Genetski mehanizmi lizosomske disfunkcije u Parkinsonovoj bolesti

Blažeković, Antonela

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:075742

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Antonela Blažeković

Genetski mehanizmi lizosomske disfunkcije u Parkinsonovoj bolesti

DISERTACIJA

Zagreb, 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Antonela Blažeković

Genetski mehanizmi lizosomske disfunkcije u Parkinsonovoj bolesti

DISERTACIJA

Zagreb, 2019.

Disertacija je izrađena na Odjelu za funkcionalnu genomiku Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Disertacija je izrađena u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost Genetski mehanizmi lizosomalne disfunkcije u Parkinsonovoj bolesti (HRZZ 9386, LYSOGENE PD).

Izrada disertacije je financirana i od strane L'Oreal ADRIA d.o.o te Hrvatskog povjerenstva UNESCO-a u obliku stipendije 'Za žene u znanosti' 2018. godine.

Mentor rada: prof.dr.sc. Fran Borovečki

Su-mentor rada: prof.dr.sc. Maja Relja

Zahvaljujem se mentoru prof.dr.sc. Franu Borovečkom na povjerenju i što me još u studentskim danima uveo u svijet znanosti. Uvijek ću pamtiti rečenicu da je ono najteže u znanosti, ne odustati.

Zahvaljujem svojim kolegama s Odjela za funkcionalnu genomiku, dr.sc. Kristini Gotovac Jerčić i Filipu Josipu Binguli, koji su me naučili sve osnove laboratorijskog rada i uvijek bili spremni pomoći, ali veliko im hvala i za ugodno radno okruženje.

Posebno se zahvaljujem i dr.sc. Silvi Katušić Hećimović i kolegama iz Laboratorija za istraživanje neurodegenerativnih bolesti koji su me prihvatili i prenijeli mi svoje znanje i ljubav prema stanicama.

Zahvaljujem se i kolegici dr.sc. Anamarii Brozović za pomoć pri transdukciji te dr.sc. Vilmi Dembitz i prof.dr.sc. Dori Višnjić za pomoć pri elektroporaciji, ali i na svim savjetima i nesebičnom dijeljenju iskustva.

Mojoj dragoj obitelji zahvaljujem na ljubavi i podršci koju su mi pružili tijekom studija te što su uvijek bili uz mene i motivirali me u težnji za znanjem.

I za kraj, posebno hvala mom suprugu Ivanu, što je uvijek bio uz mene i pružao mi bezgranično razumijevanje, bez tvoje vjere u mene ne bi ni bilo ove disertacije, te mojoj Mili Katarini uz čiji smijeh je sve bilo puno lakše i kojoj posvećujem ovaj rad.

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
1.1. Parkinsonova bolest ... 1
1.1.1. Patofiziologija i etiologija bolesti ... 1
1.1.2. Klinička slika ... 4
1.1.3. Liječenje ... 6
1.2. Genetska podloga Parkinsonove bolesti ... 8
1.3. Autofagno lizosomalna disfunkcija u Parkinsonovoj bolesti ... 18
1.4. Sekvenciranje sljedeće generacije ... 21
2. HIPOTEZA ... 23
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA ... 23
3.1. OPĆI CILJ: ... 23
3.2. SPECIFIČNI CILJEVI: ... 23
4. MATERIJALI I METODE ... 24
4.1. Odabir ispitanika i prikupljanje uzoraka krvi ... 24
4.2. Izolacija DNA ... 26
4.3. Panel sekvenciranje sljedeće generacije ... 26
4.3.1. Izrada panela LYSOGENE ... 26
4.3.2. Priprema biblioteka Nextera XT protokolom ... 29
4.3.3. Priprema biblioteka SureSelect QXT Target Enrichment protokolom ... 29
4.3.4. Sekvenciranje sljedeće generacije ... 30
4.3.5. Analiza podataka sekvenciranja ... 31
4.4. Potvrdni eksperimenti na staničnim linijama ... 32
4.4.1. Stanične kulture ... 32
4.4.2. Indukcija lizosomalne disfunkcije ... 34
4.4.3. Utišavanje izražaja gena pomoću RNA-interferencije ... 35
4.4.4. Lentiviralna transdukcija s kratkim RNA ukosnicama ... 36

4.4.5. Validacija krivulje toksičnosti polybrene za SH-SY5Y stanice 37
4.4.6. Validacija krivulje toksičnosti puromicina za SH-SY5Y stanice 38
4.4.7. Validacija uspjeha utišavanja i utjecaja na lizosomalnu disfunkciju i ekspresiju aSyn 38
4.4.8. Konfokalna mikrosokopija 41
4.4.9. Eksperimenti određivanja razine proteina 41
4.4.10. Eksperimenti na RNA 43
4.5. Statistička analiza 46
5. REZULTATI 47
5.1. Rezultati sekvenciranja 47
5.2. Evaluacija staničnih linija 57
5.2.1. Lizosomalna disfunkcija uzrokovana leupeptin/NH4Cl tretmanom ne dovodi do nakupljanja aSyn monomera 58
5.2.2. Lizosomalna disfunkcija leupeptin/NH4Cl tretmanom dovodi do nakupljanja aSyn oligomera u stanicama koje pojačano eksprimiraju aSyn 60
5.3. Utišavanje gena 62
5.3.1. Validacija metoda utišavanja izražaja gena pomoću RNA-interferencije 62
5.3.2. Preliminarni rezultati na H4 stanicama 63
5.4. Rezultati stabilnog utišavanja gena shRNA 66
5.4.1. Utišavanje GALC i LRBA gena dovodi do lizosomalne disfunkcije i nakupljanja aSyn monomera 66
6. RASPRAVA 70
6.1. LYSOGENE u konteksu monogentskih oblika PB 70
6.2. Biološki putovi uključeni u patogenezu PB 72
6.3. Uloga varijanti HLA kompleksa u patogenezi PB 76
6.4. Zajednička genetska podloga lizosomalnih bolesti nakupljanja i PB 78
6.5. Lizosomalna disfunkcija i nakupljanje aSyn: dvosmjerna ulica? 81

6.6. Utišavanje *GALC, LRBA* i *ARSD* gena dovodi do lizosomalne disfunkcije i nakupljanja aSyn 83
6.7. LYSOGENE u kontekstu vremena 85
7. ZAKLJUČCI 86
8. SAŽETAK 87
9. SUMMARY 88
10. LITERATURA 89
11. ŽIVOTOPIS 100

Popis kratica

5-HT	serotonin; prema engl. *5-hydroxytriptamine*
AB	Alzheimerova bolest
ACh	acetilkolin; prema engl. *acetylcholine*
AD	autosomno dominantno
ALP	autofagno lizosomalni put
AR	autosomno recesivno
ARSD	arilsulfataza D
aSyn	alfa sinuklein; prema engl. *alpha synuclein*
ATP13A2	gen koji kodira za ATPazu tip 13A2
BCA	bicinkonična kiselina; prema engl. *bicinchoninic acid*
CMA	šaperonima-posredovana autofagija; prema engl. *chaperone-mediated autophagy*
DA	dopamin
DNA	deoksiribonukleinska kiselina; prema engl. *deoxyribonucleic acid*
EDTA	etilenediamintetraoctena kiselina; prema engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*
EGFP	zeleni fluorescentni protein; prema engl. *enhanced green fluorescent protein*
EV	stanice s nativnom ekspresijom aSyn; prema engl. *empty vector*
FBS	fetalni goveđi serum; prema engl. *fetal bovine serum*
G418	antibiotik geneticin
GABA	gamaaminomaslačna kiselina; prema engl. *gamma-aminobutanoic acid*
GALC	galaktocerebrozidaza
GB	Gaucherova bolest
GDNF	prema engl. *glial cell-derived neurotropic factor*

gDNA	genomska DNA
GWAS	cjelogenomska studija povezanosti; prema engl. *genome-wide association study*
hLGDB	baza podataka Human Lysosome Gene Database
HT1A	serotoninergički receptor; prema engl. *5-hydroxytriptamine*
LRBA	lipopolisaharid osjetljivi proteini; prema engl. LPS responsive beige-like anchor protein
LRRK2	Kinaza bogata ponavljajućim leucinima 2; prema engl. *leucine-rich repeat kinase 2*
MOI	multiplicitet infekcije; prema engl. *multiplicity of infection*
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
NGS	sekvenciranje sljedeće generacije; prema engl. *next generation sequencing*
OD	koeficijent optičke gustoće; prema engl. *optic density*
PADK	Z-Phe-Ala-diazometilketon
PB	Parkinsonova bolest
PBS	fosfatni pufer sa soli; prema engl. *phosphate-buffered saline*
PCR	lančana reakcija polimerazom; prema engl. *polymerase chain reaction*
PINK1	gen koji kodira za PTEN induciranu putativnu kinazu; prema engl. *PTEN-induced putative kinase 1*
RNA	ribonukleinska kiselina; prema engl. *ribonucleic acid*
SBS	sekvenciranje sintezom; engl. *sequencing by synthesis*
SDS	natrij dodecil sulfat; prema engl. *sodium dodecil sulphat*
shRNA	kratka RNA ukosnica; prema engl. *short hairpin RNA*
siRNA	kratka interferirajuća RNA; prema engl. *short interfering RNA*
SNpc	crna tvar; prema lat. *substantia nigra pars compacta*
TAE pufer	tris/acetat/EDTA pufer

TEMED	tetrametiletilendiamin
TU	transdukcijska jedinica; prema engl. *transduction unit*
UPDRS	dijagnostička skala za PB; prema engl. *Unified Parkinson's Scale Rating*
VPS35	vakuolarni protein sortiranja 35; prema engl. *Vacuolar protein sorting-associated protein 35*
WT	stanice s pojačanom ekspresijom aSyn; prema engl. *wild type*

1. UVOD

1.1. Parkinsonova bolest

Parkinsonova bolest (PB) jest idiopatsko, sporoprogresivno oboljenje središnjeg živčanog sustava. Radi se o drugom najčešćem neurodegenerativnom poremećaju karakteriziranom bradikinezijom, tremorom u mirovanju, rigidnošću i posturalnom nestabilnošću. Bolest je prvi put opisao 1817. godine engleski liječnik James Parkinson, koji ju naziva drhtajućom paralizom (eng. *shaking palsy*) u svojoj publikaciji pod originalnim nazivom 'An Essay on the Shaking Palsy'. Muškarci imaju 1,5 puta veću vjerojatnost obolijevanja od PB nego žene (1), a starenje je dominantan čimbenik rizika. Incidencija bolesti raste s dobi. Najveća je u populaciji ljudi preko 50 godina starosti te prvenstveno zahvaća populaciju osoba starijih od 65 godina. Iako, važno je naglasiti, postoji trend porasta broja pacijenata mlađe dobi te se procjenjuje da se u četiri posto osoba oboljelih od PB, bolest dijagnosticira prije dobi od 50 godina. PB pogađa oko 3% ljudi starijih od 75 godina (2) i oko 0,4% onih mlađih od 40 godina. Srednja životna dob oboljelih je 57 godina. Više od 10 milijuna ljudi širom svijeta živi s PB (3). Osobe s jednim ili više bliskih rođaka oboljelih od PB imaju povećan rizik da i sami razviju bolest. Međutim, osim ako obitelj nema poznatu gensku mutaciju za bolest, ukupni rizik je i dalje ispod 5%. Osim dobi, spola i genetskih čimbenika postoje i drugi čimbenici koji povećavaju rizik obolijevanja od PB, uključujući izloženost toksinima iz okoliša. PB nije sama po sebi letalna bolest, nego uzrokuje pogoršanje normalnog funkcioniranja s vremenom. Zanimljivo je da prosječni životni vijek oboljelih od PB odgovara prosječnom životnom vijeku zdrave populacije. Neuropatološki je bolest karakterizirana preferencijalnom, ali ne i ekskluzivnom degeneracijom dopaminergičkih neurona u dijelu mozga poznatome kao crna tvar (SNpc; prema lat. *substantia nigra pars compacta*) koja proizvodi dopamin (DA) te prisutnošću agregata proteina alfa sinukleina (aSyn) u citoplazmi neurona. Također su pogođeni i drugi subkortikalni neuronski sustavi. Budući da je točan uzrok bolesti nepoznat, ne postoji adekvatan tretman za izlječenje bolesti.

1.1.1. Patofiziologija i etiologija bolesti

Patogeneza PB nije u potpunosti razjašnjena. Poznato je da okolišni i genetski čimbenici mogu pridonijeti neurodegenerativnom procesu, no sam mehanizam njihovog utjecaja nije

jasan. Dolazi do gubitka dopaminergičkih pigmentnih neurona u bazalnim ganglijima, SNpc, jezgri *locus ceruleus* te skupini dopaminergičkih neurona u moždanom deblu. Gubitkom tih neurona dolazi do snižavanja razine DA. U zdravom mozgu DA regulira ekscitabilnost strijatalnih neurona uključenih u kontrolu ravnoteže pokreta tijela. Neadekvatna razina DA uzrokuje smanjenu inhibiciju aktivnosti strijatalnih neurona, dopuštajući im prekomjerno izbijanje signala. Taj fenomen oboljelima otežava kontrolu nad vlastitim kretanjem uzrokujući motorne simptome poput tremora, rigora i bradikinezije. Važno je naglasiti da je prilikom pojave prvih simptoma 60-80% dopaminergičkih neurona u području SNpc izgubljena. Osim DA, serotonin (5-HT, prema engl. *5-hydroxytriptamine*) također igra važnu ulogu u razvoju simptoma PB, uključujući tremor, kognitivne poremećaje, depresiju i psihozu, kao i L-dopa-induciranu diskineziju (4). Važnost 5-HT projekcija u srednjem mozgu za razvoj tremora u mirovanju pokazuje i činjenica da je kod oboljelih od PB izgubljeno približno 25% serotoninergičkih receptora (HT1A) u srednjoj jezgri *raphe* (5). Pokazan je i snažan odnos između pada 5-HT u mozgu oboljelih od PB i razvoja depresije. Još jedan neurotransmiter je smanjen u nekoliko neuroloških bolesti, uključujući PB i Alzheimerovu bolest (AB). Radi se o acetilkolinu (Ach, prema engl. *acetylcholine*) koji ima značajnu ulogu u kognitivnim funkcijama. U bazalnoj jezgri Meynert (lat. *nucleus basalis Meynert*), pretežno kolinergičkoj jezgri, u bolesnika s PB, AB ili drugim oblicima demencije uočeni su različiti obrasci neuronskog gubitka koji snažno podupiru ideju uključivanja kolinergičkog sustava u PB (5). Postmortalnom analizom moždanog tkiva, ove promjene su pokazane predominantno u oboljelih od PB s kognitivnim smetnjama, sugerirajući uključenost ACh u razvoju kognitivne disfunkcije PB (6). Recentna istraživanja sve više naglašavaju važnost i inhibitornog neurotransmitera gamaaminomaslačne kiseline (GABA, prema engl. *gamma-aminobutanoic acid*) u razvoju PB. GABA kontrolira ulazak kalcija izravno preko GABA receptora kao i posredno putem mreže astrocita (5). Ca^{2+}/GABA mehanizam stabilizira neuronsku aktivnost. U slučaju PB, zbog oštećenja mitohondrija, Ca^{2+} puferski sustav postaje oštećen uzrokujući Ca^{2+} ekscitotoksičnost koja dovodi do gubitka neurona u SNpc (7). Funkcija DA-neurona je i u olfaktornom sustavu kontrolirana od neurotropnog čimbenika GDNF (prema engl. *glial cell-derived neurotropic factor)* koji je također reguliran Ca^{2+}/GABA mehanizmom. Uočeno je da približno 80% novodijagnosticiranih bolesnika s PB ima abnormalan osjet njuha, što je posljedica oštećenja DA-neurona u olfaktnim bulbusima (8). Eksperimentalni dokazi ukazuju da PB također utječe i na prefrontalni korteks, anteriornu cingularnu moždanu vijugu i / ili frontostriatalne putove (5). Iako točan mehanizam dopaminergijskog neuronskog gubitka u SNpc nije dobro poznat, predlagani procesi u podlozi bolesti uključuju mitohondrijsko

oštećenje, oksidativni stres, ekscitotoksičnost, pogrešno oblikovanje proteina i njihovu agregaciju, oštećenje mehanizama transporta proteina, poremećaj staničnih autonomnih mehanizama, kao i da se radi o "prionskoj proteinskoj infekciji" (5).

Smanjenje dopaminergičke aktivnosti u bazalnim ganglijima može uslijediti i uslijed drugih degenerativnih poremećaja, lijekova ili egzogenih toksina te se takvo stanje naziva sekundarnim parkinsonizmom. Iako je idiopatska PB najčešći oblik parkinsonizma, oko 15 posto pojedinaca sa simptomima koji upućuju na PB imaju jedan od poremećaja poznatih pod nazivom atipični parkinsonski poremećaj. Najčešći egzogeni uzrok je uzimanje antipsihotika koji djeluju antagonistički na dopaminergičke receptore. Osim toga i pojedini antiemetici, antidepresivi te blokatori kalcijevih kanala mogu dovesti do sekundarnih parkinsonizama. Obično nakon prestanka upotrebe tih lijekova parkinsonizam postupno nestaje. Druga stanja koja mogu uzrokovati sekundarne parkinsonizme uključuju idiopatske degenerativne bolesti poput multiple sistemske atrofije, progresivne supranuklearne paralize, kortikobazalnog sindroma, demencije s Lewyjevim tjelešcima zatim hidrocefalus, strukturne lezije mozga, subduralni hematom, Wilsonova bolest, ali i različita trovanja poput trovanja ugljičnim monoksidom ili manganom. Opisano je i nekoliko toksina iz okoliša koji se povezuju s sporadičnim oblikom PB, koji se djelomično može oponašati u eksperimentalnim životinjskim modelima PB, kao što je upotreba 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) i parakvata (9). Za razliku od sporadičnih oblika, obiteljski slučajevi su rijetki i ne uklapaju se u potpunosti u konvencionalnu kliničku sliku PB, što još dodatno otežava razumijevanje patogeneze PB.

Sinukleinopatije, uključujući PB, su skupina neurodegenerativnih poremećaja karakteriziranih akumulacijom aSyn, malog neuron specifičnog proteina uključenog u sinaptičku funkciju (10). Iako klinički divergentne, sinukleinopatije karakterizira prisutnost agregiranog, netopivog aSyn koji se agregira u Lewyjevim tijelešcima i Lewyjevim neuritima unutar mozga oboljelih (11). ASyn veže lipide i periferno je povezan s membranama, a zbog te sposobnosti vezanja lipida i povezivanja s membranama uključen je u kontrolu vezikularnog transporta. Preklapa se kada je povezan s membranama, a inače se nalazi u „rasklopljenom“ stanju s mogućnošću stvaranja toksičnih oligomernih vrsta. Istraživanja su pokazala da i topivi oligomeri aSyn koji su međuprodukti u formiranju fibrila, mogu biti citotoksični (12). Fibrilacija aSyn počinje dimerizacijom djelomično nabranih monomera (13), nakon čega slijedi nastajanje ionskih nefibronskih oligomernih međuprodukata, također poznatih kao protofibrili (14). Međutim, in vivo čimbenici koji diktiraju formiranje i stabilizaciju ovih

putativno toksičnih međuprodukata nisu poznati (15). Oligomeri, protofibrili i fibrili aSyn kao i drugih nepravilnih amiloidnih proteina rade pore u membrani, uzrokujući neuronsku smrt oksidativnim stresom, gubitkom energije, ekscitotoksičnošću i neuroinflamacijom (16). Prekomjerna ekspresija aSyn u modelima životinja i stanične kulture pokazala je nakupljanje njegovih agregata u mitohondrijima, deficit mitohondrijske pokretljivosti i smanjenje mitohondrijskog membranskog potencijala. Jedna intracerebroventrikularna infuzija oligomera aSyn u miševa uzrokuje razvoj motoričkih i nemotoričkih simptoma uz smanjeni sadržaj DA u kaudatusu i putamenu (17). Slično tome, mutacije *SNCA* (prema engl. *synuclein alpha)* gena (npr. A53T, A30P, E46K i H50Q) uzrokuju obiteljski oblik PB karakteriziran ranom pojavom, brzim napredovanjem i pojavom demencije. Jedan od postmortalno vidljivih znakova bolesti jest nakupljanje Lewyjevih tijelešaca koji sadrže nekoliko nepravilnih amiloidnih proteina, uključujući aSyn, fosforilirani tau i amiloidni beta protein u neuronima SNpc PB pacijenata. Međutim, čak se kod 25% pacijenata s klinički prisutnim parkinsonizmom postmortalno ne pronalaze Lewyjeva tjelešca (18). Iako ta podskupina uglavnom obuhvaća pacijente s multiplom sustavnom atrofijom i progresivnom supranuklearnom paralizom, postoje genetski dokazi da neki pacijenti oboljeli od PB (PARK2, PARK8) nemaju agregate proteina u obliku Lewyjevih tjelešaca (18). Proučavanje normalne funkcije aSyn dovelo je do prepoznavanja novog proteina, sinfilina 1 (19) s motivima ankirina koji ukazuju na njegovu potencijalnu ulogu kao citoskeletnog proteina. Prekomjerna ekspresija obaju bjelančevina dovodi do stvaranja eozinofilnih inkluzijskih tjelešaca u kulturi stanica. Nadalje, sinfilin 1 je također identificiran kao komponenta Lewyjevih tjelešaca (20). Identificirana je i Arg621Cys mutacija u genu za sinfilin 1 u dva nezavisna sporadičnih bolesnika oboljelih od PB (21) koji dalje podupiru zajednički patomehanizam bolesti.

1.1.2. Klinička slika

Važno je naglasiti da se klinička slika PB znantno razlikuje između pacijenata. Bolest obično počinje postepeno te je teško odrediti njen točan početak. Simptomi koji se obično povezuju s PB su rigor, tremor i bradikinezija. Rigor označava stanje pojačanog tonusa mišića dovodeći do otežane pokretljivosti. Izvanjskim pomicanjem zglobova dobiva se efekt zupčanika. Tremor opisuje nevoljno drhtanje mišića koje je kod ove bolesti prisutno prvenstveno u mirovanju te su karakteristične tipične kretnje ruku poput brojanja novaca. Tremor je

uglavnom spore frekvencije. Iako je obično najizraženiji na šakam, rukama te nogama, može biti prisutan i tremor donje čeljusti pa čak i vjeđa. Bradikinezija podrazumijeva usporeno započinjanje i izvođenje pokreta, a hipokinezija jest smanjena količina pokreta. Potonje zbog smanjene mimike rezultira licem poput maske, a oboje dovodi do mikrografije i otežavanja svakodnevnih aktivnosti. Osobi je teško započeti hodati i zaustaviti se, a postura osobe postaje pogrbljena. Kako osoba duže hoda tako se koraci sve više usitnjuju i ubrzavaju (festinacija). Isto tako postepeno dolazi do gubitka posturalnih refleksa te uz pogrbljeno držanje i pomaka težišta prema natrag jednostavno se izaziva retropulzija, a prema naprijed propulzija. Osim motoričkih smetnji, vrlo su česti i neurološki i kognitivni simptomi. Isto tako, sve više se naglašava važnost gubitka osjeta mirisa kao jednog od diskretnih prvih pokazatelja vremena nastupanja bolesti. Prema Braakovoj hipotezi prvi znakovi PB pojavljuju se u enteričkom živčanom sustavu, meduli i olfaktornom živcu. Progresijom bolesti dolazi do zahvaćanja i propadanja dopaminergičkih neurona SNpc i korteksa tijekom vremena. Ta se teorija sve više oslanja na dokaze da nemotorički simptomi, kao što su gubitak osjećaja mirisa (hipogamija), poremećaji spavanja i zatvor mogu prethoditi tipičnim motoričkim značajkama bolesti čak za nekoliko godina. Iz tog razloga, istraživači su sve više usredotočeni na ove ne-motorne simptome kako bi otkrili PB što je prije moguće i tražili načine za zaustavljanje progresije.

Liječnici često koriste Hoehn i Yahrovu ljestvicu za procjenu napretka bolesti tijekom godina. Ljestvica je prvobitno provedena 1967. godine i uključivala je stupnjeve nula do pet, gdje nula označava stanje bez znakova PB, a pet opisuje uznapredovali oblik. Kasnije je promijenjena kako bi postala izmijenjena Hoehn i Yahr skala. Kao što je već naglašeno progresija bolesti je postepena te se simptomi razlikuju između pacijenata. No, uobičajeno se tijek bolesti može podijeliti u nekoliko faza. Tijekom početne faze bolesti, osoba ima blage simptome koji općenito ne ometaju svakodnevno funkcioniranje te dnevne aktivnosti. Početni simptomi su suptilni i napreduju polako, zbog čega se bolest rijetko otkriva u ovoj fazi. Uključuju blagi tremor, teškoće u položaju tijela, tiši govor, sporiji rukopis, nedostatak pokreta udova, abnormalni izraz lica, gubitak fokusa misli, umor, razdražljivost ili depresija. Tremor i drugi motorički simptomi tipično se pojavljuju samo unilateralno tj. dominantno su izraženi na jednoj strani tijela. Obitelj i okolina primjećuje promjene u položaju, hodanju i izrazima lica. Tijekom sljedeće faze se simptomi počinju pogoršavati. Tremor, rigor te drugi motorički simptoma zahvaćaju obje strane tijela. Osoba još uvijek može živjeti sama, ali svakodnevni zadaci postaju otežani te je njihovo provođenje dugotrajnije. Tijekom trećeg stupnja sve više do izražaja dolazi gubitak ravnoteže i sporost kretanja zbog čega je ova faza

obilježena češćim padovim. Osoba je i dalje potpuno neovisna, ali simptomi značajno otežavaju aktivnosti poput odijevanja i prehrane. Zaista teški i ograničavajući simptomi su prisutni tijekom četvrte faze. Moguće je stajati bez pomoći, ali hodanje je otežano. Osoba treba pomoć u aktivnostima svakodnevnog života i ne može živjeti sama. Konačno, najteži oblik bolesti jest peta faza u kojoj je stajanje i hodanje onemogućeno zbog rigora nogu. Osoba zahtijeva invalidska kolica ili je vezana za postelju. Osoba može doživjeti halucinacije i deluzije.

Osim opisane Hoehn i Yahrove ljestvice koristi se još i UPDRS skala (prema engl. *Unified Parkinson's Scale Rating*) koja se koristi za opisivanje nemotornih simptoma, uključujući kognitivno funkcioniranje, raspoloženje i društvenu interakciju. Uračunava kognitivne poteškoće, sposobnost obavljanja svakodnevnih aktivnosti i komplikacije liječenja. Iako su simptomi i progresija bolesti jedinstveni za svaku osobu, poznavanje tipičnih stadija PB važno je za objektivnu procjenu brzine progresije bolesti. Neki pacijenti doživljavaju promjene tijekom 20 ili više godina dok kod drugih bolest napreduje znatno brže.

1.1.3. Liječenje

Iako je bolest prvi put opisao 1817. godine dr. James Parkinson, prva otkrića o njenoj biokemijskoj podlozi dogodila su se tek sredinom prošlog stoljeća. No, ni dan danas uzrok bolesti nije u potpunosti rasvijetljen te ne postoji učinkoviti lijek za liječenje PB. Iako PB sama nije letalna, komplikacije bolesti mogu biti ozbiljne. Centar za kontrolu i prevenciju bolesti ocijenio je da komplikacije od PB zauzimaju 14. mjesto uzroka smrti u Sjedinjenim Državama. Mogućnosti liječenja kojima se prvenstveno djeluje na simptome bolesti uključuju medikamentoznu terapiju i operativne zahvate. Zbog već opisane degeneracije SNpc dopaminergičkih neurona i smanjenja razine DA u podlozi bolesti, trenutna medikamentozna terapija PB ima za cilj prvenstveno povećati razine DA u strijatumu te tako smanjiti motoričke simptome. Ovakav pristup daje određene rezultate, no ne sprječava neurodegeneraciju niti djeluje neuroprotektivno. Danas je zlatni standard u liječenju PB levodopa (L-dopa), DA prekursor koji je sposoban prijeći krvno moždanu barijeru te se u mozgu putem L-aminokiselinske dekarboksilaze metabolizira do DA. L-dopa tijekom vremena gubi na učinkovitosti te više od 80% bolesnika koji su na terapiji dulje od 10 godina doživljavaju diskinezije i motorne fluktuacije poznate kao „on-off“ fenomeni (22). Motorne

fluktuacije se pojavljuju prije sljedeće doze u obliku povratka motornih simptoma, neki pacijenti mogu doživjeti disforiju, tjeskobu ili senzorne pojave te druge nemotorne simptome. Zanimljivo je da L-dopa pomaže kod svih motornih simptoma, ali ne i posturalne nestabilnosti te ponekad ne pomaže ni kod tremora. Vrlo često se koristi u kombinaciji s inhibitorom perifernog metabolizma DA, odnosno inhibitorima periferne dekarboksilaze (karbidopa ili benserazid).

Osim prekursora DA, za smanjenje motornih simptoma bolesti koriste se i agonisti DA receptora kao što su apomorfin, bromokriptin, ropinirol, pramipeksol i rotigotin (22). Ovi lijekovi se vrlo često kombiniraju s L-dopom što omogućava smanjnje potrebne doze L-dope kao i smanjenje „on-off" fenomena. Apomorfin ima subkutanu aplikaciju i može se davati u obliku jednokratnih aplikacija, ili u kontinuiranom obliku putem pumpe. Sljedeća meta djelovanja lijekova s ciljem povećanja razine DA jest smanjenje njegovog metabolizma. Tako se koriste MAO-B i COMT inhibitori. Nakon prijenosa DA u nedopaminergične postsinaptičke neurone ili glia stanice monoamin oksidaza B (MAO-B) ga deaminira odnosno katehol-O-metiltransferaza (COMT) metilira nakon čega slijedi deaminacija (23). Danas se koriste ireverzibilni MAO-B inhibitori selegilin i rasagiline te COMT inhibitori entakapone i tolkapone. Dok se COMT inhibitori najčešće koriste kao suplementarna terapija L-dopi, MAO-B inhibitori se češće koriste u obliku monoterapije jer je pokazano da u kombinaciji s levodopom ili karbidopom mogu dovesti do vrlo teških nuspojava. Osim djelovanja na razinu DA u terapiju su uključeni i antikolinergici koji moduliraju još jedan za motoriku izrazito bitan neurotransmiter, acetil kolin. Ovim pristupom se najuspješnije reguliraju tremor i diskinezija.

Posljednjih godina se osim medikamentozne terapije u liječenju PB sve više okreće drugim, alternativnim metodama poput duboke stimulacije mozga (DBS, prema engl. *deep brain stimulation).* Iako evidentno ima pozitivan učinak na smanjenje motoričkiih simptoma, mehanizmi putem kojih DBS modulira osnovne moždane mreže i učinci lokalne stimulacije na funkcioniranje mozga još uvijek nisu u potpunosti jasni (24). Danas se DBS prvenstveno ugrađuje kod pacijenata oboljelih od PB s perzistentnim tremorom i izraženim motornim fluktuacijama. Elektrode se najčešće ugrađuju u subtalamičku jezgru (STN; prema lat. *subthalamic nucleus*) ili jezgru latinskog naziva *globus pallidus internus* (GPi). Bilateralni STN-DBS učinkovito poboljšava motorne fluktuacije, bradikineziju i tremor, dok bilateralna GPi stimulacija manje djeluje na smanjenje tremora (24).

Iako je razvijeno nekoliko novih terapijskih mogućnosti za PB, nijedna od njih nije uspjela zaustaviti progresiju bolesti. Trenutno dostupna simptomatska terapija ima zadovoljavajući učinak u ograničenog broja bolesnika. Zanimljivo, najnovija istraživanja u transplantaciji matičnih stanica i genskoj terapiji privukle su posebnu pozornost kao alternativne strategije liječenje PB. Na primjer, genetski modificirani DA-neuroni pokazali su obećavajuće rezultate u mišjim modelima PB (25). Slično, pomoću lentivirusnih ili rekombinantnih adeno-povezanih virusnih vektora (rAAV), moguće je djelovati na neke od disfunkcionalnih metaboličkih putova koji su uključeni u PB (26). Nadalje, nove tehnike za prekrajanje gena kao CRčISPR-Cas9 imaju veliki potencijal za liječenje PB (5). Veliki napori se ulažu u potrazi za biomarkerima PB koji bi omogućili raniju dijagnozu te pravovremenu terapiju te u konačnici sprječavanje progresije bolesti. No, trenutno, sve terapije korištene za PB poboljšavaju simptome bez usporavanja ili zaustavljanja progresije bolesti.

1.2. Genetska podloga Parkinsonove bolesti

Svega oko 10 do 15 posto svih slučajeva PB smatra se nasljednim oblicima bolesti (monogeni). Preostalih 85 do 90 posto slučajeva klasificirano je kao sporadično. Ipak, prisutnost bolesti unutar prvih rođaka povećava rizik od oboljenja od PB. Danas se zna da je PB uzrokovana složenom interakcijom genetiskih i negenetskih čimbenika. Posljednjih desetljeća mnogi okolišni čimbenici, kao što su ruralni životi, izloženosti pesticidima i herbicidima te industrijski zagađivači, predlagani su kao rizični čimbenici za oboljenje od PB, dok je genetski doprinos razvoju bolesti dugo ostao kontroverzan. Međutim, studije jasno pokazuju veće stope konkordancije kod monozigotnih (45%) u odnosu na dizigotne blizance (28%) (27). Pristup genetskim kartografijama u rijetkim obiteljskim slučajevima s autosomnim recesivnim i autosomnim dominantnim nasljeđivanjem PB sugerira široku genetsku heterogenost bolesti. Iako su monogenski oblici PB izrazito rijetki, istraživanja tih bolesti značajno su pridonijela razumijevanju genetskih mehanizama i staničnih procesa koji pridonose bolesti. Proučavanjem upravo ovih bolesti postignut je znatan napredak u razumijevanju patogenetike PB. Ubrzo nakon otkrivanja prvih mutacija u *SNCA* genu 1997. godine, identificirane su brojne druge mutacije koje utječu na razvoj i tijek bolesti. Pokazalo se da monogenske bolesti uključuju vrlo rijetke autosomno dominantno bolesti (jedan do dva posto osoba oboljelih od PB), koje su posljedica prisutnost vrlo penetrantne mutacije gena kao što su *SNCA* (PARK1; kodira za α-sinuklein), *LRRK2* (PARK8; kodira za dardarin) i *VPS35*

(kodira za protein vakuolskog proteinskog sortiranja 35) (2). Autosomno recesivne oblike bolesti uzrokuju promjene u oba alela primjerice *PINK1* (PARK6; PTEN inducirana kinaza 1), *DJ-1* (PARK7), *Parkin* (PARK2), *ATP13A2* (PARK9), *FBXO7* i *PLA2GB* gena (2) (Tablica 1.1.). Isto tako, promjene mogu biti i u genima koji predstavljaju čimbenike povećanog rizika od razvoja PB kod nekih obitelji. Upravo u ovoj posljednjoj skupini je otkrivena povezanost *GBA* gena koji kodira za lizosomalni enzim β-glukocerebrozidazu i PB. Jedinstvene varijante s nepotpunom penetracijom u *LRRK2* i *GBA* pokazale su se kao jaki čimbenici rizika za PB u određenim populacijama. Osim toga, pokazano je da više od 20 zajedničkih varijanti s malim pojedinačnim učinkom može modulirati rizik za PB. Pristup sekvenciranju cijelog genoma značajno je pripomogao u potrazi za shvaćanjem uloge genetičkih čimbenika rizika u patogenezi PB.

Tablica 1.1. Geni povezani s PB

Simbol	**Gene**	**Genski produkt**	**Tip nasljeđivanja**	**Kromosomski lokus**
PARK1/PARK4	*SNCA*	Alfa sinuklein (aSyn)	AD	4q21.3-q22
PARK2	*Parkin*	Parkin RBR E3 ubikvitin protein ligaza	AR	6q25.2–q27
PARK3	Nepoznato	Nepoznato	AD	2p13
PARK5	*UCHL1*	Ubiquitin C-terminalna hidrolaza L1	AD	4p13
PARK6	*PINK1*	PTEN inducirana putativna kinaza 1	AR	1p36.12
PARK7	*DJ-1*	DJ-1	AR	1p36.23
PARK8	*LRRK2*	Kinaza bogata ponavljajućim leucinima 2	AD	12q12
PARK9	*ATP13A2*	ATPaza tip 13 A2	AR	1p36
PARK10	Nepoznato	AAOPD	Rizični čimbenik	1p32

PARK11	Nepoznato	GIGYF2 (GRB10 interakcijski protein GYF2)	AR	2q36-37
PARK12	Nepoznato	Nepoznato	Rizični čimbenik	Xq21–q25
PARK13	*HTRA2*	HtrA serinska peptidaza 2	AD	2p13.1
PARK14	*PLA2G6*	Fosfolipaza A2 skupine VI	AR	22q13.1
PARK15	*FBX07*	F-box protein 7	AR	22q12.3
PARK16	Nepoznato	Nepoznato	Rizični čimbenik	1q32
PARK17	*VPS35*	Vakuolarni protein sortiranja 35	AD	16q12
PARK18	*EIF4G1*	Eukariotski translacijski inicijacijski factor 4	AD	3q27.1
PARK19	*DNAJC6*	Auksilin	AR	1p31.3
PARK20	*SYNJ1*	Sinaptojanin-1	AR	21q22.11

AR-autosomno recesivno, AD-autosomno dominantno

Prema: Pavlou MAS, Outeiro TF. Epigenetics in Parkinson's Disease. Adv Exp Med Biol. 2017;978:363-390.

SCNA (PARK1)

Prva mutacija povezana s PB bila je u genu *SCNA* (Ala53Thr u egzonu 4). Otkrivena je 1997. godine u velikoj talijanskoj obitelji, a potom je identificirana i u tri grčke obitelji s obiteljskim oblikom PB (28). Mutacije u *SCNA* genu rijedak su uzrok autosomno dominantnog oblika PB. *SNCA* kodira mali protein od 140 aminokiselina koji može biti u obliku monomerna ili oligomera male molekulske mase do amiloidnih fibrila velike molekulske mase koji se nalaze u Lewyjevim tijelima. Ubrzo nakon otkrića mutacija gena *SNCA*, Spillantini i suradnici (29) utvrdili su da je aSyn glavni protein u sastavu Lewyjevih tjelešaca, nakupina u mozgu oboljelih od PB. ASyn se uglavnom nalazi u citosolu gdje je vezan za lipidne raftove (30).

Isto tako poznata je interakcija aSyn sa članovima obje obitelji Rab i SNARE, ukazujući i na njegovu ulogu u vezikularnom transportu (31; 32). *SNCA* knockout miševi pokazali su mitohondrijske lipidne abnormalnosti i oštećenje lanca elektronskog transporta te su postali manje osjetljivi na mitohondrijske toksine (5). Proučavanjem DA-neurona mozga oboljelih od PB zabilježeno je oštećenja mitohondrijske deoksiribonukleinske kiseline (DNA, prema engl. *deoxyribonucleic acid*), disfunkcija dišnog lanca te povećan oksidativni stres (5). Prva otkrivena mutacija, Ala53Thr, je ujedno i najčešća, no kroz vrijeme su otkrivene i druge mutacije. Mutacija A30P je opisana u njemačkoj obitelji s familijarnim oblikom PB (21), a mutacija p.E46K u jednoj španjolskoj obitelji (33). Osim toga, opisane su i duplikacije kao i triplikati kodirajuće regije *SNCA* gena, pronađene čak i u sporadičnim slučajevima PB (34). Klinički fenotip povezan sa *SNCA* mutacijama sastoji se od progresivnog kognitivnog propadanja, autonomne disfunkcije i demencije. Prosječna dob početka bolesti kod pacijenata s p.A53T mutacijom je 46 godina, dok je u obitelji s p.A30P mutacijom, koja nije potpuno penetrantna, nešto kasnija (52 godina) (2). Mutacija p.E46K uzrokuje dominantan tip PB s izraženom demencijom. Simptomima počinju između u dobi od 50 i 65 godina, a demencija se pojavljuje unutar 2 godine od dijagnoze (2). Genomska dupliciranja i triplicacije na lokaciji *SNCA* uzrokuju rano pojavljivanje PB s težinom fenotipa koji korelira s brojem kopija *SNCA*. Triplicacija aSyn uzrokuje brzo progresivnu PB s ranim početkom. Klinička prezentacija uvelike varira od teške idiopatske PB do PB s demencijom ili demencijom s Lewyjevim tjelešcima (2). Iako su mutacije u *SNCA* jasan uzrok PB i prisutnost agregata aSyn je patognomoničan znak PB, normalna funkcija aSyn ostaje slabo poznata.

PARKIN (PARK2)

Drugi otkriveni gen koji se povezuje s PB jest parkin čija mutacija uzrokuje autosomno recesivni juvenilni oblik PB. Parkin je jedan od najvećih gena ljudskog genoma i kodira za 463-aminokiselinsku E3-ubiquitin ligazu sastavljenu od ubikvitin-slične domene i tri RING (prema eng. *really interesting new-gene)* domene na karboksi kraju kojima je zadužen za interakciju s ubikvitinskom mašinerijom (35). E3-ubiquitin ligaza se kovalentno veže s ubikvitinom različitih nepravilnih proteinskih supstrata te time potpomaže njihovoj degradaciji (35). Mutacije u parkinu dovode do gubitka njegove funkcije i time gubitka ubikvitinacije svojih supstrata. Supstrati parkina su između ostaloga i određeni glikozilirani oblici aSyn te sinfilin-1 (36). Iako se smanjenje kapaciteta ubikvitacije dobro uklapa s

hipotezom oštećenja ubikvitnom posredovanog procesa degradacije proteina u PB, ne objašnjava zašto mutacije u Parkinu dovode do agregacije proteina, ali ne i nakupljanja Lewyjevih tjelešaca. Pokazano je da mutacije parkina mogu uzrokovati i agregaciju nepravilnih amiloidnih proteina unutar SNpc. Kod parkin-deficijentnih miševa i kod oboljelih od PB uzrokovane mutacijom parkina pokazan je gubitak neurona u području koje se naziva *locus ceruleus* (37). Opisano je preko 800 egzonskim mutacija s preko 147 različitih proteinskih promjena parkina od kojih je trećina posljedica promjene jednog nukleotida, 13% su manje delecije, a 54% su veće delecije ili duplikacije koje uključuju jedan ili više egzona (38). Ovaj veliki broj mutacija parkina uključujući promjene na svih 12 egzona. Mutacije parkina su najčešći poznati uzrok juvenilnog oblika PB te se pronalaze u 77% familialnih slučajeva s početkom bolesti ispod 30 godina starosti (39). Mutacije parkina mogu uzrokovati značajno smanjenje enzimatske aktivnosti enzima ubiquitin-ligaza u SNpc što može značajno smanjiti proces degradacije proteasoma. Osim toga, parkin je također uključen u regulaciju oslobađanja DA iz SNpc (40). Oboljeli od autosomno recesivnog juvenilnog oblika PB uzrokovanog mutacijom parkina imaju izrazito tešku kliničku sliku kod koje se prvi simptomi bolesti javljaju nerijetko i prije dvadeste godine života. Razlikuje se od uobičajenih sporadičnih oblika s obzirom na njegovu raniju manifestaciju, nedostatak Lewyjeva tijela i pojavu atipičnih simptoma. Tipična klinička slika oboljelih od ovog oblika PB jest pojava simptoma u dobi nižoj od 40 godina, prisutnost distonije stopala, psihijatrijskih simptoma te izrazito dobar odgovor na terapiju (41). Kao što je navedemo, zanimljivo je da kod ovih oboljelih nema tipičnog postmortalnog znaka PB, odnosno nema Lewyjevih tjelešaca. Smatra se da je nedostatak Lewyjevih tjelešaca posljedica ranog nastupa bolesti. Međutim, postoje i obitelji s mutacijama parkina, u kojima se klinički fenotip ne razlikuje od većine bolesnika s idiopatskim PB.

PINK1 (PARK6)

PINK1 gen koji kodira za PTEN induciranu putativnu kinazu (eng. *PTEN-induced putative kinase 1* PINK1) nalazi se na kromosomu 1. Radi se o serin/treonin-proteinskoj kinazi veličine 63 kDa, koja je lokalizirana u mitohondrijima i štiti neurone od stanja induciranih mitohondrijskim oštećenjem (42). Pokazano je da PINK1 može djelovati kao čimbenik preživljavanja stanica. Mutacija *PINK1* gena povezuje se s autosomno recesivnim juvenilnim oblikom PB karakteriziranom izrazito dobrim odgovorom na terapiju levodopom te

odsutstvom pojave demencije (43). U oboljelih mutacija uzrokuje pojačanu osjetljivost stanica na oštećenja (42). Mutacije *PINK1* gena također su povezane s mitohondrijskim disfunkcijama i degeneracijom SNpc neurona, što u konačnici dovodi do razvoja PB (42). Kane i suradnici (44) su pokazali da PINK1 fosforilira ubikvitin što rezultira aktivacijom parkin E3 ubikvitinskom aktivnošću te na taj način sudjeluje u regulaciji mitohondrija. PINK1 se stabilizira na mitohondrijama s nižim membranskim potencijalom i kao takav regrutira parkin iz citosola. Jednom kad se regrutiraju do mitohondrija, parkin postaje enzimatski aktivan i inicira uklanjanje mitohondrija pomoću lizosoma (mitofagija) (35). Saznanje da PINK1 fosforilira parkin prilikom regulacije mitofagije oštećenih mitohondrija navela je na razmišljanje da je i poremećaj kontrole kvalitete mitohondrija uključen u patogenezu PB, što ukazuje da različiti stanični putovi dovode do različitih oblika fenotipa u PB (2).

DJ-1 (PARK7)

DJ-1 gen obuhvaća sedam egzona koji kodiraju protein koji pripada obitelji proteina C56 pepidaze. DJ-1 je dimer koji se sastoji od 189 aminokiselina te je lokaliziran u citoplazmi, jezgri i mitohondrijima te funkcionira kao stanični senzor oksidativnog stresa (45). Smatra se da je funkcija DJ-1 zaštita stanice od oksidativnog stresa te da ima ulogu u održavanju normalne dopaminergičke funkcije u nigrostriatalnom putu. Neuroprotektivna uloga ovog proteina očituje se i u njegovoj ulozi u regulaciji aktivnosti određenih gena povezanih s preživljivanjem stanice, transkripcijskom regulacijom i proteaznom aktivnošću (45). Osim toga sudjeluje u aktivnosti šaperona utječući na sposobnost inhibicije agregacije aSyn ključnog događaja u stvaranju Lewyjevih tjelešaca (45). *DJ-1* deficijentni miševi pokazuju motoričke deficite, smanjenu aktivnost u D2 tipu DA receptora i povećavu osjetljivost na MPTP (46). Sukladno tome, mutacije *DJ-1* uzrokuju autosomno recesivni oblik PB. Klinička slika koja se javlja kao posljedica mutracije navedenog gena odgovara kliničkoj slici uzrokovanom mutacijama *parkina* i *PINK1*.

LRRK2 (PARK8)

Jedan od najčešćih uzroka familijarnog oblika PB jest mutacija *LRRK2* gena (eng. *Leucine-rich repeat kinase 2*) na kromosomu 12 koji kodira za leucinom bogatu ponavljajuću kinazu 2

koja se još naziva dardarin. Radi se o multidomenskom, pretežno citoplazmatskom proteinu veličine 268 kDa. Mutacija *LRRK2* gena izvorno je mapirana u velikoj japanskoj obitelji s autosomno dominantnim oblikom PB s nepotpunom penetracijom (47). Ubrzo su mutacije otkrivene i u više europskih obitelji (48). Poznat je veliki broj mutacija navedenog gena, međutim, samo za manji broj postoji dokaz patogenosti p.R1441C/G/H, p.Y1699C, p.S1761R, p.I2012T, p.G2019S i p.I2020T (2). Najčešće proučavana mutacija jest p.G2019S. Dok je česta kod pacijenata sa sjevera Afrike, Bliskog istoka i Aškenazi Židova, ostaje rijetka u azijskim populacijama, gdje čini manje od 1% *LRRK2* mutacija (2). Važno je da se p.G2019S također detektira i u sporadičnim PB slučajevima te je prisutna i u do 10% sporadičnih PB slučajeva širom svijeta. Penetracija p.G2019S mutacije ovisi o dobi (2). Pokazalo se da ova mutacija dosljedno povećava aktivnost kinaze (49). Budući da su protein kinaze idealni ciljevi za terapiju lijekovima, mnogo je truda usmjereno na razumijevanje uloge LRRK2 kinazne aktivnosti na početku bolesti. Međutim, do danas nije utvrđena jasna fiziološka podloga ove mutacije u nastanku bolesti (49). Smith i suradnici (50) su koristeći koimunoprecipitaciju ustanovili da LRRK2 eksprimiran u stanicama u kulturi djeluje u interakciji s parkinom, ali ne i s aSyn, DJ-1 niti tau. Mali udio od stanica koje su prekomjerno eksprimirale LRRK2 sadržavale su proteinske agregate, dok je taj udio uvelike povećan koekspresijom parkina (50). Osim toga, parkin povećava ubikvitinciju agregata, a taj proces je potaknut i s LRRK2 stimulacijom ubikvitin ligaze parkina. Interakcija LRRK2 i parkina se odvija preko RING domene parkina, tj preko istog mjesta preko kojeg se odvija i interakcija parkina i synphilina-1 (50). Pacijenti s *LRRK2* mutacijom obično imaju kasni početak bolesti sa sporom progresijom simptoma. Pacijenti dobro reagiraju na terapiju levodopom, a demencija nije uobičajena. Neuropatološki nalazi uglavnom su nedosljedni, pokazujući pleomorfnu patologiju mozga s inkluzijama Lewyjevih tjelešaca, ali i drugih proteina (tau i ubikvitin) ili se vidi degeneracija SNpc bez Lewyjevih tjelešaca (51).

ATP13A2 (PARK9)

Homozigotne ili složene heterozigotne mutacije u *ATP13A2* gena uzrokuju rijedak juvenilan nasljedni oblik parkinsonizma s demencijom, Kufor-Rakeb sindrom (OMIM 606693). Bolest je karakterizirana slabijim odgovorom na terapiju levodopom te dodatnim atipičnim značajkama bolesti kao što su distonija i supranuklearna paraliza (35). Gen *ATP13A2* kodira za ATPazu tip 13A2, lizosomalni transmembranski protein P-tipa koji igra ulogu u autofagno

lizosomalnim putovima (ALP) (52) kao i u funkciji mitohondrija (53). Protein ATP13A2 obično se nalazi u lizosomatskoj membrani i ima 10 transmembranskih domena i ATPaznu domenu (54). Opisano je oko 10 različitih patogenih mutacija *ATP13A2* koji izravno ili neizravno utječe na transmembranske domene. Većina mutacija proizvodi skraćene proteine koji su nestabilni i zadržavaju se u endoplazmatskom retikulumu i nakon toga degradiraju u proteasomima. Iako je za razvoj bolesti potrebna mutacija oba alela sugerirajući potpuni gubitak funkcije proteinskog produkta gena u podlozi bolesti, otkriveno je da se PARK9 izražava na 10 puta višoj razini u preživjelim neuronima SNpc bolesnika sa sporadičnim oblicima PB. Mutacije u ATP13A2 su vrlo rijedak uzrok parkinsonizma, no predstavljaju važan model povezanosti funkcije autofagno lizosomalnih puteva i PB. Gitler i suradnici (31) su u sklopu genetskog istraživanja potencijalnih modifikatora toksičnosti aSyn otkrili da ortolog ljudskog *ATP13A2* gena u kvascu označen kao *YOR291W* suzbija aSyn toksičnost. Lentiviralnom transfekcijom *ATP13A2* neuronalnih embrionalnih stanica s koje eksprimiraju mutirani aSyn pokazali su potentan protektivan zaštitni učinak ATP13A2 od štetnog učinka aSyn toksičnosti (31).

VPS35 (PARK17)

Prvi gen povezan s PB otkriven metodom sekvenciranja sljedeće generacije bio je *VPS35* koji kodira proteina za sortiranje vakuola 35 (55). Mutacija p.D620N potvrđena je i Sangerovim sekvenciranjem, a nije pronađena u skupini od više od 650 kontrolnih ispitanikaa. Ova mutacija je pronađena kod svakog pogođenog pojedinca u proučavanoj obitelji te je pokazan autosomno dominantan način nasljeđivanja (55). Sekvencioniranje cijelog kodirajućeg dijela *VPS35* gena otkrilo je pregršt drugih mutacija p.G51S, p.M57I, p.T82R, p.I241M, p.P316S, p.R524W i p.L774M, međutim mutacije za sada nisu potvrđene kao sigurno patogene. Mutacije *VPS35* gena su rijedak uzrok PB uzrokujući svega 1% familijarnih te 0,2% sporadičnih oblika PB (2). Kod oboljelih od PB koji u podlozi bolesti imaju mutaciju *VPS35* gena, bolest koja se javlja prosječno u dobi od 53 godine, obilježena je bradikinezijom, tremorom u mirovanju te dobrim odgovorom na terapiju levodopom (2). VPS35, ključna je komponenta kompleksa retromera koji služi za razvrstavanje staničnog tereta unutar endocitnog sustava. Retromeri igraju važnu ulogu u transportu membranskih proteina između endosoma i Golgijevih tjelešaca (56). Točni mehanizmi kojima ti geni doprinose PB nisu potpuno istraženi (57). Istraživanja su pokazala da je ekspresija VPS35 proteina smanjena u

SNpc bolesnika s PB i u hipokampusu bolesnika s AB (58). Ova klinička ispitivanja pokazuju abnormalnost VPS35/retromera u oba PB i AB, što upućuje na to da disfunkcija ili nedostatak VPS35/retromera može biti čimbenik rizika za patogenezu PB i AB.

GBA

Gaucherova bolest (GB) je autosomno recesivna lizosomalna bolest nakupljanja i posljedica mutacije *GBA* gena koji kodira za lizosomalni enzim glukocerebrozidazu. *GBA* gen se nalazi na kromosomu 1q21, a enzim kojeg kodira je potreban za razgradnju glukocerebrozida u ceramid. Ukoliko je funkcija tog enzima smanjena dolazi do nakupljanja glukocerebrozida. Bolest se prema simptomima dijeli u tri kategorije ovisno o prisutnosti neuroloških simptoma. Najčešći tip 1 nema neurološke simptome, dok oboljeli s tipom 3 imaju kronične neurološke simptome. Osim toga uočeno je i da manji broj oboljelih koji dožive odraslu dob pati od parkinsonizama. Upravo i ideja da postoji odnos između GB i PB zasnovana je na opažanjima PB-a kod bolesnika i kod rodbine GB pacijenata. I heterozigoti i homozigoti za GlcCerase mogu razviti PB (59). Prva publikacija koja jasno opisuje pojavu parkinsonizama u oboljelih od tipa 1 GB jest iz 1996. godinr od Neudorfera i suradnika (60). Primijetili su izrazito progresivan oblik parkinsonizma koji karakteristično započinje od četvrtog do šestog desetljeća života te je izrazito refraktoran na konvencionalnu terapiju koja se koristi kod PB. Kasnije je zabilježeno da pacijenti s GB i parkinsonizmom često imaju rođake s parkinsonizmom koji su heterozigotni za *GBA* mutacije (61). Veza između GB-a i PB-a bila je dodatno poduprta nizom studija u različitim populacijama širom svijeta. Tako je učestalost GBA mutacija kod PB pacijenata bila prikazana u 16 centara, a jaka povezanost između GBA mutacija i PB pokazala se. (62). Pacijenti s PB koji su imali GBA mutacije bili su mlađi u vrijeme dijagnoze nego bolesnici koji nisu nosili mutaciju te su imali više atipičnih manifestacija bolesti. Isto tako, pokazano je da pacijenti s parkinsonizmom imaju povećanu učestalost *GBA* mutacija čineći *GBA* najčešćim poznatim genetski čimbenikom rizika za PB (62). *GBA* mutacije mijenjaju razine lipida, što dovodi do lizosomalne bolesti nakupljanja koja može inducirati sinukleinopatije kao i autofagno lizosomalnu disfunkciju. Mazzulli i suradnici (15) pokazali su da uklanjanje *GBA* u kortikalnim neuronima dovodi do akumulacije aSyn. Pokazali su i da intracelularne razine glukocerebrozida kontroliraju formiranje topljivih toksičnih nakupina aSyn u kultiviranim neuronima, mišu i ljudskom mozgu, što dovodi do neurodegeneracije. Nakupljanje aSyn dodatno pridonosi patogenom ciklusu inhibiranjem

lizosomalnog sazrijevanja i aktivnosti normalne glukocerebrozidaze, što rezultira dodatnom akumulacijom glukocerebrozida i povećanjem broja oligomera aSyn sugerirajući da povišene razine toksičnih vrsta aSyn dovode do iscrpljivanja lizosomne glukocerebrozidaze i daljnje stabilizacije aSyn oligomera pomoću akumulacije glukocerebrozida. Taj se proces koji pospješuje samopropagirajuće pozitivne povratne veze nastavlja sve dok se ne nadmaši patogeni prag dovodeći do neurodegeneracije. Nadalje, iako su pokazali povećanje aSyn u dopaminergičkim neuronima deriviranim pluripotentnih matičnih stanica (iPS; prema engl. *imortal Pluripotent stem cels*) pacijenata oboljelih od GB nisu vidjeli značajnu akumulaciju huntingtina ili tau (15). Više je studija pokazalo da je aktivnost glukocerebrozidaze niža kod pacijenata koji nose *GBA* mutacije i u sporadičnim PB slučajevima, što upućuje na širu ulogu *GBA* u metabolizmu sfingolipida i lizosoma u patogenezi PB (63). Velayati i suradnici (64) su opisali da su mutacije GBA gena povezane ne samo s razvojem PB već i s LBD.

Iako još nije u potpunosti istražena, posljednjih godina je postignut znatan napredak u razumijevanju genetske podloge PB. Vrlo penetrantne mutacije koje proizvode rijetke monogene oblike bolesti otkrivene su u singularnim genima kao što su *SNCA, LRRK2, VPS35, Parkin, PINK1 i DJ-1,* dok su se jedinstvene varijante s nepotpunom penetracijom u *LRRK2 i GBA* pokazale kao jaki čimbenici rizika za PB u određenim populacijama (2). Osim toga, pokazano je više od 20 zajedničkih varijanti koje moduliraju rizik obolijevanja od PB. Sekvenciranje cijelog genoma uvelike je olakšao shvaćanje genetske podloge PB. S pojavom strategija sekvenciranja nove generacije i cjelogenomskim studijama povezanosti (GWAS) ubrzano se otkrivaju geni koji povećavaju rizik za pojavu PB i počinju se rasvjetljavati stanični putove kritični za patogenezu bolesti. Kako se povećava popis gena udruženih s PB do izražaja dolazi i važnost shvaćanja njihovih interakcija. Već su dobro poznate interakcije između pojedinih gena primjerice između parkina i *PINK1* koja je povezala oštećenje mitohondrija s PB (44), *LRRK2* i *parkina* kojim je naglašena važnost ubikvitinacije agregata u PB (50), *ATP13A2* i aSyn pri kojoj *ATP13A2* suprimira toksičnost aSyn (31) te *GBA* i aSyn kojim je pokrenut novi smjer istraživanja lizosomalne disfunkcije u PB (15; 57). Mogućnost grupiranja nekih PB gena u povezane funkcionalne mreže olakšat će razvoj učinkovitijih ciljnih terapijskih intervencija.

U svrhu razumijevanja patogeneze i patofiziologije bolesti presudno je istražiti izravne biološke posljedice poznatih varijanti rizika. Kako tehnologije kao što su proteomika, transkriptomika, sekvencioniranje sljedeće generacije i imunoprecipitacija kromatina omogućuju uvid u funkcionalnu ulogu nekodirajućih DNA regija, tumačenje i označavanje tih

područja s obzirom na regulatorne elemente podržat će prepoznavanje vjerojatnih gena kandidata. Nadalje, identifikacija biomarkera u krvi i/ili cerebrospinalnoj tekućini koja bi mogla pomoći klasificiranju pojedinaca s povećanim rizikom od PB, prije nego što su prisutni glavni klinički simptomi i gubitak DA ne bi samo pomogli u ranoj dijagnozi, već bi mogli omogućiti praćenje progresije bolesti i evaluaciju terapije.

1.3. Autofagno lizosomalna disfunkcija u Parkinsonovoj bolesti

PB je bolest nakupljanja aSyn. Uzrok nakupljanja nije jasan, no nije jasan ni razlog zašto tijelo ne razgrađuje nakupljene proteine. Postoje dva glavna puta za proteolizu važna u razgradnji aSyn, lizosomni i proteasomni sustav (65). Prvotno se smatralo da se aSyn razgrađuje proteasomima te da abnormalnosti proteasomske degradacije aSyn leže u podlozi PB. Tome u prilog je išla činjenica da je proteasomska disfunkcija poznati uzrok pojedinih neurodegenerativnih poremećaja, a mutacije kod gena koji kodira parkin (E3-ubiquitin ligaza) uzrokuju monogeni oblik PB. Ipak pojedine studije nisu pokazale promjenu u razini aSyn nakon proteazne inhibicije što upućuje da postoje alternativni oblici razgradnje aSyn (66; 67). Dok proteini s kratkim poluživotima uglavnom razgrađuju proteasom, većina citosolnih proteina s dugim poluživotima (>10 sati) razgrađuje se autofagijskim putevima unutar lizosoma. Poznato je i da mutirani *ATP13A2* gen dovodi do lizosomalne disfunkcije što zauzvrat može uzrokovati toksičnu agregaciju te posljedično Kufor Rakeb sindrom.

Tijekom posljednjih nekoliko godina, sve više istraživanja upućuje da mutacije koje se povezuju s određenim oblicima PB smanjuju autofagiju. Autofagija je degradativni put koji donosi citoplazmatski sadržaj lizosomima za degradaciju i predstavlja glavni put za degradaciju agregiranih staničnih proteina i disfunkcionalnih organela. Isto tako, pokazano je da starenje smanjuje autofagnu aktivnosti u gotovo svim stanicama i tkivima te da ta degradacija autofagije pridonosi različitim aspektima fenotipa starenja i pogoršanju štetnih bolesti povezanih s dobi (68). Smanjenje proteolitičke aktivnosti smatra se barem dijelom odgovornim za nakupljanje oštećenih staničnih komponenti u gotovo svim tkivima starenja organizama. Promjene u lizosomalnom sustavu i smanjenje autofagne aktivnosti opisane su mnogo prije nego što je molekularna osnova za taj proces potpuno proučena. Morfološke značajke starenja lizosomskog sustava poput širenje lizosomnih odjeljaka, nakupljanja autofagnih vakuola i taloženja neotopljenog materijala unutar lizosoma u obliku

autofluorescentnog pigmenta nazvanog lipofuscin opisani su i u stanicama mnogih tkiva uključujući i mozak (68). Neuspjeh mehanizama kontrole kvalitete osobito je izražen u postmitotskim stanicama u kojima distribucija oštećenih komponenata u stanice kćeri nije moguća jer stanice više ne prolaze dijeljenje stanica. Ukoliko je zaista prisutan poremećaj autofagno lizosomalnog puta u PB, pojačavanje funkcije autofagnne regulacija bi bila obećavajuća terapeutska strategija kojom bi se stanice mogle zaštiti od toksičnosti agregatima-sklonih proteina u neurodegenerativnim bolestima.

Autofagija je evolucijski očuvani proces degradacije odgovoran za razgradnju i recikliranje većine intracitoplazmatskih proteina i organela. Razlikujemo tri tipa autofagije: mikroautofagija, šaperonima-posredovana autofagija (CMA, eng. chaperone-mediated autophagy) i makroautofagija. Mikroautofagija uključuje degradaciju citosolnih sadržaja kroz male invaginacije u lizosomskoj membrani, dok CMA uključuje selektivnu translokaciju citoplazmatskih proteina u lizosomalni lumen (68). CMA je jedina vrsta autofagije koja zahtijeva razvijanje proteinskog supstrata u citosolu prije internalizacije u liposomima, dok šaperoni u lizosomalnom lumenu povlačenje proteinski supstrat preko lizosomalne membrane. Da bi proteini došli u lizosomalni lumen potrebna je interakcija s receptorskim proteinom LAMP-2A (lysosome-associated protein type 2A) i s kompleksom lizosoalnih šaperona s obje strane lizosomalne membrane (69). Razine LAMP-2A u lizosomskoj membrani mogu se povećati smanjenom razgradnjom i/ili redistribucijom iz lizosomalnog lumena do lizosomalne membrane. Nedavni rezultati pokazuju da se CMA također aktivira oksidacijskim stresom, a u ovom slučaju LAMP-2A se povećava zbog transkripcijskog reguliranja. CMA se može smanjiti inhibitorima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (69). Smanjenje CMA uzrokuje da su stanice osjetljivije na stres. Smanjena CMA u starenju je rezultat smanjenja LAMP-2A u lizosomalnoj membrani uzrokovanog povećanom degradacijom LAMP-2A (69). Iako se CMA maksimalno aktivira pod stresom, u mnogim vrstama stanica prisutne su različite razine bazalne aktivnosti. Pokazano je da sekvenca aSyn sadrži pentapeptidnu sekvencu (95VKKDQ99) koja je u skladu s motivom prepoznavanja CMA (67). Zanimljivo je da se divlji tip aSyn učinkovito degradira u lizosomima pomoću CMA, dok se mutirani aSyn unatoč visokom afmitetu za CMA receptor njime neučinkovito degradira (67). Mutirani aSyn blokira i lizosomalno unošenje i degradaciju drugih CMA supstrata. CMA blokada zatim dovodi do kompenzacijske aktivacije makroautofaga koji, pod tim uvjetima, ne može održavati normalnu brzinu degradacije proteina. Mutiranim alfasinukleinom oštećena funkcija CMA dodatno doprinosom njegovoj agregaciji ili dodatnim

modifikacijama. Mutantirani alfa-synuclein također inhibira degradaciju drugih dugotrajnih citosolnih proteina pomoću CMA, što može dodatno pridonijeti staničnom stresu, što može uzrokovati da se stanica osloni na alternativne puteve degradacije ili da agregira oštećene bjelančevine (67).

Makroautofagija je najopsežniji analizirani i kvantitativno važniji tip autofagije te se često podrazumijeva pod autofagijom u užem smislu. Podrazumijeva izdvajanje cijeliih regija citosola de novo formiranom limitirajućom membranom koja se zatvara u transijentnu struktur, fagoforu. Nakon širenja fagofora i zatvaranja rubova, dobivena vezikula naziva se autofagosom (70). Ove vezikule s dvostrukom membranom dobivaju proteaze potrebne za razgradnju sekvestriranog materijala spajanjem sa sekundarnim lizosomima. Ova serija događaja regulirana je nizom proteina koji se nazivaju geni povezani s autofagijom (ATG). Eksperimentalno pojačana ekspresija mutantnog aSyn dovodi do aktivacije makroautofagije, no iako aktivacija makroautofagije degradira mutantne proteine i mislocalizira sinukleine u autofagične organele, inhibicija makroautofagije ne mijenja razgradnju divljeg tipa alfa-sinukleina (67).

Posljednjih godina postalo je jasno da i selektivni i neselektivni tipovi autofagije postoje i održavaju degradaciju tvari poput agregata i oštećenih organela (poput mitohondrija (mitofagija), peroksisoma i endoplazmatskih retikuluma). Pokazalo se da mutacije povezane s brojnim neurodegenerativnim bolestima koje se manifestiraju s intracitoplazmatskim proteinskim agregatima utječu na uklanjanje ovih supstrata kompromitiranjem autofagije (71, 72).

Genetske studije dovele su do otkrića kauzalnih mutacija u nasljednim oblicima PB, a za brojne je pokazano da imaju funkcije povezane s autofagijom. One se mogu podijeliti u mutacije koje utječu na mitofagiju ili uzrokuju poremećaj prijenosa ili lizosomskalnu disfunkciju (72). U skladu s konvergencijskim dokazima koji upućuju na oslabljenu autofagiju u PB, nedavna meta-analiza (GWAS) identificirala je nove lokuse rizika PB koji bi mogli igrati ulogu u funkciji autofagije i lizosoma (73).

Mitohondriji su organeli neophodni za stvaranje energije. Kao što je navedeno ranije studije genetičke povezanosti identificirale su mutacije PINK1 i u autosomalnom recesivnom juvenilnom obliku PB. PINK1 i Parkin koordinirano reguliraju mitofagiju, što je presudno za uklanjanje neispravnih mitohondrija iz stanica (72). Mitohondrijska peptidaza (MPP, mitochondrial processing peptidase) i presenilin pridruženi protein (PARL presenilin-

associated rhomboid-like protein) cijepaju PINK1. Pocjepani PINK1 se ubikvitinira te konačno razgrađuje. Međutim, kada u stanjima oštećenih mitohondrija, PINK1 se akumulira na vanjskoj mitohondrijskoj membrani, gdje fosforilira parkin, što dovodi do njegove aktivacije (44). Aktivirani parkin se taloži u obliku lanaca na oštećene mitohondrije, koje zatim fosforilira PINK1. Ovaj proces omogućava vezanje autofagnih receptora, kao što su NDP52 i Optineurin, koji služe kao signali za autofagno uklanjanje regrutiranjem fagofora koji sadrže LC3 (72).

Prisutnost inkluzijskih tijela koja sadrže aSyn utječe na sazrijevanje i spajanje autofagoma s lizosomima, što rezultira smanjenjem degradacije proteina (74). In vitro studije pokazuju da prisutnost aSyn inkluzije specifično inhibira transport endocitnih i autofagnih vezikula (75). Mutacija VPS35 gena koja dovodi do autosomno dominantnog oblika PB također dovodi do disfunkcije autofagije. VPS35 je sastavni dio retromernog kompleksa, koji je potreban za sortiranje proteina i transport transmembranskih receptora između endosoma i Golgija (56, 72). VPS35 djeluje u interakciji s Parkinom koji zatim ubikvitinira VPS35, a gubitak Parkina smanjuje membransku povezanost VPS35 (72). Osim toga, pretpostavlja se da mutacija D620N VPS35 utječe na endolizosomalni put što dovodi do povećane agregacije aSyn (56). Dhungel i suradnici (57) pokazali su da miševi s divljim tipom VPS35 u usporedbi s D620N VPS35 imaju smanjen broj aSyn inkluzija i smanjen gubitak neurona.

1.4. Sekvenciranje sljedeće generacije

Određivanje sekvenci nukleinski kiselina započelo je Sangerovim sekvenciranjem koje se dugi niz godina smatralo „zlatnim standardom“ za DNA sekvenciranje. Upravo ta tehnologija omogućila je i projekt sekvenciranja humanog genoma. Ipak ta metoda je vrlo dugotrajna i skupa te je za taj projekt bilo potrebno 13 godina i 2.7 milijarde dolara. Početkom masivnog paralelnog sekvenciranje velikog broja amplificiranih DNA fragmenata u protočnoj komori (engl. *flow cell*) koje se naziva sekvenciranje sljedeće generacije (next-generation sequencing, NGS) započinje nova era u kojoj podaci o genima postaju sve dostupniji. Sekvenciranje sljedeće generacije se provodi ponavljanjem ciklusa produljivanja nukleotida pomoću polimeraze ili uzastopnim ciklusima ligacije oligonukleotida. Dodani nukleotidi se identificiraju pomoću signala koji se emitiraju kako se svaki fragment resintetizira na osnovu lanca DNA koji služi kao predložak. A izrazita brzina dobivanja podataka moguća je jer se

proces odvija u milijunima paralelnih reakcija, umjesto da je ograničen na jedan ili nekoliko fragmenata DNA. Zbog priprode samog postupka potrebno je fragmentirati genomsku DNA te prepraviti krajeve kako bi se napravio 5´ fosforilirani tupi kraj DNA. Takvi kalupi se amplificiraju u tzv. „bridge“ amplifikaciji, gdje DNA lanci nadsvođuju susjedni vezani nukleotid i vežu se na njega. Takav postupak se ponavlja više puta te nastaju tzv. klasteri, tj. nakupine amplificiranih DNA molekula, od kojeg svaki sadrži oko 1000 molekula klonova. Prije očitavanja nukleitida klasteri se denaturiraju, te kemijskim reakcijama i ispiranjima ostaje samo „forward“ lanac. Sekvenciranje započinje hibridizacijom početnice komplementarne sekvence adaptora, uz dodavanje polimeraze i četiri različito fluorescentno obojena nukleotida. Danas najčešće korištena platforma za panel sekvenciranje je MiSeq američke kompanije Illumina.

Tehnologija NGS može se osim toga koristiti ne samo za sekvenciranje genomske DNA, nego i za sekvenciranje transkriptoma i malih RNA. Kada govorimo o sekvenciranju DNA ovisno o aplikaciji razlikujemo sekvenciranje cijelog genoma, egzoma, panel sekvenciranje te sekvenciranje pojedinačnih gena. ili eksprimiranog dijela genoma (egzoma). Sekvenciranje cijelog genoma danas se pretežno koristi u istraživačke svrhe, posebice u polju proučavanja mehanizama bolesti dok upotreba sekvenciranja egzoma i panela ima vrlo važnu dijagnostičku ulogu. Pomoću panel sekvenciranja koje je brže i cjenovno prihvatljivije, dobivaju se detaljne informacije o varijantama specifičnih gene za koje je pokazano da uzrokuju bolesti ili predstavljaju visokorizične gene. Kao početni materijal koristi se genomska DNA izolirana iz krvi pacijenta, što je prednost s obzirom da je krv lako dostupan materijal za analizu. Navedena metoda uz potvrdu kliničke dijagnoze, pomaže kliničarima u prognozi tijeka bolesti te vođenju liječenja, kao i u provođenju genetskog savjetovanja s obiteljima. Od velike važnosti kod upotrebe panela u dijagnostičke svrhe, svakako je savjetovanje koje će obuhvatiti sva ključna pitanja poput limita ovakvog testiranja, mogućih rezultata, te implikacije panel sekvenciranja za pacijenta, a samim time i članove obitelj. Napretkom genomike i razvojem genomskih tehnologija koje postaju sve pristupačnije i prisutnije u laboratorijima diljem svijeta, ipak je učinjen napredak u odnosu na prijašnje dijagnostičke pristupe.

2. HIPOTEZA

Genetske varijante lizosomalnih gena povezane su sa sniženom aktivnošću autofagno-lizosomalnog puta u bolesnika s Parkinsonovom bolešću što dovodi do nakupljanja alfa-sinukleina.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. OPĆI CILJ:

Glavni cilj ove studije je utvrditi temeljne genetske mehanizme koji dovode do lizosomalne disfunkcije u bolesnika oboljelih od idiopatske Parkinsonove bolesti što bi olakšalo shvaćanje uzroka nakupljanja ključnog proteina alfa-sinukleina u nekim oblicima Parkinsonove bolesti.

3.2. SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Konstruirati genomski panel koji se sastoji od 440 gena povezanih s lizosomalnim putovima, neurodegeneracijom i alfa-sinukleinopatijama

2. Provesti sekvenciranje sljedeće generacije obogaćenih regija DNA uzoraka ispitanika oboljelih od idiopatske Parkinsonove bolesti te kontrolnih ispitanika

3. Bioinformatički odrediti specifične varijante genotipa/mutacije prisutne u ispitanika oboljelih od Parkinsonove bolesti u odnosu na kontrolne ispitanike

4. Karakterizirati otkrivene mutacije u SH-SY5Y staničnim linijama pomoću utišavanja ekspresije gena

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Odabir ispitanika i prikupljanje uzoraka krvi

U istraživanje je uključen 51 ispitanik obolio od PB i 20 zdravih kontrolnih ispitanika. Ispitanici oboljeli od PB su izabrani i klinički dijagnosticirani od strane neurologa na Klinici za neurologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb prema dijagnostičkim kriterijima United Kingdom Brain Bank Criteria (Tablica 4.1.). Zdravi kontrolni ispitanici također su izabrani u Kliničkom bolničkom centru Zagreb te uključuju dobrovoljce bez neuroloških bolesti. Ispitanici oboljeli od PB i kontrolni ispitanici upareni su po dobi i spolu. Svi potencijalni ispitanici detaljno su informirani o svrsi i načinu provedbe istraživanja te su dobili informirani pristanak, prethodno odobren od svih nadležnih etičkih povjerenstava. Uključeni su u istraživanje samo ako su bili suglasni sa svim potrebnim postupcima. Niti jedan postupak nije se proveo prije potpisivanja informiranog pristanka.

Tablica 4.1. Dijagnostički kriteriji za postavljenje kliničke dijagnoze PB- United Kingdom Brain Bank Criteria

1. Dijagnoza Parkinsonove bolesti

- Bradikinezija
- I najmanje jedno od sljedećeg:

a. rigor
b. tremor u mirovanju (4-6 Hz)
c. posturalna nestabilnost koja nije uzrokovana primarnom vizualnom, vestibularnom, cerebelarnom ili proprioceptivnom disfunkcijom.

2. Kriteriji isključenja za Parkinsonovu bolest

- Povijest ponavljanih ishemijskih moždanih udara s postupnim napredovanjem simptoma PB.
- Povijest ponavljanih ozljeda glave.
- Povijest dijagnoze encefalitisa.
- Okulogirične krize.
- Neuroleptično liječenje na početku simptoma.
- Više od jednog oboljelog rođaka.
- Stabilna remisija simptoma.
- Strogo jednostrane značajke nakon tri godine.
- Paraliza supranuklearne sfere.
- Cerebellarni znakovi.
- Rana autonomna uključenost.
- Rana teška demencija s poremećajima pamćenja, jezika i praksije.
- Pozitivan Babinski znak.
- Prisutnost cerebralnog tumora ili hidrocefalusa na CTu.
- Negativan odgovor na velike doze levodope (ako je isključena malapsorpcija).
- MPTP ekspozicija.

3. **Potporni pozitivni kriteriji za Parkinsonovu bolest.** Tri ili više potrebnih za dijagnozu određene PB

- Unilateralan nastup simptoma.
- Prisutan tremor.
- Progresivan tijek.
- Trajna asimetrija koja zahvaća jače stranu prvih simptoma.
- Odličan odgovor (70-100%) na levodopu.
- Teška levodopom inducirana koreja.
- Odgovor na levodopu u trajanju 5 ili više godina.
- Klinički tijek od 10 ili više godina.

MPTP, 1-metil-4-fenil-l,2,3,6-tetrahidropiridin

4.2. Izolacija DNA

Od svakog ispitanika uzeto je 5 ml krvi u epruvetu s EDTA (prema engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, etilenediamintetraoctena kiselina) za izolaciju DNA. Genomska DNA izolirana je modificiranom metodom isoljavanja upotrebom komercijalnog kita (Gentra Puregene Blood Kit, Qiagen) prema uputama proizvođača. Pri sobnoj temperaturi 3 ml periferne krvi odvojeno je u epruvetu od 15 ml (BD Falcon Centrifuge Tubes, BD Biosciences) u koju je dodana otopina za lizu eritrocita (RBC Lysis Solution). Nakon inkubacije smjesa je ohlađena na ledu te je u hladnu otopinu dodano 1 ml otopine za taloženje proteina (Protein Precipitation Solution). Nakon centrifugiranja, supernatant koji sadrži DNA je prikupljen u čistu epruvetu s izopropanolom (Sigma-Aldrich). DNA se taložila centrifugiranjem 3 min na 2000G nakon čega je pažljivo uklonjen supernatant. Istaložena DNA se sušila na sobnoj temperaturi 5-10 min, a potom je resuspendirana u 300 µl puferske otopine (DNA Hydration Solution). Koncentracija i kvaliteta izolirane DNA utvrdile su se pomoću spektrofotometra NanoDrop 2000 (Thermo) te fluorometra Qubit 4 (Invitrogen) te je očitan koeficijent optičke gustoće (OD, prema engl. *optic density*) 260/280. U daljnjim eksperimentima korištena je DNA čiji je OD bio 1,80±20%.

4.3. Panel sekvenciranje sljedeće generacije

4.3.1. Izrada panela LYSOGENE

Panel za sekvenciranje sljedeće generacije pod nazivom LYSOGENE konstruiran je na temelju pretraživanja literature te baze podataka Human Lysosome Gene Database (hLGDB). Uključeni su relevantni geni povezani s PB, sinukleinopatijama, neurodegeneracijom, autofagno-lizosomalnim putovima te lizosomima. Na temelju pretraženih podataka odabrano je 440 gena (Tablica 4.2). Da bismo procijenili tehničku varijabilnost, uzorke za sekvenciranje smo pripremili upotrebom kompleta za pripremu biblioteke SureSelect (Agilent) i Nextera XT (Illumina).

Tablica 4.2. Geni uključeni u LYSOGENE panel

ABCA2	ATP6V0A4	CTNS	GGA2	KCNE1	NEU1	RNF13	TIAL1
ABCA3	ATP6V0B	CTSA	GGA3	KCNE2	NEU4	RNF152	TLR3
ABCA5	ATP6V0C	CTSB	GGH	KIAA0226	NPC1	RPTOR	TLR7
ABCB9	ATP6V0D1	CTSC	GJA1	KIAA0415	NPC2	RRAGA	TLR9
ABCC10	ATP6V0D2	CTSD	GLA	KIAA1609	NPPA	RRAGB	TM9SF1
ACP2	ATP6V1A	CTSE	GLB1	LAMP1	NSF	RRAGC	TMBIM1
ACP5	ATP6V1B1	CTSF	GM2A	LAMP2	OCA2	RRAGD	TMEM127
ACPP	ATP6V1B2	CTSG	GNA11	LAMP3	OSTM1	SCARB1	TMEM175
ADA	ATP6V1C1	CTSH	GNAI1	LAMTOR1	P2RX4	SCARB2	TMEM192
ADAM8	ATP6V1C2	CTSK	GNAI2	LAMTOR2	P2RY2	SCPEP1	TMEM55A
ADRB2	ATP6V1D	CTSL1	GNAI3	LAPTM4A	**PARK2**	SELRC1	TMEM55B
AGA	ATP6V1E1	CTSL2	GNAQ	LAPTM4B	**PARK7**	SERINC2	TMEM63A
AHNAK	ATP6V1F	CTSO	GNB1	LAPTM5	PCSK9	SFTPB	TMEM74
ALDOB	ATP6V1G1	CTSS	GNB2	LDLR	PCYOX1	SFTPD	TMEM8A
ANKFY1	ATP6V1H	CTSW	GNB4	LGMN	PEBP4	SGSH	TMEM9
ANKRD27	AZU1	CTSZ	GNPTAB	LHCGR	PGCP	SH3GL2	TMEM92
ANPEP	BCL10	CUBN	GNPTG	LIPA	PI4K2A	SIAE	TMEM97
ANXA11	BLOC1S1	CXCR2	GNS	LITAF	**PINK1**	SIDT2	TOM1L1
AP1B1	BTD	CYBASC3	GOT1	LMBRD1	PLA2G15	SLC11A1	TPCN1
AP1G1	C18ORF8	DAGLB	GPC3	LNPEP	PLA2G4E	SLC11A2	TPCN2
AP1M1	C19ORF28	DEPDC5	GPLD1	LOC653653	PLA2G4F	SLC12A4	TPP1
AP1M2	C1ORF85	**DNAJC13**	GPR137	LRBA	PLBD1	SLC15A3	TRIM23
AP1S1	C2ORF18	DNAJC5	GPR137B	LRP1	PLBD2	SLC15A4	TRIP10
AP1S2	C7ORF28B	DNAJC6	GPR143	LRP2	PLD1	SLC17A5	TSPAN1
AP1S3	CAT	DNASE1	GRN	**LRRK2**	PLD3	SLC26A11	TSPAN8
AP3B1	CCDC115	DNASE2	GUSB	M6PR	PLEKHF1	SLC29A3	TXNDC5
AP3B2	CCKAR	DNASE2B	HEXA	MAN2B1	PLOD1	SLC2A13	TYR
AP3D1	CCZ1	DNM2	HEXB	MAN2B2	PNPLA7	SLC2A8	UBA52
AP3M1	CD164	DOC2A	HGSNAT	MANBA	PON2	SLC30A2	UCHL1
AP3M2	CD1B	DPP4	HLA-DMA	MARCH1	PPT1	SLC36A1	UNC13D
AP3S1	CD1D	DPP7	HLA-DMB	MARCH2	PPT2	SLC37A3	UNC93B1
AP3S2	CD1E	DRAM1	HLA-DOA	MARCH3	PRCP	SLC44A2	USP4
AP4B1	CD63	DRAM2	HLA-DOB	MARCH8	PRDX6	SLC48A1	USP5
AP4E1	CD68	ECE1	HLA-DPA1	MARCH9	PRF1	SMCR8	USP6
AP4M1	CD74	EGF	**HLA-DPB1**	MCOLN1	PRTN3	SMPD1	UVRAG
AP4S1	CECR1	ELANE	HLA-DQA1	MCOLN2	PSAP	SMPD4	VAMP4
AP5B1	CHID1	ENPEP	HLA-DQA2	MCOLN3	PSAPL1	SMPDL3A	VAMP7

APP	CHIT1	ENPP1	HLA-DQB1	MFSD1	**PSEN1**	SNAP23	VASN
AQP2	CLCN5	ENTPD4	HLA-DQB2	MFSD8	**PSEN2**	**SNCA**	VMA21
ARF1	CLCN6	EPDR1	HLA-DRA	MIOS	PTGDS	SNX16	VPS11
ARL8A	CLCN7	FAM176A	HLA-DRB1	MMD	RAB14	SORT1	VPS16
ARL8B	CLN3	FGFR3	HLA-DRB5	MON1B	RAB27A	SPACA3	VPS18
ARRB1	CLN5	FLOT1	HPS1	MPO	RAB2A	SPG11	VPS33A
ARSA	CLTA	FLOT2	HPS4	MTOR	RAB4B	SPHK2	VPS33B
ARSB	CLTB	FNBP1	HPSE	MYLPF	RAB5C	SPNS1	**VPS35**
ARSD	CLTC	FUCA1	HSPA8	MYO7A	RAB7A	SPPL2A	VPS36
ARSG	CLTCL1	FUCA2	HYAL1	NAAA	RAB9A	SRGN	VPS39
ASAH1	**CLU**	GAA	HYAL2	NAGA	RAMP2	STARD3	VPS41
ASS1	COL6A1	GABARAP	HYAL3	NAGLU	RAMP3	STARD3NL	VPS4B
ATP11A	CP	GALC	IDS	NAGPA	RDH14	STS	WDR11
ATP11C	CPVL	GALNS	IDUA	NAPA	RILP	STX3	WDR41
ATP13A2	CREG1	**GBA**	IFI30	NAPG	RNASE1	STX7	WDR48
ATP6AP1	CST3	GC	IGF2R	NAPSA	RNASE2	STXBP2	ZFYVE26
ATP6V0A1	CST7	GDAP2	IL4I1	NBR1	RNASE6	SUMF1	ZNRF1
ATP6V0A2	CTBS	GGA1	ITM2C	NCSTN	RNASET2	TCIRG1	ZNRF2

Sekvence gena uključenih u panel LYSOGENE obuhvaćaju kodirajuće regije gena. Geni navedeni debljim slovima obuhvaćaju i CDS+ 3' i 5' regije gena.

4.3.2. Priprema biblioteka Nextera XT protokolom

Prvi korak u pripremi biblioteka jest provjera kvalitete i koncentracije izolirane DNA. Početne koncentracije DNA izmjerene su spektrofotometrom NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Uzorci su zatim razrjeđeni na koncentraciju od 5ng/µL te je ponovno izmjerena koncentracija, ovaj put na fluorometru Qubit (Thermo Scientific) kitom Qubit dsDNA HS Assay (Thermo Scientific). Sljedeći korak jest bila tako zvana tagmentacija DNA koja podrazumijeva enzimatsko cijepanje DNA u fragmente veličine približno 300pb. Da bismo uklonili fragmente DNA neadekvatne dužine tagmentirana DNA je vezana magnetskim česticama te je ispiran ostali, nevezani, sadržaja. Nakon otpuštanja DNA s magnetskih čestica dodani su dvostruki indeksi kojima se imenuje svaki uzorak za daljnje raspoznavanje. Takva, magnetnim česticama pročišćena DNA je zatim amplificirana po sljedećem protokolu: 72°C 3 minute, 98°C 30 sekundi, 10 ciklusa od: 98°C 10 sekundi, 60°C 30 sekundi, 72°C 30 sekundi te konačno 72°C 5 minuta. Nakon ponovnog ispiranja zajednički je pomiješano 500ng svakog uzoraka u zajedničku skupnu biblioteku. Sljedećim korakom izdvojeni su samo oni fragmenti koji nose gene od našeg interesa. U tu svrhu je dizajniran skup oligonukleotida za amplifikaciju gena uključenih u panele LYSOGENE. Nakon hibridizacije na 58°C s oligonukleotidima slijedilo je odvajanje regija od interesa pomoću streptavidinskih magnetskih čestica, ispiranja te ponavljanja istog postupka. Nakon ispiranja dobiveni fragmenati su amplificirani (98°C 30 sekundi, 12 ciklusa od: 98°C 10 sekundi, 60°C 30 sekundi, 72°C 30 sekundi te konačno 72°C 5 minuta).

Kvaliteta dobivenih biblioteka provjerena je korištenjem kompleta za provjeru Agilent Bioanalyzer HS DNA Kit na uređaju 2100 Bioanalyzer (Agilent), koji pokazuje veličinu i koncentraciju uzoraka. Ukratko, ova metoda djeluje na principu elektroforeze koja se odvija na pločici koja sadrži set mikrokanala u kojima se DNA fragmenti razdvajaju ovisno o veličini. Na temelju veličine fragmenata i koncentracije pripremljene biblioteke izračunata je potrebna količina uzorka za razrjeđenje od 4nM u 5µL. Takva biblioteka je prije stavljanja u uređaj denaturirana s 0,2N NaOH te razrijeđena u hibridizacijskom HT1 puferu (Illumina) na koncentraciju od 12pM.

4.3.3. Priprema biblioteka SureSelect QXT Target Enrichment protokolom

Za pripremu dijela biblioteka korišten je i SureSelect QXT Target Enrichment Kit (Agilent) prema uputama proizvođača. Ovaj kit koristi početnu količinu DNA od 50ng. Jednakim

postupkom razrjeđenja opisanim ranije svaki uzorak DNA razrijedio se na koncentraciju od 25ng/µl. Slijedio je postupak fragmentacije putem QXT Enzyme Mix 10 minuta na 45 °C. Nakon zaustavljanja fragmentacije, DNA magnetskim česticama AMPure XP bead (Beckman Coulter) odvajeni su fragmente odgovarajuće veličine te amplificirani po sljedećem protokolu: 68°C 2 minute, 98°C 2 minute, 8 ciklusa od: 98°C 30 sekundi, 57°C 30 sekundi, 72°C 1 minuta te 72°C 5 minuta. Amplificirani uzorci su ponovno pročišćeni magnetnim česticama te je provjerena kvaliteta i kvantifikacija uzoraka putem DNA 1000 Kita na uređaju Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent). Za hibridizaciju biblioteke na dizajnirani panel LYSOGENE za daljnje korake korišteno je 1500ng DNA. Fragmenti su zatim hibridizirani i umnoženi te su odvojene regije od interesa pomoću streptavidinskih magnetskih čestica. Sljedeći korak jest bilo dodavanje dvostrukih indeksa kojima imenujemo svaki uzorak za daljnje raspoznavanje te su uzorci ponovno pročišćeni mangnetnim česticama AMPure XP bead (Beckman Coulter). Posljednji korak prije spajanja uzoraka u zajedničku biblioteku bila je provjera njihove kvalitete korištenjem kompleta za provjeru Agilent Bioanalyzer HS DNA Kit na uređaju 2100 Bioanalyzer (Agilent) te njihova kvantifikacija fluorometrom Qubit (Thermo Scientific) kitom Qubit dsDNA HS Assay. Jednake količine svih pripremljenih biblioteka pomiješane su u zajedničku biblioteku finalne koncentracije od 10nM. Takva biblioteka je razrijeđena TE puferom na 4nM, denaturirana s 0,2N NaOH te konačno razrijeđena hibridizacijskim HT1 puferom (Illumina) na 12pM.

4.3.4. Sekvenciranje sljedeće generacije

Biblioteke pripremljene opisanim postupcima su sekvencirane na MiSeq (Illumina) uređaju za sekvenciranje sljedeće generacije po uputama proizvođača. S obzirom na tehničke mogućnosti uređaja i veličine LYSOGENE panela istovremeno smo sekvencirali po 12 uzoraka. MiSeq uređaj u protočnim komorama istovremeno priprema, umnoža i sekvencira velik broj klasterskih fragmenata DNA. Prije samog sekvenciranja, odnosno određivanja slijeda nukleotida, u istom uređaju se odvija generacija klonalnih klastera koja podrazumijeva vezanje pripremljenih fragmenata DNA pomoću umetnutih oligonukleotida te njihovo umnažanje. Sekvenciranje na ovom uređaju prvenstveno radi na principu detekcije fluorescencije. Nukleotidi koji se koriste tijekom sekvencioniranja označeni su različitim fluoroforima te označene baze postaju vidljive u trenutku komplementarnog vezivanja pa se ova tehnologija naziva sekvenciranje sintezom (engl. *sequencing by synthesis*, SBS). Sekvenciranje svakog fragmenta se odvija u oba smjera što se naziva sekvenciranje uparenih

krajeva (engleski *paired-end*). Tijekom obrade podataka dva očitanja se spajaju na preklapajućim krajevima u jedinstvenu sekvencu. Nakon paralelnog sekvenciranja svih uzoraka i analize dobivenih podataka uređaj daje sirove podatke u .fastq formatu.

4.3.5. Analiza podataka sekvenciranja

Za analizu podataka sekvenciranja korišteni su CASAVA 1.8.2 softver, SureCall softver (Agilent), VariantStudio (Illumina) te Variant Interpreter (Illumina). U analizu su uključene samo one varijante zadovoljavajuće kvalitete sekvenciranja te varijante koje se pojavljuju u manje od 5% populacije. Zatim su isključene sve one varijante koje ne dovode do promjene u aminokiselinskom slijedu te su konačno odvojene one varijante koje se pojavljuju isključivo među oboljelima od PB.

4.4. Potvrdni eksperimenti na staničnim linijama

Potvrdni eksperimenti na staničnim kulturama provedeni su na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za istraživanje neurodegenerativnih bolesti pod vodstvom doc.dr.sc. Silve Katušić Hećimović.

4.4.1. Stanične kulture

Za potvrdne eksperimente koristili smo SH-SY5Y i H4 stanične modele. SH-SY5Y stanice su humane neuroblastomske stanične linije te ih je ustupio dr. sc. Sébastien Paillusson, koji radi na Odjelu za bazičnu i kliničku neuroznanost na Kings College London. Radi se o SH-SY5Y stanicama koje pojačano stabilno eksprimiraju aSyn označen EGFPom (prema engl. *enhanced green fluorescent protein,* zeleni fluorescentni protein) te SH-SY5Y stanicama s endogenim izražajem aSyn. Dio eksperimenata utišavanje izražaja gena pomoću RNA interferencije proveden je i na H4 stanicama (Odjel za eksperimentalnu neurodegeneraciju, Sveučilište Georg August Göttingen, Njemačka) koje su humanog neuroglijalnog podrijetla.

SH-SY5Y stanice su uzgajane u DMEM-F12 mediju (Sigma) uz dodatak 10%-tnog FBS-a (prema engl. *fetal bovine serum*, fetalni goveđi serum), L-glutamina (2 mM), penicilina (50 U/mL) i streptomicina (50 μg/mL), neesencijalnih aminokiselina, natrijeva piruvata te G418 (geneticin) (500μg/mL) u vlažnom okolišu temperature 37ºC uz 5%-tni CO_2.

H4 stanice su uzgajane u DMEM mediju (Sigma) uz dodatak 10%-tnog FBS-a u vlažnom okolišu temperature 37ºC uz 5%-tni CO_2.

Otopine korištene u metodama provedenim na staničnim kulturama navedene su u tablici 4.3..

Tablica 4.3. Otopine korištene pri metodama provedenim na staničnim kulturama

Otopina	Sastojci	Otapalo
1M fosfatni pufer sa soli (PBS)	0,2 M natrij-dihidrogen-fosfat (Na_2HPO_4) 0,2 M dinatrij-hidrogen-fosfat (NaH_2PO_4) NaCl	H_2O
Pufer za lizu stanica (RIPA)	150mM NaCl 1% Nonidet P-40 0.5% Natrij deoksikolat (DOC) 0.1% SDS 50 mM Tris	H_2O
2x BES pufer	50mM BES, natrijeva sol 280mM NaCl 1.5mM Na2HPO4, $2H_20$	H_2O
Tris-EDTA pufer	10 mM Tris baza 1 mM otopina EDTA 0,05% Tween 20	H_2O
I-block	i-block prah 1M PBS 0,01% Tween 20	H_2O
TBST pufer	25 mM Tris 150 mM NaCl 0,1%-tni Tween 20	H_2O
TAE pufer	48,4g Tris baze 17,4M GAC AC (prema engl. *glacial acetic acid*) 2,92g EDTA	H_2O

4.4.2. Indukcija lizosomalne disfunkcije

U svrhu validacije uzročno posljedične veze lizosomalne disfunkcije i nakupljanja aSyn na SH-SY5Y staničnom modelu smo izazvali lizosomalnu disfunkciju te proučavali utjecaj na nakupljanje aSyn. S druge strane, za analizu utjecaja aSyn na lizosomalnu disfunkciju uspoređivali smo lizosomalni status između SH-SY5Y stanica koje pojačano eksprimiraju aSyn i SH-SY5Y stanica s endogenom ekspresijom.

Za analizu utjecaja lizosomalne disfunkcije na nakupljanje aSyn postupkom imunocitokemije jedan uzorak od 50000 SH-SY5Y stanica je 24 sata tretiran s 100 μM Leupeptinom (Sigma) i 5 mM NH_4Cl, a drugi uzorak je bio u istim uvjetima bez tretmana. Lizosomalna disfunkcija je monitorirana fluorescentnom bojom LysoTracker Red (Invitrogen). Stanice su tretirane 80 minuta s 200 nM Lysotracker u staničnom mediju, isprane dva puta s PBS (prema engl. *Phosphate-buffered saline*, fosfatni pufer sa soli) te fiksirane. Radi postizanja jasnijeg prikaza aSyn u stanicama stanice smo bojali primarnim protutijelom za aSyn c20 (Santa Cruz Biotechnology, sc-7011-R) te sekundarnim anti-Rabbit protitijelom (Alexa Fluor 594) (Tablica 4.5.). Stanice pripremljene postupkom imunocitokemije analizirane su konfokalnom mikroskopijom opisanom dalje u tekstu.

Za analizu promjena na proteinskoj razini nakon jednakog tretmana sa 100 μM Leupeptinom i 5 mM NH_4Cl stanice su isprane s PBS te prikupljene u puferu za lizu (RIPA pufer) s dodanim proteaznim inhibitorom. Nakon inkubacije od 30 minuta i centrifuge od 10 minuta na 16000G odvojen je supernatant u kojem je izmjerena koncentracija proteina. Najbolji rezultati elektroforeze aSyn monomera su postignuti s ukupnom masom proteina od 0,25 ug. Za evaluaciju aSyn oligomera morali smo ih prvo odvojiti od aSyn monomera. Razdvajanje aSyn monomera i oligomera provedeno je frakcioniranjem po topljivosti. Nakon jednakog Leupeptin/NH_4Cl tretmana stanica kao i kod prethodno opisane analize, s razlikom većeg formata, stanice su dva puta isprane hladnim PBSom. Nakon toga je na stanice dodan 1%Triton X (Sigma) s proteaznim i fosfataznim inhibitorima. Nakon sonikacije i ultracentrifuge u trajanju od 30 minuta na 100000G odvojen je supernatant, odnosno triton frakcija za analizu monomera. Za analizu oligomera pripremljena je SDS frakcija otapanjem taloga u 2% SDS (Eurobio) otopini koja je dodatno sonicirana i ultracentrifugirana. Triton X frakcija sadržava monomere, dok SDS frakcija sadržava oligomere. Osim lizosomalne disfunkcije uzrokovane Leupeptin/NH_4Cl tretmanom, koristili smo i tretman s 100 μM PADK (prema Z-Phe-Ala-diazometilketon) koji inhibira katepsin B/L. Da bismo omogućili

promjenu fenotipa produžili smo vrijeme djelovanja i Leupeptin/NH_4Cl tretmana i PADK tretmana na 48h. Razlika na proteinskoj razini analizirana je Western blot metodom opisanom kasnije u tekstu.

4.4.3. Utišavanje izražaja gena pomoću RNA-interferencije

U svrhu postizanja optimalnog utišavanja gena koristili smo nekoliko metoda transfekcije siRNA. Sve siRNA su SMARTpool (Dharmacon). Kontrolna siRNA te siRNA za gene od interesa otopljene su u vodi bez nukleaza u temeljnu otopinu koncentracije 10 μM.

Reverzna transfekcija lipidnom metodom

Nakon brojanja i razrjeđivanja stanica na koncentraciju od 500000 stanica po mL stanice su presađene u pločice s 24 bunarića za provjeru na razini RNA te u pločice sa 6 bunarića za provjeru na razini proteina. Nakon toga je pripremljena transfekcijska smjesa od medija Opti-MEM (Gibco) te transfekcijskog reagensa Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher) u omjeru 150:1. U pločice s 24 bunarića dodano je 150μL transfekcijske smjese, a u pločice sa 6 bunarića 750μL. U pripremljene bunariće je zatim dodana razrjeđena siRNA do koncentracije od 10nM. Nakon inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperatu ri 15 minuta dodane su ranije razrjeđene stanice. U pločice s 24 bunarića dodano je 350μL stanica, a u pločice sa 6 bunarića 1mL. Nakon 24h inkubacije na 37ºC dodano je 350μL medija za rast SH-SY5Y stanica u pločice s 24 bunarića, odnosno 1mL u pločice sa 6 bunarića. Uspješnost dobivene transfekcije analizirana je nakon 72h od početka transfekcije.

Elektroporacija

Utišavanje gena elektroporacijom provodili smo u Laboratoriju za stanične kulture i kulture tkiva, Hrvatski institut za istraživanje mozga, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Transfekcija siRNA koje su specifične za *ATP13A2* i *ARSD* gene te kontrolne siRNA napravljena je pomoću sustava NeonTM (Invitrogen) prema uputama proizvođača. Sve siRNA otopljene su u vodi bez nukleaza u temeljnu otopinu koncentracije 10 μM. Nakon prikupljanja stanica u mediju, iste su centrifugirane 5 minuta na 1500 RPM na 4ºC. Nakon ispiranja staničnog taloga s PBS i brojanja stanica, ukupan broj od $5x10^6$ stanica je ponovno centrifugiran u istim uvjetima te stanični talog ponovno ispiran u PBS. Konačno je stanični talog resuspendiran u 430 μL pufera R (Invitrogen) tako da koncentracija stanica bude $11x10^6$

stanica po mL. Volumenu od 200 µL stanica resuspendiranih u puferu R dodano je 30µL siRNA (10µl/mL). Suspenzije su pokupljene posebnim nastavkom presvučenim zlatom volumena 100µL te umetnute u epruvetu s elektrodom u koju smo dodali E2 pufer (Invitrogen). Stanična suspenzija je zatim izložena jednom udaru struje napona 1100 V tijekom 50 milisekundi te raspršena u 200 mL medija. Nakon inkubacije od 15 minuta na 37ºC resuspendirane stanice su zasađene u pločice s 24 bunarića za analizu na razini RNA te pločice s 6 bunarića za analizu na razini proteina pomoću tehnike Western blot.

Utišavanje izražaja gena pomoću kalcijevog fosfata

Utišavanje gena metodom s kalcijevim fosfatom provodili smo na Odjelu za eksperimentalnu neurodegeneraciju, Sveučilište Georg August Göttingen, Njemačka. Dan prije transfekcije stanice su zasađene u koncentraciji $7x10^5$ stanica/mL u pljoskice T75 cm^2. Reakcijska smjesa se sastojala od 8µg siRNA, 0,25 M $CaCl_2$ te vode do volumena od 100µL. U zasebnoj epruveti pripremljen je jednaki volumen 2xBES pufera te je kap po kap dodavana siRNA/$CaCl_2$ reakcijska smjesa uz neprestano mješanje. Nakon inkubacije od 20 minuta na sobnoj temperaturi transfekcijska smjesa je polagano dodana na pripremljene stanice u pločice s 24 bunarića za analizu imunocitokemijom, u pločice s 12 bunarića za analizu na razini RNA te pločice s 6 bunarića za analizu na razini proteina pomoću tehnike Western blot.

4.4.4. Lentiviralna transdukcija s kratkim RNA ukosnicama

Za stabilno utišavanje gena koristio se princip lentiviralne transdukcije s kratkim RNA ukosnicama (shRNA, engl. *short hairpin RNA*). Za lentiviralno utišavanje gena koristili smo MISSION Lentiviral Transduction Particles (Sigma). Lentiviralni konstrukti navedeni su u tablici 4.4. Dan prije transdukcije stanice su nasađene u pločicu s 24 bunarića u gustoći od 150000 stanica po bunariću. Na dan transdukcije stanicama je promijenjen medij te je dodan reagens Polybrene (heksadimetrin bromid, Sigma) u koncentraciji od 8µL/mL. Lentiviralni alikvoti su polagano odmrznuti na ledu te je stanicama dodan volume koji odgovara MOI 40 (prema engl. *multiplicity of infection*, multiplicite infekcije). MOI je broj transdukcije lentivirusnih čestica po stanici koji je izračunat po sljedećim formulama:

Za izračun MOI:

potreban broj TU = (ukupan broj stanica po bunariću) x (željeni MOI)

ukupno ml lentivirusnih čestica koje treba dodati u svaku jažicu = (potreban broj TU) / (TU/ml lentiviralnih čestica)

TU transdukcijske jedinice

Nakon 24h od transdukcije stanicama je uklonjen medij s lentiviralnim česticama te je zamijenjen svježim ugrijanim medijem. Sutradan je stanicama promijenjen medij s 2μL/mL puromicina. Nakon 24h od promjene medija stanice su zasađene u pločice sa 6 bunarića te je svaka dva dana mijenjan medij s 2μL/mL puromicina. Istovremeno je mijenjan medij i netretiranom uzorku stanica kao kontrola aktivnosti puromicina.

Tablica 4.4. Lentiviralne čestice korištene za lentiviralno utišavanje gena (MISSION Lentiviral Transduction Particles (Sigma))

Naziv		TU/ml
ATP13A2	TRCN00000504404	$3,0*10^7$
ARSD	TRCN0000051618	$5,2*10^7$
LRBA	TRCN0000148136	$3,3*10^7$
GALC	TRCN0000049499	$8,9*10^7$
Kontrola		$7,7*10^7$

TU transdukcijske jedinice

vektor je pLKO.1

4.4.5. Validacija krivulje toksičnosti polybrene za SH-SY5Y stanice

Za provjeru toksičnosti reagensa za poboljšanje učinkovitosti transdukcije Polybrene (heksadimetrin bromid, Sigma), stanice su zasađene u pločice s 24 bunarića u gustoći od 150000 stanica po bunariću. Nakon 24 sata inkubacije na 37ºC i 5% CO_2 stanice su u triplikatu tretirane sa sljedećim koncentracijama polybrene: 2, 4, 6, 8, 10 μL/mL, a dvama triplikatima stanica je samo promijenjen medij. Nakon sljedeća 24 sata inkubacije na 37ºC u vlažnom okolišu s 5% CO_2 napravljen je LDH test toksičnosti, LDH-Cytotoxicity Assay Kit

II (Abcam) prema uputama proizvođača. Jednom triplikatu netretiranih stanica dodano je 50μL otopine za lizu stanica. Ovaj uzorak služi za detekciju intra- i ekstracelularne LDH aktivnosti. Zatim je prikupljen medij svih uzoraka te centrifugiran 10 minuta na 600G pri sobnoj temperaturi. Nakon rekonstitucije WST substrata dodavanjem 1,1mL ddH2O napravljena je LDH reakcijska otopina dilucijom WST otopine u LDH puferu. U pločice s 96 bunarića dodano je 10 μL supernatanta centrifugiranog medija te 100μL LDH reakcijske otopine. Nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperature izmjerena je apsorbancija na 450nm. Niti jedna koncentracija polybrene se nije pokazala citotoksična te smo se odlučili za koncentraciju od 8μL/ml.

4.4.6. Validacija krivulje toksičnosti puromicina za SH-SY5Y stanice

Za provjeru toksičnosti puromicina stanice su nasađene u pločice s 96 bunarića u gustoći od 22500 stanica po bunariću. Nakon 24 sata inkubacije na 37ºC i 5% CO_2 stanice su u triplikatu tretirane s navedenim koncentracijama puromicina: 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 10 μL/mL, a jednom triplikatu stanica je samo promijenjen medij. Postupak promjene medija s puromicinom različitih koncentracija ponavljan je svakih 48h 7 dana. Zaključili smo da je najmanja koncentracija pri kojoj umiru sve stanice 2μL/mL puromicina.

4.4.7. Validacija uspjeha utišavanja i utjecaja na lizosomalnu disfunkciju i ekspresiju aSyn

Nakon utišavanje izražaja gena pomoću siRNA i lentiviralne transdukcije sa shRNA pratili smo učinak na mRNA pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR, prema engl. *polymerase chain reaction*) u stvarnom vremenu (qPCR), učinak na proteinskoj razini metodom Western blot, a lizosomalnu disfunkciju imunocitokemijom. Kao pozitivnu kontrolu utišavanja lizosomalnog gena koji dovodi do nakupljanja aSyn koristili smo utišavanje *ATP13A2* (PARK9) gena, mutacija kojeg dovodi do rijetkog nasljednog oblika PB, Kufor Rakeb sindroma. Osim eksperimenata utišavanja gena na SH-SY5Y stanicama proveli smo i eksperimente kojima smo proučavali uzročno posljedičnu vezu nakupljanja aSyn i lizosomalne disfunkcije. Sva protutijela korištena u ovim postupcima prikazana su u tablici 4.5.

Tablica 4.5. Korištena protutijela

Specifičnost	**Proizvođač**	**Serijski broj**	**Tip**	**Razrjeđenje WB/ICC**
aSyn (C20)	Santa Cruz	sc-7011-R	Poliklonsko, zečji IgG, anti-ljudsko	1:1000 1:400
ATP13A2	Cell Signaling	5879	Poliklonsko, zečji IgG, anti-ljudsko	1:1000 1:400
ARSD	Abcam	ab81978	Poliklonsko, kozji IgG, anti-ljudsko	1:1000 1:400
GALC	Sigma	SAB1410476	Poliklonsko, zečji IgG, anti-ljudsko	1:500 1:400
βACTIN	Cell Signaling	8H10D10	Poliklonsko, mišji IgG, anti-ljudsko	1:10000
LC3	Sigma	L8918	Poliklonsko, zečji IgG, anti-ljudsko	1:500
LAMP1	Sigma	L1418	Poliklonsko, zečji IgG, anti-ljudsko	1:1000
LRBA	Atlas	HPA023597	Poliklonsko, zečji IgG, anti-ljudsko	1:100
Sekundarna protutijela				
Imunocitokemija				
Anti-mišji IgG	Molecular Probes		Kozji IgG, konjugirano s Alexa Fluor 594	1:400
Anti-zečji IgG	Molecular Probes		Kozji IgG, konjugirano s Alexa Fluor 594	1:400

Sekundarna protutijela

Western blot			
Anti-mišji IgG	BioRad	Kozji IgG	1:5000
Anti-zečji IgG	BioRad	Kozji IgG	1:5000
Anti-kozji IgG	BioRad	Zečji IgG	1:5000

4.4.8. Konfokalna mikrosokopija

Stanice pripremljene postupkom imunocitokemije analizirane su konfokalnom mikroskopijom Leica TCS SP8 (Leica Microsystems), uz pripadajući software LAS X. U ovom istraživanju snimanje uzoraka obojenih fluorescentnom imunocitokemijom je standardizirano i svi uzorci su snimani pod istom jačinom lasera, duljinom ekspozicije, kontrastom i optičkom debljinom. Snimanje je provodio nezavisni znanstvenik mikroskopičar. Sve snimke uzete su pri povećanju 40x, uz 0,75 optičko povećanje pod istim uvjetima ekspozicije, jačine lasera, kontrasta i digitalnog *offseta* kako bi bile međusobno usporedive. Optička debljina reza u svim snimkama iznosila je 1 μm, a obuhvatila je najjači signal u danom preparatu. Fluorescencija je stimulirana laserskom svjetlošću valne duljine 577 i 594 nm. Snimke nisu digitalno obrađivane prije postupka kvantifikacije. Kontrolni uzorci su snimljeni identičnim postupkom.

4.4.9. Eksperimenti određivanja razine proteina

Izolacija ukupnih staničnih lizata

Stanice su zasađene u koncentraciji $3x10^5$ stanica/mL u pločice sa 6 bunarića. Nakon inkubacije na 37ºC i 5% CO_2, stanice su isprane u hladnom PBS-u i raspršene u puferu za lizu stanica (RIPA pufer). Nakon 20-minutne inkubacije na ledu, stanice su prikupljene te odmah centrifugirane tijekom 10 minuta na 14000G na temperaturi od 4ºC. Izdvojeni nadtalog je pospremljen na -20ºC.

Određivanje koncentracije proteina

Određivanje koncentracije proteina provedeno je uz upotrebu komercijalno dostupnog kompleta BCA protein Assay kit (Thermo Scientific) koji se temelji na redukciji Cu^{2+} u Cu^{1+} te kompleksiranju nastalog Cu^{1+} s dvije molekule bicinkonične kiseline (BCA, od engl. *bicinchoninic acid*) u produkt ljubičaste boje. Prilikom svakog određivanja koncentracije proteina potrebna priprema standarda iz otopine BSA u razrjeđenja kako slijedi: 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,5 i 1 μg/μL. U pojedine bunariće pločice s 96 mjesta naneseno je 200 μL smjese koja se sastoji od BCA reagensa A i BCA reagensa B u omjeru 1:50. Zatim je u pripremljene bunariće u duplikatu dodano po 25 μL svakog od razrjeđenja BSA standarda te po 25 μL prethodno pripremljenih uzoraka staničnog lizata. Nakon inkubacije od 30 minuta na 37°C,

određena je apsorbancija na 562 nm pomoću automatskog čitača mikrotitarskih pločica. Koncentracija proteina određena je prema izmjerenoj apsorbanciji BSA standarda.

Izvođenje SDS-poliakrilamidne elektroforeze

Kod SDS (natrij dodecil sulfat, prema engl. *sodium dodecil sulphat*) elektroforeze na poliakrilamidnom gelu se razdvajaju proteini koji su prilikom denaturacije vezali SDS koji poništava njihov endogeni naboj te proteini tijekom elektroforeze migriraju na osnovu molekularnih masa. Prijeđeni put pojedinog proteina u gelu obrnuto je proporcionalan logaritmu njegove molekulske mase. Uzorci proteina su denaturirani zagrijavanjem na 70ºC tijekom 10 minuta u puferu koji uz SDS sadrži i βmerkaptoetanol te bromfenol modrilo. Korišteni su 6, 8 i 15% gelovi za razdvajanje proteina koji se sastoje od destilirane vode, Tris-HCl-a (1,5 M, pH 8,8), SDS-a (10%), akrilamid/bisakrilamida (30%), amonijev persulfat (10%) i TEMED-a (tetrametiletilendiamin) ((10%). Pripremljena otopina ulivena je između dva stakalca te nadslojena propanolom. Nakon 15 minuta polimerizacije gela uklonjen je propanol te je gel za razdvajanje proteina nadslojen gelom za sabijanje proteina (5%) koji za razliku od prethodno opisanog gela sadrži Tris-HCl-a (1M, pH 6,8). U jažice SDS-poliakrilamidnih gelova naneseni su uzorci jednake mase proteina te je u sustavu za elektroforezu Mini-Protean (Bio-Rad) omogućen protok struje napona 130 V.

Western blot prijenos i detekcija proteina

Proteini su sa SDS-poliakrilamidnog gela preneseni na PVDF membranu (Roche) pomoću sustava mini Trans-Blot (Bio-Rad). Membrane su prije korištenja aktivirane u metanolu. Gel i PVDF membrana obloženi su filter papirima i spužvicama te uronjeni u pufer za prijenos. Elektroprijenos proteina s gela na membranu proveden je tijekom 90 minuta pri stalnoj jakosti struje od 200mA. Nakon prenošenja proteina membrana je inkubirana u I-block otopini 30 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela. Nakon blokiranja, membrane su inkubirane tijekom noći na 4ºC s odgovarajućim primarnim protutijelima (Tablica 4.5.) razrijeđenim u I-block otopini. Nakon inkubacije, membrane su isprane tri puta s TBST puferom te inkubirane u svježe pripremljenom sekundarnom protutijelu koje je razrijeđeno (1:5000) u I-block otopini tijekom 90 minuta na sobnoj temperaturi na rotirajućem stalku. Nakon inkubacije, membrane su ponovno isprane tri puta u puferu TBST. Očitavanje vezanja protutijela za membranu određeno je pomoću pribora BM Chemiluminiscence Blotting Supstrate (Roche). Kao kontrolu jednakog nanošenja količine proteina, koristili smo protutijela koja prepoznaju ukupni β-aktin ili GAPDH. Intenziteti

signala određeni su denzitometrijski pomoću računalnog programa ImageJ te izraženi u relativnim jedinicama kao omjeri intenziteta signala.

4.4.10. Eksperimenti na RNA

Izolacija RNA

Izolacija RNA provedena je komercijalnim kitom RNeasy Mini Kit (Qiagen) prema uputama proizvođača. Stanice su prvo dva puta isprane s hladnim PBSom. Dodano je 700µL Qiazola (Qiagen) te je slijedila inkubacija od 5 minuta na sobnoj temperaturi. Dodano je 140µL kloroforma te nakon vorteksiranja i inkubacije od 3 minute uzorci su centrifugirani 15 minuta na 12000G na 4°C. Na 350 µL gornje, vodene faze koja je odvojena u čistu, prethodno označenu epruvetu dodano je 525µL etanola (100%) te snažno protreseno. Zatim je 700µL dobivene smjese dodano u filter kolumnu te centrifugirano na 8000G 15s, postupak je ponovljen s ostatkom smjese. Na filter kolumnu je zatim dodano 700µL reagensa RWT te ponovno centrifugirano na 8000G 15s. Postupak ispiranja ponovljen je dva puta s 500µL reagensa RPE. Pročišćena RNA isprana je s filtera dva puta s 30µL vode bez RNAze. Koncentracija i kvaliteta dobivene RNA određena je pomoću spektrofotometra NanoDrop 2000 (Thermo) te na 2% agaroznom gelu.

Elektroforeza RNA na agaroznom gelu

Izolirana RNA provjerena je elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Za pripravu gela, agaroza (Promega) je pomiješana s puferom za elektroforezu TAE pufer (tris/acetat/EDTA pufer). Nakon zagrijavanja u mikrovalnoj pećnici, smjesa je ohlađena te su joj dodane dvije kapi etidijeva bromida (10mg/mL). Nakon polimerizacije na gel su naneseni uzorci RNA te se elektroforeza odvijala pod naponom od 90 V 45 minuta.

Prepisivanje RNA u cDNA

Za reverznu transkripciju korišten je kit AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent). Izolirana RNA pojedinačnih uzoraka razrijeđena je prema izmjerenim koncentracijama kako bi u reakciju ušlo ukupno 1µg RNA svakog uzorka. Reakcijska smjesa za prepisivanje RNA u cDNA sastoji se od 10 µL cDNA Synthesis Master Mix (Agilent), 3 µL Oligo(dT) primera, 1 µL AffinityScript RT/ RNase Block Enzyme Mixture (Agilent) te 1 µg RNA te vode bez

RNaza do volumena od 20 µL. Uzorci su inkubirani prvo 5 minuta na sobnoj temperaturi, zatim 15 minuta na 42ºC te je konačno zaustavljena sinteza cDNA na 95ºC u trajanju od 5 minuta. Reakcijska smjesa se odmah stavila na led za neposredno korištenje za qPCR.

PCR u stvarnom vremenu (qPCR)

Reakcijska smjesa za qPCR pripravljena je od 12,5 µL Brilliant II QPCR Master Mix (Agilent), po 1 µL svakog od para početnica (korištene početnice prikazane su u tablici 4.6), 8,5 µL vode bez nukleaza te 2 µL cDNA iz prethodno opisane reakcije. Termalni profil uključuje inkubaciju od 10 minuta na 95ºC, 40 ciklusa od 30s na 95 ºC, 1 minuta na 55 ºC, 30s na 72 ºC, slijedi 30s na 95 ºC, 30s na 60 ºC te 30s na 95 ºC.

Tablica 4.6. Početnice za qPCR

Gen	Naziv primera	Sekvenca
ATP13A2	ATP13A2 1F	AGGGACATCAATAGATCCCCTC
	ATP13A2 1R	CACGACGTGATAGCCGATGA
	ATP13A2 2F	CCCCTACTATGGGTTCCAGG
	ATP13A2 2R	CCGCATGGACAACTTGACC
ARSD	ARSD 1F	AGGGTGTGAATTGTGCATCCC
	ARSD 1R	ACAGTCGTTTGTGAGCGTGAA
	ARSD 2F	TTCCTTCAGATCAGGCATGGA
	ARSD 2R	ACCCTGGTGCCATTTTCCTAT
GALC	GALC 1F	AGGGAACCTCACCATCATCA
	GALC 1R	GCTGTCAAGGAGCCATAGAGAA
	GALC 2F	TATTTCCGAGGATACGAGTGGT
	GALC 2R	CCAGTCGAAACCTTTTCCCAG
GAPDH	GAPDH 1F	AGGTCGGAGTCAACGGATTTG
	GAPDH 1R	GTGATGGCATGGACTGTGGT
	GAPDH 2F	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	GAPDH 2R	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
LRBA	LRBA 1F	AGCATACGGAATCTTCAAGTCTG
	LRBA 1R	CAGGACCATACTTCTGAGGCATA
	LRBA 2F	AAAGGTCTTGGCTATTCTGCTC
	LRBA 2R	GGTATCGCTAGTGTTGACAAACC
ACTB	ACTB 1F	CTGGAACGGTGAAGGTGACA
	ACTB 1R	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA
	ACTB 2F	CCATCATGAAGTGTGACGTGG
	ACTB 2R	GTCCGCCTAGAAGCATTTGCG

Početnice su dizajnirane iz slijeda nukleotida ispitivanih gena preuzetog s internetske stranice Nacionalnog centra za informacije o biotehnologiji Nacionalne knjižnice medicine Sjedinjenih Država, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ pomoću programa Primer3web, inačica 4.1.0, dostupan na internetskoj stranici http://primer3.ut.ee/. Svi parovi početnica dizajnirani su kako bi obuhvatili mjesta spajanja introna i time bili neučinkoviti u umnažanju genomske DNA (gDNA).

Rezultati usporedbe izražaja mRNA prikazani su ΔCq metodom. Tom metodom se svaki pojedinačni uzorak relativizira korištenjem referentnog gena, u našem slučaju actin beta. Očitani su kvantifikacijski ciklusi (Cq) za ciljne gene i referentne gene koji služe za normalizaciju rezultata. Izračunata je razlika u Cq vrijednostima (ΔCq) između ciljnog gena i referentnog gena.

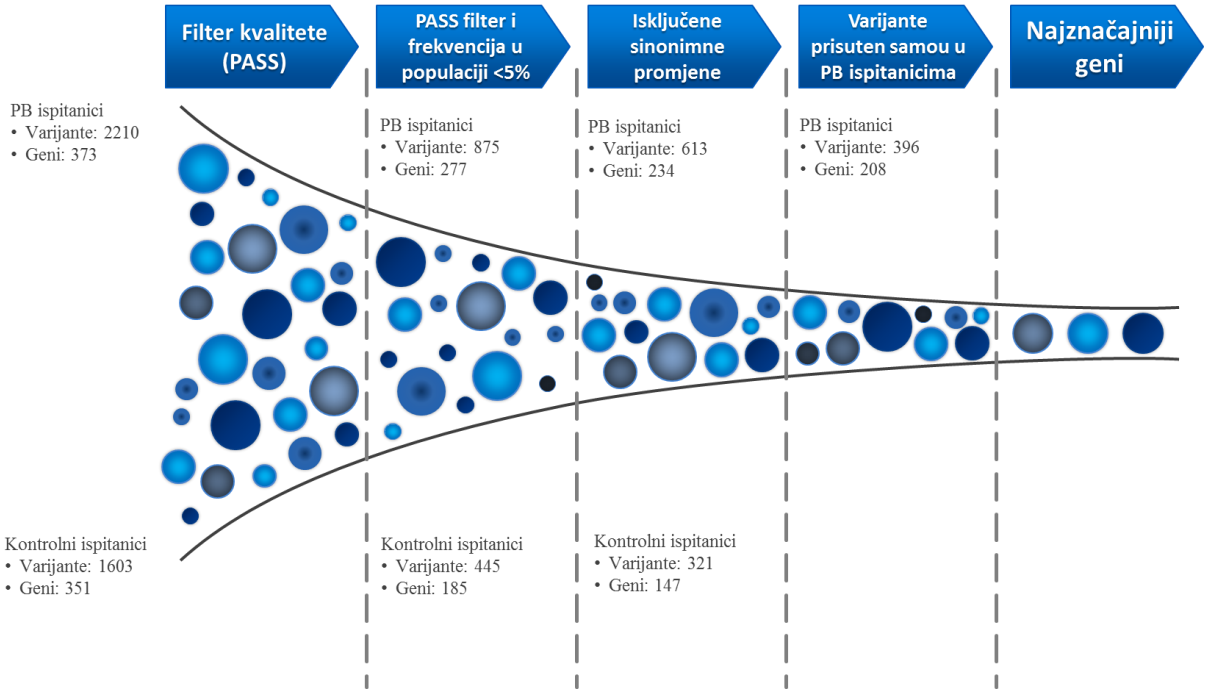
4.5. Statistička analiza

Prikupljeni podaci prikazani su opisnom statistikom, grafički i tabelarno. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardne pogreške te analizirani pomoću Studentovog t-testa (za usporedbu tretiranih stanica prema kontroli). Za sve testove uzeta je razina vjerodostojnosti $p < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Rezultati sekvenciranja

Panel sekvenciranjem 440 gena smo u prosjeku dobili 2.545.197 očitanja po uzorku (1.830.662-3.686.265). U analizu su uključene samo one varijante koje su bile zadovoljavajuće kvalitete sekvenciranja. Prosječno je otkriveno 1154 varijanti po uzorku (622-1884) te prosječno 13 varijanti u 1. kategoriji (10-16), ukupno 25 različitih. Zatim su odvojene one varijante koje se pojavljuju u manje od 5% populacije te isključene sve one varijante koje ne dovode do promjene u aminokiselinskom slijedu te su konačno odvojene one varijante koje se pojavljuju isključivo među oboljelima od PB (Slika 5.1.)



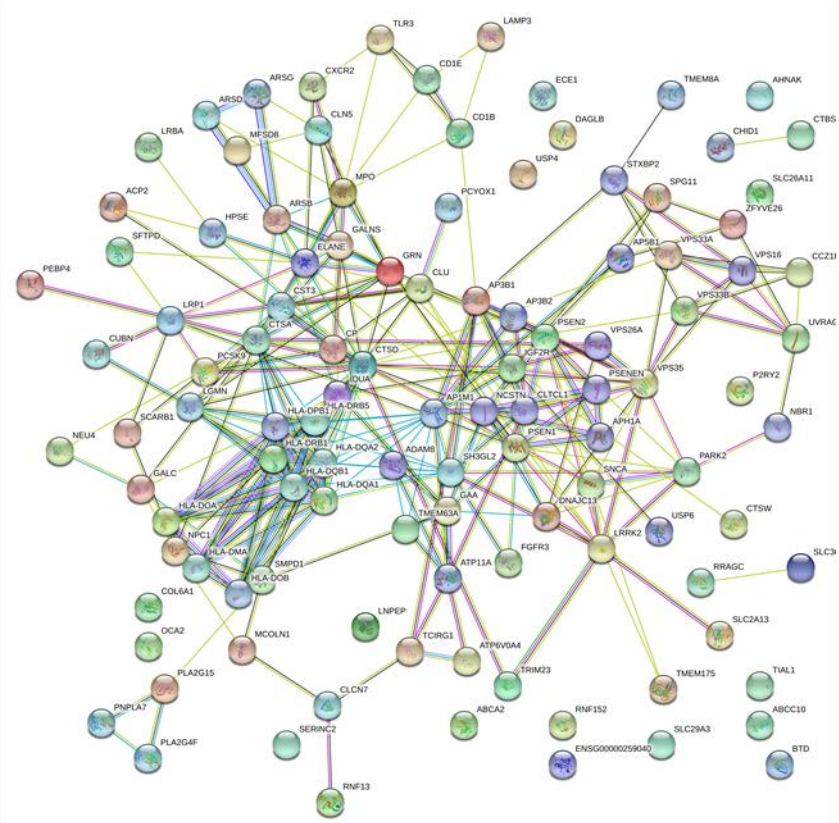
Slika 5.1. Grafički prikaz analize varijanti dobivenih sekvenciranjem LYSOGENE panela

Među varijantama koje su prošle filtere kvalitete se već posebno istaknulo nekoliko gena čije su se varijante češće ili isključivo pojavljivale među oboljelima od PB (Tablica 5.1.). Te varijante su uključene u veliki broj bioloških procesa prvenstveno povezanih s kataboličkim procesima, staničnim transportom te lizosomalnom organizacijom (Slika 5.2.).

Tablica 5.1. Varijante koje su prošle filtere kvalitete, a češće ili isključivo su se pojavljivale među oboljelima od PB

Gen	**Promjena**	**Kromosom**	**Lokacija**		**RS broj**	**Broj oboljelih kod kojih se pojavljuje mutacija**
HLA-DQB1	T>T/C	6	32634301	het/hom	rs1130373	12
IDUA	C>C/T, C>T/T	4	994452	het/hom	rs3755954	12
HLA-DRB1	C>C/G	6	32549525	het	rs16822698, rs111965977	8
DNAJC13	G>G/A	3	132257747	het/hom	rs6671	7
HLA-DQA2	C>C/T	6	32713827	het	rs1129956	7
HLA-DQB1	G>G/A	6	32634355	het/hom	rs36222083, rs1049072	6
HLA-DRB5	A>A/C	6	32489707	het	rs41559714	6
HLA-DRB5	C>C/A	6	32489708	het	rs41556512	6
HLA-DRB5	C>C/G	6	32489745	het/hom	rs41548618	6
SNCA	CT>CT/C	4	90646686	het		6
ZFYVE26	A>A/T	14	68252852	het/hom	rs112787369	6

ACP2	C>C/T	11	47267079	het/ hom	rs10838677	5
ATP11A	C>C/T	13	113485850	het	rs61741250	5
CHID1	C>C/T	11	870467	het	rs1127800	5
DNAJC13	A>A/G	3	132226100	het	rs79953286	5
HLA-DQB1	G>G/A	6	32629146	het/ hom	rs112517017	5
HLA-DRB1	G>G/A	6	32549588	het	rs201929247	5
HLA-DRB5	T>C/C	6	32486344	het/ hom	rs116408738	5
HLA-DRB5	T>A/G	6	32489933	het/ hom	rs1071748	5
LRBA	G>G/A	4	151520216	het	rs35879351	5
MPO	C>C/A	17	56357818	het	rs7208693	5
OCA2	G>G/A	15	28260053	het	rs1800401	5
TMEM63A	C>C/T	1	226040404	het	rs1009668	5
TMEM8A	T>T/C; T>C/C	16	426432	het/ hom	rs2071915	5
GALC	G>G/T	14	88459434	het	rs111976362	4
GALC	C>C/G	14	88459448	het	rs111887056	4
GALC	C>C/G	14	88459467	het	rs112992946	4

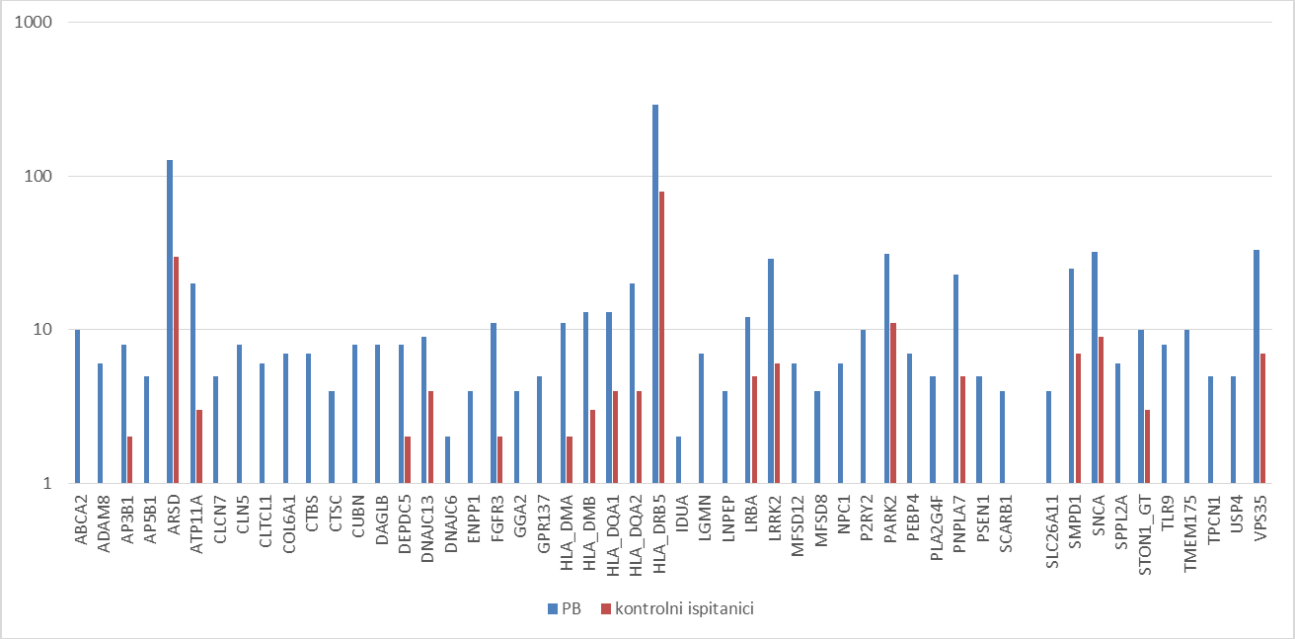


ID	Proces	uključen broj gena	značaj
GO:0016192	vezikularni transport	47	1.06e-17
GO:0006955	imunološki odgovor	42	4.18e-15
GO:0019884	obrada antigena i prezentacija egzogenog antigena	17	6.34e-15
GO:0006810	stanični transport	65	9.77e-15
GO:0002376	proces imunološkog sustava	48	1.34e-13
GO:0002274	aktivacija mijeloidnog leukocita	24	9.66e-12
GO:0002478	obrada antigena i prezentacija egzogenog peptidnog antigena	14	1.17e-11
GO:0019886	obrada antigena i prezentacija egzogenog peptidnog antigena preko MHC klase II	13	1.18e-11
GO:0051179	lokalizacija	67	2.71e-11
GO:0002443	imunitet posredovan leukocitima	24	3.85e-11
GO:0009056	katabolički proces	39	3.97e-11
GO:0006887	egzocitoza	26	4.41e-11
GO:0043312	degranulacija neutrofila	21	1.15e-10
GO:0045055	regulirana egzocitoza	24	1.66e-10
GO:0007040	organizacija lizozoma	10	3.07e-10
GO:0007033	organizacija vakuola	12	6.17e-10
GO:0002263	aktivacija stanica uključenih u imunološki odgovor	22	8.08e-10
GO:0002252	imunološki procesi	26	1.26e-09
GO:0044248	stanični katabolički proces	34	1.78e-09
GO:0046903	lučenje	27	4.50e-09

Slika 5.2. Varijante koje su prošle filtere kvalitete, a češće ili isključivo su se pojavljivale među oboljelima od PB su uključene u veliki broj bioloških procesa prvenstveno povezanih s kataboličkim procesima, staničnim transportom te lizosomalnom organizacijom

a) slikovni prikaz povezanosti proteina kodiranih navedenim genima
b) tablični prikaz puteva u koje su uključeni

Za one varijante koje su relativno česte u općoj populaciji, manje je vjerojatno da imaju patogeni potencijal te je dogovorena granica učestalosti potencijalno patogenih varijanti 5%. Upravo zbog toga smo u daljnjoj analizi eliminirali sve varijante s većom učestalošću (Tablica 5.2; Graf 5.1.).



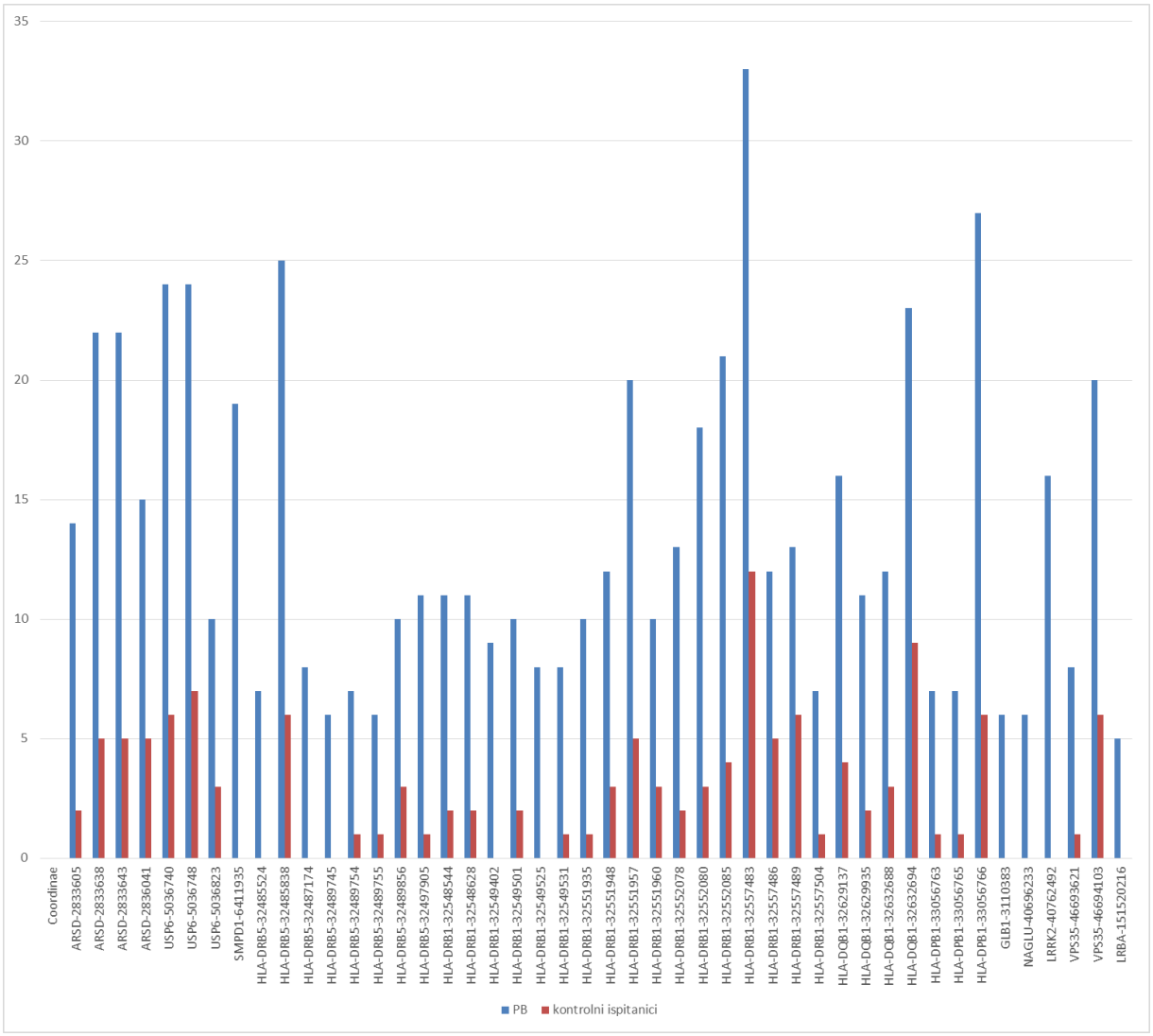
Graf 5.1. Grafički prikaz usporedbe varijanti koje su prošle filtere kvalitete te se u populaciji pojavljuju u češće od 5% između oboljelih od PB i kontrolnih ispitanika

Tablica 5.2 Usporedba varijanti koje su prošle filtere kvalitete te se u populaciji pojavljuju u češće od 5% između oboljelih od PB i kontrolnih ispitanika

frekvencija
udio u odnosu na sve pronađene varijante
omjer PB/kontrola
udio u odnosu na pronađene varijante iste skupine

	skupina			skupina			skupina			skupina	
Gen	PB	kontrola	Gen	PB	kontrola	Gen	PB	kontrola	Gen	PB	kontrola
ABCA2	10	1	DAGLB	8	0	IDUA	2	0	PSEN1	5	0
	0.26	0.03		0.21	0.00		0.05	0.00		0.13	0.00
	90.91	9.09		100.00	0.00		100.00	0.00		100.00	0.00
	0.35	0.10		0.28	0.00		0.07	0.00		0.17	0.00
ADAM8	6	0	DEPDC5	8	2	LGMN	7	0	SCARB1	4	0
	0.16	0.00		0.21	0.05		0.18	0.00		0.10	0.00
	100.00	0.00		80.00	20.00		100.00	0.00		100.00	0.00
	0.21	0.00		0.28	0.21		0.24	0.00		0.14	0.00
AP3B1	8	2	DNAJC13	9	4	LNPEP	4	0	SLC26A	4	0
	0.21	0.05		0.23	0.10		0.10	0.00		0.10	0.00
	80.00	20.00		69.23	30.77		100.00	0.00		100.00	0.00
	0.28	0.21		0.31	0.41		0.14	0.00		0.14	0.00
AP5B1	5	1	DNAJC6	2	0	LRBA	12	5	SMPD1	25	7
	0.13	0.03		0.05	0.00		0.31	0.13		0.65	0.18
	83.33	16.67		100.00	0.00		70.59	29.41		78.13	21.88
	0.17	0.10		0.07	0.00		0.42	0.52		0.87	0.73
ARSD	128	30	ENPP1	4	0	LRRK2	29	6	SNCA	32	9
	33,33	0.78		0.10	0.00		0.76	0.16		0.83	0.23
	81.01	18.99		100.00	0.00		82.86	17.14		78.05	21.95
	4,45	3,11		0.14	0.00		1,1	0.62		1,11	0.93
ATP11A	20	3	FGFR3	11	2	MFSD12	6	1	SPPL2A	6	1
	0.52	0.08		0.29	0.05		0.16	0.03		0.16	0.03
	86.96	13,04		84.62	15.38		85.71	14.29		85.71	14.29
	0.70	0.31		0.38	0.21		0.21	0.10		0.21	0.10
CLCN7	5	1	GGA2	4	0	MFSD8	4	0	STON1_GT	10	3
	0.13	0.03		0.10	0.00		0.10	0.00		0.26	0.08
	83.33	16.67		100.00	0.00		100.00	0.00		76.92	23,08
	0.17	0.10		0.14	0.00		0.14	0.00		0.35	0.31
CLN5	8	1	GPR137	5	1	NPC1	6	0	TLR9	8	0
	0.21	0.03		0.13	0.03		0.16	0.00		0.21	0.00
	88.89	43050		83.33	16.67		100.00	0.00		100.00	0.00
	0.28	0.10		0.17	0.10		0.21	0.00		0.28	0.00
CLTCL1	6	1	HLA_DMA	11	2	P2RY2	10	0	TMEM175	10	1
	0.16	0.03		0.29	0.05		0.26	0.00		0.26	0.03
	85.71	14.29		84.62	15.38		100.00	0.00		90.91	9,09
	0.21	0.10		0.38	0.21		0.35	0.00		0.35	0.10
COL6A1	7	1	HLA_DMB	13	3	PARK2	31	11	TPCN1	5	1
	0.18	0.03		0.34	0.08		0.81	0.29		0.13	0.03
	87.50	12,5		81.25	18.75		73.81	26.19		83.33	16.67
	0.24	0.10		0.45	0.31		1,08	1,14		0.17	0.10
CTBS	7	1	HLA_DQA1	13	4	PEBP4	7	0	USP4	5	0
	0.18	0.03		0.34	0.10		0.18	0.00		0.13	0.00
	87.50	12,5		76.47	23.53		100.00	0.00		100.00	0.00
	0.24	0.10		0.45	0.41		0.24	0.00		0.17	0.00
CTSC	4	0	HLA_DQA2	20	4	PLA2G4F	5	0	VPS35	33	7
	0.10	0.00		0.52	0.10		0.13	0.00		0.86	0.18
	100.00	0.00		83.33	16.67		100.00	0.00		82.50	17.50
	0.14	0.00		0.70	0.41		0.17	0.00		1,15	0.73
CUBN	8	1	HLA_DRB5	291	79	PNPLA7	23	5			
	0.21	0.03		7,58	2,6		0.60	0.13			
	88.89	11,11		78.65	21.35		82.14	17.86			
	0.28	0.10		10,11	8,2		0.80	0.52			

U daljnjoj analizi smo broj varijanti smanjili tako da smo isključili istoznačne varijante tj varijante koje ne dovode do promjene u aminokiselinskom slijedu. Takvih varijanti je bilo je u skupini oboljellih od PB bilo 613 (Tablica 5.3; Graf 5.2.)



Graf 5.2. Grafički prikaz usporedbe varijanti koje su prošle filtere kvalitete, češće su od 5% te dovode do promjene proteina između oboljelih od PB i kontrolnih ispitanika

Tablica 5.3 Usporedba varijanti koje su prošle filtere kvalitete, češće su od 5% te dovode do promjene aminokiselinskog slijeda između oboljelih od PB i kontrolnih ispitanika

frekvencija
udio u odnosu na sve pronađene varijante
omjer PB/kontrola
udio u odnosu na pronađene varijante iste skupine

Gen	skupina		Gen	skupina		Gen	skupina		Gen	skupina	
	PB	kontrola		PB	kontrola		PB	kontrola		PB	kontrola
ABCA2	3	0	CLTCL1	5	1	HLA_DRB5	215	56	SERINC2	38	11
	0,11	0		0,18	0,04		7,56	1,97		1,34	0,39
	100	0		83,33	16,67		79,34	20,66		77,55	22,45
	0,14	0		0,24	0,14		10,11	7,82		1,79	1,54
ABCC10	4	1	CTBS	5	1	LRBA	11	4	SGSH	4	1
	0,14	0,04		0,18	0,04		0,39	0,14		0,14	0,04
	80	20		83,33	16,67		73,33	26,67		80	20
	0,19	0,14		0,24	0,14		0,52	0,56		0,19	0,14
ACP2	3	0	CUBN	8	1	LRRK2	28	6	SMPD1	25	7
	0,11	0		0,28	0,04		0,98	0,21		0,88	0,25
	100	0		88,89	11,11		82,35	17,65		78,13	21,88
	0,14	0		0,38	0,14		1,32	0,84		1,18	0,98
ADAM8	6	0	DAGLB	4	0	MFSD12	5	1	SMPD4	14	4
	0,21	0		0,14	0		0,18	0,04		0,49	0,14
	100	0		100	0		83,33	16,67		77,78	22,22
	0,28	0		0,19	0		0,24	0,14		0,66	0,56
AHNAK	13	4	DEPDC5	4	0	NAGLU	6	1	SNCA	31	9
	0,46	0,14		0,14	0		0,21	0,04		1,9	0,32
	76,47	23,53		100	0		85,71	14,29		77,5	22,5
	0,61	0,56		0,19	0		0,28	0,14		1,46	1,26
ANPEP	4	1	FGFR3	9	2	NPC1	5	0	SPPL2A	5	1
	0,14	0,04		0,32	0,07		0,18	0		0,18	0,04
	80	20		81,82	18,18		100	0		83,33	16,67
	0,19	0,14		0,42	0,28		0,24	0		0,24	0,14
AP3B1	7	2	GPR137	5	1	P2RY2	6	0	TMEM175	6	0
	0,25	0,07		0,18	0,04		0,21	0		0,21	0
	77,78	22,22		83,33	16,67		100	0		100	0
	0,33	0,28		0,24	0,14		0,28	0		0,28	0
ARSD	73	18	HLA_DMA	11	2	PARK2	31	11	UNC93B1	4	1
	2,57	0,63		0,39	0,07		1,9	0,39		0,14	0,04
	80,22	19,78		84,62	15,38		73,81	26,19		80	20
	3,43	2,51		0,52	0,28		1,46	1,54		0,19	0,14
ARSG	7	2	HLA_DMB	13	3	PEBP4	4	0	VPS33B	4	0
	0,25	0,07		0,46	0,11		0,14	0		0,14	0
	77,78	22,22		81,25	18,75		100	0		100	0
	0,33	0,28		0,61	0,42		0,19	0		0,19	0
ATP11A	11	1	HLA_DQA1	13	4	PSEN1	4	0	VPS35	33	7
	0,39	0,04		0,46	0,14		0,14	0		1,16	0,25
	91,67	8,33		76,47	23,53		100	0		82,5	17,5
	0,52	0,14		0,61	0,56		0,19	0		1,55	0,98
CLN5	4	1	HLA_DQB1	169	56	SCARB1	4	0			
	0,14	0,04		5,94	1,97		0,14	0			
	80	20		75,11	24,89		100	0			
	0,19	0,14		7,95	8,82		0,19	0			

Daljnji korak jest bilo odvajanje samo onih varijanti koje se pojavljuju isključivo u oboljelih od PB. Takvih varijanti je bilo 396 u 208 gena te su prikazane u tablici 5.4.

Tablica 5.4. Popis gena čije se varijante pojavljuju isključivo u oboljelih od PB

Gen	Učestalost varijanti
HLA_DRB5	53
HLA_DRB1	28
HLA_DPB1	11
LRRK2	11
SNCA	11
LRBA	10
USP6	10
AP3B1	7
LRP2	7
ADAM8	6
AHNAK	6
ATP11A	6
CUBN	6
HLA_DQB1	6
NAGLU	6
P2RY2	6
PARK2	6
TMEM175	6
GBA	5
LRP1	5
MFSD12	5
NPC1	5
VPS35	5
ABCC10	4
ARSG	4
CLN5	4
CLTCL1	4
CTBS	4
DAGLB	4
DEPDC5	4
MYO7A	4
PEBP4	4
PSEN1	4
SCARB1	4
SERINC2	4
VPS33B	4

Konačno smo odabrali set gena čije se varijante najsnažnije povezuju s lizosomalnom disfunkcijom specifično u oboljelih od PB (Tablica 5.5).

Tablica 5.5. Set gena čije se varijante najsnažnije povezuju s lizosomalnom disfunkcijom specifično u oboljelih od PB

ARSD
IDUA
DNAJC13
GALC
LRBA
HLA-DRB5
USP6
MPO
ABCA2
ATP11A
CLN5
SMPD1
LRP2
ADAM8
AHNAK

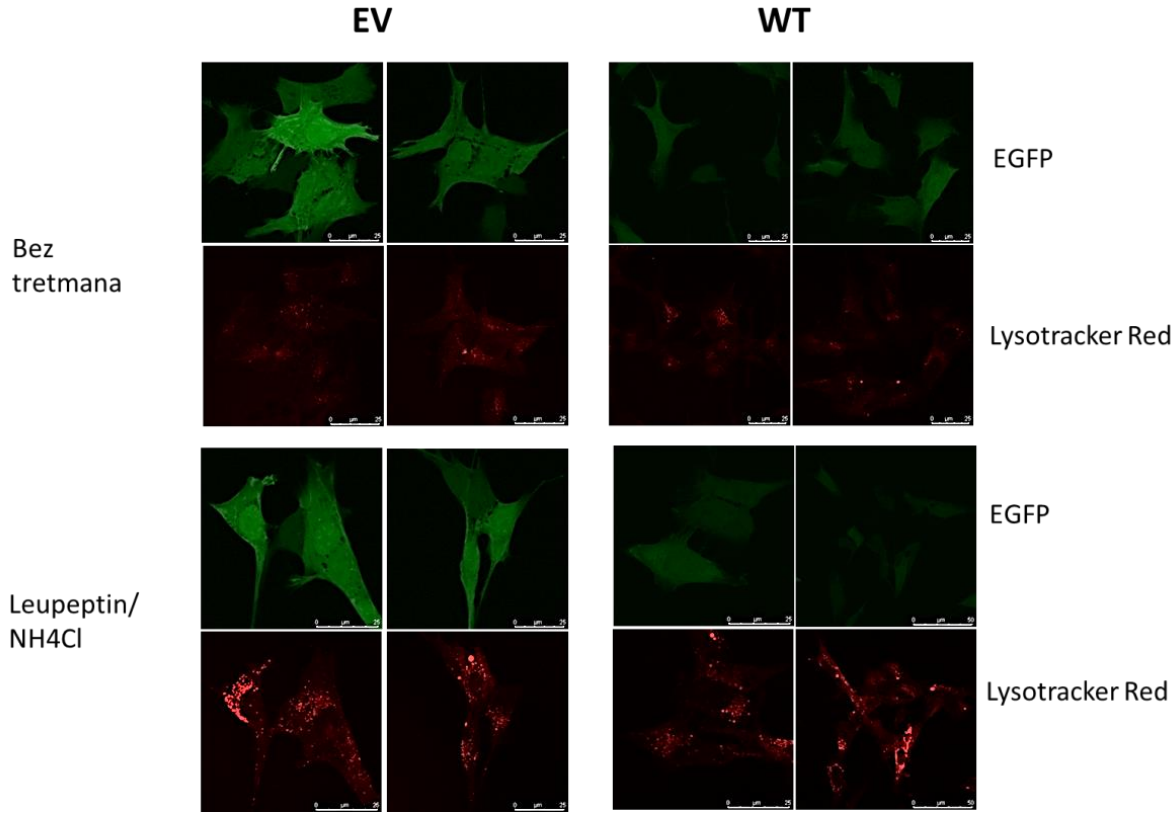
Deblje su označeni oni geni čiji smo utjecaj na lizosomalnu disfunkciju i nakupljanje aSyn evaluirali na staničnom modelu.

5.2. Evaluacija staničnih linija

Početni dio potvrdnih eksperimenata na staničnom modelu jest bila evaluacija SH-SY5Y stanica koje pojačano eksprimiraju aSyn označen EGFPom te optimizacija metoda prikaza aSyn i lizosomalne disfunkcije. Za početak je bilo potrebno pokazati da stanice zaista eksprimiraju aSyn, zatim istražiti postoji li razlika u lizosomalnom statusu između stanica koje pojačano eksprimiraju aSyn i onih s endogenom ekspresijom te usporediti aSyn u stanicama kojima je tretmanom provedena lizosomalna disfunkcija i onima s urednim lizosomalnim statusom. Ukratko, osim dokaza pojačane ekspresije aSyn htjeli smo pokazati uzročno posljedičnu vezu između nakupljanja aSyn i lizosomalne disfunkcije.

5.2.1. Lizosomalna disfunkcija uzrokovana leupeptin/NH_4Cl tretmanom ne dovodi do nakupljanja aSyn monomera

Imunocitokemijom je uspješno potvrđena pojačana ekspresija EGFP označenog aSyn u SH-SY5Y stanicama (Slika 5.3.), no nije bilo moguće zaključivati o razlikama u aSyn između stanica s lizosomalnom disfunkcijom i stanica bez tretmana. Ovom metodom nije pokazana razlika u lizosomalnom statusu između stanica s nativnom i onih s pojačanom ekspresijom aSyn.



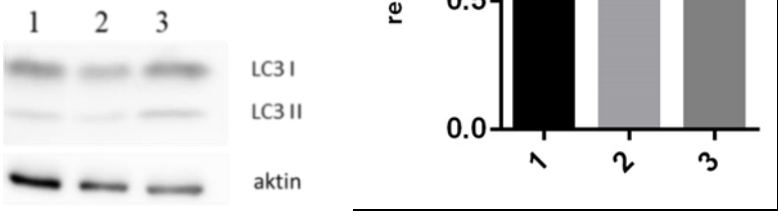
Slika 5.3. Imunocitokemija. EV stanice endogeno eksperimiraju aSyn, a WT stanice pojačano eksprimiraju aSyn označen GFPom. Nije vidljiva razlika u lizosomalnom statusu između EV i WT stanica niti bez niti s tretmanom leupeptin/NH_4Cl

Analizom proteina nismo pokazali razliku u aSyn monomerima između stanica tretiranih leupeptin/NH_4Cl i netretiranih stanica (Slika 5.4.). Time smo pokazali da Leupeptin/ NH_4Cl tretman ne dovodi do nakupljanja monomera aSyn. Isto tako pokazali smo da u stanicama koje pojačano nakupljaju aSyn nije prisutna pojačana lizosomalna disfunkcija u usporedbi sa stanicama koje eksprimiraju normalne razine aSyn (Slika 5.5.).



Slika 5.4. Nije pokazana razlika u ekspresiji aSyn monomeria između stanica tretiranih leupeptin/NH_4Cl i netretiranih stanica

Western blot, aSyn c20 protutijelo

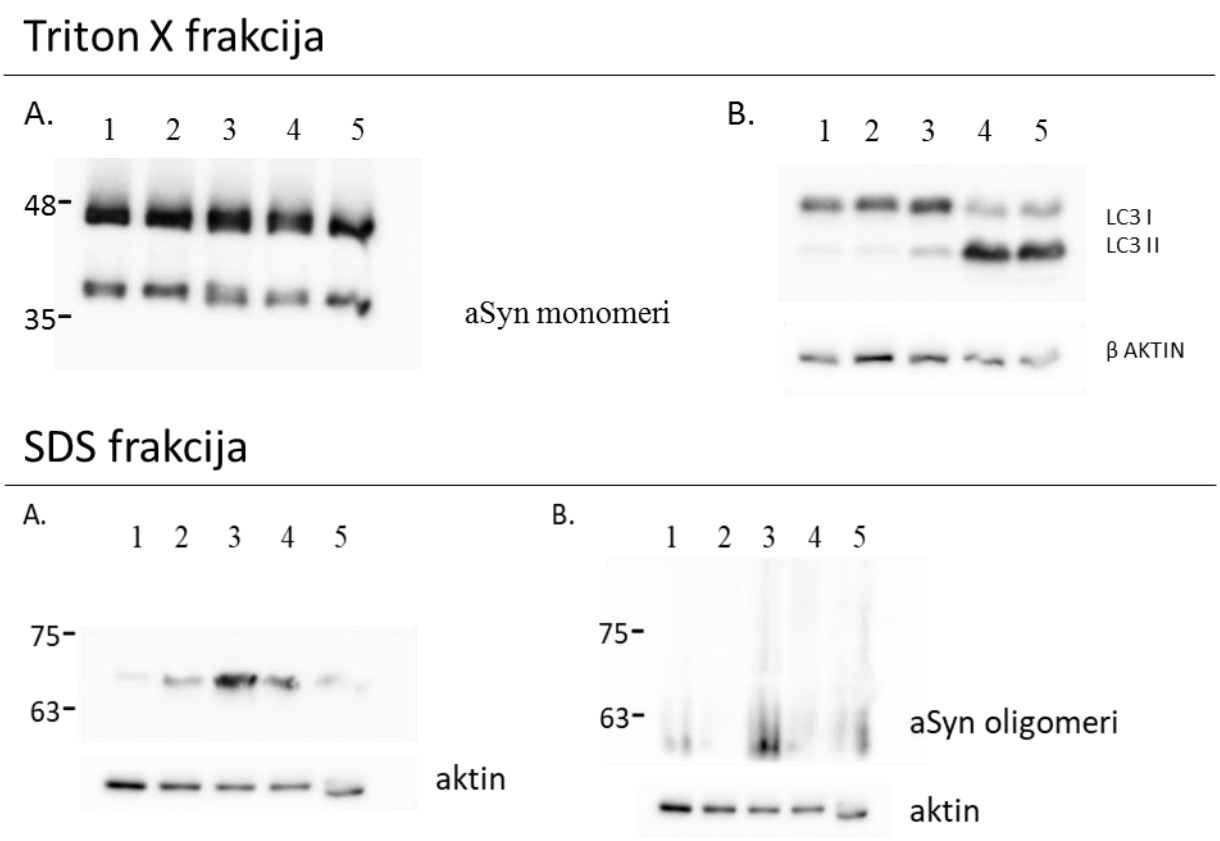


Slika 5.5. Prikaz lizosomalne aktivnosti u usporedbi stanica s nativnim izražajem aSyn (1), stanica koje pojačano eksprimiraju aSyn (2) i stanica koje pojačano eksprimiraju aSyn i tretirane su Leu/NH_4Cl l tretmanom.

Western blot, LC3 protutijelo

5.2.2. Lizosomalna disfunkcija leupeptin/NH_4Cl tretmanom dovodi do nakupljanja aSyn oligomera u stanicama koje pojačano eksprimiraju aSyn

Budući da nismo pronašli promjenu pod utjecajem lizosomalne disfunkcije na razini monomera sljedeći cilj je bila analiza na razini oligomera. Frakcioniranjem staničnog lizata po topljivosti aSyn monomeri su odvojeni u Triton X frakciju, dok su oligomeri sadržani u SDS frakciji. Triton X frakcija je ponovno pokazala da Leupeptin/NH_4Cl tretman ne dovodi do nakupljanja aSyn monomera (Slika 5.6.). Ovom metodom frakcioniranja proteina po topljivosti smo uspješno prikazali oligomere u SDS frakciji te pokazali da Leupeptin/NH_4Cl tretman dovodi do nakupljanja aSyn oligomera u stanicama koje pojačano eksprimiraju aSyn (Slika 5.6.). Iako je PADK evidentno izazvao jaču lizosomalnu disfunkciju, samo smo za Leupeptin/NH_4Cl tretman pokazali nakupljanje aSyn oligomera (Slika 5.6.).



Slika 5.6. Prikaz Triton X i SDS frakcije ovisno o Leu/NH_4Cl i PADK tretmanu.

Triton frakcija:

A. aSyn c20 protutijelo

B.LC3 protutijelo

SDS frakcija :

A. aSyn 505 protutijelo

B. aSyn c20 protutijelo

1 i 2 su bez tretmana, 3 su tretirane Leu/NH_4Cl tretmanom, a 4 i 5 PADK tretmanom;

Nakon 48 sati tretiranja stanica Leupeptin/NH_4Cl ili PADK tretmana na stanice je dodan 1%Triton X s proteaznim i fosfataznim inhibitorima. Nakon sonikacije i ultracentrifuge odvojen je supernatant, odnosno triton frakcija za analizu monomera. Za analizu oligomera pripremljena je SDS frakcija otapanjem taloga u 2% SDS. Jednake količine proteina su nanijete na dva paralelna gela (15%) za analizu triton frakcije te na 8% gel za analizu SDS frakcije. Izražaj aSyn monomera i oligomera analiziran je metodom Western blot. Kako bismo potvrdili da je u svim uzorcima nanesena jednaka količina proteina, sve membrane su naknadno inkubirane s protutijelom za β-aktin. Denzitometrijom je utvrđen omjer intenziteta signala proteina te je izražen u relativnim jedinicama.

5.3. Utišavanje gena

5.3.1. Validacija metoda utišavanja izražaja gena pomoću RNA-interferencije

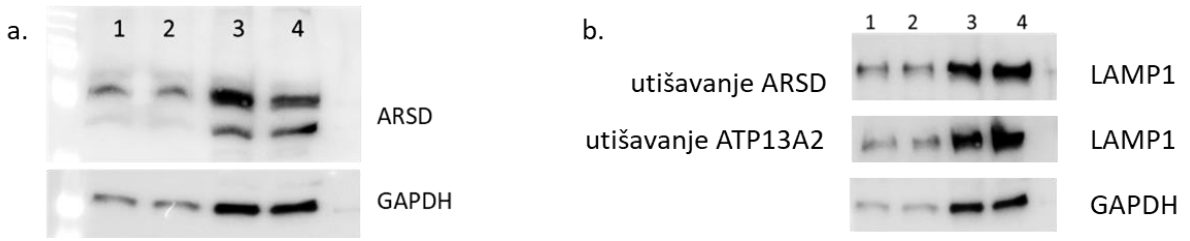
Eksperimentima utišavanja gena putem siRNA na stanicama SH-SY5Y nismo dobili zadovoljavajuće rezultate niti jednom od metoda utišavanja. Usporedba rezultata utišavanja lipidnom metodom, kalcijevim fosfatom te elektroporacijom gena na SH-SY5Y stanicama prikazana je na tablici 5.6.

Tablica 5.6. Prikaz rezultata utišavanja *ATP13A2* gena pomoću različitih pristupa RNA-interferencije na razini RNA. SH-SY5Y stanice

Metoda utišavanja		Uspješnost utišavanja gena
Lipidne metode utišavanja		
RNAImax	siRNA 5 nM	40,71%
	siRNA 10 nM	55.12%
	siRNA 20 nM	53.05%
Lipofectamine	siRNA 10 nM	58.79%
Utišavanje kalcijevim fosfatom	siRNA 20 nM	55,2%
Elektroporacija	siRNA 50 nM	48,1%

5.3.2. Preliminarni rezultati na H4 stanicama

Zbog nemogućnosti postizanja uspješnog utišavanja gena na SH-SY5Y stanicama preliminarne rezultate istraživanja tranzijentnog utišavanja gena RNA interferencijom smo proveli na H4 stanicama. Da bismo pokazali utjecaj utišavanja gena na aSyn, jedan uzorak stanica je istovremeno transficiran pomoću kalcijevog fosfata sa synT/synphilin plazmidom. Najbolji rezultati su postignuti kombiniranom transfekcijom kod koje smo synphilin i synT transficirali kalcijevim fosfatom, a siRNA lipofectaminom 3000. Utišavanje je bilo evidentno na razini RNA kao i na razini proteina (Slika 5.7.). Nadalje, protutijelom protiv LAMP1 smo prikazali blagu lizosomalnu disfunkciju uslijed utišavanja *ARSD* gena, a kao pozitivnu kontrolu smo koristili lizosomalnu disfunkciju kao posljedicu utišavanja *ATP13A2* gena (Slika 5.7.). Na razini proteina je bilo teško zaključivati o nakupljanju aSyn monomera, no imunocitokemijom smo pokazali veći udio stanica s većim brojem inkluzija stanica s više od 5.

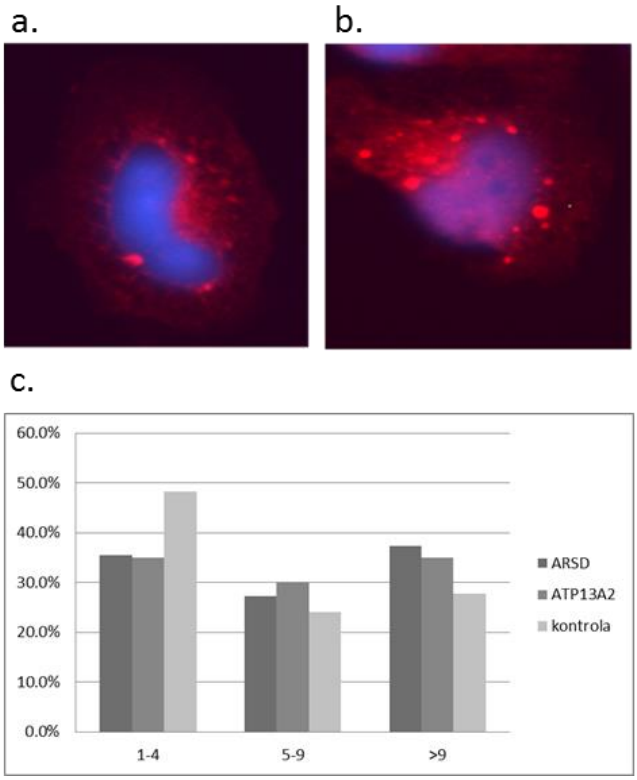


Slika 5.7. Utišavanje *ARSD* gena u H4 stanicama:

a. Prikaz utišavanja *ARSD* gena

b. Prikaz lizosomalne disfunkcije LAMP1 antitijelom na H4 stanicama s utišanim ARSD i ATP13A2 genom

1. trostruka transfekcija: SynT/Synphilin s kalcijevim fosfatom → kontrolna siRNA transficirana putem Lipofectamine 3000
2. trostruka transfekcija: SynT/Synphilin s kalcijevim fosfatom → ARSD/ATP13A2 siRNA transficirana putem Lipofectamine 3000
3. reverzna transfekcija: kontrolna siRNA transficirana putem Lipofectamine 3000
4. reverzna transfekcija: ARSD/ATP13A2 siRNA transficirana putem Lipofectamine 3000

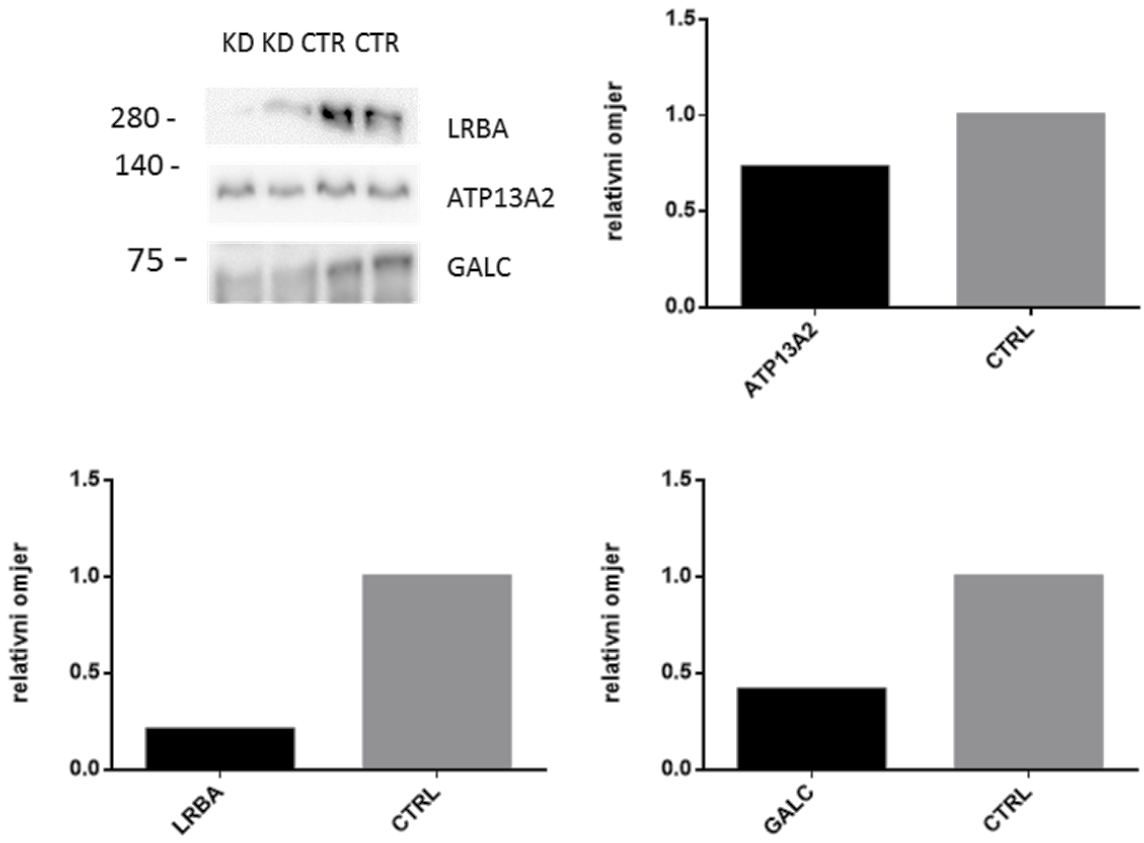


Slika 5.8. Prikaz aSyn inkluzija u stanicama transficiranih SynT/Synphilin te kontrolnom siRNA (a.) te stanica transficiranih SynT/Synphilin i utišanom ARSD ekspresijom (b.).
c. grafički prikaz broja stanica ovisno o broju aSyn inkluzija

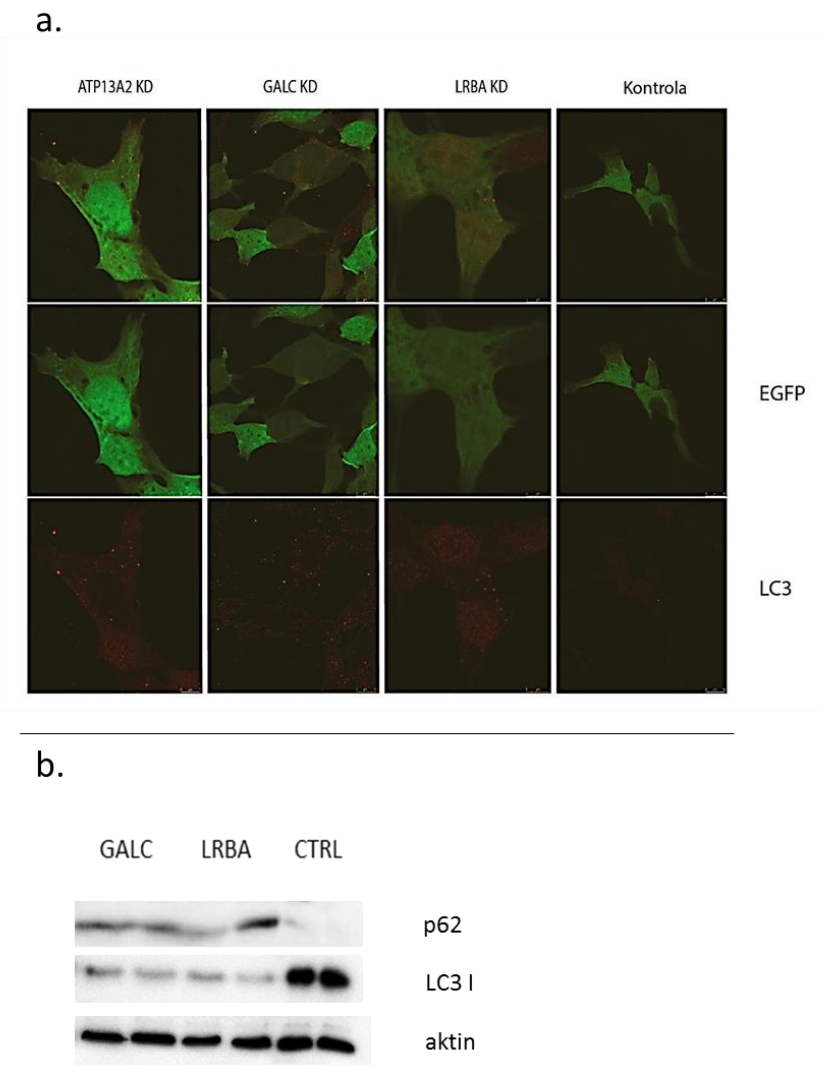
5.4. Rezultati stabilnog utišavanja gena shRNA

5.4.1. Utišavanje *GALC* i *LRBA* gena dovodi do lizosomalne disfunkcije i nakupljanja aSyn monomera

Utišavanjem *LRBA* i *GALC* gena metodom lentiviralne transdukcije gena shRNA dobili smo odlične rezultate utišavanja, dok je za *ATP13A2* kojeg smo koristili kao pozitivnu kontrolu lizosomalne disfunkcije i nakupljanja aSyn učinkovitost utišavanja bila oko 30% (Slika 5.9.). Imunocitokemijom smo prikazali lizosomalnu disfunkciju i uslijed *LRBA i GALC* utišavanja (Slika 5.10.). Analizom ekspresije aSyn monomera pokazali smo najjaču korelaciju utišavanja *GALC* gena i nakupljanja aSyn monomera ($p<0,05$, student t-test) (Slika 5.11.).



Slika 5.9. Rezultati utišavanja *LRBA, ATP13A2 i GALC* gena metodom lentiviralne transdukcije gena shRNA. Nakon uspostavljanja stabilne linije uspješno transduciranih stanica, stanice su pokupljene, priređeni su stanični lizati, jednake količine proteina su nanijete u duplikatu te je izražaj proteina analiziran metodom Western blot. Kako bismo potvrdili da je u svim uzorcima nanesena jednaka količina proteina, sve membrane su naknadno inkubirane s protutijelom za β-aktin. Denzitometrijom je utvrđen omjer intenziteta signala stanica transduciranih shRNA za ciljni gen (KD) i kontrolnom shRNA (CTRL) te je izražen u relativnim jedinicama.



Slika 5.10. Prikaz lizosomalne disfunkcije uslijed utišavanja *ATP13A2, GALC i LRBA* gena.

a. Imunocitokemija
b. Western blot



Slika 5.11. Prikaz ekspresije aSyn monomera Western blot metodom. Nakon utišavanja *LRBA, ATP13A2 i GALC* gena metodom lentiviralne transdukcije gena shRNAstanice su pokupljene, priređeni su stanični lizati te je po1µg proteina od svake stanične linije u duplikatu nanijet na 15% SDS-PAGE gel. Kako bismo potvrdili da je u svim uzorcima nanesena jednaka količina proteina, sve membrane su naknadno inkubirane s protutijelom za β-aktin. Denzitometrijom je utvrđen omjer intenziteta signala stanica transduciranih shRNA za ciljni gen (*ATP13A2, GALC i LRBA*) i kontrolnom shRNA (CTRL) te je izražen u relativnim jedinicama.

6. RASPRAVA

6.1. LYSOGENE u konteksu monogentskih oblika PB

Dugo se smatralo da je PB jedna jedinstvena negenetska bolest. Međutim, danas se sve veći broj mutacija gena i varijanti povezuje s PB te se smatra da su mutacije uzrok u oko 2-3% slučajeva PB s kasnim početkom te u preko 50% juvenilnih oblika kod kojih pretežno govorimo o monogenskim bolestima. Juvenilni oblik PB javlja se u malom broju slučajeva, no pruža važan uvid u patogenezu bolesti. Mutacije u nekoliko gena identificirane su kao uzroci juvenilnog oblika PB s Mendelovim tipom nasljeđivanja, a utvrđuje se sve više čimbenika rizika za idiopatski tip PB, uključujući polimorfizme u regijama *SNCA*, *LRRK2* (76) i *PSEN1* (34) gena. Najčešće identificirani geni koji se nalaze u podlozi juvenilnog oblika bolesti uključuju *SNCA* (29), *LRRK2* (76), *PARKIN* (*PARK2*) (77), *DJ-1* (78) i *PINK1* (79). U naše istraživanje su uključeni samo oboljeli od idiopatskog oblika PB, no ipak smo pronašli znatan broj heterozigotnih varijanti navedenih gena povezanih s juvenilnim oblicima bolesti. Ukoliko se uzmu samo one varijante koje su prošle filtere kvalitete, one koje se u općoj populaciji pojavljuju u manje od 5% te one koje dovode do promjene aminokiselinskog slijeda pronađeno je 8 mutacija *SNCA* gena i to u 22 pacijenta i 9 kontrolnih ispitanika. Od toga je 6 varijanti bilo prisutno isključivo u oboljelih od PB. Jedna od pronađenih varijanti bila je rs33988309 za koju je pokazana povezanost s demencijom s Lewyevim tjelešcima (80). Za *PARK2* gen smo opisali četiri varijante gena, od kojih je jedna opisana kao benigna varijanta za juvenilni oblik PB. Osim toga, pronašli smo pet varijanti *PINK1* gena u 9 pacijenata i u troje kontrolnih ispitanike. Od toga su dvije bile prisutne samo u pacijentima te do sada nisu opisane u literaturi. Zatim je pronađeno 9 varijanti *LRRK2* gena i to u 21 pacijentu i 6 kontrolnih ispitanika. Od toga je 6 varijanti bilo prisutno isključivo u oboljelih od PB te su tri opisane kao benigne, a tri nisu do sada opisane u literaturi. Razumijevanje funkcije gena mutiranih u nasljednim oblicima PB daje uvid u etiologiju bolesti i otkriva nove putove u staničnoj biologiji. Tako su genetske studije otkrile da proteini kodirani genima koji su mutirani u autosomno recesivnom obliku PB, *PINK1* i *Parkin*, sudjeluju u istim putovima upravljanja kontrolom kvalitete mitohondrija, podupirući prethodne dokaze da je oštećenje mitohondrija uključeno u PB (81). Mutacije u genu *LRRK2* su prvi put identificirane u obiteljima s autosomno dominantnim oblikom PB (76), no ubrzo je identficirano da se mutacija G2019S (c.G6055A) nalazi ne samo u 5–6% slučajeva obiteljskog PB nego i u 1–2% slučajeva sporadičnog oblika PB (82). Zanimljivost otkrića ove mutacije jest da se time po

prvi put uspostavilo načelo za genetsku determinantu koja je često uključena u sporadični oblik PB (83) Ova mutacija je vrlo česta u oboljelih od PB i iznimno rijetka u zdravih osoba, no prevalencija značajno ovisi i o populaciji (83). Tako je prevalencija G2019S vrlo niska u Aziji, niska u sjevernoj Europi, no visoka u Italiji, Španjolskoj i Portugalu (83). Našim panelom nismo identificirali niti jednog ispitanika s navedenom mutacijom, no ova mutacija je zanimljiva u kontekstu ovog istraživanja jer su istraživanja na G2019S varijanti dodatno ukazala na važnost autofagije u patogenezi PB. Naime, pokazana je aktivna uloga autofagije u povlačenju neurita povezanom s ekspresijom mutiranog G2019S-*LRRK2* u SH-SY5Y neuroblastomskim stanicama (84). Daljnja istraživanja koja su prvenstveno uključivala GWAS pristup također su identificirala varijante *LRRK2* gena kao čimbenike rizika za sporadični oblik PB (85). Precizan mehanizam kojim varijante *LRRK2* genske regije doprinose riziku od bolesti nisu u potpunosti jasne, no pokazano je da su polimorfizmi povezani sa sporadičnim PB prisutni uglavnom u promotorskoj regiji *LRRK2* gena (86). Na temelju toga je pretpostavljeno da te varijante ne mijenjaju strukturu proteina ili njegovu funkciju nego mijenjaju razinu ekspresije gena, iako je te tvrdnje potrebno još dodatno istražiti na staničnim modelima (86). S druge strane, do danas je u *LRRK2* genu pronađeno više od 75 mutacija od kojih je sedam mutacija s promjenom aminokiselinskog slijeda (G2019S, I2020T, N1437H, R1441G / C / H i Y1699C) opisano kao patogene za familijarni oblik PB (87). Navedene mutacije su koncentrirane u središnjim katalitičkim domenama, što ukazuje na bitnu ulogu GTPaze i kinazne domene u patogenezi PB. Središnja katalitička domena LRRK2 se sastoji od tri dijela, Roc (prema engl. *Ras of complex proteins*), COR (prema engl. *C-terminal of ROC*) i kinaze. Među šest varijanti *LRRK2* gena pronađenih među našim pacijentima koje nisu bile prisutne u kontrolnim ispitanicima tri su varijante kodirale za središnju katalitičku domenu (jedna za ROC, jedna za kinazu i jedna za COR) te jedna za promotorsku regiju. Najčešća je bila ona za kinazu koja je pronađena u četvero ispitanika.

6.2. Biološki putovi uključeni u patogenezu PB

Genetske studije su identificirale potencijalne rizične čimbenike koji su pomogli profilirati i rasvijetliti biološke putove uključene u patogenezu PB. Metaanaliza GWAS studija provedena u najvećoj kohorti pacijenata oboljelih od PB i kontrolnih ispitanika do danas, identificirala je 17 novih značajnih lokusa rizika, čime je ukupni broj lokusa povezanih s PB prešao brojku od 40 (73). Proveli su GWAS na 6.476 oboljelih od PB te 302.042 kontrolnih ispitanika, a potom su napravili metaanalizu do tada objavljenih studija s više od 13.000 slučajeva PB i 95.000 kontrolnih ispitanika te uključenih 9.830 preklapajućih varijanti (73). Analizom identificiranih kandidatnih gena i njihove povezanosti s već otprije poznatim putovima uključenim u patogenezu PB, pokazali su da je većina varijanti otkrivenih u oboljelih od PB uključena u autofagno lizosomalni put (73). Uz otprije opisane gene *GBA* (glukocerebrozidaza) i *TMEM175* (transmembranski protein 175), otkrivena je povezanost još tri gena s lizosomalnim putem i to *CTSB* (katepsin B), *ATP6V0A1* (ATPaze H + koji prenosi V0 podjedinicu A1) i *GALC* (galaktocerebrozidaza) te povezanost gena *KAT8* (lizin acetiltransferaza) za koji je pokazano da mijenjaju autofagni tijek (73). Svi navedeni geni osim *KAT8* su uključeni u LYSOGENE panel te su pokazali pojačanu pojavnost varijanti u oboljelih od PB u odnosu na kontrolne ispitanike. Od navedenih gena najzanimljivija razlika je bila u *GALC* genu čiju ulogu smo dalje istražili na staničnom modelu. Naše istraživanje koje je bilo fokusirano upravo na gene autofagno lizosomalnog puta preciziralo je tvrdnju o utjecaju varijanti gena na PB putem mehanizama razgradnje te smo pokazali da su otkrivene varijante u našem istraživanju uključene u veliki broj bioloških procesa prvenstveno povezanih s kataboličkim procesima, staničnim transportom te lizosomalnom organizacijom.

GWAS su definirale *TMEM175* kao jedan od potencijalnih čimbenika rizika za PB. Našim panelom smo pronašli 6 različitih, do sada u literaturi neopisanih, varijanti *TMEM175* gena u 5 pacijenata oboljelih od PB koje nisu bile prisutne u kontrolnih ispitanika. Jinn i suradnici (88) su istražili funkciju TMEM175 u neuronalnom modelu te potvrdili da manjak TMEM175 rezultira nestabilnim lizosomskim pH, što je dovelo do smanjene lizosomalne katalitičke aktivnosti, smanjene aktivnosti glukocerebrozidaze, smanjenja klirensa autofagosoma i smanjenog mitohondrijalnog disanja. Isto tako, pokazali su izravnu povezanost nedostatka TMEM175 u primarnim neuronima štakora i akumulacije fosforiliranih agregata aSyn ukazujući na njegovu krucijalnu ulogu u patogenezi sinukleinopatija (88). Potpuno utišavanje ekspresije *TMEM175* gena rezultiralo je smanjenom razinom proteina zrelih CTSD, CTSB i LAMP1, što upućuje na to da odsutnost TMEM175 doprinosi ranoj dezintegraciji

disfunkcionalnih lizosoma (88) Našim istraživanjem smo prikazali jednu varijantu *CTSB* gena te jednu *CTSD* gena koje su bile prisutne u troje oboljelih od PB te nisu bile prisutna u kontrolnim ispitanicima. TMEM175 jest lizosomalni K^+ kanal te je ovo istraživanje potvrdilo ulogu disregulacije ionskog prijenosa preko lizosomalne membrane u razvoju neuroloških bolesti. Važnost regulacije ionskog transporta u lizosomalnoj funkciji u PB vidljiva je i na već spomenutom primjeru *LRRK2* gena, a pod utjecajem lizosomalnog pH jest i funkcija GBA, jednog od najpoznatijih rizičnih čimbenika za PB opisanog u nastavku.

Isto tako, već otprije je poznato da poremećaj i ATP13A2 koji regulira prijenos kationa preko lizosoma, dovodi do disfunkcije lizosomalne degradacije proteina i autofagosoma putem oslabljenog lizosomskog zakiseljavanja (52, 89). Pokazano je da ATP13A2 igra ulogu u metabolizmu Mn^{2+} i Zn^{2+}, mitohondrijskim putovima te autofagno lizosomalnim putovima (90). *ATP13A2* gen kodira za lizosomsku ATPazu odgovornu za održavanje intralizosomskog pH i suzbija aSyn toksičnost što je pokazano u C. elegansu, kvascu i primarnim neuronskim kulturama. Mutacija ovog gena dovodi do juvenilnog oblika PB, Kufer Rakebove bolesti (59). Temeljeno na istraživanju provedenom od Usenović i suradnika (52), upravo je mutacija ovog gena u našem istraživanju korištena kao pozitivna kontrola lizosomalne disfunkcije koja dovodi do nakupljanja aSyn. Oni su pokazali da gubitak ATP13A2 u humanim fibroblastima od bolesnika s Kufor-Rakeb sindromom i mišjim primarnim neuronima dovodi do smanjenja lizosomalne funkcije. Pokazali su da tako izazvana lizosomalna disfunkcija dovodi do akumulacije aSyn i toksičnosti u primarnim kortikalnim neuronima. Ta toksičnost je atenuirana utišavanjem endogenog aSyn sugerirajući da gubitak ATP13A2 posreduje neurotoksičnost, barem djelomično, preko akumulacije aSyna (52). U dvoje pacijenata oboljelih od PB pronašli smo istu heterozigotnu p.Thr953= (rs144557304) varijantu *ATP13A2* gena koja je u literaturi opisana kao varijanta nejasnog kliničkog značaja za razvoj Kufer Rakebove bolesti. Eksperimentima na H4 i SH-SY5Y staničnom modelu potvrdili smo da utišavanje *ATP13A2* gena dovodi do lizosomalne disfunkcije te povećanog nakupljanja aSyn. Lizosomalna disfunkcija je pokazana LAMP1 protutijelom na H4 stanicama te LC3 protutijelom na SH-SY5Y staničnom modelu. Nakupljanje aSyn uslijed utišavanja *ATP13A2* gena smo na H4 staničnom modelu prikazali povećanim brojem inkluzija istodobno transficiranih synT i synphilina. Nakupljanje u SH-SY5Y staničnom modelu s pojačanom ekspresijom aSyn bilo je evidentno na proteinskoj razini i evidentirano Western blot metodom.

Otkriće povezanosti mutacija u genu *ATP13A2* s PB je izrazito značajno jer predstavlja prvu genetsku vezu između lizosomalnih putova i parkinsonizma (89). Iako njegova funkcija još uvijek nije u potpunosti rasvjetljena vjeruje se da mutacije *ATP13A2* gena ispoljavaju svoj patogeni učinak uzrokujući gubitak funkcije ATP13A2 u lizosomima. Doista, proteinski produkt mutiranog *ATP13A2* gena je zadržan u endoplazmatskom retikulumu, što rezultira nedostatkom ATP13A2 u lizosomima (89). Osim toga, pokazana je povišena razina *ATP13A2* glasničke RNA (mRNA, prema engl. *messenger RNA*) u preostaloj SNpc dopaminergičkih neurona iz uzoraka mozgova uzetih postmortem od oboljelih od sporadičnog oblika PB (54). Isto tako, pokazano je značajno povećanje proteina ATP13A2 u SNpc i drugim područjima mozga oboljelih od sporadičnog oblika PB (90). Što se tiče utjecaja mutacija *ATP13A2* gena na lizosomalnu funkciju, usporedbom s kontrolnim fibroblastima, fibroblasti s mutiranim *ATP13A2* pokazuju nekoliko lizosomalnih promjena, kao što je oslabljeno lizosomalno zakiseljavanje, smanjeno sazrijevanje lizosomskih enzima, smanjena razgradnja lizosomalnih supstrata, povećana osjetljivost na lizosomalnu membranu permeabilizacije i defektni klirens i naknadna akumulacija nerazvijenih autofagosoma (89).

Osim mutacija gena za same lizosome u oboljelih od PB otkriveno je i mnoštvo varijanti gena za vezikularni transport uključujući retromer komponente kao što je *VPS35* (55), *LIMP2* koji je neophodan za usmjeravanje betaglukozidaze na lizosome (91) i *LRRK2*, koji mogu fosforilirati i deregulirati Rab GTPazu da utječe na vezikularni transport (92). Zanimljivo je da smo identificirali 5 (10,6%) pacijenata s varijantama *VPS35* gena te čak 10 (21,27%) pacijenata s varijantama *LRRK2* gena koje nismo pronašli u kontrolnoj skupini ispitanika. Jedna od identificiranih varijanti VPS35 gena, rs199765664, koja je bila prisutna u dvoje ispitanika je također opisana u jednoj studiji provedenoj na 12 ispitanika oboljelih od PB iz male izolirane populacije ruralnog područja jugoistočnog dijela Češke s do sada najvećom incidencijom PB opisanom u Europi (93). Do danas su opisane brojne mutacije *VPS35* gena (D620N, P316S, R524W i L774M) koje su povezane s PB s kasnim nastupom, a analiza 144 pojedinca potvrdila je da su ukupne razine VPS35 mRNA u SNpc značajno smanjene u bolesnika s PB (94). VPS35 je najveća komponenta retromera, s kritičnom ulogom u transportu endosoma do Golgievih tjelešaca. Retromeri imaju središnju ulogu u recikliranju membranskih proteina te su ključni u endosomalno-lizosomalnom transportu. Evolucijski gledano, područje *VPS35* gena je izrazito visoko konzervirana regija. Identifikacija patogenih mutacija *VPS35* gena u oboljelih od PB daje jasnu genetsku podlogu uloge retromera u patogenezi neurodegeneracije. Tako je primjerice poznato da nedostatak retromera u AB

remeti Wnt signalni put i transport amiloidnim prekursorskim proteinom (APP), a povezan je s povišenjem endogenog β amiloida. S druge strane, zanimljvo je da demencija nije izražena u bolesnika s parkinsonizmom i nositelja *VPS35* p.Asp620Asn (95). Zbog evidentno važne, no još uvijek nepotpuno istražene, uloge retromera u neurodegeneraciji, istraživanje *VPS35* mutacija pruža platformu za otkrivanje mehanizama kojim defekt transporta određenih proteina utječe na selektivnu ranjivost dopaminergičkih neurona. Čini se da je endosomalna trgovina zajednički put koji je poremećen u neurodegenerativnim bolestima te bi rasvjetljavanje uloge VPS35 i njegovih interakcija dodatno rasvijetlilo ulogu retromera ne samo u PB nego i drugim kognitivnim i neurodegenerativnim bolestima (95). Prikazani rezultati koji pokazuju ulogu mutacija više gena uključenih u različite segmente autofagno lizosomalnog puta dovode do zaključka da više varijanti amplificira disfunkciju opisanog sustava razgradnje proteina (58, 96).

6.3. Uloga varijanti HLA kompleksa u patogenezi PB

Spomenuta GWAS metaanaliza koju su proveli Chang i suradnici (73) pokazala je također vrlo kompleksnu povezanost HLA regije s PB. To je u skladu s prethodnom studijom koja je sugerirala da je utjecaj promjena HLA regije na razvoj PB posredovan višestrukim čimbenicima HLA, uključujući nezavisne regulatorne čimbenike (97). Našim istraživanjem smo pokazali da su varijante gena HLA kompleksa izrazito zastupljene u oboljelih od PB te smo pronašli čak 51 varijantu gena HLA kompleksa prisutnu u oboljelih, a koje nisu bile prisutne kod kontrolnih ispitanika. Te varijante su pokazane kod čak 29 pacijenata (63,04%). Tri varijante koje su pokazale najveću razliku u zastupljenosti između pacijenata i kontrolnih ispitanika su sve iz HLA kompleksa te se redom radi o *HLA-DRB5, HLA-DRB1* te *HLA-DPB1* genu. Zbog velikog broja blisko povezanih gena i njihovih poimorfizama, HLA je jedna od najsloženijih regija u ljudskom genomu (97). Naši rezultati su u skladu s brojnim istraživanjima koja su pokazala vezu između imunološki posredovanih bolesti i PB (85, 98, 99).

Hamza i suradnici (98) su pokazali snažnu povezanost PB i HLA regije, s vršnom vezom rs3129882 polimorfizma introna 1 *HLA-DRA* gena. No, zanimljivo, našim istraživanjem nismo pokazali značajne varijante ovog gena. Razlog može ležati u činjenici da je *HLA-DRA* vrlo monomorfan gen (98). S druge strane, *HLA-DRB* lanci su vrlo varijabilni i povezani su s brojnim poremećajima. U skladu s našim rezultatima, GWAS studije su pokazale uključenost ponajprije *HLA-DRB5* gena u patogenezu PB (85). Interpretacija ove povezanosti je vrlo složena, tim više jer je lokus *HLA-DRB5* prisutan samo u otprilike 20% ljudi (99). Isto tako, i za *HLA-DRB1* je opisana povezanost s PB. Dvije studije su pokazale da je *HLA-DRB1* različito distribuiran u oboljelih od PB i kontrolnih ispitanika, s pojačanom zastupljenošću *DRB1*03* i smanjenom zastupljenošću *DRB1*04* alela u slučajevima PB u usporedbi s kontrolnim ispitanicima (99, 100). Od otkrića povezanosti HLA regije s PB provedena su mnoga istraživanja na tom području. Tako je GWAS provedena u nizozemskoj populaciji (772 slučajeva, 2024 kontrola) potvrdila povezanost PB s HLA te su pokazali najjaču povezanost s rs4248166, također iz regije HLA klase II (101). Uključenost HLA regije u PB potvrđena je i metaanalizom Međunarodnog parkinsonskog genomskog konzorcija (International Parkinson Disease Genomics Consortium IPDGC), koja je identificirala chr6:32588205 u HLA klasi II regiji kao najznačajniji SNP u njihovom uzorku (85).

Sva nova istraživanja koja učvršćuju znanja o povezanosti PB s HLA naglašavaju važnost imune komponente u etiologiji PB te vode boljem definiranju potencijalnih terapijskih ciljnih mjesta. Ipak, vidljivo je kako svaki otkriveni lokus ima pojedinačno vrlo slab utjecaj na razvoj bolesti, no razmotrimo li ih zajedno uz *SNCA, MAPT i GAK*, kumulativni učinak može biti značajan (98). Pokazano je da u usporedbi s ispitanicima koji su imali jedan ili nijedan alel rizika, rizik od PB je udvostručen za pojedince koji su imali četiri alela rizika (OR = 2,49, 95% CI = 1,79-3,47, p= 6,5 × 10−8), te je bio pet puta veći kod pojedinaca koji su imali šest ili više alela rizika (OR = 4,95, 95% CI = 3,20–7,64, p = 5,5 × 10-13) (98). Ovi podaci podupiru dugogodišnju predodžbu da je rizik od PB posljedica kumulativnih učinaka čimbenika rizika sa skromnim pojedinačnim učinkom (98). Ovakav koncept u kojem postoji mnoštvo varijanti slabe penetracije sugerira da se etiologija idiopatske PB može objasniti međudjelovanjem nekoliko djelomično penetrantnih mutacija koje konvergiraju u zajedničke putove, povezane primjerice s autofagno lizosomalnim putom (96).

6.4. Zajednička genetska podloga lizosomalnih bolesti nakupljanja i PB

Iako se pretežno radi o bolestima dječje dobi, kod određenih oblika lizosomalnih bolesti nakupljanja kod kojih oboljeli dožive odraslu dob prominentan simptom jest neurodegeneracija, upučujući na važnost uspješne lizosomalne funkcije u aktivnosti neurona (102). Autofagno lizosomalni putovi od presudne su važnosti za održavanje normalne neuronske homeostaze i funkcije. Stoga, bilo kakvo smanjenje njihovih funkcija može doprinijeti neuropatogenim procesima (102). Zanimljivo je da približno dvije trećine oboljelih od lizosomalnih bolesti nakupljanja ima izražene barem neke neurološke simptome (103). Kako je i PB u osnovi bolest nakupljanja, brojna istraživanja su se okrenula povezivanju ovih dviju skupina bolesti. Očita poveznica jest da je i kod mnogih lizosomalnih bolesti nakupljanja prisutno nakupljanje aSyn (59). Iako se smatra da nakupljanje aSyn ima ključnu ulogu u patogenezi sinukleinopatija, molekularni mehanizmi akumulacije i razgradnje aSyn nisu u potpunosti jasni. Identifikacija varijanti lizosomalnih gena u oboljelih od neurodegenerativnih bolesti usmjerilo je istraživanja na te putove. Tako je pokazano da mutacije *GBA* gena rezultiraju smanjenom lizosomskom proteolitičkom funkcijom i akumulacijom aSyn (15). U slučaju mutiranog GBA gena, dolazi do nakupljanja njegovih lipidnih supstrata koji izravno alteriraju agregaciju aSyn (15). Heterozigotne mutacije *GBA* gena su najčešći genetski čimbenik rizika za razvoj PB (62). Pokazana je različita klinička slika oboljelih od PB s identificiranim heterozigotnim *GBA* mutacijama karakterizirana ranijim nastupom bolesti te bržim napredovanjem motoričkih simptoma (104). Uz to je prisutno i izraženije kognitivno oštećenje (105). U skladu s izraženijim napredovanjem motornih i nemotornih simptoma kod nositelja *GBA* mutacije, predložen je i povećan rizik od smrtnosti, no ovu hipotezu je potrebno potvrditi u većoj populaciji (106). Nadalje, vjerojatnije je da će oboljeli od PB koji nose *GBA* mutacije napredovati do demencije. Isto tako pokazana je još izraženija povezanost *GBA* muitacija s demencijom s Lewyjevim tjelešcima nego s PB (107). S druge strane, zanimljivo je da do sada *GBA* nije povezana s drugim neurološkim bolestima nakupljanja poput tauopatija, kao što su progresivna supranuklearna paraliza (PSP) i kortikobazalna degeneracija (CBD) (107). Najčešće opisivane mutacije *GBA* gena pronađene pri genskim probirima su p.N370S i p.L444P (107), dok su Gustavsson i suradnici (108) generirali iPSC linije iz fibroblasta PB pacijenta koji nosi novootkrivenu varijantu p.R301C *GBA* gena. Našim istraživanjem smo pronašli šest različitih varijanti *GBA* gena, od kojih je četiri pronađeno isključivo u oboljelih od PB. U jednog pacijenta je pronađena navedena heterozigotna p.L444P (rs421016) varijanta, dok ostale pronađene varijante do sada nisu

opisane u literaturi. Homozigotne *GBA* mutacije dovode do GB koja se javlja u tri klinička tipa: ne-neuropatska (tip I), akutna neuropatska (tip II) i kronična neuropatska (tip III). Prema tome su *GBA* mutacije kategorizirane kao blage ili teške, ovisno o tome koji tip GB uzrokuju: blage mutacije su one koji uzrokuju GB tip I, a teške mutacije su one koje uzrokuju GB tipove II i III (109). Korelacijom fenotipa prema genotipu ustanovljeno je da su mutacije koje uzrokuju teži GB fenotip, kao što je p.L444P mutacija, također povezane s povećanim rizikom za razvoj PB, ranijom dobi početka bolesti kao i težom kognitivnom disfunkcijom u usporedbi s manje teškim mutacijama (npr. p.N370S) (106). Cilia i suradnici (106) su također pokazali da kod nositelji *GBA* mutacija bolest nastupa u prosjeku 5 godina ranije te da je češće prisutna pozitivna obiteljska anamneza na PB.

Nakon opisivanja snažne povezanosti *GBA* s PB i drugi geni koji se nalaze u podlozi lizosomalnih bolesti nakupljanja su postali atraktivne mete za istraživanje potencijalnih čimbenika rizika za PB (110). Istraživanja su pokazala vezu PB s promjenama u *SMPD1* genu koji se nalaze u podlozi Niemann-Pickove bolest A i B (111), te s varijantama *NPC1* gena koji uzrokuje Niemann-Pickovu bolest tipa C (NPC) (112). S druge strane utjecaj pojedinih varijanti gena kao što su *NPC2*, *MCOLN1*, *NAGLU* i *ARSB* je i dalje upitan (110). Ideja o povezanosti *NPC1* gena i PB leži u preklapanju patoloških promjena bolesti Niemann-Pick tipa C i neurodegenerativnih bolesti. Naime, u obje bolesti je prisutan deregulirani transport kolesterola s povećanim odlaganjem istog u neuronima (113). Isto tako, otkriveno je odlaganje aSyn u mozgu oboljelih od NPC (114). Do sada su opisana tri slučaja heterozigotnih nositelja varijanti *NPC1* gena koje su povezali s PB (112). Analizom *NPC1* varijanti u našem uzorku pokazali smo da petero oboljelih od PB nosi varijante *NPC1* gena koje se pojavljuju isključivo u skupini oboljelih od PB, no nema preklapanja s do sada opisanim varijantama.

U svrhu validacije utjecaja *MCOLN1* gena na akumulaciju Lewyjevih tjelešaca, Clark i suradnici (111) su proveli genetsku asocijacijsku analizu na 231 uzorku autopsije mozga oboljelih od demencije s Lewyjevim tjelešcima. Pokazali su 12 varijanti *MCOLN1* gena koje su bile značajno povezane s neuropatološkom dijagnozom demencije s Lewyjevim tjelešcima. Naši rezultati su otkrili dvije varijante tog gena koje su se javile isključivo među oboljelima uključujući varijantu rs73003348 koja se nalazi među 12 opisanih varijanti. Sekvenciranjem LYSOGENE panela dobili smo vrlo zanimljive rezultate i za *NAGLU* gen, naime čak 6 pacijenata (12,8%) nosi istu varijantu *NAGLU* gena koja nije opisana u zdravoj skupini. Ovo je izrazito zanimljiv rezultat jer do sada nije definirana točna varijanta *NAGLU* gena koja bi

doprinosila razvoju PB. *NAGLU* gen kodira za aN-acetilglukozaminidazu te homozigotna mutacija ovog gena uzrokuje Sanfilippo sindrom. Povezanost PB i Sanfilippo sindroma ustanovljena je otkrićem akumulacije aSyn u kortikalnom tkivu postmortem uzoraka dvoje oboljelih od ove bolesti nakupljanja (115) čime je ojačana hipoteza da lizosomska disfunkcija doprinosi nakupljanju aSyn. Radi se o autosomno recesivnoj neurodegenerativnoj bolesti nakupljanja karakteriziranoj progresivnom motornom i kognitivnom disfunkcijom te smrću u ranoj odrasloj dobi. Uzrokovana je nedostatkom u jednom od enzima lizosomalne razgradnje glikozaminoglikana heparan sulfat, što dovodi do akumulacije njegovih metabolita.

Nedavno objavljeno istraživanje u časopisu Brain također je pokazalo povezanost do sada neopisanih varijanti gena koji dovode do lizosomskih bolesti nakupljanja s povećanim rizikom od PB (110). U ovoj studiji analizirana je skupina od 1156 bolesnika s PB i 1679 kontrolnih ispitanika za varijante 54 lizosomalnih gena za koje je poznato da uzrokuju pedijatrijske lizosomske bolesti nakupljanja te su identificirane nove varijante unutar *CTSD* (katepsin D), *SLC17A5* (sialin) i *ASAH1* (kiselinska ceramidaza) gena. Većina (56%) bolesnika s PB imala je barem jednu vjerojatno patogenu varijantu u barem jednom od 54 analiziranih lizosomalnih gena, a 21% u više alela (110). Našim istraživanjem smo pokazali čak 396 varijanti 208 gena koje se u usporedbi sa zdravim ispitanicima pojavljuju isključivo u oboljelih od PB. Od ova tri navedena gena identificirali smo jednu varijantu *ASAH1* gena koja je bila prsutna u oboljelog od PB, a nije bila prisutna među zdravim ispitanicima. *ASAH1* gen kodira za acidnu ceramidazu, lipidnu hidrolazu odgovornu za razgradnju ceramida u sfingozin i slobodne masne kiseline unutar lizosoma (116). Manjak ovog enzima uzrokuje nasljednu lizosomsku bolest nakupljanja, Farberovu lipogranulomatozu.

6.5. Lizosomalna disfunkcija i nakupljanje aSyn: dvosmjerna ulica?

Autofagno lizosomalni putovi igraju ključnu ulogu u razgradnji aSyn (117). Stoga je jedan od ciljeva ovog istraživanja bio pokazati da smanjena funkcija lizosoma može dovesti do agregacije aSyn i u odsutnosti mutacija koje povećavaju proizvodnju aSyn. U skladu s ovom hipotezom, primijećeno je da se aSyn akumulira u nekoliko lizosomalnih bolesti nakupljanja (59), što upućuje da pacijenti s ovim bolestima mogu u nekom trenutku razviti neuropatologiju povezanu sa sinukleinskim mehanizmima nalik onoj koja se javljaja u oboljelih od PB i srodnih sinukleinopatija. U osnovi lizosomalnih bolesti nakupljanja leži gubitak funkcionalnih varijanti u genima koji kodiraju za lizosomalne proteine ili za proteine uključene u transport do lizosoma, mitofagiju ili druge funkcije povezane s autofagijom što dovodi do lizosomalne disfunkcije i nakupljanja nedegradiranih metabolita (96). Međutim, u nekim slučajevima lizosomalna aktivnost može biti pogođena neizravnim putovima, kao što je mutacijom uzrokovano stvaranje agregata proteina. Jedna od takvih bolesti kod koje dolazi do nakupljanja proteina jest PB. Povećana pozornost posvećena je aSyn kao kritičnoj molekuli koja potencijalno posreduje neurodegenerativne procese uzrokovane lizosomalnom disfunkcijom. Mnoge studije ukazuju na uključenost lizosomalne disfunkcije u procesima nakupljanja, iako mehanizmi koji posreduju agregaciju aSyn i neurotoksičnost ostaju nejasni (102). Smatra se da je ta veza obostrana te agregirani oblici aSyn mogu vezati lizosome, čime ometaju njegovu aktivnost. Jedna od hipoteza koja objašnjava progresivni tijek bolesti jest da disfunkcija razgradnje proteina rezultira nakupljanjem toksičnih vrsta aSyn, što pak može dodatno spriječiti njihovu vlastitu degradaciju, kao i degradaciju drugih supstrata, stvarajući tako začarani krug neurotoksičnosti (118). Naši rezultati su potvrdili da poremećaj lizosoma uzrokuje nakupljanje aSyn. Indukcijom lizosomalne disfunkcije putem tretmana stanica Leupeptinom i NH_4Cl pokazali smo pojačano nakupljanje aSyn oligomera, dok je razina monomera ostala nepromijenjena. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima koje su dobili Lee i suradnici (117). Naime, kako bi odredili da li se agregati aSyn mogu ukloniti putem lizosomalne razgradnje tretirali su stanice koje su prekomjerno eksprimirale aSyn s različitim lizosomalnim inhibitorima. Tretman s Bafylomicinom doveo je do nakupljanja i Triton topivih i Triton netopljivih agregata, dok je u razinama monomera zabilježena mala promjena (117). Katepsin I, inhibitor lizosomskih katepsin proteaza, također je povećao razinu aSyn agregata, potvrđujući ulogu lizosomalnog puta (117). Nasuprot tome, tretman makroautofagnim inhibitorom 3-MA nije doveo do promjene niti na razini oligomera ni monomera (117). Naši rezultati pokazuju da tretman leupeptinim dovodi do nakupljanja aSyn

oligomera u Triton netopivoj frakciji, dok tretman Bafilomycinom dovodi do lizosomalne disfunkcije pokazane metodom imunocitokemije.

Gledajući u suprotnom smjeru, postavlja se pitanje utjecaja samog aSyn na lizosomalnu aktivnost. Mazzuli i suradnici (119) su pokazali da aSyn ometa ključne komponente vezikularnog prometa na ranom putu sekrecije, što rezultira poremećenim transportom hidrolaza i smanjenom lizosomalnom funkcijom, no rezultati našeg istraživanja nisu pokazali tu vezu. Usporedbom SH-SY5Y stanica s nativnom ekspresijom aSyn i onih s pojačanom ekspresijom nismo pokazali pojačanu lizosomalnu disfunkciju ovisno o razini aSyn. Iako su SH-SY5Y stanice vrlo vrijedan stanični model PB važno je naglasiti da su Mazzuli i suradnici svoje rezultate ostvarili na homogenim dopaminergičkim linijama sa stabilno pojačanom ekspresijom aSyn (119). Pokazali su da akumulacija aSyn nije promijenila ukupnu staničnu enzimsku aktivnost hidrolaza, već je uzrokovala značajan pad specifično unutar kiselih subcelularnih odjeljaka živih neurona (119). U ovom istraživanju promjenu u lizosomalnom statusu pratili smo putem Western blot analize LC3 protutijelom te imunocitokemijom nativno putem Lysotrackera, LAMP1 i LC3 protutijela. Korištena protutijela na membranske proteine su posebno korisna u proučavanju morfologije i raspodjele vezikula. Odnos LC3-II: LC3-I uobičajeno se koristi za mjerenje razine autofagosoma (120). Analizom LC3-I i II omjera između stanica koje pojačano eksprimiraju aSyn i onih s nativnim izražajem nismo pokazali razliku u lizosomalnom statusu. Kao pozitivnu kontrolu lizosomalne disfunkcije koristili smo NH_4Cl/Leupeptin tretman koji je očekivano pokazao povećan LC3-II: LC3-I omjer. Utišavanje *GALC i LRBA* gena je dovelo do smanjenja LC3-I u odnosu na stanice s transduciranim kontrolnim konstruktom, kao i povećanje p62. LAMP-1 i LAMP-2 su transmembranski proteini lokalizirani specifično na lizosomalnim membranama. U ovom istraživanju smo LAMP1 protutijelom potvrdili da utišavanje ATP13A2 gena dovodi do lizosomalne disfunkcije. Prikaz lizosomalne disfunkcije LAMP1 protutijelom uslijed utišavanja ekspresije *ATP13A2* gena dao je bolje rezultate od prikaza utišavanja LC3 protutijelom.

6.6. Utišavanje *GALC, LRBA* i *ARSD* gena dovodi do lizosomalne disfunkcije i nakupljanja aSyn

Sličnost pojedinih simptoma osoba oboljelih od nasljednih metaboličkih poremećaja poznatih kao bolesti lizosomalnog nakupljanja te osoba s neurodegenerativnim poremećajima prvotno je pokazana kod GB uslijed nedvojbenih preklapanja na genetskoj, staničnoj te kliničkoj razini (59). No, rastom broja istraživanja i druge bolesti su se počele povezivati s PB. Tako su Smith i suradnici (121) pokazali prisutnost aSyn proteinskih agregata u mozgu oboljelih od Krabbeove bolesti kao i u mišjim modelima te bolesti. Isto tako, već spomenuta GWAS studija koju su proveli Chang i suradnici (73) je identificirala gen koji kodira za lizosomalni enzim galaktozilceramidazu (GALC) kao još jedan čimbenik rizika za PB. Mutacije ovog gena uzrokuju rijedak nasljedni poremećaj lizosomalnog skladištenja, Krabbeovu bolest. Slično kao GBA i GALC sudjeluje u metabolizmu ceramida. Gubitkom funkcije ovog enzima dolazi do akumulacije ponajprije sfingolipidnog psihozina te posljedične progresivne demijelinizacije središnjeg i perifernog živčanog sustava (122). Pokazano je da psihozin in vitro olakšava formiranje netopljivih aSyn agregata (121). Do sada je objavljeno samo jedno istraživanje koje dublje istražuje molekularne mehanizme agregacije aSyn uslijed mutacije *GALC* gena (123). Abdelkarim i suradnici su pokazali da se psihozin uz to što inducira fibrilizaciju aSyn in vitro i izravno veže za njega kako bi inducirao njegovu agregaciju (123). Korekcijom nedostatka *GALC* nakon genske terapije doveli su do eliminacije aSyn agregata i amiloidnih inkluzija u mozgu životinja. Ovi rezultati upućuju na to da korekcija GALC aktivnosti i naknadno smanjenje psihozinske akumulacije nude novu terapijsku strategiju za intervenciju u nekim oblicima agregacije aSyn (123). Na temelju analize genskih varijanti oboljelih od PB i zdravih kontrolnih ispitanika ustanovili smo uniformniju pojavnost varijanti *GALC* gena u oboljelih. Daljnjom analizom putem staničnog modela s utišanom *GALC* ekspresijom ustanovili smo da utišavanje *GALC* gena dovodi do nakupljanja aSyn. Naši rezultati potvrđuju povezanost *GALC* gena s PB. Bolje razumijevanje povezanosti GALC mutacije i PB također bi otvorila vrata novim moćnim biomarkerima za identificiranje podskupina pacijenata s rizikom za razvoj PB.

Na temelju opsežne analize genskih varijanti dobivenih panel sekvenciranjem 440 gena i njihove različite pojavnosti između oboljelih od PB i zdravih kontrolnih ispitanika osim *GALC* gena odlučili smo na staničnoj razini istražiti i utjecaj utišavanja *LRBA* i *ARSD* gena na lizosomalnu disfunkciju i nakupljanje aSyn. Pretraživanjem varijanti *LRBA* gena prisutnih samo u oboljelih od PB pokazali smo dvije varijante od kojih je jedna bila prisutna u pet, a

druga u četiri pacijenta. Zanimljivo je naglasiti da pretraživanjem literature nismo pronašli niti jedno istraživanje u kojem se ova dva gena povezuju s nakupljanjem aSyn niti s PB. LRBA gen (prema engl. *LPS responsive beige-like anchor protein*) je član obitelji WDL-BEACH-WD. Njegova ekspresija je inducirana u B limfocitima i makrofagima putem bakterijskih lipopolisaharida (LPS). Kodirani protein se veže s protein kinazom A te može biti uključen u promet vezikula što pomaže u sekreciji i membranskom odlaganju imunoloških efektorskih molekula. Defekti ovog gena povezani su s poremećajem uobičajene varijabilne imunodeficijencije-8 (*common variable immune deficiency* (CVID) (prema NCBI Gene) te sindromom imune deficijencije i autoimunosti (124). Ovaj gen se nalazi na dugom kraku četvrtog kromosoma na poziciji 31.3 (prema NCBI Gene). Sukladno našim rezultatim, Herrera i suradnici su pokazali smanjenu autofagnu aktivnost uslijed homozigotne mutacije *LRBA* gena, no u B limfocitima (124). Pokazali su da B limfociti s nedostatkom *LRBA* imaju značajno smanjenu sposobnost induciranja autofagije kao odgovor na izgladnjivanje. Nadalje, LRBA protein ima domene homologne proteinima koji vežu vezikule, ali njegova funkcija i odnos u patogenezi bolesti nije poznat (124). Nedostatak LRBA rezultirao je smanjenom autofagijom, što se pokazalo abnormalnom akumulacijom organela u B limfocitima. Ovo opažanje je potvrđeno niskom kolokalizacijom LC3 s lizosomima. Ovi podaci upućuju na to da LRBA ima ulogu u autofagiji i da povećana osjetljivost na apoptozu može biti posljedica neispravne autofagije (124). Isto tako poznato je da proteini koji sadrže BEACH domenu reguliraju transport intracelularnim vezikulama (124).

O ulozi ARSD gena se također ne zna puno. Radi se o genu koji kodira za arilsulfatazu D koja je član obitelji sulfataza. Sulfataze su neophodne za ispravan sastav kosti i hrskavice. Kodirani protein je postranslacijski glikoziliran i lokaliziran u lizosomu. Ovaj se gen nalazi unutar skupine sličnih gena arilsulfataze na kromosomu X. Povezani pseudogen identificiran je u pseudoautosomalnoj regiji kromosoma Y. Zanimljivo je da smo već blagim tranzijentnim utišavanjem ekspresije ARSD gena u H4 stanicama pokazali lizosomalnu disfunkciju. Istovremenom transfekcijom ovih stanica synT i sinfilinom potaknuli smo stvaranje aSyn inkluzija te smo pokazali da je u stanicama s utišanom ekspresijom ARSD gena veći broj stanica s većim brojem inkluzija.

6.7. LYSOGENE u kontekstu vremena

Nedavne genetske i kliničke studije upućuju na jasan odnos između nakupljanja aSyn i simptoma bolesti. Varijante *SNCA* gena koje dovode do povećanog nakupljanja aSyn su glavni čimbenik genetskog rizika za sporadični oblik bolest, dok duplikacije i triplikacije u *SNCA* genu rezultiraju familijarnim oblikom PB (34). Osim toga, snižavanje ekspresije *SNCA* u mišjim modelima dovodi do djelomičnog poboljšanja patoloških fenotipova, što dodatno upućuje na činjenicu da učinkovito uklanjanje aSyn predstavlja ključni terapeutski cilj u sinukleinopatijama (52). ASyn razgrađuje i ubikvitin-proteasomski i autofagno-lizosomalni put, no potonji je ključan za uklanjanje agregiranog aSyn. Rezultati ovog istraživanja su u skladu s mehanicističkim istraživanjima koja povezuju lizosomalne abnormalnosti s aSyn toksičnošću te nude nove mete za razvoj terapijskih lijekova za idiopatsku PB koji ciljaju specifične komponente lizosomalnog sustava. Uz bolju definiciju genetskih mehanizama koji leže u podlozi PB, rezultati ovog istraživanja upućuju na važnu ulogu međudjelovanja više različitih djelomično penetrantnih mutacija koje konvergiraju u zajedničke putove. Osim na genetskoj razini, utjecaj lizosomalne disfunkcije na akumulaciju aSyn potvrđen je i na staničnoj razini te je po prvi put učinjena poveznica između *LRBA* i *ARSD* gena i nakupljanja aSyn te je potvrđena veza *GALC* gena s PB.

7. ZAKLJUČCI

- Varijante HLA kompleksa igraju važnu ulogu u patogenezi PB.
- Analizom gena uključenih u lizosomalne bolesti nakupljanja pokazali smo različitu pojavnost varijanti u oboljelih od PB i zdravih ispitanika te ukazali na nove potencijalno značajne varijante gena.
- Utišavanje *ATP13A2* gena dovodi do lizosomalne disfunkcije te povećanog nakupljanja aSyn.
- Poremećaj lizosoma uzrokuje nakupljanje aSyn. Indukcijom lizosomalne disfunkcije pokazali smo pojačano nakupljanje aSyn oligomera, dok je razina monomera ostala nepromijenjena.
- Po prvi put je opisana veza *LRBA* i *ARSD* gena s Parkinsonovom bolesti. *LRBA* i *ARSD* geni uzrokuju lizosomalnu disfunkciju i dovode do nakupljanja aSyn.
- Potvrđena je veza *GALC* gena s PB. Utišavanje *GALC* gena uzrokuje lizosomalnu disfunkciju i dovodi do nakupljanja aSyn.

8. SAŽETAK

Glavni patološki znak Parkinsonove bolesti (PB) jest nakupljanje proteina alfa sinukleina (aSyn) što sugerira da neučinkovita razgradnja proteina podložnih agregaciji igra važnu ulogu u patogenezi bolesti. Studije o rijetkim naslijeđenim oblicima PB ukazale su na smanjenu razgradnju aSyn putem autofagno-lizosomalnog puta (ALP) kao jednog od ključnih mehanizama u podlozi PB. Kako bismo karakterizirali pretpostavljene genetske mehanizme koji dovode do disfunkcije ALP-a u PB, proveli smo opsežnu analizu genetskih varijanti korištenjem ciljanog panela za sekvenciranje pod nazivom LYSOGENE. LYSOGENE panel sadrži sveobuhvatni skup od 440 ALP srodnih gena, kao i gene prethodno opisane u familijarnim oblicima PB, sinukleinopatijama i drugim neurodegenerativnim bolestima. Identificirali smo značajan broj varijanti ALP gena među PB pacijentima u usporedbi s kontrolnim ispitanicima, s 396 varijanti prisutnih isključivo u PB bolesnika. Ove varijante uključene su u više od 50 bioloških procesa, ponajprije u putovima organizacije lizosoma, transporta organskih tvari, abnormalne mijelinizacije i metabolizma sfingolipida. Suprotno tome, varijante koje su pronađene isključivo u zdravih ispitanika nisu bile povezane sa specifičnim biološkim putovima. Na temelju podataka sekvenciranja, odabrali smo *ARSD, GALC i LRBA* gene s najviše zastupljenim genetskim varijantama kod pacijenata s PB i istražili njihove učinke na lizosomalno oštećenje, akumulaciju aSyn i neurotoksičnost primjenom SH-SY5Y staničnih linija koje stabilno eksprimiraju ljudski aSyn. Rezultati su uspoređeni s učincima utišavanja *ATP13A2* gena za kojeg je opisano da dovodi do nakupljanja aSyn. Naši rezultati snažno upućuju na to da specifične varijante ALP gena mogu doprinijeti lizosomalnoj disfunkciji u PB. Ovim istraživanjem je po prvi puta opisana povezanost utišavanja *ARSD i LRBA* gena s nakupljanjem aSyn proteina te potvrđena povezanost utišavanja *GALC* gena s PB. Ovo istraživanje je potvrdilo vezu između lizosomalnog oštećenja i akumulacije aSyn.

9. SUMMARY

Genetic mechanisms of lysosomal dysfunction in Parkinson's disease

Antonela Blažeković

Zagreb, 2019

Accumulation of misfolded proteins in the brain is the main pathological hallmark of neurodegenerative diseases, including Parkinson's disease (PD), suggesting that inadequate clearance of aggregation-prone proteins plays an important role in the disease pathogenesis. Studies on the rare inherited forms of PD have highlighted disturbed alpha-synuclein clearance through the autophagy-lysosomal pathway (ALP) as a key mechanism leading to PD. In order to characterize the putative underlying genetic mechanisms leading to ALP dysfunction in PD, we performed comprehensive analysis of genetic variants in ALP genes in PD patients using the custom LYSOGENE targeted next-generation sequencing panel, containing a set of 440 ALP related genes, as well as genes previously implicated in familial forms of PD. We identified a significant number of ALP gene variants among PD patients when compared to control subjects. These variants were involved in over 50 biological processes, with the greatest enrichment observed in categories of lysosome organization, organic substance transport, abnormal myelination and sphingolipid metabolism. In contrast, variants found exclusively in healthy subjects were not related to specific biological pathways.

Based on the NGS data, we selected genes *ARSD, GALC* and *LRBA* with the most over-represented genetic variants in PD patients and investigated their effects on lysosomal impairment, alpha-synuclein accumulation and neurotoxicity using SH-SY5Y cell lines stably expressing human alpha-synuclein.. The results were compared to the effects of the knock-down of a known lysosome-related gene, *ATP13A2*, which causes a rare autosomal recessive form of juvenile-onset atypical PD (PARK9). Our knock-down experiments described for the first time the association between *ARSD* and *LRBA* genes with the accumulation of aSyn and confirmed the association between *GALC* gene and PD. This study confirmed a link between lysosomal dysfunction and alpha-synuclein accumulation.

Keywords: Parkinson disease, autophagy-lysosomal pathway, next-generation sequencing

10. LITERATURA

1. Wooten GF, Currie LJ, Bovbjerg VE, Lee JK, Patrie J. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2004;75(4):637-9.
2. Hernandez DG, Reed X, Singleton AB. Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance. J Neurochem. 2016;139 Suppl 1:59-74. doi:10.1111/jnc.13593.
3. Martin I, Dawson VL, Dawson TM. Recent advances in the genetics of Parkinson's disease. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2011;12:301–325. doi: 10.1146/annurev-genom-082410-101440.
4. Huot P, Sgambato-Faure V, Fox SH, McCreary AC. Serotonergic approaches in Parkinson’s disease: translational perspectives, an update. ACS Chem Neurosci. 2017;8(5):973–986. doi: 10.1021/acschemneuro.6b00440.
5. Maiti P, Manna J, Dunbar GL. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. Transl Neurodegener. 2017;6:28. doi:10.1186/s40035-017-0099-z
6. Tan SK, Hartung H, Sharp T, Temel Y. Serotonin-dependent depression in Parkinson's disease: a role for the subthalamic nucleus? Neuropharmacology. 2011;61(3):387–399. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.01.006.
7. Hurley MJ, Brandon B, Gentleman SM, Dexter DT. Parkinson's disease is associated with altered expression of CaV1 channels and calcium-binding proteins. Brain. 2013;136(Pt 7):2077-97. doi: 10.1093/brain/awt134.
8. Stefanis L. α-Synuclein in Parkinson's disease. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2(2):a009399. doi: 10.1101/cshperspect.a009399.
9. Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. NeuroRx. 2005;2(3):484–494. doi: 10.1602/neurorx.2.3.484.
10. Chandra S, Gallardo G, Fernandez-Chacon R, Schluter OM, Sudhof TC. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell*. 2005;23:383–396
11. Trojanowski JQ, Lee VM. Parkinson's disease and related synucleinopathies are a new class of nervous system amyloidoses. Neurotoxicology. 2002; 23: 457–460
12. Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. Science. 2003; 300: 486–489

13. Uversky VN, Lee H-J, Li J, Fink AL, Lee S-J. Stabilization of partially folded conformation during α-synuclein oligomerization in both purified and cytosolic preparations. J Biol Chem 2001;276: 43495-43498.
14. Volles MJ, Lansbury Jr PT. Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. Biochemistry 2003;42: 7871-7878.
15. Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, Knight AL, McLean PJ, Caldwell GA et al. Gaucher disease glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. Cell. 2011;146(1):37–52.
16. Roberts HL, Brown DR. Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric α-synuclein. Biomolecules. 2015;5(2):282–305. doi:10.3390/biom5020282
17. Fortuna JTS, Gralle M, Beckman D, Neves FS, Diniz LP, Frost PS et al. Brain infusion of α-synuclein oligomers induces motor and non-motor Parkinson's disease-like symptoms in mice. Behav Brain Res. 2017;333:150-160. doi: 10.1016/j.bbr.2017.06.047.
18. Riess O, Krüger R, Schulz JB. Spectrum of phenotypes and genotypes in Parkinson's disease. J Neurol. 2002;249 Suppl 3:III/15-20. Review. PubMed PMID: 12522566.
19. Engelender S, Kaminsky Z, Guo X, Sharp AH, Amaravi RK, Kleiderlein JJ et al. Synphilin 1 associates with α-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. Nat Genet 1999;22:110–114
20. Wakabayashi K, Engelender S, Yoshimoto M, Tsuji S, Ross CA, Takahashi H. Synphilin 1 is present in Lewy bodies in Parkinson’s disease. Ann Neurol 2000;47:521–523
21. Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson’s disease. Nat Genet. 1998;18(2):106–8.
22. Rizek P, Kumar N, Jog MS. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. CMAJ. 2016;188(16):1157–1165. doi:10.1503/cmaj.151179
23. Finberg JPM. Inhibitors of MAO-B and COMT: their effects on brain dopamine levels and uses in Parkinson's disease. J Neural Transm (Vienna). 2019;126(4):433-448. doi: 10.1007/s00702-018-1952-7.
24. Muthuraman M, Deuschl G, Koirala N, Riedel C, Volkmann J, Groppa S. Effects of DBS in parkinsonian patients depend on the structural integrity of frontal cortex. Sci Rep. 2017;7:43571. doi:10.1038/srep43571

25. Han F, Baremberg D, Gao J, Duan J, Lu X, Zhang N, Chen Q. Development of stem cell-based therapy for Parkinson's disease. Transl Neurodegeneration. 2015;4:16. doi: 10.1186/s40035-015-0039-8.
26. Coune PG, Schneider BL, Aebischer P. Parkinson's disease: gene therapies. Cold Spring Harb Med. 2012;2(4):a009431.
27. Burn DJ, Mark MH, Playford ED, Maraganore DM, Zimmerman TR Jr, Duvoisin R et al. Parkinson's disease in twins studied with 18F-dopa and positron emission tomography. Neurology 1992;42:1894–1900.
28. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science. 1997;276(5321):2045–7.
29. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature. 1997;388(6645):839–40.
30. Fortin DL, Troyer MD, Nakamura K, Kubo S, Anthony MD, Edwards RH. Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. J Neurosci. 2004;24(30):6715–23.
31. Gitler AD, Bevis BJ, Shorter J, Strathearn KE, Hamamichi S, Su LJ et al. The Parkinson's disease protein alpha-synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(1):145–50.
32. Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. Science. 2010;329(5999):1663–7.
33. Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. Annals of neurology. 2004;55(2):164–73.
34. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. Science. 2003;302(5646):841.
35. Klein C, Schlossmacher MG. The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care. Nat Clin Pract Neurol. 2006;2(3):136–46.
36. Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R et al. Ubiquitination of a novel form of α-synuclein of parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. Science 2010;293: 263–269

37. Schlossmacher MG, Frosch MP, Gai WP, Medina M, Sharma N, Forno L et al. Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. Am J Pathol. 2002;160(5):1655–1667. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61113-3.
38. Grünewald A, Voges L, Rakovic A, Kasten M, Vandebona H, Hemmelmann C et al. Mutant Parkin impairs mitochondrial function and morphology in human fibroblasts. PLoS One. 2010;5(9):e12962.
39. Lucking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T et al. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. N Engl J Med 2000; 342: 1560–1567.
40. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron. 2003;39(6):889–909. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00568-3.
41. Khan NL, Graham E, Critchley P, Schrag AE, Wood NW, Lees AJ et al. Parkin disease: a phenotypic study of a large case series. Brain. 2003;126(Pt 6):1279–92.
42. Wu HY, Chen SF, Hsieh JY, Chou F, Wang YH, Lin WT et al. Structural basis of antizyme-mediated regulation of polyamine homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(36):11229–11234. doi: 10.1073/pnas.1508187112.
43. Ibáñez P, Lesage S, Lohmann E, Thobois S, De Michele G, Borg M et al. Mutational analysis of the PINK1 gene in early-onset parkinsonism in Europe and North Africa. Brain. 2006;129(Pt 3):686–94.
44. Kane LA, Lazarou M, Fogel AI, Li Y, Yamano K, Sarraf SA. PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. J Cell Biol 2014; 205, 143–153
45. Canet-Avilés RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S et al. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101(24):9103-8.
46. Ibanez CF, Andressoo JO. Biology of GDNF and its receptors - relevance for disorders of the central nervous system. Neurobiol Dis. 2017;97(Pt B):80–89. doi: 10.1016/j.nbd.2016.01.021.
47. Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. Ann Neurol. 2002;51(3):296–301.

48. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. Neuron. 2004;44(4):601–7.
49. Greggio E. Role of LRRK2 kinase activity in the pathogenesis of Parkinson's disease. Biochem Soc Trans. 2012;40(5):1058–62.
50. Smith WW, Pei Z, Jiang H, Moore DJ, Liang Y, West AB et al. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:18676–18681.
51. Giasson BI, Covy JP, Bonini NM, Hurtig HI, Farrer MJ, Trojanowski JQ et al. Biochemical and pathological characterization of Lrrk2. Ann Neurol 2006;59: 315–322.
52. Usenovic M, Tresse E, Mazzulli JR, Taylor JP, Krainc D. Deficiency of ATP13A2 leads to lysosomal dysfunction, α-synuclein accumulation, and neurotoxicity. J Neurosci. 2012;32(12):4240-6. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5575-11.2012.
53. Grünewald A, Arns B, Seibler P, Rakovic A, Münchau A, Ramirez A, et al. ATP13A2 mutations impair mitochondrial function in fibroblasts from patients with Kufor-Rakeb syndrome. Neurobiol Aging. 2012;33(8):1843 e1–7.
54. Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP et al. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. Nat Genet 2006;38:1184- 1191.
55. Zimprich A, Benet-Pagès A, Struhal W, Graf E, Eck SH, Offman MN et al. A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. Am J Hum Genet. 2011;89(1):168–75.
56. Tang FL, Erion JR, Tian Y, Liu W, Yin DM, Ye J et al. VPS35 in Dopamine Neurons Is Required for Endosome-to-Golgi Retrieval of Lamp2a, a Receptor of Chaperone-Mediated Autophagy That Is Critical for α-Synuclein Degradation and Prevention of Pathogenesis of Parkinson's Disease. J Neurosci. 2015;35(29):10613-28. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0042-15.2015.
57. Dhungel N, Eleuteri S, Masliah E, Gitler AD, Dhungel N, Eleuteri S. Parkinson's disease genes VPS35 and EIF4G1 interact genetically and converge on a-synuclein. Neuron. 2015; 85, 76–87
58. MacLeod DA, Rhinn H, Kuwahara T, Zolin A, Di Paolo G, McCabe BD et al. RAB7L1 interacts with LRRK2 to modify intraneuronal protein sorting and

Parkinson's disease risk. Neuron. 2013;77(3):425-39. doi: 10.1016/j.neuron.2012.11.033.

59. Shachar T, Lo Bianco C, Recchia A, Wiessner C, Raas-Rothschild A, Futerman AH. Lysosomal storage disorders and Parkinson's disease: Gaucher disease and beyond. Mov Disord. 2011;26(9):1593–604.
60. Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, Abrahamov A, Turezkite T, Aghai E et al. Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. Q J Med 1996; 89:691–694.
61. Goker-Alpan O, Schiffmann R, LaMarca ME, Nussbaum RL, McInerney-Leo A, Sidransky E. Parkinsonism among Gaucher disease carriers. J Med Genet. 2004; 41: 937–940.
62. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. N Engl J Med 2009;361:1651–1661.
63. Gegg ME, Burke D, Heales SJ, Cooper JM, Hardy J, Wood NW et al. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. Ann Neurol. 2012;72(3):455–63.
64. Velayati A, Yu WH, Sidransky E. The role of glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease and Lewy body disorders. Curr Neurol Neurosci Rep. 2010;10(3):190-8. doi: 10.1007/s11910-010-0102-x.
65. Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC. a-synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. J Biol Chem 2003; 278, 25009–25013.
66. Rideout HJ, Larsen KE, Sulzer D, Stefanis L. Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/alpha-synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells. J Neurochem. 2001;78(4):899-908.
67. Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant α-synuclein by chaperone-mediated autophagy. Science 2004;305, 1292–1295.
68. Cuervo AM. Autophagy and aging: keeping that old broom working. Trends Genet. 2009;24, 604–612
69. Dice JF. Chaperone-mediated autophagy. Autophagy. 2007;3(4):295-9.
70. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. Cell Death Differ. 2005;12:1542–1552.

71. Menzies FM, Fleming A, Caricasole A, Bento CF, Andrews SP, Jackson A. Autophagy and neurodegeneration: pathogenic mechanisms and therapeutic opportunities. Neuron 2017; 93, 1015–1034
72. Karabiyik C, Lee MJ, Rubinsztein DC. Autophagy impairment in Parkinson's disease. Essays Biochem. 2017;61(6):711-720. doi: 10.1042/EBC20170023.
73. Chang D, Nalls MA, Hallgrímsdóttir IB, Hunkapiller J, van der Brug M, Cai F et al. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci. Nat Genet 2017;49, 1511–1516.
74. Tanik SA, Schultheiss CE, Volpicelli-Daley LA, Brunden KR, Lee VM. Lewy body-like α-synuclein aggregates resist degradation and impair macroautophagy. J Biol Chem. 2013;288(21):15194-210. doi: 10.1074/jbc.M113.457408.
75. Volpicelli-Daley LA, Gamble KL, Schultheiss CE, Riddle DM, West AB, Lee VM. Formation of α -synuclein Lewy neurite - like aggregates in axons impedes the transport of distinct endosomes. Mol Biol Cell 2014;25, 4010–4023.
76. Paisán-Ruíz C, Lang AE, Kawarai T, Sato C, Salehi-Rad S, Fisman GK et al. LRRK2 gene in Parkinson disease: mutation analysis and case control association study. Neurology.;65(5):696-700.
77. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. Nature 1998;392: 605–608.
78. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. Science 2003;299:256–259.
79. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. Science 2004;304:1158–1160
80. Chiba-Falek O, Tagliafierro L, Lutz MW, Glenn O, Beach TG, Woltjer RL. The distinct contribution of SNCA-3′UTR to Parkinson's and dementia with Lewy bodies. Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association. 2017;13(7), 629-630.
81. Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. Neuron. 2015;85(2):257-73. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.007.

82. Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S, Jain S, Singleton A, Lees AJ et al: A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. Lancet 2005; 365: 415–416.
83. Bonifati V. Parkinson's disease: the LRRK2-G2019S mutation: opening a novel era in Parkinson's disease genetics. Eur J Hum Genet. 2006;14(10):1061-2.
84. Plowey ED, Cherra SJ 3rd, Liu YJ, Chu CT. Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. J Neurochem. 2008;105(3):1048-56. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05217.x.
85. Nalls MA, Plagnol V, Hernandez DG, Sharma M, Sheerin UM, Saad M et al. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. Lancet. 2011;377:641-649.
86. Roosen DA, Cookson MR. LRRK2 at the interface of autophagosomes, endosomes and lysosomes. Mol Neurodegener. 2016;11(1):73. doi: 10.1186/s13024-016-0140-1.
87. Wang J, Song W. Regulation of LRRK2 promoter activity and gene expression by Sp1. Mol Brain. 2016;9:33. doi: 10.1186/s13041-016-0215-5.
88. Jinn S, Drolet RE, Cramer PE, Wong AH, Toolan DM, Gretzula CA et al. TMEM175 deficiency impairs lysosomal and mitochondrial function and increases α-synuclein aggregation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(9):2389-2394. doi: 10.1073/pnas.1616332114.
89. Dehay B, Martinez-Vicente M, Ramirez A, Perier C, Klein C, Vila M, Bezard E. Lysosomal dysfunction in Parkinson disease: ATP13A2 gets into the groove. Autophagy. 2012;8(9):1389-91. doi: 10.4161/auto.21011.
90. Park JS, Blair NF, Sue CM. The role of ATP13A2 in Parkinson's disease: Clinical phenotypes and molecular mechanisms. Mov Disord. 2015;30(6):770-9. doi: 10.1002/mds.26243.
91. Rothaug M, Zunke F, Mazzulli JR, Schweizer M, Altmeppen H, Lüllmann-Rauch R et al. LIMP-2 expression is critical for β-glucocerebrosidase activity and α-synuclein clearance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(43):15573-8. doi: 10.1073/pnas.1405700111.
92. Steger M, Diez F, Dhekne HS, Lis P, Nirujogi RS, Karayel O et al. Systematic proteomic analysis of LRRK2-mediated Rab GTPase phosphorylation establishes a connection to ciliogenesis. Elife. 2017;6. pii: e31012. doi: 10.7554/eLife.31012.

93. Bartoníková T, Menšíková K, Kolaříková K, Vodička R, Vrtěl R, Otruba P et al. New endemic familial parkinsonism in south Moravia, Czech Republic and its genetical background. Medicine (Baltimore). 2018;97(38):e12313. doi:10.1097/MD.0000000000012313
94. Follett J, Bugarcic A, Yang Z, Ariotti N, Norwood SJ, Collins BM et al. Parkinson Disease-linked Vps35 R524W Mutation Impairs the Endosomal Association of Retromer and Induces α-Synuclein Aggregation. *J Biol Chem*. 2016;291(35):18283-98.
95. Vilariño-Güell C, Wider C, Ross OA, Dachsel JC, Kachergus JM, Lincoln SJ et al. VPS35 mutations in Parkinson disease. Am J Hum Genet. 2011;89(1):162-7. doi:10.1016/j.ajhg.2011.06.001.
96. Klein AD, Mazzulli JR. Is Parkinson's disease a lysosomal disorder? Brain. 2018;141(8):2255-2262. doi: 10.1093/brain/awy147.
97. Wissemann WT, Hill-Burns EM, Zabetian CP, Factor SA, Patsopoulos N, Hoglund B et al. Association of Parkinson disease with structural and regulatory variants in the HLA region. Am J Hum Genet. 2013 ;93(5):984-93. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.10.009.
98. Hamza TH, Zabetian CP, Tenesa A, Laederach A, Montimurro J, Yearout D et al. Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease. Nat. Genet. 2010;42:781–785.
99. Hill-Burns EM, Factor SA, Zabetian CP, Thomson G, Payami H. Evidence for more than one Parkinson's disease-associated variant within the HLA region. PLoS ONE. 2011;6:e27109.
100. Ahmed I, Tamouza R, Delord M, Krishnamoorthy R, Tzourio C, Mulot C et al. Association between Parkinson's disease and the HLA-DRB1 locus. Mov Disord. 2012;27:1104–1110.
101. Simón-Sánchez J, van Hilten JJ, van de Warrenburg B, Post B, Berendse HW, Arepalli S et al. Genome-wide association study confirms extant PD risk loci among the Dutch. Eur J Hum Genet. 2011;19:655–661.
102. Fraldi A, Klein AD, Medina DL, Settembre C. Brain disorders due to lysomal dysfunction. Annu Rev Neurosci 2016; 39: 277–95
103. Boustany RM. Lysosomal storage diseases--the horizon expands. Nat Rev Neurol. 2013;9(10):583-98. doi: 10.1038/nrneurol.2013.163.
104. Barkhuizen M, Anderson DG, Grobler AF. Advances in GBA-associated Parkinson's disease-Pathology, presentation and therapies. Neurochem Int 2016;93:6-25.

105. Sidransky E, Lopez G. The link between the GBA gene and parkinsonism. Lancet Neurol. 2012;11, 986–998.
106. Cilia R, Tunesi S, Marotta G, Cereda E, Siri C, Tesei S et al. Survival and dementia in GBA-associated Parkinson's disease: The mutation matters. Ann Neurol. 2016;80(5):662-673. doi: 10.1002/ana.24777.
107. Asselta R, Rimoldi V, Siri C, Cilia R, Guella I, Tesei S et al. Glucocerebrosidase mutations in primary parkinsonism. Parkinsonism Relat Disord. 2014;20(11):1215-20. doi: 10.1016/j.parkreldis.2014.09.003.
108. Gustavsson N, Marote A, Pomeshchik Y, Russ K, Azevedo C, Chumarina M et al. Generation of an induced pluripotent stem cell line (CSC-46) from a patient with Parkinson's disease carrying a novel p.R301C mutation in the GBA gene. Stem Cell Res. 2018;34:101373. doi: 10.1016/j.scr.2018.101373.
109. Beutler E, Gelbart T, Scott CR. Hematologically important mutations: Gaucher disease. Blood Cells Mol Dis 2005;35:355-364.
110. Robak LA, Jansen IE, van Rooij J, Uitterlinden AG, Kraaij R, Jankovic J et al. Excessive burden of lysosomal storage disorder gene variants in Parkinson's disease. Brain. 2017;140(12):3191-3203. doi: 10.1093/brain/awx285.
111. Clark LN, Chan R, Cheng R, Liu X, Park N, Parmalee N et al. Gene-wise association of variants in four lysosomal storage disorder genes in neuropathologically confirmed Lewy body disease. PLoS One. 2015;10(5):e0125204. doi: 10.1371/journal.pone.0125204.
112. Kluenemann HH, Nutt JG, Davis MY, Bird TD. Parkinsonism syndrome in heterozygotes for Niemann-Pick C1. J Neurol Sci. 2013;335(1-2):219–220. doi:10.1016/j.jns.2013.08.033
113. Liu JP, Tang Y, Zhou S, Toh BH, McLean C, Li H. Cholesterol involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Mol Cell Neurosci 2010;43(1):33–42 97.
114. Saito Y, Suzuki K, Hulette CM, Murayama S. Aberrant phosphorylation of alpha-synuclein in human Niemann-Pick type C1 disease. J Neuropathol Exp Neurol. 2004;63(4):323–328.
115. Winder-Rhodes SE, Garcia-Reitböck P, Ban M, Evans JR, Jacques TS, Kemppinen A et al. Genetic and pathological links between Parkinson's disease and the lysosomal disorder Sanfilippo syndrome. Mov Disord. 2012;27(2):312-5. doi: 10.1002/mds.24029.

116. Park JH, Schuchman EH. Acid ceramidase and human disease. Biochim Biophys Acta. 2006;1758(12):2133-8.
117. Lee HJ, Khoshaghideh F, Patel S, Lee SJ. Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway. J Neurosci. 2004;24(8):1888-96.
118. Xilouri M, Brekk OR, Stefanis L. Autophagy and Alpha-Synuclein: Relevance to Parkinson's Disease and Related Synucleopathies. Mov Disord. 2016;31(2):178-92. doi: 10.1002/mds.26477.
119. Mazzulli JR, Zunke F, Isacson O, Studer L, Krainc D. α-Synuclein-induced lysosomal dysfunction occurs through disruptions in protein trafficking in human midbrain synucleinopathy models. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(7):1931-6. doi: 10.1073/pnas.1520335113
120. Raben N, Shea L, Hill V, Plotz P. Monitoring autophagy in lysosomal storage disorders. Methods Enzymol. 2009;453:417-49. doi: 10.1016/S0076-6879(08)04021-4.
121. Smith BR, Santos MB, Marshall MS, Cantuti-Castelvetri L, Lopez-Rosas A, Li G et al. Neuronal inclusions of alpha-synuclein contribute to the pathogenesis of Krabbe disease. 2014 Apr;232(5):509-21. doi: 10.1002/path.4328.
122. Marshall MS, Bongarzone ER. Beyond Krabbe's disease: The potential contribution of galactosylceramidase deficiency to neuronal vulnerability in late-onset synucleinopathies. J Neurosci Res. 2016 ;94(11):1328-32. doi: 10.1002/jnr.23751.
123. Abdelkarim H, Marshall MS, Scesa G, Smith RA, Rue E, Marshall J et al. α-Synuclein interacts directly but reversibly with psychosine: implications for α-synucleinopathies. Sci Rep. 2018;8(1):12462. doi: 10.1038/s41598-018-30808-9.
124. Lopez-Herrera G, Tampella G, Pan-Hammarström Q, Herholz P, Trujillo-Vargas CM, Phadwal K et al. Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. Am J Hum Genet. 2012;90(6):986-1001. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.04.015.

11. ŽIVOTOPIS

Antonela Blažeković rođena je 1990. godine u Hagenu u Njemačkoj. Osnovnu školu završila je u Zagrebu 2004. godine, a VII. Opću gimnaziju 2008. godine. Svoje sveučilišno obrazovanje započela je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pri kojem je diplomirala 2014. godine među 10% najboljih studenata s prosjekom ocjena 4,86. Tijekom studija nagrađena je Dekanovom nagradom za najboljeg studenta pete godine, Posebnom dekanovom nagradom za studentski časopis „Medicinar“ te Rektorovom nagradom za znanstveni rad „Analiza glikomskog profila u uzorcima plazme bolesnika s Parkinsonovom bolešću“ (mentor: prof. dr.sc. Fran Borovečki; ak.god. 2013./2014.). Poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ upisala je 2014. godine, a u siječnju 2015. zaposlena je na projektu Hrvatske Zaklade za Znanost „Genetski mehanizmi lizosomalne disfunkcije u Parkinsonovoj bolesti“ u sklopu kojeg je i izradila doktorsku disertaciju. Nakon odrađenog pripravničkog staža, stručni ispit za doktore medicine položila je u rujnu 2015. godine. U sklopu istraživanja je u tri navrata bila u istraživačkom posjetu u Department of NeuroDegeneration and Restaurative Research, University Medizin Gottingen, Gottingen, Njemačka (DAAD grant). Od siječnja 2017. godine zaposlena je kao asistent na Katedri za anatomiju i kliničku anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U travnju 2018. godine postala je stipendistica nacionalnog programa „Za žene u znanosti“.

Svoje istraživanje je prezentirala na međunarodnom kongresu SfN Neuroscience 2017 u Washingtonu DC te je autorica šest poglavlja u stručnim knjigama, prvi autor dva znanstvena rada publicirana u časopisima indeksiranim u Current Contents-u te koautor tri rada publicirana u međunarodno indeksiranim časopisima.

Publikacije vezane uz temu doktorskog rada:

Blazekovic A, Borovecki F. Psychiatric comorbidities in Parkinson's disease seen through the prism of genomics and epigenetics. Psych Dan. (u postupku objavljivanja)