

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Neurobiologijos magistro studijų programos II kurso studentė

Greta Aleksandravičiūtė

Baigiamasis magistro darbas

**$\alpha$ -sinukleino agregacijos ir poveikio smegenų ląstelėms tyrimas**

Darbo vadovė:

Prof. Dr. Vilmantė Borutaitė

Darbo konsultantė:

Katryna Pampuščenko

Vilnius, 2021

## **$\alpha$ -sinukleino agregacijos ir poveikio smegenų ląstelėms tyrimas**

Darbas atliktas:

Lietuvos Sveikatos Mokslų universitete, Neuromokslų instituto Biochemijos laboratorijoje ir  
Vilniaus universitete, Gyvybės mokslų centre, Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir  
biospektroskopijos skyriuje

Greta Aleksandravičiūtė

---

(Parašas)

Darbo vadovė:

Prof. Dr. Vilmantė Borutaitė

---

(Parašas)

## TURINYS

Santrumpos .....	4
ĮVADAS .....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	8
1.1 Neurodegeneracinės ligos .....	8
1.2. $\alpha$ -syn baltymas .....	9
1.2.1 $\alpha$ -syn struktūra ir funkcijos .....	9
1.2.2 $\alpha$ -syn agregacija .....	10
1.2.3 Baltymo sekrecija ir internalizacija .....	12
1.2.4 $\alpha$ -syn toksiškumas .....	13
1.3 A $\beta$ ir jo toksiškumas .....	18
1.4 Baltymų ryšys .....	19
2. METODIKA .....	21
2.1 A $\beta$ <sub>1-42</sub> didelių oligomerų paruošimas .....	21
2.2. $\alpha$ -syn baltymo paruošimas .....	21
2.3 $\alpha$ -syn darinių analizė atominės jėgos mikroskopijos metodu .....	22
2.4 Pirminės žiurkių smegenėlių neuronų – glijos ląstelių kultūros paruošimas .....	23
2.5 Ląstelių gyvybingumo ir tankio vertinimas fluorescencinio mikroskopavimo metodu .....	23
2.6 Statistinė analizė .....	25
3. REZULTATAI .....	26
3.1. $\alpha$ -syn darinių dydžio tyrimas .....	26
3.2. Skirtingo oligomerizacijos laipsnio $\alpha$ -syn darinių poveikio smegenų ląstelėms vertinimas .....	31
REZULTATŲ APTARIMAS .....	39
IŠVADOS .....	43
SANTRAUKA .....	44
SUMMARY .....	46
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	48

## Santrumpos

ADJ – aktyvūs deguonies junginiai

AICD (angl. the amyloid precursor protein APP intracellular domain) – amiloido pirmtako baltymo viduląstelinis domenas

AJM – atominės jėgos mikroskopija

AL – Alzheimerio liga

APP (angl. amyloid precursor protein) – amiloido pirmtako baltymas

AR – aminorūgštys

ATP – adenzintrifosfatas

A $\beta$  – amiloidas beta

BACE (angl. beta secretase 1) – beta sekretazė 1

CD (angl. cluster of differentiation) – diferenciacijos antigenai

CGC (angl. cerebellum granule cells) – pirminė smegenėlių neuronų – glijos kultūra

CMA (angl. chaperone mediated autophagy) – šaperonų sukelta autofagija

CNS – centrinė nervų sistema

ERK (angl. extracellular signal regulated kinase) – užląstelinio signalo reguliuojamos kinazės

ET – endoplazminis tinklas

IL – interleukinas

JNK (angl. c-Jun N-terminal kinase) – c-Jun N-galo kinazė

LDLR (angl. low density lipoprotein receptor) – mažo tankio lipoproteinų receptoriai

LRRK2 (angl. Leucine-rich repeat kinase 2) – leucino kartotinių sekų kinazė 2

LTD (angl. long-term depression) – ilgalaikė depresija

LTP (angl. long-term potentiation) – ilgalaikė potenciacija

MAPK (angl. mitogen activated protein kinase) – mitogenų aktyvuojama baltymų kinazė

NAC (angl. non-amyloid component) – neamiloidinio komponento sritis

NF –  $\kappa$ B (angl. Nuclear factor-kappa B) – Branduolio faktorius kapa B

NLRP3 (angl. pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome) – pirino domeną turinti 3 inflammasoma

PI3K-AKT – fosfatidilinozitolio 3 kinazės – baltymų kinazės B kelias

PL – Parkinsono liga

PLK (angl. Polo-like kinase 2) – Polo-tipo kinazė 2

SEM – skenuojanti elektronų mikroskopija

SNARE (angl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) – tirpaus, N-etilmaleimidui jautraus faktoriaus prisijungimo baltymo receptoriai

SS (angl. cerebrospinal fluid, CSF) – smegenų skystis

TGF (angl. tumor growth factor) – naviko augimo faktorius

TLR – toll-tipo receptoriai

TNF- $\alpha$  – naviko nekrozės veiksnys alfa

TOM (angl. translocase of the outer membrane) – išorinės membranos translokazė

UPS – ubikvitino-proteosomų sistema

$\alpha$ -syn – alfa sinukleinas

## IVADAS

Parkinsono liga (PL) yra antras pagal dažnumą neurodegeneracinis sutrikimas, priskiriamas sinukleinoopatijoms – ligų grupei, kurioms būdingos Lewy kūnelių sankaupos. PL būdinga selektyvi dopaminerginių neuronų žūtis juodojoje medžiagoje (lot. substantia nigra), hipokampe bei dryžuotame kūne (lot. striatum) (Fields ir kt., 2019). Taip pat šių sričių neuronuose nustatomi Lewy kūneliai, kuriuos sudaro  $\alpha$ -sinukleinas ( $\alpha$ -syn). Tai mažas, 14 kDa baltymas, lokalizuotas neuronų aksonuose. Sergant PL,  $\alpha$ -syn toksiškumas pasireiškia įvairiais mechanizmais. Ilgą laiką manyta, kad neurotoksinis poveikiu pasižymi Lewy kūneliai ir juos formuojančios fibrilės. Visgi pastarųjų metų tyrimai rodo, kad Lewy kūnelių sankaupos būdingos net 10 proc. neurologiškai sveikų pacientų (Markesbery ir kt., 2009), o stipriu toksiniu poveikiu pasižymi tarpinės struktūros – tirpūs oligomerai (McKinnon ir kt. 2020). Kaupiantis toksinį poveikį ląstelėms turinčioms formoms pažeidžiama mitochondrijų, endoplazminio tinklo (ET) veikla, sukeliamas oksidacinis stresas ir baltymų degradacijos sistemų disfunkcija (Wong & Krainc, 2017). Įvairaus oligomerizacijos laipsnio baltymas nustatomas sergančiųjų smegenų skystyje (SS), labiausiai paveiktose smegenų srityse padidėja baltymo sekrecija (Brás & Outeiro, 2021). Užląstelinis baltymas taip pat pasižymi toksiniu poveikiu neuronams. Endocituotos  $\alpha$ -syn formos sukelia viduląstelinio monomerinio baltymo agregaciją ir taip prisideda prie pataloginių pokyčių plitimo (Longhena ir kt., 2017). Taip pat yra žinoma, kad užląstelinis baltymas sukelia neurouždegimą, jungdamasis prie mikroglijos ir astrocitų paviršiaus receptorių (Kaur ir kt., 2017).

Nustatyta, kad  $\alpha$ -syn toksiškumui įtakos gali turėti kitų baltymų pataloginės formos. Apie 40 proc. PL atvejų nustatomi reikšmingai padidėję amiloido beta ( $A\beta$ ) ir Tau baltymo darinių kiekiai. Pastarieji baltymai būdingi Alzheimerio ligai (AL) (Swirski ir kt., 2014). Pacientams, kuriems pasireiškia  $A\beta$  ir  $\alpha$ -syn patalogija, būdinga sunkesnė ligos forma. Molekuliniiais tyrimais nustatytas jų poveikis vienas kito oligomerizacijai, o kartu ir toksiškumui (Malek-Ahmadi ir kt., 2019).

Siekiant nustatyti ankstyvos PL diagnostikos žymenis, bei sukurti efektyvius gydymo metodus, būtina geriau suprasti ligos vystymosi molekulinis mechanizmus. Nors kasmet daugėja pagrindinio PL žymens -  $\alpha$ -syn tyrimų, vis dar nėra žinoma, kokio oligomerizacijos laipsnio agregatai pasižymi didžiausiu neurotoksinis poveikiu ir, ar jis pasireiškia tiesiogiai, ar netiesiogiai – aktyvinant glijos ląsteles. Taip pat neurodegeneracinių ligų variantai, kuriems būdingi tiek PL priskiriamas  $\alpha$ -syn, tiek AL žymuo  $A\beta$ , rodo baltymų poveikį vienas kito

oligomerizacijai, tačiau vis dar trūksta žinių apie susidarančius agregatus ir jų toksiškumo pokyčius.

**Darbo tikslas** – įvertinti skirtingo oligomerizacijos laipsnio  $\alpha$ -syn darinių poveikį smegenų ląstelėms.

**Darbo uždaviniai:**

1. Parengti  $\alpha$ -syn oligomerizacijos - savaiminės ir naudojant  $A\beta_{1-42}$  oligomerus – protokolus;
2. Nustatyti  $\alpha$ -syn agregatų dydį, taikant atominės jėgos mikroskopijos metodą;
3. Įvertinti skirtingo oligomerizacijos laipsnio  $\alpha$ -syn darinių poveikį žiurkių smegenėlių neuronų-glijos kultūroms;
4. Įvertinti ar  $A\beta_{1-42}$  turi įtakos  $\alpha$ -syn oligomerizacijai ir neurotoksiškumui.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Neurodegeneracinės ligos

Neurodegeneracijai būdingi progresuojantys sinapsių, neuronų ir glijos ląstelių bei tarpląstelių ryšių pataloginiai pokyčiai, lemiantys neuronų žūtį. Nors neurodegeneracinių sutrikimų suskaičiuojama virš 100, dažniausiai diagnozuojamos, paplitusios bei tiriamos yra Alzheimerio (AL) ir Parkinsono (PL) ligos. AL sudaro 60-80 proc. visų demencijos atvejų, o antra pagal dažnumą – PL 3,6 proc. (Sabbagh ir kt., 2009). Jų atsiradimui ir paplitimui didelės įtakos turi žmonių amžius: ilgėjant gyvenimo trukmei populiacijoje daugėja neurodegeneracinių ligų skaičius (Kovacs, 2019). Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis demencija – vienu iš neurodegeneracinių ligų sindromų, pasižyminčiu lėtiniu progresuojančiu kognityvinių funkcijų blogėjimu – serga 5 – 8 proc. bendros populiacijos virš 60 metų (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>).

Neurodegeneracinės ligos skiriasi klinikiniais simptomais. AL pirmiausia apibūdinama lėtiniu ir progresuojančiu kognityvinių funkcijų blogėjimu, o PL būdingi motorikos sutrikimai, tokie kaip drebulys ar bradikinezija. Progresuojantis kognityvinių funkcijų blogėjimas, motorikos sutrikimai leidžia nustatyti degeneracijos paveiktas centrinės nervų sistemos (CNS) sritis, pvz: frontotemporalinė, piramidinė/ ekstrapiramidinė (angl. frontotemporal, pyramidal/ extrapyramidal). Klinikiniai simptomai yra nulemti paveiktos anatominės arba funkcinės srities (Dugger & Dickson, 2017). Neurodegeneracinėms ligoms būdingos tam tikrų baltymų sankaupos. AL požymis - pataloginiai A $\beta$  peptidai ir jų formuojamos plokštelės. Kartu liga priskiriama tauopatijų grupei, nes jai būdingos viduląstelinės Tau baltymo sankaupos, padidėjęs baltymo kiekis SS. PL būdingos amiloidinės sankaupos, vadinamos Lewy kūneliais, kurie yra sudaryti iš baltymo  $\alpha$ -syn. Didžioji šių ligų dalis yra savaiminės, tačiau procentaliai maža dalis gali būti paveldimos, sukeltos genų mutacijų (Jucker & Walker, 2018; Kovacs, 2019).

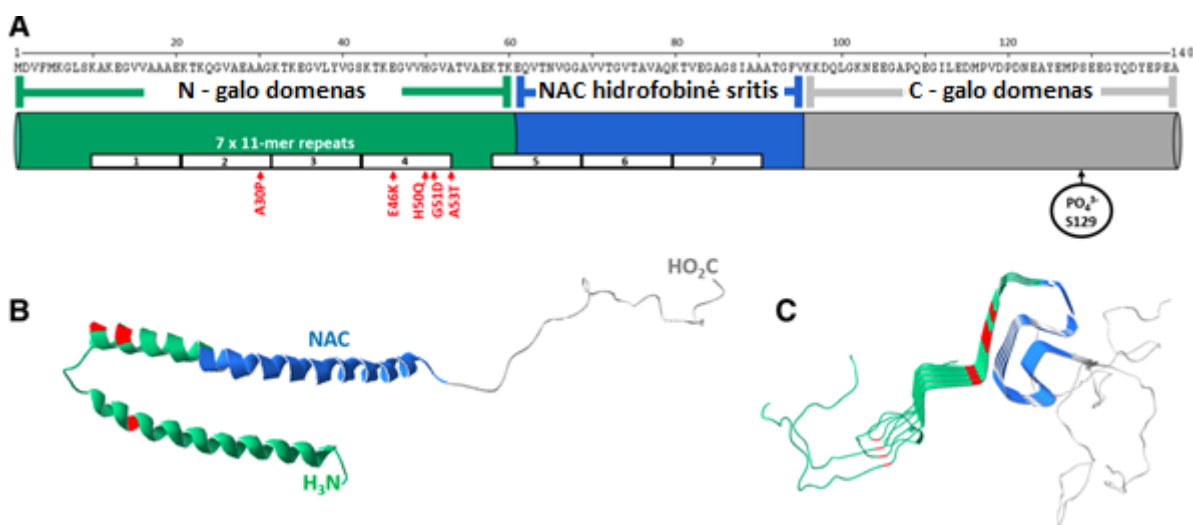
Nors kasmet daugėja neurodegeneracinių ligų tyrimų ir žinių, AL ir PL vystymosi mechanizmai nėra pilnai atskleisti. Šios neurodegeneracinės ligos ne tik neturi efektyvaus gydymo, bet ir ankstyvos diagnostikos biožymenų (Mattsson-Carlgrén ir kt., 2020). Taigi kas yra žinoma apie ligas charakterizuojančius baltymus ir neurodegeneracijos mechanizmus?



## 1.2. $\alpha$ -syn baltymas

### 1.2.1 $\alpha$ -syn struktūra ir funkcijos

$\alpha$ -syn yra mažas 14 kDa baltymas, lokalizuotas aksonų terminalėse. Baltymą sudaro 140 aminorūgščių (AR) seka, kurią galima suskirstyti į tris domenų: 1-60 AR N-galo domeną, 61-95 AR neamiloidinio komponento sritį (angl. non-amyloid component, NAC) ir 96-140 AR C-galo domeną (1.1 pav.). N-galo sritis formuoja  $\alpha$ -spirales, būtinas jungimuisi prie membranos ir sąveikaudama su sinapsinėmis pūslelėmis stabilizuoja baltymą. Šiame domene yra ir trys sritys, kurių mutacijos sukelia šeiminingą PL: A30P, A53T ir E46K (Longhena ir kt., 2019). NAC domeną turi hidrofobinių motyvų, kurie yra svarbūs oligomerizacijai ir fibrilių formavimuisi. C-terminalės reguliacinis domenas turi fosforilinimo sritį ir yra atsakingas už sąveiką su membrana.  $\alpha$ -syn koduoja vienas *SNCA* genas 4 chromosomoje (Vacchi ir kt., 2020).



#### 1.1 pav. $\alpha$ -sinukleino struktūra

A – pirminė baltymo struktūra. N-galo domeną pažymėtas žalia spalva, neamiloidinio komponento sritis NAC mėlyna spalva, C-galo domeną pilka spalva; B – kristalinės struktūros modelis; C – 4 baltymų formuojamų fibrilių struktūros modelis. Adaptuota pagal (Towhig & Nielsen, 2019a).

Fiziologinės  $\alpha$ -syn funkcijos nėra pilnai aiškios. Ląstelės citoplazmoje baltymas pasiskirstęs netolygiai, mažesni jo kiekiai nustatomi neurono kūne, o didžioji dalis lokalizuota aksonuose, kur baltymas atlieka pagrindines funkcijas. Nustatyta, kad  $\alpha$ -syn sąveikauja su mažomis membraninėmis pūslelėmis ir jų baltymais, tokiais kaip sinapsinas, sinfilinas-1, su sinaptobrevinu/ pūslelėmis susijęs membranos baltymas-2, SNARE baltymų kompleksas

(Burré ir kt., 2010; B.-K. Choi ir kt., 2013). Taip pat žinoma, kad  $\alpha$ -syn skatina neurosiuntiklio dopamino sekreciją (Zaltieri ir kt., 2015). Tai leidžia manyti, kad baltymas glaudžiai susijęs su membraninių pūslelių mobilumo reguliacija ir dalyvauja prikabinant membranine pūsleles prie presinapsinės membranos.  $\alpha$ -syn taip pat aptinkamas ir ląstelės organelėse: endoplazminiame tinke (ET), mitochondrijose, branduolyje, kur dalyvauja neurosiuntiklių sintezėje, turi įtakos mitochondrijų funkcijai ir kalcio homeostazei, bei veikia genų raišką (Bendor ir kt., 2013).

### 1.2.2 $\alpha$ -syn agregacija

Didžioji dalis  $\alpha$ -syn ląstelėje egzistuoja kaip kompaktiški  $\alpha$ -spiralinės konformacijos monomerai. Šių baltymų konformacija priklauso nuo biocheminių sąlygų ląstelėje ir yra stabilizuojama centrinės 30-100 AR srities ir C-domeno 120-140 AR srities (Breydo ir kt., 2012). Net trečdalis neuronuose esančio  $\alpha$ -syn yra prisijungęs prie membranų ir membraninių pūslelių. Šios baltymo populiacijos N-galo ir centrinis domenai susisuka į  $\alpha$ -spirales, o C-galo domenai lieka be struktūros. Monomerai jungiasi prie didelio išgaubtumo, neigiamus fosfolipidus turinčių membranų (Masaracchia ir kt., 2018; Roberts & Brown, 2015). Ištyrus neurologiškai sveikų žmonių smegenų ląsteles nustatyta, kad kartu su 14 kDa monomerais dominuoja ir apie 58 kDa tetramerai. Pastarąjį dešimtmetį šių multimerų tyrimai susilaukia vis daugiau dėmesio, jie nustatyti žmogaus ląstelių linijose, eritrocituose, žinduolių smegenų audinyje (Lucas & Fernández, 2020). Tai  $\alpha$ -spiralinės konformacijos dariniai, kurie yra atsparūs agregacijai: tetramerus inkubavus agregaciją sukeliančiomis sąlygomis nesukeliama  $\beta$ -klosčių konformacija ir fibrilių susidarymas. Tai stabili forma, kurioje už agregaciją atsakingas  $\alpha$ -syn NAC regionas lieka molekulės viduje (Lashuel ir kt., 2013). Monomerinio ir tetramerinio  $\alpha$ -syn santykis priklauso nuo ląstelių tipo ir biocheminių sąlygų. Pavyzdžiui, gliukocerebrocidazės 1 trūkumas sumažina tetramerinio ir padidina monomerinio  $\alpha$ -syn kiekį SH-SY5Y ląstelėse (S. Kim ir kt., 2018).

Sinukleinopatijos (angl. synucleinopathies) yra grupė ligų, kurioms būdingas padidėjęs baltymo kaupimasis citoplazmoje ir patologinės, pakitusios konformacijos bei agreguotos formos neuronuose ir glijos ląstelėse. Baltymo neurotoksiškumas siejamas su oligomerizacijos laipsnio pokyčiais, tirpiems  $\alpha$ -syn monomerams jungiantis ir formuojant netirpias fibriles.  $\alpha$ -syn oligomerizacijai svarbi jo struktūra, kuri kinta esant patologinėmis sąlygomis (Ma ir kt., 2019). Manoma, kad  $\alpha$ -syn tetramerų destabilizavimas ir disociacija į monomerus gali būti baltymo agregacijos ir PL pradžia. Nors veiksniai, sukeliančys multimerų disociaciją vis dar nėra žinomi, su šiuo procesu siejamos šeiminei ligos formai būdingos A30P, E46K, A53T mutacijos, sukeliančios N-galo KTKEGV sekos pokyčius

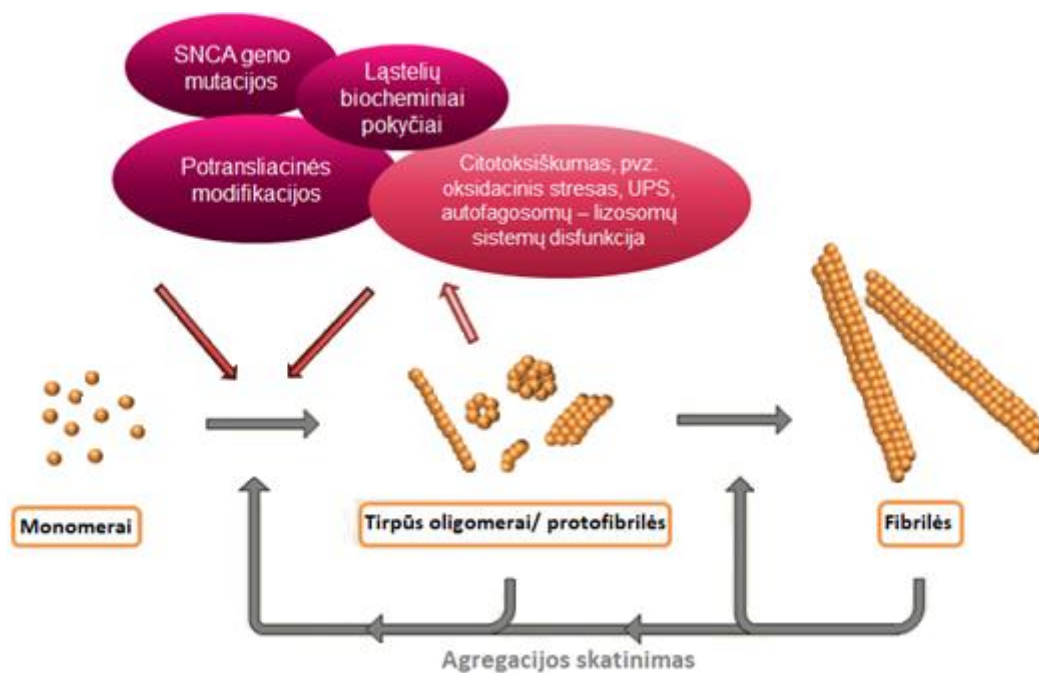
(Dettmer ir kt., 2015a; Nuber ir kt., 2018). Nustatyta, kad šio motyvo mutacijos sukelia tetramerų kiekio sumažėjimą žmogaus M17D ląstelių linijoje ir monomerų konformacijos į  $\beta$ -klostes pasikeitimą (Dettmer ir kt., 2015b).

Monomerų struktūros pokyčius, skatinančius agregaciją, sukelia oksidacinis stresas (Takahashi ir kt., 2007), metalų jonai (Deas ir kt., 2016), proteolizė (Dufty ir kt., 2007), bei riebalų rūgščių koncentracija ir fosfolipidų sudėtis (Kiechle ir kt., 2020; Matsuo ir kt., 2019). Svarbiausi pokyčiai vyksta N-galo sekoje, kuri sąveikauja su membranomis. Fiziologinėmis sąlygomis joje dominuoja spiralinė konformacija, o patologinėmis sąlygomis formuojasi  $\beta$ -klosčių struktūras turinčios fibrilės. (Killinger ir kt., 2019). Taip pat su membrana sąveikaujančiame domene yra hidrofobinis NAC regionas, atsakingas už sąveikas tarp baltymų ir sukeliantis agregaciją (Shvadchak ir kt., 2011). Nustatyta, kad pirmiausia ant membranos formuojasi stabilūs homodimerai. Dimerai, sudaryti iš nelygiagrečių  $\beta$ -klosčių, nesudaro didesnių agregatų, o lygiagrečių formuoja didesnius oligomerus – pentamerus ir heksamerus. Šie multimerai sudaro porų ar žiedo tipo struktūras, sukeliančias membranų pralaidumo padidėjimą. Šių oligomerų susidarymui įtakos turi  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ir  $Cu^{2+}$  jonai (Tsigelny ir kt., 2007). *In vitro* eksperimentais nustatyta, kad membranos sudėties pokyčiai, neigiamas krūvis, išlenktumo didėjimas gali pagreitinti  $\alpha$ -syn oligomerizaciją (Pariary ir kt., 2019; Ugalde ir kt., 2019).

Vidutinės (5-15 monomerų) ir didelės (15-150 monomerų) oligomerinės struktūros susidaro ląstelės citoplazmoje. Šie dariniai nustatomi *in vivo* transgeninėse pelėse ar ląstelių linijose, bei tiriant pomirtinius žmonių smegenų audinius (Luth ir kt., 2015).  $\alpha$ -syn oligomerai gaunami gryninant baltymus iš ląstelių lizatų ar naudojant antikūnius ir fluorescentinius metodus (Frey ir kt., 2020). AJM ir SEM metodais nustatyti sferiniai, apie 30 nm skersmens ir 2 – 10 nm aukščio, vidutiniai oligomerai. SAXS (angl. small-angle X-ray scattering) metodu charakterizuoti dviejų A ir B tipų oligomerai. Dauguma jų sudaryti iš 15-40 monomerų, juose dominuoja  $\beta$ -klosčių struktūra. Abiejų tipų oligomerai turi taisyklingą kompaktišką centrą ir aplink jį esantį 5 nm storio nestruktūruotų polipeptidų sluoksnį. Šie oligomerų tipai skiriasi konformacija, nes toksiškesnis B tipas susidaro iš mažiau toksinio A tipo, bei sąveikos su membrana būdu (Musteikytė ir kt., 2021; P ir kt., 2019). *In vitro* tyrimais nustatyta dar didesnė oligomerų įvairovė: nuo 0,8 nm aukščio dimerų, iki 12 nm aukščio vidutinių oligomerų, kuri priklauso nuo inkubacijos fizinių (pvz.: maišymo) ir cheminių (pvz.: pH, tirpalo joninės jėgos) sąlygų. Nuo jų priklauso ir toliau besiformuojančios protofibrilės ir fibrilės. Minimali koncentracija, reikalinga stabilioms prefibrilinėms struktūroms gauti yra 0,4-3,5  $\mu$ M (Afitska ir kt., 2019). Fibrilių formavimuisi reikalinga didesnė 15  $\mu$ M koncentracija (van Raaij ir kt., 2008), tačiau inkubuojant  $\alpha$ -syn su anijoniniais detergentais,

lipidais, veikiant ultragarsu pakanka 1-4  $\mu\text{M}$  baltymo (Afitska ir kt., 2019). AJM metodu nustatytas fibrilinių darinių aukštis yra maždaug 6-10 nm, o ilgis priklauso nuo jau minėtų sąlygų, pvz.: didinant tirpalo joninę jėgą fibrilės fragmentuojasi į trumpesnius darinius (Yu ir kt., 2011) (1.2 pav.).

Baltymo toksiškumas ir oligomerizacija yra glaudžiai susiję su potransliacinėmis modifikacijomis, iš kurių dažniausiai pasitaikanti yra fosforilinimas ties Ser129. Sveikose smegenyse fosforilinto baltymo yra vos 4 proc. Esant patologijai ir nustatčius Lewy kūnelių formavimąsi, nustatoma daugiau nei 90 proc. fosforilinto  $\alpha\text{-syn}$ . Baltymą fosforilina kazeino kinazė 2, G-baltymo receptoriaus kinazė 2 ir PLK (angl. Polo-like kinase 2) (Ma ir kt., 2019). Kita dažna modifikacija yra tirozino nitrinimas ties Y39, Y125, Y133 ir Y136. Šios potransliacinės modifikacijos skatina ir pagreitina baltymo oligomerizaciją (Giasson ir kt., 2000).



**1.2 pav.**  $\alpha$ -sinukleino agregacija ir toksiškumas  
Adaptuota pagal (Ingelsson, 2016a)

### 1.2.3 Baltymo sekrecija ir internalizacija

$\alpha\text{-syn}$  neturi sekrecijos signalo sekos. Tai ir jo funkcijos sinapsėje leido manyti, kad baltymas lokalizuotas išskirtinai ląstelės viduje. Visgi,  $\alpha\text{-syn}$  nustatytas įvairiuose žmogaus audiniuose: seilėse, kraujo plazmoje, eritrocituose ir SS bei ląstelių kultūrų terpėse *in vitro* (Brás & Outeiro, 2021). Patologinės baltymų formos, kaip ligų žymenys, dažniausiai nustatomos SS. Užląstelinė  $\alpha\text{-syn}$  forma nėra naudojama kaip PL žymuo, nes, nors keletas

tyrimų rodo ligos stadijos ir baltymo kiekio koreliaciją (Tokuda ir kt. 2006), didesnėmis studijomis ši koreliacija nenustatoma (Hong ir kt. 2010). Lyginant sveikų ir PL sergančių žmonių rezultatus nustatyta, kad monomerinio baltymo kiekis tarp šių grupių nesiskiria, tačiau fosforilinto ir oligomerinio baltymo kiekis PL grupėje yra reikšmingai padidėjęs (Atik ir kt., 2016).

Nustatyta, kad padidėjus  $\alpha$ -syn raiškai ląstelėje, jis kaupiasi didelio tankio pūslelėse. Dopaminas ne tik skatina pūslelėse esančio baltymo agregaciją, bet ir jo sekreciją (H.-J. Lee ir kt., 2011). Taip pat tyrimų rezultatai rodo, kad baltymo sekreciją sukelia ląstelės stresas, kartu skatinantis ir patologinių  $\alpha$ -syn agregaciją (Jang ir kt., 2010).  $\alpha$ -syn egzocituojamas mažose membraninėse pūslelėse (H.-J. Lee ir kt., 2008a) arba egzosomose, nuo  $Ca^{2+}$  priklausomu mechanizmu. Tokia sekrecija intensyvėja esant lizosomų disfunkcijai (Emmanouilidou ir kt., 2010).  $\alpha$ -syn sekrecija pūslelėse reguliuojama Rab baltymų (Hasegawa ir kt., 2011; Underwood ir kt., 2020). Kitas baltymo plitimo kelias yra tiesioginis iš neurono į ląstelę recipientę – glijos ar neuroną (Loria ir kt., 2017).

Baltymo patekimas į ląstelę vyksta keliais mechanizmais. Monomerai difunduoja tiesiogiai per plazminę membraną. Oligomerai ir fibrilės į ląstelę patenka jungdamiesi prie jų paviršiaus receptorių ir yra degraduojami endosomai susilieję su lizosomomis (H.-J. Lee ir kt., 2008b). Taip pat baltymas gali plisti sinapsėmis. Perduodamas iš ląstelės į ląstelę  $\alpha$ -syn skatina viduląstelinių agregatų formavimąsi receptorinėje ląstelėje (Longhena ir kt., 2017).

#### 1.2.4 $\alpha$ -syn toksiškumas

Baltymo agregacijos proceso tyrimai svarbūs siekiant nustatyti ir toksines  $\alpha$ -syn formas, sukeliančias neuronų disfunkciją ir žūtį. Nepaisant to, vis dar nėra žinoma kurios baltymo formos pasižymi stipriausiu neurotoksinu poveikiu. Tyrimų rezultatai leidžia manyti, kad  $\alpha$ -syn formuojamos fibrilės ir Lewy kūneliai, kaip ir  $A\beta$ , nėra pavojingi ląstelei, o tuo pasižymi tirpūs oligomerai (Ingelsson, 2016b). Lewy kūneliai nustatomi 10 proc. neurologiškai sveikų žmonių virš 60 metų (Markesbery ir kt., 2009; Parkkinen ir kt., 2005). Be to, PL sergantys pacientai turi LRRK2 (angl. Leucine-rich repeat kinase 2) geno G2019S mutacijas, kurioms būdinga neuronų degeneracija nesant Lewy kūnelių (Gaig ir kt., 2007).  $\alpha$ -syn mutacijos A53T ir A30P yra susijusios su oligomerų, bet ne fibrilių formavimusi (Conway ir kt., 2000). Kartu daugėja tyrimų, įrodančių tarpinės  $\alpha$ -syn struktūros darinių neurotoksinį poveikį. Buvo parodyta, kad ląstelės stipriau pažeidžiamos  $\alpha$ -syn, formuojančio oligomerus, o ne fibriles (Karpinar ir kt., 2009). Oligomerai, negalintys formuoti fibrilių, sukelia dopaminerginių neuronų degeneraciją. Nors šie rezultatai rodo oligomerų toksiškumą,

tikslus jų dydis bei tipas nėra nustatyti (Winner ir kt., 2011). Kartu duomenys apie  $\alpha$ -syn oligomerų ir fibrilių poveikį ląstelėms leidžia manyti, kad Lewy kūnelių formavimasis gali būti apsauginis mechanizmas, surenkantis toksines baltymo formas ir neleidžiantis joms sutrikdyti ląstelėje vykstančių mechanizmų (Chartier & Duyckaerts, 2018).

Kaupiantis toksinį poveikį neuronams turinčioms baltymo formoms, skatinama monomerinio  $\alpha$ -syn oligomerizacija, žūsta neuronai ir progresuoja judėjimo ir kiti ligai būdingi sutrikimai.  $\alpha$ -syn oligomerai ir fibrilės turi tiesioginį toksinį poveikį neuronams. Tyrimais nustatyta, kad prie membranos prisijungęs baltymas agreguojasi labiau, nei laisva citozolinė forma. Taip patologinė baltymo forma sutrikdo membraninių pūslelių transportą aksonu bei sukelia dopamino pūslelių disreguliaciją. Kadangi įvairios oligomerizacijos  $\alpha$ -syn nustatyta ląstelės organelėse, baltymas sukelia jų disfunkciją (McKinnon ir kt., 2020).

Prie patologijos progresavimo labiausiai prisideda mitochondrijų disfunkcija. Yra žinoma, kad  $\alpha$ -syn gali sąveikauti su išorinės ir vidinės membranos baltymais. Oligomerinė, tačiau ne monomerinė ar fibrilinė, baltymo forma jungiasi prie išorinės membranos TOM20 receptorių, taip slopindama kitų baltymų patekimą į organelę ir sutrikdydama jos veiklą (Di Maio ir kt., 2016).  $\alpha$ -syn agregatai, sąveikaudami su mitochondrijų vidinės membranos baltymais, tokiais kaip ATP sintazė, sukelia I kvėpavimo grandinės komplekso sutrikimus žmogaus dopaminerginiuose neuronuose (Bose & Beal, 2016). Prefibrilinė forma sutrikdo  $Ca^{2+}$  sulaikymą mitochondrijose. Šie pokyčiai veda prie mitochondrijų depoliarizacijos, funkcijos sutrikimų, mitofagijos ir galiausiai ląstelės žūties (Ganjam ir kt., 2019).

Taip pat citotoksinis baltymo poveikis susijęs su ubikvitino-proteosomų sistemos (UPS) ir autofagosomų – lizosomų mechanizmų sutrikdymu (McKinnon ir kt., 2020). Ląstelėje yra dvi pagrindinės sistemos, pašalinančios disfunkcinius baltymus: UPS ir autofagosomų - lizosomų kelias. UPS atsakinga už baltymų skaidymą, pažymint juos ubikvitinu ir transportuojant į proteosomas degradacijai. Autofagosomų - lizosomų kelias skirstomas į tris dalis: makroautofagiją, mikroautofagiją ir šaperonų sukeltą autofagiją (CMA). Makroautofagijos metu, viduląsteliniai komponentai, įskaitant citozolinius baltymus, yra endocituojami autofagosomų, kurios susilieja su lizosomomis ir tai veda prie autofagosomų turinio suskaidymo. Mikroautofagijos atveju endocituojant ir degraduojant citoplazmos komponentus dalyvauja tik lizosomos. CMA yra selektyvesnis procesas, kur molekuliniai šaperonai taikosi į specifinį baltymą ir transportuoja jį į lizosomas degradacijai. Monomerinis  $\alpha$ -syn yra pašalinamas abiejų UPS ir autofagosomų - lizosomų kelio, o bet kurios sistemos pažeidimas susijęs su PL patogenezė, prisideda prie pažeistų, patologiinių baltymų formų kaupimosi (Kouli ir kt., 2018). Šiuos pažeidimus sukelia ir pats  $\alpha$ -syn. Nustatyta, kad po lizosomų inkubacijos su  $\alpha$ -syn, jų aktyvumas reikšmingai sumažėja ir

baltymas palaipsniui pradeda jose kauptis. Tai labiau pasireiškia ląstelėse, paveiktose  $\alpha$ -syn oligomerais, o ne monomierine ar fibriline forma (Hoffmann ir kt., 2019). Tiriant UPS ir  $\alpha$ -syn sąveiką nustatyta, kad baltymas gali tiesiogiai jungtis prie 20S ir 19S proteosomų subvienetų. Šiai sąveikai svarbus baltymo agregacijos laipsnis: prie proteosomų 20S subvienetų jungiasi ir jų veiklą slopina oligomerai ir fibrilės, o 19S - oligomerai (Lindersson ir kt., 2004; Snyder ir kt., 2003).

### 1.2.5 $\alpha$ -syn ir neuroūždegimas

Su PL patogenezė ir dopaminerginių neuronų degeneracija siejami įvairūs molekuliniai mechanizmai, iš kurių vienas svarbiausių – neuroūždegimas. Aktyvius uždegiminius procesus rodo tiek CNS, tiek periferijoje esantys žymenys. PL pacientams nustatomi padidėję prouždegiminių citokinų, tokių kaip IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ir jo receptorių TNFR1/2, kiekiai plazmoje, lyginant su to paties amžiaus ir lyties kontrolinėmis grupėmis. Kartu pasikeičia ir imuninių ląstelių kiekis kraujyje: PL pacientams nustatomas sumažėjęs bendras leukocitų skaičius, kur labiausiai paveiktas yra T (CD3+) ir B (CD19+) limfocitų skaičius (Rocha ir kt., 2015). Visgi svarbiausi neuroūždegimui būdingi pokyčiai nustatomi CNS.  $\alpha$ -syn sankaupos nustatomos ne tik neuronuose, bet ir uždegime dalyvaujančiose ląstelėse – astrocituose (Chavarría ir kt., 2018a). Labiausiai PL paveiktose smegenų srityse - juodojoje medžiagoje (lot. substantia nigra), dryžuotame kūne (lot. striatum) bei hipokampe - nustatoma mikrogliozė ir astrogliozė, kurių pagrindinis požymis yra reikšmingai padidėjęs reaktyvių ląstelių skaičius (Doorn ir kt., 2014) ir padidėjusi prouždegiminių molekulių raiška (Kaur ir kt., 2017; Reynolds ir kt., 2008). Kaip ir kraujyje, SS nustatomi padidėję citokinų IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  kiekiai (Rocha ir kt., 2015).

*In vivo* ir *in vitro* tyrimai suteikia daugiau žinių apie  $\alpha$ -syn sukiamą uždegimą ir jame aktyvinamus molekulinis mechanizmus. Pirmiausia,  $\alpha$ -syn toksiškumas pasireiškia aktyvinant neuroūždegime dalyvaujančias glijos ląsteles: mikrogliją ir astrocitus (Kam ir kt., 2020). Mikroglijos ląstelės yra smegenų makrofagai, įgimto imuniteto dalis, sudarančios 5 – 10 proc. visų suaugusio žmogaus smegenų ląstelių. Šios ląstelės nuolat sąveikauja su aplinka, fagocituoja patogenus ir žuvusias ląsteles bei jų dalis, taip palaikydamos CNS homeostazę. Nustatyta, kad užląstelinis  $\alpha$ -syn sukelia neuroūždegiminius procesus mikroglijos ląstelėse.  $\alpha$ -syn, jungdamasis prie fagocitinių ląstelių receptorių, aktyvina keletą molekulinį mechanizmų, atsakingų už pro-uždegiminius procesus (1.3 pav.). Jungdamasis prie TLR2/4 receptorių baltymas sukelia fosforilavimo kaskadą, aktyvindamas mieloidinės diferenciacijos pirminio atsako adaptacinį baltymą 88 (angl. Myeloid differentiation primary response 88,

MyD88) ir I $\kappa$ B kinazes. Tai sukelia NF- $\kappa$ B translokaciją ir padidėjusią citokinų raišką (Daniele ir kt., 2015a). TLR aktyvacija aktyvina ir kitus molekulinis mechanizmus. Monomerinis ir oligomerinis  $\alpha$ -syn baltymas sukelia ERK1/2, p38 MAPK ir JNK aktyvaciją, kurie siejami su toksiškumu ir uždegiminiais procesais (E. K. Kim & Choi, 2010; Prabhakaran ir kt., 2011).

$\alpha$ -syn oligomerai, prisijungę prie Fc $\gamma$ R gali būti internalizuojami mikroglijos ląstelių į autofagosomas ir taip pat aktyvuoti NF- $\kappa$ B (Cao ir kt., 2012).

Dar vienas receptorių, prie kurio prisijungdamas  $\alpha$ -syn sukelia viduląstelinis uždegiminius procesus, yra P2X7R. Visgi, kaip baltymas sąveikauja su receptoriais nėra nustatyta. Manoma, kad baltymas gali jungtis ne tik prie ATP jungimosi srities, bet ir sąveikauti su membranoje esančia receptoriaus dalimi, nes abu baltymai turi įterpimo į membraną sritis. ATP prisijungimas prie P2X7R, kuris yra jonų kanalas, sukelia K<sup>+</sup> kiekio mažėjimą ląstelėje. Agreguotas  $\alpha$ -syn sukelia ADJ susidarymą, kuris slopinamas kalio kanalų blokavimu. Pakitus P2X7R konformacijai, aktyvinama NADPH oksidazė ir PI3K/ AKT kelias. Šie mechanizmai veda prie ADJ susidarymo ir ląstelės žūties (Jiang ir kt., 2015). Minėti receptoriai dalyvauja inflammosomos NLRP3 bei kaspazės – 1 aktyvavime, kurios neaktyvias citokinų, tokių kaip proIL-1 $\beta$  ir proIL-18, formas paverčia aktyviomis (Haque ir kt., 2020).

ADJ ir NO susidaro ne tik aktyvuojant P2X7R, bet ir  $\alpha$ -syn oligomerams bei fibrilėms jungiantis prie CD molekulių. Baltymas sąveikauja su p47<sup>phox</sup>, tokiu būdu aktyvuojama NADPH oksidazė 2 ir skatinamas superoksido susidarymas (Hou ir kt., 2017).

$\alpha$ -syn sukelia padidėjusią prouždegiminių citokinų TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 raišką ir sekreciją į užląstelinę terpę (Rocha ir kt., 2015). Taip pat paveikus ląsteles  $\alpha$ -syn reikšmingai (80 proc.) sumažėja TGF $\beta$ 3 kiekis. Tai molekulė, kuri sumažina prouždegiminių citokinų ir chemokinų susidarymą. TGF $\beta$ 1 sumažina A $\beta$  plokštelių kiekį AL atveju, skatindamas jų fagocitozę (H.-J. Lee, Kim, ir kt., 2010).

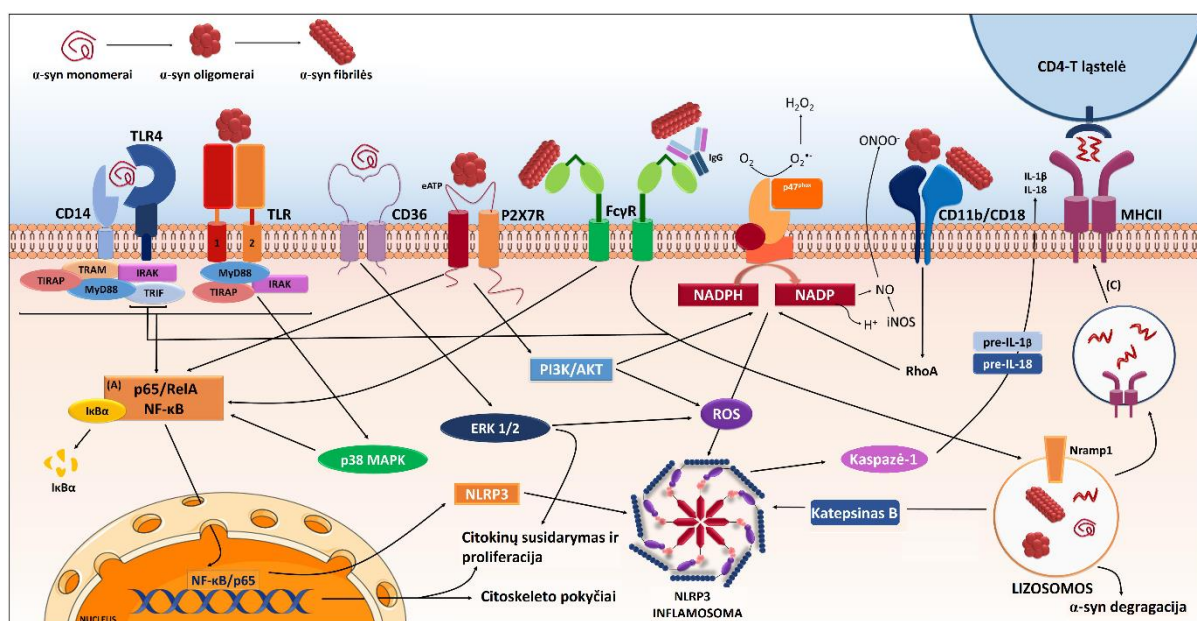
Galimas ir priešingas poveikis, kai mikroglija ir neuroūždegimas skatina  $\alpha$ -syn agregaciją. Nustatyta, kad uždegimo aktyvuota kaspazė – 1 tiesiogiai skaido  $\alpha$ -syn, o likusi baltymo dalis yra labiau linkusi agreguotis ir sukelia toksiškumą PL modeliuose (Wang ir kt., 2016).

Kitos  $\alpha$ -syn sukeltame neuroūždegime dalyvaujančios ląstelės yra astrocitai. Šios ląstelės sudaro 19 – 40 proc. visų glijos ląstelių. Astrocitai yra smegenų-kraujo barjero dalis, kurie atlieka trofinę funkciją neuronams, palaiko užląstelinį jonų ir neurosiuntiklių kiekį (Siracusa ir kt., 2019).



Lygint su neuronais, šiose glijos ląstelėse baltymo raiška yra daug mažesnė. Taigi didžioji dalis  $\alpha$ -syn į astrocitus patenka iš neuronų.  $\alpha$ -syn gali plisti iš neuronų į glijos ląsteles per užląstelinę erdvę arba tiesiogiai iš ląstelės į ląstelę (H.-J. Lee, Suk, ir kt., 2010). Tiek tirpūs baltymo dariniai, tiek fibrilinės formos yra endocituojamos ir kaupiamos astrocitu, bei sukelia ląstelėse uždegiminiuosius procesus, padidėjusią IL raišką ir ADJ susidarymą (Chavarría ir kt., 2018a).

Astrocituose, esant pataloginėms sąlygoms, prasideda procesas, vadinamas astroglioze. Dėl to ląstelėse persitvarko viduląsteliniai filamentai, jos tampa hipertrofinėmis, sekretuoja su uždegimu susijusias molekules, tampa fagocitinėmis. Reaktyvi astrogliozė artimai susijusi su  $\alpha$ -syn PL ir DLB ligų modeliuose. Reaktyvūs astrocитай siejami su  $\alpha$ -syn ir žmonių ligų atvejais. Pirminėse stadijose, kaip ir mikroglijos atveju,  $\alpha$ -syn fagocitozė yra procesas, apsaugantis nuo  $\alpha$ -syn sukeltų pataloginių pokyčių progresavimo. Visgi ilgalaikis  $\alpha$ -syn poveikis sukelia pačių astrocитай mitochondrijų pažeidimus (Y. Kim ir kt., 2019).



### 1.3 pav. $\alpha$ -sinukleino darinių sąveika su mikroglijos receptoriais

TLR – Toll tipo receptoriai; ADJ – aktyvūs deguonies junginiai; CD – diferenciacijos antigenai; P2X7R – purinerginis P2X receptorių 7; FcγR – Fc gama receptorių; PI3K – fosfatidilinozitolio 3 kinazė; AKT – baltymų kinazė B; ERK – užląstelinio signalo reguliuojama kinazė; MAPK – mitogenų aktyvuojama baltymų kinazė; NLRP3 - pirino domeną turinti 3(NLRP3) inflammosoma; NF-κB – branduolio faktorius kapa B; RhoA – ras homologų šeimos narys A; IL – interleukinas; NADP - Nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas. Adaptuota pagal (Ferreira & Romero-Ramos, 2018)

### 1.3 A $\beta$ ir jo toksiškumas

Neurodegeneracinėms ligoms, tokioms kaip AL, yra būdingos A $\beta$  fibrilės ir amiloidinės plokštelės. A $\beta$  peptidai yra proteolitiniai fragmentai, susiformuojantys skylant amiloido pirmtako baltymui (APP).

APP yra transmembraninis baltymas, pasižymintis neurotrofiniu apsauginiu poveikiu, o esant patologijai – neurotoksinis. APP genas yra lokalizuotas 21 chromosomoje, o dėl alternatyvaus splaisingo žmogaus smegenyse susidaro trys pagrindinės jo izoformos: APP770, APP751 ir APP695 (G. Chen ir kt., 2017). Dažniausia neuronų sintetinama yra APP695 izoforma. Baltymas sintetinas ir transportuojamas į plazminę membraną per endoplazminio tinklo (ET) – Goldžio komplekso sekretinį kelią ir kaupiasi sinapsėse. APP skyla dviem keliais: amiloidiniu ir neamiloidiniu.

Neamiloidiniame kelyje APP pirmiausia skaidomas  $\alpha$ -sekretazės, susidarant sAPP $\alpha$  ektodomenui ir plazminėje membranoje likusiam C-galo fragmentui alfa (CTF $\alpha$ ). Pastarasis skaidomas  $\gamma$ -sekretazės. Susidaro užląstelinis peptidas (p3) ir APP viduląstelinis domenas (AICD). APP gali jungtis prie mažo tankio lipoproteinų receptorių (LDLRs) ir būti internalizuojami bei suskaidomi. LDLRs nebuvimas gali nukreipti APP į  $\beta$ -sekretazės, t.y. amiloidinį kelią.

Amiloidiniame kelyje baltymas  $\beta$ -sekretazės 1 (BACE-1) skaidomas į tirpų ektodomeną sAPP $\beta$  ir membranoje likusį CTF $\beta$ . CTF $\beta$  toliau  $\gamma$ -sekretazės į skaidomas į AICDs ir A $\beta$  monomerus. Didžioji dauguma A $\beta$  peptidų yra sekretuojami į užląstelinę erdvę, o mažas kiekis gali likti ir agreguotis neuronuose. AICD transportuojamas į branduolį, kur veikia kaip transkripcijos faktorius.  $\gamma$ -sekretazė skelia CTF $\beta$  skirtingose vietose, dėl to gali susidaryti skirtingo ilgio monomerai A $\beta$ 40 ir A $\beta$ 42. A $\beta$ 40 sudaro apie 90 proc. viso amiloido kiekio (Zhou ir kt., 2018).

Fiziologinė A $\beta$  funkcija nėra pilnai ištyrinėta. Tyrimais, atliktais su žiurkių smegenų žievės ir hipokampo ląstelių kultūromis, nustatyta, kad mažos pikomoliarinės A $\beta$  koncentracijos sekretuojamos į užląstelinę erdvę priklausomai nuo neuronų aktyvumo. Užląstelinio amiloido susidarymo ir skaidymo moduliacija veikia neurosiuntiklių sekreciją, mažindamos sinaptinių pūslelių susidarymą. Taip A $\beta$  apsaugo nuo glutamato sąlygoto toksiškumo (Lazarevic ir kt., 2017). Taip pat galimos A $\beta$  funkcijos fiziologinėmis sąlygomis yra antimikrobinis aktyvumas, dalyvavimas atstatomuosiuose procesuose po smegenų traumos bei jungimasis prie pažeisto kraujo - smegenų barjero, apsaugant CNS nuo patogenų patekimo (Brothers ir kt., 2018).

Yra du modeliai, aiškinantys A $\beta$  fibrilių formavimąsi. Klasikinis modelis teigia, kad tai polimerizacijos procesas, kai monomerai formuoja oligomerus, o šie formuoja protofibriles. Galiausiai protofibrilės suformuoja pilno ilgio skaidulas. Naujasis modelis teigia, kad protofibrilės negali tiesiogiai formuoti fibrilių, o šiam procesui reikalingi pirmtakai (Zhou ir kt., 2018). Didžiausiu toksiškumu pasižymi maži A $\beta$  oligomerai (Sengupta ir kt., 2016). Kadangi amiloidas, APP bei jo skaidymą katalizuojantys fermentai yra lokalizuoti lipidiniuose plaustuose (angl. lipid rafts), jo toksinis poveikis taip pat pasireiškia membranoms. Nustatyta, kad A $\beta$  mažina membranų stabilumą, sąveikaudamas su lipidais bei skatindamas kanalų arba porų susidarymą (Gunn ir kt., 2016). Taip pat A $\beta$  jungiasi prie glutaminerginės sistemos komponentų: NMDA receptorių, metabotropinių mGluR5 receptorių, ląstelių priono baltymo (PrPc). Šie komponentai tarpininkauja amiloido sukeltame LTP slopinime ir LTD stiprinime bei dendritinių spygliukų nykime (Benarroch, 2018). Taip pat pažeisdamas mitochondrijų funkciją amiloidas sukelia oksidacinį ląstelės stresą (Cheignon ir kt., 2018).

#### 1.4 Baltymų ryšys

Nors patologiniai ligų žymenys charakterizuoja ligas, daugeliu demencijos atvejų šie žymenys persidengia: daugiau nei 50 proc. AL atvejų, kuriems būdingos A $\beta$  plokštelės ir neurofibriliniai tinkleliai, kartu nustatoma Lewy kūnelių patologija. Tuo tarpu apie 40 proc. PL ir DLK (demencija su Lewy kūneliais) atvejų nustatomi reikšmingi A $\beta$  ir Tau baltymo darinių kiekiai (Swirski ir kt., 2014). Šioms pacientų subpopuliacijoms, pvz.: sergantiems AL-LKV (angl. Lewy body variant of Alzheimer's disease, AD-LBW) būdingas greitesnis kognityvinių funkcijų blogėjimas ir trumpesnė gyvenimo trukmė, lyginant su įprasta AL forma sergančiais pacientais. Dėl šių agresyvesnių ligų formų pradėta manyti, kad A $\beta$  ir  $\alpha$ -syn sąveikauja ir gali skatinti vienas kito agregaciją (Malek-Ahmadi ir kt., 2019).

Pirmiausia nustatytos šių baltymų oligomerizacijos ir kaupimosi vietos. Manoma, kad baltymai gali sąveikauti tiek užląstelinėje erdvėje, tiek ląstelių viduje. Esant patologinėms sąlygoms membranoje esantys lipidiniai plaustai (angl. lipid rafts) dalyvauja baltymų oligomerizacijoje, įskaitant A $\beta$  ir  $\alpha$ -syn (Mesa-Herrera ir kt., 2019). Tai gali būti viena iš galimų baltymų sąveikos vietų. Taip pat tokiomis sritimis gali būti organelės, tokios kaip mitochondrijos, MVB (angl. multivesicular bodies) ir lizosomos, kur nustatyti abiejų baltymų agregatai (Tsigelny ir kt., 2008). Baltymai gali sąveikauti ir užląstelinėje erdvėje.  $\alpha$ -syn

monomerai ir oligomerai nustatyti tokiuose biologiniuose skysčiuose, kaip kraujo plazma (Vaneyck ir kt., 2021) ir SS (Stav ir kt., 2015).

*In vivo* tyrimais nustatytas sinergistinis A $\beta$  ir  $\alpha$ -syn poveikis, sukeliant sunkesnę ligos eigą. Transgeninėms pelėms, ekspresuojančioms žmogaus APP ir  $\alpha$ -syn, motorikos sutrikimai pasireiškia greičiau, lyginant su tik  $\alpha$ -syn ekspresuojančiomis pelėmis (Masliah ir kt., 2001). Kartu, abu baltymus ekspresuojančioms pelėms pasireiškia stipresni erdvinės atminties, mokymosi deficitai ir reikšmingai padidėjęs Lewy kūnelių kiekis (Hao ir kt., 2018). Taip pat gyvūnų modeliuose ir žmonėse nustatyta, kad APP ir prenilino mutacijos, dėl kurių padidėja A $\beta$  susidarymas, koreliuoja su  $\alpha$ -syn sankauptu didėjimu (Marsh & Blurton-Jones, 2012a).

*In vitro* tyrimais nustatyta, kad abu baltymai turi poveikį vienas kito oligomerizacijai ir toksiškumui. Baltymai formuoja ne tik homo-, bet ir heterooligomeras. Nustatyta, kad net esant mažoms, fiziologinėms sąlygoms būdingoms koncentracijoms, heterooligomerų susidarymas yra dažnesnis, nei tik  $\alpha$ -syn formuojamų homooligomerų (Iljina ir kt., 2018). Siekiant nustatyti A $\beta$  poveikį  $\alpha$ -syn, nustatyta, kad, nors su baltymu sąveikauja abi A $\beta_{1-40}$  ir A $\beta_{1-42}$  formos, oligomerizaciją sukelia tik toksiškesnė A $\beta_{1-42}$ . Taip pat šiai sąveikai svarbi baltymų konformacija.  $\alpha$ -syn monomerai ir oligomerai jungiasi prie A $\beta$  ir slopina jo agregaciją, tačiau fibrilės turi priešingą poveikį (Candrea ir kt., 2020; Chia ir kt., 2017).

Vienas iš galimų baltymų sąveikos būdų yra  $\alpha$ -syn fosforilavimo skatinimas *in vivo* ir *in vitro*. Esant patologijai, pvz.: DLK, iki 90 proc.  $\alpha$ -syn yra fosforilinta ties 129 serinu (pSer-syn), lyginant su 4 proc. sveikose smegenyse (Ma ir kt., 2019). Būtent fosfato grupės prijungimas ties Ser129 skatina fibrilių formavimąsi *in vitro* (Marsh & Blurton-Jones, 2012a). Nustatyta, kad esant AD-LBW, pSer129 koreliuoja su parenchiminiu tirpau ir netirpau A $\beta$  kiekiu (Obi ir kt., 2008).

Abu baltymai sąveikauja sritimis, kurios svarbios ir homooligomerizacijai. Hidrofobiniai A $\beta$  domenai 17-21 AR ir 29-35 AR yra svarbūs formuojant ir stabilizuojant fibriles (Köppen ir kt., 2020a). Panašiai, centrinis hidrofobinis neamiloidinio komponento (NAC) regionas (61-95 AR) yra svarbus  $\alpha$ -syn agregacijai. Nustatyta, kad  $\alpha$ -syn tiesiogiai sąveikauja su A $\beta$  NAC esančiomis G67, G73 ir V74 AR (Jose ir kt., 2014).

## 2. METODIKA

Eksperimentai su ląstelių kultūromis buvo atlikti LSMU Biochemijos laboratorijoje. Eksperimentai su gyvūnais buvo vykdomi remiantis LR bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimais darbu su laboratoriniais gyvūnais B6(1.9)- 855.

Rekombinantinis  $\alpha$ -syn buvo gautas iš dr. Vytauto Smirnovo grupės, VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriaus.

$\alpha$ -syn dydžio charakterizavimas atliktas VU GMC Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriuje, dr. Rima Budvytytė.

### 2.1 $A\beta_{1-42}$ didelių oligomerų paruošimas

1 mg sintetinių  $A\beta_{1-42}$  peptidų ištirpinta 400  $\mu$ l heksafluorizopropanolio (HFIP). Paruoštas tirpalas praskiedžiamas 10 kartų bidistiliuotu vandeniu (25  $\mu$ l tirpalo ir 225  $\mu$ l bidistiliuoto vandens). Sumaišytas tirpalas 20 min inkubuojamas kambario temperatūroje ir 15 min centrifuguojamas 1200 aps./min greičiu. HFIP išgarinamas atidarytą mėgintuvėlį inkubuoiant 4 val. leduose, vėliau 20 val. vandens termostate (16 °C). Po HFIP išgarinimo amiloido tirpalas oligomerizuojamas inkubuoiant 24 val. 20 °C temperatūroje ant maišyklės.

### 2.2. $\alpha$ -syn baltymo paruošimas

Eksperimentai atlikti naudojant rekombinantinį  $\alpha$ -syn baltymą (140 AR), kurio molekulinė masė 14,4 kDa. Gauto baltymo koncentracija nustatyta pagal jo molekulinę masę (14,4 kDa) ir ekstinkcijos koeficientą ( $\epsilon = 5960 \text{ M}^{-1}$ ) su NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, JAV) spektrofotometru. Siekiant gauti skirtingos oligomerizacijos laipsnio agregatus, baltymas ruoštas 7 protokolais.

I protokolas:  $\alpha$ -syn tirpintas PBS buferyje (pH 7,4), 1 mg/ml koncentracija.

II, IV, VI protokolai: 1 mg/ml  $\alpha$ -syn inkubuojamas 24 val., 48 val. ir 7 d. kambario temperatūroje, švelniai maišant ant maišyklės (25 aps./ min.). Po inkubacijos gauti  $\alpha$ -syn dariniai dedami į ląstelių auginimo terpę.

III, V, VII protokolai: 1 mg/ml  $\alpha$ -syn sumaišomas su  $A\beta_{1-42}$  dideliais oligomerais (santykiu  $A\beta_{1-42}:\alpha$ -syn 1:140) ir 24 val., 48val., arba 7 d. ir inkubuojamas kambario temperatūroje, švelniai maišant (25 aps./ min). Po inkubacijos gauti  $\alpha$ -syn dariniai dedami į ląstelių auginimo terpę.

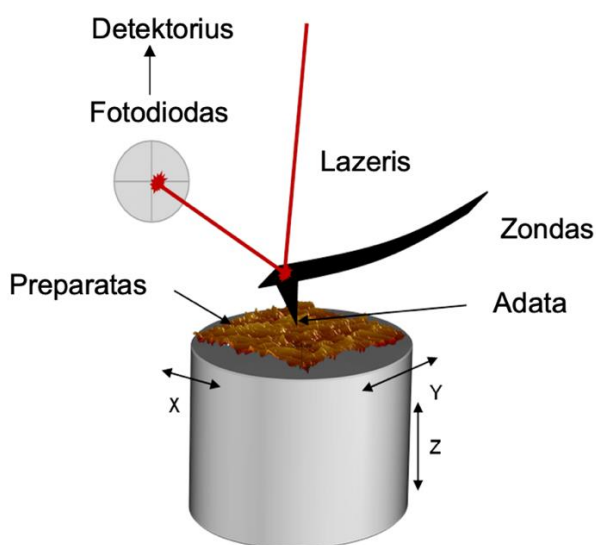
Vertinant skirtingais protokolais paruoštų  $\alpha$ -syn agregatų poveikį ląstelėms, galutinė koncentracija, dedama į ląstelių auginimo terpę, yra 3  $\mu$ M (43  $\mu$ g/ml) ir 9  $\mu$ M (130  $\mu$ g/ml). Agregatų ir fibrilių koncentracija buvo skaičiuojama remiantis monomerinio  $\alpha$ -syn molekulinio dydžiu.

### 2.3 $\alpha$ -syn darinių analizė atominės jėgos mikroskopijos metodu

$\alpha$ -syn analizei naudotas baltymas, paruoštas septyniais 2.2 skyriuje aprašytais metodais, kurio koncentracija mėginyje buvo 50  $\mu$ M. Žėručio plokštelės (2,5 cm. x 2,5 cm) paruošiamos lipinia juostele nuplėšiant viršutinį paviršiaus sluoksnį. Ant plokštelės centro užpilama 20  $\mu$ l paruošto  $\alpha$ -syn tirpalo ir fiksuojama 30  $\mu$ l PBS tirpalo, kuriame yra 0,5 proc. glutaraldehido. Mėginys inkubuojamas 5 min., po to nuplaunamas 100  $\mu$ l PBS tirpalu ir išdžiovinamas pučiant vidutinę azoto dujų srovę.

$\alpha$ -syn agregatai charakterizuoti atominės jėgos mikroskopu (AJM) Dimension Icon (Bruker, JAV). Analizė atlikta kambario temperatūroje pasirinkus “tapšnojimo” režimą (angl. Tapping mode). Naudota EFM-20 (PtIr) (NanoWorld, Šveicarija) adata ( $f_0 = 75$  kHz;  $k = 2,8$  N/m). Adatos storis 3  $\mu$ m, ilgis 225  $\mu$ m ir plotis 28  $\mu$ m. Prieš matavimus atlikta rezonansinio dažnio kalibracija.

Parametrų keitimui naudota Nanoscope programinė įranga. Nuotraukos gautos skenuojant 3  $\mu$ m x 3  $\mu$ m plotą 0,557 Hz skenavimo greičiu, esant 1024 x 1024 pikselių skiriamajai gebai. Jų redagavimui naudota WSxM 4.0 Beta 9.1, o analizei Nanoscope analysis programinė įranga.



**2.1 pav.** Atominės jėgos mikroskopo veikimo schema

Adaptuota pagal: <https://www.tescan-analytics.com/en-us/analyse-de-surface/techniques/afm>

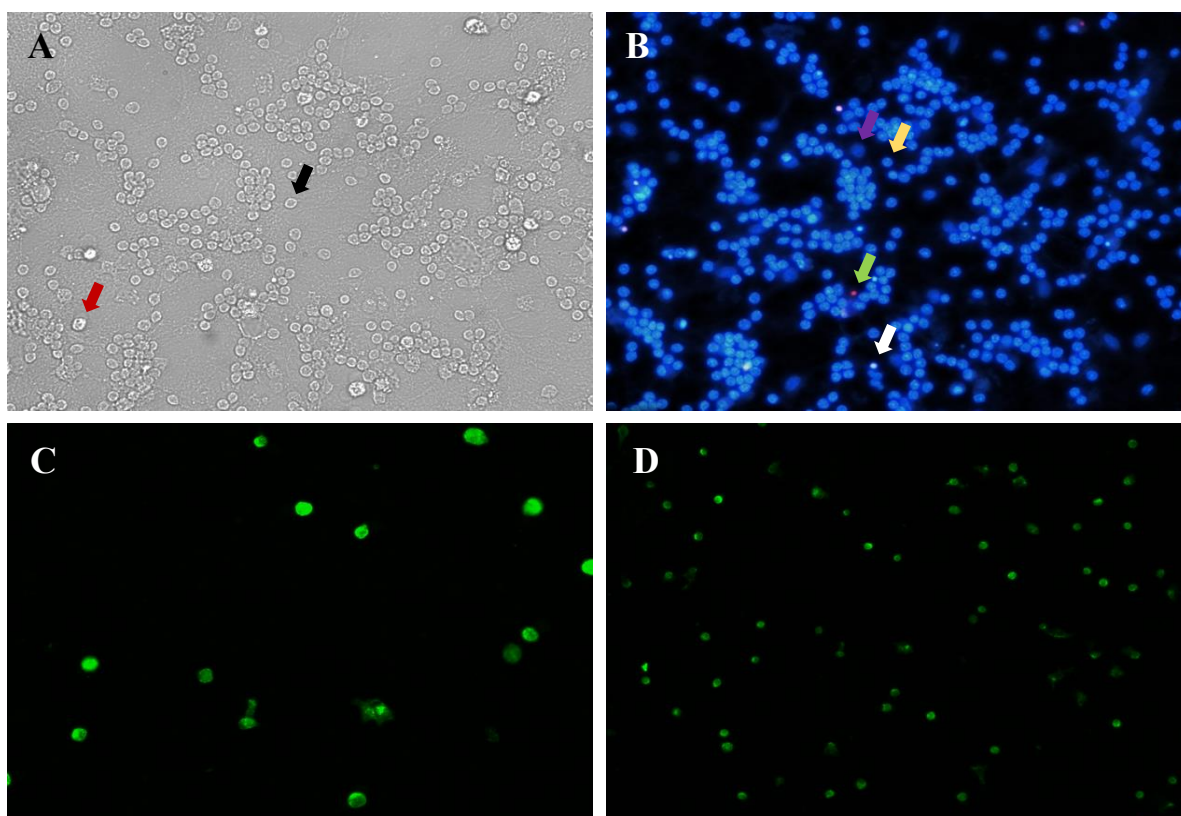
## 2.4 Pirminės žiurkių smegenėlių neuronų – glijos ląstelių kultūros paruošimas

Smegenėlių kultūra gaunama iš 5-7 dienų Wistar linijos žiurkių jauniklių. Ląstelių kultūros paruošimui naudojamos 3-4 gyvūnų smegenis. Smegenėlių ląstelių išskyrimas atliekamas steriliomis sąlygomis laminaro srauto spintoje (HERASAFE KS, Vokietija), naudojant sterilius įrankius ir per 0,22 µm filtrą (Merck Millipore, JAV) filtruotus tirpalus. Išpreparuotos smegenys patalpinamos į Petri lėkštelę su 4°C PBS tirpalu, papildytu 13 mM gliukozės ir 100 IU/ml – 100 µg/ml penicilino – streptomicino tirpalu. Smegenėlės yra atskiriamos nuo smegenų pusrutulio ir perkeliama į kitą Petri lėkštelę, kur nuo jų pašalinus kraujagyslės. Padalintos į tris dalis smegenėlės perkeliama į 15 ml mėgintuvėlį su 6-8 ml Verseno tirpalu (1:5000) ir 5 min. inkubuojamos (37°C) ląstelių auginimo inkubatoriuje (Thermo Scientific, JAV), kas minutę švelniai pavartant. Audiniui ardyti naudojamos 3 skirtingų skersmenų Pastero pipetės, pradedant nuo didžiausią skersmenį turinčios. Tirpalas Pastero pipete 8-10 kartų trituruojamas, triturasas perpilamas į 50 ml mėgintuvėlį su 5 ml DMEM GlutaMAX ląstelių auginimo terpė, papildyta 5 proc. veršelio serumo, 5 proc. arklio serumo, 13 mM gliukozės, 25 mM KCl ir 100 IU/ml – 100 µg/ml penicilino – streptomicino tirpalu. Procesas kartojamas, kol audinys suardomas ir visos smegenėlių dalys praeina pro mažiausią Pastero pipetės spindį. Visas tirpalas supilamas į 50 ml mėgintuvėlį ir centrifuguojamas (Eppendorf 5810R, Kanada) 270 x g, 5min. kambario temperatūroje. Supernatantas nupilamas, o ląstelių nuosėdos suspenduojamos 5 ml šviežios auginimo terpės. Ląstelių suspensija filtruojama per 40 µm filtrą (Falcon, JAV). Ląstelių gyvybingumas ir tankis vertinami 0,4 proc. tripano mėlio dažais naudojant hemocitometro kamerą (Marienfeld, Vokietija) ir šviesinį mikroskopą (Olympus CKX41, Japonija). Dažymo metu žuvusios ląstelės nusidažo tamsiai mėlyna spalva, o gyvybingos lieka baltos. Ląstelės užsėjamos į poli-L-lizino (0,0001 proc.) padengtas 24 šulinėlių lėkštelės, 1 mln./ 1 ml – 500 µl tankiu. Smegenėlių kultūra 7-8 d. auginama inkubatoriuje, kuriame yra palaikoma 37°C temperatūra bei 5 proc. CO<sub>2</sub> ir 21 proc. O<sub>2</sub> dujų koncentracija.

## 2.5 Ląstelių gyvybingumo ir tankio vertinimas fluorescencinio mikroskopavimo metodu

Ląstelių gyvybingumo ir tankio vertinimas atliekamas fluorescenciniu mikroskopu (OLYMPUS IX71S1F-3, Japonija) naudojant 7 µM propidžio jodido (PJ) ir 4 µg/ml Hoechst 33342 dažus. Ląstelių auginimo terpę papildžius išvardytais dažais, lėkštelė 15 min.

inkubuojama tamsoje, 37°C. Hoechst 33342 nudažo ląstelių branduolius mėlyna spalva: ląstelės su homogeniškai nusidažiusiais branduoliais yra vertinamos kaip gyvybingos, o ląstelės, kurių branduoliai yra kondensuoti arba fragmentuoti – kaip apoptozinės. Astroцитai identifikuojami pagal jiems būdingą morfologiją. PJ raudonai nudažo tik tas ląsteles, kurių plazminė membrana yra pažeista, todėl tokios ląstelės yra vertinamos kaip nekrozinės. Neuronai šviesinės mikroskopijos nuotraukose identifikuojami pagal jiems būdingą morfologiją. Mikroglijos ląstelėms vizualizuoti naudojamas žaliai fluorescuojantis izolektino B4 ir AlexaFluor488 konjugatas (7 ng/ml). Neuronų gyvybingumas, tankis bei neuronų ir glijos ląstelių procentinė sudėtis vertinami naudojant 20x objektyvą (gaunamas 500 kartų padidintas vaizdas), o mikroglijos ląstelių skaičiaus pokyčiai naudojant 10x objektyvą (250 kartų padidintas vaizdas).



**2.5 pav.** Pavyzdinės smegenėlių neuronų-glijos kultūros nuotraukos  
A – šviesinė (fazių kontrasto) nuotrauka (juoda rodykle pažymėtas neuronas, raudona rodykle - mikroglija); B – fluorescencinė nuotrauka, ląsteles nudažius PJ ir Hoechst 33342 dažais (geltona rodykle pažymėtas gyvybingas neuronas; balta rodykle – apoptozinė ląstelė; žalia rodykle – nekrozinė ląstelė; violetine rodykle - astroцитas); C ir D - fluorescencinės nuotraukos, gautos mikroglijos ląsteles nudažius izolektino B4 - AlexaFluor 488 konjugatu, 20x ir 10x padidinimas atitinkamai



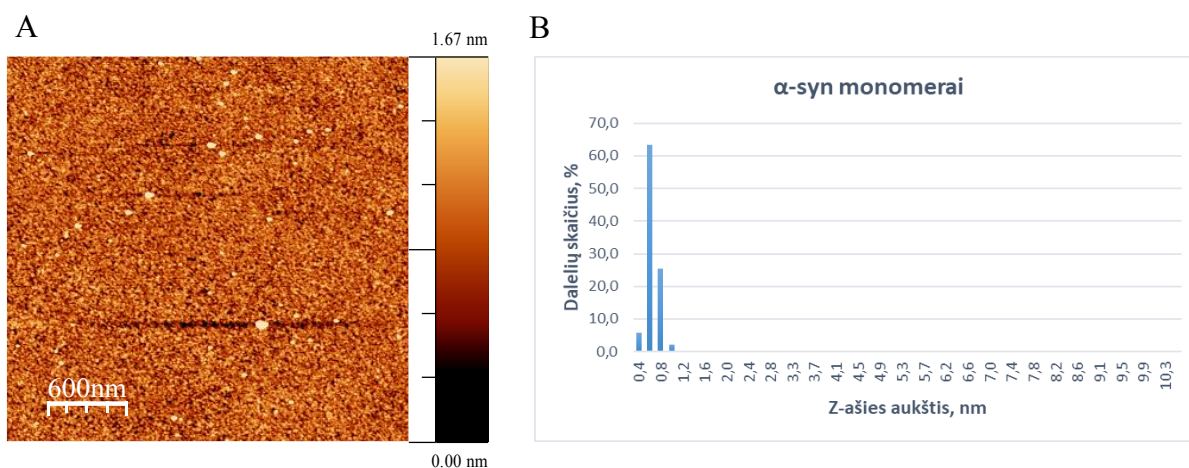
## 2.6 Statistinė analizė

Rezultatų vizualizavimui ir statistinei analizei naudojama SigmaPlot 14.0 (Systat Software Inc, Anglija) programa. Rezultatų statistiniam patikimumui įvertinti taikomas One-way ANOVA, Fisher LSD testas. Rezultatai yra patikimi, jei  $p \leq 0,05$ . Grafikuose pateikti rezultatų vidurkiai su standartine paklaida ( $\bar{x} \pm SE$ ).

### 3. REZULTATAI

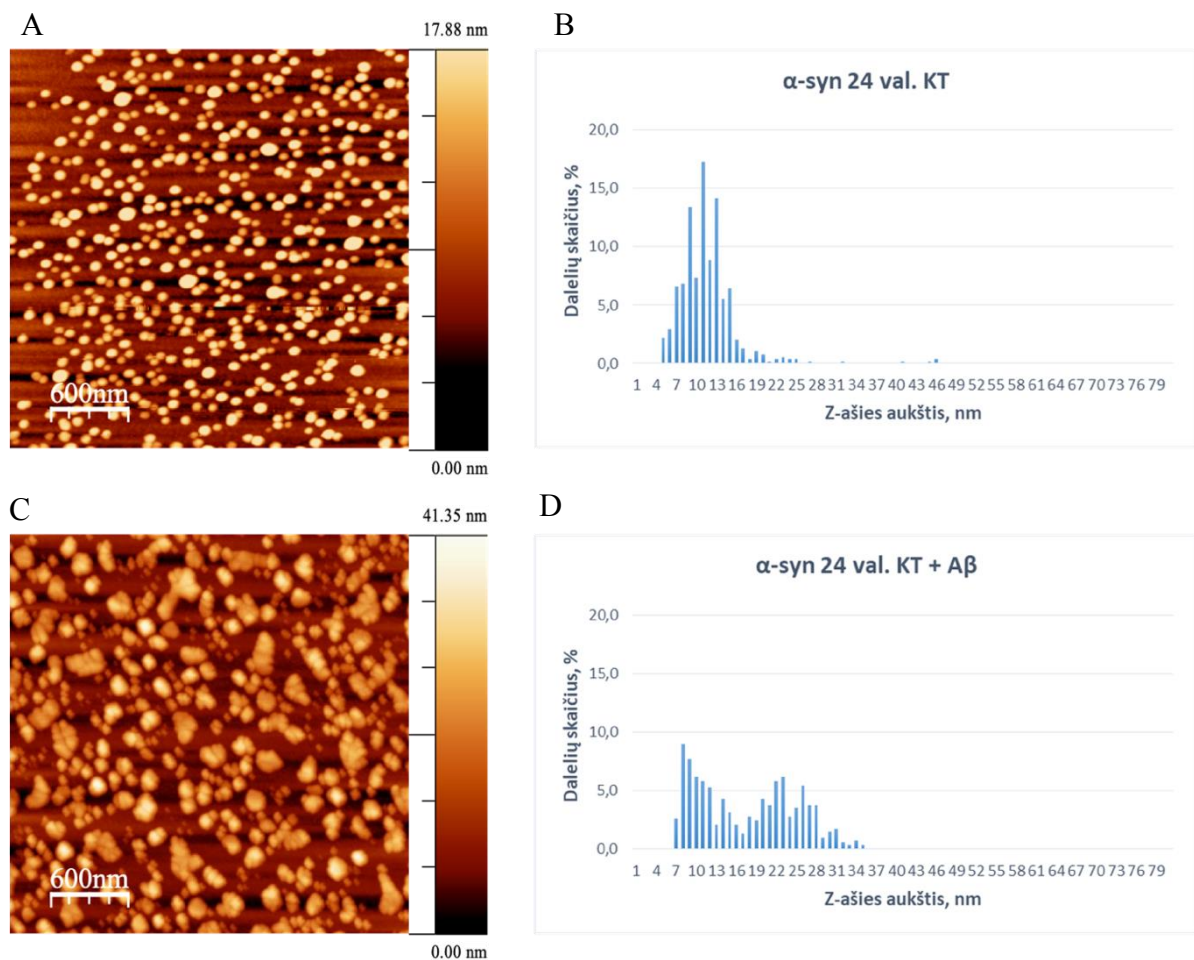
#### 3.1. $\alpha$ -syn darinių dydžio tyrimas

Pirmame darbo etape siekėme parengti  $\alpha$ -syn oligomerizacijos protokolus ir nustatyti  $\alpha$ -syn agregatų dydį. Bandymams naudotas rekombinantinis  $\alpha$ -syn baltymas (teorinis molekulinis dydis 14,4 kDa), paruoštas naudojant septynis protokolus. Taikant I protokolą, liofilizuotas rekombinantinis  $\alpha$ -syn baltymas buvos ištirpinamas PBS tirpale ir iškart naudojamas tyrimams arba užšaldomas. Tokiu būdu paruoštas  $\alpha$ -syn buvo laikomas monomeriniu. Norint sukelti  $\alpha$ -syn baltymo agregaciją, PBS tirpintas  $\alpha$ -syn buvo inkubuotas 24 val. (II protokolas), 48 val. (IV protokolas) ir 7 d. (VI protokolas) KT arba papildomai pridedant agregacijos induktoriaus – didelių  $A\beta_{1-42}$  oligomerų 140:1 ( $\alpha$ -syn:  $A\beta_{1-42}$ ) santykiu (III, V ir VII paruošimo protokolai atitinkamai).  $\alpha$ -syn dydžio matavimai pagal z-ašį atlikti atominės jėgos mikroskopu Dimension Icon (Bruker, JAV).



**3.1. pav.** Monomerinio (I paruošimo protokolas)  $\alpha$ -syn dydžio nustatymo rezultatai  
A – pavyzdinė atominės jėgos mikroskopijos nuotrauka; B – pagal z-ašį įvertintas  $\alpha$ -syn dalelių dydžio pasiskirstymas

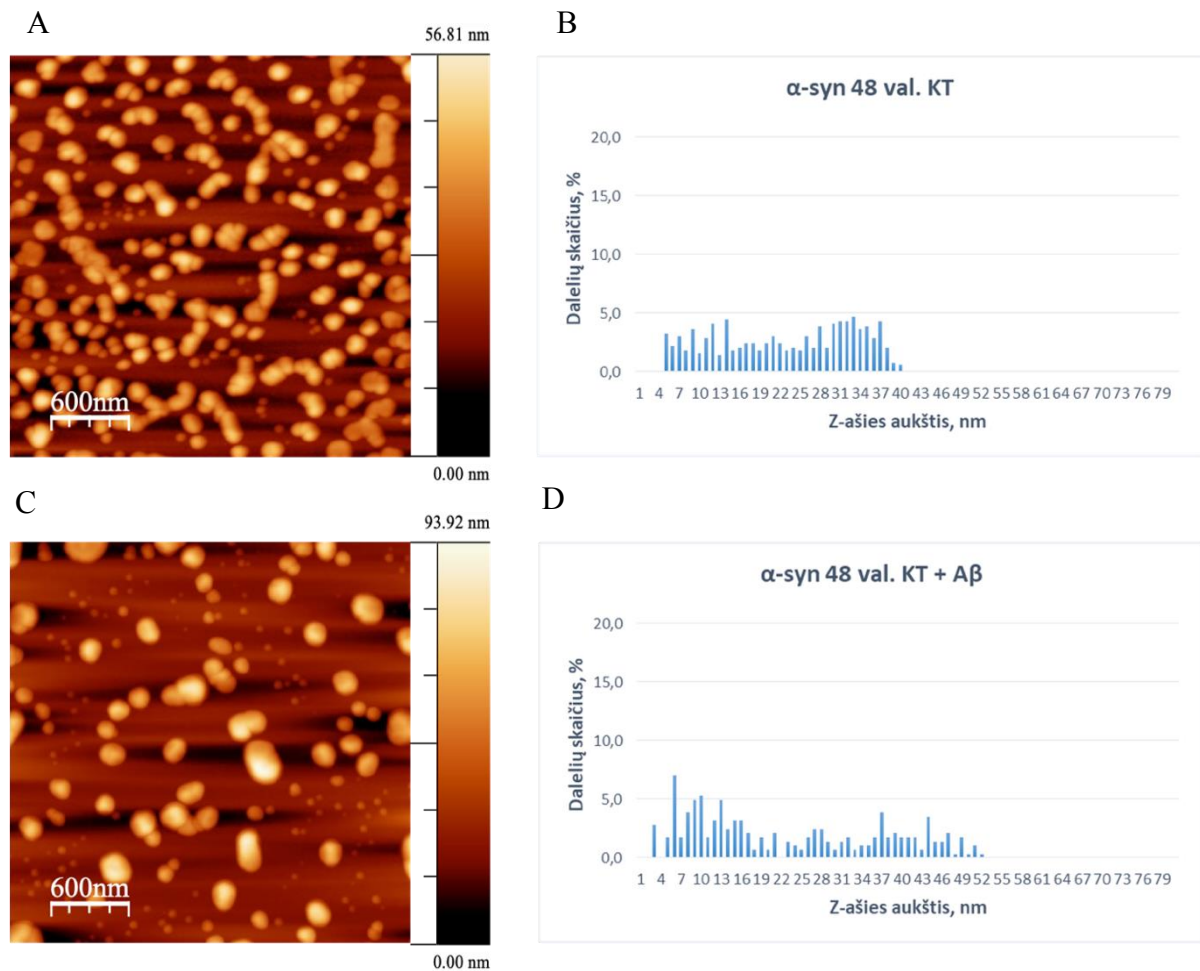
Iš gautų rezultatų matyti (3.1 pav. A ir B), kad monomerinio  $\alpha$ -syn (I paruošimo protokolas) pagal z ašį įvertintas dydis yra 0,4-1 nm. Didžiąją dalį (63,5 proc.) frakcijos sudaro 0,6 nm dydžio dalelės.



**3.2 pav.**  $\alpha$ -syn darinių (II ir III paruošimo protokolai) dydžio nustatymo rezultatai  
 A ir C – pavyzdinės atominės jėgos mikroskopijos nuotraukos; B ir D – pagal z-ašį įvertintas  $\alpha$ -syn dalelių dydis

Vertinant  $\alpha$ -syn darinių dydį po 24 val. inkubacijos KT (II paruošimo protokolais), nustatyta, kad po savaiminės agregacijos 90 proc. frakcijos sudaro nuo 5 iki 17 nm dydžio sferiniai dariniai (3.2 pav. A ir B). Iš 3.2 pav. B taip pat matyti, kad 9 nm, 11 nm ir 13 nm dydžio dariniai sudaro 13,4 proc., 17,3 proc. ir 14,2 proc. visos frakcijos. Kitų dalelių kiekis frakcijoje yra maždaug po 1-7 proc.

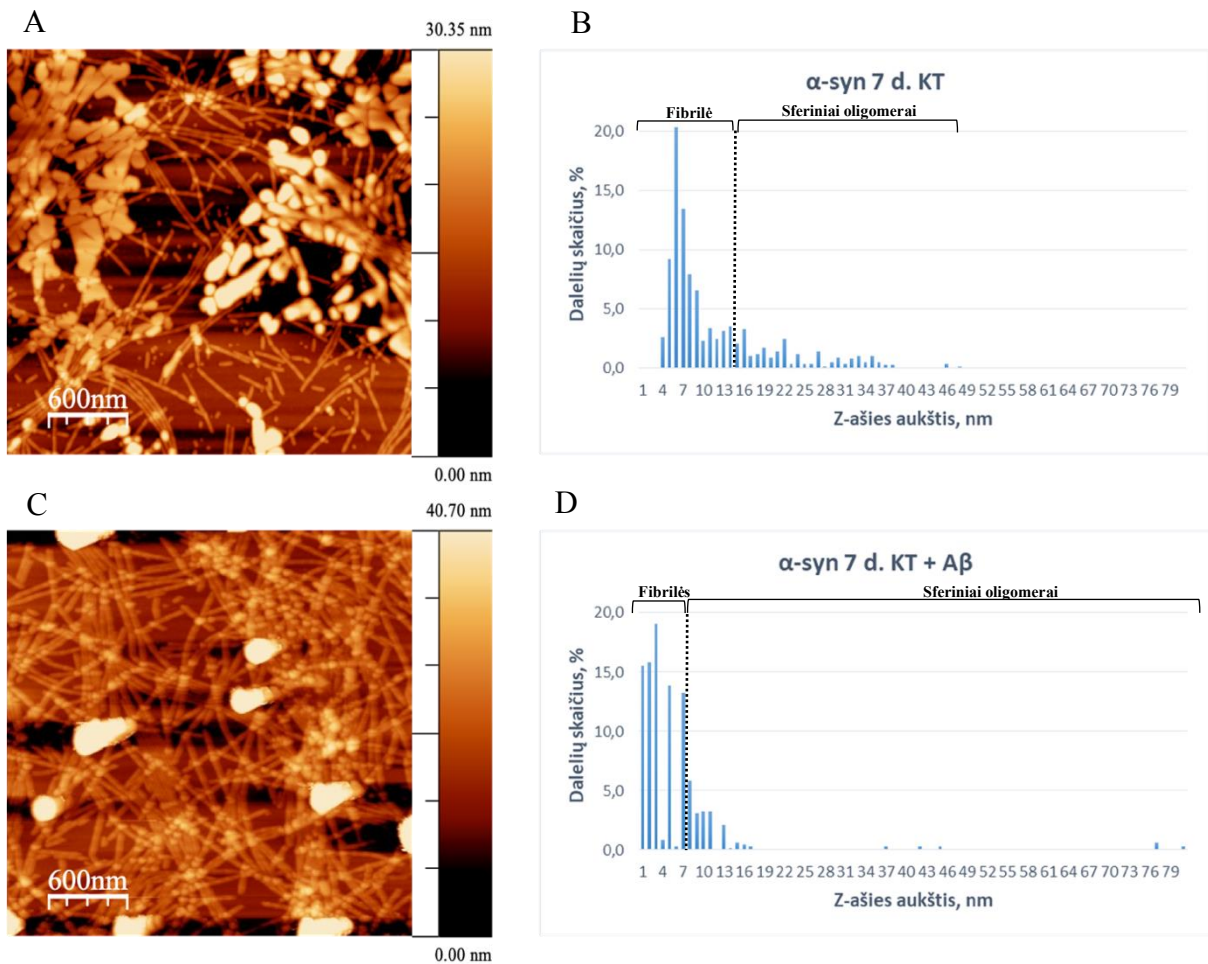
Taip pat nustatyta (3.2 pav. C ir D), kad po 24 val. inkubacijos KT su agregacijos induktoriais -  $A\beta_{1-42}$  oligomerais (III protokolas) -  $\alpha$ -syn darinių frakciją sudaro 7-35 nm dydžio oligomerai. Lyginant su 24 val. inkubacijos KT be  $A\beta_{1-42}$  oligomerų protokolu (II), matyti, kad susidaro didesni oligomerai, kurių dydis yra iki 35 nm. Taip pat šiam  $\alpha$ -syn paruošimo protokolui yra būdingas labiau tolygus dalelių pasiskirstymas pagal dydį: visų dalelių procentinis pasiskirstymas yra apie 2-8 proc.



### 3.3 pav. $\alpha$ -syn darinių (IV ir V protokolai) dydžio nustatymo rezultatai

A ir C – pavyzdinės atominės jėgos mikroskopijos nuotraukos; B ir D – pagal z-ašį įvertintas  $\alpha$ -syn dalelių dydis

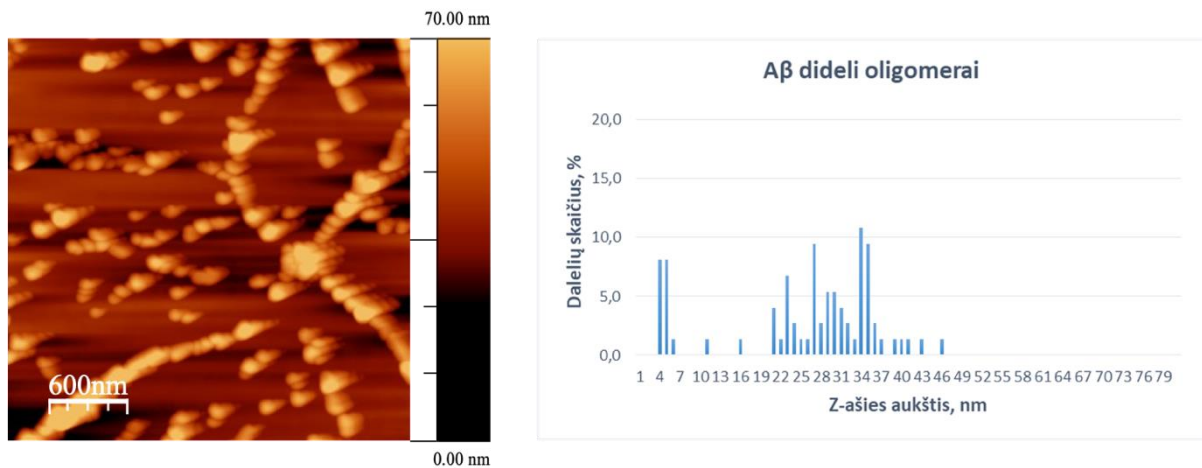
Vertinant  $\alpha$ -syn darinių dydį po 48 val. inkubacijos KT (IV paruošimo protokolas) (3.3 pav. A ir B), nustatyta, kad taikant šį protokolą susidaro 5-40 nm oligomerai. Visi  $\alpha$ -syn dariniai procentiškai sudaro maždaug po 3-5 proc. visos frakcijos. Taikant tą patį protokolą, bet pridėjus A $\beta_{1-42}$  oligomerų (V protokolas) (3.3 pav. C ir D), nustatyta, kad šiuo atveju susidaro 3-52 nm oligomerai, kurių procentinis pasiskirstymas frakcijoje yra maždaug po 2-7 proc. Gauti rezultatai rodo, kad A $\beta_{1-42}$  oligomerai po 48 val. inkubacijos sukelia didesnių oligomerų susidarymą.



### 3.4 pav. $\alpha$ -syn darinių (VI ir VII protokolai) dydžio nustatymo rezultatai

A ir C – pavyzdinės atominės jėgos mikroskopijos nuotraukos; B ir D – pagal z-ašį įvertintas  $\alpha$ -syn dalelių dydis

Vertinant  $\alpha$ -syn darinių dydį po 7d. inkubacijos KT (VI protokolai), nustatyta, kad susidaro sferiniai oligomerai ir fibrilės (3.4 pav. A ir B). Fibrilių dydis pagal z ašį yra – 5-15 nm, o sferinių oligomerų – 16-37 nm. Monomerinį  $\alpha$ -syn 7d. inkubuoiant su A $\beta_{1-42}$  oligomerais (VII protokolai) susidaro sferiniai oligomerai ir fibrilės, kurių dydis pagal z ašį yra 37-81 nm ir 2-7 nm atitinkamai (3.4 pav. C ir D). Gauti rezultatai rodo, kad po 7d. inkubacijos su A $\beta_{1-42}$  oligomerais susidaro didesni sferiniai oligomerai, tačiau fibrilių dydis pagal z-ašį atvirkščiai – mažesnis.



**3.5 pav.** Aβ<sub>1-42</sub> oligomerų dydžio nustatymo rezultatai

A – pavyzdinė atominės jėgos mikroskopijos nuotrauka; B – pagal z-ašį įvertintas Aβ<sub>1-42</sub> oligomerų dydžio pasiskirstymas

Nustatant α-syn darinių dydį taip pat buvo atlikti kontroliniai eksperimentai, kuriais buvo siekiama įvertinti Aβ<sub>1-42</sub> oligomerų dydį. Nustatyta, kad Aβ<sub>1-42</sub> oligomerų dydis pagal z-ašį yra 2-46 nm (3.5 pav.). Tačiau Aβ<sub>1-42</sub> oligomerai buvo pridedami 1:140 santykiu (Aβ:α-syn), todėl reikšmingos įtakos rezultatų vertinimui jie neturi.



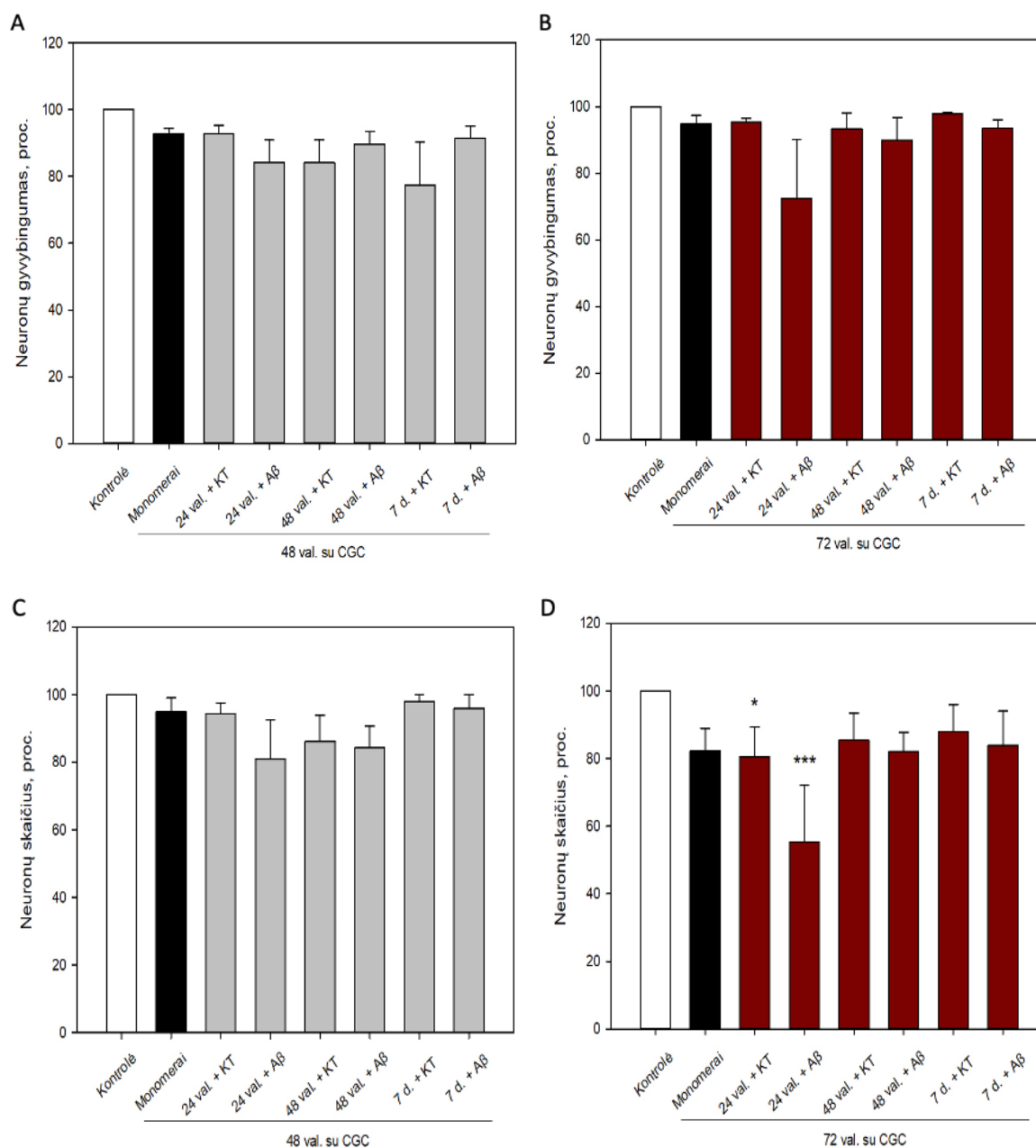
### 3.2. Skirtingo oligomerizacijos laipsnio $\alpha$ -syn darinių poveikio smegenų ląstelėms vertinimas

Patologinėmis sąlygomis tirpus  $\alpha$ -syn baltymas formuoja oligomerus, kurie agreguojasi į netirpias fibriles ir sudaro Lewy kūnelius (Meade ir kt., 2019). Šiuo metu nėra tiksliai žinoma, kokio oligomerizacijos laipsnio  $\alpha$ -syn yra toksiškas smegenų ląstelėms bei nėra nustatyta, ar glijos ląstelės dalyvauja  $\alpha$ -syn sukeltame neurotoksiškume (Ferreira & Romero-Ramos, 2018; Ingelsson, 2016b). Siekiant nustatyti, kokie agregatai yra toksiškiausi ląstelėms ir ar  $A\beta_{1-42}$  turi įtakos  $\alpha$ -syn toksiškumui, eksperimentų metu naudotos žiurkių smegenėlių mišrios kultūros, kuriose neuronų skaičius sudarė  $83 \pm 2$  proc., mikroglijos ląstelės sudarė  $7 \pm 1$  proc. ir astroцитai  $10 \pm 1$  proc. visų ląstelių skaičiaus. Jos buvo veikiamos monomerais ir 7 protokolais paruoštais  $\alpha$ -syn dariniais, kurių dydžio nustatymo rezultatai yra pateikti 3.1.

Vertinant  $\alpha$ -syn neurotoksinį poveikį, smegenų ląstelių kultūros buvo 48 val. inkubuojamos su  $3 \mu\text{M}$   $\alpha$ -syn dariniais. Iš gautų rezultatų matyti, kad  $\alpha$ -syn, nepriklausomai nuo dydžio ir paruošimo būdo, neturėjo poveikio neuronų gyvybingumui (3.6 pav. A) ir skaičiui (3.6 pav. C), lyginant su kontroline grupe (100 proc.): po inkubacijos su 0,4-1 nm monomerais, 5-81 oligomerais ir 2-15 nm fibrilėmis, gyvybingumas išliko didesnis nei 77 proc., o neuronų skaičius didesnis nei 81 proc.

Yra žinoma, kad neurodegeneracinių ligų patogenezėje dalyvaujančių baltymų neurotoksinis poveikis gali priklausyti nuo inkubacijos laiko (Y. J. Choi ir kt., 2013), todėl toliau vertinome  $\alpha$ -syn darinių poveikį ląstelių kultūroms po ilgesnės, 72 val. inkubacijos. Gauti rezultatai rodo, kad monomerinis  $\alpha$ -syn, kurio dydis pagal z-ašį buvo 0,4-1 nm, po 72 val. inkubacijos su mišriomis ląstelių kultūromis neturėjo poveikio neuronų gyvybingumui (3.6 pav. B) ir skaičiui (3.6 pav. D), kurie sudarė  $95 \pm 2,4$  proc. ir  $82,4 \pm 6,6$  proc. atitinkamai. Po ląstelių kultūrų inkubacijos su 5-17 nm dydžio  $\alpha$ -syn oligomerais, gautais monomerinį  $\alpha$ -syn inkubuojant 24 val. KT, buvo stebimas bendro neuronų skaičiaus nykimas iki  $80,6 \pm 8,8$  proc., jų gyvybingumui nekintant ( $95,4 \pm 1,2$  proc.). Kai ląstelių kultūros buvo inkubuojamos su  $\alpha$ -syn oligomerais (7-35 nm), gautais po 24 val. KT, bet su agregacijos induktoriumi -  $A\beta_{1-42}$  oligomerais, bendras neuronų skaičius sumažėjo iki  $55,4 \pm 16,7$  proc. bei buvo stebima neuronų gyvybingumo mažėjimo tendencija ( $72,4 \pm 17,8$  proc.), tačiau statistinio patikimumo nebuvo gauta. Vertinant didesnių 5-40 nm  $\alpha$ -syn oligomerų, kurie buvo gauti po 48 val. inkubacijos KT, arba 3-52 nm po inkubacijos su  $A\beta_{1-42}$  oligomerais, poveikį, nustatyta, kad tokio dydžio dariniai neturi poveikio neuronų gyvybingumui ( $93,3 \pm 4,8$  proc. ir  $90 \pm 6,7$  proc. atitinkamai) bei skaičiui ( $85,5 \pm 7,9$  proc. ir  $82 \pm 5,8$  proc. atitinkamai). Neuronų

gyvybingumas ir skaičius taip pat liko nepakitęs, kai neuronų – glijos kultūra buvo inkubuota su 5-15 nm fibrilėmis ir 16-37 nm oligomerais, gautais po 7 d. inkubacijos KT ir su 2-7 nm fibrilėmis ir 37-81 nm oligomerais, gautais po inkubacijos su A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomerais.



**3.6 pav.**  $\alpha$ -syn darinių (3  $\mu$ M) poveikis neuronų skaičiui ir gyvybingumui mišriose neuronų – glijos kultūrose

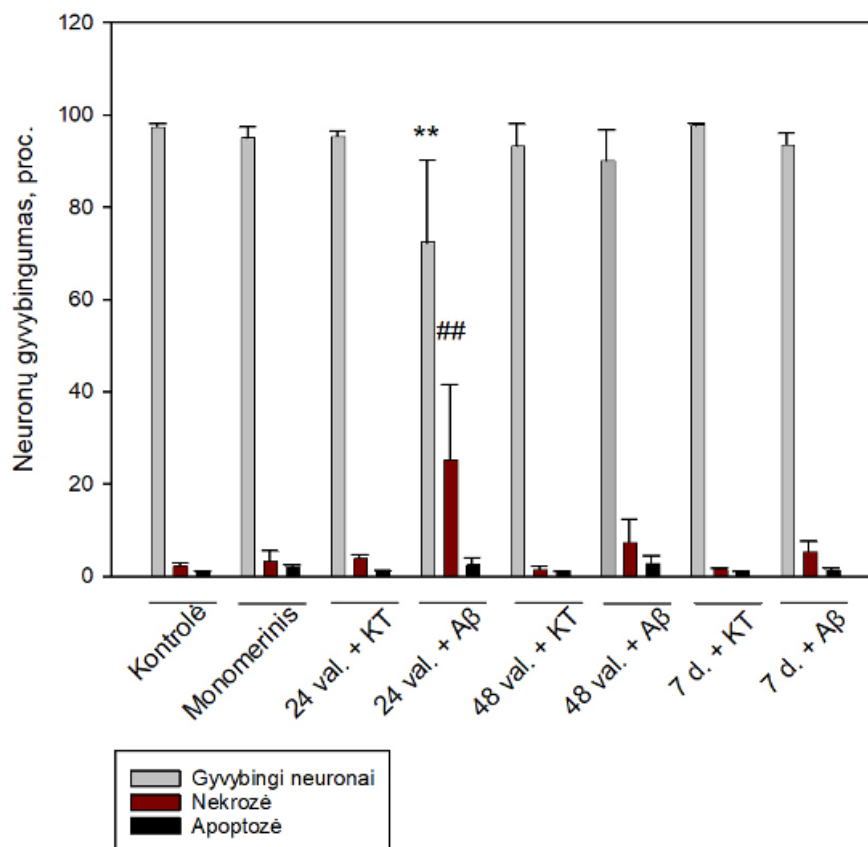
A – neuronų gyvybingumas po 48 val.; B – neuronų gyvybingumas po 72 val.; C – neuronų skaičius po 48 val.; D – neuronų skaičius po 72 val.

\* -  $p < 0,05$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ .  $\bar{x} \pm SE$ ,  $n = 6-7$

Vertinant ląstelių žūties tipą (3.7 pav.) nustatyta, kad kontrolinėje ląstelių kultūroje yra  $97,4 \pm 0,8$  proc. gyvybingų,  $2,1 \pm 0,6$  proc. nekrozinių ir  $0,9 \pm 0,3$  proc. apoptozinių neuronų. Po CGC 72 val. inkubacijos su 3  $\mu$ M  $\alpha$ -syn monomerais (I paruošimo protokolas) ir II, IV-



VII protokolais paruoštais oligomerais bei fibrilėmis gyvybingų ir žuvusių – nekrozinų ir apoptozinių – ląstelių skaičius liko nepakitęs, lyginant su kontroline grupe. Iš grafiko matyti, kad statistiškai reikšmingą poveikį gyvybingų ir nekrozinų ląstelių skaičiui turėjo 7-35 nm aukščio dariniai, susidarę po 24 val. inkubacijos su agregacijos induktoriumi A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Šioje grupėje gyvybingų neuronų skaičius sumažėjo iki 72,4  $\pm$  17,8 proc., o nekrozinų ląstelių skaičius padidėjo iki 25,2  $\pm$  16,2 proc.



**3.7 pav.**  $\alpha$ -syn darinių (3  $\mu$ M) sukeltas neuronų žūtis būdas po 72 val. su CGC  
 \* - patikimumas, lyginant gyvybingumą; \*\* -  $p < 0,01$ ;  
 # - patikimumas, lyginant nekrozę; ## -  $p < 0,01$ .  $\bar{x} \pm SE$ ,  $n = 6-7$

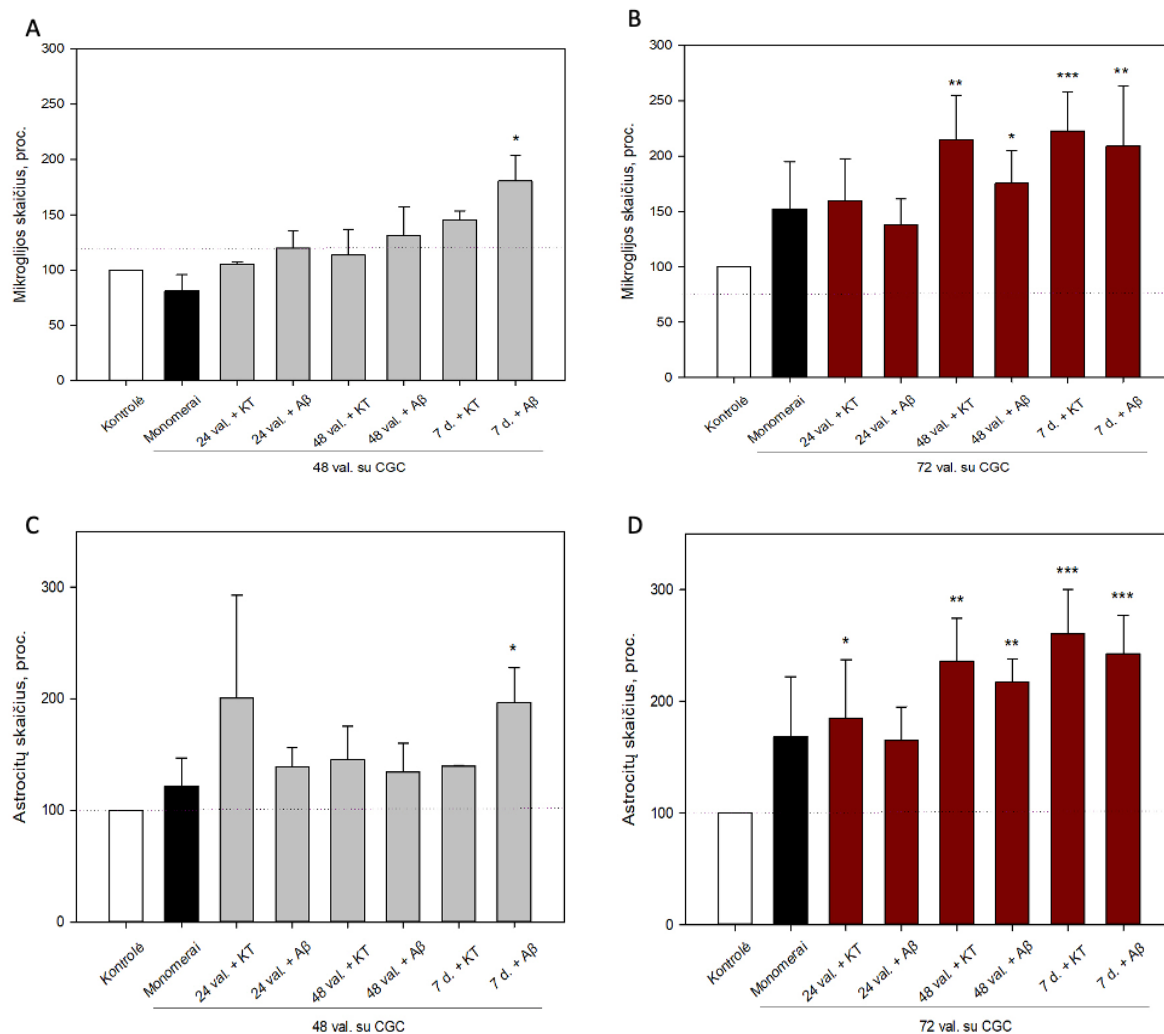
Yra žinoma, kad  $\alpha$ -syn sukelia neurouždegimą ir jo neurotoksinis poveikis pasireiškia netiesiogiai, aktyvinant mikroglijos ląsteles ir astrocitus (Kam ir kt., 2020). Todėl toliau vertinome glijos ląstelių skaičių mišrioje ląstelių kultūroje.

Po 48 val.  $\alpha$ -syn monomerų, oligomerų (24 val. KT  $\pm$  A $\beta$ ; 48 val. KT  $\pm$  A $\beta$ ) bei sferinių oligomerų (7d. KT) inkubacijos su CGC mikroglijos skaičiaus pokyčio nebuvo nustatyta. Statistiškai reikšmingas mikroglijos ląstelių skaičiaus padidėjimas iki 180,7  $\pm$  23,5 proc. nustatytas ląstelių kultūrą veikiant 37-81 nm agregatais ir 2-7 nm fibrilėmis, gautais po 7 d.  $\alpha$ -syn inkubacijos su dideliais A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomerais (3.8 pav A).

Vertinant poveikį astroцитų skaičiui (3.8 pav. C), buvo nustatytas panašus  $\alpha$ -syn darinių poveikis, kaip ir mikroglijos atveju. CGC ląstelių kultūras 48 val. veikiant 3  $\mu$ M  $\alpha$ -syn monomerais, oligomerais (24 val. KT  $\pm$  A $\beta$ ; 48 val. KT  $\pm$  A $\beta$ ) bei sferiniais oligomerais ir fibrilėmis (7d. KT), statistiškai patikimo astroцитų skaičiaus sumažėjimo arba padidėjimo nenustatyta. Tačiau po 7 d. inkubacijos KT su A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomerais susidariusios  $\alpha$ -syn 2-7 nm fibrilės ir 37-81 nm oligomerai sukėlė reikšmingą ląstelių skaičiaus padidėjimą iki 197  $\pm$  31,1 proc.

Toliau vertintas  $\alpha$ -syn darinių poveikis glijos ląstelių skaičiui po 72 val. inkubacijos. Nustatyta, kad  $\alpha$ -syn monomerais ir 5-17 nm bei 7-35 nm aukščio agregatai, gauti po 24 val. KT be ir su A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomerais neturėjo poveikio mikroglijos skaičiui (3.8 pav. B). Statistiškai reikšmingas mikroglijos ląstelių skaičiaus didėjimas nustatytas po CGC inkubacijos su 5-40 nm ir 3-52 nm dariniais, susidariusiais po 48 val. KT ir su A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomerais (iki 215  $\pm$  39,9 proc. ir 175,5  $\pm$  29,9 proc. atitinkamai). Reikšmingą ląstelių proliferaciją sukelia ir 5-15 nm fibrilės bei 16-37 nm oligomerai, susidarę po 7d. inkubacijos KT (iki 222,5  $\pm$  35,5 proc.), bei 2-7 nm fibrilės ir 37-81 nm oligomerai, susidarę po tos pačios trukmės inkubacijos su A $\beta$ <sub>1-42</sub> (iki 209,3  $\pm$  54,5 proc.).

Stipresnis  $\alpha$ -syn poveikis, esant 72 val. inkubacijai, nustatytas ir astroцитų proliferacijai (3.8 pav. D). Poveikio astroцитų skaičiui neturėjo tik 0,4-1 nm monomerais ir 7-35 nm dydžio oligomerai, susidarę po 24 val. inkubacijos su A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomerais. Statistiškai reikšmingas ląstelių skaičiaus pokytis iki 185,2  $\pm$  52 proc. nustatytas po inkubacijos su 5-17 nm dydžio oligomerais, susidariusiais po 24 val. inkubacijos KT. Didesni 5-40 nm ir 3-52 nm dariniai, susidarę po 48 val. inkubacijos atitinkamai be ir su A $\beta$ <sub>1-42</sub>, sukėlė statistiškai reikšmingą ląstelių proliferaciją (iki 235,8  $\pm$  38,5 proc. ir 217,3  $\pm$  20,5 proc.). Panašiu poveikiu pasižymėjo ir 5-15 nm fibrilės bei 16-37 nm oligomerai, susidarę po 7d. inkubacijos KT (iki 260,3  $\pm$  39,9 proc.) ir 2-7 nm fibrilės bei 37-81 nm oligomerai, susidarę po inkubacijos su A $\beta$ <sub>1-42</sub> (iki 242,5  $\pm$  34,5 proc.).



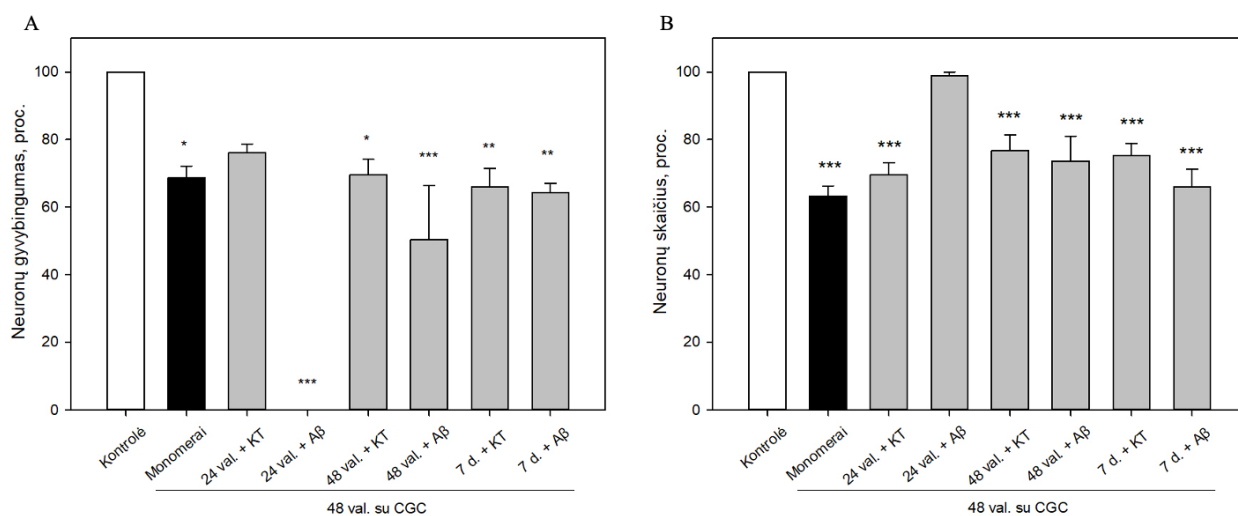
**3.8 pav.**  $\alpha$ -syn darinių ( $3 \mu\text{M}$ ) poveikis mikroglijos ir astrocytų skaičiui mišriose neuronų – glijos kultūrose

A – mikroglijos skaičius po 48 val.; B – mikroglijos skaičius po 72 val.; C – astrocytų skaičius po 48 val.; D – astrocytų skaičius po 72 val.

\* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .  $\bar{x} \pm \text{SE}$ ,  $n = 6-7$

Eksperimentai buvo tęsiami mišrią neuronų – glijos kultūrą 48 val. veikiant  $9 \mu\text{M}$  įvairios oligomerizacijos  $\alpha$ -syn baltymu. Gauti rezultatai rodo, kad visi dariniai, ir monomerinis, ir skirtingais būdais paruošti oligomerai bei fibrilės, veikia neuronų gyvybingumą ir skaičių (3.9 A ir B). Po ląstelių kultūros inkubacijos su 0,4-1 nm dariniais nustatytas statistiškai reikšmingas neuronų gyvybingumo (iki  $68,7 \pm 3,5$  proc.) ir skaičiaus (iki  $63,3 \pm 2,9$  proc.) sumažėjimas. Vertinant 5-17 nm aukščio oligomerų, gautų po 24 val. inkubacijos KT, poveikį nustatytas statistiškai reikšmingas neuronų skaičiaus sumažėjimas iki  $69,5 \pm 3,7$  proc., tačiau vertinant gyvybingumą ( $76 \pm 2,7$  proc.) statistinio patikimumo nebuvo gauta. Atvirkščiai, 7-35 nm oligomerai, susidarę po 24 val. inkubacijos KT su  $\text{A}\beta_{1-42}$ , sukėlė statistiškai reikšmingą neuronų gyvybingumo sumažėjimą iki 0 proc., tačiau neuronų skaičius reikšmingai nepakitęs ( $98,8 \pm 1,2$  proc.). Dideli 5-40 nm dariniai, susidarę po 48 val. inkubacijos KT, bei 3-52 nm oligomerai, susidarę po tos pačios trukmės inkubacijos su  $\text{A}\beta_{1-}$

42, statistiškai reikšmingai veikia neuronų gyvybingumą (iki  $69,5 \pm 4,6$  proc. ir  $50,3 \pm 16,1$  proc. atitinkamai) ir skaičių (iki  $76,7 \pm 4,7$  proc. ir  $73,7 \pm 7,4$  proc. atitinkamai). Kai ląstelių kultūros buvo inkubuojamos su 5-15 nm fibrilėmis ir 16-37 nm oligomerais, gautais po 7 d. inkubacijos KT, ląstelių gyvybingumas sumažėjo iki  $66 \pm 5,5$  proc., o skaičius iki  $75,3 \pm 3,5$  proc. Po tos pačios trukmės inkubacijos su  $A\beta_{1-42}$  susidariusios 2-7 nm fibrilės ir 37-81 nm oligomerai taip pat reikšmingai sumažino neuronų gyvybingumą (iki  $64,3 \pm 2,6$  proc.) ir skaičių (iki  $66 \pm 5,2$  proc.).



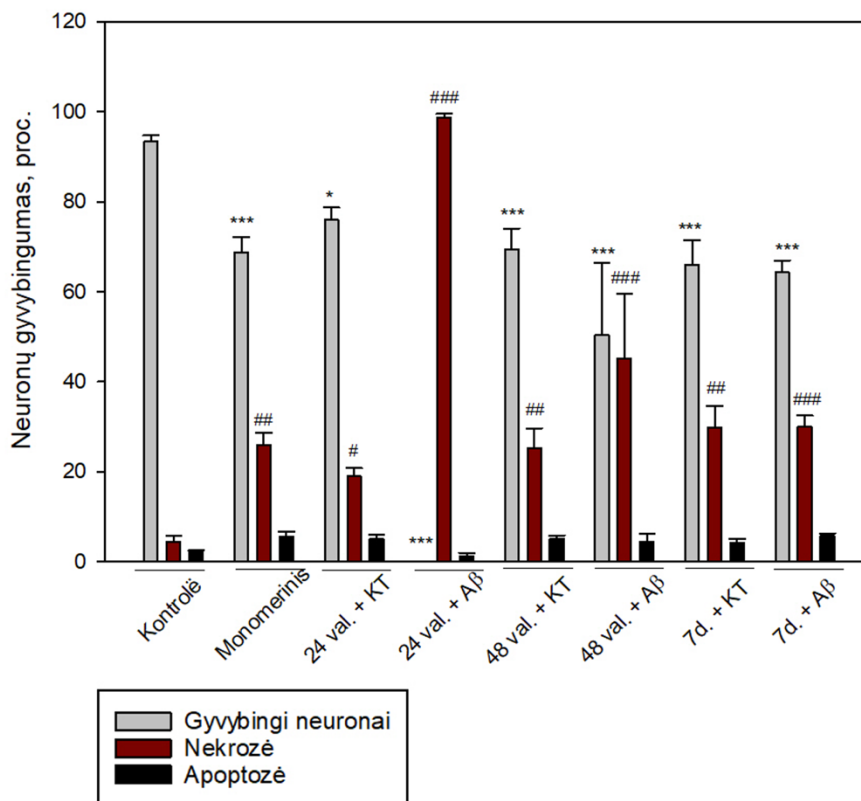
**3.9 pav.**  $\alpha$ -syn darinių ( $9 \mu\text{M}$ ) poveikis neuronų gyvybingumui ir skaičiui mišriose neuronų – glijos kultūrose

A – neuronų gyvybingumas po 48 val., B – neuronų skaičius po 48 val.

\* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .  $\bar{x} \pm \text{SE}$ ,  $n = 6-7$

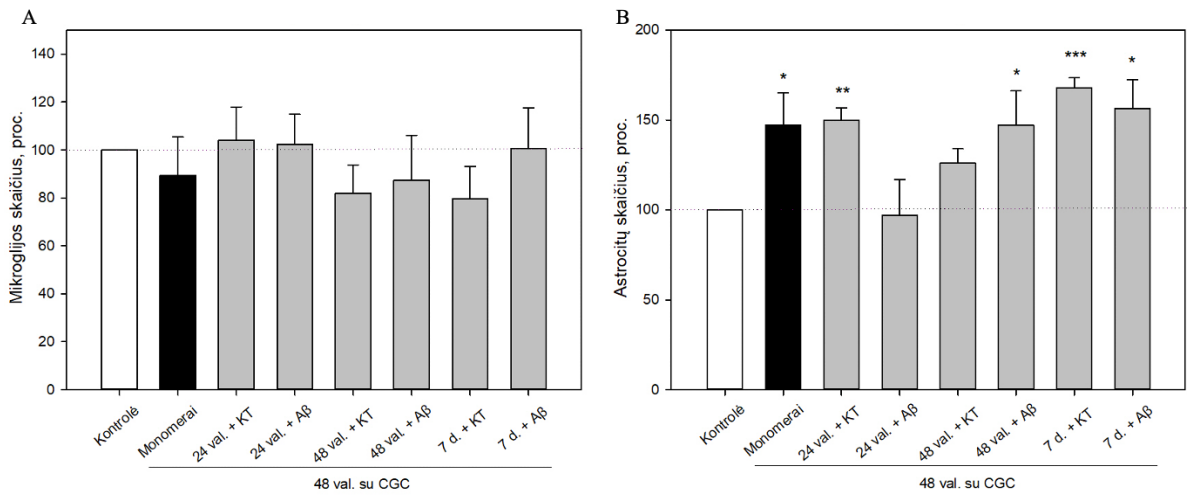
Vertinant ląstelių žūties tipą (3.10 pav.) nustatyta, kad po 48 val. inkubacijos su  $\alpha$ -syn ( $9 \mu\text{M}$ ) dariniais kontrolinėje ląstelių kultūroje gyvybingi neuronai sudaro  $93,3 \pm 1,4$  proc., nekroziniai  $4,5 \pm 1,3$  proc., o apoptoziniai neuronai  $2,2 \pm 0,3$  proc. Statistiškai reikšmingas nekrozių skaičiaus padidėjimas nustatytas po inkubacijos su 0,4-1 nm monomerais, kurių skaičius padidėjo iki  $25,8 \pm 2,8$  proc. Nors po 24 val. KT susidarę 5-17 nm dydžio dariniai neturi statistiškai patikimo poveikio gyvybingų neuronų skaičiui, tačiau reikšmingai padidina nekrozių skaičių iki  $19 \pm 1,8$  proc. Stipriausiu poveikiu pasižymi 7-35 nm dariniai, susidarę po 24 val. inkubacijos su oligomerizacijos induktoriumi  $A\beta_{1-42}$ , kurie padidino nekrozių skaičių iki  $98,8 \pm 0,7$  proc. Veikiant CGC 5-40 nm aukščio  $\alpha$ -syn oligomerais nustatytas statistiškai reikšmingas žuvusių neuronų skaičiaus padidėjimas, kur nekrozė sudarė  $25,3 \pm 4,3$  proc. Didesniu neurotoksinu poveikiu pasižymi 3-52 nm aukščio oligomerai, susidarę po tos pačios trukmės inkubacijos su  $A\beta_{1-42}$ . Šioje grupėje nekrozių neuronų skaičius sudaro  $45,2 \pm 14,3$  proc. VI ir VII protokolais (7 d. KT  $\pm A\beta_{1-42}$ ) paruošti baltymo

dariniai – oligomerai ir fibrilės - turi reikšmingą poveikį nekrozinų neuronų skaičiaus padidėjimui (iki  $29,8 \pm 4,8$  proc. ir  $30 \pm 2,4$  proc. atitinkamai).



**3.10 pav.**  $\alpha$ -syn darinių ( $9 \mu\text{M}$ ) sukeltas neuronų žūties būdas po 48 val. su CGC  
 \* - patikimumas, lyginant gyvybingumą; \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .  
 # - patikimumas, lyginant nekrozę; # -  $p < 0,05$ ; ## -  $p < 0,01$ ; ### -  $p < 0,001$   
 $\bar{x} \pm \text{SE}$ ,  $n = 6-7$

Vertinant poveikį glijos ląstelėms nustatyta, kad  $9 \mu\text{M}$   $\alpha$ -syn monomerai ir agregatai bei fibrilės, gauti naudojant visus 7 protokolus, statistiškai reikšmingo poveikio mikroglijos ląstelių skaičiui neturėjo (3.11 pav. A). Tačiau monomerinis  $0,4-1 \text{ nm}$   $\alpha$ -syn baltymas statistiškai patikimai skatina astrocitų proliferaciją (iki  $147 \pm 18,3$  proc.) (3.11 pav. B). Reikšmingą astrocitų skaičiaus padidėjimą sukelia ir  $5-17 \text{ nm}$  oligomerai, gauti po 24 val. inkubacijos KT (iki  $149,8 \pm 7,1$  proc.), tačiau  $7-35 \text{ nm}$  dariniai, susidarę po tos pačios trukmės inkubacijos su  $\text{A}\beta_{1-42}$ , poveikio ląstelėms neturi ( $97 \pm 20$  proc.). Ląsteles inkubuojant su  $5-40 \text{ nm}$  oligomerais, susidariusiais po 48 val. inkubacijos KT, statistiškai patikimo poveikio nebuvo ( $126 \pm 7,9$  proc.), tačiau reikšmingą astrocitų proliferaciją (iki  $147,2 \pm 19,1$  proc.) sukelia  $3-52 \text{ nm}$  dariniai, susidarę po inkubacijos su dideliais  $\text{A}\beta_{1-42}$  oligomerais. Vertinant  $5-15 \text{ nm}$  fibrilių ir  $16-37 \text{ nm}$  oligomerų, susidariusių po 7 d. inkubacijos KT, bei  $2-7 \text{ nm}$  fibrilių ir  $37-81 \text{ nm}$  oligomerų, gautų po inkubacijos su  $\text{A}\beta_{1-42}$ , poveikį, nustatytas statistiškai reikšmingas astrocitų skaičiaus padidėjimas (iki  $167,8 \pm 5,7$  proc. ir  $156,2 \pm 16,4$  proc.).



**3.11 pav.**  $\alpha$ -syn darinių ( $9 \mu\text{M}$ ) poveikis mikroglijos ir astrocytų skaičiui mišriose neuronų – glijos kultūrose

A – mikroglijos skaičius po 48 val.; B – astrocytų skaičius po 48 val.

\* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .  $\bar{x} \pm \text{SE}$ ,  $n = 6-7$

## REZULTATŲ APTARIMAS

$\alpha$ -syn yra mažas 14 kDa baltymas, lokalizuotas neuronų aksonuose. Jo formuojamos fibrilės ir Lewy kūneliai yra pagrindiniai PL žymenys (Meade ir kt., 2019). Visgi, pastarųjų metų tyrimai leidžia manyti, kad šie  $\alpha$ -syn agregatai susidaro veikiant ląstelės apsauginiams mechanizms ir jie nėra pavojingi ląstelei, o didžiausiu citotoksiškumu pasižymi tirpūs oligomerai ir prefibriliniai dariniai (Ingelsson 2016b). Šiuo metu  $\alpha$ -syn agregacijos tyrimuose yra naudojami agregacijos induktoriai, kurie nėra artimi smegenų fiziologinėms sąlygoms arba glaudžiai siejami su PL patologija, pvz., metalo jonai, polikatijonai (polilizinas, poliargininas ir kt.), glikozaminoglikanai (heparinas ir kt.), natrio dodecilsulfatas, organiniai tirpikliai ir kt. (Narkiewicz et al., 2014). Mokslinėje literatūroje daugėja duomenų, jog neurodegeneracinių ligų variantai, pvz.: AL-LKV, kuriems būdingas sinergistinis A $\beta$  ir  $\alpha$ -syn poveikis, pasižymi sunkesne ligos eiga (Malek-Ahmadi ir kt., 2019; Marsh & Blurton-Jones, 2012b; Twohig & Nielsen, 2019b). Naujausi tyrimai rodo, kad mažas A $\beta$  kiekis turi poveikį  $\alpha$ -syn oligomerizacijai (Köppen ir kt., 2020b). Šio darbo tikslas buvo nustatyti įvairios oligomerizacijos laipsnio  $\alpha$ -syn poveikį smegenų ląstelėms. Kadangi PL patologija yra susijusi su neurodegeneracine procesais (Kaur ir kt., 2017), šiame darbe tyrėme savaiminės agregacijos ir A $\beta$ <sub>1-42</sub> agregacijos induktoriaus sąlygotų  $\alpha$ -syn darinių neurotoksinį poveikį mišrioje neruonų-glijos kultūroje.

Pirmiausia, tyrimo metu  $\alpha$ -syn dariniai charakterizuoti AJM metodu. Nustatant neoligomerizuoto  $\alpha$ -syn dydį, identifikuoti 0,4-1 nm pagal z-ašį aukščio dariniai. Ruggeri ir kolegos (2018) nustatė, kad tokio dydžio baltymai yra monomerai arba dimerinės struktūros (Ruggeri ir kt., 2018). Mokslinėje literatūroje yra duomenų, kad  $\alpha$ -syn baltymo oligomerizacija priklauso nuo jo koncentracijos tirpale (Raaij ir kt., 2008). Nustatyta, kad monomerinis  $\alpha$ -syn prefibrilines struktūras formuoja esant mažai 0,4  $\mu$ M koncentracijai, o fibrilės – esant 10  $\mu$ M (Afitska et al., 2019). Visgi dažniausiai  $\alpha$ -syn oligomerizacijos tyrimams pasirenkamos didesnės baltymo koncentracijos – 0,5-1 mg/ml (Narkiewicz et al., 2014). Todėl šiame tyrime  $\alpha$ -syn inkubuotas esant didesnei 1 mg/ml (70  $\mu$ M) koncentracijai, o agregacijos induktorius – A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomerai – buvo pridedamai 1:140 santykiu (A $\beta$ <sub>1-42</sub>: $\alpha$ -syn).

Vykdam tyrimą nustatyta, kad po savaiminės oligomerizacijos susidariusių darinių dydis priklauso nuo inkubacijos laiko: po 24 val. formuojami 5-17 nm, po 48 val. 5-40 nm oligomerai. Šie rezultatai rodo, kad, esant didelėms baltymo koncentracijoms,  $\alpha$ -syn oligomerizuojasi KT, nenaudojant oligomerizaciją skatinančių cheminių medžiagų. Toliau baltymą ruošėme minėtais protokolais, papildomai pridėjus oligomerizacijos induktorių – didelius A $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomerus. Nustatėme, kad po 24 val. inkubacijos susidaro 7-35 nm aukščio

oligomerai, po 48 val. inkubacijos su  $A\beta_{1-42}$  susidaro 3-52 nm dydžio agregatai. Taigi, taikant protokolus su inkubacijos induktoriais  $A\beta_{1-42}$ , nustatyti didesni oligomerai. Vertinant  $\alpha$ -syn darinių dydį gautų po 7d. inkubacijos KT, nustatyta, kad susidaro fibrilės, kurių dydis 5-15 nm ir 16-37 nm oligomerai. Pridėjus  $A\beta_{1-42}$  oligomerų susidaro 2-7 nm fibrilės ir 37-81 nm agregatai. Ankstesnėmis studijomis nustatyta, kad protofilamentų aukštis, nustatytas naudojant AJM metodą, yra maždaug 0,4 nm. Dviems protofilamentams jungiantis formuojamos didesnės tarpinės gijos, kurių dydis yra 0,8-6 nm, kol susidaro 6-10 nm fibrilės (Ruggeri ir kt., 2018). Taigi, vertinant  $A\beta$  poveikį  $\alpha$ -syn oligomerizacijai ir remiantis kitų autorių tyrimais, mūsų rezultatai leidžia manyti, kad  $A\beta$  oligomerai skatino didesnių oligomerų susidarymą, tačiau neskatino didesnių fibrilinių darinių formavimosi.

Progresuojant PL, didesni monomerų ir minėtų oligomerų kiekiai nustatomi pacientų seilėse, plazmoje bei smegenų skystyje (Brás & Outeiro, 2021). Mokslininkų atlikti tyrimai rodo, kad skirtingos oligomerizacijos baltymas yra endocituojamas ląstelių, kuriose pažeidžia mitochondrijų, ET, baltymų degradacijos sistemų veiklą, bei didina membranos pralaidumą (Du ir kt., 2020). Kartu, užląstelinėje erdvėje esančios baltymo formos sąveikauja su mikroglijos ir astrocitų membranoje esančiais receptoriais, taip aktyvuodamas neuoroždegimui būdingus mechanizmus (Kam ir kt., 2020; E.-J. Lee ir kt., 2010).

Taigi, magistro darbo eksperimentams pasirinkta mišri neuronų – glijos kultūra, siekiant įvertinti baltymo darinių poveikį neuronams ir mikroglijos bei astrocitų ląstelėms. Eksperimentais su CGC nustatėme, kad  $\alpha$ -syn darinių toksiškumas neuronams ir poveikis neuronų ir astrocitų ląstelėms priklauso nuo trijų faktorių: oligomerų dydžio, koncentracijos ir inkubacijos su ląstelių kultūra trukmės. 3  $\mu$ M įvairaus oligomerizacijos laipsnio  $\alpha$ -syn baltymo, inkubuoto 48 val. su ląstelių kultūra poveikio neuronų gyvybingumui ir skaičiui neturėjo. Po ilgesnės 72 val. inkubacijos statistiškai reikšmingą poveikį neuronams turėjo tik 5-17 nm ir 7-35 nm dariniai, susidarę po 24 val. inkubacijos be ir su  $A\beta_{1-42}$  oligomerais. Tačiau šiems  $\alpha$ -syn dariniams yra būdingas skirtingas neuronų žūtis tipas: 5-17 nm oligomerai mažina gyvybingų neuronų nykimą, nekintant apoptozinių ir nekrozinių ląstelių skaičiui, o 7-35 nm dariniai didina nekrozinių ląstelių skaičių. Žinoma, kad pažeistus, bet dar gyvybingus neuronus gali fagocituoti mikroglijos ląstelės ir toks žūtis tipas vadinamas pirmine fagocitoze arba fagoptoze (Yanuck, 2019). Aktyvuota mikroglija taip pat gali prisidėti prie nekrozinių ląstelių žūtis (Brown & Vilalta, 2015). Todėl ateityje būtų galima atlikti tyrimus su ląstelių kultūromis, kuriose pašalintos mikroglijos ląstelės, kas leistų nustatyti, kaip tokio dydžio  $\alpha$ -syn dariniai veikia neuronus – tiesiogiai ar per mikroglijos ląsteles.



Vertinant didesnės 9  $\mu\text{M}$  koncentracijos visų  $\alpha$ -syn darinių poveikį neuronams, nustatyta, kad toksiškiausiu poveikiu pasižymi 7-35 nm oligomerai, susidarę po 24 val. inkubacijos su  $\text{A}\beta_{1-42}$  oligomerais. Šie dariniai sukėlė nekrozinę ląstelių žūtį (apie 98 proc.), bet bendras neuronų skaičius liko nepakitęs. Kiti dariniai, tiek monomerinis, tiek skirtingais protokolais paruošti oligomerai ir fibrilės, didino nekrozinį ląstelių skaičių (apie 25-45 proc.) bei mažino gyvybingų ląstelių skaičių. Žinoma, kad mikroglijos funkcija yra fagocituoti žuvusias ląsteles (Janda ir kt., 2018), tačiau 7-35 nm oligomerų atveju bendras neuronų skaičius liko nepakitęs, kas leidžia manyti, kad šie dariniai gali veikti ir mikroglijos ląsteles. Mokslinėje literatūroje yra duomenų, kad  $\alpha$ -syn monomerai didina mikroglijos fagocitinį aktyvumą, tačiau dideli agregatai ir fibrilinės struktūros atvirkščiai – jį mažina, prisijungdami prie receptorių (pvz.: Fc $\gamma$ Rs) ir slopindami ląstelių aktyvaciją (Y. R. Choi ir kt., 2015; Park ir kt., 2008).

Mokslininkai nustatė, kad vertinant tiesioginį  $\alpha$ -syn darinių poveikį neuroblastomos SH-SY5Y neuronams, ląstelių žūtį sukelia 1,9-3,5 nm aukščio ir 60-100 nm skersmens oligomerai, kurie formuoja poras ir didina plazminės membranos pralaidumą. Visgi, didžiausiu neurotoksinio poveikiu pasižymi didesni 5-9 nm aukščio ir 75-110 nm skersmens oligomerai (Kumar ir kt., 2018). Kitų autorių duomenimis 3-16 nm aukščio oligomerai skatina ADJ susidarymą, pažeidžia lipidinių pūslelių membranų vientisumą, tuo tarpu 10-35 nm aukščio fibrilės nesukelia stiprių neurotoksinių pokyčių (S. W. Chen ir kt., 2015). Astrocitų - neuronų kultūrose nustatyta, kad 18-73 nm skersmens  $\alpha$ -syn dariniais aktyvuoti astroцитai turi mažesnę poveikį neuronų gyvybingumui, nei fibriliniiais dariniais aktyvuotos ląstelės (Chavarría ir kt., 2018b), toks poveikis nustatytas veikiant ir mikroglijos ląsteles (Hughes ir kt., 2019a). Šie rezultatai nesutampa su mūsų tyrimo rezultatais, kurie rodo, kad didžiausiu neurotoksinio poveikiu pasižymi didesni nei literatūroje apibūdinami, 7-35 nm aukščio dariniai (24 val. inkubacija KT su  $\text{A}\beta$ ). Būtent jie pasižymi stipriausiu poveikiu neuronų gyvybingumui padidinus koncentraciją iki 9  $\mu\text{M}$ .

Vertinant poveikį glijos ląstelėms nustatyta, kad po 48 val. inkubacijos su 3  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -syn dariniais astrocitų ir mikroglijos proliferaciją sukėlė tik dideli 37-81 nm oligomerai ir 2-7 nm fibrilės, susidarę po 7 d. inkubacijos su  $\text{A}\beta_{1-42}$ . Po 72 val. inkubacijos mikroglijos ir astrocitų proliferaciją sukėlė didesni  $\alpha$ -syn dariniai, susidarę po 48 val. ir 7 d. inkubacijos su ir be  $\text{A}\beta_{1-42}$ . Tačiau nors po inkubacijos (48 val.) su 9  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -syn dariniais reikšmingą astrocitų proliferaciją sukėlė tiek monomerai, tiek įvairaus dydžio oligomerai. Mikroglijos ląstelių skaičiui poveikio nenustatyta.

Kiti mokslininkai nustatė, kad oligomerai (720 – 1048 kDa), tačiau ne monomerai, sukelia mikroglijos uždegimui būdingą fenotipą ir sąveikauja su TLR receptoriais (Daniele ir

kt., 2015b). Būtent TLR1/2 ir TLR4 labiausiai siejami su  $\alpha$ -syn agregatų sukeltu neurouždegimu, nes padidėjusi jų raiška nustatyta juodojoje medžiagoje (lot. substantia nigra), kuriai būdinga astro- ir mikrogliozė (Hughes ir kt., 2019b). Prouždegiminius signalinius kelius (p38, ERK1/2 MAP kinazių ir NF- $\kappa$ B) aktyvuoja ir  $\alpha$ -syn formuojamos protofibrilės (Wilms ir kt., 2009). Visgi tyrimai, kurių metu lygintas oligomerų ir fibrilių poveikis glijos ląstelių aktyvacijai, rodo, kad fibrilės turi didesnę poveikį mikroglijos ir astrocitų aktyvacijai (Chavarría ir kt., 2018b; Hughes ir kt., 2019b). Šie duomenys sutampa su mūsų tyrime gautais rezultatais, kurie rodo, kad esant mažoms 3  $\mu$ M koncentracijoms  $\alpha$ -syn poveikis mikroglijos ir astrocitų proliferacijai priklauso nuo agregatų dydžio.

Apibendrinant tyrimą, galime teigti, kad  $A\beta_{1-42}$  skatina didesnių oligomerų (24-48 val. oligomerizacijos trukmė), bet mažesnių fibrilių (7d. oligomerizacijos trukmė) susidarymą. Skirtingos oligomerizacijos  $\alpha$ -syn darinių poveikis ląstelių kultūrai priklauso nuo dalelių dydžio, koncentracijos bei inkubacijos su CGC trukmės. Didžiausiu toksiškumu neuronams pasižymi agregatai, kurie gaunami po 24 val. inkubacijos su  $A\beta_{1-42}$ . Visgi, mūsų tirtose oligomerų grupėse dalelių dydis yra gana plačiai pasiskirstęs. Dėl to ateityje, siekiant išsamiau ištirti skirtingų dydžių oligomerų poveikį neuronams ir glijos ląstelėms, reikėtų atskirti skirtingo baltymo frakcijas. Kartu, jomis veikti neuronų ir glijos ląsteles ne mišriose kultūrose, siekiant nustatyti tiesioginį ir netiesioginį neurotoksinį poveikį.

## IŠVADOS

1.  $\alpha$ -syn darinių dydis priklauso nuo inkubacijos laiko: po 24 val. ir 48 val. inkubacijos susidaro oligomerai, o po 7 d. inkubacijos susidaro dviejų tipų dariniai – sferiniai oligomerai ir fibrilės. Pridėjus agregacijos induktoriaus –  $A\beta_{1-42}$  – susidaro didesni oligomerai, tačiau mažesnės fibrilės.
2. Toksiškiausiu poveikiu neuronams pasižymi vidutiniai 7-35 nm  $\alpha$ -syn dariniai, susidarę po 24 val. inkubacijos su oligomerizacijos induktoriumi  $A\beta_{1-42}$ : 7-35 nm  $\alpha$ -syn sukelia nekrozinę ląstelių žūtį esant mažesnėms koncentracijoms ir trumpesnei inkubacijai su CGC ląstelėmis.
3.  $\alpha$ -syn darinių poveikis glijos ląstelėms priklauso nuo koncentracijos: oligomerai ir fibrilės sukelia mikroglijos bei astrocitų proliferaciją esant mažesnei koncentracijai, o esant didesnei koncentracijai, skatinama tik astrocitų proliferaciją.

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS  
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Greta Aleksandravičiūtė

Magistro baigiamasis darbas

**$\alpha$ -sinukleino agregacijos ir poveikio smegenų ląstelėms tyrimas**

SANTRAUKA

Sergant Parkinsono liga, smegenyse susidaro  $\alpha$ -syn fibrilių formuojami Lewy kūneliai. Baltymo monomerų agregacija, formuojant tirpius oligomerus ir galiausiai fibriles, laikoma ligą sukeliančiu mechanizmu. Tačiau pastarųjų metų tyrimai rodo, kad įvairaus oligomerizacijos laipsnio baltymas yra toksiškas neuronams bei gali aktyvinti glijos ląsteles (Ingelsson, 2016b). Visgi, vis dar nėra žinoma, kokio oligomerizacijos laipsnio  $\alpha$ -syn yra toksiškiausias smegenų ląstelėms.

Šio darbo tikslas buvo įvertinti skirtingo oligomerizacijos laipsnio  $\alpha$ -syn darinių poveikį smegenų ląstelėms. Iškelti uždaviniai: 1) Parengti  $\alpha$ -syn oligomerizacijos - savaiminės ir naudojant  $A\beta_{1-42}$  oligomerus – protokolus; 2) Nustatyti  $\alpha$ -syn agregatų dydį, taikant atominės jėgos mikroskopijos metodą; 3) Įvertinti skirtingo oligomerizacijos laipsnio  $\alpha$ -syn darinių poveikį žiurkių smegenėlių neuronų-glijos kultūroms; 4) Įvertinti ar  $A\beta_{1-42}$  turi įtakos  $\alpha$ -syn oligomerizacijai ir neurotoksiškumui.

Tyrimo metu  $\alpha$ -syn oligomerizacijai sukelti, monomerinis  $\alpha$ -syn buvo 24 val., 48 val. ir 7d. inkubuojamas kambario temperatūroje su agregacijos induktoriumi –  $A\beta_{1-42}$  oligomerai (140:1  $\alpha$ -syn:  $A\beta_{1-42}$ ) arba be jų. Agregatų dydžio (pagal z-ašį) nustatymui taikytas atominės jėgos mikroskopijos (AJM) metodas.  $\alpha$ -syn neurotoksiškumo tyrimai atlikti su pirminėmis smegenėlių neuronų-glijos kultūromis (CGC). Ląstelių gyvybingumas ir skaičius vertintas fluorescentinės mikroskopijos metodu, naudojant Hoesht33342 ir propidžio jodido branduolio dažus, mikroglijos ląstelės buvo dažomos izolektino-IB4 ir AlexaFluor488 konjugatas.

Gauti rezultatai rodo, kad po 24-48 val. ( $\pm A\beta$ ) inkubacijos susidaro oligomerinės baltymo formos, o po 7d. ( $\pm A\beta$ ) – sferiniai oligomerai ir fibrilės. Po inkubacijos su  $A\beta_{1-42}$  susidaro didesni oligomerai, tačiau mažesnės fibrilės, kurių dydis buvo įvertintas pagal z-ašį.

Vertinant neurotoksinį poveikį, nusatyta, kad esant mažesnei (3  $\mu\text{M}$ ) ir didesnei (9  $\mu\text{M}$ ) koncentracijai, didžiausiu toksiniu poveikiu neuronams pasižymi po 24 val. inkubacijos su  $\text{A}\beta_{1-42}$  susidarę vidutiniai 7-35 nm  $\alpha$ -syn dariniai. Po 48-72 val. CGC inkubacijos su šiais dariniais buvo stebima nekrozinė neuronų žūtis. Mikroglijos ir astrocitų ląstelių proliferaciją sukelia didesni baltymo dariniai (3  $\mu\text{M}$ ), susidarę po 48 val. ir 7 d. inkubacijos su ir be  $\text{A}\beta_{1-42}$  oligomerais. Tačiau esant didesnei (9  $\mu\text{M}$ ) koncentracijai, yra skatinama tik astrocitų proliferacija, o mikroglijos ląstelių skaičius nekinta.

Apibendrinant, galima daryti išvadą, kad skirtingos oligomerizacijos  $\alpha$ -syn darinių poveikis neuronų gyvybingumui, bei neuronų ir glijos ląstelių skaičiui priklauso nuo dalelių dydžio, koncentracijos, bei inkubacijos su CGC trukmės.

VILNIUS UNIVERSITY  
LIFE SCIENCES CENTER  
INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Greta Aleksandravičiūtė

Master thesis

**Investigation of  $\alpha$ -synuclein aggregation and toxicity to brain cells**

SUMMARY

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder characterized by insoluble  $\alpha$ -syn deposits called Lewy bodies. The protein aggregation process into soluble aggregates and fibrils is considered to be the disease causative mechanism. Recent studies show that protein aggregates are toxic to neurons and can induce activation of glial cells (Ingelsson, 2016b). However, it is still unknown which  $\alpha$ -syn forms are the most neurotoxic.

This study aimed to investigate the effects of the different  $\alpha$ -syn aggregates on brain cells. The objectives were: 1) to prepare protocols on  $\alpha$ -syn self-aggregation and aggregation using  $A\beta_{1-42}$  oligomers; 2) to characterize  $\alpha$ -syn aggregates using the atomic force microscopy; 3) to evaluate  $\alpha$ -syn induced neurotoxicity in primary neuronal-glial cell cultures; 4) to evaluate whether  $A\beta_{1-42}$  has an impact on  $\alpha$ -syn oligomerization and toxicity.

For the preparation of  $\alpha$ -syn aggregates, seven protocols were used. Monomeric protein was incubated for 24, 48 hours, and 7 days at room temperature with and without aggregation inductor  $A\beta_{1-42}$  (140:1  $\alpha$ -syn:  $A\beta_{1-42}$ ). The degree of  $\alpha$ -syn oligomerization was established using atomic force microscopy (AFM). Experiments on  $\alpha$ -syn cytotoxicity were carried out using primary neuronal-glial cell cultures. Cell viability and number were evaluated by fluorescence microscopy. Cellular nuclei were stained with propidium iodide and Hoechst33342, and microglial cells were labelled using Isolectin-IB4 conjugated with AlexaFluor488.

The results show that after 24 and 48 hours ( $\pm A\beta$ ) of incubation,  $\alpha$ -syn aggregates observed by AFM were spheric oligomers, and after 7-day ( $\pm A\beta$ ) incubation, a protein formed spheric oligomers and fibrils. Co-incubation with  $A\beta_{1-42}$  promotes the formation of larger oligomers but smaller fibrils, characterized by z-axis. We found that a medium 7-35 nm oligomers, formed after 24 h incubation with  $A\beta_{1-42}$ , exert more pronounced neurotoxic

effects at lower 3  $\mu\text{M}$  and higher 9  $\mu\text{M}$  concentrations. These oligomers induced neuronal death via necrosis. Microglial and astrocyte proliferation was caused by oligomeric and fibrillar species formed after 48 hours or 7 days of incubation with or without  $\text{A}\beta_{1-42}$ . However, at higher concentration (9  $\mu\text{M}$ ) alpha-synuclein aggregates caused astrocyte proliferation while did not affect microglial number.

Taken together, our results show that the effect of  $\alpha$ -syn species on cell viability and the number of neurons and glial cells depends on particle size, concentration, and incubation with CGC time.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Afitska, Kseniia, Anna Fucikova, Volodymyr V. Shvadchak, ir Dmytro A. Yushchenko. 2019.** „ $\alpha$ -Synuclein Aggregation at Low Concentrations“. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1867 (7): 701–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.05.003>.
- Atik, Anzari, Tessandra Stewart, ir Jing Zhang. 2016.** „ALPHA-SYNUCLEIN AS A BIOMARKER FOR PARKINSON’S DISEASE“. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 26 (3): 410–18. <https://doi.org/10.1111/bpa.12370>.
- Benarroch, Eduardo E. 2018.** „Glutamatergic Synaptic Plasticity and Dysfunction in Alzheimer Disease: Emerging Mechanisms“. *Neurology* 91 (3): 125–32.  
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005807>.
- Bendor, Jacob, Todd Logan, ir Robert H. Edwards. 2013.** „The Function of  $\alpha$ -Synuclein“. *Neuron* 79 (6). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.004>.
- Bose, Anindita, ir M. Flint Beal. 2016.** „Mitochondrial Dysfunction in Parkinson’s Disease“. *Journal of Neurochemistry* 139 (S1): 216–31.  
<https://doi.org/10.1111/jnc.13731>.
- Brás, Inês C., ir Tiago F. Outeiro. 2021.** „Alpha-Synuclein: Mechanisms of Release and Pathology Progression in Synucleinopathies“. *Cells* 10 (2): 375.  
<https://doi.org/10.3390/cells10020375>.
- Breydo, Leonid, Jessica W. Wu, ir Vladimir N. Uversky. 2012.** „ $\alpha$ -Synuclein Misfolding and Parkinson’s Disease“. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1822 (2): 261–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.10.002>.
- Brothers, Holly M., Maya L. Gosztyla, ir Stephen R. Robinson. 2018.** „The Physiological Roles of Amyloid- $\beta$  Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer’s Disease“. *Frontiers in Aging Neuroscience* 10: 118. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00118>.
- Brown, Guy C., ir Anna Vilalta. 2015.** „How Microglia Kill Neurons“. *Brain Research, Neuroprotection: Basic mechanisms and translational potential*, 1628 (gruodžio): 288–97. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.08.031>.
- Burré, Jacqueline, Manu Sharma, Theodoros Tsetsenis, Vladimir Buchman, Mark R. Etherton, ir Thomas C. Südhof. 2010.** „Alpha-Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro“. *Science (New York, N.Y.)* 329 (5999): 1663–67. <https://doi.org/10.1126/science.1195227>.
- Candrea, Jason, Edward Chau, Margaret E. Rice, ir Jin Ryouon Kim. 2020.** „Interactions between soluble species of  $\beta$ -amyloid and  $\alpha$ -synuclein promote oligomerization while inhibiting fibrillization“. *Biochemistry* 59 (4): 425–35.  
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00655>.
- Cao, Shuwen, David G. Standaert, ir Ashley S. Harms. 2012.** „The Gamma Chain Subunit of Fc Receptors Is Required for Alpha-Synuclein-Induced pro-Inflammatory Signaling in Microglia“. *Journal of Neuroinflammation* 9 (lapkričio): 259.  
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-259>.
- Chartier, Suzanne, ir Charles Duyckaerts. 2018.** „Is Lewy Pathology in the Human Nervous System Chiefly an Indicator of Neuronal Protection or of Toxicity?“. *Cell and Tissue Research* 373 (1): 149–60. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2854-6>.
- Chavarría, Cecilia, Sebastián Rodríguez-Bottero, Celia Quijano, Patricia Cassina, ir José M. Souza. 2018a.** „Impact of Monomeric, Oligomeric and Fibrillar Alpha-



- Synuclein on Astrocyte Reactivity and Toxicity to Neurons“. *The Biochemical Journal* 475 (19): 3153–69. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180297>.
- . **2018b**. „Impact of monomeric, oligomeric and fibrillar alpha-synuclein on astrocyte reactivity and toxicity to neurons“. *Biochemical Journal* 475 (19): 3153–69. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180297>.
- Cheignon, C., M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot, P. Faller, C. Hureau, ir F. Collin. 2018.** „Oxidative Stress and the Amyloid Beta Peptide in Alzheimer’s Disease“. *Redox Biology* 14 (balandžio): 450–64. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>.
- Chen, Guo-fang, Ting-hai Xu, Yan Yan, Yu-ren Zhou, Yi Jiang, Karsten Melcher, ir H. Eric Xu. 2017.** „Amyloid Beta: Structure, Biology and Structure-Based Therapeutic Development“. *Acta Pharmacologica Sinica* 38 (9): 1205–35. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>.
- Chen, Serene W., Srdja Drakulic, Emma Deas, Myriam Ouberai, Francesco A. Aprile, Rocío Arranz, Samuel Ness, ir kt. 2015.** „Structural Characterization of Toxic Oligomers That Are Kinetically Trapped during  $\alpha$ -Synuclein Fibril Formation“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (16): E1994–2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421204112>.
- Chia, Sean, Patrick Flagmeier, Johnny Habchi, Veronica Lattanzi, Sara Linse, Christopher M. Dobson, Tuomas P. J. Knowles, ir Michele Vendruscolo. 2017.** „Monomeric and fibrillar  $\alpha$ -synuclein exert opposite effects on the catalytic cycle that promotes the proliferation of A $\beta$ 42 aggregates“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (30): 8005–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700239114>.
- Choi, Bong-Kyu, Mal-Gi Choi, Jae-Yeol Kim, Yoosoo Yang, Ying Lai, Dae-Hyuk Kweon, Nam Ki Lee, ir Yeon-Kyun Shin. 2013.** „Large  $\alpha$ -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (10): 4087–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218424110>.
- Choi, Yoon Jung, Sukyung Chae, Jeong Hun Kim, Kate F. Barald, Joong Yull Park, ir Sang-Hoon Lee. 2013.** „Neurotoxic Amyloid Beta Oligomeric Assemblies Recreated in Microfluidic Platform with Interstitial Level of Slow Flow“. *Scientific Reports* 3 (1): 1921. <https://doi.org/10.1038/srep01921>.
- Choi, Yu Ree, Seo-Jun Kang, Jin-Mo Kim, Seung-Jae Lee, Ilo Jou, Eun-Hye Joe, ir Sang Myun Park. 2015.** „Fc $\gamma$ RIIB Mediates the Inhibitory Effect of Aggregated  $\alpha$ -Synuclein on Microglial Phagocytosis“. *Neurobiology of Disease* 83 (lapkričio): 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.08.025>.
- Conway, Kelly, S.J. Lee, J.C. Rochet, Tomas Ding, Robin Williamson, ir Peter Lansbury. 2000.** „Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson’s disease: Implications for pathogenesis and therapy“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (vasario): 571–76. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.571>.
- Daniele, Stefano G., Dawn Béraud, Connor Davenport, Kui Cheng, Hang Yin, ir Kathleen A. Maguire-Zeiss. 2015a.** „Activation of MyD88-dependent TLR1/2 signaling by misfolded  $\alpha$ -synuclein, a protein linked to neurodegenerative disorders“. *Science signaling* 8 (376): ra45. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005965>.

- . **2015b.** „Activation of MyD88-dependent TLR1/2 signaling by misfolded  $\alpha$ -synuclein, a protein linked to neurodegenerative disorders“. *Science signaling* 8 (376): ra45. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005965>.
- Deas, Emma, Nunilo Cremades, Plamena R. Angelova, Marthe H. R. Ludtmann, Zhi Yao, Serene Chen, Mathew H. Horrocks, ir kt. 2016.** „Alpha-Synuclein Oligomers Interact with Metal Ions to Induce Oxidative Stress and Neuronal Death in Parkinson’s Disease“. *Antioxidants & Redox Signaling* 24 (7): 376–91. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6343>.
- „Dementia“.** s.a. Žiūrēta 2021 m. gegužēs 11 d. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
- Dettmer, Ulf, Andrew J. Newman, Frank Soldner, Eric S. Luth, Nora C. Kim, Victoria E. von Saucken, John B. Sanderson, Rudolf Jaenisch, Tim Bartels, ir Dennis Selkoe. 2015a.** „Parkinson-causing  $\alpha$ -synuclein missense mutations shift native tetramers to monomers as a mechanism for disease initiation“. *Nature Communications* 6 (birželio). <https://doi.org/10.1038/ncomms8314>.
- . **2015b.** „Parkinson-Causing  $\alpha$ -Synuclein Missense Mutations Shift Native Tetramers to Monomers as a Mechanism for Disease Initiation“. *Nature Communications* 6 (birželio): 7314. <https://doi.org/10.1038/ncomms8314>.
- Di Maio, Roberto, Paul J. Barrett, Eric K. Hoffman, Caitlyn W. Barrett, Alevtina Zharikov, Anupom Borah, Xiaoping Hu, ir kt. 2016.** „ $\alpha$ -Synuclein Binds to TOM20 and Inhibits Mitochondrial Protein Import in Parkinson’s Disease“. *Science Translational Medicine* 8 (342): 342ra78. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf3634>.
- Doorn, Karlijn J, Tim Moors, Benjamin Drukarch, Wilma DJ van de Berg, Paul J Lucassen, ir Anne-Marie van Dam. 2014.** „Microglial phenotypes and toll-like receptor 2 in the substantia nigra and hippocampus of incidental Lewy body disease cases and Parkinson’s disease patients“. *Acta Neuropathologica Communications* 2 (rugpjūčio). <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0090-1>.
- Du, Xiao-yu, Xi-xiu Xie, ir Rui-tian Liu. 2020.** „The Role of  $\alpha$ -Synuclein Oligomers in Parkinson’s Disease“. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (22): 8645. <https://doi.org/10.3390/ijms21228645>.
- Dufty, Brian M., Lisa R. Warner, Sheng T. Hou, Susan X. Jiang, Teresa Gomez-Isla, Kristen M. Leenhouts, Julia T. Oxford, Mel B. Feany, Eliezer Masliah, ir Troy T. Rohn. 2007.** „Calpain-Cleavage of Alpha-Synuclein: Connecting Proteolytic Processing to Disease-Linked Aggregation“. *The American Journal of Pathology* 170 (5): 1725–38. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.061232>.
- Dugger, Brittany N., ir Dennis W. Dickson. 2017.** „Pathology of Neurodegenerative Diseases“. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9 (7): a028035. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035>.
- Emmanouilidou, Evangelia, Katerina Melachroinou, Theodoros Roumeliotis, Spiros D. Garbis, Maria Ntzouni, Lukas H. Margaritis, Leonidas Stefanis, ir Kostas Vekrellis. 2010.** „Cell-Produced Alpha-Synuclein Is Secreted in a Calcium-Dependent Manner by Exosomes and Impacts Neuronal Survival“. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (20): 6838–51. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010>.

- Ferreira, Sara A., ir Marina Romero-Ramos. 2018.** „Microglia Response During Parkinson’s Disease: Alpha-Synuclein Intervention“. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00247>.
- Fields, Carroll Rutherford, Nora Bengoa-Vergniory, ir Richard Wade-Martins. 2019.** „Targeting Alpha-Synuclein as a Therapy for Parkinson’s Disease“. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00299>.
- Frey, Bryan, Abdelrahman AIOkda, ir Hilal A. Lashuel. 2020.** „Monitoring Alpha-Synuclein Oligomerization and Inclusion Formation Using Bimolecular Fluorescence Complementation Assays: What You See Is Not Always What You Get“. *BioRxiv*, gegužės, 2020.05.02.074161. <https://doi.org/10.1101/2020.05.02.074161>.
- Gaig, Carles, María José Martí, Mario Ezquerra, Maria Jesús Rey, Adriana Cardozo, ir Eduardo Tolosa. 2007.** „G2019S LRRK2 mutation causing Parkinson’s disease without Lewy bodies“. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 78 (6): 626–28. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2006.107904>.
- Ganjam, Goutham K., Kathrin Bolte, Lina A. Matschke, Sandra Neitemeier, Amalia M. Dolga, Matthias Höllerhage, Günter U. Höglinger, ir kt. 2019.** „Mitochondrial Damage by  $\alpha$ -Synuclein Causes Cell Death in Human Dopaminergic Neurons“. *Cell Death & Disease* 10 (11): 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2091-2>.
- Giasson, B. I., J. E. Duda, I. V. Murray, Q. Chen, J. M. Souza, H. I. Hurtig, H. Ischiropoulos, J. Q. Trojanowski, ir V. M. Lee. 2000.** „Oxidative Damage Linked to Neurodegeneration by Selective Alpha-Synuclein Nitration in Synucleinopathy Lesions“. *Science (New York, N.Y.)* 290 (5493): 985–89. <https://doi.org/10.1126/science.290.5493.985>.
- Gunn, Adam P., Bruce X. Wong, Timothy Johanssen, James C. Griffith, Colin L. Masters, Ashley I. Bush, Kevin J. Barnham, James A. Duce, ir Robert A. Cherny. 2016.** „Amyloid- $\beta$  Peptide A $\beta$ 3pE-42 Induces Lipid Peroxidation, Membrane Permeabilization, and Calcium Influx in Neurons“. *The Journal of Biological Chemistry* 291 (12): 6134–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.655183>.
- Hao, Yi-Ning, Qi-Xuan Lu, Yu-Hao Zhai, Hao-Yue Wang, Mei-Na Wu, Meng-Ming Hu, Biao Yang, Zhao-Jun Wang, Ze-Wen Wu, ir Jin-Shun Qi. 2018.** „Cerebral Inoculation of Human A53T  $\alpha$ -Synuclein Reduces Spatial Memory Decline and Amyloid- $\beta$  Aggregation in APP/PS1 Transgenic Mice of Alzheimer’s Disease“. *Brain Research Bulletin* 143 (spalio): 116–22. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.10.003>.
- Haque, Md Ezazul, Mahbuba Akther, Md Jakaria, In-Su Kim, Shofiul Azam, ir Dong-Kug Choi. 2020.** „Targeting the Microglial NLRP3 Inflammasome and Its Role in Parkinson’s Disease“. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 35 (1): 20–33. <https://doi.org/10.1002/mds.27874>.
- Hasegawa, Takafumi, Masatoshi Konno, Toru Baba, Naoto Sugeno, Akio Kikuchi, Michiko Kobayashi, Emiko Miura, ir kt. 2011.** „The AAA-ATPase VPS4 Regulates Extracellular Secretion and Lysosomal Targeting of  $\alpha$ -Synuclein“. *PLoS ONE* 6 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029460>.
- Hoffmann, Anna-Carin, Georgia Minakaki, Stefanie Menges, Rachele Salvi, Sergey Savitskiy, Aida Kazman, Hugo Vicente Miranda, ir kt. 2019.** „Extracellular Aggregated Alpha Synuclein Primarily Triggers Lysosomal Dysfunction in Neural

- Cells Prevented by Trehalose“. *Scientific Reports* 9 (1): 544.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-35811-8>.
- Hong, Zhen, Min Shi, Kathryn A. Chung, Joseph F. Quinn, Elaine R. Peskind, Douglas Galasko, Joseph Jankovic, ir kt. 2010.** „DJ-1 and Alpha-Synuclein in Human Cerebrospinal Fluid as Biomarkers of Parkinson’s Disease“. *Brain: A Journal of Neurology* 133 (Pt 3): 713–26. <https://doi.org/10.1093/brain/awq008>.
- Hou, Liyan, Xiuqi Bao, Caixia Zang, Hanyu Yang, Fuqiang Sun, Yuning Che, Xuefei Wu, Shao Li, Dan Zhang, ir Qingshan Wang. 2017.** „Integrin CD11b mediates  $\alpha$ -synuclein-induced activation of NADPH oxidase through a Rho-dependent pathway“. *Redox Biology* 14 (lapkrićio): 600–608. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.11.010>.
- Hughes, Craig D., Minee L. Choi, Mina Ryten, Lee Hopkins, Anna Drews, Juan A. Botía, Maria Iljina, ir kt. 2019a.** „Picomolar concentrations of oligomeric alpha-synuclein sensitizes TLR4 to play an initiating role in Parkinson’s disease pathogenesis“. *Acta Neuropathologica* 137 (1): 103–20.  
<https://doi.org/10.1007/s00401-018-1907-y>.
- . **2019b.** „Picomolar concentrations of oligomeric alpha-synuclein sensitizes TLR4 to play an initiating role in Parkinson’s disease pathogenesis“. *Acta Neuropathologica* 137 (1): 103–20. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1907-y>.
- Yanuck, Samuel F. 2019.** „Microglial Phagocytosis of Neurons: Diminishing Neuronal Loss in Traumatic, Infectious, Inflammatory, and Autoimmune CNS Disorders“. *Frontiers in Psychiatry* 10. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00712>.
- Iljina, Marija, Alexander J. Dear, Gonzalo A. Garcia, Suman De, Laura Tosatto, Patrick Flagmeier, Daniel R. Whiten, ir kt. 2018.** „Quantifying Co-Oligomer Formation by  $\alpha$ -Synuclein“. *ACS Nano* 12 (11): 10855–66.  
<https://doi.org/10.1021/acsnano.8b03575>.
- Ingelsson, Martin. 2016a.** „Alpha-Synuclein Oligomers—Neurotoxic Molecules in Parkinson’s Disease and Other Lewy Body Disorders“. *Frontiers in Neuroscience* 10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00408>.
- . **2016b.** „Alpha-Synuclein Oligomers—Neurotoxic Molecules in Parkinson’s Disease and Other Lewy Body Disorders“. *Frontiers in Neuroscience* 10 (rugsèjo).  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00408>.
- Yu, Junping, Julia Warnke, ir Yuri L. Lyubchenko. 2011.** „Nanoprobng of  $\alpha$ -Synuclein Misfolding and Aggregation with Atomic Force Microscopy“. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 7 (2): 146–52.  
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.08.001>.
- Janda, Elzbieta, Laura Boi, ir Anna R. Carta. 2018.** „Microglial Phagocytosis and Its Regulation: A Therapeutic Target in Parkinson’s Disease?“. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00144>.
- Jang, Ara, He-Jin Lee, Ji-Eun Suk, Jin-Woo Jung, Kwang-Pyo Kim, ir Seung-Jae Lee. 2010.** „Non-Classical Exocytosis of Alpha-Synuclein Is Sensitive to Folding States and Promoted under Stress Conditions“. *Journal of Neurochemistry* 113 (5): 1263–74.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06695.x>.
- Jiang, Tianfang, Jake Hoekstra, Xin Heng, Wenyan Kang, Jianqing Ding, Jun Liu, Shengdi Chen, ir Jing Zhang. 2015.** „P2X7 Receptor Is Critical in  $\alpha$ -Synuclein-Mediated Microglial NADPH Oxidase Activation“. *Neurobiology of Aging* 36 (7): 2304–18. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.015>.

- Jose, Jaya C., Prathit Chatterjee, ir Neelanjana Sengupta. 2014.** „Cross Dimerization of Amyloid- $\beta$  and  $\alpha$ Synuclein Proteins in Aqueous Environment: A Molecular Dynamics Simulations Study“. *PLoS ONE* 9 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106883>.
- Jucker, Mathias, ir Lary C. Walker. 2018.** „Propagation and Spread of Pathogenic Protein Assemblies in Neurodegenerative Diseases“. *Nature Neuroscience* 21 (10): 1341–49. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0238-6>.
- Kam, Tae-In, Jared T. Hinkle, Ted M. Dawson, ir Valina L. Dawson. 2020.** „Microglia and Astrocyte Dysfunction in Parkinson’s Disease“. *Neurobiology of Disease* 144 (spalio): 105028. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105028>.
- Karpinar, Damla Pinar, Madhu Babu Gajula Balija, Sebastian Kügler, Felipe Opazo, Nasrollah Rezaei-Ghaleh, Nora Wender, Hai-Young Kim, ir kt. 2009.** „Pre-Fibrillar Alpha-Synuclein Variants with Impaired Beta-Structure Increase Neurotoxicity in Parkinson’s Disease Models“. *The EMBO Journal* 28 (20): 3256–68. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.257>.
- Kaur, Karamjeet, Jaskamal Singh Gill, Puneet Kumar Bansal, ir Rahul Deshmukh. 2017.** „Neuroinflammation - A Major Cause for Striatal Dopaminergic Degeneration in Parkinson’s Disease“. *Journal of the Neurological Sciences* 381 (spalio): 308–14. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.08.3251>.
- Kiechle, Martin, Veselin Grozdanov, ir Karin M. Danzer. 2020.** „The Role of Lipids in the Initiation of  $\alpha$ -Synuclein Misfolding“. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.562241>.
- Killinger, Bryan A., Ronald Melki, Patrik Brundin, ir Jeffrey H. Kordower. 2019.** „Endogenous Alpha-Synuclein Monomers, Oligomers and Resulting Pathology: Let’s Talk about the Lipids in the Room“. *Npj Parkinson’s Disease* 5 (1): 23. <https://doi.org/10.1038/s41531-019-0095-3>.
- Kim, Eun Kyung, ir Eui-Ju Choi. 2010.** „Pathological Roles of MAPK Signaling Pathways in Human Diseases“. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1802 (4): 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009>.
- Kim, Yonghee, Jinhong Park, ir Yoon Kyung Choi. 2019.** „The Role of Astrocytes in the Central Nervous System Focused on BK Channel and Heme Oxygenase Metabolites: A Review“. *Antioxidants* 8 (5). <https://doi.org/10.3390/antiox8050121>.
- Kim, Sangjune, Seung Pil Yun, Saebom Lee, George Essien Umanah, Veera Venkata Ratnam Bandaru, Xiling Yin, Peter Rhee, ir kt. 2018.** „GBA1 Deficiency Negatively Affects Physiological  $\alpha$ -Synuclein Tetramers and Related Multimers“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (4): 798–803. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700465115>.
- Köppen, Janett, Anja Schulze, Lisa Machner, Michael Wermann, Rico Eichentopf, Max Guthardt, Angelika Hähnel, ir kt. 2020a.** „Amyloid-Beta Peptides Trigger Aggregation of Alpha-Synuclein In Vitro“. *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030580>.
- . **2020b.** „Amyloid-Beta Peptides Trigger Aggregation of Alpha-Synuclein In Vitro“. *Molecules* 25 (3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030580>.
- Kouli, Antonina, Kelli M. Torsney, ir Wei-Li Kuan. 2018.** „Parkinson’s Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis“. *Parkinson’s Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*, sudarè Thomas B. Stoker ir Julia C. Greenland. Brisbane (AU): Codon Publications. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536722/>.

- Kovacs, Gabor G. 2019.** „Molecular Pathology of Neurodegenerative Diseases: Principles and Practice“. *Journal of Clinical Pathology* 72 (11): 725–35.  
<https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-205952>.
- Kumar, Roshan, Raniki Kumari, Sanjay Kumar, Deepak Kumar Jangir, ir Tushar Kanti Maiti. 2018.** „Extracellular  $\alpha$ -Synuclein Disrupts Membrane Nanostructure and Promotes S-Nitrosylation-Induced Neuronal Cell Death“. *Biomacromolecules* 19 (4): 1118–29. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01727>.
- Lashuel, Hilal A., Cassia R. Overk, Abid Oueslati, ir Eliezer Masliah. 2013.** „The many faces of  $\alpha$ -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target“. *Nature reviews. Neuroscience* 14 (1): 38–48. <https://doi.org/10.1038/nrn3406>.
- Lazarevic, Vesna, Sandra Fieńko, Maria Andres-Alonso, Daniela Anni, Daniela Ivanova, Carolina Montenegro-Venegas, Eckart D. Gundelfinger, Michael A. Cousin, ir Anna Fejtova. 2017.** „Physiological Concentrations of Amyloid Beta Regulate Recycling of Synaptic Vesicles via Alpha7 Acetylcholine Receptor and CDK5/Calcineurin Signaling“. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10 (liepos): 221. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00221>.
- Lee, Eun-Jung, Moon-Sook Woo, Pyong-Gon Moon, Moon-Chang Baek, In-Young Choi, Won-Ki Kim, Eunsung Junn, ir Hee-Sun Kim. 2010.** „ $\alpha$ -Synuclein Activates Microglia by Inducing the Expressions of Matrix Metalloproteinases and the Subsequent Activation of Protease-Activated Receptor-1“. *The Journal of Immunology* 185 (1): 615–23. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903480>.
- Lee, He-Jin, Sung Min Baek, Dong-Hwan Ho, Ji-Eun Suk, Eun-Duk Cho, ir Seung-Jae Lee. 2011.** „Dopamine promotes formation and secretion of non-fibrillar alpha-synuclein oligomers“. *Experimental & Molecular Medicine* 43 (4): 216–22. <https://doi.org/10.3858/emm.2011.43.4.026>.
- Lee, He-Jin, Changyoun Kim, ir Seung-Jae Lee. 2010.** „Alpha-synuclein stimulation of astrocytes“. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3 (4): 283–87. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12809>.
- Lee, He-Jin, Ji-Eun Suk, Eun-Jin Bae, Jung-Ho Lee, Seung R. Paik, ir Seung-Jae Lee. 2008a.** „Assembly-Dependent Endocytosis and Clearance of Extracellular Alpha-Synuclein“. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 (9): 1835–49. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.01.017>.
- . **2008b.** „Assembly-Dependent Endocytosis and Clearance of Extracellular  $\alpha$ -Synuclein“. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 (9): 1835–49. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.01.017>.
- Lee, He-Jin, Ji-Eun Suk, Christina Patrick, Eun-Jin Bae, Ji-Hoon Cho, Sangchul Rho, Daehee Hwang, Eliezer Masliah, ir Seung-Jae Lee. 2010.** „Direct Transfer of  $\alpha$ -Synuclein from Neuron to Astroglia Causes Inflammatory Responses in Synucleinopathies“. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (12): 9262–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.081125>.
- Lindersson, Evo, Rasmus Beedholm, Peter Højrup, Torben Moos, WeiPing Gai, Klavs B. Hendil, ir Poul H. Jensen. 2004.** „Proteasomal Inhibition by Alpha-Synuclein Filaments and Oligomers“. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (13): 12924–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306390200>.
- Longhena, Francesca, Gaia Faustini, Cristina Missale, Marina Pizzi, PierFranco Spano, ir Arianna Bellucci. 2017.** „The Contribution of  $\alpha$ -Synuclein Spreading to

- Parkinson's Disease Synaptopathy". *Neural Plasticity* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5012129>.
- Longhena, Francesca, Gaia Faustini, Maria Grazia Spillantini, ir Arianna Bellucci. 2019.** „Living in Promiscuity: The Multiple Partners of Alpha-Synuclein at the Synapse in Physiology and Pathology“. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (1). <https://doi.org/10.3390/ijms20010141>.
- Loria, Frida, Jessica Vargas, Luc Bousset, Sylvie Syan, Audrey Salles, Ronald Melki, ir Chiara Zurzolo. 2017.** „ $\alpha$ -Synuclein transfer between neurons and astrocytes indicates that astrocytes play a role in degradation rather than in spreading“. *Acta Neuropathologica* 134 (lapkričio). <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1746-2>.
- Lucas, Heather R., ir Ricardo D. Fernández. 2020.** „Navigating the Dynamic Landscape of Alpha-Synuclein Morphology: A Review of the Physiologically Relevant Tetrameric Conformation“. *Neural Regeneration Research* 15 (3): 407–15. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.265792>.
- Luth, Eric S., Tim Bartels, Ulf Dettmer, Nora C. Kim, ir Dennis J. Selkoe. 2015.** „Purification of  $\alpha$ -Synuclein from Human Brain Reveals an Instability of Endogenous Multimers as the Protein Approaches Purity“. *Biochemistry* 54 (2): 279–92. <https://doi.org/10.1021/bi501188a>.
- Ma, Jiangnan, Jing Gao, Jing Wang, ir Anmu Xie. 2019.** „Prion-Like Mechanisms in Parkinson's Disease“. *Frontiers in Neuroscience* 13: 552. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00552>.
- Malek-Ahmadi, Michael, Thomas G. Beach, Edward Zamrini, Charles H. Adler, Marwan N. Sabbagh, Holly A. Shill, Sandra A. Jacobson, ir kt. 2019.** „Faster Cognitive Decline in Dementia Due to Alzheimer Disease with Clinically Undiagnosed Lewy Body Disease“. *PLOS ONE* 14 (6): e0217566. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217566>.
- Markesbery, William R., Gregory A. Jicha, Huaichen Liu, ir Frederick A. Schmitt. 2009.** „Lewy Body Pathology in Normal Elderly Subjects“. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 68 (7): 816–22. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181ac10a7>.
- Marsh, Samuel E, ir Mathew Blurton-Jones. 2012a.** „Examining the mechanisms that link  $\beta$ -amyloid and  $\alpha$ -synuclein pathologies“. *Alzheimer's Research & Therapy* 4 (2): 11. <https://doi.org/10.1186/alzrt109>.
- . **2012b.** „Examining the mechanisms that link  $\beta$ -amyloid and  $\alpha$ -synuclein pathologies“. *Alzheimer's Research & Therapy* 4 (2): 11. <https://doi.org/10.1186/alzrt109>.
- Masaracchia, Caterina, Marilena Hnida, Ellen Gerhardt, Tomás Lopes da Fonseca, Anna Villar-Pique, Tiago Branco, Markus A. Stahlberg, ir kt. 2018.** „Membrane binding, internalization, and sorting of alpha-synuclein in the cell“. *Acta Neuropathologica Communications* 6 (1): 79. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0578-1>.
- Maslah, Eliezer, Edward Rockenstein, Isaac Veinbergs, Yutaka Sagara, Margaret Mallory, Makoto Hashimoto, ir Lennart Mucke. 2001.** „ $\beta$ -Amyloid peptides enhance  $\alpha$ -synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease“. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America* 98 (21): 12245–50.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.211412398>.
- Matsuo, Kazuya, An Cheng, Yasushi Yabuki, Ibuki Takahata, Hiroyuki Miyachi, ir Kohji Fukunaga. 2019.** „Inhibition of MPTP-Induced  $\alpha$ -Synuclein Oligomerization by Fatty Acid-Binding Protein 3 Ligand in MPTP-Treated Mice“. *Neuropharmacology* 150 (gegužès): 164–74.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.03.029>.
- Mattsson-Carlgrén, Niklas, Sebastian Palmqvist, Kaj Blennow, ir Oskar Hansson. 2020.** „Increasing the Reproducibility of Fluid Biomarker Studies in Neurodegenerative Studies“. *Nature Communications* 11 (1): 6252. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19957-6>.
- McKinnon, Chris, Mitchell L. De Snoo, Elise Gondard, Clemens Neudorfer, Hien Chau, Sophie G. Ngana, Darren M. O’Hara, ir kt. 2020.** „Early-onset impairment of the ubiquitin-proteasome system in dopaminergic neurons caused by  $\alpha$ -synuclein“. *Acta Neuropathologica Communications* 8 (1): 17. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-0894-0>.
- Meade, Richard M., David P. Fairlie, ir Jody M. Mason. 2019.** „Alpha-synuclein structure and Parkinson’s disease – lessons and emerging principles“. *Molecular Neurodegeneration* 14 (1): 29. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0329-1>.
- Mesa-Herrera, Fátima, Lucas Taoro-González, Catalina Valdés-Baizabal, Mario Diaz, ir Raquel Marín. 2019.** „Lipid and Lipid Raft Alteration in Aging and Neurodegenerative Diseases: A Window for the Development of New Biomarkers“. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (15).  
<https://doi.org/10.3390/ijms20153810>.
- Musteikytė, Greta, Akhila K. Jayaram, Catherine K. Xu, Michele Vendruscolo, Georg Krainer, ir Tuomas P. J. Knowles. 2021.** „Interactions of  $\alpha$ -Synuclein Oligomers with Lipid Membranes“. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1863 (4): 183536. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183536>.
- Nuber, Silke, Molly Rajsombath, Georgia Minakaki, Jürgen Winkler, Christian P. Müller, Maria Ericsson, Barbara Caldarone, Ulf Dettmer, ir Dennis J. Selkoe. 2018.** „Abrogating native  $\alpha$ -synuclein tetramers in mice causes a L-DOPA responsive motor syndrome closely resembling Parkinson’s disease“. *Neuron* 100 (1): 75-90.e5.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.014>.
- Obi, Kimiko, Haruhiko Akiyama, Hiromi Kondo, Yoko Shimomura, Masato Hasegawa, Takeshi Iwatsubo, Yoshikuni Mizuno, ir Hideki Mochizuki. 2008.** „Relationship of Phosphorylated Alpha-Synuclein and Tau Accumulation to Abeta Deposition in the Cerebral Cortex of Dementia with Lewy Bodies“. *Experimental Neurology* 210 (2): 409–20. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.11.019>.
- P, Alam, Bousset L, Melki R, ir Otzen De. 2019.** „ $\alpha$ -Synuclein Oligomers and Fibrils: A Spectrum of Species, a Spectrum of Toxicities.“ *Journal of Neurochemistry* 150 (5): 522–34. <https://doi.org/10.1111/jnc.14808>.
- Pariary, Ranit, Dipita Bhattacharyya, ir Anirban Bhunia. 2019.** „Mitochondrial-Membrane Association of  $\alpha$ -Synuclein: Pros and Cons in Consequence of Parkinson’s Disease Pathophysiology“. *Gene Reports* 16 (rugsėjo): 100423.  
<https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100423>.



- Park, Ji-Young, Seung R. Paik, Ilo Jou, ir Sang Myun Park. 2008.** „Microglial Phagocytosis Is Enhanced by Monomeric  $\alpha$ -Synuclein, Not Aggregated  $\alpha$ -Synuclein: Implications for Parkinson’s Disease“. *Glia* 56 (11): 1215–23. <https://doi.org/10.1002/glia.20691>.
- Parkkinen, Laura, Tuula Pirttilä, Markku Tervahauta, ir Irina Alafuzoff. 2005.** „Widespread and Abundant Alpha-Synuclein Pathology in a Neurologically Unimpaired Subject“. *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology* 25 (4): 304–14. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2005.00644.x>.
- Prabhakaran, Krishnan, Gail D. Chapman, ir Palur G. Gunasekar. 2011.** „ $\alpha$ -Synuclein Overexpression Enhances Manganese-Induced Neurotoxicity through the NF-KB-Mediated Pathway“. *Toxicology Mechanisms and Methods* 21 (6): 435–43. <https://doi.org/10.3109/15376516.2011.560210>.
- Raaij, Martijn E. van, Jeroen van Gestel, Ine M. J. Segers-Nolten, Simon W. de Leeuw, ir Vinod Subramaniam. 2008.** „Concentration Dependence of Alpha-Synuclein Fibril Length Assessed by Quantitative Atomic Force Microscopy and Statistical-Mechanical Theory“. *Biophysical Journal* 95 (10): 4871–78. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.127464>.
- Raaij, Martijn E. van, Jeroen van Gestel, Ine M. J. Segers-Nolten, Simon W. de Leeuw, ir Vinod Subramaniam. 2008.** „Concentration Dependence of  $\alpha$ -Synuclein Fibril Length Assessed by Quantitative Atomic Force Microscopy and Statistical-Mechanical Theory“. *Biophysical Journal* 95 (10): 4871–78. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.127464>.
- Reynolds, Ashley D., Jason G. Glanzer, Irena Kadiu, Mary Ricardo-Dukelow, Ananthbandhu Chaudhuri, Pawel Ciborowski, Ronald Cerny, ir kt. 2008.** „Nitrated Alpha-Synuclein-Activated Microglial Profiling for Parkinson’s Disease“. *Journal of Neurochemistry* 104 (6): 1504–25. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05087.x>.
- Roberts, Hazel L., ir David R. Brown. 2015.** „Seeking a Mechanism for the Toxicity of Oligomeric  $\alpha$ -Synuclein“. *Biomolecules* 5 (2): 282–305. <https://doi.org/10.3390/biom5020282>.
- Rocha, Natália Pessoa, Aline Silva de Miranda, ir Antônio Lúcio Teixeira. 2015.** „Insights into Neuroinflammation in Parkinson’s Disease: From Biomarkers to Anti-Inflammatory Based Therapies“. *BioMed Research International* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/628192>.
- Ruggeri, Francesco Simone, Fabrizio Benedetti, Tuomas P. J. Knowles, Hilal A. Lashuel, Sergey Sekatskii, ir Giovanni Dietler. 2018.** „Identification and Nanomechanical Characterization of the Fundamental Single-Strand Protofilaments of Amyloid  $\alpha$ -Synuclein Fibrils“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (28): 7230–35. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721220115>.
- Sabbagh, Marwan N, Charles H Adler, Tyson J Lahti, Donald J Connor, Linda Vedders, Lars K Peterson, John N Caviness, ir kt. 2009.** „Parkinson’s disease with dementia: comparing patients with and without Alzheimer pathology“. *Alzheimer disease and associated disorders* 23 (3): 295–97. <https://doi.org/10.1097/WAD.0b013e31819c5ef4>.
- Sengupta, Urmi, Ashley N. Nilson, ir Rakez Kaye. 2016.** „The Role of Amyloid- $\beta$  Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy“. *EBioMedicine* 6 (balandžio): 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.03.035>.

- Shvadchak, Volodymyr V., Lisandro J. Falomir-Lockhart, Dmytro A. Yushchenko, ir Thomas M. Jovin. 2011.** „Specificity and Kinetics of  $\alpha$ -Synuclein Binding to Model Membranes Determined with Fluorescent Excited State Intramolecular Proton Transfer (ESIPT) Probe\*,“. *Journal of Biological Chemistry* 286 (15): 13023–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.204776>.
- Siracusa, Rosalba, Roberta Fusco, ir Salvatore Cuzzocrea. 2019.** „Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies“. *Frontiers in Pharmacology* 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01114>.
- Snyder, Heather, Kwame Mensah, Catherine Theisler, Jack Lee, Andreas Matouschek, ir Benjamin Wolozin. 2003.** „Aggregated and Monomeric Alpha-Synuclein Bind to the S6' Proteasomal Protein and Inhibit Proteasomal Function“. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (14): 11753–59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208641200>.
- Stav, Ane Løvli, Dag Aarland, Krisztina Kunszt Johansen, Erik Hessen, Eirik Auning, ir Tormod Fladby. 2015.** „Amyloid- $\beta$  and  $\alpha$ -Synuclein Cerebrospinal Fluid Biomarkers and Cognition in Early Parkinson's Disease“. *Parkinsonism & Related Disorders* 21 (7): 758–64. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.04.027>.
- Swirski, Marta, J Scott Miners, Rohan de Silva, Tammaryn Lashley, Helen Ling, Janice Holton, Tamas Revesz, ir Seth Love. 2014.** „Evaluating the relationship between amyloid- $\beta$  and  $\alpha$ -synuclein phosphorylated at Ser129 in dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease“. *Alzheimer's Research & Therapy* 6 (9–9). <https://doi.org/10.1186/s13195-014-0077-y>.
- Takahashi, Makio, Li-wen Ko, Jayanarayan Kulathingal, Peizhou Jiang, Daniel Sevlever, ir Shu-Hui C. Yen. 2007.** „Oxidative Stress-Induced Phosphorylation, Degradation and Aggregation of Alpha-Synuclein Are Linked to Upregulated CK2 and Cathepsin D“. *The European Journal of Neuroscience* 26 (4): 863–74. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05736.x>.
- Tokuda, Takahiko, Sultan A. Salem, David Allsop, Toshiki Mizuno, Masanori Nakagawa, Mohamed M. Qureshi, Joseph J. Locascio, Michael G. Schlossmacher, ir Omar M. A. El-Agnaf. 2006.** „Decreased Alpha-Synuclein in Cerebrospinal Fluid of Aged Individuals and Subjects with Parkinson's Disease“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349 (1): 162–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.024>.
- Tsigelny, Igor F., Pazit Bar-On, Yuriy Sharikov, Leslie Crews, Makoto Hashimoto, Mark A. Miller, Steve H. Keller, Oleksandr Platoshyn, Jason X.-J. Yuan, ir Eliezer Masliah. 2007.** „Dynamics of  $\alpha$ -Synuclein Aggregation and Inhibition of Pore-like Oligomer Development by  $\beta$ -Synuclein“. *The FEBS Journal* 274 (7): 1862–77. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05733.x>.
- Tsigelny, Igor F., Leslie Crews, Paula Desplats, Gideon M. Shaked, Yuriy Sharikov, Hideya Mizuno, Brian Spencer, ir kt. 2008.** „Mechanisms of Hybrid Oligomer Formation in the Pathogenesis of Combined Alzheimer's and Parkinson's Diseases“. *PLoS ONE* 3 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003135>.
- Twohig, Daniel, ir Henrietta M. Nielsen. 2019a.** „ $\alpha$ -synuclein in the pathophysiology of Alzheimer's disease“. *Molecular Neurodegeneration* 14 (1): 23. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0320-x>.
- . **2019b.** „ $\alpha$ -synuclein in the pathophysiology of Alzheimer's disease“. *Molecular Neurodegeneration* 14 (birželio). <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0320-x>.

- Ugalde, Cathryn L., Victoria A. Lawson, David I. Finkelstein, ir Andrew F. Hill. 2019.** „The Role of Lipids in  $\alpha$ -Synuclein Misfolding and Neurotoxicity“. *Journal of Biological Chemistry* 294 (23): 9016–28. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.007500>.
- Underwood, Rachel, Bing Wang, Christine Carico, Robert H. Whitaker, William J. Placzek, ir Talene Yacoubian. 2020.** „Rab27b Regulates the Release, Autophagic Clearance, and Toxicity of Alpha-Synuclein“. Preprint. Neuroscience. <https://doi.org/10.1101/2020.03.09.984096>.
- Vacchi, Elena, Alain Kaelin-Lang, ir Giorgia Melli. 2020.** „Tau and Alpha Synuclein Synergistic Effect in Neurodegenerative Diseases: When the Periphery Is the Core“. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (14). <https://doi.org/10.3390/ijms21145030>.
- Vaneyck, Jonathan, Ine Segers-Nolten, Kerensa Broersen, ir Mireille M. A. E. Claessens. 2021.** „Cross-Seeding of Alpha-Synuclein Aggregation by Amyloid Fibrils of Food Proteins“. *Journal of Biological Chemistry* 296 (sausio): 100358. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100358>.
- Wang, Wei, Linh T. T. Nguyen, Christopher Burlak, Fariba Chegini, Feng Guo, Tim Chataway, Shulin Ju, ir kt. 2016.** „Caspase-1 Causes Truncation and Aggregation of the Parkinson’s Disease-Associated Protein  $\alpha$ -Synuclein“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (34): 9587–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610099113>.
- Wilms, H., P. Rosenstiel, M. Romero-Ramos, A. Arlt, H. Schäfer, D. Seegert, P. J. Kahle, ir kt. 2009.** „Suppression of MAP Kinases Inhibits Microglial Activation and Attenuates Neuronal Cell Death Induced by Alpha-Synuclein Protofibrils“. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 22 (4): 897–909. <https://doi.org/10.1177/039463200902200405>.
- Winner, Beate, Roberto Jappelli, Samir K. Maji, Paula A. Desplats, Leah Boyer, Stefan Aigner, Claudia Hetzer, ir kt. 2011.** „In Vivo Demonstration That Alpha-Synuclein Oligomers Are Toxic“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (10): 4194–99. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100976108>.
- Wong, Yvette C., ir Dimitri Krainc. 2017.** „ $\alpha$ -Synuclein Toxicity in Neurodegeneration: Mechanism and Therapeutic Strategies“. *Nature Medicine* 23 (2): 1–13. <https://doi.org/10.1038/nm.4269>.
- Zaltieri, Michela, Jessica Grigoletto, Francesca Longhena, Laura Navarria, Gaia Favero, Stefania Castrezzati, Maria Alessandra Colivicchi, ir kt. 2015.** „ $\alpha$ -Synuclein and Synapsin III Cooperatively Regulate Synaptic Function in Dopamine Neurons“. *Journal of Cell Science* 128 (13): 2231–43. <https://doi.org/10.1242/jcs.157867>.
- Zhou, Yixiu, Yuhui Sun, Quan-Hong Ma, ir Yaobo Liu. 2018.** „Alzheimer’s Disease: Amyloid-Based Pathogenesis and Potential Therapies“. *Cell Stress* 2 (7): 150–61. <https://doi.org/10.15698/cst2018.07.143>.