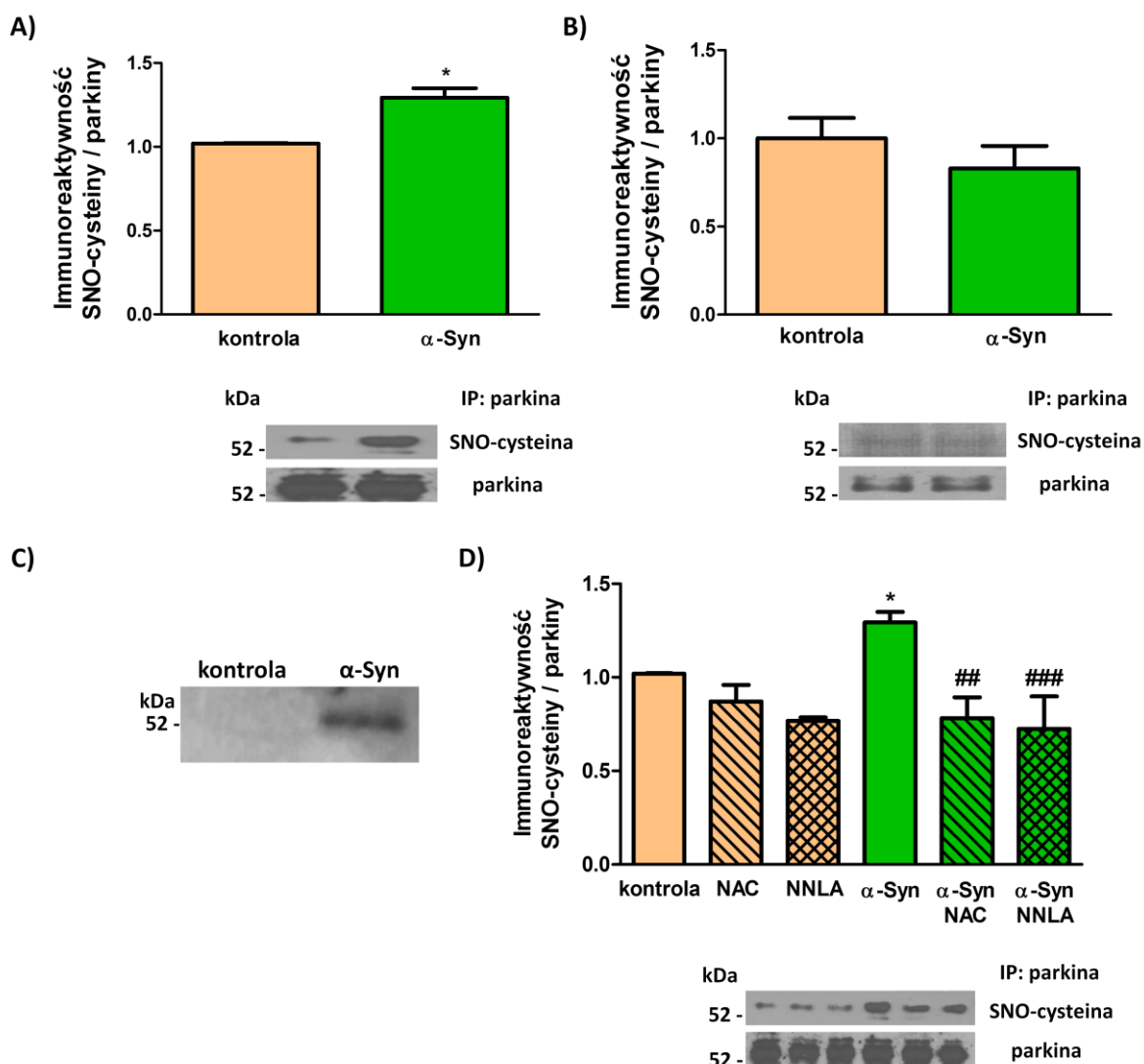
Rycina 23. Analiza zależnej od oligomerów α -synukleiny fragmentacji DNA, indukcji programowanej śmierci oraz przeżywalności komórek PC12.

A) Fragmentację DNA w komórkach PC12 traktowanych 48 godzin oligomerami α -Syn ($5 \mu\text{M}$) mierzono z zastosowaniem metody TUNEL. $***p < 0,001$ w stosunku do kontroli (test *t*-Studenta). Reprezentatywne mikrofotografie komórek PC12 poddanych 48-godzinnemu traktowaniu $5 \mu\text{M}$ oligomerami α -Syn wyznakowanych z zastosowaniem barwników fluorescencyjnych: PI (czerwony) oraz FITC (zielony). Żółta strzałka wskazuje na komórkę z pofragmentowanym DNA (FITC-pozytywną), $n=4$. **B)** Procent komórek apoptotycznych w linii komórek PC12 traktowanych 48 godzin oligomerami α -Syn ($5 \mu\text{M}$) w obecności 1 mM NAC lub $100 \mu\text{M}$ NNLA liczono z zastosowaniem barwnika Hoechst 33342. $***p < 0,001$ w stosunku do kontroli, $###p < 0,001$ w stosunku do komórek traktowanych α -Syn (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n=20-24$. Reprezentatywne mikrofotografie komórek PC12 poddanych 48-godzinnemu traktowaniu $5 \mu\text{M}$ oligomerami α -Syn w obecności 1 mM NAC lub $100 \mu\text{M}$ NNLA barwionych z zastosowaniem Hoechst 33342. Czerwone strzałki wskazują na jądra wykazujące typowe cechy apoptotyczne. **C)** Przeżywalność komórek PC12 traktowanych 48 godzin oligomerami α -Syn ($5 \mu\text{M}$) w obecności 1 mM NAC lub $100 \mu\text{M}$ NNLA mierzono z zastosowaniem testu kolorymetrycznego MTT. $***p < 0,001$ w stosunku do kontroli, $###p < 0,001$ w stosunku do komórek traktowanych α -Syn (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n=28-30$.

10.2. Wpływ oligomerów α -synukleiny na ekspresję, aktywność oraz S-nitrozylację parkiny

W warunkach zwiększonej syntezy NO i indukcji stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego dochodzi do swoistych modyfikacji potranslacyjnych aminokwasów łańcucha polipeptydowego, co może wywoływać zmiany funkcji licznych białek. Szczególne znaczenie przypisuje się modyfikacjom reszt cysteiny (S-nitrozylacja) w strukturze parkiny, które często postrzegane są jako modyfikacje prowadzące do obniżenia aktywności tego białka.

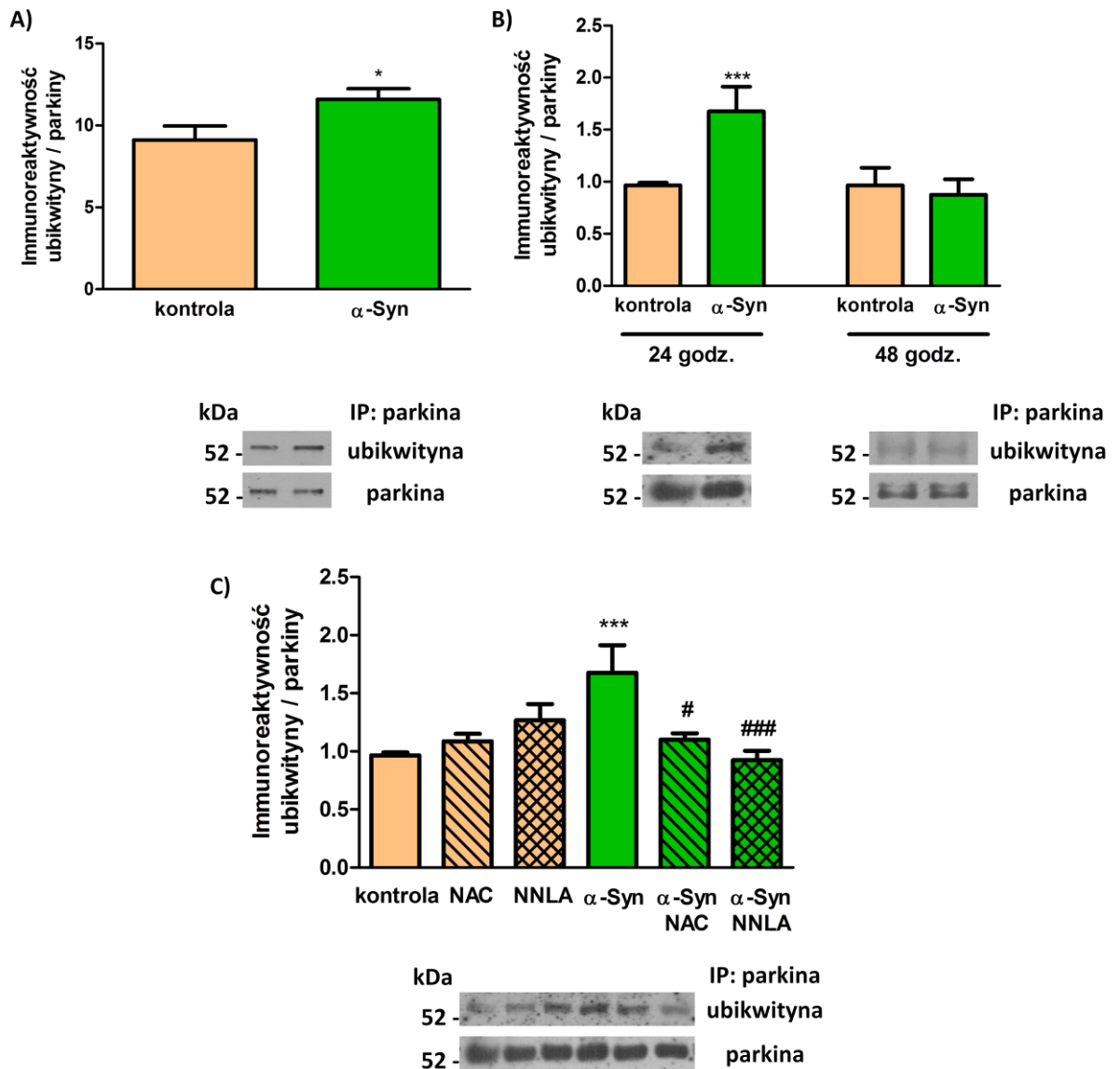
S-nitrozylację parkiny, polegającą na kowalencyjnym przyłączeniu grupy NO do reszt cysteinowych, badano metodą immunochemiczną z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko S-nitrozocysteinie (SNO-C) po uprzedniej immunoprecypitacji parkiny (**Ryc.24.A, B, D**). S-nitrozylację parkiny zbadano również przy użyciu techniki podstawienia biotynowego, polegającej na przyłączeniu cząsteczki biotyny do nitrozylowanych reszt cysteinowych i detekcji na drodze chemiluminescencji (**Ryc.24.C**). Wykazano, że po 24-godzinnej inkubacji z egzogennymi oligomerami α -Syn immunoreaktywność S-nitrozylowanej parkiny w komórkach PC12 wzrasta o około 25% (**Ryc.24.A, C**), a następnie powraca do poziomu podstawowego po 48 godzinach inkubacji (**Ryc.24.B**). Przeciwtleniacz NAC oraz inhibitor NOS, NNLA zapobiegają S-nitrozylacji parkiny wywołanej przez oligomery α -Syn (**Ryc.24.D**).



Rycina 24. Analiza S-nitrozytacji parkiny w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

Immunoreaktywność S-nitrozylowanej parkiny w komórkach PC12 po 24-godzinnej (A, C) i 48-godzinnej (B) inkubacji z oligomerami α -Syn oraz w komórkach traktowanych 24 godziny oligomerami α -Syn (5 μ M) w obecności 1 mM NAC lub 100 μ M NNLA (D) wyznaczono poprzez określenie stosunku formy S-nitrozylowanej do całkowitej puli parkiny za pomocą metody Western blot (A, B, D) oraz z zastosowaniem podstawienia biotynowego (C). A) Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli (test *t*-Studenta), $n = 6-9$. B) Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej, $n = 4-6$. D) Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli, ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ w stosunku do komórek traktowanych oligomerami α -Syn (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n = 6-9$. IP - immunoprecypitacja.

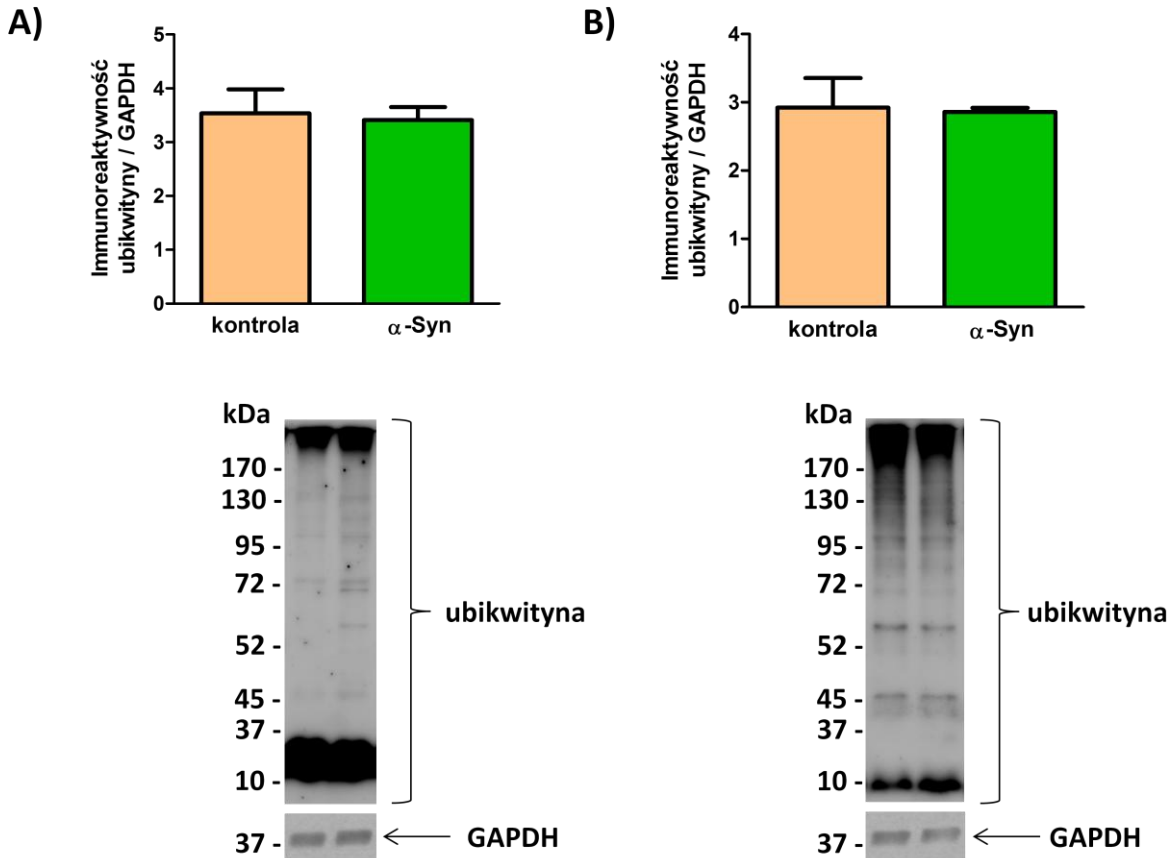
W celu oceny aktywności parkiny jako ligazy ubikwitynowej E3, 24 godziny po inkubacji komórek PC12 z egzogenną α -Syn, dokonano immunoprecypitacji parkiny, a następnie wykorzystując zdolność tego białka do autoubikwitynacji, przeprowadzono reakcję enzymatyczną w obecności wszystkich kofaktorów, substratów (ATP, ubikwityna) oraz enzymów współuczestniczących (Ube1 oraz UbcH4) (Imai i wsp., 2000; Shimura i wsp., 2000; Zhang i wsp., 2000). Następnie oznaczono poziom ubikwitynowanej parkiny w stosunku do całkowitej puli tego białka za pomocą metody Western blot. Badania wykazały, że egzogenna α -Syn istotnie wpływa na zwiększenie aktywności parkiny, ponieważ poziom jej autoubikwitynacji w komórkach PC12 traktowanych α -Syn wzrasta o około 30% w stosunku do komórek kontrolnych (**Ryc.25.A**). Następnie zbadano, czy traktowanie α -Syn wpływa na poziom endogennej ubikwitynowanej formy parkiny w komórkach PC12, gdzie reakcja enzymatyczna autoubikwitynacji zachodzi w warunkach ograniczonej dostępności kofaktorów i enzymów (**Ryc.25.B**). Wykazano, że po 24-godzinnej inkubacji z oligomerami α -Syn poziom ubikwitynowanej parkiny wzrasta o około 70% w stosunku do komórek kontrolnych, a następnie wraca do poziomu podstawowego po 48 godzinach traktowania (**Ryc.25.B**). Podobnie, jak w przypadku S-nitrozylacji, NAC i NNLA obniżały zależną od oligomerów α -Syn autoubikwitynację parkiny odpowiednio o około 35% i 45% (**Ryc.25.C**).



Rycina 25. Analiza autoubikwytynacji parkiny w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

Autoubikwytynację parkiny w komórkach traktowanych 24 godziny (A, B) lub 48 godzin (B) oligomerami α -Syn ($5 \mu\text{M}$) oraz w komórkach traktowanych 24 godziny oligomerami α -Syn ($5 \mu\text{M}$) w obecności 1 mM NAC lub $100 \mu\text{M}$ NNLA (C) wyznaczono poprzez określenie stosunku formy ubikwytynowanej do całkowitej puli parkiny za pomocą metody Western blot. Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej. A) $*p < 0,05$ w stosunku do kontroli (test *t*-Studenta), $n=4$. B) $***p < 0,001$ w stosunku do kontroli (test *t*-Studenta), $n=6-9$. C) $***p < 0,001$ w stosunku do kontroli, $\#p < 0,05$; $###p < 0,001$ w stosunku do komórek traktowanych oligomerami α -Syn (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n=6-9$. IP - immunoprecypitacja.

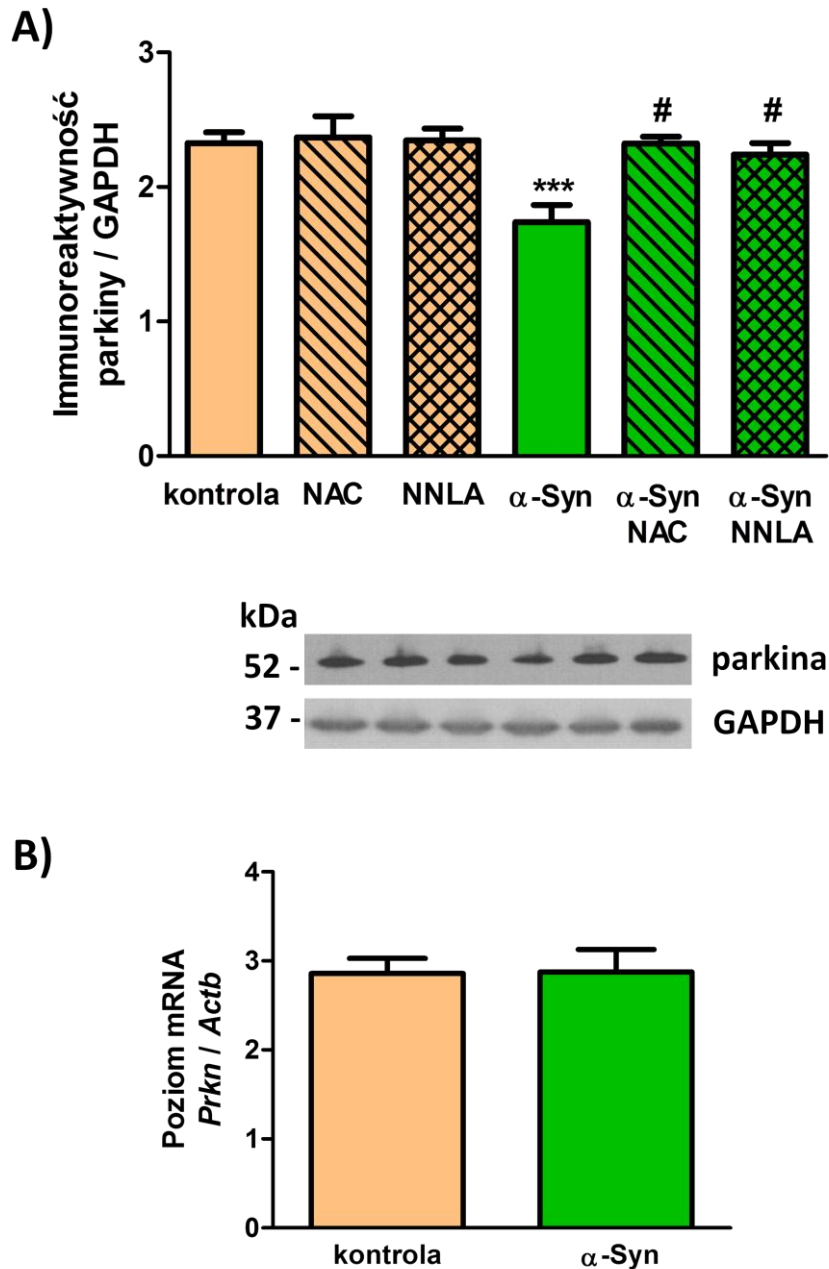
Parkina, dzięki aktywności ligazy ubikwitynowej E3, może modyfikować wiele białek w komórce, wobec czego zwiększenie aktywności parkiny przez zewnątrzkomórkową α -Syn może wpłynąć na zwiększenie poziomu ubikwytynacji substratów dla tego enzymu. Wykazano, że chociaż egzogenna α -Syn wywołuje znaczący wzrost autoubikwytynacji parkiny, to pozostaje ona bez wpływu na zależną od parkiny całkowitą ubikwytynację białek zarówno po 24 (**Ryc.26.A**), jak i po 48 godzinach inkubacji (**Ryc.26.B**).



Rycina 26. Analiza ubikwytynacji białek w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

Stosunek immunoreaktywności ubikwityny do GAPDH w komórkach traktowanych 24 godziny (A) i 48 godzin (B) oligomerami α -Syn (5 μ M) oznaczano za pomocą metody Western blot. Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej, n=5-7.

W celu wyjaśnienia tego zjawiska zbadano, czy α -Syn wpływa na poziom białka parkiny i wykazano, że 24-godzinna inkubacja z egzogennymi oligomerami α -Syn wywołuje istotne obniżenie immunoreaktywności parkiny, a hamowanie NOS oraz obniżenie poziomu wolnych rodników tlenowych skutecznie zapobiega zależnemu od oligomerów α -Syn spadkowi poziomu parkiny (**Ryc.27.A**). Ponadto zaobserwowano, że traktowanie komórek PC12 α -Syn nie skutkuje obniżeniem poziomu mRNA dla parkiny (**Ryc.27.B**).



Rycina 27. Analiza ekspresji parkiny w komórkach PC12 poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

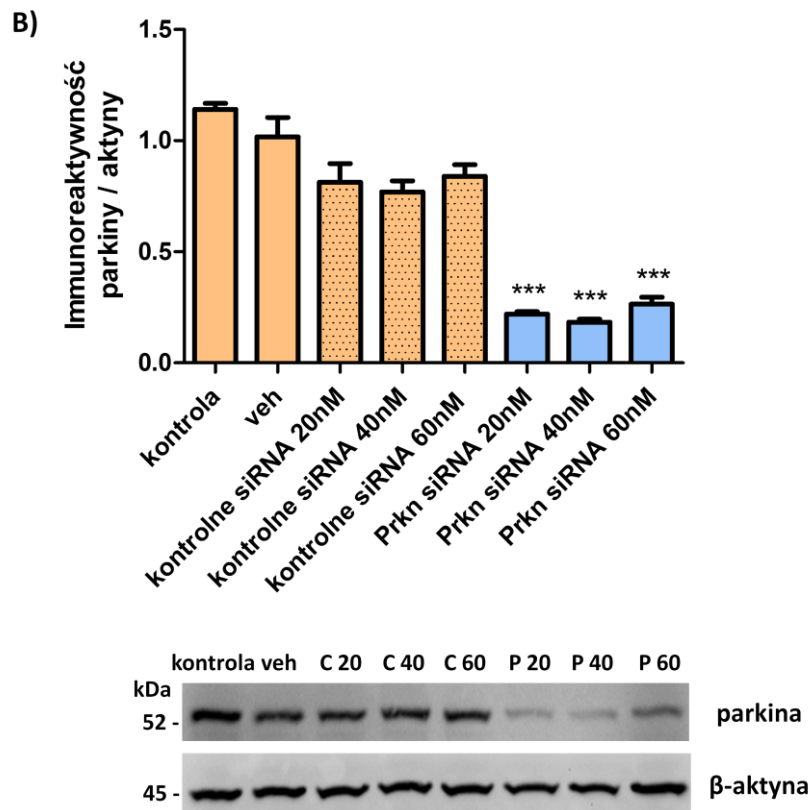
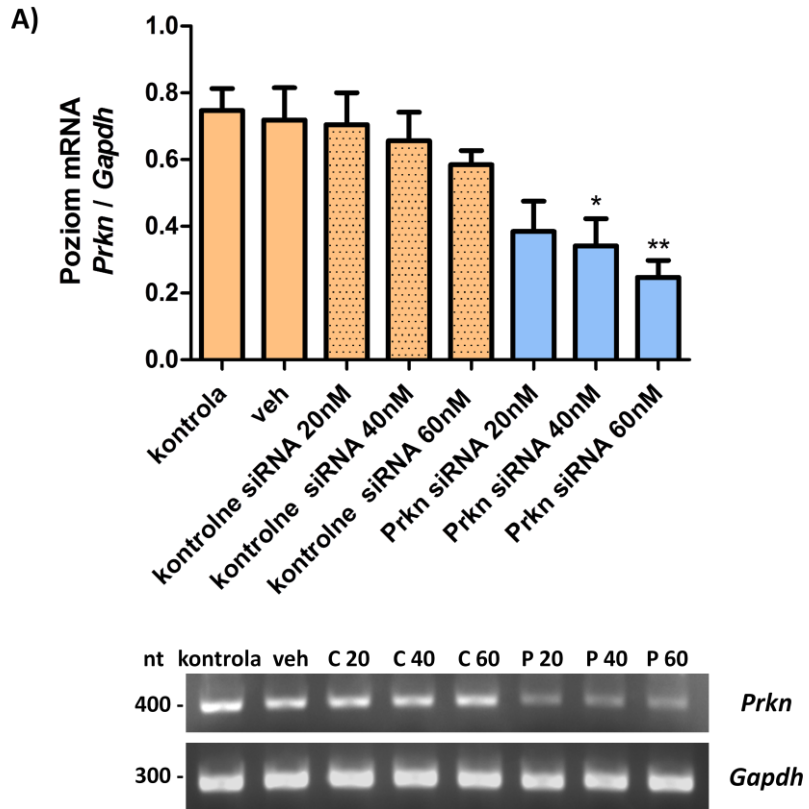
A) Stosunek immunoreaktywności parkiny do GAPDH w komórkach po 24-godzinnym traktowaniu oligomerami α -Syn ($5 \mu\text{M}$) w obecności 1 mM NAC lub $100 \mu\text{M}$ NNLA oznaczano metodą Western blot. Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej. *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli, # $p < 0,05$ w stosunku do komórek traktowanych oligomerami α -Syn (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n=9-12$. **B)** Poziom ekspresji genu Prkn w komórkach po 24-godzinnym traktowaniu oligomerami α -Syn ($5 \mu\text{M}$) mierzono metodą qRT-PCR. Wyniki normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (Actb), $n=5-8$.

10.3. Udział parkiny w zależnych od oligomerów α -synukleiny zaburzeniach dynamiki i funkcji mitochondriów w komórkach PC12

Obecnie uważa się, że oprócz odkładania się złogów nieprawidłowo sfałdowanych białek, jedną z głównych przyczyn zmian neurodegeneracyjnych w ChP stanowi dysfunkcja mitochondriów. Najnowsze badania sugerują, że aberracje białek kluczowych dla patomechanizmu ChP, takich jak α -Syn lub parkina, mogą istotnie przyczyniać się do zaburzenia regulacji cyklu życiowego oraz funkcji mitochondriów. Kolejne badania miały więc na celu określenie roli parkiny w zależnych od α -Syn mechanizmach prowadzących do dysfunkcji mitochondriów w komórkach dopaminergicznych PC12.

10.3.1. Wpływ obniżenia ekspresji parkiny na funkcje mitochondriów oraz przeżywalność komórek dopaminergicznych

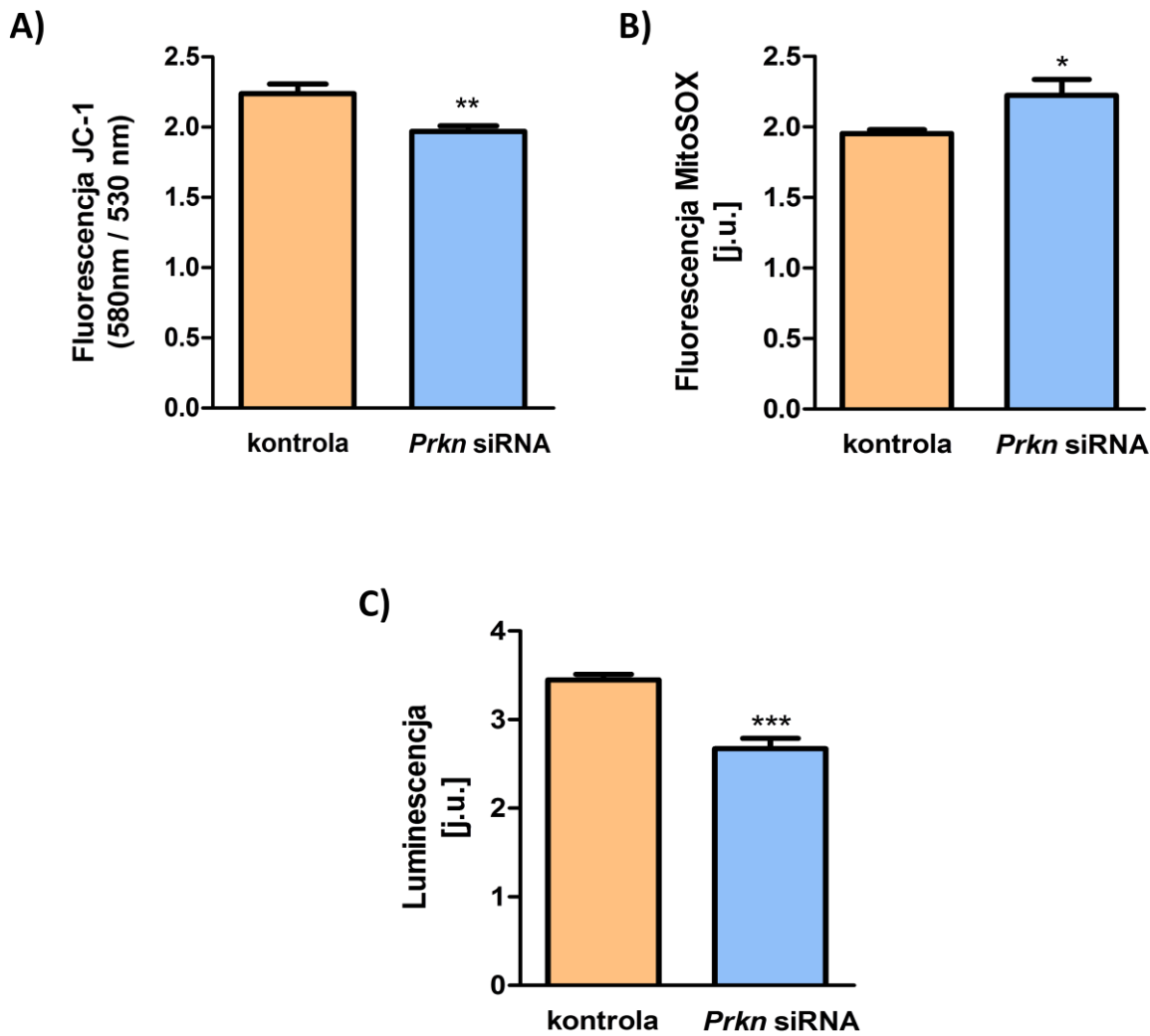
W celu zbadania, czy obniżenie poziomu parkiny może bezpośrednio wpływać na funkcję mitochondriów, komórki PC12 poddano procedurze częściowego wyciszenia genu *Prkn*, przy użyciu krótkiego interferującego RNA - siRNA, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i Metody. Kontrolą do tego układu badawczego były komórki PC12 transfekowane nieukierunkowanym siRNA. W celu doboru odpowiedniego stężenia siRNA, zbadano ekspresję i poziom białka parkiny w komórkach po podaniu siRNA w zakresie stężeń 20-60 nM. Stwierdzono, że zastosowanie 40 nM siRNA przyniosło najlepsze efekty i skutkowało obniżeniem poziomu mRNA dla *Prkn* o 45% (**Ryc.28.A**) i spadkiem immunoreaktywności parkiny o około 80% w stosunku do kontroli (**Ryc.28.B**).



Rycina 28. Analiza częściowego wyciszenia ekspresji genu *Prkn* kodującego parkinę w komórkach PC12.

A) Poziom ekspresji genu *Prkn* w komórkach PC12 po 48-godzinnej traktowaniu 20-60 nM *Prkn* siRNA mierzono z zastosowaniem metody PCR z odwrotną transkryptazą. Wyniki normalizowano względem genu kodującego GAPDH (*Gapdh*). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ w stosunku do kontroli referencyjnej (test *t*-Studenta), $n=4$. **B)** Stosunek immunoreaktywności parkiny do β -aktyny w komórkach PC12 po 48-godzinnej traktowaniu 20-60 nM *Prkn* siRNA oznaczano metodą Western blot. Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej. *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli referencyjnej (test *t*-Studenta), $n=4$. Kontrola z mieszaniną do transfekcji bez siRNA (ang. vehicle - veh), kontrolne siRNA 20-60 nM (C20-60), *Prkn* siRNA 20-60 nM (P20-60).

Następnie w komórkach, które poddano 48-godzinnej preinkubacji z 40 nM siRNA oznaczono podstawowe parametry określające funkcje mitochondriów. Badania wykazały, że w wyniku obniżenia poziomu parkiny dochodzi do znamiennych zaburzeń mitochondrialnego potencjału błonowego (**Ryc.29.A**), co skutkuje zwiększoną produkcją O_2^- (**Ryc.29.B**) przy równoczesnym spadku syntezy ATP (**Ryc.29.C**).

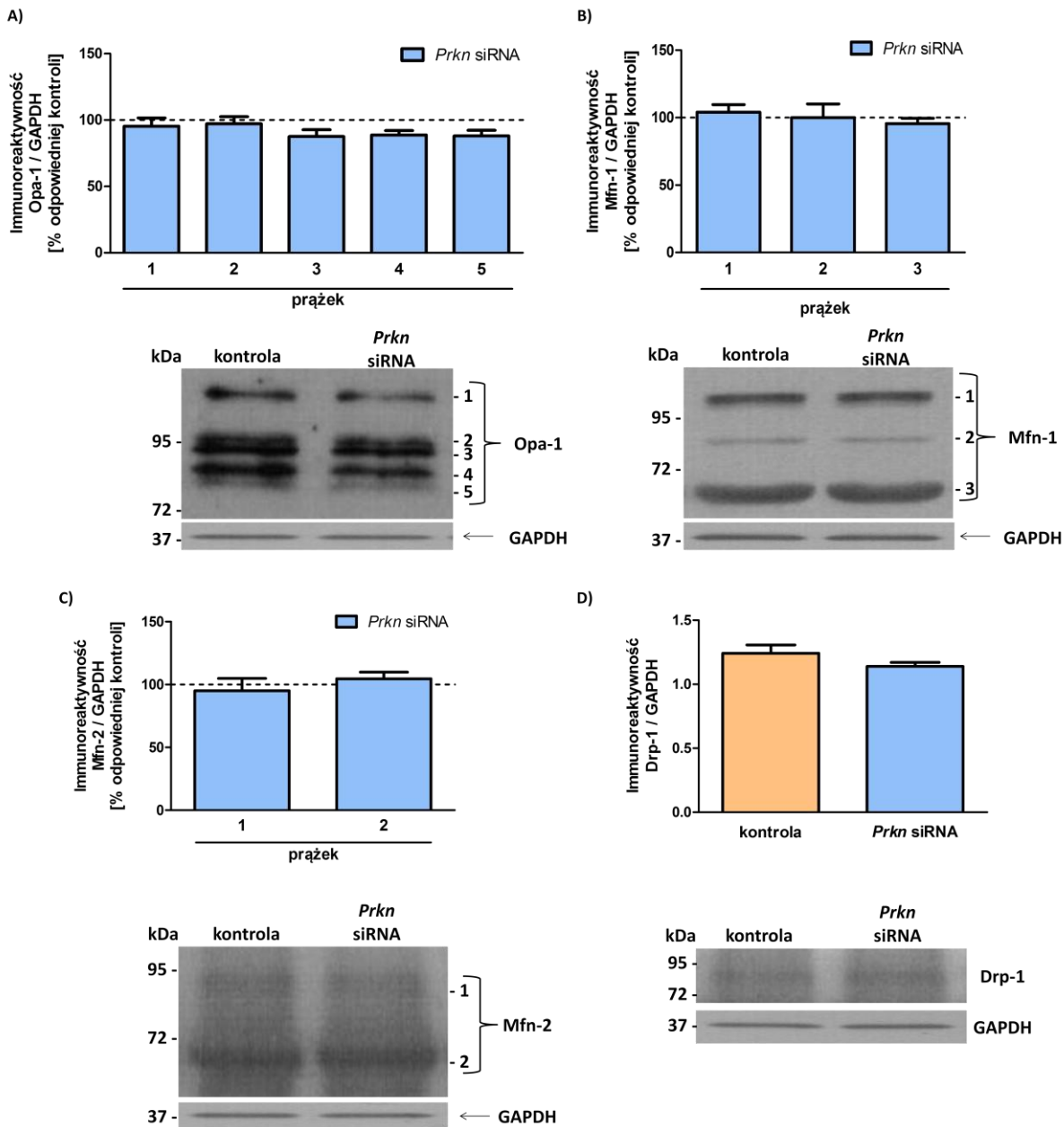


Rycina 29. Analiza dysfunkcji mitochondriów w komórkach PC12 z częściowym wyciszeniem genu *Prkn*.

A) Mitochondrialny potencjał błonowy w komórkach PC12 z częściowym wyciszeniem genu *Prkn* mierzono z zastosowaniem cytometrii przepływowej oraz sondy fluorescencyjnej JC-1. $**p < 0,01$ w stosunku do kontroli (test *t*-Studenta), $n=7$. **B)** Poziom mitochondrialnego rodnika ponadtlenkowego w komórkach PC12 z częściowym wyciszeniem genu *Prkn* mierzono z zastosowaniem sondy fluorescencyjnej MitoSOX. $*p < 0,05$ w stosunku do kontroli (test *t*-Studenta), $n=13$. **C)** Poziom wewnątrzkomórkowego ATP w komórkach PC12 z częściowym wyciszeniem genu *Prkn* mierzono z zastosowaniem luminescencji. $***p < 0,001$ w stosunku do kontroli (test *t*-Studenta), $n=6$.

W celu zbadania, czy obniżenie poziomu parkiny ma istotny wpływ na regulację cyklu życiowego mitochondriów, zbadano poziom białek biorących udział w procesie fuzji mitochondriów - Opa-1, Mfn-1 i Mfn-2 oraz rozszczepienia - Drp-1. Dane literaturowe wskazują, że białko Opa-1 u ssaków występuje w przynajmniej ośmiu wariantach powstałych na skutek alternatywnego składowania mRNA oraz potranslacyjnego cięcia mitochondrialnymi proteazami (Ishihara i wsp., 2013). W wyniku proteolizy powstają długie, tzw. L-Opa1 (ang. long-Opa1) i krótkie, tzw. S-Opa-1 (ang. short-Opa-1) formy białka, które pełnią odmienne funkcje w regulacji dynamiki mitochondriów (Baker i wsp., 2014; Duvezin-Caubet i wsp., 2006). L-Opa-1 są konieczne, by mogła zajść fuzja wewnętrznej błony mitochondrialnej, podczas gdy formy S-Opa-1 sprzyjają fragmentacji sieci mitochondrialnej. W warunkach fizjologicznych utrzymuje się homeostaza pomiędzy poziomem długich i krótkich form Opa-1, jednakże na skutek obniżenia mitochondrialnego potencjału błonowego wzrasta poziom S-Opa-1, co prowadzi do zahamowania fuzji mitochondriów (Ishihara i wsp., 2013; Baker i wsp., 2014).

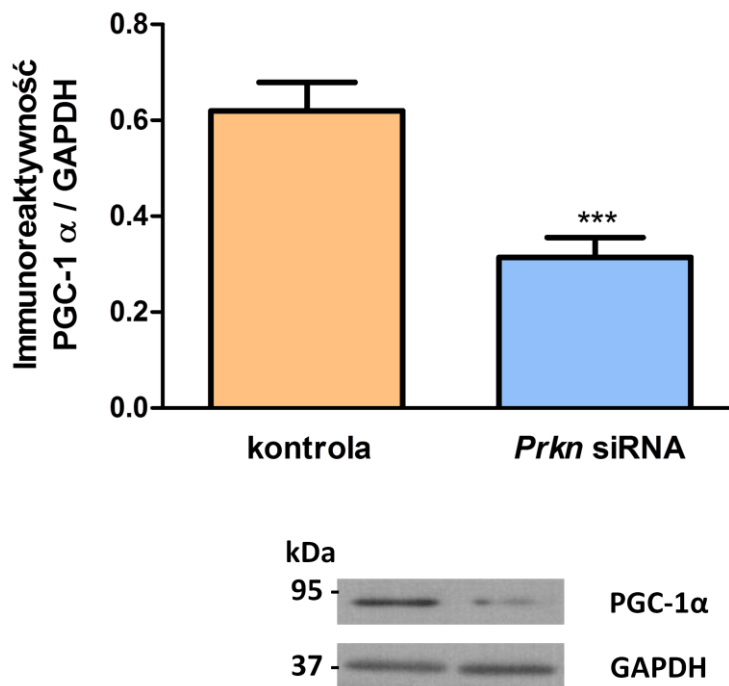
W niniejszej pracy, analiza z zastosowaniem metody Western blot wykazała obecność pięciu prążków odpowiadających długim (**Ryc.30.A**, odpowiednio prążki 1 i 2) i krótkim (**Ryc.30.A**, odpowiednio prążki 3, 4 i 5) izoformom Opa-1. Badania wykazały, że częściowe wyciszenie ekspresji parkiny nie wpływa znacząco na immunofluorescencję poszczególnych izoform Opa-1 (**Ryc.30.A**). W analizie Western blot zaobserwowano również obecność 3 prążków dla Mfn-1, które odpowiadają białkom o masie odpowiednio: ~ 100 kDa, ~ 80 kDa oraz ~ 60 kDa oraz 2 prążków dla Mfn-2, które występują na wysokości ~ 80 kDa oraz ~ 60 kDa. Krótsze izoformy mitofuzyn, pozbawione reszt aminokwasowych na końcu aminowym, powstają wskutek alternatywnego składowania mRNA (Kawalec i wsp., 2016) i są bogato reprezentowane we frakcji mitochondrialnej (Menges i wsp., 2017). Wykazano, że wyciszenie genu *Prkn* nie wpływa istotnie na poziom immunoreaktywności żadnej z analizowanych izoform Mfn-1 oraz Mfn-2 (**Ryc.30.B**, **Ryc.30.C**). Podobnie spadek poziomu parkiny nie miał istotnego wpływu na immunoreaktywność białka Drp-1, odpowiedzialnego za regulację rozszczepienia mitochondriów (**Ryc.30.D**).



Rycina 30. Analiza immunoreaktywności białek biorących udział w cyklu życiowym mitochondriów w komórkach PC12 z częściowym wyciszeniem genu *Prkn*.

Stosunek immunoreaktywności białek *Opa-1* (A), *Mfn-1* (B), *Mfn-2* (C) oraz *Drp-1* (D) do *GAPDH* w komórkach PC12 z częściowym wyciszeniem genu *Prkn* oznaczano z zastosowaniem metody Western blot. Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej. Wyniki przedstawiono jako procent odpowiedniej kontroli, $n=12-15$.

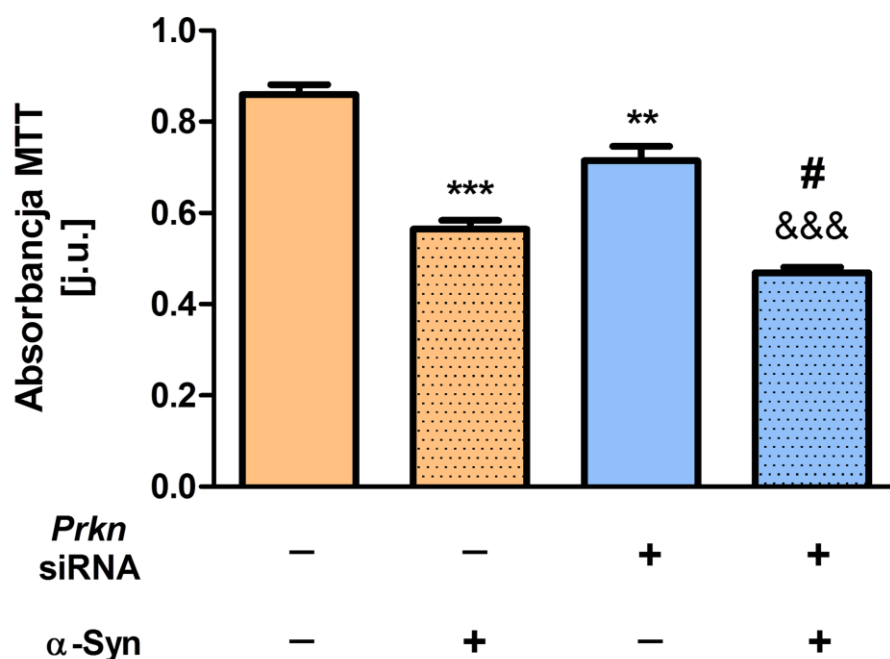
Następnie przeanalizowano wpływ częściowego wyciszenia genu *Prkn* na poziom immunoreaktywności czynnika transkrypcyjnego PGC-1 α , odpowiedzialnego za regulację metabolizmu energetycznego komórki i biogenezy mitochondriów. Analiza z zastosowaniem metody Western blot wykazała, że spadek poziomu parkiny prowadzi do około 50% obniżenia immunoreaktywności białka PGC-1 α (Ryc.31).



Rycina 31. Analiza immunoreaktywności białka PGC-1 α w komórkach PC12 z częściowym wyciszeniem genu *Prkn*.

Stosunek immunoreaktywności PGC-1 α do GAPDH w komórkach PC12 z częściowym wyciszeniem genu *Prkn* oznaczano z zastosowaniem metody Western blot. Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej. *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli (test *t*-Studenta), $n=9-10$.

Powyższe dane wskazują, że obniżenie poziomu parkiny prowadzi do zaburzenia funkcji oraz biogenezy mitochondriów, w wyniku czego dochodzić może do zmniejszenia puli funkcjonalnych mitochondriów i w konsekwencji do śmierci komórek dopaminergicznych. Uzyskane wyniki badań wykazały, że częściowe wyciszenie ekspresji genu *Prkn* znacząco zmniejszyło żywotność komórek PC12, ale efekt ten był mniejszy niż ten zaobserwowany w przypadku komórek kontrolnych traktowanych α -Syn (**Ryc.32**). Zaobserwowano natomiast, że częściowe wyciszenie parkiny zwiększa toksyczność oligomerów α -Syn o około 20% (**Ryc.32**).

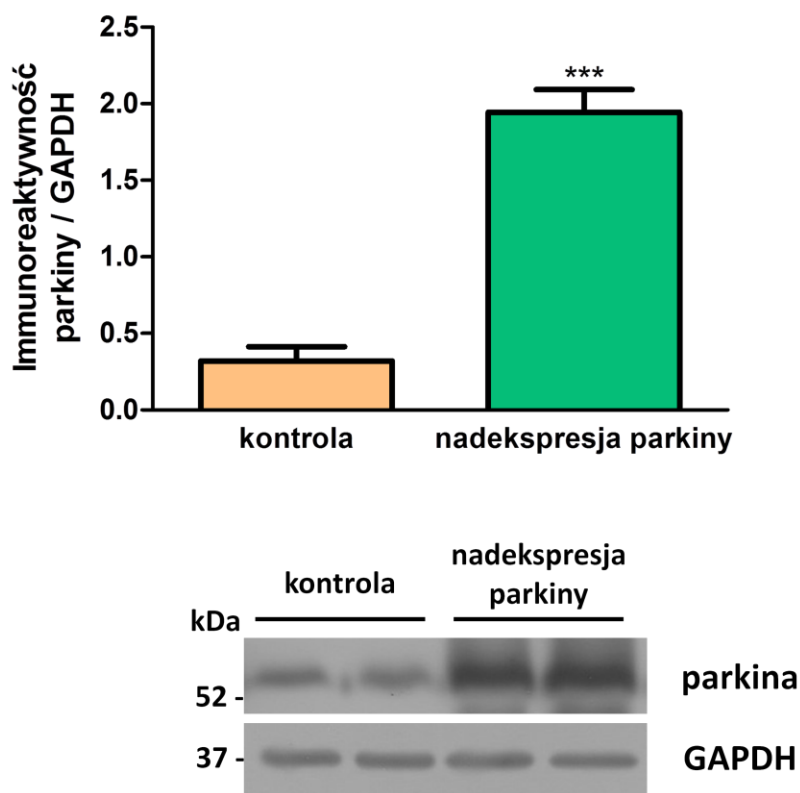


Rycina 32. Analiza przeżywalności komórek PC12 poddanych częściowemu wyciszeniu genu *Prkn* w obecności egzogennych oligomerów α -synukleiny.

Przeżywalność komórek PC12 z częściowym wyciszeniem genu *Prkn* traktowanych 48 godzin egzogennymi oligomerami α -Syn ($5 \mu\text{M}$) mierzono z zastosowaniem testu kolorymetrycznego MTT. $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ w stosunku do kontroli, $\#p < 0,05$ w stosunku do kontroli traktowanej oligomerami α -Syn, $\&\&\&p < 0,001$ w stosunku do komórek z częściowym wyciszeniem genu *Prkn* (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n=5-8$.

10.3.2. Wpływ nadekspresji parkiny na zależne od oligomerów α -synukleiny zaburzenia funkcji mitochondriów i śmierć komórek PC12

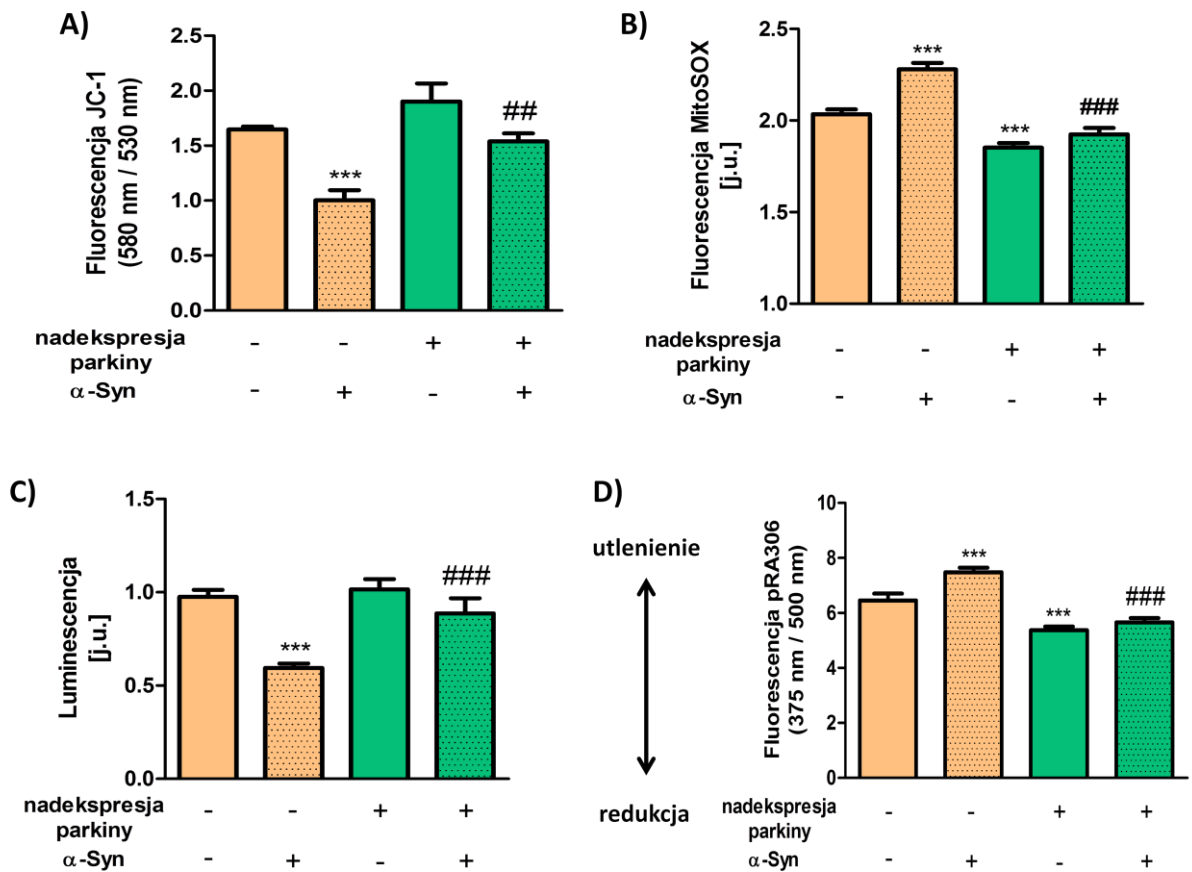
W celu określenia, czy zaburzenia parkiny wywołane przez oligomery α -Syn mogą przyczyniać się do dysfunkcji mitochondriów oraz czy zwiększenie poziomu parkiny może zapobiegać toksyczności α -Syn, komórki PC12 transfekowano ludzkim genem *PRKN*, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i Metody. Kontrolą do tego układu badawczego były komórki PC12 transfekowane pustym wektorem. Zaobserwowano, że nadekspresja genu *PRKN* skutkuje około 6-krotnym wzrostem poziomu białka parkiny w porównaniu do kontroli (Ryc.33).



Rycina 33. Analiza nadekspresji genu *PRKN* kodującej parkinę w komórkach PC12.

*Stosunek immunoreaktywności parkiny do GAPDH w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* oznaczano metodą Western blot. Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej. *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli (test *t*-Studenta), $n=4$.*

Uzyskane wyniki wskazują, że 24-godzinna inkubacja komórek PC12 kontrolnych z egzogennymi oligomerami α -Syn powoduje znaczny spadek mitochondrialnego potencjału błonowego (**Ryc.34.A**), co prowadzi do wzrostu uwalniania mitochondrialnego O_2^- (**Ryc.34.B**) oraz skutkuje spadkiem poziomu wewnątrzkomórkowego ATP o 40% (**Ryc.34.C**). Natomiast nadekspresja parkiny zapobiega niekorzystnemu działaniu α -Syn na funkcję mitochondriów, zapobiega depolaryzacji mitochondriów i nadmiernemu uwalnianiu O_2^- oraz przywraca poziom wewnątrzkomórkowego ATP do wartości kontrolnych (**Ryc.34**). W celu zbadania, czy zależne od oligomerów α -Syn zaburzenie poziomu i aktywności parkiny wpływa na mitochondrialny potencjał oksydoredukcyjny komórek, dokonano transfekcji komórek białkiem GFP wrażliwym na potencjał oksydoredukcyjny, lokalizującym się selektywnie w mitochondriach (pRA306). Zaobserwowano, że w komórkach PC12 poddanych 24-godzinnemu traktowaniu egzogennymi oligomerami α -Syn dochodzi do 15% wzrostu stosunku fluorescencji 375/500 nm białka pRA306, co świadczy o zwiększonym stresie oksydacyjnym w mitochondriach (**Ryc.34.D**). Jednocześnie, nadekspresja parkiny zapobiega zmianom potencjału oksydoredukcyjnego wywołanym przez α -Syn (**Ryc.34.D**). Ponadto zaobserwowano, że nadekspresja parkiny wykazuje właściwości cytoprotekcyjne, obniżając uwalnianie mitochondrialnego O_2^- (**Ryc.34.B**) oraz mitochondrialnego potencjału oksydoredukcyjnego (**Ryc.34.D**) w stosunku do komórek kontrolnych.

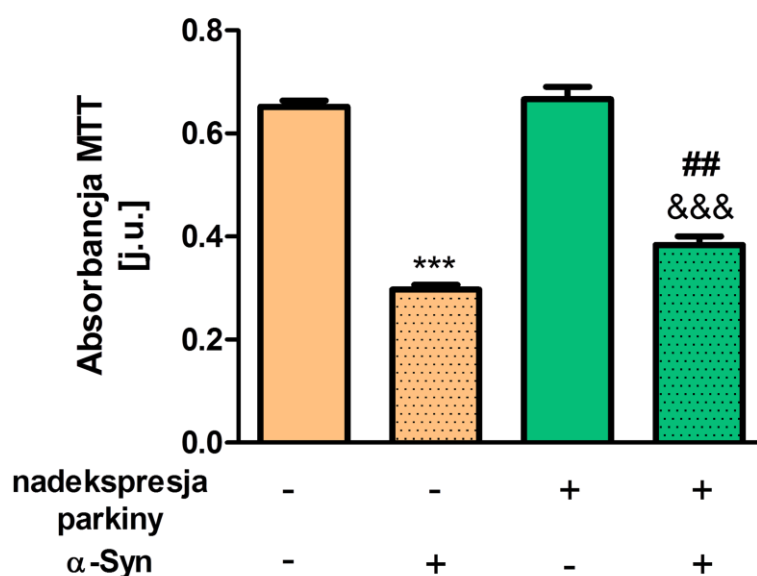


Rycina 34. Analiza dysfunkcji mitochondriów w komórkach PC12 z nadekspresją z genu *PRKN* poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

A) Mitochondrialny potencjał błonowy w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* traktowanych 24 godziny oligomerami α -Syn (5 μ M) mierzono z zastosowaniem cytometrii przepływowej oraz sondy fluorescencyjnej JC-1. *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli, ## $p < 0,01$ w stosunku do kontroli traktowanej oligomerami α -Syn (dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n = 18-20$. **B)** Poziom mitochondrialnego rodnika ponadtlenkowego w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* traktowanych 24 godziny oligomerami α -Syn (5 μ M) mierzono z zastosowaniem sondy fluorescencyjnej MitoSOX. *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli, ### $p < 0,001$ w stosunku do kontroli traktowanej oligomerami α -Syn (dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n = 15-18$. **C)** Poziom wewnątrzkomórkowego ATP w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* traktowanych 24 godziny oligomerami α -Syn (5 μ M) mierzono z zastosowaniem luminescencji. *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli, ### $p < 0,001$ w stosunku do kontroli traktowanej oligomerami α -Syn (dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n = 24$. **D)** Mitochondrialny potencjał oksydoredukcyjny wyrażony jako stosunek fluorescencji fali o długości 375/500 nm w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* traktowanych 24 godziny oligomerami α -Syn (5 μ M) mierzono z zastosowaniem białka rekombinowanego pRA306. *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli, ### $p < 0,001$ w stosunku do kontroli traktowanej

oligomerami α -Syn (dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n=18-20$.

Uzyskane wyniki sugerują, że zależny od oligomerów α -Syn spadek poziomu parkiny jest odpowiedzialny za zaburzenia funkcji mitochondriów, co może być bezpośrednią przyczyną śmierci komórek dopaminergicznych. W badaniach zaobserwowano, że 48-godzinna inkubacja z egzogennymi oligomerami α -Syn obniża przeżywalność komórek PC12 o 55%, a nadekspresja parkiny częściowo zapobiega śmierci komórek PC12 traktowanych oligomerami α -Syn (Ryc.35).

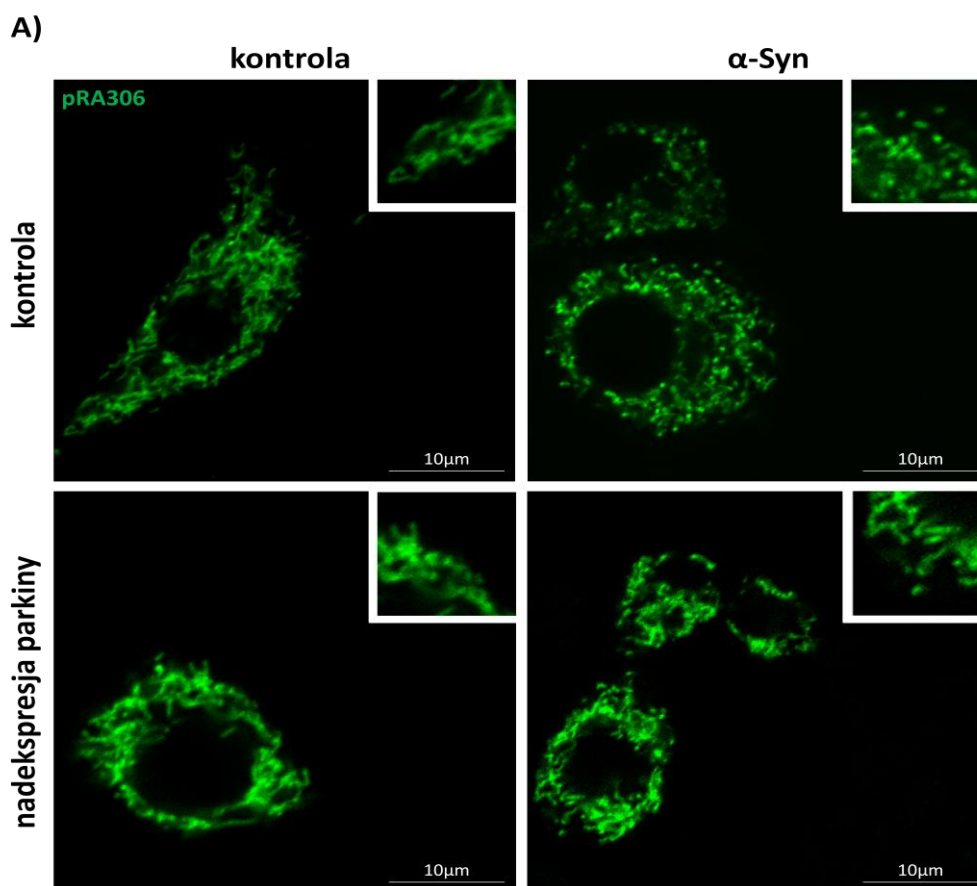


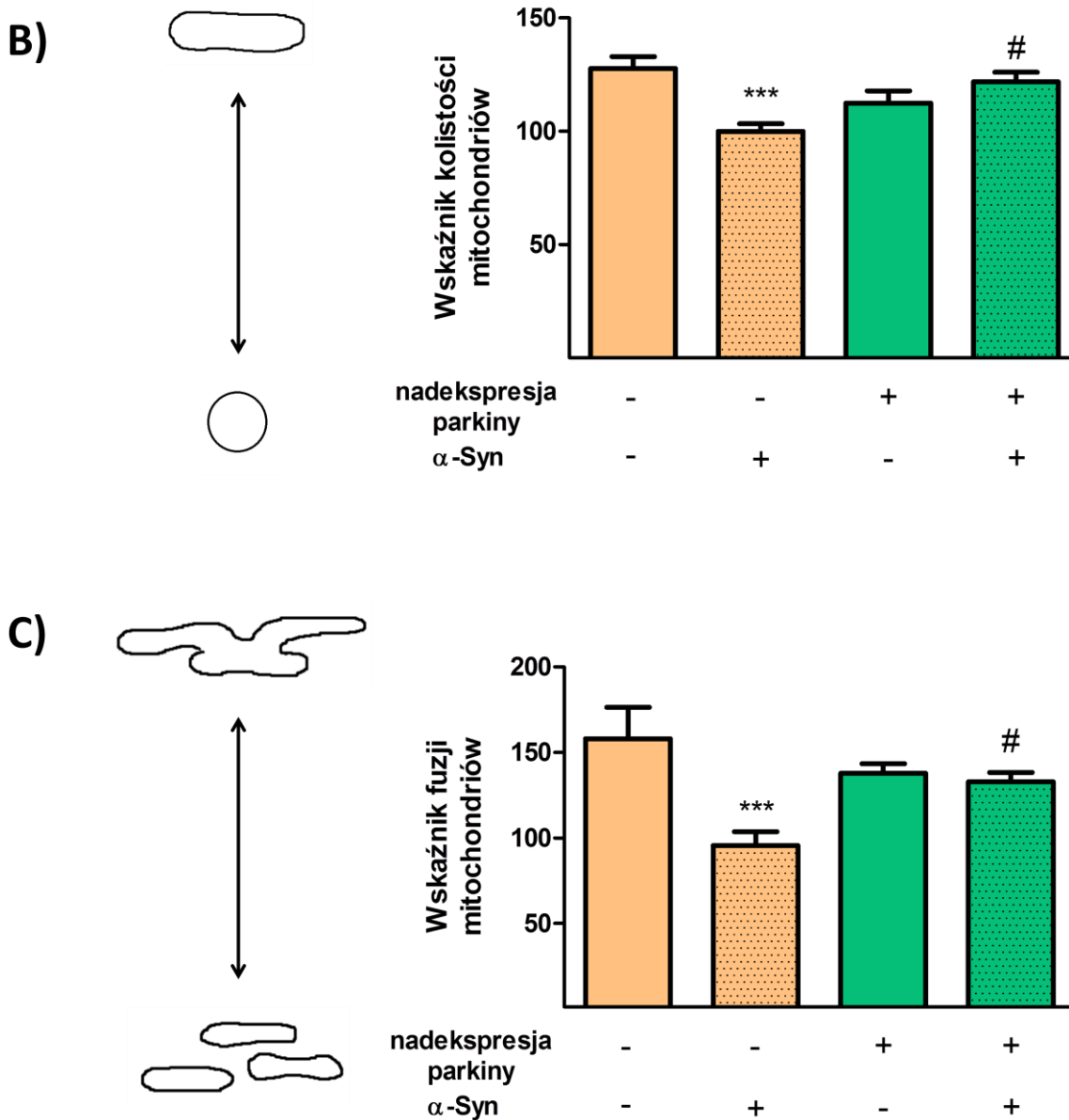
Rycina 35. Analiza przeżywalności komórek PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

Przeżywalność komórek PC12 z nadekspresją genu *PRKN* traktowanych 48 godzin oligomerami α -Syn ($5 \mu\text{M}$) mierzona z zastosowaniem testu kolorymetrycznego MTT. *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli, ## $p < 0,01$ w stosunku do kontroli traktowanej oligomerami α -Syn, &&& $p < 0,001$ w stosunku do komórek z nadekspresją genu *PRKN* (dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n=6-7$.

10.3.3. Wpływ nadekspresji parkiny na wywołane przez oligomery α -synukleiny zaburzenia procesów fuzji i rozszczepienia mitochondriów

Następnie przeprowadzono analizę zmian morfologii sieci mitochondrialnej pod kątem ich fuzji oraz rozszczepienia. Badania w mikroskopie fluorescencyjnym komórek PC12 z nadekspresją mitochondrialnego białka pRA306 wykazały, że 24-godzinna inkubacja z egzogenną α -Syn wywołuje zwiększoną fragmentację mitochondriów w stosunku do warunków kontrolnych, gdzie obserwuje się tworzenie rozległej, połączonej sieci mitochondrialnej (**Ryc.36.A**). Zaobserwowano, że nadekspresja parkiny skutkuje powstaniem struktury „pośredniej”, gdzie obok wydłużonych, połączonych ze sobą mitochondriów, występują również mitochondria pojedyncze, mniejsze i kuliste. Podobny obraz struktury mitochondrialnej obserwuje się w komórkach z nadekspresją genu *PRKN* traktowanych α -Syn (**Ryc.36.A**). Analiza morfometryczna sieci mitochondrialnych z wykorzystaniem programu ImageJ wykazała, że zwiększenie poziomu parkiny w komórkach PC12 częściowo zapobiega wywołanemu przez α -Syn tworzeniu mniejszych, sferycznie ukształtowanych mitochondriów (**Ryc.36.B**) oraz zwiększa ich fuzję (**Ryc.36.C**).

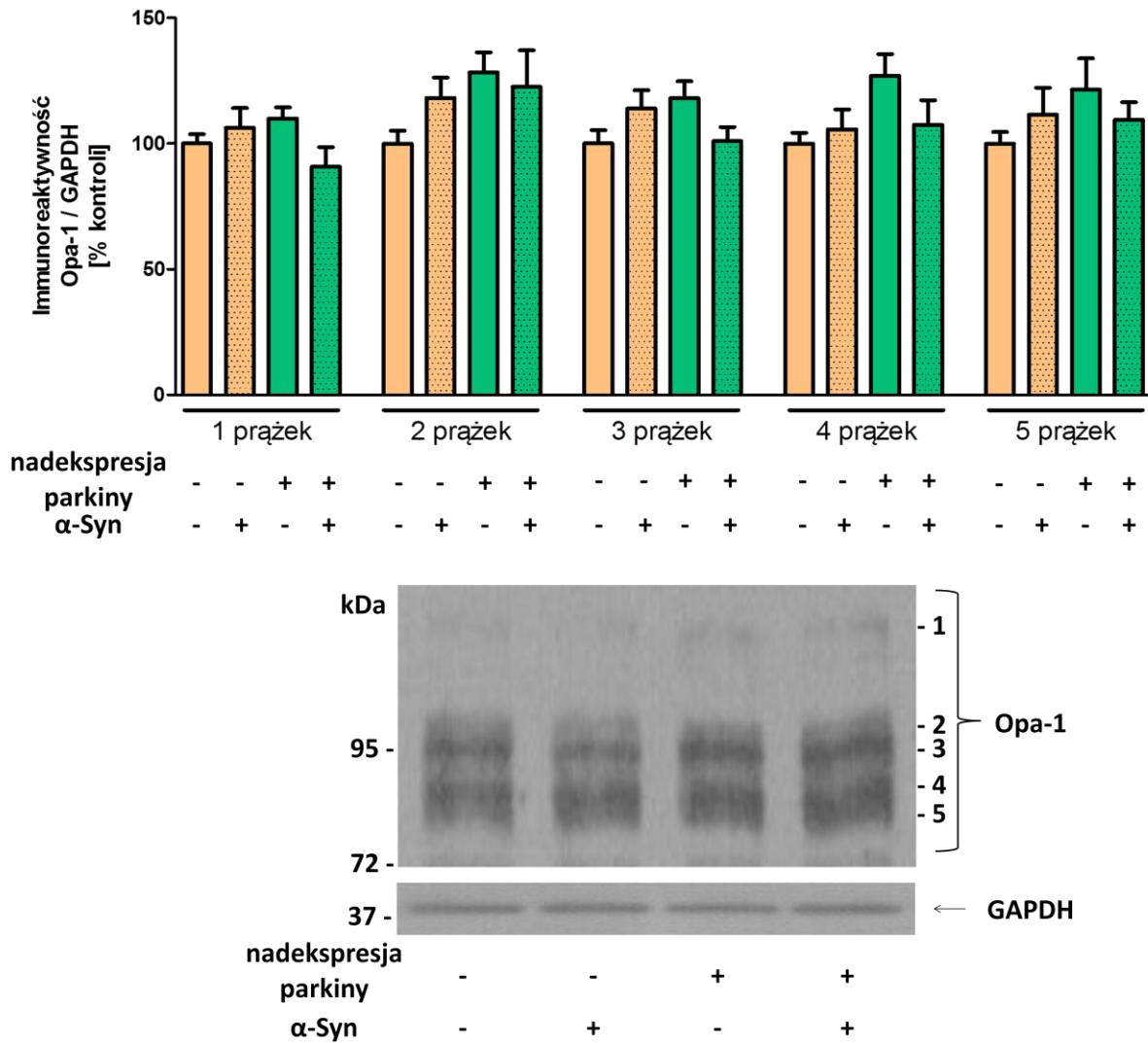




Rycina 36. Analiza morfologii mitochondriów w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

Morfologię mitochondriów (A), wskaźnik kolistości (B) oraz wskaźnik fuzji mitochondriów (C) komórek PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddanych 24-godzinnemu działaniu egzogennych oligomerów α -Syn ($5 \mu\text{M}$) badano z zastosowaniem białka rekombinowanego pRA306 (A) oraz barwnika fluorescencyjnego MitoTracker Green (B, C) przy użyciu mikroskopii konfokalnej oraz programu Image J. A) Mikrofotografie w prawym górnym rogu są powiększeniem głównych obrazów. B) *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli, # $p < 0,05$ w stosunku do kontroli traktowanej oligomerami α -Syn (dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n=17-20$. C) *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli; # $p < 0,05$ w stosunku do kontroli traktowanej oligomerami α -Syn (dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n=17-20$.

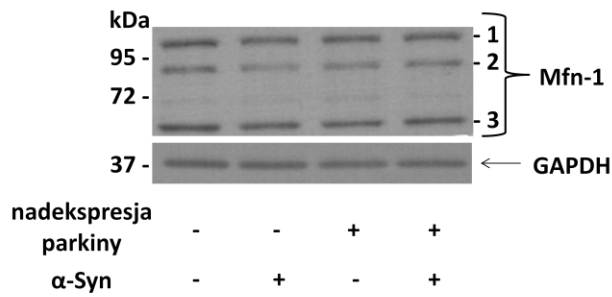
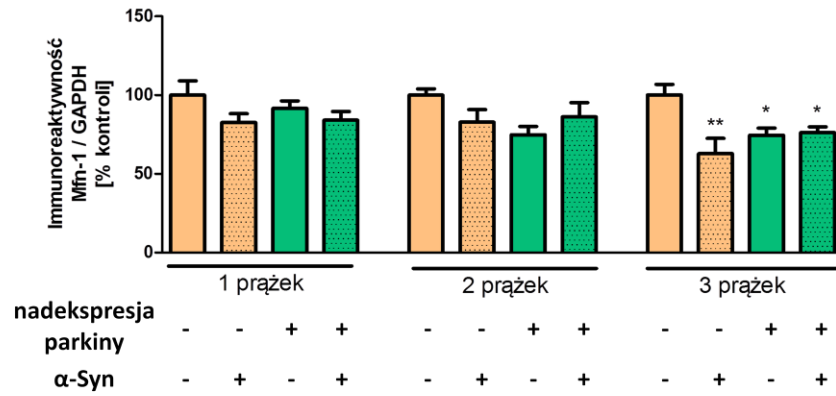
Konsekwentnie przeprowadzono analizę poziomu białek biorących udział w procesach fuzji (Opa-1, Mfn-1 i Mfn-2) i rozszczepienia (Drp-1) mitochondriów. Wykazano, że egzogenne oligomery α -Syn i nadekspresja parkiny nie wpływają na poziom długich i krótkich izoform białka Opa-1 (**Ryc.37**) oraz ~ 100 kDa i ~ 80 kDa izoform białka Mfn-1 (**Ryc.38.A**). Jednakże zarówno egzogenna α -Syn, jak również nadekspresja parkiny, prowadzą do obniżenia poziomu najkrótszej (~ 60 kDa) izoformy białka Mfn-1 (**Ryc.38.A**). W przypadku Mfn-2 egzogenna α -Syn wywołuje spadek poziomu izoformy o masie 85 kDa, ale pozostaje bez istotnego wpływu na poziom krótszej izoformy. Z kolei nadekspresja parkiny wywołuje znaczne obniżenie poziomu zarówno dłuższej jak i krótszej izoformy Mfn-2 (**Ryc.38.B**). Ponadto wyniki niniejszej pracy wykazały, że zarówno nadekspresja parkiny, jak i traktowanie egzogenną α -Syn nie wpływa na poziom białka Drp-1 (**Ryc.39**).



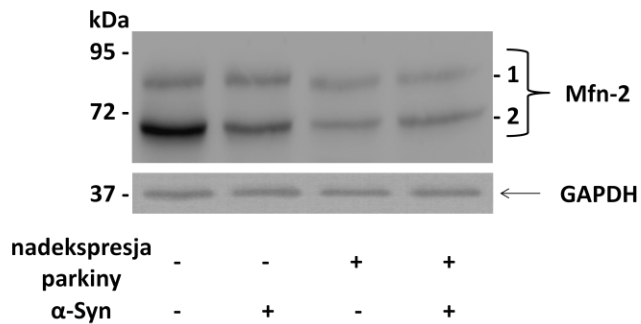
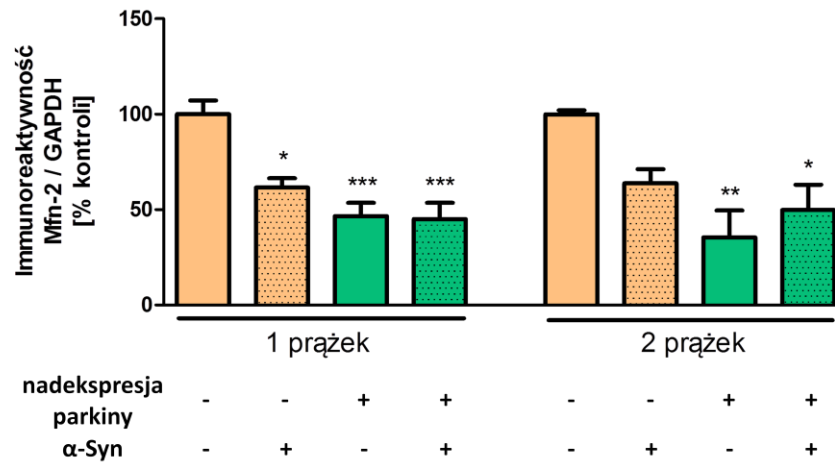
Rycina 37. Analiza immunoreaktywności białka Opa-1 w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

Stosunek immunoreaktywności *Opa-1* do *GAPDH* w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -Syn ($5 \mu\text{M}$) przez 24 godziny badano z zastosowaniem metody Western blot. Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli. $n=15-17$.

A)

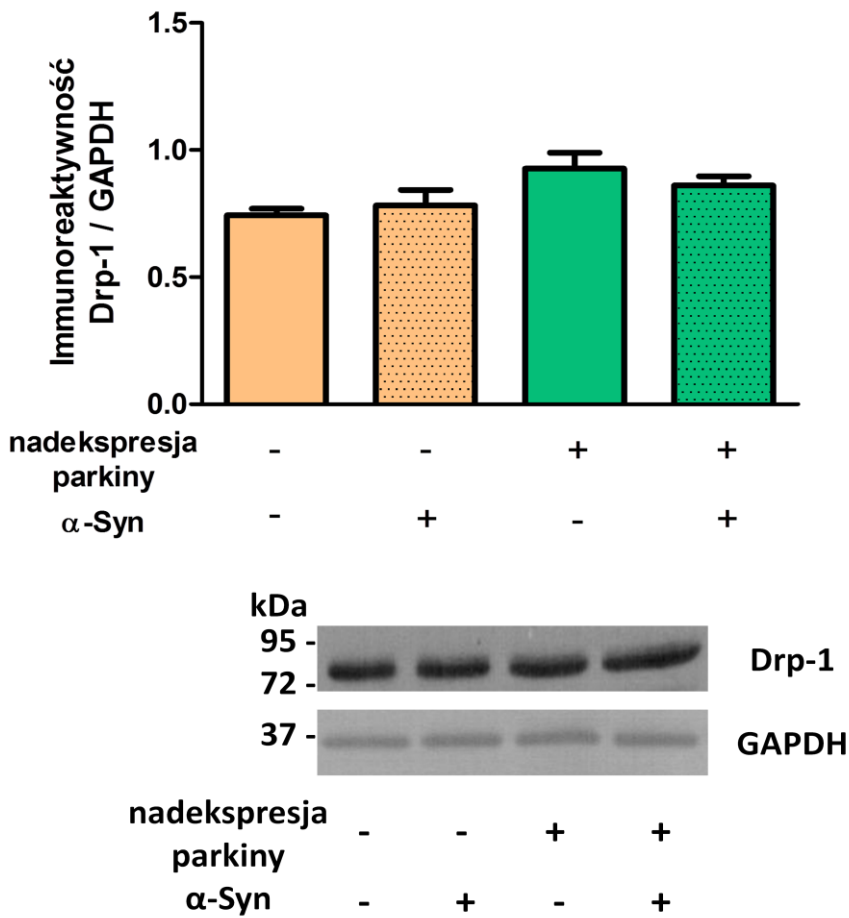


B)



Rycina 38. Analiza immunoreaktywności białek Mfn-1 oraz Mfn-2 w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

Stosunek immunoreaktywności *Mfn-1* (A) i *Mfn-2* (B) do *GAPDH* w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -Syn (5 μ M) przez 24 godziny badano z zastosowaniem metody Western blot. Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli (dwuczynnikowa analiza wariacji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n = 15-17$.



Rycina 39. Analiza immunoreaktywności białka Drp-1 w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

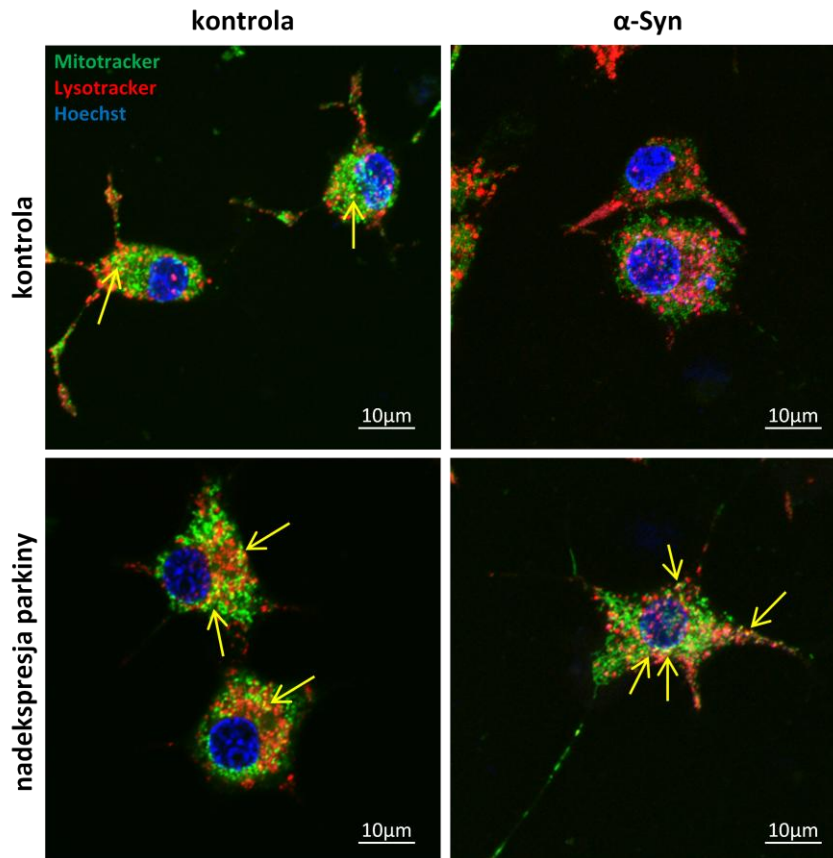
Stosunek immunoreaktywności *Drp-1* do *GAPDH* w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -Syn (5 μ M) przez 24 godziny badano z zastosowaniem metody Western blot. Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej, $n = 15-17$.

10.3.4. Wpływ nadekspresji parkiny na wywołane przez oligomery α -synukleiny zaburzenia mitofagii i biogenezy mitochondriów

Fragmentacja mitochondriów umożliwia kontrolę ich jakości poprzez odłączanie wadliwych fragmentów sieci mitochondrialnej i ich degradację na drodze mitofagii czyli autofagii mitochondriów. Proces ten jest ściśle zależny od parkiny, zachodzi w autofago-lizosomach i zapobiega akumulacji uszkodzonych, starych lub mało wydajnych mitochondriów.

W celu zbadania, czy egzogenna α -Syn zaburza proces mitofagii poprzez modulację funkcji parkiny, komórki PC12 po 24-godzinnej inkubacji z oligomerami α -Syn poddano analizie w mikroskopie konfokalnym z zastosowaniem odpowiednich barwników fluorescencyjnych. Mitochondria wyznakowano barwnikiem MitoTracker Green, który jest zielonym fluorescencyjnym związkiem lokalizującym się selektywnie w mitochondriach niezależnie od ich potencjału błonowego. W mitochondriach MitoTracker Green zostaje kowalencyjnie związany z białkami i pozostaje w tych organellach niezależnie od stopnia ich depolaryzacji, czy fragmentacji. Poza znakowaniem MitoTracker Green, komórki wybarwiono również sondą LysoTracker Red składającą się z czerwonego fluoroforu połączonego ze słabą zasadą, która jest odłączana w środowisku o niskim pH. Dzięki temu sonda LysoTracker Red jest wysoce selektywna dla organelli o kwaśnym odczynie takich jak lizosomy i autofago-lizosomy. Pojawienie się żółtego zabarwienia w wyniku zastosowania sond MitoTracker Green i LysoTracker Red, świadczy o kolokalizacji mitochondriów z lizosomami, co może sugerować aktywację procesu usuwania mitochondriów na drodze mitofagii. Jądra komórkowe wybarwiano za pomocą barwnika Hoechst 33342 (kolor niebieski).

Przeprowadzone badania wykazały brak wyraźnej kolokalizacji MitoTracker Green i LysoTracker Red w komórkach PC12 traktowanych egzogennymi oligomerami α -Syn w porównaniu do kontroli, co sugeruje zaburzenia procesu mitofagii (**Ryc.40**). Jednocześnie zaobserwowano kolokalizację MitoTracker Green z LysoTracker Red w komórkach z nadekspresją parkiny, co wskazuje na aktywację zależnej od parkiny mitofagii (**Ryc.40**).

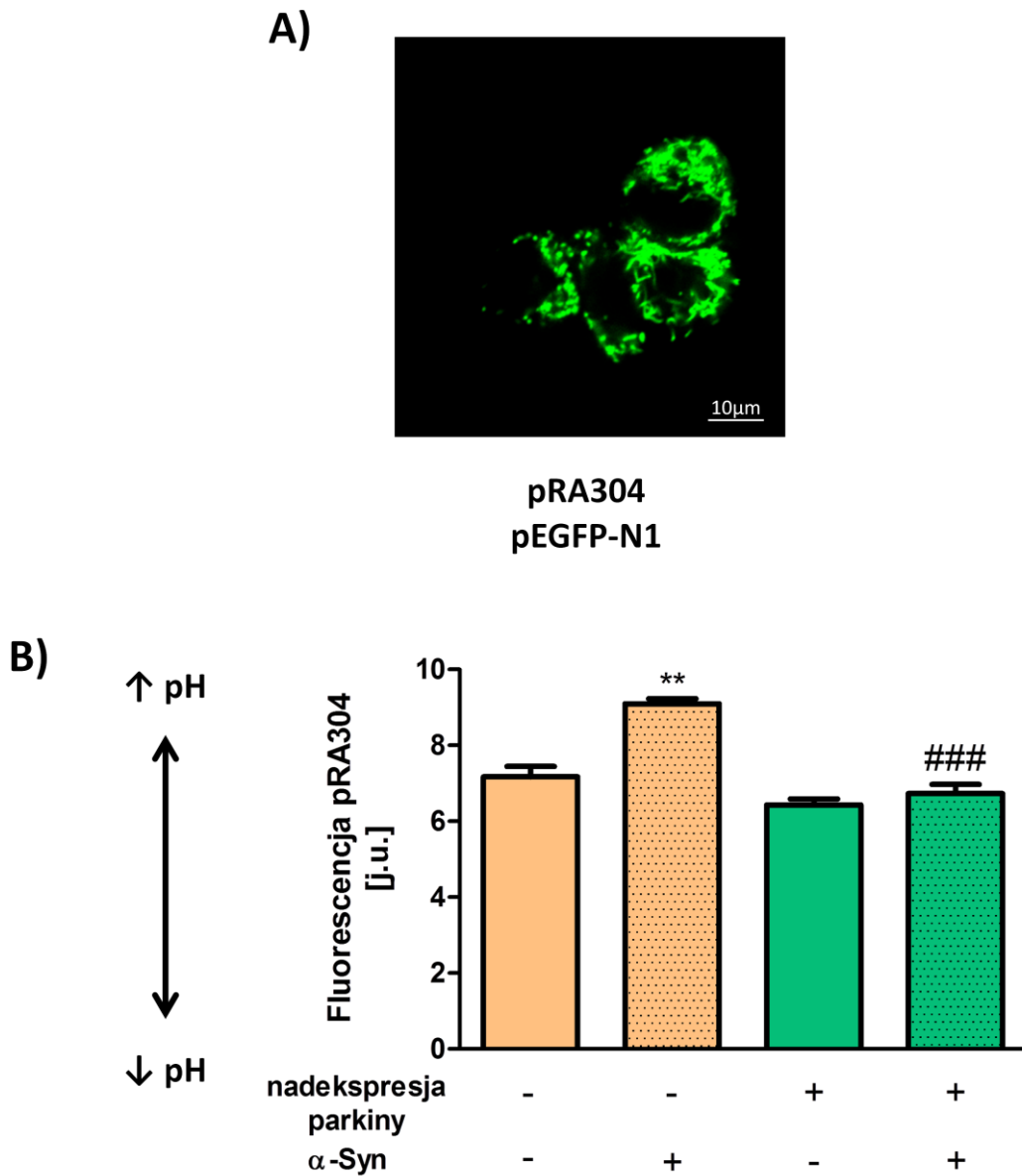


Rycina 40. Analiza kolokalizacji mitochondriów oraz lizosomów w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

Kolokalizację mitochondriów (zielony) oraz lizosomów (czerwony) w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -Syn ($5 \mu\text{M}$) przez 24 godziny badano z zastosowaniem specyficznych barwników fluorescencyjnych, odpowiednio MitoTracker Green i LysoTracker Red. Jądra barwiono przy użyciu Hoechst 33342 (niebieski). Strzałki wskazują miejsca kolokalizacji mitochondriów z lizosomami (żółty), $n=7-9$.

Mając na uwadze pewne ograniczenia metody mikroskopowej, np. możliwość losowego nakładania się organelli w płaszczyźnie przekrojów konfokalnych, postanowiono wykonać dodatkową analizę z wykorzystaniem komórek PC12 z nadekspresją parkiny transfekowanych wrażliwym na zmiany pH białkiem GFP zlokalizowanym w mitochondriach (pRA304) (**Ryc.41.A**). Wykazano, że traktowanie komórek PC12 egzogenną α -Syn prowadzi do wzrostu emisji fluorescencji białka pRA304 w porównaniu do komórek kontrolnych, co wskazuje na wzrost pH w mitochondriach w wyniku osłabienia ich fuzji z lizosomami (**Ryc.41.B**). Jednocześnie wykazano, że nadekspresja parkiny obniża fluorescencję białka

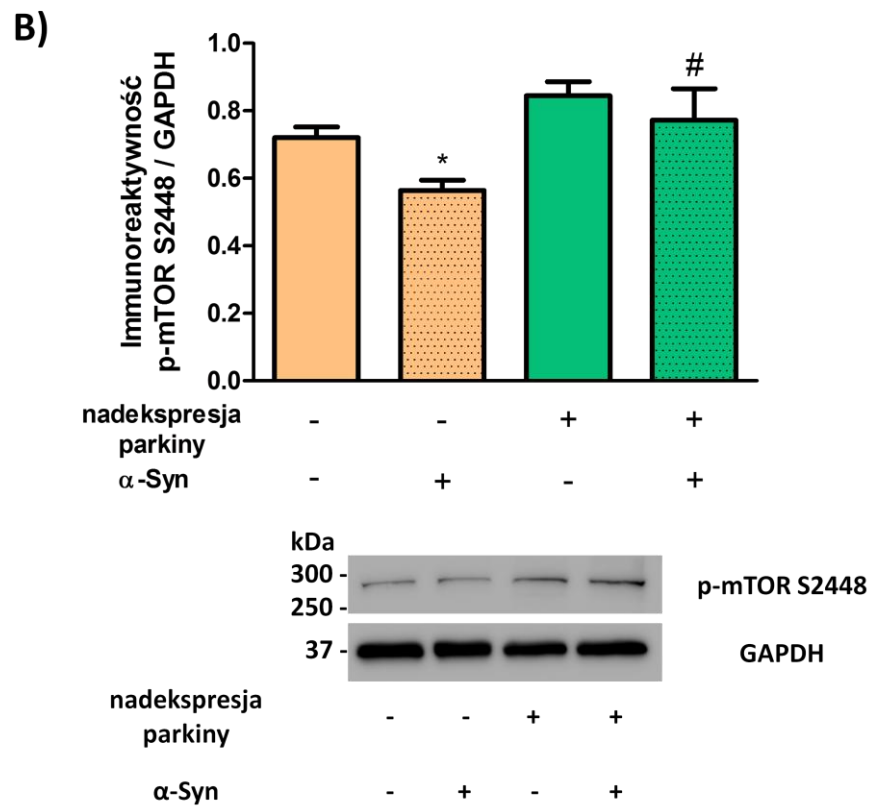
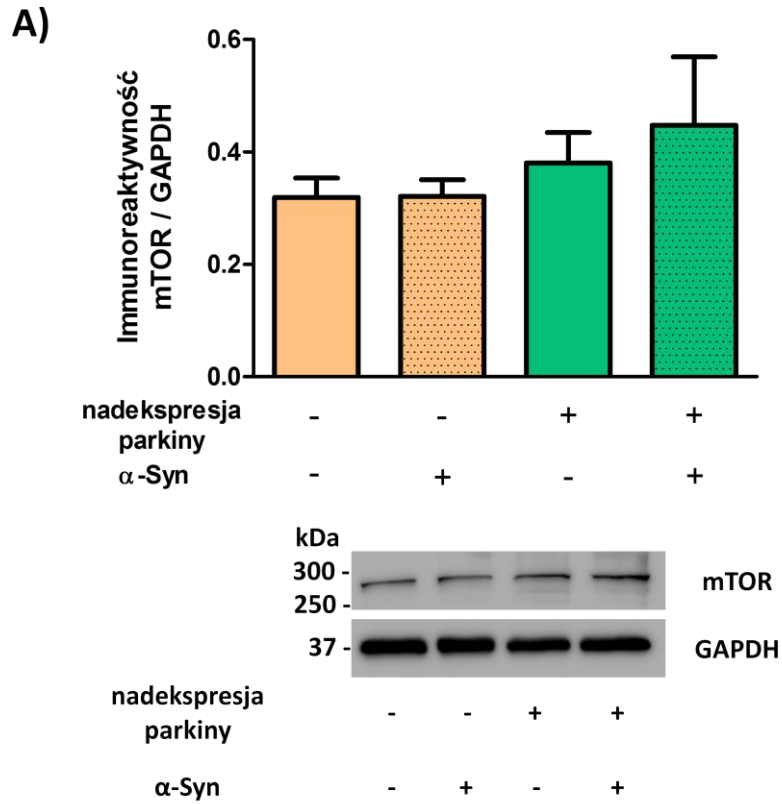
pRA304 w komórkach traktowanych α -Syn, co świadczy o spadku pH w mitochondriach i aktywacji procesu mitofagii (Ryc.41.B).

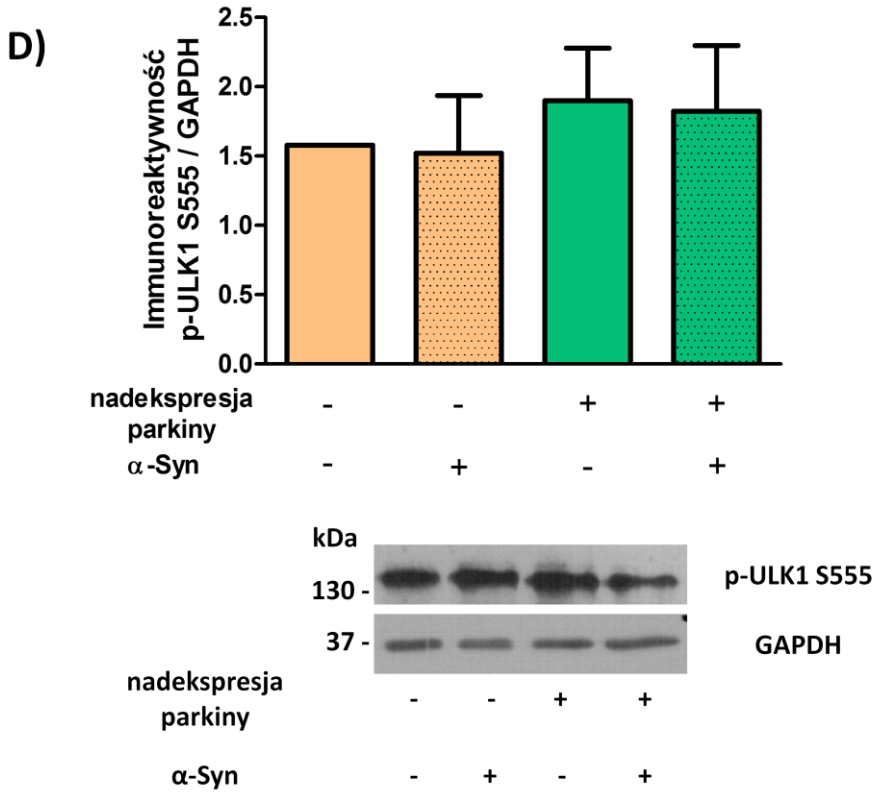
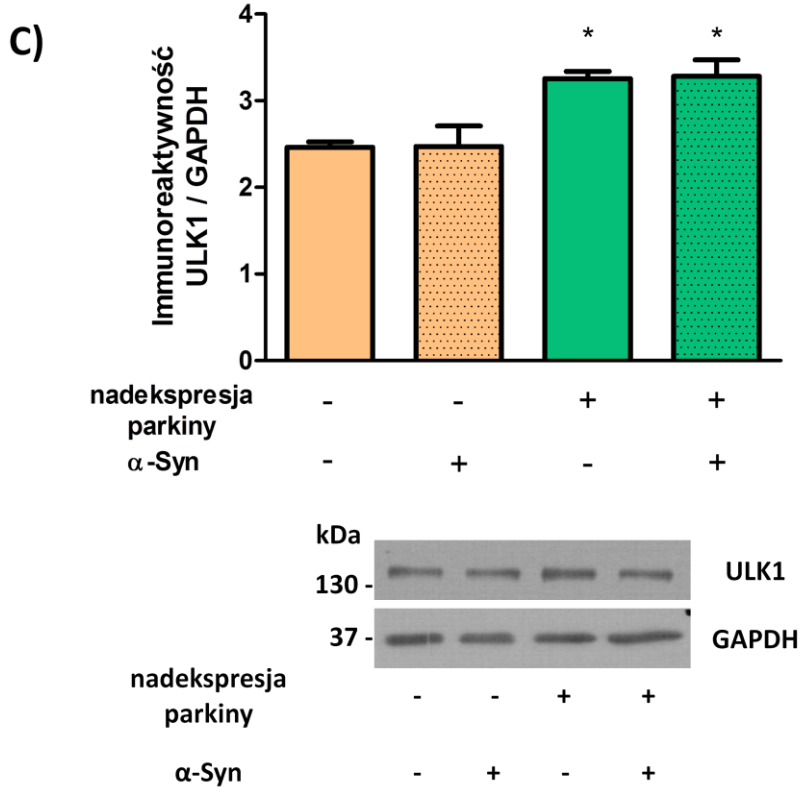


Rycina 41. Analiza poziomu mitochondrialnego pH w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

Poziom mitochondrialnego pH w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* traktowanych 24 godziny oligomerami α -Syn ($5 \mu\text{M}$) mierzono z zastosowaniem fluorescencyjnego białka rekombinowanego pRA304. **A)** Reprezentatywna mikrofotografia komórek PC12 po transfekcji wektorem pEGFP-N1 z genem kodującym białko pRA304. **B)** $**p < 0,01$ w stosunku do kontroli, $###p < 0,001$ w stosunku do kontroli traktowanej oligomerami α -Syn (dwuczynnikowa analiza wariacji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n=6-8$.

Uzyskane wyniki sugerują, że zależne od egzogennej α -Syn zaburzenia parkiny prowadzą do zakłócenia procesu mitofagii w komórkach PC12. W celu określenia molekularnych mechanizmów leżących u podstaw tego zjawiska oznaczono poziom i aktywację białek regulujących proces mitofagii. Wykazano, że oligomery α -Syn nie wpływają na poziom białka mTOR, które jest negatywnym regulatorem autofagii i biogenezy lizosomów (**Ryc.42.A**). W obecności oligomerów α -Syn zaobserwowano natomiast około 40% spadek fosforylacji mTOR na serynie 2448 (S2448), co wskazuje na spadek aktywności tego enzymu (**Ryc.42.B**). Ponadto inkubacja z egzogennymi oligomerami α -Syn nie powodowała istotnych zmian w immunoreaktywności białka ULK1, odpowiedzialnego za stymulację procesu mitofagii (**Ryc.42.C**). α -Syn nie powodowała również istotnych zmian w fosforylacji tego białka na serynie 555 (S555) (**Ryc.42.D**). Nadekspresja parkiny nie miała istotnego wpływu na całkowity poziom mTOR (**Ryc.42.A**), ale zapobiegała wywołanemu przez α -Syn spadkowi immunoreaktywności ufosforylowanej formy tego białka (**Ryc.42.B**). Zwiększenie poziomu parkiny w komórkach PC12 w warunkach kontrolnych, jak również po traktowaniu α -Syn skutkowało istotnym wzrostem poziomu białka ULK1 (**Ryc.42.C**), ale nie wpływało na poziom jego fosforylacji (**Ryc.42.D**).

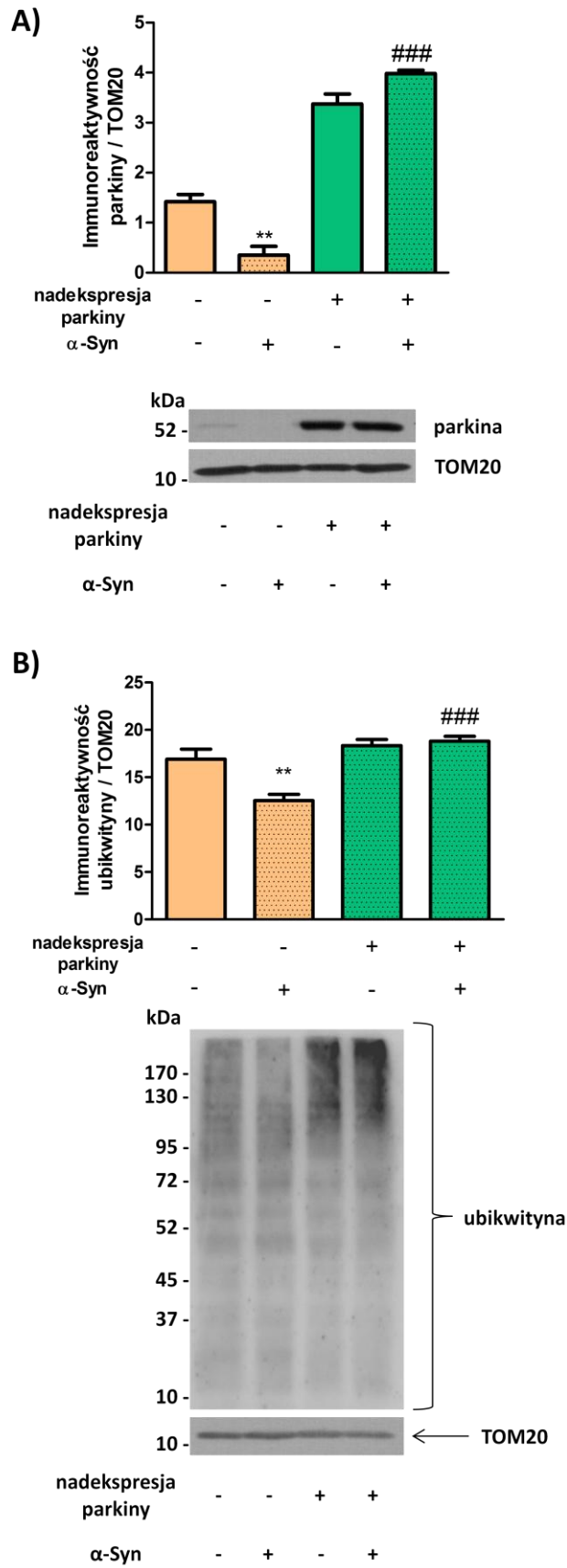




Rycina 42. Analiza immunoreaktywności białek biorących udział w regulacji inicjacji tworzenia autofagosomów w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

*Stosunek immunoreaktywności białka mTOR (A), ufosforylowanego na serynie 2448 białka mTOR (p-mTOR S2448) (B), ULK1 (C) oraz ufosforylowanego na serynie 555 białka ULK1 (p-ULK1 S555) (D) do GAPDH w komórkach PC12 z nadekspresją genu PRKN poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -Syn (5 μ M) przez 24 godziny badano z zastosowaniem metody Western blot. Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej. B) * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli, # $p < 0,05$ w stosunku do kontroli traktowanej oligomerami α -Syn (dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n = 7-9$. C) * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli (dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n = 3$.*

W warunkach spadku mitochondrialnego potencjału błonowego parkina ulega translokacji do uszkodzonych mitochondriów, gdzie katalizuje ubikwitynację białek mitochondrialnych zlokalizowanych na zewnętrznej błonie mitochondrialnej, co stanowi swoiste „znakowanie” mitochondriów przeznaczonych do degradacji. Jest to pierwszy, a zarazem najbardziej istotny etap procesu mitofagii. W celu określenia, czy wywołane działaniem α -Syn obniżenie poziomu parkiny może skutkować zaburzeniem ubikwitynacji uszkodzonych mitochondriów, 24 godziny po inkubacji z egzogenną α -Syn, z komórek PC12 kontrolnych i transfekowanych parkiną wyizolowano frakcję mitochondrialną i oznaczono poziom parkiny oraz ubikwityny. Analiza Western blot wykazała, że oligomery α -Syn obniżają poziom mitochondrialnej parkiny o około 75% (**Ryc.43.A**) oraz powodują spadek ubikwitynacji mitochondriów o około 25% (**Ryc.43.B**). Jednocześnie zaobserwowano, że nadekspresja parkiny skutkuje istotnym zwiększeniem poziomu tego białka we frakcji mitochondrialnej (**Ryc.43.A**), co prowadzi do wzrostu ubikwitynacji białek mitochondrialnych i odwraca niekorzystne działanie egzogennych oligomerów α -Syn (**Ryc.43.B**).

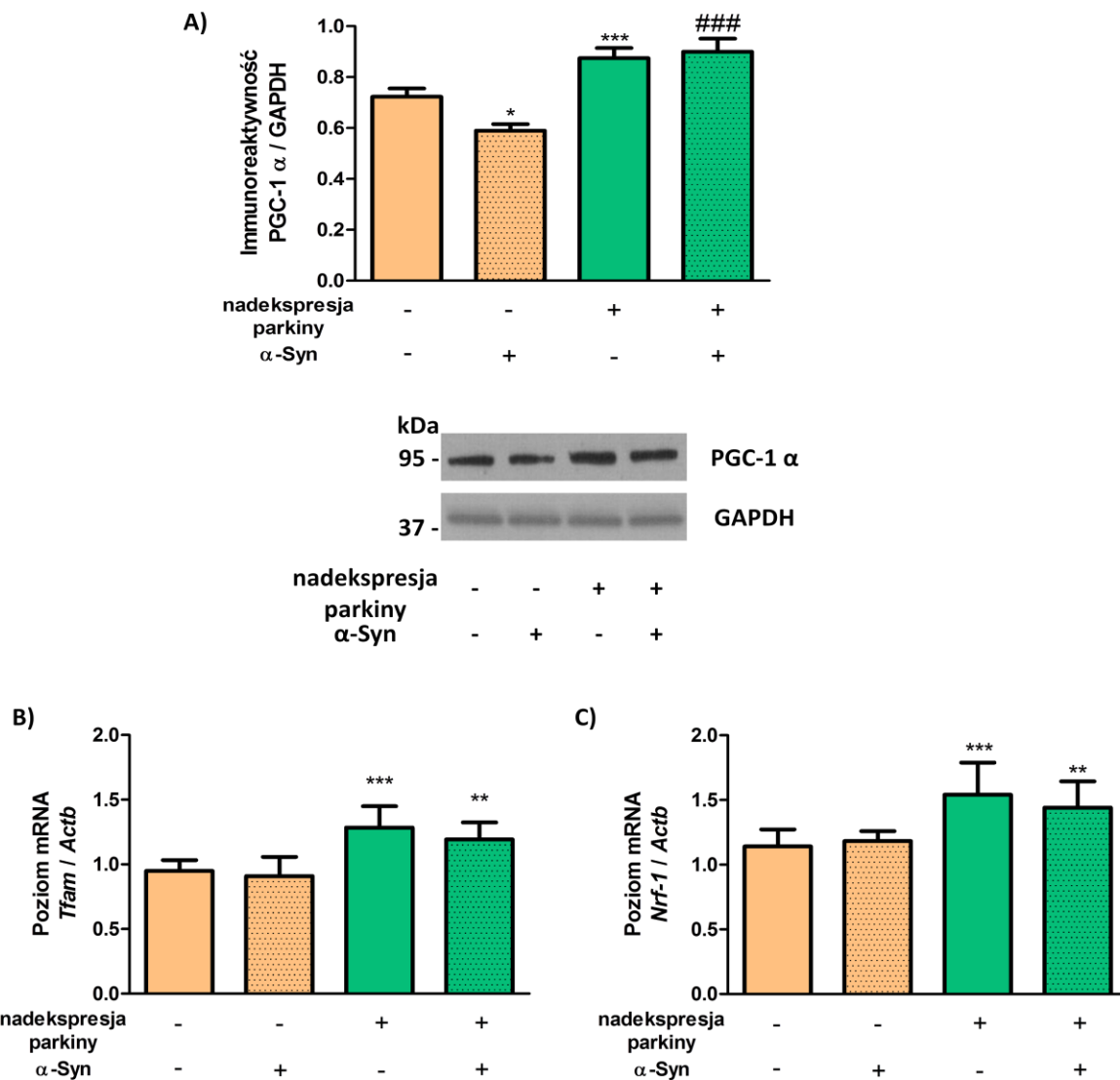


Rycina 43. Analiza immunoreaktywności białek frakcji mitochondrialnej w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

*Stosunek immunoreaktywności parkiny (A) oraz ubikwityny (B) do TOM20 we frakcji mitochondrialnej komórek PC12 z nadekspresją genu *PRKN* traktowanych 24 godziny oligomerami α -Syn (5 μ M) oznaczano z zastosowaniem metody Western blot. Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej. ** $p < 0,01$ w stosunku do kontroli, ### $p < 0,001$ w stosunku do komórek kontrolnych traktowanych oligomerami α -Syn (dwuczynnikowa analiza wariacji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n=6-8$.*

Kondycja i stan sieci mitochondrialnej są ściśle zależne od biogenezy mitochondriów, czyli ich syntezy *de novo*. Proces biogenezy mitochondriów jest regulowany m.in. przez czynniki transkrypcyjne PGC-1 α , Nrf-1 (ang. nuclear respiratory factor-1) oraz TFAM. PGC-1 α reguluje ekspresję wielu białek zaangażowanych w regulację metabolizmu energetycznego komórki oraz jest głównym regulatorem procesu biogenezy mitochondriów. Z kolei Nrf-1 odpowiada za regulację ekspresji białek kodowanych zarówno przez DNA mitochondrialne jak i genomowe, a TFAM jest czynnikiem transkrypcyjnym regulującym ekspresję genów zakodowanych na mitochondrialnym DNA.

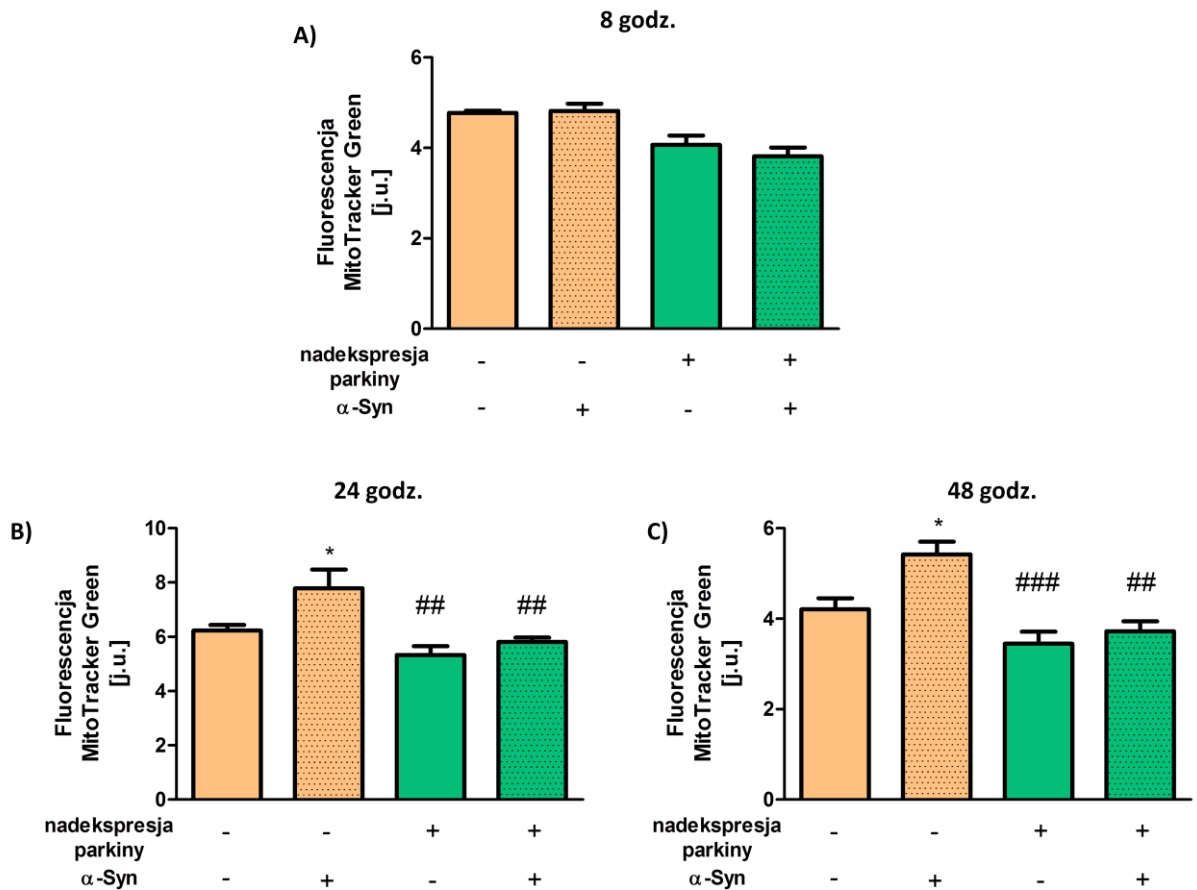
W celu określenia wpływu oligomerów α -Syn na proces biogenezy mitochondriów, 24 godziny po traktowaniu egzogennymi oligomerami α -Syn oznaczono poziom białka PGC-1 α oraz ekspresję genów kodujących czynniki transkrypcyjne Nrf-1 i TFAM (**Ryc.44**). Zaobserwowano, że egzogenna α -Syn powoduje znamienny spadek immunoreaktywności PGC-1 α (**Ryc.44.A**), ale pozostaje bez wpływu na ekspresję *Tfam* i *Nrf-1* (**Ryc.44.B**, **Ryc.44.C**). Wykazano, że nadekspresja parkiny znamiennie zwiększa immunoreaktywność białka PGC-1 α w stosunku do kontroli, a traktowanie α -Syn pozostaje bez wpływu na ten wzrost (**Ryc.44.A**). Podobnie w komórkach z nadekspresją parkiny zaobserwowano zwiększony w stosunku do kontroli poziom mRNA dla TFAM i Nrf-1 (**Ryc.44.B**, **Ryc.44.C**).



Rycina 44. Analiza ekspresji białek zaangażowanych w proces biogenezy mitochondriów w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

A) Stosunek immunoreaktywności białka PGC-1 α do GAPDH w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* traktowanych 24 godziny oligomerami α -Syn ($5 \mu\text{M}$) oznaczano z zastosowaniem metody Western blot. Dane uzyskano na drodze analizy densytometrycznej. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli, ### $p < 0,001$ w stosunku do komórek kontrolnych traktowanych oligomerami α -Syn (dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n = 14-16$. Poziom ekspresji genów *Tfam* (**B**) oraz *Nrf-1* (**C**) w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* traktowanych 24 godziny oligomerami α -Syn ($5 \mu\text{M}$) mierzono metodą qRT-PCR. Wyniki normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli (dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n = 6-8$.

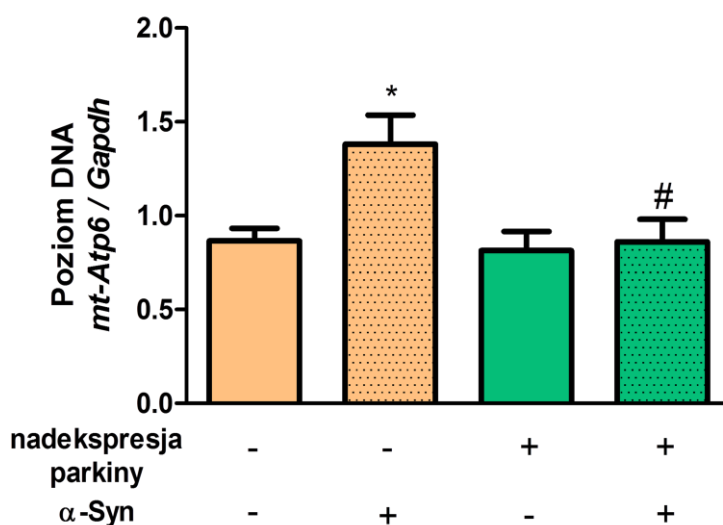
Zaburzenie równowagi pomiędzy procesami mitofagii i biogenezy mitochondriów może prowadzić do akumulacji uszkodzonych mitochondriów. Wobec powyższego, aby zbadać wpływ egzogennej α -Syn na ilość mitochondriów, komórki PC12 z nadekspresją genu *PRKN* traktowano przez 8, 24 i 48 godzin oligomerami α -Syn, a następnie barwiono przy użyciu barwnika fluorescencyjnego MitoTracker Green (**Ryc.45**). Jak już wspomniano wcześniej, związek ten wybarwia selektywnie mitochondria niezależnie od ich potencjału i stopnia fragmentacji, a intensywność jego fluorescencji jest wprost proporcjonalna do ilości mitochondriów. Badania wykazały, że w wyniku 8-godzinnej inkubacji z oligomerami α -Syn nie dochodzi do zmian fluorescencji MitoTracker Green zarówno w komórkach z nadekspresją parkiny jak również w grupie kontrolnej (**Ryc.45.A**). Natomiast po 24 oraz 48 godzinach zaobserwowano znamienne wzrost ilości mitochondriów w komórkach kontrolnych traktowanych α -Syn (**Ryc.45.B, Ryc.45.C**). Ponadto zaobserwowano, że nadekspresja parkiny zapobiega wywołanemu przez α -Syn wzrostowi fluorescencji MitoTracker Green (**Ryc.45.B, Ryc.45.C**).



Rycina 45. Analiza ilości mitochondriów w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* traktowanych oligomerami α -synukleiny.

Ilość mitochondriów w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* traktowanych 8 (A), 24 (B) i 48 godzin (C) oligomerami α -Syn (5 μ M) badano z zastosowaniem cytometrii przepływowej oraz sondy fluorescencyjnej MitoTracker Green. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli, ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ w stosunku do kontroli traktowanej oligomerami α -Syn (dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n = 5-7$.

Ilość mitochondriów w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* traktowanych oligomerami α -Syn określono również na podstawie stosunku ilości DNA mitochondrialnego do DNA genomowego, analizując gen kodujący mitochondrialną ATPazę - *mt-Atp6* znajdujący się na mitochondrialnym DNA oraz gen *Gapdh* zakodowany na DNA jądrowym. Badania wykazały, że 24-godzinna inkubacja komórek PC12 z oligomerami α -Syn skutkuje 60% wzrostem ilości mitochondrialnego DNA, podczas gdy w komórkach PC12 z nadekspresją parkiny traktowanych oligomerami α -Syn nie obserwuje się zmian stosunku *mt-Atp6* do *Gapdh* (Ryc.46).



Rycina 46. Analiza poziomu mitochondrialnego oraz jądrowego DNA w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddanych działaniu egzogennych oligomerów α -synukleiny.

Poziom mitochondrialnego oraz jądrowego DNA w komórkach PC12 z nadekspresją genu *PRKN* poddanych 24-godzinnemu działaniu egzogennych oligomerów α -Syn ($5 \mu\text{M}$) oceniano na podstawie genów kodujących odpowiednio mitochondrialną syntazę ATP (*mt-Atp6*) oraz GAPDH (*Gapdh*) z zastosowaniem metody qRT-PCR. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli, # $p < 0,05$ w stosunku do kontroli traktowanej oligomerami α -Syn (dwuczynnikowa analiza wariacji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego), $n=4-5$.

11. DYSKUSJA

Chociaż utrata fizjologicznych funkcji parkiny, jak również uwalnianie α -Syn z komórek do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i jej rozprzestrzenianie się oraz oligomeryzacja, są kluczowymi mechanizmami związanymi z powstawaniem i rozwojem ChP, niewiele badań wskazuje na funkcjonalne zależności pomiędzy tymi białkami. Do chwili obecnej nie badano wpływu zewnątrzkomórkowych oligomerów α -Syn na aktywność, ekspresję oraz modyfikacje potranslacyjne parkiny. Najistotniejszym osiągnięciem niniejszej pracy było wykazanie, że stres nitrozacyjny wywołany przez egzogenne oligomery α -Syn powoduje S-nitrozylację parkiny i jej degradację, a wywołana przez α -Syn deregulacja tego enzymu jest częściowo odpowiedzialna za zaburzenie dynamiki, funkcji oraz cyklu życiowego mitochondriów w komórkach dopaminergicznych. Wcześniejsze doniesienia wykazały, że stres oksydacyjny oraz nitrozacyjny mogą wywoływać modyfikacje potranslacyjne parkiny, takie jak sulfonacja bądź S-nitrozylacja (Yao i wsp., 2004; Meng i wsp., 2011; Chung i wsp., 2004). Ponadto w badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że podanie toksyn indukujących objawy ChP (MPP⁺, rotenon, 6-hydroksydopamina, parakwat) wywołuje agregację parkiny i w konsekwencji jej inaktywację, co skutkuje śmiercią komórek nerwowych (Wang i wsp., 2005; Meng i wsp., 2011; Kawahara i wsp., 2008). Co więcej, badania sugerują, że pod wpływem stresu oksydacyjnego w neuronach dochodzi do akumulacji parkiny, a proces ten jest zależny od endogennej puli α -Syn (Kawahara i wsp., 2008). Badania przedstawione w niniejszej pracy, wskazując na funkcjonalne powiązanie między oligomerami α -Syn a S-nitrozylacją parkiny w komórkach dopaminergicznych, korespondują z wynikami uzyskanymi przez inne zespoły badawcze, a ponadto rozszerzają wcześniejsze doniesienia poprzez pokazanie, że egzogenna α -Syn jest bezpośrednim czynnikiem wywołującym modyfikacje potranslacyjne i spadek poziomu parkiny w komórkach dopaminergicznych.

11.1. Molekularne mechanizmy toksyczności egzogennych oligomerów α -synukleiny

Dotychczasowe dane wskazują, że uwolnione do przestrzeni zewnątrzkomórkowej oligomery α -Syn wywierają najsilniejsze cytotoksyczne działanie na komórki dopaminergiczne szlaku czarno-prążkowiowego i prowadzą do zaburzeń funkcji motorycznych obserwowanych w ChP (Jang i wsp., 2010; Lee i wsp., 2011). Zgodnie z tymi odkryciami podanie ekstraktów zawierających zagregowaną α -Syn do śródmózgowia myszy zainicjowało rozwój zmian w anatomicznie połączonych regionach mózgu, jak również dysfunkcje motoryczne i neurodegenerację (Luk i wsp., 2009; Mougenot i wsp., 2012). Badania niniejszej pracy wykazały, że w wyniku inkubacji komórek dopaminergicznych PC12 z egzogennymi oligomerami α -Syn zwiększeniu ulega endogenna pula tego białka. Uzyskane wyniki korelują z wcześniejszymi danymi wskazującymi, że zewnątrzkomórkowe oligomery mogą wchodzić w interakcję z endogenną α -Syn inicjując jej oligomeryzację (Angot i wsp., 2012; Luk i wsp., 2012a; Luk i wsp., 2012b; Masuda-Suzukake i wsp., 2013). Obecność α -Syn wykryto nie tylko w cytosolu i w jądrze komórkowym, ale również w mitochondriach i w ER. Sugeruje się, że poprzez bezpośrednie oddziaływanie na mitochondria i błony ER oligomery α -Syn mogą indukować zaburzenia tych organelli oraz śmierć komórek nerwowych (Ludtmann i wsp., 2017; Bengoa-Vergniory i wsp., 2017; Plotegher i wsp., 2014; Luth i wsp., 2014; Guardia-Laguarta i wsp., 2014).

Dane ostatnich lat wskazują jednak, że cytotoksyczny wpływ egzogennej α -Syn na komórki neuronalne nie jest wyłącznie związany z przedostawaniem się tego białka do wnętrza tychże komórek (Melachroinou i wsp., 2013), ale w znaczącym stopniu zależy od pobudzenia receptorów w błonie komórkowej, z których większość stanowią kanały wapniowe (Wilkaniec i wsp., 2017; Stöckl i wsp., 2012; Tsigelny i wsp., 2012). Wykazano, że zewnątrzkomórkowa α -Syn poprzez interakcję z receptorem NMDA zwiększa transport synaptyczny (Diógenes i wsp., 2012) oraz aktywuje nNOS (Adamczyk i wsp., 2009). Ponadto α -Syn może indukować napływ jonów Ca^{2+} poprzez interakcję z kanałem wapniowym zależnym od napięcia (ang. voltage-dependent calcium channel - VDCC) (Adamczyk i wsp., 2006), a najnowsze dane wskazują na rolę α -Syn w aktywacji receptora purynergicznego P2X7, co w konsekwencji prowadzi do zaburzenia homeostazy wapniowej (Wilkaniec i wsp., 2017). Uwolniona do przestrzeni zewnątrzkomórkowej α -Syn może również wywierać negatywny wpływ na sąsiadujące komórki poprzez wbudowywanie się w błonę komórkową

i tworzenie przepuszczalnych dla związków niskocząsteczkowych porów (Pacheco i wsp., 2015; Tosatto i wsp., 2012; Stöckl i wsp., 2012), co skutkuje niekontrolowanym napływem jonów Ca^{2+} oraz aktywacją wapniowo-zależnych enzymów (Melachroinou i wsp., 2013; Ronzitti i wsp., 2014; Pacheco i wsp., 2015). Zsyntetyzowane na potrzeby niniejszej pracy oligomery ludzkiej rekombinowanej α -Syn mają zdolność do tworzenia annularnych, pierścieniowych struktur przypominających pory, co według danych literaturowych sugeruje możliwość ich wbudowywania się do błon komórkowych.

W badaniach niniejszej pracy zaobserwowano, że traktowanie komórek PC12 oligomerami α -Syn prowadzi do znacznego wzrostu poziomu jonów Ca^{2+} w cytosolu. Wiele badań wskazuje, że zaburzenia homeostazy wapniowej, a w konsekwencji zwiększone uwalnianie NO, są kluczowymi czynnikami odpowiedzialnymi za patologiczne działanie zewnątrzkomórkowej α -Syn (Wilkaniec, i wsp., 2013; Adamczyk i wsp., 2009; Adamczyk i wsp., 2010). Zgodnie z powyższym wykazano, że egzogenne oligomery α -Syn zwiększają poziom NO oraz innych wolnych rodników tlenowych co w konsekwencji aktywuje stres oksydacyjno-nitrozacyjny w komórkach dopaminergicznych PC12. W warunkach niskiego dostępu do argininy lub kofaktorów, NOS może dodatkowo produkować O_2^- oraz H_2O_2 (Rosen i wsp., 2002; Pou i wsp., 1992; Beckman i Koppenol, 1996). Skoro w warunkach eksperymentalnych dochodzi do obniżenia poziomu argininy, prawdopodobnie na skutek jednoczesnej aktywacji NOS i arginaz, może to sprzyjać produkcji wolnych rodników tlenowych przez NOS i stanowić jeden z mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego w komórkach dopaminergicznych. Ponadto uwalnianie znacznych ilości H_2O_2 , a następnie jego przekształcenie do rodnika hydroksylowego ($\text{HO}\cdot$) może zachodzić w trakcie oligomeryzacji endogennej puli α -Syn (Masliah i wsp., 2000; Turnbull i wsp., 2001; Deas i wsp., 2016). Co więcej, wskutek bezpośredniego działania α -Syn na mitochondria może dochodzić do obniżenia aktywności I kompleksu łańcucha oddechowego i wytworzenia O_2^- (Devi i wsp., 2008; Chinta i wsp., 2010; Reeve i wsp., 2015). Równoczesna produkcja NO i O_2^- w warunkach stresu oksydacyjnego prowadzi do wytworzenia ONOO^- , który może powodować nitrację związków organicznych, w tym białek i lipidów oraz indukować tworzenie rodników tlenowych (Radi, 2013; Nakamura i wsp., 2013). Badania *post mortem* mózgow osób z ChP, MSA, DLB i innymi synukleinopatiami wykazują obecność nitrowanych białek, których powstawanie jest wynikiem działania ONOO^- (Good i wsp., 1998). W procesie neurodegeneracji α -Syn również może podlegać nitracji. Udowodniono, że modyfikacja reszt tyrozynowych

w cząsteczce α -Syn pod wpływem działania ONOO⁻ skutkuje tworzeniem wysoce stabilnych oligomerów o,o'-dityrozynowych. Powstawanie kowalencyjnych wiązań wewnątrz jednej lub pomiędzy wieloma cząsteczkami α -Syn sprawia, że są one niezwykle odporne na działanie czynników denaturujących (Souza i wsp., 2000). Z kolei nitracja reszt tyrozynowych w pojedynczej cząsteczce α -Syn indukuje powstanie jej dimerów oraz hamuje dalszą agregację tego białka do protofibrili, co sprzyja powstawaniu najbardziej toksycznych form tego białka (Norris i wsp., 2003). Chociaż oligomeryczna α -Syn zwiększa uwalnianie NO i innych wolnych rodników tlenowych, w warunkach eksperymentalnych w niniejszej pracy nie dochodzi do wytworzenia ONOO⁻ i zwiększenia poziomu nitracji białek, prawdopodobnie wskutek aktywacji komórkowych procesów antyoksydacyjnych. Zaobserwowano, że egzogenne oligomery α -Syn zwiększają ekspresję genów kodujących enzymy odpowiedzialne za usuwanie wolnych rodników tlenowych, co prawdopodobnie stanowi mechanizm kompensujący prooksydacyjne działanie α -Syn. Aktywacja komórkowych systemów antyoksydacyjnych pod wpływem działania egzogennej α -Syn nie była jednak wystarczająca do całkowitego usunięcia wolnych rodników tlenowych, co skutkowało zaburzeniem homeostazy potencjału oksydoredukcyjnego i aktywacją stresu oksydacyjnego. Uzyskane wyniki korelują z wcześniejszymi danymi wskazującymi, że akumulacja α -Syn w komórkach istotnie zaburza równowagę pomiędzy uwalnianiem wolnych rodników tlenowych, a ich usuwaniem w komórce (Deas i wsp., 2016; Béraud i wsp., 2013; Kaźmierczak i wsp., 2008; Wilkaniec i wsp., 2013; Adamczyk i wsp., 2009; Parihar i wsp., 2009).

11.2. Wpływ egzogennych oligomerów α -synukleiny na ekspresję, aktywność i S-nitrozylację parkiny

Stres oksydacyjno-nitrozacyjny obserwuje się w procesie neurodegeneracji w ChP oraz w innych chorobach neurozwyrodnieniowych (Bhat i wsp., 2015; Wilkaniec i wsp., 2013; Dias i wsp., 2013). Sugeruje się, że w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych zarówno nitracja jak i S-nitrozylacja mogą prowadzić do zaburzeń fałdowania, oligomeryzacji i uszkodzenia funkcji wielu białek (Gu i wsp., 2002; Cho i wsp., 2009; Nakamura i Lipton, 2009). Parkina jest jednym z białek, które w warunkach stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego w pierwszej kolejności ulegają S-nitrozylacji, co wykazano w badaniach *in vitro*, *in vivo* oraz zaobserwowano w mózгах osób z idiopatyczną formą ChP (Chung i wsp., 2004; Yao

i wsp., 2004; Sunico i wsp., 2013). Stres oksydacyjno-nitrozacyjny inicjuje proces agregacji i dezaktywacji parkiny (LaVoie i wsp., 2005, 2007; Wang i wsp., 2003, 2005; Winklhofer i wsp., 2003; Palacino i wsp., 2004). Badania na mózgach osób z ChP wykazały, że rozpuszczalność parkiny wraz z wiekiem pacjenta maleje, co może być przyczyną obniżenia jej cytoprotekcyjnych właściwości (Wang i wsp., 2005). Z kolei obniżenie poziomu parkiny lub jej agregacja mogą przyczyniać się do zwiększania stresu oksydacyjnego w komórkach. Wykazano, że u myszy pozbawionych genu kodującego parkinę istotnemu zaburzeniu ulegały komórkowe mechanizmy obrony antyoksydacyjnej, co skutkowało wystąpieniem podwyższonego stresu oksydacyjnego w porównaniu do myszy kontrolnych (Palacino i wsp., 2004). Zarówno w modelach *in vitro* jak również *in vivo* wykazano, że neurotoksyny (MPP⁺, rotenon, 6-hydroksydopamina, parakwat), NO, DA czy H₂O₂ zaburzają rozpuszczalność parkiny indukując jej agregację, co w konsekwencji prowadzi do zaburzeń aktywności proteasomu i śmierci komórek (Wang i wsp., 2005; Winklhofer i wsp., 2003). Dane te wskazują na istnienie swoistego „błędnego koła”, w którym stres oksydacyjny inicjuje zaburzenia poziomu parkiny, co z kolei prowadzi do dysfunkcji procesów zmiatania wolnych rodników tlenowych i przyczynia się do zwiększenia stresu oksydacyjnego, ostatecznie prowadząc do śmierci komórek. Badania niniejszej pracy wskazują, że egzogenne oligomery α -Syn indukują S-nitrozylację i aktywację parkiny, prowadząc ostatecznie do jej degradacji i obniżenia poziomu tego białka. Uzyskane wyniki korelują z wcześniejszymi doniesieniami, które wskazują, że S-nitrozylacja parkiny jest odpowiedzialna za aktywację tego enzymu jako ligazy ubikwitynowej E3 (Ozawa i wsp., 2013). Z drugiej zaś strony, badania grupy Dawsona wykazały, że S-nitrozylacja parkiny prowadzi do zahamowania jej aktywności (Chung i wsp., 2004). Grupa badawcza Liptona i wsp. wykazała, że zależne od NO modyfikacje potranslacyjne parkiny początkowo prowadzą do aktywacji, a następnie do spadku aktywności tego enzymu (Yao i wsp., 2004). Na podstawie zaobserwowanych różnic w powyższych wynikach wysunięto wniosek, że regulacja aktywności parkiny jako ligazy ubikwitynowej E3 przez S-nitrozylację/denitrozylację może ulegać zmianom w czasie, a denitrozylacja może być faktyczną przyczyną obniżenia aktywności tego enzymu, którą obserwuje się w dalszych godzinach od podania badanych związków (Ozawa i wsp., 2013).

W niniejszej pracy wykazano, że zwiększony poziom S-nitrozylowanej parkiny utrzymuje się aż do 24 godzin po podaniu oligomerów α -Syn. W tym samym punkcie czasowym dochodzi do wzrostu aktywności parkiny oraz jej autoubikwitynacji.

Dopiero po 48-godzinnej inkubacji z oligomerami α -Syn S-nitrozylacja parkiny oraz jej aktywność spadają do poziomu kontrolnego. Mając na uwadze wyniki badań własnych oraz innych grup badawczych sugeruje się, że uzyskane rozbieżności w rezultatach dotyczących czasu S-nitrozylacji parkiny i jej aktywacji lub inhibicji wynikają z różnic w stopniu uwalniania NO w zależności od warunków eksperymentalnych. W przytoczonych powyżej pracach stosowano zarówno związki będące donorami NO, jak również inhibitory I kompleksu mitochondrialnego i związki rozprzegające łańcuch oddechowy. Zastosowanie tych warunków eksperymentalnych skutkowało nagłym wzrostem poziomu NO, a następnie względnie szybkim spadkiem poziomu tego rodnika (Ozawa i wsp., 2013). Efektem tak szybkich zmian poziomu NO w komórce był początkowy wzrost S-nitrozylacji parkiny, który po 3 godzinach, gdy poziom NO wracał do poziomu kontrolnego, stopniowo obniżał się wskutek denitrozylacji. Badania prowadzone w Zakładzie Komórkowej Transdukcji Sygnału wykazały, że egzogenna α -Syn powoduje stopniowy i długotrwały wzrost poziomu jonów Ca^{2+} w cytosolu (Czapski i wsp., 2013), zaś w niniejszej pracy zaobserwowano, że oligomery α -Syn wywołują długotrwały wzrost poziomu NO utrzymujący się aż do 24 godzin po traktowaniu komórek. Ponadto wykazano, że na skutek długotrwałego oddziaływania α -Syn dochodzi nie tylko do zwiększenia aktywności nNOS, ale również do wzrostu ekspresji genu dla tego enzymu, co może skutkować długotrwałym wzrostem syntezy NO (Adamczyk i wsp., 2009; Adamczyk i wsp., 2010). W konsekwencji obserwuje się przedłużającą się w czasie S-nitrozylację parkiny. Warto zaznaczyć, że chociaż traktowanie egzogenną α -Syn skutkuje zwiększoną autoubikwitynacją parkiny, w tym samym czasie nie obserwuje się istotnych zmian poziomu ubikwitynacji białek, co sugeruje istnienie dodatkowych procesów, które uniemożliwiają efektywne działanie parkiny jako ligazy ubikwitynowej E3. Jedną z możliwych przyczyn tego zjawiska jest istotne obniżenie poziomu parkiny, które obserwuje się wraz ze wzrostem S-nitrozylacji i autoubikwitynacji, co może skutecznie wpływać na jego wydajność. Sugeruje się również, że autoubikwitynacja aktywowana przez S-nitrozylację może być bezpośrednio odpowiedzialna za hamowanie aktywności parkiny jako ligazy E3. Zaburzenie ubikwitynacji i degradacji substratów białkowych może prowadzić do stresu ER, uszkodzenia komórek i ich śmierci (Nakamura i wsp., 2013). W niniejszej pracy wykazano, że zahamowanie syntezy NO i innych wolnych rodników tlenowych zapobiega programowanej śmierci komórek indukowanej działaniem egzogennych oligomerów α -Syn. W obecności przeciwutleniacza oraz inhibitora NOS nie dochodzi również do S-nitrozylacji i obniżenia poziomu parkiny. Ponieważ parkina jest białkiem o działaniu neuroprotektynym (Tang i wsp., 2016; Kramer i Liss, 2015; Meka

i wsp., 2015; Lee i wsp., 2015) oraz bierze udział w wielu mechanizmach regulujących żywotność komórek, m.in. w regulacji kontroli jakości mitochondriów (Pickrell i wsp., 2015) oraz procesów degradacji białek (Wang i Takahashi, 2007), to wywołane przez α -Syn obniżenie poziomu parkiny może istotnie przyczyniać się do degeneracji komórek dopaminergicznych.

11.3. Wpływ obniżenia ekspresji parkiny na funkcje mitochondriów

W niniejszej pracy wykazano, że obniżenie poziomu parkiny prowadzi do zaburzenia funkcji mitochondriów i śmierci komórek dopaminergicznych. Badania te korelują z wynikami z innych ośrodków badawczych, w których wykazano, że wyciszenie parkiny skutkuje deregulacją komórkowych systemów obrony antyoksydacyjnej, m.in. obniżeniem poziomu zredukowanej formy glutationu (GSH) i aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) prowadząc do aktywacji stresu oksydacyjnego i dysfunkcji mitochondriów (Yang i wsp., 2007). Wykazano, że wyciszenie parkiny skutkuje obniżeniem mitochondrialnego potencjału błonowego oraz spadkiem poziomu wewnątrzkomórkowego ATP (Mortiboys i wsp., 2008; Meka i wsp., 2015). W komórkach z wyciszoną ekspresją parkiny zaobserwowano również zaburzenia I kompleksu mitochondrialnego oraz spadek zużycia tlenu (Mortiboys i wsp., 2008; Ferretta i wsp., 2014).

Coraz większą uwagę w ostatnich latach przywiązuje się do badań dynamiki mitochondriów w patomechanizmie ChP i sugeruje się, że zmiany organizacji sieci mitochondrialnej mogą przyczynić się do powstawania i rozwoju tej choroby (Dauer i Przedborski, 2003; Exner i wsp., 2012). Wykazano, że zaburzenia równowagi pomiędzy procesami fuzji i fragmentacji (rozszczenia) mitochondriów skutkują niewłaściwą organizacją sieci mitochondrialnej i licznymi zaburzeniami metabolicznymi w ChP (Dauer i Przedborski, 2003). Na poziomie molekularnym proces łączenia się mitochondriów regulowany jest przez mitofuzyny (Mfn-1 i Mfn-2), GTPazy z rodziny dynamin zlokalizowane w zewnętrznej błonie mitochondrialnej oraz białko wewnętrznej błony mitochondrialnej - Opa-1 (Meeusen i wsp., 2004; Song i wsp., 2009). Podczas fuzji mitochondriów mitofuzyny zlokalizowane na zewnętrznej błonie mitochondrialnej dimeryzują, co umożliwia zbliżenie się zewnętrznych błon tych organelli i ich połączenie. Następnie, dochodzi do fuzji wewnętrznych błon mitochondrialnych.

Procesem przeciwnym fuzji mitochondriów jest ich rozszczepienie, które w warunkach fizjologicznych umożliwia transport tych organelli do zakończeń synaptycznych oraz jest pierwszym etapem procesu usuwania uszkodzonych mitochondriów na drodze mitofagii (Itoh i wsp., 2013). Proces rozszczepienia mitochondriów regulowany jest przez cytosolowe białko Drp-1, które ulega translokacji do mitochondriów i wiąże się ze swoistymi „receptorami” zlokalizowanymi na zewnętrznej błonie mitochondrialnej: białkiem Mff oraz Fis1. Po połączeniu z mitochondrium Drp-1 tworzy strukturę spiralną, która oplata mitochondrium i dzięki aktywności GTP-azowej wiąże i hydrolizuje GTP. Umożliwia to wytworzenie energii niezbędnej do zaciskania pierścienia Drp-1 poprzez dalsze zmiany konformacyjne tego białka i prowadzi do przzerwania fragmentu sieci mitochondrialnej w wyniku reorganizacji struktury błon mitochondrium (Burté i wsp., 2015).

Wiele współczesnych badań wskazuje, że obserwowane w ChP zaburzenia funkcji parkiny mogą być odpowiedzialne za dysfunkcję mitochondriów, w szczególności ich fuzji, rozszczepienia oraz kontroli ich jakości (Hammerling i wsp., 2016; Narendra i wsp., 2008). Zaobserwowane w niniejszej pracy zaburzenia funkcji mitochondriów w wyniku zahamowania ekspresji parkiny nie wydają się być bezpośrednio związane z deregulacją dynamiki tych organelli, ponieważ nie zaobserwowano istotnych zmian poziomu białek regulujących procesy fuzji i fragmentacji mitochondriów. Uzyskane wyniki korelują z wcześniejszymi danymi, w których obniżenie ekspresji parkiny nie miało wpływu na regulację poziomu białka Opa-1 (Meka i wsp., 2015; Glauser i wsp., 2011). Istnieją również doniesienia, że zaburzenie aktywności parkiny jako ligazy E3 wynikające z mutacji bądź wyciszenia jej ekspresji hamuje ubikwitynację i degradację Drp-1 skutkując wzmożonym rozszczepieniem mitochondriów (Kamp i wsp., 2010; Wang i wsp., 2011). Inne dane wskazują że parkina ubikwitynuje Mfn-1 i Mfn-2, przez co wpływa na ich degradację, ale do tego zjawiska dochodzi wyłącznie w warunkach wzmożonej depolaryzacji mitochondriów wywołanej np. działaniem CCCP (Gegg i wsp., 2010; Tanaka i wsp., 2010). Sugeruje się, że zależna od parkiny degradacja mitofuzyn jest zjawiskiem wtórnym do wywołanej depolaryzacją rozszczepienia mitochondriów i ma na celu zapobieganie ponownemu połączeniu się uszkodzonych organelli z prawidłowymi mitochondriami (Tanaka i wsp., 2010).

Warto dodać, że zgodnie z niektórymi doniesieniami, parkina nie jest niezbędna do regulacji cyklu życiowego mitochondriów, gdyż u myszy z wyciszoną ekspresją parkiny obserwuje się niewielkie zmiany morfologii tych organelli (Frank-Cannon i wsp., 2008;

Gispert i wsp., 2009; Kitada i wsp., 2009; Akundi i wsp., 2011). Ponadto komórkowy poziom mitofuzyn regulowany jest również poprzez inne ligazy ubikwitynowe, w tym Huwel (Leboucher i wsp., 2012), MUL1 (Li i wsp., 2008), mitochondrialną ligazę ubikwityny (MITOL/MARCH V) (Yonashiro i wsp., 2006), czy białka z rodziny Bcl-2 (Muñoz i wsp., 2013), możliwe więc, że w warunkach obniżonego poziomu parkiny aktywacja innych enzymów pozwala zachować prawidłowy poziom mitofuzyn w komórce. Chociaż w badaniach niniejszej pracy obniżenie ekspresji parkiny nie wpływa na białka regulujące dynamikę mitochondriów, to istotnie przyczynia się do obniżenia poziomu czynnika transkrypcyjnego PGC-1 α , który jest głównym regulatorem biogenezy mitochondriów (Finck i Kelly, 2006). Badania te korespondują z poprzednimi doniesieniami, które wykazały, że parkina może w sposób pośredni regulować poziom PGC-1 α , poprzez oddziaływanie na białko PARIS (Shin i wsp., 2011), które jest represorem transkrypcji PGC-1 α . W warunkach fizjologicznych parkina ubikwitynuje PARIS co prowadzi do jego degradacji w proteasomie i znosi jego hamujący wpływ na PGC-1 α , umożliwiając biogenezę mitochondriów. Ponadto zaobserwowano, że u myszy z całkowitym wyciszeniem parkiny dochodzi do degeneracji neuronów dopaminergicznych poprzez zwiększoną ekspresję białka PARIS i wzmożoną represję transkrypcji PGC-1 α (Shin i wsp., 2011). Akumulację białka PARIS potwierdzono również w mózгах osób z autosomalną recesywną oraz sporadyczną ChP (Shin i wsp., 2011). Sugeruje się, że PGC-1 α odgrywa główną rolę w regulacji biogenezy mitochondriów indukowanej przez parkinę, ponieważ wyciszenie tego czynnika transkrypcyjnego znosi stymulujący wpływ parkiny na gęstość mitochondriów. Ponadto zaobserwowano, że wpływ parkiny na wydajność oksydacyjnej fosforylacji zależy od ekspresji PGC-1 α , co wskazuje, że poprzez oddziaływanie na PGC-1 α parkina nie tylko wpływa na ilość mitochondriów, ale również na ich funkcję (Zheng i wsp., 2017). Badania ostatnich lat wskazują, że zaburzenia funkcji PGC-1 α mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych. W odniesieniu do ChP wykazano, że u myszy z wyciszoną ekspresją PGC-1 α dochodzi do zwiększonej degeneracji szlaku czarno-prążkowiowego po podaniu MPTP (St-Pierre i wsp., 2006). Dodatkowo badania *post mortem* na mózгах osób z ChP wykazały obniżoną ekspresję genów związanych z funkcjonowaniem mitochondriów i wytwarzaniem energii, regulowanych bezpośrednio przez PGC-1 α zarówno w istocie czarnej, jak i w innych strukturach (Zheng i wsp., 2010). Oprócz istotnej roli PGC-1 α jako czynnika regulującego metabolizm energetyczny komórki, wykazano również jego wpływ na ekspresję genów kodujących wiele enzymów antyoksydacyjnych w neuronach (St-Pierre i wsp., 2006). Sugeruje się zatem,

że zaobserwowane w niniejszej pracy zaburzenia funkcji mitochondriów i śmierć komórek wywołane obniżeniem ekspresji parkiny, mogą wynikać bezpośrednio z deregulacji białka PGC-1 α .

11.4. Znaczenie parkiny w dysfunkcji mitochondriów wywołanej przez oligomery α -synukleiny

11.4.1. Wpływ nadekspresji parkiny na zależne od oligomerów α -synukleiny uszkodzenie funkcji mitochondriów

Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy wskazują, że parkina jest bezpośrednio zaangażowana w zależne od zewnątrzkomórkowych oligomerów α -Syn obumieranie komórek dopaminergicznych. Po raz pierwszy wykazano, że podane zewnątrzkomórkowo oligomery α -Syn prowadzą do obniżenia poziomu białka parkiny, a w konsekwencji do utraty jej cytoprotekcyjnych właściwości. Wywołane działaniem α -Syn zaburzenia parkiny wpływają na funkcję i dynamikę mitochondriów oraz przeżywalność komórek dopaminergicznych. Jednakże badania wskazują, że w proces degeneracji komórek zależny od zewnątrzkomórkowych oligomerów α -Syn zaangażowane są również inne mechanizmy niezależne od parkiny, ponieważ wyciszenie genu kodującego parkinę wywołuje znacznie mniejszą śmiertelność komórek niż ta zaobserwowana w obecności oligomerów α -Syn. Ponadto odnotowano, że nadekspresja parkiny w komórkach PC12 częściowo zapobiega toksyczności α -Syn, natomiast zahamowanie stresu oksydacyjnego całkowicie znosi toksyczne działanie α -Syn. Wyniki badań są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, które wskazują, że stres oksydacyjny wywołany działaniem α -Syn aktywuje wiele ścieżek sygnalizacyjnych, które nie podlegają regulacji przez parkinę (Wong i Krainc, 2017). Zależny od α -Syn wzrost poziomu jonów Ca^{2+} w cytoplazmie prowadzi do aktywacji toksycznej kaskady kalmoduliny-kalcyneuryny (Caraveo i wsp., 2014) przy jednoczesnym zaburzeniu buforowania jonów Ca^{2+} przez ER. W wyniku stresu oksydacyjnego może również dojść do zmian przepuszczalności, a nawet ciągłości błony jądrowej i translokacji α -Syn z cytoplazmy do jądra (Sangchot i wsp., 2002), gdzie α -Syn działa jako czynnik transkrypcyjny i powoduje obniżenie ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2, zwiększenie poziomu mRNA dla kinazy syntazy glikogenu-3 β (GSK-3 β) (Yuan i wsp., 2008) oraz wywołuje zahamowanie acetylacji histonów (Kontopoulos i wsp., 2006). Z kolei

obserwacja, że w warunkach obniżonego poziomu parkiny, obumieranie komórek wskutek działania α -Syn jest znacząco zwiększone sugeruje, że parkina może wywierać cytoprotekcyjne działanie zapobiegające toksyczności α -Syn, ale w warunkach wzmożonego stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego ten korzystny efekt parkiny może zostać osłabiony poprzez jej S-nitrozylację i degradację. Uzyskane badania korespondują z wynikami pracy, w której mutacje parkiny skutkowały akumulacją i agregacją α -Syn w indukowanych pluripotentnych komórkach macierzystych (iPSC) (Shaltouki i wsp., 2015). Ponadto wykazano, że neuroprotektoryjne właściwości parkiny mogą manifestować się poprzez zależną od autofagii degradację α -Syn, natomiast gdy dochodzi do obniżenia poziomu parkiny, zwiększeniu ulega sekrecja α -Syn do krwi (Lonskaya i wsp., 2013). Parkina reguluje także poziom fosforylowanej α -Syn w unieśmiertelnionych komórkach dopaminergicznych i tłumi zależną od α -Syn aktywację mikrogleju (Khandelwal i wsp., 2010). Wykazano również, że spadek ekspresji PGC-1 α może prowadzić do wzrostu oligomeryzacji i toksyczności α -Syn (Eschbach i wsp., 2015). Ponieważ oligomery α -Syn wykazują właściwości zbliżone do białek prionowych, takie jak przedostawanie się do sąsiadujących neuronów, zdolność do interakcji z endogenną pulą białka oraz indukcja jej agregacji (Bengoa-Vergniory i wsp., 2017; Wilkaniec i wsp., 2013), sugeruje się, że prawidłowe utrzymywanie aktywności parkiny może zapobiegać rozprzestrzenianiu się i toksyczności oligomerów α -Syn.

Pomimo, że α -Syn wywiera wpływ na szereg organelli, według dotychczasowych danych głównym celem neurotoksycznego działania tego białka w komórce są mitochondria (Perier i wsp., 2007; Loeb i wsp., 2010; Xie i wsp., 2010). W badaniach *in vitro* wykazano, że nadekspresja zmutowanych form α -Syn A53T i A30P, prowadzi do zaburzenia funkcji mitochondriów, obniżenia potencjału błony mitochondrialnej i oddychania komórkowego (Parihar i wsp., 2009). Sugeruje się, że oligomery α -Syn mogą zaburzać funkcję mitochondriów poprzez ich permeabilizację, spadek mitochondrialnego potencjału błonowego, wzrost mitochondrialnych wolnych rodników tlenowych oraz zwiększoną fragmentację (Plotegher i wsp., 2014; Nakamura i Lipton, 2011; Xie i Chung, 2012; Sarafian i wsp., 2013; Shen i wsp., 2014). Grupa badawcza Przedborskiego wskazuje na istotną rolę α -Syn w zaburzeniach interakcji między mitochondriami a ER, co może dodatkowo predysponować mitochondria do fragmentacji (Guardia-Laguarta i wsp., 2014). Jednak mechanizmy zależnego od α -Syn zaburzenia funkcji i dynamiki mitochondriów nie były do chwili obecnej w pełni wyjaśnione. Dane literaturowe wskazują, że α -Syn, poprzez powinowactwo do kardiolipiny (Nakamura i Lipton, 2009), może wchodzić w bezpośrednią

interakcję z mitochondriami i zaburzać funkcję kompleksu I (Cole, 2008; Liu i wsp., 2009). Co więcej, udowodniono, że N-końcowy fragment α -Syn zawiera sygnał lokalizacji mitochondrialnej, co umożliwia jej przedostawanie się do tych organelli, a zaimportowana do mitochondriów α -Syn lokalizuje się w pobliżu wewnętrznej błony mitochondrialnej (Devi i wsp., 2008). Wykazano również, że α -Syn powoduje zaburzenia potencjału błony mitochondrialnej nawet w izolowanych organellach (Banerjee i wsp., 2010). Badania niniejszej pracy także wskazują, że po podaniu egzogennej α -Syn, jej ilość w mitochondriach komórek dopaminergicznych znacznie wzrasta. To koreluje z doniesieniami wskazującymi, że u pacjentów z idiopatyczną jak i rodzinną ChP obserwuje się dysfunkcję mitochondriów związaną ze zwiększoną obecnością α -Syn w tych organellach (Devi i wsp., 2008; Bendor i wsp., 2013). α -Syn może również pośrednio prowadzić do dysfunkcji mitochondriów poprzez wpływ na nitrozylację białek mitochondrialnych (Parihar i wsp., 2009), co prowadzi do uwolnienia cytochromu c, aktywacji kaspazy-3 i śmierci komórek (Kazmierczak i wsp., 2008; Seo i wsp., 2002). Badania niniejszej pracy korelują z poprzednimi doniesieniami i pokazują, że w wyniku działania egzogennej α -Syn dochodzi do spadku potencjału błony mitochondrialnej, zwiększenia zależnego od dysfunkcji kompleksu I uwalniania O_2^- , obniżenia syntezy ATP oraz zwiększenia potencjału oksydoredukcyjnego mitochondriów.

Abstrahując od istotnej roli mitochondriów w mechanizmach neurotoksyczności α -Syn, wykazano, że deregulacja tych organelli w ChP jest ściśle związana z zaburzeniami funkcji parkiny (Dawson i Dawson, 2010). Wykazano, że choć wyciszenie genu dla parkiny u myszy nie powoduje obumierania neuronów w istocie czarnej, to skutkuje znamienym zaburzeniem aktywności mitochondrialnego łańcucha oddechowego (Goldberg i wsp., 2003). Podobnie w badaniach *in vitro* prowadzonych na fibroblastach pacjentów z ChP zaobserwowano, że obniżenie aktywności parkiny w wyniku jej mutacji indukuje zaburzenia morfologii mitochondriów, spadek mitochondrialnego potencjału błonowego, zahamowanie aktywności I kompleksu łańcucha mitochondrialnego oraz produkcji ATP (Mortiboys i wsp., 2008). Ponadto wykazano, że zaburzenia parkiny skutkują obniżeniem fosforylacji oksydacyjnej w prążkowiu (Palacino i wsp., 2004). Badania niniejszej pracy korelują z tymi doniesieniami pokazując, że nadekspresja parkiny całkowicie odwraca niekorzystny efekt oddziaływania α -Syn na funkcje mitochondriów, pomimo iż jedynie częściowo zapobiega toksyczności tego białka.

11.4.2. Wpływ nadekspresji parkiny na wywołane przez oligomery α -synukleiny zaburzenia dynamiki mitochondriów

Liczne badania pokazują, że w warunkach patologicznych zwiększony poziom i uwalnianie α -Syn skutkują istotnymi zmianami organizacji sieci mitochondrialnej. W niniejszej pracy wykazano, że w wyniku działania tego białka dochodzi do znacznej fragmentacji mitochondriów, co bezpośrednio koresponduje z wynikami uzyskanymi przez inne zespoły badawcze zarówno w modelach *in vitro* (Butler i wsp., 2012), jak i u myszy z nadekspresją zmutowanej α -Syn (Xie i Chung, 2012), czy w modelu toksyczności α -Syn u *Danio rerio* (O'Donnell i wsp., 2014). Chociaż nie istnieją dane, które potwierdzałyby bezpośrednią korelację pomiędzy zaburzeniami procesów dynamiki mitochondriów a etiopatologią ChP, to fragmentacja mitochondriów może w istotny sposób przyczyniać się do dysfunkcji tych organelli oraz prowadzić może do zaburzeń przekaźnictwa dopaminergicznego w ChP. Zaobserwowano, że wyciszenie genu dla Mfn-2 skutkuje zmianami w morfologii mitochondriów i zaburza aktywność łańcucha oddechowego, co powoduje degenerację zakończeń nerwowych w obrębie prążkowania (Lee i wsp., 2012). Podobnie obniżenie poziomu Drp-1 skutkuje spadkiem ilości mitochondriów w synapsach oraz śmiercią neuronów dopaminergicznych (Berthet i wsp., 2014). Dokładny mechanizm prowadzący do zależnej od α -Syn fragmentacji mitochondriów nie został poznany. Niektóre badania wskazują bezpośredni wpływ α -Syn na białka odpowiedzialne za regulację dynamiki mitochondriów (Xie i Chung, 2012, Gui i wsp., 2012, Menges i wsp., 2017). Obniżenie ekspresji białek Mfn-1, Mfn-2 i Drp-1 oraz zwiększona fragmentacja mitochondriów zostały zaobserwowane w mysim modelu ChP (Xie i Chung, 2012). Podobnie w komórkach SH-SY5Y z nadekspresją zmutowanej α -Syn zaobserwowano zwiększoną ekspresję białka DLP (ortolog Drp-1) i jego translokację do mitochondriów w celu indukcji rozszczepienia (Gui i wsp., 2012). Rezultaty niniejszej pracy pokazują, że w wyniku działania egzogennych oligomerów α -Syn nie dochodzi do zmian w poziomie białek Drp-1 oraz Opa-1, natomiast obserwuje się istotne obniżenie poziomu Mfn-1 i Mfn-2. Wyniki te korelują z wcześniejszymi badaniami które wykazały, że zależna od natywnej α -Syn fragmentacja mitochondriów nie jest związana ze zmianami w poziomie białka Drp-1 (Nakamura i Lipton, 2011; Devoto i wsp., 2017). W badaniach niniejszej pracy zaobserwowano, że chociaż nadekspresja parkiny w istotny sposób zapobiega fragmentacji mitochondriów wywołanej przez α -Syn, to nie wpływa na obniżenie poziomu mitofuzyn w wyniku działania oligomerów α -Syn.

Ponadto nadekspresja parkiny wpływa na obniżenie poziomu mitofuzyn *per se*. Uzyskane wyniki korespondują z wcześniejszymi badaniami na fibroblastach pochodzących od pacjentów z mutacją w genie kodującym parkinę, gdzie wykazano zwiększoną fuzję mitochondriów w stosunku do kontroli (Mortiboys i wsp., 2008), jak również w komórkach z nadekspresją natywnej α -Syn (Poole i wsp., 2010). Jak już wcześniej wspomniano, wpływ parkiny na proces rozszczepienia mitochondriów obserwuje się w warunkach obniżenia mitochondrialnego potencjału błonowego, co jest zjawiskiem korzystnym, gdyż zapobiega połączeniu uszkodzonych mitochondriów z organellami prawidłowymi (Glauser i wsp., 2011; Tanaka i wsp., 2010; Gegg i wsp., 2010). W związku z powyższym powstaje pytanie, w jaki sposób nadekspresja parkiny zapobiega nadmiernemu rozszczepieniu mitochondriów wywołanemu przez α -Syn. Wiele współczesnych badań wskazuje na bezpośredni wpływ α -Syn na procesy rozszczepienia mitochondriów, niezależnie od poziomu białek regulatorowych. Fragmentacja mitochondriów indukowana przez α -Syn obserwowana była w fibroblastach myszy z wyciszeniem genu Drp-1 (Guardia-Laguarta i wsp., 2014). α -Syn hamowała również proces tworzenia sieci mitochondrialnych pomimo jednoczesnej nadekspresji Mfn-1, Mfn-2 oraz Opa-1 (Kamp i wsp., 2010). Ponadto wyciszenie genu dla α -Syn u *Caenorhabditis elegans* (Kamp i wsp., 2010) lub ekspresja tego białka pozbawionego N-końcowej domeny w ludzkich komórkach iPSC prowadziły do znacznego wydłużenia sieci mitochondrialnej (Devoto i wsp., 2017). Istnieją też dane, które pokazują, że fragmentacja mitochondriów jest zwiększona w wyniku przedostawania się α -Syn do tych organelli (Devoto i wsp., 2017). Ponadto wykazano, że w wyniku bezpośredniej interakcji z zewnętrzną błoną mitochondrialną α -Syn w sposób mechaniczny blokuje proces fuzji mitochondriów (Kamp i wsp., 2010). Poprzez wiązanie się z lipidami α -Syn powoduje zmiany strukturalne pęcherzyków fosfolipidowych, skutkujące zwiększeniem ich zakrzywienia i formowaniem mniejszych kulistych struktur (Perlmutter, 2009; Braun i wsp., 2012). Ponadto w badaniach *in vitro* wykazano, że ten istotny wpływ α -Syn na zakrzywienie błony fosfolipidowej może być odpowiedzialny za zmniejszenie procesu fuzji (Kamp i wsp., 2010). W takim przypadku wiązanie α -Syn z zewnętrzną błoną mitochondrialną może wpłynąć na krzywiznę tejże błony i zmniejszyć szybkość fuzji mitochondriów (Kamp i wsp., 2010). W badaniach niniejszej pracy zaobserwowano, że działanie egzogennej α -Syn skutkuje powstawaniem małych mitochondriów o zwiększonej kulistości, co jest zgodne z powyższymi obserwacjami. Wykazano, że ta unikalna właściwość α -Syn związana jest z obecnością w jej strukturze domeny oddziałującej z lipidami, składającej się z fragmentu N-końcowego i domeny NAC (Kamp i wsp., 2010), co potwierdzają badania

z wykorzystaniem zmutowanych form α -Syn zlokalizowanych w obrębie N-końca tego białka. Podczas gdy w przypadku mutacji A53T, która zwiększa powinowactwo α -Syn do lipidów, obserwuje się znamienne rozszczepienie mitochondriów, w obecności wariantu A30P, który nie wpływa na wiązanie α -Syn do błon lipidowych, organizacja sieci mitochondrialnej pozostaje bez zmian (Butler i wsp., 2017; Xie i Chung, 2012; Gui i wsp., 2012; Devoto i wsp., 2017). Dodatkowo wykazano, że nadekspresja parkiny lub kinazy PINK-1, która jest swoistym mitochondrialnym aktywatorem i „receptorem” dla parkiny, skutkuje obniżeniem fragmentacji mitochondriów wywołanej bezpośrednim działaniem α -Syn (Kamp i wsp., 2010). W świetle tych danych i uzyskanych wyników, które pokazują, że protekcyjny wpływ parkiny nie wyraża się poprzez jej działanie na białka regulujące procesy fuzji i rozszczepienia, sugeruje się, że parkina może bezpośrednio zapobiegać interakcjom α -Syn z mitochondriami, co skutkuje nie tylko hamowaniem ich fragmentacji, ale również może blokować niekorzystne działanie α -Syn na aktywność tych organelli. Wobec tego wywołane działaniem α -Syn obniżenie poziomu parkiny w wyniku jej S-nitrozylacji może pośrednio potęgować niekorzystne działanie oligomerów α -Syn na funkcje i dynamikę mitochondriów.

11.4.3. Wpływ nadekspresji parkiny na zależne od oligomerów α -synukleiny zaburzenia mitofagii i biogenezy mitochondriów

W niniejszej pracy wykazano, że obniżenie poziomu parkiny wskutek działania egzogennej α -Syn w istotny sposób zaburza proces degradacji mitochondriów w komórkach dopaminergicznych. Obserwacja ta wpisuje się w najnowszy trend naukowy ostatnich lat, który wskazuje, że regulacja cyklu życiowego mitochondriów stanowi kluczowy molekularny mechanizm działania parkiny w komórkach nerwowych (Hammerling i wsp., 2016; Narendra i wsp., 2008). Parkina razem z kinazą PINK-1 pełnią istotną rolę w inicjacji procesu mitofagii, a mutacje genów kodujących te dwa białka skutkują akumulacją nieprawidłowych, uszkodzonych mitochondriów, co może być przyczyną zmian neurodegeneracyjnych obserwowanych w dziedzicznych formach ChP (De Vries i Przedborski, 2013; Burman i wsp., 2012; Narendra i wsp., 2008).

Do chwili obecnej zależności pomiędzy uwalnianiem do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i oligomeryzacją α -Syn a procesem mitofagii pozostawały niewyjaśnione. Wykazano, że u zwierząt transgenicznym z nadekspresją zmutowanej α -Syn

(A53T) dochodzi do inhibicji kompleksu I i zaburzenia funkcji mitochondriów wraz ze wzrostem ich degradacji na drodze autofagii (mitofagii) (Chinta i wsp., 2010). Zwiększoną degradację mitochondriów zaobserwowano również w neuronach dopaminergicznych śródmózgowia transfekowanych α -Syn z mutacją A53T (Choubey i wsp., 2011). Z drugiej strony w eksperymentalnych modelach ChP oraz badaniach *post mortem* na mózgach osób z ChP zaobserwowano zwiększoną akumulację mitochondriów w zdegenerowanych neuronach (Dehay i wsp., 2010; Vila i Przedborski, 2001), co wskazuje na zahamowanie procesu mitofagii. Uważa się, że nagromadzenie dysfunkcyjnych mitochondriów może przyczyniać się do śmierci komórek dopaminergicznych poprzez zwiększone wytwarzanie wolnych rodników tlenowych i nadmierne uwalnianie mitochondrialnych czynników proapoptotycznych (Vila i Przedborski, 2001; Vila i Przedborski 2003; Perier i wsp., 2007). W zgodzie z powyższymi doniesieniami wyniki niniejszej pracy wykazały, że w komórkach dopaminergicznych działanie egzogennych oligomerów α -Syn prowadzi do zahamowania procesu mitofagii na skutek zaburzenia interakcji mitochondriów z lizosomami, czego konsekwencją jest akumulacja dysfunkcyjnych mitochondriów.

Wcześniejsze dane pokazały, że w ChP dochodzi do zaburzenia funkcjonowania lizosomów i nadmiernej akumulacji autofagosomów (Anglade i wsp., 1997; Chu i wsp., 2009). Ponadto w warunkach patologicznych zagregowana α -Syn, poprzez interakcję z błonami pęcherzykowymi, upośledza proces degradacji białek na drodze autofagii, co wykazano zarówno w badaniach *in vitro* w neuronalnych liniach komórkowych jak i u myszy transgenicznych (Winslow i wsp., 2010). Sugeruje to, że zaburzenia procesu autofagii indukowane przez α -Syn mogą prowadzić do nieprawidłowości w usuwaniu uszkodzonych mitochondriów. Jednakże badania niniejszej pracy wykazały, że chociaż w obecności egzogennych oligomerów α -Syn zaobserwowano zahamowanie procesu mitofagii, to obserwuje się spadek aktywności kinazy mTOR, która jest głównym negatywnym regulatorem autofagii (Wang i wsp., 2012). Wcześniejsze doniesienia sugerują, że zahamowanie mTOR zwiększa przeżywalność *D. melanogaster* traktowanych neurotoksyną parakwatem i hamuje apoptozę komórek dopaminergicznych wywołaną działaniem rotenonu (Ravikumar i wsp., 2006; Pan i wsp., 2009; Bjedov i wsp., 2010). Aktywacja procesu autofagii wskutek zahamowania mTOR jest też jednym z mechanizmów pozwalających na usunięcie cytoplazmatycznych złogów nieprawidłowych białek, w tym α -Syn (Menzies i wsp., 2015). Wobec powyższego możliwe jest, że w warunkach eksperymentalnych niniejszej pracy aktywacja procesu autofagii wskutek zahamowania

mTOR stanowi swoisty mechanizm obronny przed działaniem oligomerów α -Syn. Jednakże w warunkach zwiększonego stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego, który również obserwuje się w wyniku działania α -Syn, indukcja autofagii oraz zahamowanie mTOR może prowadzić do śmierci komórek nerwowych (Choi i wsp., 2010). W badaniach niniejszej pracy zaobserwowano, że zaburzenia procesu mitofagii wywołane działaniem α -Syn nie są również skutkiem zaburzenia poziomu i fosforylacji białka ULK-1, kinazy seryno-treoninowej, która odgrywa istotną rolę w inicjacji procesu autofagii (Egan i wsp., 2011; Itakura i wsp., 2012). ULK-1 może wchodzić w interakcje z różnymi białkami tworząc kompleks, który w odpowiedzi na zahamowanie mTOR lub aktywację kinazy AMPK reguluje procesy tworzenia autofagosomu (Egan i wsp., 2011). Kompleks ULK-1 jest kluczowym regulatorem początkowych etapów mitofagii zależnych od parkiny (Egan i wsp., 2011; Itakura i wsp., 2012), a złogi tego białka wykryto w LB (Miki i wsp., 2016). Co ciekawe, badania niniejszej pracy wykazały, że nadekspresja parkiny zapobiega wywołanemu przez α -Syn zahamowaniu fosforylacji mTOR, w konsekwencji czego dochodzić może do jego wzmożonej aktywności i do zahamowania inicjacji autofagii. Wyniki uzyskanych badań korelują z wcześniejszymi doniesieniami, gdzie w komórkach HEK293 z nadekspresją parkiny nie obserwowano zahamowania aktywności kompleksu mTOR w wyniku traktowania CCCP (Park i wsp., 2014). Sugeruje się, że parkina poprzez ubikwitynację mTOR na lizynie 2066 oraz 2306 wykazuje swoje cytoprotekcyjne działanie w sposób niezależny od systemu UPS, zapobiegając całkowitemu zahamowaniu aktywności mTOR i niekontrolowanej mitofagii (Park i wsp., 2014). Jednocześnie wyniki niniejszej pracy pokazały, że nadekspresja parkiny zapobiega negatywnemu działaniu α -Syn na proces mitofagii, ponieważ obserwuje się zwiększoną fuzję mitochondriów z lizosomami.

Jak już wspomniano, początkowym etapem procesu mitofagii jest translokacja parkiny do zdepolaryzowanych mitochondriów, która zachodzi pod wpływem ekspozycji na zewnętrznej błonie mitochondrialnej białka PINK-1. Udowodniono, że wyciszenie genu dla białka PINK-1, będącego swoistym mitochondrialnym „receptorem” parkiny, powodowało dysfunkcję mitochondriów oraz obniżenie procesu mitofagii. Z kolei nadekspresja parkiny przywracała prawidłowe usuwanie uszkodzonych mitochondriów oraz hamowała zaburzenia syntezy ATP (Gegg i wsp., 2010). Podobnie w warunkach stresu nitrozacyjnego w komórkach SH-SY5Y zaobserwowano zahamowanie procesu mitofagii wskutek deregulacji parkiny (Ozawa i wsp., 2013). Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje można wnioskować, że zaburzenia procesu mitofagii wywołane działaniem egzogennej α -Syn

są bezpośrednio związane z deregulacją parkiny. W zgodzie z tą hipotezą badania niniejszej pracy wykazały, że nadekspresja parkiny całkowicie zapobiega obniżeniu poziomu parkiny we frakcji mitochondrialnej oraz zahamowaniu ubikwitynacji białek mitochondrialnych w wyniku działania oligomerów α -Syn.

Wraz z upośledzeniem procesu usuwania uszkodzonych mitochondriów egzogenna α -Syn powoduje również zaburzenia syntezy tych organelli *de novo*, poprzez hamujący wpływ na poziom białka PGC-1 α . Przedstawione wcześniej wyniki pokazują, że wskutek zaburzeń parkiny może dochodzić do obniżenia poziomu tego czynnika transkrypcyjnego. Ponadto nadekspresja parkiny w komórkach dopaminergicznych zapobiegała zależnej od α -Syn deregulacji PGC-1 α . Zgodnie z doniesieniami, które pokazują, że nadekspresja parkiny poprzez obniżenie poziomu PARIS zwiększa ekspresję PGC-1 α i przez to stymuluje procesy biogenezy mitochondriów (Shin i wsp., 2011; Stevens i wsp., 2015), sugeruje się, że α -Syn, poprzez negatywny wpływ na poziom parkiny, pośrednio prowadzi do obniżenia poziomu PGC-1 α . Istnieją również doniesienia, które wskazują na bezpośrednie działanie α -Syn na ekspresję tego czynnika transkrypcyjnego. W badaniach *in vitro* oraz *in vivo* pokazano, że zlokalizowana w jądrze α -Syn wiąże się z promotorem dla genu kodującego PGC-1 α , przez co może hamować ekspresję tego białka (Siddiqui i wsp., 2016). W związku z tym można sugerować, że przeciwny efekt α -Syn i parkiny na poziom PGC-1 α może być wywierany na drodze niezależnych mechanizmów, a obniżenie poziomu parkiny wskutek zależnej od oligomerów α -Syn S-nitrozylacji może zaburzać równowagę procesów regulujących biogenezę mitochondriów.

Co ciekawe, chociaż w badaniach nie zaobserwowano znamionego wpływu egzogennej α -Syn na ekspresję czynników transkrypcyjnych Nrf-1 i TFAM, które regulują ekspresję białek mitochondrialnych, to nadekspresja parkiny skutkuje istotnym zwiększeniem poziomu mRNA dla tych białek, co może dodatkowo stymulować procesy biogenezy mitochondriów. Uzyskane wyniki popierają hipotezę, zgodnie z którą wzrost poziomu parkiny powyżej wartości kontrolnych może aktywować wiele ścieżek sygnalizacyjnych, które nie są regulowane przez endogenne poziomy tego białka (Dawson i Dawson, 2010). Niemniej jednak uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę zaburzeń poziomu parkiny w deregulacji biogenezy mitochondriów, co prowadzić może do zmniejszenia puli funkcjonalnych mitochondriów w komórce. Ostatecznie badania niniejszej pracy wykazały, że wywołany działaniem α -Syn spadek poziomu parkiny skutkuje zaburzeniem równowagi pomiędzy syntezą mitochondriów *de novo* a procesem aktywnego usuwania uszkodzonych

organelli, co prowadzi do akumulacji dysfunkcyjnych mitochondriów w komórkach dopaminergicznych. Z kolei przywrócenie prawidłowego poziomu parkiny skutkuje zwiększoną degradacją uszkodzonych przez α -Syn mitochondriów oraz stymuluje syntezę nowych funkcjonalnych organelli. Uzyskane wyniki korespondują z wcześniejszymi badaniami pokazującymi, że w wyniku deregulacji parkiny dochodzi do nagromadzenia mitochondriów, przy jednoczesnym spadku syntezy ATP (Matsuda i wsp., 2010; Vives-Bauza i wsp., 2010). Mając na uwadze dane literaturowe i wyniki niniejszej pracy sugeruje się, że wywołane przez α -Syn zaburzenia funkcji mitochondriów oraz śmierć komórek dopaminergicznych częściowo wynika z dysfunkcji procesu aktywnego usuwania uszkodzonych mitochondriów wskutek deregulacji parkiny.

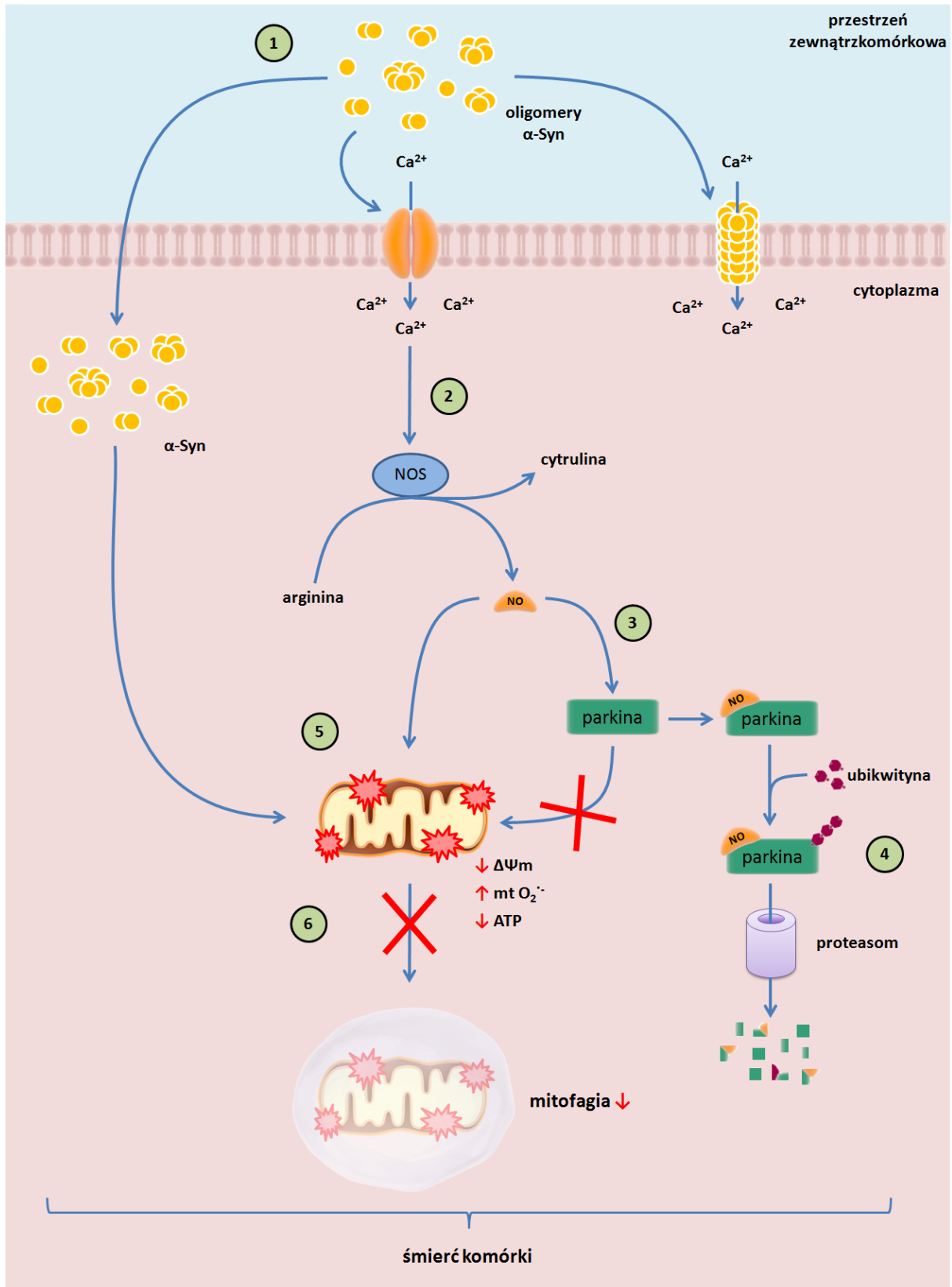
Podsumowując, w niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano istnienie bezpośredniego związku pomiędzy toksycznością egzogennych oligomerów α -Syn, a funkcją parkiny. Uzyskane wyniki badań wykazały, że zależna od α -Syn indukcja stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego jest kluczowym zjawiskiem odpowiedzialnym za S-nitrozylację parkiny i jej degradację. Obniżenie poziomu parkiny prowadzi do zaburzenia kontroli jakości, dynamiki i funkcji mitochondriów oraz śmierci komórek dopaminergicznych.

12. WNIOSKI I PODSUMOWANIE

1. Uzyskane wyniki badań wykazały, że traktowanie komórek dopaminergicznych PC12 oligomerami α -Syn prowadzi do wzrostu poziomu jonów Ca^{2+} w cytosolu oraz syntezy NO i innych wolnych rodników tlenowych. W konsekwencji dochodzi do aktywacji stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego i śmierci komórek. Zahamowanie syntezy NO i innych wolnych rodników tlenowych zapobiega programowanej śmierci komórek indukowanej działaniem egzogennej α -Syn. Badania wskazują, że zaburzenie homeostazy wapniowej, aktywacja wapniowo-zależnej NOS oraz zwiększone uwalnianie NO i wolnych rodników pełnią istotną rolę w zależnej od oligomerów α -Syn śmierci komórek dopaminergicznych.
2. Wykazano, że w warunkach stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego wywołanego działaniem oligomerów α -Syn dochodzi do S-nitrozylacji, autoubikwitynacji, a następnie degradacji parkiny. Inhibitor NOS – NNLA oraz przeciwutleniacz N-acetylocysteina przeciwdziałają zależnej od α -Syn S-nitrozylacji parkiny. Badania wskazują, że oligomery α -Syn w sposób zależny od NO prowadzą do degradacji parkiny i utraty jej cytoprotekcyjnych właściwości.
3. Wykazano, że w warunkach stresu wywołanego działaniem egzogennych oligomerów α -Syn w komórkach dopaminergicznych PC12 dochodzi do zaburzenia funkcji mitochondriów: spadku mitochondrialnego potencjału błonowego, zwiększonego uwalniania O_2^- , obniżenia syntezy ATP oraz zwiększenia potencjału oksydoredukcyjnego. Zależne od α -Syn zaburzenia funkcji mitochondriów przyczyniają się do zwiększonej ich fragmentacji oraz zmian morfologicznych. Indukowana oligomerami α -Syn fragmentacja mitochondriów nie jest zależna od białka Drp-1, a za przesunięcie równowagi pomiędzy fuzją a fragmentacją w kierunku rozszczepienia może być odpowiedzialne obniżenie poziomu Mfn-1 i Mfn-2. Nie można jednak wykluczyć znaczenia bezpośredniej interakcji α -Syn z błoną mitochondrialną w promowaniu fragmentacji tych organelli. Zwiększenie ekspresji parkiny zapobiega rozszczepieniu mitochondriów wywołanemu przez α -Syn w sposób niezależny od białek regulujących dynamikę mitochondriów.

4. Wykazano, że egzogenna α -Syn w komórkach dopaminergicznych PC12 inicjuje akumulację uszkodzonych mitochondriów w wyniku zaburzenia ich degradacji na drodze mitofagii. Zahamowanie procesu mitofagii związane jest z zależną od α -Syn deregulacją parkiny. Nadekspresja parkiny zapobiega wywołanym przez α -Syn zaburzeniom transportu tego białka do mitochondriów i osłabieniu mitofagii.
5. Zaobserwowano, że wraz z upośledzeniem procesu usuwania uszkodzonych mitochondriów, α -Syn w sposób zależny od parkiny powoduje zaburzenia syntezy tych organelli poprzez obniżenie poziomu białka PGC-1 α . Nadekspresja parkiny zapobiega zależnej od α -Syn deregulacji poziomu PGC-1 α .

Podsumowując, do chwili obecnej wykazano zaburzenia funkcjonowania mitochondriów zarówno w sporadycznej, jak i rodzinnej postaci ChP. Znaczna liczba dotychczas opisanych genów, których mutacje są związane z rozwojem rodzinnej postaci ChP, koduje białka regulujące funkcjonowanie mitochondriów. Do tej puli genów należy również gen *PRKN* kodujący parkinę, którego mutacje odpowiedzialne są za najczęstszą formę rodzinnej postaci ChP. Mutacje w tych genach prowadzą do obniżenia aktywności kompleksu I łańcucha oddechowego, spadku poziomu ATP, zaburzeń mitofagii, a także zmian organizacji sieci mitochondrialnej. Z drugiej strony według powszechnie przyjętej hipotezy α -Syn o zmienionej konformacji może być odpowiedzialna za degenerację neuronów dopaminergicznych, prowadząc do wystąpienia objawów ChP. Przedstawione w niniejszej pracy badania po raz pierwszy wykazały istnienie funkcjonalnych zależności pomiędzy α -Syn, parkiną oraz siecią mitochondrialną. Ponadto po raz pierwszy zbadano i scharakteryzowano molekularne zjawiska prowadzące od zewnątrzkomórkowych oligomerów α -Syn poprzez dysfunkcję parkiny aż do zmian w funkcjonalności sieci mitochondrialnej, co może być bezpośrednią przyczyną śmierci komórek dopaminergicznych w ChP (**Ryc.47**).



Rycina 47. Udział parkiny w molekularnych mechanizmach toksyczności egzogennych oligomerów α -synukleiny (schemat autorski).

- 1 *Oligomery α -synukleiny (α -Syn) mogą wykazywać swoje zewnątrzkomórkowe działanie poprzez interakcję z kanałami wapniowymi, w tym z receptorami, jak również poprzez swobodne przenikanie lub tworzenie porów w błonie komórkowej. Konsekwencją podania egzogennych oligomerów α -Syn jest wzrost poziomu jonów wapnia (Ca^{2+}) w cytosolu komórek dopaminergicznych.*
- 2 *Zależne od egzogennych oligomerów α -Syn zaburzenia homeostazy wapniowej prowadzą do aktywacji wapniowo-zależnych enzymów, w tym syntazy tlenku azotu (NOS) co prowadzi do zwiększonej syntezy tlenku azotu (NO).*
- 3 *Zależne od egzogennych oligomerów α -Syn uwalnianie NO prowadzi do S-nitrozylacji parkiny.*
- 4 *S-nitrozylacja parkiny skutkuje jej autoubikwitynacją, co prowadzi do degradacji tego białka w proteasomie hamując funkcje i aktywność tego enzymu.*
- 5 *Zależne od egzogennych oligomerów α -Syn zwiększone uwalnianie NO i innych reaktywnych form tlenu skutkuje aktywacją stresu oksydacyjno-nitrozacyjnego, który prowadzi do zaburzeń funkcji mitochondriów.*
- 6 *Zależne od egzogennych oligomerów α -Syn zaburzenia funkcji mitochondriów skutkują deregulacją cyklu życiowego mitochondriów oraz zahamowaniem procesu degradacji mitochondriów na drodze mitofagii, co w konsekwencji prowadzi do akumulacji uszkodzonych mitochondriów i śmierci komórek dopaminergicznych.*

Wykaz skrótów: $\Delta\Psi_m$ – potencjał błony mitochondrialnej; mt O_2^- - mitochondrialny rodnik ponadtlenkowy; ATP – adenozyntrifosforan.

13. LITERATURA

1. **Abeliovich**, A., Schmitz, Y., Fariñas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., Castillo, P. E., Shinsky N., Manuel J., Verdugo G., Armanini M., Ryan A., Hynes, M., Phillips, H., Sulzer, D., Rosenthal, A. (2000). Mice lacking α -synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, 25(1), 239-252.
2. **Abounit**, S., Bousset, L., Loria, F., Zhu, S., De Chaumont, F., Pieri, L., Olivo-Marin J.-C., Melki R., Zurzolo, C. (2016). Tunneling nanotubes spread fibrillar α -synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. *The EMBO Journal*, 35(19), 2120-2138.
3. **Adamczyk**, A., & Strosznajder, J. B. (2006). Alpha-synuclein potentiates Ca²⁺ influx through voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Neuroreport*, 17(18), 1883-1886.
4. **Adamczyk**, A., Czapski, G. A., Kaźmierczak, A., & Strosznajder, J. B. (2009). Effect of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists on α -synuclein-evoked neuronal nitric oxide synthase activation in the rat brain. *Pharmacological Reports*, 61(6), 1078-1085.
5. **Adamczyk**, A., Kaźmierczak, A., & Strosznajder, J. B. (2006). α -synuclein and its neurotoxic fragment inhibit dopamine uptake into rat striatal synaptosomes: relationship to nitric oxide. *Neurochemistry International*, 49(4), 407-412.
6. **Adamczyk**, A., Kaźmierczak, A., Czapski, G. A., & Strosznajder, J. B. (2010). α -Synuclein induced cell death in mouse hippocampal (HT22) cells is mediated by nitric oxide-dependent activation of caspase-3. *FEBS Letters*, 584(15), 3504-3508.
7. **Adamczyk**, A., Solecka, J., & Strosznajder, J. B. (2005). Expression of α -synuclein in different brain parts. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 56(1), 29-37.
8. **Akundi**, R. S., Huang, Z., Eason, J., Pandya, J. D., Zhi, L., Cass, W. A., Sullivan, P., G., Büeler, H. (2011). Increased mitochondrial calcium sensitivity and abnormal expression of innate immunity genes precede dopaminergic defects in Pink1-deficient mice. *PLOS ONE*, 6(1), e16038.
9. **Alvarez-Castelao**, B., Goethals, M., Vandekerckhove, J., & Castaño, J. G. (2014). Mechanism of cleavage of alpha-synuclein by the 20S proteasome and modulation of its degradation by the RedOx state of the N-terminal methionines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(2), 352-365.
10. **Anglade**, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M. T., Michel, P. P., Marquez, J., Ruberg, M., Hirsch, E., C., Agid, Y. (1997). Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histology and Histopathology*, 12(1), 25-32.
11. **Angot**, E., Steiner, J. A., Tomé, C. M. L., Ekström, P., Mattsson, B., Björklund, A., & Brundin, P. (2012). Alpha-synuclein cell-to-cell transfer and seeding in grafted dopaminergic neurons in vivo. *PLOS ONE*, 7(6), e39465.
12. **Appel-Cresswell**, S., Vilarino-Guell, C., Encarnacion, M., Sherman, H., Yu, I., Shah, B. Weir, D., Thompson, C., Szu-Tu, C., Tinh, J., Aasly, J. O., Rajput, A., Rajput, A. H., Stoessl, A. J., Ferrer, M. J. (2013). Alpha-synuclein p. H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 28(6), 811-813.
13. **Ariesandi**, W., Chang, C. F., Chen, T. E., & Chen, Y. R. (2013). Temperature-dependent structural changes of Parkinson's alpha-synuclein reveal the role of pre-existing oligomers in alpha-synuclein fibrillization. *PLOS ONE*, 8(1), e53487.
14. **Avraham**, E., Rott, R., Liani, E., Szargel, R., & Engelender, S. (2007). Phosphorylation of Parkin by the cyclin-dependent kinase 5 at the linker region modulates its ubiquitin-ligase activity and aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(17), 12842-12850.
15. **Baba**, M., Nakajo, S., Tu, P. H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q & Iwatsubo, T. (1998). Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *The American Journal of Pathology*, 152(4), 879.

16. **Bae**, Y. J., Park, K. S., & Kang, S. J. (2003). Genomic organization and expression of parkin in *Drosophila melanogaster*. *Experimental & Molecular Medicine*, 35(5), 393.
17. **Baker**, M. J., Lampe, P. A., Stojanovski, D., Korwitz, A., Anand, R., Tatsuta, T., & Langer, T. (2014). Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics. *The EMBO Journal*, 33(6), 578-593.
18. **Banerjee**, K., Sinha, M., Pham, C. L. L., Jana, S., Chanda, D., Cappai, R., & Chakrabarti, S. (2010). α -Synuclein induced membrane depolarization and loss of phosphorylation capacity of isolated rat brain mitochondria: Implications in Parkinson's disease. *FEBS Letters*, 584(8), 1571-1576.
19. **Bartels**, T., Choi, J. G., & Selkoe, D. J. (2011). α -synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*, 477(7362), 107.
20. **Beckman**, J. S., & Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 271(5), C1424-C1437.
21. **Bendor**, J. T., Logan, T. P., & Edwards, R. H. (2013). The function of α -synuclein. *Neuron*, 79(6), 1044-1066.
22. **Bengoa-Vergniory**, N., Roberts, R. F., Wade-Martins, R., & Alegre-Abarrategui, J. (2017). Alpha-synuclein oligomers: a new hope. *Acta Neuropathologica*, 134(6), 819-838.
23. **Béraud**, D., Hathaway, H. A., Trecki, J., Chasovskikh, S., Johnson, D. A., Johnson, J. A., Federoff, H. J., Shimoji, M., Mhyre, T. R. & Maguire-Zeiss, K. A. (2013). Microglial activation and antioxidant responses induced by the Parkinson's disease protein α -synuclein. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 8(1), 94-117.
24. **Berger**, A. K., Cortese, G. P., Amodeo, K. D., Weihofen, A., Letai, A., & LaVoie, M. J. (2009). Parkin selectively alters the intrinsic threshold for mitochondrial cytochrome c release. *Human Molecular Genetics*, 18(22), 4317-4328.
25. **Berridge**, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127-152.
26. **Berthet**, A., Margolis, E. B., Zhang, J., Hsieh, I., Zhang, J., Hnasko, T. S., Ahmad, J., Edwards, R. H., Sesaki, H., Huang, E. J., Nakamura, K (2014). Loss of mitochondrial fission depletes axonal mitochondria in midbrain dopamine neurons. *Journal of Neuroscience*, 34(43), 14304-14317.
27. **Beyer**, K., Domingo-Sábat, M., Humbert, J., Carrato, C., Ferrer, I., & Ariza, A. (2008). Differential expression of alpha-synuclein, parkin, and synphilin-1 isoforms in Lewy body disease. *Neurogenetics*, 9(3), 163-172.
28. **Bhat**, A. H., Dar, K. B., Anees, S., Zargar, M. A., Masood, A., Sofi, M. A., & Ganie, S. A. (2015). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 74, 101-110.
29. **Bingol**, B., & Sheng, M. (2016). Mechanisms of mitophagy: PINK1, Parkin, USP30 and beyond. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 210-222.
30. **Bjedov**, I., Toivonen, J. M., Kerr, F., Slack, C., Jacobson, J., Foley, A., & Partridge, L. (2010). Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metabolism*, 11(1), 35-46.
31. **Bossy-Wetzel**, E., Schwarzenbacher, R., & Lipton, S. A. (2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature Medicine*, 10(7), S2.
32. **Braak**, H., de Vos, R. A., Bohl, J., & Del Tredici, K. (2006). Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neuroscience Letters*, 396(1), 67-72.
33. **Braak**, H., Del Tredici, K., Rüb, U., De Vos, R. A., Steur, E. N. J., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(2), 197-211.
34. **Braak**, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., & Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and Tissue Research*, 318(1), 121-134.

35. **Bradford**, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
36. **Braun**, A. R., Sevcsik, E., Chin, P., Rhoades, E., Tristram-Nagle, S., & Sachs, J. N. (2012). α -synuclein induces both positive mean curvature and negative Gaussian curvature in membranes. *Journal of the American Chemical Society*, 134(5), 2613-2620.
37. **Burman**, J. L., Yu, S., Poole, A. C., Decal, R. B., & Pallanck, L. (2012). Analysis of neural subtypes reveals selective mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons from parkin mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), 10438-10443.
38. **Burré**, J., Sharma, M., & Südhof, T. C. (2014). α -synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(40), E4274-E4283.
39. **Burré**, J., Sharma, M., & Südhof, T. C. (2015). Definition of a molecular pathway mediating α -synuclein neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 35(13), 5221-5232.
40. **Burré**, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M. R., & Südhof, T. C. (2010). α -synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science*, 329(5999), 1663-1667.
41. **Burté**, F., Carelli, V., Chinnery, P. F., & Yu-Wai-Man, P. (2015). Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology*, 11(1), 11.
42. **Butler**, E. K., Voigt, A., Lutz, A. K., Toegel, J. P., Gerhardt, E., Karsten, P., Butler, J. S., Fearon, C., Killane, I., Waechter, S. M., Reilly, R. B., & Lynch, T. (2017). Motor preparation rather than decision-making differentiates Parkinson's disease patients with and without freezing of gait. *Clinical Neurophysiology*, 128(3), 463-471.
43. **Cabin**, D. E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N. B., Gottschalk, W., McIlwain, K. L., Orrison, B., Chen, A., Ellis, C. E., Paylor, R., Lu, B., Nussbaum, R. L. (2002). Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking α -synuclein. *Journal of Neuroscience*, 22(20), 8797-8807.
44. **Calì**, T., Ottolini, D., Negro, A., & Brini, M. (2013). Enhanced parkin levels favor ER-mitochondria crosstalk and guarantee Ca²⁺ transfer to sustain cell bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1832(4), 495-508.
45. **Calo**, L., Wegrzynowicz, M., Santivañez-Perez, J., & Grazia Spillantini, M. (2016). Synaptic failure and α -synuclein. *Movement Disorders*, 31(2), 169-177.
46. **Caraveo**, G., Auluck, P. K., Whitesell, L., Chung, C. Y., Baru, V., Mosharov, E. V., Yan, X., Ben-Johny, M., Soste, M., Picotti, P., Kim, H., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Sulzer, D., Yue, D. T., Lindquist, S. (2014). Calcineurin determines toxic versus beneficial responses to α -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(34), E3544-E3552.
47. **Carroll**, R. G., Hollville, E., & Martin, S. J. (2014). Parkin sensitizes toward apoptosis induced by mitochondrial depolarization through promoting degradation of Mcl-1. *Cell Reports*, 9(4), 1538-1553.
48. **Cersosimo**, M. G. (2015). Gastrointestinal biopsies for the diagnosis of alpha-synuclein pathology in Parkinson's disease. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015.
49. **Chakraborty**, J., Basso, V., & Ziviani, E. (2017). Post translational modification of Parkin. *Biology Direct*, 12(1), 6.
50. **Chan**, N. C., Salazar, A. M., Pham, A. H., Sweredoski, M. J., Kolawa, N. J., Graham, R. L., Hess, S., Chan, D. C. (2011). Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Human Molecular Genetics*, 20(9), 1726-1737.
51. **Charan**, R. A., Johnson, B. N., Zaganelli, S., Nardozi, J. D., & LaVoie, M. J. (2014). Inhibition of apoptotic Bax translocation to the mitochondria is a central function of parkin. *Cell Death & Disease*, 5(7), e1313.
52. **Chartier-Harlin**, M. C., 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). α -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *The Lancet*, 364(9440), 1167-1169.

53. **Checler, F., & Da Costa, C. A.** (2014). p53 in neurodegenerative diseases and brain cancers. *Pharmacology & Therapeutics*, *142*(1), 99-113.
54. **Chen, D., Gao, F., Li, B., Wang, H., Xu, Y., Zhu, C., & Wang, G.** (2010). Parkin mono-ubiquitinates Bcl-2 and regulates autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(49), 38214-38223.
55. **Chen, L., Jin, J., Davis, J., Zhou, Y., Wang, Y., Liu, J., Lockhart, P. J., Zhang, J.** (2007). Oligomeric α -synuclein inhibits tubulin polymerization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *356*(3), 548-553.
56. **Chen, Y., & Dorn, G. W.** (2013). PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science*, *340*(6131), 471-475.
57. **Chinta, S. J., Mallajosyula, J. K., Rane, A., & Andersen, J. K.** (2010). Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. *Neuroscience Letters*, *486*(3), 235-239.
58. **Cho, M. K., Nodet, G., Kim, H. Y., Jensen, M. R., Bernado, P., Fernandez, C. O., Becker, S., Blackledge, M., Zweckstetter, M.** (2009). Structural characterization of α -synuclein in an aggregation prone state. *Protein Science*, *18*(9), 1840-1846.
59. **Choi, B. K., Choi, M. G., Kim, J. Y., Yang, Y., Lai, Y., Kweon, D. H., Lee, N. K., Shin, Y. K.** (2013). Large α -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(10), 4087-4092.
60. **Choi, K. C., Kim, S. H., Ha, J. Y., Kim, S. T., & Son, J. H.** (2010). A novel mTOR activating protein protects dopamine neurons against oxidative stress by repressing autophagy related cell death. *Journal of Neurochemistry*, *112*(2), 366-376.
61. **Choi, P., Snyder, H., Petrucelli, L., Theisler, C., Chong, M., Zhang, Y., Lim, K., Chung, K. K., Kehoe, K., D'Adamio, L., Lee, J. M., Cochran, E., Bowser, R., Dawson, T. M., Wolozin, B.** (2003). SEPT5_v2 is a parkin-binding protein. *Molecular Brain Research*, *117*(2), 179-189.
62. **Chomczynski, P., & Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*(1), 156-159.
63. **Choo, Y. S., Vogler, G., Wang, D., Kalvakuri, S., Iliuk, A., Tao, W. A., Bodmer, R., Zhang, Z.** (2012). Regulation of parkin and PINK1 by neddylation. *Human Molecular Genetics*, *21*(11), 2514-2523.
64. **Choubey, V., Safiulina, D., Vaarmann, A., Cagalinec, M., Wareski, P., Kuum, M., Zharkovsky, A., Kaasik, A.** (2011). Mutant A53T α -synuclein induces neuronal death by increasing mitochondrial autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(12), 10814-10824.
65. **Chu, Y., Dodiya, H., Aebischer, P., Olanow, C. W., & Kordower, J. H.** (2009). Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiology of Disease*, *35*(3), 385-398.
66. **Chung, K. K., Thomas, B., Li, X., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Marsh, L., Dawson, V. L., Dawson, T. M.** (2004). S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science*, *304*(5675), 1328-1331.
67. **Cole, N. B.** (2008). Metal Catalyzed Oxidation of Alpha-synuclein-A Role for Oligomerization in Pathology?. *Current Alzheimer Research*, *5*(6), 599-606.
68. **Colla, E., Jensen, P. H., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Glabe, C., & Lee, M. K.** (2012). Accumulation of toxic α -synuclein oligomer within endoplasmic reticulum occurs in α -synucleinopathy in vivo. *Journal of Neuroscience*, *32*(10), 3301-3305.
69. **Cookson, M. R.** (2003). Neurodegeneration: how does parkin prevent Parkinson's disease?. *Current Biology*, *13*(13), R522-R524.
70. **Coppedè, F.** (2012). Genetics and epigenetics of Parkinson's disease. *The Scientific World Journal*, *2012*.
71. **Corbillé, A. G., Preterre, C., Rolli-Derkinderen, M., Coron, E., Neunlist, M., Lebouvier, T., & Derkinderen, P.** (2017). Biochemical analysis of α -synuclein extracted from control and Parkinson's disease colonic biopsies. *Neuroscience Letters*, *641*, 81-86.

72. **Crouch**, S. P. M., Kozlowski, R., Slater, K. J., & Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 160(1), 81-88.
73. **Czapski**, G. A., Gąssowska, M., Wilkaniec, A., Cieślík, M., & Adamczyk, A. (2013). Extracellular alpha-synuclein induces calpain-dependent overactivation of cyclin-dependent kinase 5 in vitro. *FEBS Letters*, 587(18), 3135-3141.
74. **Da Costa**, C. A., Paitel, E., Vincent, B., & Checler, F. (2002). α -synuclein Lowers p53-dependent Apoptotic Response of Neuronal Cells. Abolishment by 6-hydroxydopamine and implication for parkinson's disease. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50980-50984.
75. **Da Costa**, C. A., Sunyach, C., Giaime, E., West, A., Corti, O., Brice, A., Safe, S., Abou-Sleiman, P. M., Wood, N. W., Takahashi, H., Goldberg, M. S., Shen, J., Checler, F. (2009). Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. *Nature Cell Biology*, 11(11), 1370.
76. **D'agata**, V., Grimaldi, M., Pascale, A., & Cavallaro, S. (2000). Regional and cellular expression of the parkin gene in the rat cerebral cortex. *European Journal of Neuroscience*, 12(10), 3583-3588.
77. **Dagda**, R. K., Cherra, S. J., Kulich, S. M., Tandon, A., Park, D., & Chu, C. T. (2009). Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13843-13855.
78. **Danzer**, K. M., Haasen, D., Karow, A. R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretschmar, H., Hengerer, B., Kostka, M. (2007). Different species of α -synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *Journal of Neuroscience*, 27(34), 9220-9232.
79. **Danzer**, K. M., Kranich, L. R., Ruf, W. P., Cagsal-Getkin, O., Winslow, A. R., Zhu, L., Vanderburg, C. R., McLean, P. J. (2012). Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Molecular Neurodegeneration*, 7(1), 42.
80. **Darios**, F., Corti, O., Lücking, C. B., Hampe, C., Muriel, M. P., Abbas, N., Gu, W. J., Hirsch, E. C., Rooney T., Ruberg M., Brice, A. (2003). Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Human Molecular Genetics*, 12(5), 517-526.
81. **Dauer**, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39(6), 889-909.
82. **Dawson**, T. M., & Dawson, V. L. (2010). The role of parkin in familial and sporadic Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 25(S1).
83. **Dawson**, T. M., & Dawson, V. L. (2014). Parkin plays a role in sporadic Parkinson's disease. *Neurodegenerative Diseases*, 13(2-3), 69-71.
84. **De Rijk**, M. C., Launer, L. J., Berger, K., Breteler, M. M., Dartigues, J. F., Baldereschi, M., Fratiglioni, L., Lobo, A., Martinez-Lage, J., Trenkwalder, C., Hofman, A. (2000). Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*, 54(11 Suppl 5), S21-3.
85. **De Vries**, R. L., Przedborski, S. (2013) Mitophagy and Parkinson's disease: be eaten to stay healthy. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 55:37- 43.
86. **Deas**, E., Cremades, N., Angelova, P. R., Ludtmann, M. H., Yao, Z., Chen, S., Horrocks, M. H., Banushi, B., Little, D., Devine, M. J., Gissen, P., Klenerman, D., Dobson, C. M., Wood, N. W., Gandhi, S., Abramov, A. Y. (2016). Alpha-synuclein oligomers interact with metal ions to induce oxidative stress and neuronal death in Parkinson's disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 24(7), 376-391.
87. **Dehay**, B., Bové, J., Rodríguez-Muela, N., Perier, C., Recasens, A., Boya, P., & Vila, M. (2010). Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, 30(37), 12535-12544.
88. **Desplats**, P., Lee, H. J., Bae, E. J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E., Lee, S. J. (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of α -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 13010-13015.

89. **Dettmer**, U., Newman, A. J., Luth, E. S., Bartels, T., & Selkoe, D. (2013). In vivo cross-linking reveals principally oligomeric forms of α -synuclein and β -synuclein in neurons and non-neural cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(9), 6371-6385.
90. **Dettmer**, U., Newman, A. J., Soldner, F., Luth, E. S., Kim, N. C., Von Saucken, V. E., Sanderson, J. B., Jaenisch, R., Bartels, T., Selkoe, D. (2015). Parkinson-causing α -synuclein missense mutations shift native tetramers to monomers as a mechanism for disease initiation. *Nature Communications*, 6, 7314.
91. **Devi**, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of α -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9089-9100.
92. **Devoto**, V. M. P., & Falzone, T. L. (2017). Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease: a role for α -synuclein?. *Disease Models & Mechanisms*, 10(9), 1075-1087.
93. **Dias**, V., Junn, E., & Mouradian, M. M. (2013). The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 3(4), 461-491.
94. **Diógenes**, M. J., Dias, R. B., Rombo, D. M., Miranda, H. V., Maiolino, F., Guerreiro, P., Näsström, T., Franquelim, H. G., Oliveira, L. M., Castanho, M. A., Lannfelt, L., Bergström, J., Ingelsson, M., Quintas, A., Sebastião, A. M., Lopes, L. V., Outeiro, T.F. (2012). Extracellular alpha-synuclein oligomers modulate synaptic transmission and impair LTP via NMDA-receptor activation. *Journal of Neuroscience*, 32(34), 11750-11762.
95. **Doss-Pepe**, E. W., Chen, L., & Madura, K. (2005). α -synuclein and parkin contribute to the assembly of ubiquitin lysine 63-linked multiubiquitin chains. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 16619-16624.
96. **Drescher**, M., Huber, M., & Subramaniam, V. (2012). Hunting the Chameleon: Structural Conformations of the Intrinsically Disordered Protein Alpha-Synuclein. *ChemBioChem*, 13(6), 761-768.
97. **Duplan**, E., Sevalle, J., Viotti, J., Goiran, T., Bauer, C., Renbaum, P., Levy-Lahad, E., Gautier, C. A., Corti, O., Leroudier, N., Checler, F., da Costa, C. A. (2013). Parkin differently regulates presenilin-1 and presenilin-2 functions by direct control of their promoter transcription. *Journal of Molecular Cell Biology*, 5(2), 132-142.
98. **Durcan**, T. M., Tang, M. Y., Pérusse, J. R., Dashti, E. A., Aguilera, M. A., McLelland, G. L., Gros, P., Shaler, T. A., Faubert, D., Coulombe, B., Fon, E. A. (2014). USP8 regulates mitophagy by removing K6-linked ubiquitin conjugates from parkin. *The EMBO Journal*, e201489729.
99. **Duvezin-Caubet**, S., Jagasia, R., Wagener, J., Hofmann, S., Trifunovic, A., Hansson, A., Chomyn, A., Bauer, M. F., Attardi, G., Larsson, N. G., Neupert, W., Reichert, A.S. (2006). Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49), 37972-37979.
100. **Dye**, B. T., & Schulman, B. A. (2007). Structural mechanisms underlying posttranslational modification by ubiquitin-like proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 36, 131-150.
101. **Ebrahimi-Fakhari**, D., Cantuti-Castelvetri, I., Fan, Z., Rockenstein, E., Masliah, E., Hyman, B. T., McLean, P. J., Unni, V. K. (2011). Distinct roles in vivo for the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosomal pathway in the degradation of α -synuclein. *Journal of Neuroscience*, 31(41), 14508-14520.
102. **Egan**, D. F., Shackelford, D. B., Mihaylova, M. M., Gelino, S., Kohnz, R. A., Mair, W., Vasquez, D. S., Joshi, A., Gwinn, D. M., Taylor, R., Asara, J. M., Fitzpatrick, J., Dillin, A., Viollet, B., Kundu, M., Hansen, M., Shaw, R. J. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*, 331(6016), 456-461.
103. **Ekholm-Reed**, S., Goldberg, M. S., Schlossmacher, M. G., & Reed, S. I. (2013). Parkin-dependent degradation of the F-box protein Fbw7 β promotes neuronal survival in response to oxidative stress by stabilizing Mcl-1. *Molecular and Cellular Biology*, 33(18), 3627-3643.

104. **Eschbach**, J., Von Einem, B., Müller, K., Bayer, H., Scheffold, A., Morrison, B. E., Rudolph, K. L., Thal, D. R., Witting, A., Weydt, P., Otto, M., Fauler, M., Liss, B., McLean, P. J., Spada, A. R., Ludolph, A. C., Weishaupt, J. H., Danzer, K. M. (2015). Mutual exacerbation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α deregulation and α -synuclein oligomerization. *Annals of Neurology*, 77(1), 15-32.
105. **Exner**, N., Lutz, A. K., Haass, C., & Winklhofer, K. F. (2012). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *The EMBO journal*, 31(14), 3038-3062.
- Falkenburger, B., Reinartz, A., Winklhofer, K. F. Schulz, J. B. (2012). The mitochondrial chaperone protein TRAP1 mitigates α -synuclein toxicity. *PLOS Genetics*, 8(2), e1002488.
106. **Ferretta**, A., Gaballo, A., Tanzarella, P., Piccoli, C., Capitano, N., Nico, B., Annese, T., Di Paola, M., Dell'aquila, C., De Mari, M., Ferranini, E., Bonifati, V., Pacelli, C., Cocco, T. (2014). Effect of resveratrol on mitochondrial function: implications in parkin-associated familial Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(7), 902-915.
107. **Finck**, B. N., & Kelly, D. P. (2006). PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(3), 615-622.
108. **Frank-Cannon**, T. C., Tran, T., Ruhn, K. A., Martinez, T. N., Hong, J., Marvin, M., Hartley, M., Treviño, I., O'Brien, D. E., Casey, B., Goldberg, M. S., Tansey, M. G. (2008). Parkin deficiency increases vulnerability to inflammation-related nigral degeneration. *Journal of Neuroscience*, 28(43), 10825-10834.
109. **Friedman** A. (2005). Mechanizmy neurodegeneracji w chorobie Parkinsona. Choroba Parkinsona - mechanizmy, rozpoznawanie, leczenie. Wydawnictwo Czelej, Warszawa 2005, wyd.1.
110. **Fukae**, J., Sato, S., Shiba, K., Sato, K. I., Mori, H., Sharp, P. A., Mizuno, Y., Hattori, N. (2009). Programmed cell death-2 isoform1 is ubiquitinated by parkin and increased in the substantia nigra of patients with autosomal recessive Parkinson's disease. *FEBS Letters*, 583(3), 521-525.
111. **Gasser**, T. (2009). Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11.
112. **Gąssowska**, M., Czapski, G. A., Pająk, B., Cieślík, M., Lenkiewicz, A. M., & Adamczyk, A. (2014). Extracellular α -synuclein leads to microtubule destabilization via GSK-3 β -dependent Tau phosphorylation in PC12 cells. *PLOS ONE*, 9(4), e94259.
113. **Gautier**, C. A., Erpapazoglou, Z., Mouton-Liger, F., Muriel, M. P., Cormier, F., Bigou, S., Duffaure, S., Girard, M., Foret, B., Iannielli, A., Broccoli, V., Dalle, C., Bohl, D., Michel, P. P., Corvol, J. C., Brice, A., Corti, O. (2016). The endoplasmic reticulum-mitochondria interface is perturbed in PARK2 knockout mice and patients with PARK2 mutations. *Human Molecular Genetics*, 25(14), 2972-2984.
114. **Gegg**, M. E., & Schapira, A. H. (2011). PINK1-parkin-dependent mitophagy involves ubiquitination of mitofusins 1 and 2: implications for Parkinson disease pathogenesis. *Autophagy*, 7(2), 243-245.
115. **Gegg**, M. E., Cooper, J. M., Chau, K. Y., Rojo, M., Schapira, A. H., & Taanman, J. W. (2010). Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Human Molecular Genetics*, 19(24), 4861-4870.
116. **Geisler**, S., Holmström, K. M., Skujat, D., Fiesel, F. C., Rothfuss, O. C., Kahle, P. J., & Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature Cell Biology*, 12(2), 119.
117. **Gispert**, S., Ricciardi, F., Kurz, A., Azizov, M., Hoepken, H. H., Becker, D., Voos, W., Leuner, K., Müller, W. E., Kudin, A. P., Kunz, W. S., Zimmermann, A., Roeper, J., Wenzel, D., Jendrach, M., García-Arencibia, M., Fernández-Ruiz, J., Huber, L., Rohrer, H., Barrera, M., Reichert, A. S., Rüb, U., Chen, A., Nussbaum, R. L., Auburger, G. (2009). Parkinson phenotype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration. *PLOS ONE*, 4(6), e5777.

118. **Glauser, L.**, Sonnay, S., Stafa, K., & Moore, D. J. (2011). Parkin promotes the ubiquitination and degradation of the mitochondrial fusion factor mitofusin 1. *Journal of Neurochemistry*, *118*(4), 636-645.
119. **Goldberg, M. S.**, Fleming, S. M., Palacino, J. J., Cepeda, C., Lam, H. A., Bhatnagar, A., Meloni, E. G., Wu, N., Ackerson, L. C., Klapstein, G. J., Gajendiran, M., Roth, B. L., Chesselet, M. F., Maidment, N. T., Levine, M. S., Shen, J. (2003). Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(44), 43628-43635.
120. **Gong, Y.**, Xiong, K. P., Mao, C. J., Shen, Y., Hu, W. D., Huang, J. Y., Han, F., Chen, R., Liu, C. F. (2014). Clinical manifestations of Parkinson disease and the onset of rapid eye movement sleep behavior disorder. *Sleep Medicine*, *15*(6), 647-653.
121. **Good, P. F.**, Hsu, A., Werner, P., Perl, D. P., & Olanow, C. W. (1998). Protein nitration in Parkinson's disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *57*(4), 338-342.
122. **Gu, G.**, Reyes, P. F., Golden, G. T., Woltjer, R. L., Hulette, C., Montine, T. J., & Zhang, J. (2002). Mitochondrial DNA deletions/rearrangements in parkinson disease and related neurodegenerative disorders. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *61*(7), 634-639.
123. **Gu, W. J.**, Abbas, N., Lagunes, M. Z., Parent, A., Pradier, L., Bohme, G. A., Agid, Y., Hirsch, E. C., Raisman-Vozari, R., Brice, A. (2000). Cloning of rat parkin cDNA and distribution of parkin in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, *74*(4), 1773-1776.
124. **Guardia-Laguarta, C.**, Area-Gomez, E., Rüb, C., Liu, Y., Magrané, J., Becker, D., Voos, W., Schon, E. A., Przedborski, S. (2014). α -synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. *Journal of Neuroscience*, *34*(1), 249-259.
125. **Gui, Y. X.**, Wang, X. Y., Kang, W. Y., Zhang, Y. J., Zhang, Y., Zhou, Y., Quinn, T. J., Liu, J., Chen, S. D. (2012). Extracellular signal-regulated kinase is involved in alpha-synuclein-induced mitochondrial dynamic disorders by regulating dynamin-like protein 1. *Neurobiology of Aging*, *33*(12), 2841-2854.
126. **Hammerling, B. C.**, Cortez, M. Q., Najor, R. H., & Gustafsson, Å. B. (2016). Parkin is Critical for the Clearance of Damaged Mitochondria via an Autophagy-independent Pathway. *Circulation Research*, *119*, 1.
127. **Hampe, C.**, Ardila-Osorio, H., Fournier, M., Brice, A., & Corti, O. (2006). Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity. *Human Molecular Genetics*, *15*(13), 2059-2075.
128. **Han, H.**, Weinreb, P. H., & Lansbury Jr, P. T. (1995). The core Alzheimer's peptide NAC forms amyloid fibrils which seed and are seeded by β -amyloid: is NAC a common trigger or target in neurodegenerative disease?. *Chemistry & Biology*, *2*(3), 163-169.
129. **Hansen, C.**, Angot, E., Bergström, A. L., Steiner, J. A., Pieri, L., Paul, G., Outeiro, T. F., Melki, R., Kallunki, P., Fog, K., Li, J. Y., Brundin P. (2011). α -synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *The Journal of Clinical Investigation*, *121*(2), 715-725.
130. **Hebron, M.**, Chen, W., Miessau, M. J., Lonskaya, I., & Moussa, C. E. H. (2014). Parkin reverses TDP-43-induced cell death and failure of amino acid homeostasis. *Journal of Neurochemistry*, *129*(2), 350-361.
131. **Henchcliffe, C.**, & Beal, M. F. (2008). Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nature Reviews Neurology*, *4*(11), 600.
132. **Henn, I. H.**, Bouman, L., Schlehe, J. S., Schlierf, A., Schramm, J. E., Wegener, E., Nakaso, K., Culmsee, C., Berninger, B., Krappmann, D., Tatzelt, J., Winklhofer, K. F. (2007). Parkin mediates neuroprotection through activation of I κ B kinase/nuclear factor- κ B signaling. *Journal of Neuroscience*, *27*(8), 1868-1878.
133. **Heo, J. M.**, Ordureau, A., Paulo, J. A., Rinehart, J., & Harper, J. W. (2015). The PINK1-PARKIN mitochondrial ubiquitylation pathway drives a program of OPTN/NDP52 recruitment and TBK1 activation to promote mitophagy. *Molecular Cell*, *60*(1), 7-20.

134. **Hirsch, L.**, Jette, N., Frolkis, A., Steeves, T., & Pringsheim, T. (2016). The incidence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology*, *46*(4), 292-300.
135. **Hoffman-Zacharska, D.**, Kozirowski, D., Ross, O. A., Milewski, M., Poznański, J., Jurek, M., Wszolek, Z. K., Soto-Ortolaza, A., Awek, J. A. S., Janik, P., Jamrozik, Z., Potulska-Chromik, A., Jasinska-Myga, B., Opala, G., Krygowska-Wajs, A., Czyzewski, K., Dickson, D. W., Bal, J., Friedman, A. (2013). Novel A18T and pA29S substitutions in α -synuclein may be associated with sporadic Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, *19*(11), 1057-1060.
136. **Hristova, V. A.**, Beasley, S. A., Rylett, R. J., & Shaw, G. S. (2009). Identification of a novel Zn²⁺-binding domain in the autosomal recessive juvenile Parkinson-related E3 ligase parkin. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(22), 14978-14986.
137. **Hurtig, H. I.**, Trojanowski, J. Q., Galvin, J., Ewbank, D., Schmidt, M. L., Lee, V. Y., Clark, C. M., Glosser, G., Stern, M. B., Gollomp, S. M., Arnold, S. E. (2000). Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease. *Neurology*, *54*(10), 1916-1921.
138. **Im, E.**, & Chung, K. C. (2015). Dyrk1A phosphorylates parkin at Ser-131 and negatively regulates its ubiquitin E3 ligase activity. *Journal of Neurochemistry*, *134*(4), 756-768.
139. **Imai, Y.**, Soda, M., & Takahashi, R. (2000). Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(46), 35661-35664.
140. **Imai, Y.**, Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y., & Takahashi, R. (2001). An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell*, *105*(7), 891-902.
141. **Imam, S. Z.**, Zhou, Q., Yamamoto, A., Valente, A. J., Ali, S. F., Bains, M., Roberts, J. L., Kahle, P. J., Clark, R. A., Li, S. (2011). Novel regulation of parkin function through c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation: implications for Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, *31*(1), 157-163.
142. **Ingelsson, M.** (2016). Alpha-synuclein Oligomers—Neurotoxic Molecules in Parkinson's Disease and Other Lewy Body Disorders. *Frontiers in Neuroscience*, *10*, 408.
143. **Ishihara, N.**, Otera, H., Oka, T., & Mihara, K. (2013). Regulation and physiologic functions of GTPases in mitochondrial fusion and fission in mammals. *Antioxidants & Redox Signaling*, *19*(4), 389-399.
144. **Itakura, E.**, Kishi-Itakura, C., Koyama-Honda, I., & Mizushima, N. (2012). Structures containing Atg9A and the ULK1 complex independently target depolarized mitochondria at initial stages of Parkin-mediated mitophagy. *Journal of Cell Science*, *125*(6), 1488-1499.
145. **Itoh, K.**, Nakamura, K., Iijima, M., & Sesaki, H. (2013). Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends in Cell Biology*, *23*(2), 64-71.
146. **Jaffrey, S. R.**, & Snyder, S. H. (2001). The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Science's STKE*, *2001*(86), p11.
147. **Janezic, S.**, Threlfell, S., Dodson, P. D., Dowie, M. J., Taylor, T. N., Potgieter, D., Parkkinen, L., Senior, S. L., Anwar, S., Ryan, B., Deltheil, T., Kosillo, P., Cioroch, M., Wagner, K., Ansorge, O., Bannerman, D. M., Bolam, J. P., Magill, P. J., Cragg, S. J., Wade-Martins, R. (2013). Deficits in dopaminergic transmission precede neuron loss and dysfunction in a new Parkinson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(42), E4016-E4025.
148. **Jang, A.**, Lee, H. J., Suk, J. E., Jung, J. W., Kim, K. P., & Lee, S. J. (2010). Non-classical exocytosis of α -synuclein is sensitive to folding states and promoted under stress conditions. *Journal of Neurochemistry*, *113*(5), 1263-1274.
149. **Jiang, H.**, Jiang, Q., Liu, W., & Feng, J. (2006). Parkin suppresses the expression of monoamine oxidases. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(13), 8591-8599.
150. **Jiang, H.**, Ren, Y., Yuen, E. Y., Zhong, P., Ghaedi, M., Hu, Z., Azabdaftari, G., Nakaso, K., Yan, Z., Feng, J. (2012). Parkin controls dopamine utilization in human midbrain dopaminergic neurons derived from induced pluripotent stem cells. *Nature Communications*, *3*, 668.
151. **Joazeiro, C. A.**, & Weissman, A. M. (2000). RING finger proteins. *Cell*, *102*(5), 549-552.

152. **Johnson**, B. N., Berger, A. K., Cortese, G. P., & LaVoie, M. J. (2012). The ubiquitin E3 ligase parkin regulates the proapoptotic function of Bax. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(16), 6283-6288.
153. **Jung**, C. H., Ro, S. H., Cao, J., Otto, N. M., & Kim, D. H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters*, *584*(7), 1287-1295.
154. **Kamp**, F., Exner, N., Lutz, A. K., Wender, N., Hegemann, J., Brunner, B., Nuscher, B., Bartels, T., Giese, A., Beyer, K., Eimer, S., Winklhofer, K. F., Haass, C. (2010). Inhibition of mitochondrial fusion by α -synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *The EMBO Journal*, *29*(20), 3571-3589.
155. **Kaufmann**, T. J., Harrison, P. M., Richardson, M. J., Pinheiro, T. J., & Wall, M. J. (2016). Intracellular soluble α -synuclein oligomers reduce pyramidal cell excitability. *The Journal of Physiology*, *594*(10), 2751-2772.
156. **Kawahara**, K., Hashimoto, M., Bar-On, P., Ho, G. J., Crews, L., Mizuno, H., Rockenstein, E., Imam, S. Z., Masliah, E. (2008). α -synuclein Aggregates Interfere with Parkin solubility and distribution role in the pathogenesis of Parkinson disease. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(11), 6979-6987.
157. **Kawalec**, M., Beręsewicz, M., Zabłocki, K., & Zabłocka, B. (2016). Mitofusin 2 and mitochondrial dynamics in norm and pathology. *Postepy Biochemii*, *62*(2), 149-157.
158. **Kazmierczak**, A., Strosznajder, J. B., & Adamczyk, A. (2008). α -synuclein enhances secretion and toxicity of amyloid beta peptides in PC12 cells. *Neurochemistry International*, *53*(6-8), 263-269.
159. **Kemeny**, S., Dery, D., Loboda, Y., Rovner, M., Lev, T., Zuri, D., Finberg, J. P., Larisch, S. (2012). Parkin promotes degradation of the mitochondrial pro-apoptotic ARTS protein. *PLOS ONE*, *7*(7), e38837.
160. **Khandelwal**, P. J., Dumanis, S. B., Feng, L. R., Maguire-Zeiss, K., Rebeck, G. W., Lashuel, H. A., & Moussa, C. E. (2010). Parkinson-related parkin reduces α -synuclein phosphorylation in a gene transfer model. *Molecular Neurodegeneration*, *5*(1), 47.
161. **Khurana**, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S. A., Krishna, V., Grover, R. K., Roy, R., Singh, S. (2005). Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology*, *151*(3), 229-238.
162. **Kilpatrick**, I. C. (1991). Rapid, automated HPLC analysis of neuroactive and other amino acids in microdissected brain regions and brain slice superfusates using fluorimetric detection. In *Neuroendocrine Research Methods* (Vol. 2, pp. 555-578). Harwood Academic Publishers Chur, Switzerland.
163. **Kitada**, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, *392*(6676), 605.
164. **Kitada**, T., Asakawa, S., Minoshima, S., Mizuno, Y., & Shimizu, N. (2000). Molecular cloning, gene expression, and identification of a splicing variant of the mouse parkin gene. *Mammalian Genome*, *11*(6), 417-421.
165. **Kitada**, T., Tong, Y., Gautier, C. A., & Shen, J. (2009). Absence of nigral degeneration in aged parkin/DJ-1/PINK1 triple knockout mice. *Journal of Neurochemistry*, *111*(3), 696-702.
166. **Klucken**, J., Poehler, A. M., Ebrahimi-Fakhari, D., Schneider, J., Nuber, S., Rockenstein, E., Schlötzer-Schrehardt, U., Hyman, B. T., McLean, P. J., Masliah, E., Winkler, J. (2012). Alpha-synuclein aggregation involves a bafilomycin A1-sensitive autophagy pathway. *Autophagy*, *8*(5), 754-766.
167. **Ko**, H. S., Kim, S. W., Sriram, S. R., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2006). Identification of far upstream element-binding protein-1 as an authentic Parkin substrate. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(24), 16193-16196.
168. **Ko**, H. S., von Coelln, R., Sriram, S. R., Kim, S. W., Chung, K. K., Pletnikova, O., Troncoso, J., Johnson, B., Saffary, R., Goh, E. L., Song, H., Park, B. J., Kim, M. J., Kim, S., Dawson, V. L., Dawson, T. M. (2005). Accumulation of the authentic parkin substrate aminoacyl-tRNA synthetase cofactor, p38/JTV-1, leads to catecholaminergic cell death. *Journal of Neuroscience*, *25*(35), 7968-7978.

169. **Kojima**, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., Nagano, T. (1998). Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry*, *70*(13), 2446-2453.
170. **Komander**, D., & Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annual Review of Biochemistry*, *81*, 203-229.
171. **Kondapalli**, C., Kazlauskaitė, A., Zhang, N., Woodroof, H. I., Campbell, D. G., Gourlay, R., Burchell, L., Walden, H., Macartney, T. J., Deak, M., Knebel, A., Alessi, D. R., Muqit, M. M. (2012). PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biology*, *2*(5), 120080.
172. **Kontopoulos**, E., Parvin, J. D., & Feany, M. B. (2006). α -synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Human Molecular Genetics*, *15*(20), 3012-3023.
173. **Kordower**, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B., & Olanow, C. W. (2008). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nature Medicine*, *14*(5), 504.
174. **Kozak-Putowska**, D., Ilzecka, J., Piskorz, J., Wójcik, G., & Nalepa, D. (2015). Kinezyterapia w chorobie Parkinsona. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, *21*(1).
175. **Kramer**, E. R., & Liss, B. (2015). GDNF-Ret signaling in midbrain dopaminergic neurons and its implication for Parkinson disease. *FEBS Letters*, *589*(24PartA), 3760-3772.
176. **Krüger**, R., Kuhn, W., Müller, T., Voitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., Schöls, L., Riess, O. (1998). AlaSOPro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genetics*, *18*(2), 106-108.
177. **Kubo**, S. I., Hatano, T., Takanashi, M., & Hattori, N. (2013). Can parkin be a target for future treatment of Parkinson's disease?. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *17*(10), 1133-1144.
178. **Kuroda**, Y., Mitsui, T., Kunishige, M., Shono, M., Akaike, M., Azuma, H., & Matsumoto, T. (2006). Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. *Human Molecular Genetics*, *15*(6), 883-895.
179. **Langston**, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, *219*(4587), 979-980.
180. **LaVoie**, M. J., Cortese, G. P., Ostaszewski, B. L., & Schlossmacher, M. G. (2007). The effects of oxidative stress on parkin and other E3 ligases. *Journal of Neurochemistry*, *103*(6), 2354-2368.
181. **LaVoie**, M. J., Ostaszewski, B. L., Weihofen, A., Schlossmacher, M. G., & Selkoe, D. J. (2005). Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nature Medicine*, *11*(11), 1214.
182. **Lazarou**, M., Jin, S. M., Kane, L. A., & Youle, R. J. (2012). Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Developmental Cell*, *22*(2), 320-333.
183. **Leboucher**, G. P., Tsai, Y. C., Yang, M., Shaw, K. C., Zhou, M., Veenstra, T. D., Glickman, M. H., Weissman, A. M. (2012). Stress-induced phosphorylation and proteasomal degradation of mitofusin 2 facilitates mitochondrial fragmentation and apoptosis. *Molecular Cell*, *47*(4), 547-557.
184. **Lee**, H. J., Baek, S. M., Ho, D. H., Suk, J. E., Cho, E. D., & Lee, S. J. (2011). Dopamine promotes formation and secretion of non-fibrillar alpha-synuclein oligomers. *Experimental & Molecular Medicine*, *43*(4), 216.
185. **Lee**, M., Hyun, D. H., Halliwell, B., & Jenner, P. (2001). Effect of the overexpression of wild-type or mutant α -synuclein on cell susceptibility to insult. *Journal of Neurochemistry*, *76*(4), 998-1009.
186. **Lee**, S. B., Kim, J. J., Nam, H. J., Gao, B., Yin, P., Qin, B., Yi, S. Y., Ham, H., Evans, D., Kim, S. H., Zhang, J., Deng, M., Liu, T., Zhang, H., Billadeau, D. D., Wang, L., Giaime, E., Shen, J., Pang, Y. P., Jen, J., van Deursen, J. M., Lou, Z. (2015). Parkin regulates mitosis and genomic stability through Cdc20/Cdh1. *Molecular Cell*, *60*(1), 21-34.

187. **Lee, S.**, Sterky, F. H., Mourier, A., Terzioglu, M., Cullheim, S., Olson, L., & Larsson, N. G. (2012). Mitofusin 2 is necessary for striatal axonal projections of midbrain dopamine neurons. *Human Molecular Genetics*, *21*(22), 4827-4835.
188. **Lesage, S.**, Anheim, M., Letournel, F., Bousset, L., Honoré, A., Rozas, N., Pieri, L., Madiona, K., Dürr, A., Melki, R., Verny, C., Brice, A. (2013). G51D α -synuclein mutation causes a novel Parkinsonian–pyramidal syndrome. *Annals of Neurology*, *73*(4), 459-471.
189. **Li, J. Y.**, Englund, E., Holton, J. L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A. J., Lashley, T., Quinn, N. P., Rehnkrone, S., Björklund, A., Widner, H., Revesz, T., Lindvall, O., Brundin, P. (2008). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nature Medicine*, *14*(5), 501.
190. **Li, N.**, Sul, J. Y., & Haydon, P. G. (2003). A calcium-induced calcium influx factor, nitric oxide, modulates the refilling of calcium stores in astrocytes. *Journal of Neuroscience*, *23*(32), 10302-10310.
191. **Liu, L.**, Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, Q., Song, P., Ma, Q., Zhu, C., Wang, R., Qi, W., Huang, L., Xue, P., Li, B., Wang, X., Jin, H., Wang, J., Yang, F., Liu, P., Zhu, Y., Sui, S., Chen, Q. (2012). Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nature Cell Biology*, *14*(2), 177.
192. **Liu, W.**, Vives-Bauza, C., Yamamoto, A., Tan, Y., Li, Y., Magrané, J., Stavarache, M. A., Shaffer, S., Chang, S., Kaplitt, M. G., Huang, X. Y., Beal, M. F., Manfredi, G., Li, C. (2009). PINK1 defect causes mitochondrial dysfunction, proteasomal deficit and α -synuclein aggregation in cell culture models of Parkinson's disease. *PLOS ONE*, *4*(2), e4597.
193. **Liu, Z.**, Yu, Y., Li, X., Ross, C. A., & Smith, W. W. (2011). Curcumin protects against A53T alpha-synuclein-induced toxicity in a PC12 inducible cell model for Parkinsonism. *Pharmacological Research*, *63*(5), 439-444.
194. **Loeb, V.**, Yakunin, E., Saada, A., & Sharon, R. (2010). The transgenic overexpression of α -synuclein and not its related pathology associates with complex I inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(10), 7334-7343.
195. **Lonskaya, I.**, Desforgues, N. M., Hebron, M. L., & Moussa, C. E. (2013). Ubiquitination increases parkin activity to promote autophagic α -synuclein clearance. *PLOS ONE*, *8*(12), e83914.
196. **Lotharius, J.**, & Brundin, P. (2002). Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein. *Nature Reviews Neuroscience*, *3*(12), 932.
197. **Lowry, O. H.**, Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265-275.
198. **Ludtmann, M.**, Angelova, P., Choi, M. L., Horrocks, M., Baev, A., Little, D., Devine, M., Gissen, P., Pavlov, E., Klenerman, D., Abramov, A., Gandhi, S. (2017). Direct Modulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore by Oligomeric Alpha-synuclein Causes Toxicity in PD. *Biophysical Journal*, *112*(3), 440a.
199. **Luk, K. C.**, Kehm, V. M., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2012a). Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α -synucleinopathy in mice. *Journal of Experimental Medicine*, jem-20112457.
200. **Luk, K. C.**, Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2012b). Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science*, *338*(6109), 949-953.
201. **Luk, K. C.**, Song, C., O'Brien, P., Stieber, A., Branch, J. R., Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y. (2009). Exogenous α -synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(47), 20051-20056.
202. **Luth, E. S.**, Stavrovskaya, I. G., Bartels, T., Kristal, B. S., & Selkoe, D. J. (2014). Soluble, prefibrillar α -synuclein oligomers promote complex I-dependent, Ca²⁺-induced mitochondrial dysfunction. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(31), 21490-21507.
203. **Mao, X.**, Ou, M. T., Karuppagounder, S. S., Kam, T. I., Yin, X., Xiong, Y., Ge, P., Umanah, G. E., Brahmachari, S., Shin, J. H., Kang, H. C., Zhang, J., Xu, J., Chen, R., Park, H., Andrabi, S.

- A., Kang, S. U., Gonçalves, R. A., Liang, Y., Zhang, S., Qi, C., Lam, S., Keiler, J. A., Tyson, J., Kim, D., Panicker, N., Yun, S. P., Workman, C. J., Vignali, D. A., Dawson, V. L., Ko, H. S., Dawson, T. M. (2016). Pathological α -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science*, 353(6307), aah3374.
204. **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 α -synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science*, 287(5456), 1265-1269.
205. **Masuda-Suzukake, M.**, Nonaka, T., Hosokawa, M., Oikawa, T., Arai, T., Akiyama, H., Mann, D. M., Hasegawa, M. (2013). Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain. *Brain*, 136(4), 1128-1138.
206. **Matsuda, N.**, Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C. A., Sou, Y. S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., Kimura, M., Komatsu, M., Hattori, N., Tanaka, K. (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *The Journal of Cell Biology*, 189(2), 211-221.
207. **McKinnon, C.**, & Tabrizi, S. J. (2014). The ubiquitin-proteasome system in neurodegeneration. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(17), 2302-2321.
208. **McWilliams, T. G.**, & Muqit, M. M. (2017). PINK1 and Parkin: emerging themes in mitochondrial homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology*, 45, 83-91.
209. **Meeusen, S.**, McCaffery, J. M., & Nunnari, J. (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science*, 305(5691), 1747-1752.
210. **Meka, D. P.**, Müller-Rischart, A. K., Nidadavolu, P., Mohammadi, B., Motori, E., Ponna, S. K., Aboutalebi, H., Bassal, M., Annamneedi, A., Finckh, B., Miesbauer, M., Rotermund, N., Lohr, C., Tatzelt, J., Winklhofer, K. F., Kramer, E. R. (2015). Parkin cooperates with GDNF/RET signaling to prevent dopaminergic neuron degeneration. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(5), 1873-1885.
211. **Melachroinou, K.**, Xilouri, M., Emmanouilidou, E., Masgrau, R., Papazafiri, P., Stefanis, L., & Vekrellis, K. (2013). Deregulation of calcium homeostasis mediates secreted α -synuclein-induced neurotoxicity. *Neurobiology of Aging*, 34(12), 2853-2865.
212. **Mendez, I.**, Viñuela, A., Astradsson, A., Mukhida, K., Hallett, P., Robertson, H., Tierney, T., Holness, R., Dagher, A., Trojanowski, J. Q., Isacson, O. (2008). Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nature Medicine*, 14(5), 507.
213. **Meng, F.**, Yao, D., Shi, Y., Kabakoff, J., Wu, W., Reicher, J., Ma, Y., Moosmann, B., Masliah, E., Lipton, S. A., Gu, Z. (2011). Oxidation of the cysteine-rich regions of parkin perturbs its E3 ligase activity and contributes to protein aggregation. *Molecular Neurodegeneration*, 6(1), 34.
214. **Menges, S.**, Minakaki, G., Schaefer, P. M., Meixner, H., Prots, I., Schlötzer-Schrehardt, U., Friedland, K., Winner, B., Outeiro, T. F., Winklhofer, K. F., von Arnim, C. A., Xiang, W., Winkler, J., Klucken, J. (2017). Alpha-synuclein prevents the formation of spherical mitochondria and apoptosis under oxidative stress. *Scientific Reports*, 7, 42942.
215. **Menzies, F. M.**, Garcia-Arencibia, M., Imarisio, S., O'Sullivan, N. C., Ricketts, T., Kent, B. A., Rao, M. V., Lam, W., Green-Thompson, Z. W., Nixon, R. A., Saksida, L. M., Bussey, T. J., O'Kane, C. J., Rubinsztein, D. C. (2015). Calpain inhibition mediates autophagy-dependent protection against polyglutamine toxicity. *Cell Death and Differentiation*, 22(3), 433.
216. **Miki, Y.**, Tanji, K., Mori, F., Utsumi, J., Sasaki, H., Kakita, A., Takahashi, H., Wakabayashi, K. (2016). Alteration of Upstream Autophagy-Related Proteins (ULK1, ULK2, Beclin1, VPS34 and AMBRA1) in Lewy Body Disease. *Brain Pathology*, 26(3), 359-370.
217. **Mizuno, Y.**, Hattori, N., Mori, H., Suzuki, T., & Tanaka, K. (2001). Parkin and Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology*, 14(4), 477-482.
218. **Moore, D. J.** (2006). Parkin: a multifaceted ubiquitin ligase. *Biochemical Society Transactions*, 34 (5) 749-753.
219. **Moore, D. J.**, West, A. B., Dikeman, D. A., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2008). Parkin mediates the degradation-independent ubiquitination of Hsp70. *Journal of Neurochemistry*, 105(5), 1806-1819.

220. **Mortiboys**, H., Thomas, K. J., Koopman, W. J., Klaffke, S., Abou-Sleiman, P., Olpin, S., Wood, N. W., Willems, P. H., Smeitink, J. A., Cookson, M. R., Bandmann, O. (2008). Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts. *Annals of Neurology*, 64(5), 555-565.
221. **Mougenot**, A. L., Nicot, S., Bencsik, A., Morignat, E., Verchère, J., Lakhdar, L., Legastelois, S., Baron, T. (2012). Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiology of Aging*, 33(9), 2225-2228.
222. **Müller-Rischart**, A. K., Pils, A., Beaudette, P., Patra, M., Hadian, K., Funke, M., Peis, R., Deinlein, A., Schweimer, C., Kuhn, P. H., Lichtenthaler, S. F., Motori, E., Hrelia, S., Wurst, W., Trümbach, D., Langer, T., Krappmann, D., Dittmar, G., Tatzelt, J., Winklhofer, K.F. (2013). The E3 ligase parkin maintains mitochondrial integrity by increasing linear ubiquitination of NEMO. *Molecular Cell*, 49(5), 908-921.
223. **Muñoz**, J. P., Ivanova, S., Sánchez-Wandelmer, J., Martínez-Cristóbal, P., Noguera, E., Sancho, A., Díaz-Ramos, A., Hernández-Alvarez, M. I., Sebastián, D., Mauvezin, C., Palacín, M., Zorzano, A. (2013). Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK. *The EMBO Journal*, 32(17), 2348-2361.
224. **Mutschler** E. (2012). Zespół Parkinsona i leki przeciwparkinsonowskie. Farmakologia i toksykologia Mutschlera. III wyd. Wrocław.
225. **Nakamura**, T., & Lipton, S. A. (2009). Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Apoptosis*, 14(4), 455-468.
226. **Nakamura**, T., & Lipton, S. A. (2011). Redox modulation by S-nitrosylation contributes to protein misfolding, mitochondrial dynamics, and neuronal synaptic damage in neurodegenerative diseases. *Cell Death and Differentiation*, 18(9), 1478.
227. **Nakamura**, T., Tu, S., Akhtar, M. W., Sunico, C. R., Okamoto, S. I., & Lipton, S. A. (2013). Aberrant protein s-nitrosylation in neurodegenerative diseases. *Neuron*, 78(4), 596-614.
228. **Nardin**, A., Schrepfer, E., & Ziviani, E. (2016). Counteracting PINK/Parkin deficiency in the activation of mitophagy: a potential therapeutic intervention for Parkinson's Disease. *Current Neuropharmacology*, 14(3), 250-259.
229. **Narendra**, D., Tanaka, A., Suen, D. F., & Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of Cell Biology*, 183(5), 795-803.
230. **Nemani**, V. M., Lu, W., Berge, V., Nakamura, K., Onoa, B., Lee, M. K., Chaudhry, F. A., Nicoll, R. A., Edwards, R. H. (2010). Increased expression of α -synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle recluster after endocytosis. *Neuron*, 65(1), 66-79.
231. **Nguyen**, T. N., Padman, B. S., Usher, J., Oorschot, V., Ramm, G., & Lazarou, M. (2016). Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome-lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation. *The Journal of Cell Biology*, 215(6), 857-874.
232. **Norris**, E. H., Giasson, B. I., Ischiropoulos, H., & Lee, V. M. (2003). Protein synthesis, post-translation modification, and degradation-Effects of Oxidative and Nitrative Challenges on α -synuclein Fibrillogenesis Involve Distinct Mechanisms of Protein Modifications. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 27230-27240.
233. **O'Donnell**, K. C., Lulla, A., Stahl, M. C., Wheat, N. D., Bronstein, J. M., & Sagasti, A. (2014). Axon degeneration and PGC-1 α -mediated protection in a zebrafish model of α -synuclein toxicity. *Disease Models & Mechanisms*, 7(5), 571-582.
234. **Oczkowska**, A., Kozubski, W., & Dorszewska, J. (2014). Alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Przegląd Lekarski*, 71(1), 26-32.
235. **Oczkowska**, A., Kozubski, W., Lianeri, M., & Dorszewska, J. (2013). Mutations in PRKN and SNCA genes important for the progress of Parkinson's disease. *Current Genomics*, 14(8), 502-517.
236. **Oh**, S. H., Kim, H. N., Park, H. J., Shin, J. Y., Bae, E. J., Sunwoo, M. K., Lee, S. J., Lee, P. H. (2016). Mesenchymal stem cells inhibit transmission of α -synuclein by modulating clathrin-mediated endocytosis in a Parkinsonian model. *Cell Reports*, 14(4), 835-849.

237. **Olzmann**, J. A., Li, L., Chudaev, M. V., Chen, J., Perez, F. A., Palmiter, R. D., & Chin, L. S. (2007). Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination targets misfolded DJ-1 to aggresomes via binding to HDAC6. *The Journal of Cell Biology*, 178(6), 1025-1038.
238. **Ordureau**, A., Sarraf, S. A., Duda, D. M., Heo, J. M., Jedrychowski, M. P., Sviderskiy, V. O., Olszewski, J. L., Koerber, J. T., Xie, T., Beausoleil, S. A., Wells, J. A., Gygi, S. P., Schulman, B. A., Harper, J. W. (2014). Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis. *Molecular Cell*, 56(3), 360-375.
239. **Outeiro**, T. F., & Lindquist, S. (2003). Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science*, 302(5651), 1772-1775.
240. **Ozawa**, K., Komatsubara, A. T., Nishimura, Y., Sawada, T., Kawafune, H., Tsumoto, H., Tsuji, Y., Zhao, J., Kyotani, Y., Tanaka, T., Takahashi, R., Yoshizumi, M. (2013). S-nitrosylation regulates mitochondrial quality control via activation of parkin. *Scientific Reports*, 3, 2202.
241. **Pacheco**, C. R., Morales, C. N., Ramírez, A. E., Muñoz, F. J., Gallegos, S. S., Caviedes, P. A., Aguayo, L. G., Opazo, C. M. (2015). Extracellular α -synuclein alters synaptic transmission in brain neurons by perforating the neuronal plasma membrane. *Journal of Neurochemistry*, 132(6), 731-741.
242. **Palacino**, J. J., Sagi, D., Goldberg, M. S., Krauss, S., Motz, C., Wacker, M., Klose, J., Shen, J. (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 18614-18622.
243. **Paleologou**, K. E., Kragh, C. L., Mann, D. M., Salem, S. A., Al-Shami, R., Allsop, D., Hassan, A. H., Jensen, P. H., El-Agnaf, O. M. (2009). Detection of elevated levels of soluble α -synuclein oligomers in post-mortem brain extracts from patients with dementia with Lewy bodies. *Brain*, 132(4), 1093-1101.
244. **Pan**, T., Rawal, P., Wu, Y., Xie, W., Jankovic, J., & Le, W. (2009). Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction. *Neuroscience*, 164(2), 541-551.
245. **Parihar**, M. S., 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. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(10), 2015-2024.
246. **Park**, D., Lee, M. N., Jeong, H., Koh, A., Yang, Y. R., Suh, P. G., & Ryu, S. H. (2014). Parkin ubiquitinates mTOR to regulate mTORC1 activity under mitochondrial stress. *Cellular Signalling*, 26(10), 2122-2130.
247. **Park**, H. M., Kim, G. Y., Nam, M. K., Seong, G. H., Han, C., Chung, K. C., Kang, S., Rhim, H. (2009). The serine protease HtrA2/Omi cleaves Parkin and irreversibly inactivates its E3 ubiquitin ligase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 387(3), 537-542.
248. **Park**, M. J., Cheon, S. M., Bae, H. R., Kim, S. H., & Kim, J. W. (2011). Elevated levels of α -synuclein oligomer in the cerebrospinal fluid of drug-naïve patients with Parkinson's disease. *Journal of Clinical Neurology*, 7(4), 215-222.
249. **Parnetti**, L., Farotti, L., Eusebi, P., Chiasserini, D., De Carlo, C., Giannandrea, D., Salvadori, N., Lisetti, V., Tambasco, N., Rossi, A., Majbour, N. K., El-Agnaf, O., Calabresi, P. (2014). Differential role of CSF alpha-synuclein species, tau, and A β 42 in Parkinson's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 53.
250. **Pavelescu**, L. A. (2015). On reactive oxygen species measurement in living systems. *Journal of Medicine and Life*, 8(Spec Issue), 38.
251. **Perier**, C., Bové, J., Wu, D. C., Dehay, B., Choi, D. K., Jackson-Lewis, V., Rathke-Hartlieb, S., Bouillet, P., Strasser, A., Schulz, J. B., Przedborski, S., Vila, M. (2007). Two molecular pathways initiate mitochondria-dependent dopaminergic neurodegeneration in experimental Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(19), 8161-8166.
252. **Perlmutter**, D. H. (2009). Autophagic disposal of the aggregation-prone protein that causes liver inflammation and carcinogenesis in α -1-antitrypsin deficiency. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 39.

253. **Perrin**, R. J., Woods, W. S., Clayton, D. F., & George, J. M. (2000). Interaction of human α -synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids structural analysis using site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34393-34398.
254. **Pickrell**, A. M., Huang, C. H., Kennedy, S. R., Ordureau, A., Sideris, D. P., Hoekstra, J. G., Harper, J. W., Youle, R. J. (2015). Endogenous Parkin preserves dopaminergic substantia nigral neurons following mitochondrial DNA mutagenic stress. *Neuron*, 87(2), 371-381.
255. **Plotegher**, N., Gratton, E., & Bubacco, L. (2014). Number and Brightness analysis of alpha-synuclein oligomerization and the associated mitochondrial morphology alterations in live cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(6).
256. **Polymeropoulos**, M. H. (2000). Genetics of Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 920(1), 28-32.
257. **Polymeropoulos**, M. H., Higgins, J. J., Golbe, L. I., Johnson, W. G., Ide, S. E., Di Iorio, G., Sanges, G., Stenroos, E. S., Pho, L. T., Schaffer, A. A., Lazzarini, A. M., Nussbaum, R. L., Duvoisin, R. C. (1996). Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science*, 274(5290), 1197-1199.
258. **Polymeropoulos**, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276(5321), 2045-2047.
259. **Poole**, A. C., Thomas, R. E., Yu, S., Vincow, E. S., & Pallanck, L. (2010). The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PLOS ONE*, 5(4), e10054.
260. **Postuma**, R. B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C. W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A. E., Halliday, G., Goetz, C. G., Gasser, T., Dubois, B., Chan, P., Bloem, B. R., Adler, C. H., Deuschl, G. (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 30(12), 1591-1601.
261. **Pou**, S., Pou, W. S., Bredt, D. S., Snyder, S. H., & Rosen, G. M. (1992). Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 267(34), 24173-24176.
262. **Proukakis**, C., Dudzik, C. G., Brier, T., MacKay, D. S., Cooper, J. M., Millhauser, G. L., Houlden, H., Schapira, A. H. (2013). A novel α -synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology*, 80(11), 1062-1064.
263. **Radi**, R. (2013). Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *Journal of Biological Chemistry*, 288(37), 26464-26472.
264. **Randow**, F., & Youle, R. J. (2014). Self and nonself: how autophagy targets mitochondria and bacteria. *Cell Host & Microbe*, 15(4), 403-411.
265. **Ravikumar**, B., Berger, Z., Vacher, C., O'kane, C. J., & Rubinsztein, D. C. (2006). Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. *Human Molecular Genetics*, 15(7), 1209-1216.
266. **Reeve**, A. K., Ludtmann, M. H., Angelova, P. R., Simcox, E. M., Horrocks, M. H., Klenerman, D., Gandhi, S., Turnbull, D. M., Abramov, A. Y. (2015). Aggregated α -synuclein and complex I deficiency: exploration of their relationship in differentiated neurons. *Cell Death & Disease*, 6(7), e1820.
267. **Rey**, N. L., Petit, G. H., Bousset, L., Melki, R., & Brundin, P. (2013). Transfer of human α -synuclein from the olfactory bulb to interconnected brain regions in mice. *Acta Neuropathologica*, 126(4), 555-573.
268. **Rhein**, V., Song, X., Wiesner, A., Ittner, L. M., Baysang, G., Meier, F., Ozmen, L., Bluethmann, H., Dröse, S., Brandt, U., Savaskan, E., Czech, C., Götz, J., Eckert, A. (2009). Amyloid- β and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(47), 20057-20062.
269. **Rideout**, H. J., Larsen, K. E., Sulzer, D., & Stefanis, L. (2001). Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/ α -synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, 78(4), 899-908.

270. **Ronzitti, G.**, Bucci, G., Emanuele, M., Leo, D., Sotnikova, T. D., Mus, L. V., Soubrane, C. H., Dallas, M. L., Thalhammer, A., Cingolani, L. A., Mochida, S., Gainetdinov, R. R., Stephens, G. J., Chiergatti, E. (2014). Exogenous α -synuclein decreases raft partitioning of Cav2. 2 channels inducing dopamine release. *Journal of Neuroscience*, *34*(32), 10603-10615.
271. **Rosen, G. M.**, Tsai, P., Pou, S. (2002). Mechanism of free-radical generation by nitric oxide synthase. *Chemical Reviews*, *102*(4), 1191-1200.
272. **Rosen, K. M.**, Moussa, C. E. H., Lee, H. K., Kumar, P., Kitada, T., Qin, G., Fu, Q., Querfurth, H. W. (2010). Parkin reverses intracellular β -amyloid accumulation and its negative effects on proteasome function. *Journal of Neuroscience Research*, *88*(1), 167-178.
273. **Rothfuss, O.**, Fischer, H., Hasegawa, T., Maisel, M., Leitner, P., Miesel, F., Sharma, M., Bornemann, A., Berg, D., Gasser, T., Patenge, N. (2009). Parkin protects mitochondrial genome integrity and supports mitochondrial DNA repair. *Human Molecular Genetics*, *18*(20), 3832-3850.
274. **Sampson, T. R.**, Debelius, J. W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G. G., Ilhan, Z. E., Challis, C., Schretter, C. E., Rocha, S., Gradinaru, V., Chesselet, M. F., Keshavarzian, A., Shannon, K. M., Krajmalnik-Brown, R., Wittung-Stafshede, P., Knight, R., Mazmanian, S. K. (2016). Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. *Cell*, *167*(6), 1469-1480.
275. **Sangchot, P.**, Sharma, S., Chetsawang, B., Porter, J., Govitrapong, P., & Ebadi, M. (2002). Deferoxamine attenuates iron-induced oxidative stress and prevents mitochondrial aggregation and α -synuclein translocation in SK-N-SH cells in culture. *Developmental Neuroscience*, *24*(2-3), 143-153.
276. **Sarafian, T. A.**, Ryan, C. M., Souda, P., Masliah, E., Kar, U. K., Vinters, H. V., Mathern, G. W., Faull, K. F., Whitelegge, J. P., Watson, J. B. (2013). Impairment of mitochondria in adult mouse brain overexpressing predominantly full-length, N-terminally acetylated human α -synuclein. *PLOS ONE*, *8*(5), e63557.
277. **Sarraf, S. A.**, Raman, M., Guarani-Pereira, V., Sowa, M. E., Huttlin, E. L., Gygi, S. P., & Harper, J. W. (2013). Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature*, *496*(7445), 372.
278. **Sassone, J.**, Serratto, G., Valtorta, F., Silani, V., Passafaro, M., & Ciammola, A. (2017). The synaptic function of parkin. *Brain*, *140*(9), 2265-2272.
279. **Scarffe, L. A.**, Stevens, D. A., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2014). Parkin and PINK1: much more than mitophagy. *Trends in Neurosciences*, *37*(6), 315-324.
280. **Schon, E. A.**, & Przedborski, S. (2011). Mitochondria: the next (neurode) generation. *Neuron*, *70*(6), 1033-1053.
281. **Seirafi, M.**, Kozlov, G., & Gehring, K. (2015). Parkin structure and function. *The FEBS Journal*, *282*(11), 2076-2088.
282. **Seo, J. H.**, Rah, J. C., Choi, S. H., Shin, J. K., Min, K. S., & Suh, Y. H. (2002). The dual effects of alpha-synuclein on the neuronal survival. *Neurobiology Of Aging*, *23*(1), 295-296
283. **Shaltouki, A.**, Sivapatham, R., Pei, Y., Gerencser, A. A., Momčilović, O., Rao, M. S., & Zeng, X. (2015). Mitochondrial alterations by PARKIN in dopaminergic neurons using PARK2 patient-specific and PARK2 knockout isogenic iPSC lines. *Stem Cell Reports*, *4*(5), 847-859.
284. **Sharp, M. E.**, Marder, K. S., Côté, L., Clark, L. N., Nichols, W. C., Vonsattel, J. P., & Alcalay, R. N. (2014). Parkinson's disease with Lewy bodies associated with a heterozygous PARKIN dosage mutation. *Movement Disorders*, *29*(4), 566-568.
285. **Shen, J.**, Du, T., Wang, X., Duan, C., Gao, G., Zhang, J., Lu, L., Yang, H. (2014). α -synuclein amino terminus regulates mitochondrial membrane permeability. *Brain Research*, *1591*, 14-26.
286. **Shiba-Fukushima, K.**, Imai, Y., Yoshida, S., Ishihama, Y., Kanao, T., Sato, S., & Hattori, N. (2012). PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Scientific Reports*, *2*, 1002.
287. **Shimura, H.**, Hattori, N., Kubo, S. I., 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. *Nature Genetics*, *25*(3), 302.

288. **Shimura, H.**, Hattori, N., Kubo, S. I., Yoshikawa, M., Kitada, T., Matsumine, H., Asakawa, S., Minoshima, S., Yamamura, Y., Shimizu, N., Mizuno, Y. (1999). Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. *Annals of Neurology*, 45(5), 668-672.
289. **Shimura, H.**, Schlossmacher, M. G., Hattori, N., Frosch, M. P., Trockenbacher, A., Schneider, R., Mizuno, Y., Kosik, K. S., Selkoe, D. J. (2001). Ubiquitination of a new form of α -synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science*, 293(5528), 263-269.
290. **Shin, J. H.**, Ko, H. S., Kang, H., Lee, Y., Lee, Y. I., Pletinkova, O., Troconso, J. C., Dawson, V. L., Dawson, T. M. (2011). PARIS (ZNF746) repression of PGC-1 α contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell*, 144(5), 689-702.
291. **Siddiqui, A.**, Rane, A., Rajagopalan, S., Chinta, S. J., & Andersen, J. K. (2016). Detrimental effects of oxidative losses in parkin activity in a model of sporadic Parkinson's disease are attenuated by restoration of PGC1 α . *Neurobiology of Disease*, 93, 115-120.
292. **Silva, B. A.**, Breydo, L., & Uversky, V. N. (2013). Targeting the chameleon: a focused look at α -synuclein and its roles in neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, 47(2), 446-459.
293. **Singleton, A. B.**, 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, M. R., Muentner, M., Baptista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J., Gwinn-Hardy, K. (2003). α -synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, 302(5646), 841-841.
294. **Slawek J.** „Kryteria rozpoznawania, różnicowanie, obraz kliniczny zaburzeń ruchowych oraz powikłania ruchowe późnego okresu choroby. Choroba Parkinsona i inne zaburzenia ruchowe Tom 1” pod redakcją J. Sławka, A. Friedmana, A. Boguckiego, G. Opali. *Wydawnictwo Via Medica*, Gdańsk 2011, wyd.1.
295. **Slawek J.** „Zespół i choroba Parkinsona. Neurologia tom II” pod redakcją A. Stępnia, *Wydawnictwo Medical Tribune Polska*, Warszawa 2014.
296. **Song, Z.**, Ghochani, M., McCaffery, J. M., Frey, T. G., & Chan, D. C. (2009). Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 20(15), 3525-3532.
297. **Sotiriou, S.**, Gibney, G., Baxevasis, A. D., & Nussbaum, R. L. (2009). A single nucleotide polymorphism in the 3' UTR of the SNCA gene encoding alpha-synuclein is a new potential susceptibility locus for Parkinson disease. *Neuroscience Letters*, 461(2), 196-201.
298. **Souza, J. M.**, Giasson, B. I., Chen, Q., Lee, V. M. Y., & Ischiropoulos, H. (2000). Dityrosine Cross-linking Promotes Formation of Stable α -synuclein Polymers Implication Of Nitrate And Oxidative Stress In The Pathogenesis Of Neurodegenerative Synucleinopathies. *Journal of Biological Chemistry*, 275(24), 18344-18349.
299. **Staropoli, J. F.**, McDermott, C., Martinat, C., Schulman, B., Demireva, E., & Abeliovich, A. (2003). Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron*, 37(5), 735-749.
300. **Stevens, D. A.**, Lee, Y., Kang, H. C., Lee, B. D., Lee, Y. I., Bower, A., Jiang, H., Kang, S. U., Andrabi, S. A., Dawson, V. L., Shin, J. H., Dawson, T. M. (2015). Parkin loss leads to PARIS-dependent declines in mitochondrial mass and respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(37), 11696-11701.
301. **Stichel, C. C.**, Augustin, M., KuÈhn, K., Zhu, X. R., Engels, P., Ullmer, C., & LuÈbbert, H. (2000). Parkin expression in the adult mouse brain. *European Journal of Neuroscience*, 12(12), 4181-4194.
302. **Stöckl, M. T.**, Claessens, M. M., & Subramaniam, V. (2012). Novel Insights into Impairment of Membrane Integrity by Alpha-synuclein Oligomers. *Biophysical Journal*, 102(3), 256a-257a.
303. **St-Pierre, J.**, Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J. M., Rhee, J., Jäger, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D. K., Bachoo, R., Spiegelman, B. M. (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*, 127(2), 397-408.
304. **Strappazzon, F.**, Nazio, F., Corrado, M., Cianfanelli, V., Romagnoli, A., Fimia, G. M., Campello, S., Nardacci, R., Piacentini, M., Campanella, M., Cecconi, F. (2015). AMBRA1 is

- able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell Death and Differentiation*, 22(3), 419.
305. **Su**, K., Bourdette, D., & Forte, M. (2013). Mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Frontiers in Physiology*, 4, 169.
306. **Sul**, J. W., Park, M. Y., Shin, J., Kim, Y. R., Yoo, S. E., Kong, Y. Y., Kwon, K. S., Lee, Y. H., Kim, E. (2013). Accumulation of the parkin substrate, FAF1, plays a key role in the dopaminergic neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*, 22(8), 1558-1573.
307. **Sunico**, C. R., Nakamura, T., Rockenstein, E., Mante, M., Adame, A., Chan, S. F., Newmeyer, T. F., Masliah, E., Nakanishi, N., Lipton, S. A. (2013). S-Nitrosylation of parkin as a novel regulator of p53-mediated neuronal cell death in sporadic Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 8(1), 29.
308. **Tanaka**, A., Cleland, M. M., Xu, S., Narendra, D. P., Suen, D. F., Karbowski, M., & Youle, R. J. (2010). Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *The Journal of Cell Biology*, 191(7), 1367-1380.
309. **Tanaka**, K., Suzuki, T., Chiba, T., Shimura, H., Hattori, N., & Mizuno, Y. (2001). Parkin is linked to the ubiquitin pathway. *Journal of Molecular Medicine*, 79(9), 482-494.
310. **Tang**, J., Hu, Z., Tan, J., Yang, S., & Zeng, L. (2016). Parkin protects against oxygen-glucose deprivation/reperfusion insult by promoting Drp1 degradation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
311. **Tanik**, S. A., Schultheiss, C. E., Volpicelli-Daley, L. A., Brunden, K. R., & Lee, V. M. (2013). Lewy body-like α -synuclein aggregates resist degradation and impair macroautophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 288(21), 15194-15210.
312. **Tanner**, C. M. (1992). Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurologic Clinics*, 10(2), 317-329.
313. **Tian**, W., Li, W., Chen, Y., Yan, Z., Huang, X., Zhuang, H., Chen, Y., Wu, W., Lin, C., Chen, H., Hou, X., Zhang, L., Sui, S., Zhao, B., Hu, Z., Li, L., Feng, D. (2015). Phosphorylation of ULK1 by AMPK regulates translocation of ULK1 to mitochondria and mitophagy. *FEBS Letters*, 589(15), 1847-1854.
314. **Tofaris**, G. K., Layfield, R., & Spillantini, M. G. (2001). α -Synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Letters*, 509(1), 22-26.
315. **Tosatto**, L., Andrighetti, A. O., Plotegher, N., Antonini, V., Tessari, I., Ricci, L., Bubacco, L., Dalla Serra, M. (2012). Alpha-synuclein pore forming activity upon membrane association. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818(11), 2876-2883.
316. **Trempe**, J. F., Sauvé, V., Grenier, K., Seirafi, M., Tang, M. Y., Ménade, M., Al-Abdul-Wahid, S., Krett, J., Wong, K., Kozlov, G., Nagar, B., Fon, E. A., Gehring, K. (2013). Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation. *Science*, 340(6139), 1451-1455.
317. **Tsigelny**, I. F., Sharikov, Y., Wrasidlo, W., Gonzalez, T., Desplats, P. A., Crews, L. Spencer, B., Masliah, E. (2012). Role of α -synuclein penetration into the membrane in the mechanisms of oligomer pore formation. *The FEBS Journal*, 279(6), 1000-1013.
318. **Turnbull**, S., Tabner, B. J., El-Agnaf, O. M., Moore, S., Davies, Y., & Allsop, D. (2001). α -synuclein implicated in Parkinson's disease catalyses the formation of hydrogen peroxide in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(10), 1163-1170.
319. **Ulmer**, T. S., Bax, A., Cole, N. B., & Nussbaum, R. L. (2005). Structure and dynamics of micelle-bound human α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9595-9603.
320. **Um**, J. W., & Chung, K. C. (2006). Functional modulation of parkin through physical interaction with SUMO-1. *Journal of Neuroscience Research*, 84(7), 1543-1554.
321. **Um**, J. W., Han, K. A., Im, E., Oh, Y., Lee, K., & Chung, K. C. (2012). Neddylation positively regulates the ubiquitin E3 ligase activity of parkin. *Journal of Neuroscience Research*, 90(5), 1030-1042.
322. **Van Humbeeck**, C., Cornelissen, T., Hofkens, H., Mandemakers, W., Gevaert, K., De Strooper, B., & Vandenberghe, W. (2011). Parkin interacts with Ambra1 to induce mitophagy. *Journal of Neuroscience*, 31(28), 10249-10261.

323. **Van Rooijen**, B. D., Claessens, M. M., & Subramaniam, V. (2010). Membrane permeabilization by oligomeric α -synuclein: in search of the mechanism. *PLOS ONE*, 5(12), e14292.
324. **Veeriah**, S., Taylor, B. S., Meng, S., Fang, F., Yilmaz, E., Vivanco, I., Janakiraman, M., Schultz, N., Hanrahan, A. J., Pao, W., Ladanyi, M., Sander, C., Heguy, A., Holland, E. C., Paty, P. B., Mischel, P. S., Liao, L., Cloughesy, T. F., Mellinghoff, I. K., Solit, D. B., Chan, T. A. (2010). Somatic mutations of the Parkinson's disease-associated gene PARK2 in glioblastoma and other human malignancies. *Nature Genetics*, 42(1), 77.
325. **Vila**, M., & Przedborski, S. (2001). Engineered modeling and the secrets of Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*, 24, 49-55.
326. **Vila**, M., & Przedborski, S. (2003). Neurological diseases: Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(5), 365.
327. **Vincow**, E. S., Merrihew, G., Thomas, R. E., Shulman, N. J., Beyer, R. P., MacCoss, M. J., & Pallanck, L. J. (2013). The PINK1-Parkin pathway promotes both mitophagy and selective respiratory chain turnover in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(16), 6400-6405.
328. **Viotti**, J., Duplan, E., Caillava, C., Condat, J., Goiran, T., Giordano, C., Marie, Y., Idbaih, A., Delattre, J. Y., Honnorat, J., Checler, F., Alves da Costa, C. (2014). Glioma tumor grade correlates with parkin depletion in mutant p53-linked tumors and results from loss of function of p53 transcriptional activity. *Oncogene*, 33(14), 1764.
329. **Vives-Bauza**, C., Zhou, C., Huang, Y., Cui, M., de Vries, R. L., Kim, J., Tocilescu, M. A., Liu, W., Ko, H. S., Magrané, J., Moore, D. J., Dawson, V. L., Grailhe, R., Dawson, T. M., Li, C., Tieu, K., Przedborski, S. (2010). PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1), 378-383.
330. **Volpicelli-Daley**, L. A., Luk, K. C., Patel, T. P., Tanik, S. A., Riddle, D. M., Stieber, A., Meaney, D. F., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. (2011). Exogenous α -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron*, 72(1), 57-71.
331. **Walczak**, J., & Szczepanowska, J. (2015). Zaburzenia dynamiki i dystrybucji mitochondriów w komórkach w stwardnieniu zanikowym bocznym (ALS). *Postępy Biochemii*, 61(2), 183-190.
332. **Walden**, H., & Martinez-Torres, R. J. (2012). Regulation of Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(18), 3053-3067.
333. **Wang**, A., Costello, S., Cockburn, M., Zhang, X., Bronstein, J., & Ritz, B. (2011a). Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides. *European Journal of Epidemiology*, 26(7), 547-555.
334. **Wang**, C., Tan, J. M., Ho, M. W., Zaiden, N., Wong, S. H., Chew, C. L., Eng, P. W., Lim, T. M., Dawson, T. M., Lim, K. L. (2005). Alterations in the solubility and intracellular localization of parkin by several familial Parkinson's disease-linked point mutations. *Journal of Neurochemistry*, 93(2), 422-431.
335. **Wang**, E., Metman, L. V., Bakay, R., Arzbaeher, J., & Bernard, B. (2003). The effect of unilateral electrostimulation of the subthalamic nucleus on respiratory/phonatory subsystems of speech production in Parkinson's disease—a preliminary report. *Clinical Linguistics & Phonetics*, 17(4-5), 283-289.
336. **Wang**, H. F., Yu, J. T., Tang, S. W., Jiang, T., Tan, C. C., Meng, X. F., Wang, C., Tan, M. S., Tan, L. (2014). Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors and memantine in cognitive impairment in Parkinson's disease, Parkinson's disease dementia, and dementia with Lewy bodies: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, jnnp-2014.
337. **Wang**, H. Q., & Takahashi, R. (2007). Expanding insights on the involvement of endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(5), 553-561.
338. **Wang**, X., Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y. L., Selkoe, D., Rice, S., Steen, J., LaVoie, M. J., Schwarz, T. L. (2011b). PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell*, 147(4), 893-906.
339. **Wang**, Y., Ding, L., Wang, X., Zhang, J., Han, W., Feng, L., Sun, J., Jin, H., Wang, X. J. (2012). Pterostilbene simultaneously induces apoptosis, cell cycle arrest and cyto-protective autophagy in breast cancer cells. *American Journal of Translational Research*, 4(1), 44.

340. **Wauer**, T., & Komander, D. (2013). Structure of the human Parkin ligase domain in an autoinhibited state. *The EMBO Journal*, *32*(15), 2099-2112.
341. **Wenzel**, D. M., Lissounov, A., Brzovic, P. S., & Klevit, R. E. (2011). UBC7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. *Nature*, *474*(7349), 105.
342. **Wilkaniec**, A., Gąssowska, M., Czapski, G. A., Cieślak, M., Sulkowski, G., & Adamczyk, A. (2017). P2X7 receptor-pannexin 1 interaction mediates extracellular alpha-synuclein-induced ATP release in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Purinergic Signalling*, *13*(3), 347-361.
343. **Wilkaniec**, A., Strosznajder, J. B., & Adamczyk, A. (2013). Toxicity of extracellular secreted alpha-synuclein: Its role in nitrosative stress and neurodegeneration. *Neurochemistry International*, *62*(5), 776-783.
344. **Winklhofer**, K. F., Henn, I. H., Kay-Jackson, P. C., Heller, U., & Tatzelt, J. (2003). Inactivation of Parkin by oxidative stress and C-terminal truncations a protective role of molecular chaperones. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(47), 47199-47208.
345. **Winslow**, A. R., Chen, C. W., Corrochano, S., Acevedo-Arozena, A., Gordon, D. E., Peden, A. A., Lichtenberg, M., Menzies, F. M., Ravikumar, B., Imarisio, S., Brown, S., O'Kane, C. J., Rubinsztein, D. C. (2010). α -synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *The Journal of Cell Biology*, *190*(6), 1023-1037.
346. **Wong**, Y. C., & Krainc, D. (2017). α -synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. *Nature Medicine*, *23*(2), 1.
347. **Xie**, W., & Chung, K. K. (2012). Alpha-synuclein impairs normal dynamics of mitochondria in cell and animal models of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, *122*(2), 404-414.
348. **Xie**, Y. Y., Zhou, C. J., Zhou, Z. R., Hong, J., Che, M. X., Fu, Q. S., Song, A. X., Lin, D. H., Hu, H. Y. (2010). Interaction with synphilin-1 promotes inclusion formation of α -synuclein: mechanistic insights and pathological implication. *The FASEB Journal*, *24*(1), 196-205.
349. **Xilouri**, M., Brekk, O. R., & Stefanis, L. (2013). Alpha-synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. *Molecular Neurobiology*, *47*(2), 537-551.
350. **Xilouri**, M., Brekk, O. R., & Stefanis, L. (2016). Autophagy and Alpha-Synuclein: Relevance to Parkinson's Disease and Related Synucleopathies. *Movement Disorders*, *31*(2), 178-192.
351. **Yamamoto**, A., Friedlein, A., Imai, Y., Takahashi, R., Kahle, P. J., & Haass, C. (2005). Parkin phosphorylation and modulation of its E3 ubiquitin ligase activity. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(5), 3390-3399.
352. **Yang**, H., Zhou, H. Y., Biao, L. I., Niu, G. Z., & Chen, S. D. (2007). Downregulation of parkin damages antioxidant defenses and enhances proteasome inhibition-induced toxicity in PC12 cells. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, *2*(3), 276-283.
353. **Yang**, J. Y., & Yang, W. Y. (2013). Bit-by-bit autophagic removal of parkin-labelled mitochondria. *Nature Communications*, *4*, 2428.
354. **Yao**, D., Gu, Z., Nakamura, T., Shi, Z. Q., Ma, Y., Gaston, B., Palmer, L. A., Rockenstein, E. M., Zhang, Z., Masliah, E., Uehara, T., Lipton, S. A. (2004). Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(29), 10810-10814.
355. **Yasuda**, T., & Mochizuki, H. (2010). The regulatory role of α -synuclein and parkin in neuronal cell apoptosis; possible implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Apoptosis*, *15*(11), 1312-1321.
356. **Yeo**, C. W., Ng, F. S., Chai, C., Tan, J. M., Koh, G. R., Chong, Y. K., Koh, L. W., Foong, C. S., Sandanaraj, E., Holbrook, J. D., Ang, B. T., Takahashi, R., Tang, C., Lim, K. L. (2012). Parkin pathway activation mitigates glioma cell proliferation and predicts patient survival. *Cancer Research*, *72*(10), 2543-2553.
357. **Yonashiro**, R., Ishido, S., Kyo, S., Fukuda, T., Goto, E., Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Sada, K., Hotta, H., Yamamura, H., Inatome, R., Yanagi, S. (2006). A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *The EMBO Journal*, *25*(15), 3618-3626.
358. **Youle**, R. J., & Narendra, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(1), 9.

359. **Yuan, Y.**, Jin, J., Yang, B., Zhang, W., Hu, J., Zhang, Y., & Chen, N. H. (2008). Overexpressed alpha-synuclein regulated the nuclear factor-kappaB signal pathway. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 28(1), 21-33.
360. **Zarranz, J. J.**, Alegre, J., Gómez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., Llorens, V., Gomez Tortosa, E., del Ser, T., Muñoz, D. G., de Yebenes, J. G. (2004). The new mutation, E46K, of α -synuclein causes parkinson and Lewy body dementia. *Annals of Neurology*, 55(2), 164-173.
361. **Zhang, C. W.**, Hang, L., Yao, T. P., & Lim, K. L. (2016). Parkin regulation and neurodegenerative disorders. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7, 248.
362. **Zhang, Q. S.**, Heng, Y., Yuan, Y. H., & Chen, N. H. (2017). Pathological α -synuclein exacerbates the progression of Parkinson's disease through microglial activation. *Toxicology Letters*, 265, 30-37.
363. **Zhang, Y.**, Gao, J., Chung, K. K., Huang, H., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2000). Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 13354-13359.
364. **Zheng, L.**, Bernard-Marissal, N., Moullan, N., D'Amico, D., Auwerx, J., Moore, D. J., Knott, G., Aebischer, P., Schneider, B. L. (2017). Parkin functionally interacts with PGC-1 α to preserve mitochondria and protect dopaminergic neurons. *Human Molecular Genetics*, 26(3), 582-598.
365. **Zheng, Z.**, Li, Y., Li, J., Zhang, Y., Zhang, X., & Zhuang, P. (2010). Stimulation-induced dyskinesia in the early stage after subthalamic deep brain stimulation. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, 88(1), 29-34.
366. **Ziviani, E.**, Tao, R. N., & Whitworth, A. J. (2010). Drosophila parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(11), 5018-5023.