

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINA

TEZĂ DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. POPESCU BOGDAN OVIDIU

Student doctorand:

IUGHEN OCTAVIAN COSTIN

2025

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINA**

**ROLUL MICROBIOTEI ÎN MECANISMELE DE AGREGARE
ȘI PROPAGARE A ALFA-SINUCLEINEI ÎN MODELE
EXPERIMENTALE DE BOALA PARKINSON**

TEZĂ DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. POPESCU BOGDAN OVIDIU

Student doctorand:

IOGHEN OCTAVIAN COSTIN

2025

Cuprinsul tezei de doctorat

I. Partea generală.....	1
1. Boala Parkinson – introducere.....	1
2. Proteinopatiile.....	2
3. Boala Parkinson ca proteinopatie.....	15
4. Boala Parkinson și microbiota intestinală.....	22
5. Rolul microbiotei în alte boli neurologice.....	27
6. Linia celulară SH-SY5Y în studiul bolii Parkinson.....	32
II. Contribuții personale.....	41
7. Ipoteza de lucru și obiective generale.....	41
8. Materiale și metode.....	43
9. Studiul 1 - Efectul compușilor microbieni derivați din microbiota intestinală asupra neuronilor dopaminergici.....	70
10. Studiul 2 – Efectul compușilor microbieni derivați din microbiota intestinală asupra celulelor epiteliale intestinale.....	96
11. Studiul 3 – Efectul compușilor microbieni într-un sistem de co-cultură între celule epiteliale intestinale și neuroni dopaminergici	116
12. Concluzii și contribuții proprii.....	122
13. Bibliografie.....	126

Introducere, ipoteze și obiective

Boala Parkinson este a doua cea mai frecventă boală neurodegenerativă, cu incidență în creștere și fără existența unui tratament neuroprotector, din cauza cunoașterii încă incomplete a fiziopatologiei bolii. O înțelegere aprofundată a mecanismelor care determină inițierea și progresia fenomenului neurodegenerativ este esențială pentru dezvoltarea strategiilor preventive și terapeutice.

Până la începutul anilor 2000 se considera că elementele patologice ale bolii Parkinson, ci anume agregatele de α -sinucleină și apoptoza neuronală, apar concomitent și cu evoluție progresivă la nivelul structurilor neuroanatomice, atât la nivelul neuronilor dopaminergici din *substantia nigra pars compacta*, cât și la nivelul neuronilor non-dopaminergici. Heiko Braak et al. și apoi alte studii care au urmat au arătat că modificările patologice apar inițial în periferie, la nivelul cavității nazale și, mai ales, la nivelul tubului intestinal, cu evoluția progresivă a acestora, ascendent, centripet, inter-neuronal, într-un mod asemănător cu progresia din cadrul bolilor prionice, cu afectarea ulterioară secvențială a bulbului, punții, mezencefalului, ganglionilor bazali și ariilor corticale. Astfel, numeroase studii care evaluează mecanismele care determină inițierea agregării α -sinucleinei se concentrează pe interacțiunile care se produc la nivelul sistemului intestinal.

Un actor relevant în această interacțiune de la nivelul sistemului intestinal este microbiota intestinală. Rolurile acesteia în patologie sunt strâns legate de amplificarea sau inițierea fenomenelor autoimune, promovarea inflamației locale și sistemice, creșterea permeabilității barierei intestinale etc. Însă studii publicate anterior, in vitro, in vivo sau chiar clinice au indicat că modificări ale microbiotei intestinale se corelează cu apariția și progresia bolii Parkinson. Din punct de vedere fiziopatologic, acest posibil rol al microbiotei intestinale în inițierea și progresia bolii Parkinson are temei științific.

Bacteriile intestinale formează local structuri complexe numite biofilme, acătuite din comunități bacteriene înglobate într-o matrice extracelulară produsă de bacterii. Aceste biofilme au rolul de adăpost împotriva celulelor sau compușilor secretați local cu efect antibacterian. O componentă semnificativă din punct de vedere structural a biofilmelor o reprezintă agregatele proteice. Proteinele care fac parte din agregate se numesc amiloizi funcționali și au atât rolul de a induce propria agregare, cât și rolul de a produce o agregare încrucișată a altor proteine

susceptibile la agregare. Exemple de amiloizi funcționali produși de microbiota intestinală sunt proteina curli sau modulina fenol solubilă α (PSM α).

Un alt tip de molecule produse de microbiota intestinală sunt amfifilele bacteriene, care prezintă atât o componentă hidrofilă, cât și o componentă hidrofobă. Astfel, acestea au capacitatea de a forma micelii, putând sechestra anumite proteine în interior și catalizând astfel agregarea proteică dacă sunt sechestrate proteine susceptibile acestui proces. Exemple de amfifile bacteriene sunt lipopolizaharidul (LPS) sau rhamnolipidul.

Cunoscând aceste informații, se poate concluziona că evaluarea efectului compușilor microbieni derivați din microbiota intestinală asupra epitelului intestinal și asupra sistemului nervos enteric, precum și evaluarea interacțiunii dintre epitelul intestinal expus la acești compuși și sistemul nervos enteric reprezintă scopuri esențiale în studiile ce privesc patogeniza bolii Parkinson.

Ipoteza acestei lucrări de doctorat este că acești compuși microbieni derivați din microbiota intestinală exercită un efect patologic asupra celulelor de la nivelul sistemului intestinal care determină inițierea agregării α -sinucleinei cu propagarea inter-neuronală ulterioară.

Astfel, această lucrare de doctorat a fost alcătuită din trei studii in vitro și a evaluat efectul compușilor microbieni derivați din microbiota intestinală, precum lipopolizaharid (LPS), rhamnolipid, subunitatea CsgA a proteinei curli și modulina fenol solubilă $\alpha 1$ (PSM $\alpha 1$), asupra neuronilor dopaminergici (studiul 1) și asupra celulelor epiteliale intestinale (studiul 2). În plus, a fost evaluat efectul compușilor microbieni asupra interacțiunii dintre celulele epiteliale intestinale și neuronii dopaminergici, similar cu interacțiunea dintre epitelul intestinal și sistemul nervos enteric (studiul 3).

Pentru evaluarea efectului compușilor microbieni asupra neuronilor dopaminergici, s-a utilizat în cadrul studiului in vitro linia de neuroblastom uman SH-SY5Y, care a fost diferențiată dopaminergic în cadrul unui protocol specific la care s-a evaluat succesul diferențierii.

Pentru evaluarea efectului compușilor microbieni asupra epitelului intestinal, s-a utilizat în cadrul studiului in vitro linia de adenocarcinom colorectal Caco-2.

Pentru evaluarea efectului compușilor microbieni asupra interacțiunii dintre epitelul intestinal și sistemul nervos enteric, s-a utilizat în cadrul studiului in vitro un sistem de co-

cultură între celulele epiteliale Caco-2 anterior tratate cu compuși microbieni și celulele neuronale diferențiate dopaminergic SH-SY5Y.

Evaluarea efectului compușilor microbieni a implicat evaluarea viabilității și citotoxicității (prin efectuarea de teste de viabilitate MTS și citotoxicitate LDH), evaluarea adeziunii celulare (prin măsurarea impedanței de suprafață cu ajutorul platformei xCELLigence) și evaluarea efectului asupra nivelului de α -sinucleină intracelular (prin evaluarea expresiei de α -sinucleină secundar măsurării de ARN mesager cu ajutorul qRT-PCR și măsurarea cantității intracelulare de α -sinucleină cu ajutorul Western Blot).

Cercetarea experimentală a fost realizată în cadrul Laboratorului de Biologie Celulară, Neuroștiințe și Miologie Experimentală din Institutul Național de Patologie "Victor Babeș".

Datele au fost reprezentate ca medie $\pm$ eroarea standard a mediei (standard error of mean - SEM) și au fost analizate statistic folosind GraphPad Prism v 9.5.

În experimentele de Western Blot și qRT-PCR, datele au fost evaluate ca raport față de control și normalizate la nivelul controlului (valoarea controlului=1), iar analiza statistică a fost efectuată pe valorile normalizate.

Primul pas a fost evaluarea distribuției normale a datelor și s-au efectuat testul Shapiro-Wilk și testul Kolmogorov-Smirnov. Pentru datele parametrice s-au efectuat testul one-way ANOVA și testul de comparație multiplă Dunnett, în timp ce pentru datele neparametrice s-au efectuat testul Kruskal-Wallis și testul de comparație multiplă Dunn. Rezultatele testelor au fost reprezentate ca * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Sinteza studiului 1 - Efectul compușilor microbieni derivați din microbiota intestinală asupra neuronilor dopaminergici

Având în vedere prezența neuronilor dopaminergici în sistemul nervos enteric și capacitatea metaboliților microbiotei intestinale de a perturba bariera intestinală, de a intra în fluxul sanguin, de a perturba bariera hematoencefalică și de a interacționa cu neuronii dopaminergici din substanța nigra, un pas crucial în înțelegerea rolului microbiotei intestinale în patogeneza BP este evaluarea impactului compușilor microbieni asupra neuronilor dopaminergici.

În acest studiu in vitro, am tratat linia neuronală umană SH-SY5Y diferențiată dopaminergic conform unui protocol de diferențiere validat (figura 1) cu molecule derivate din

microbiota intestinală, LPS, ramnolipid, curli CsgA și PSMα1 și am evaluat viabilitatea celulară, impedanța de suprafață, curbele de creștere și nivelurile de α -sinucleină.

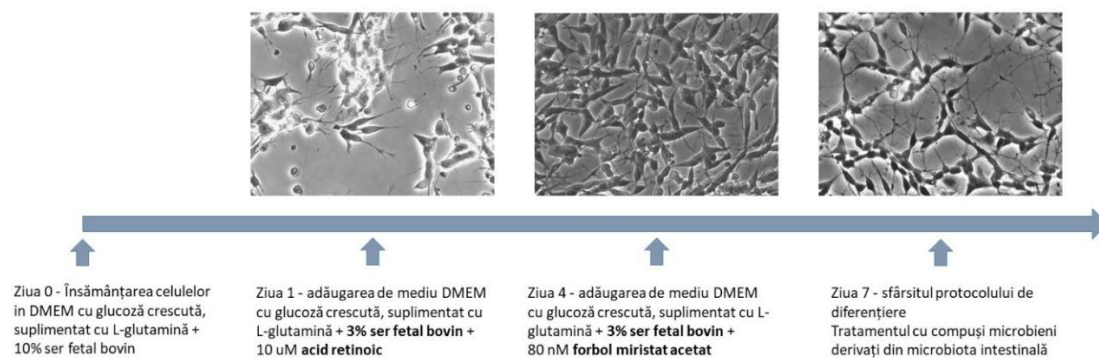


Figura 1. Reprezentare grafică a protocolului de diferențiere dopaminergică SH-SY5Y cu imagini de microscopie în contrast de fază corespunzătoare fiecărei etape (obiectiv 40x)

În timp ce numeroase modele neuronale in vitro utilizează linia celulară de neuroblastom uman SH-SY5Y în stadiu proliferativ, nediferențiat, în acest studiu am folosit celule SH-SY5Y diferențiate dopaminergic, deoarece prezintă un grad mai mare de asemănare cu neuronii dopaminergici umani. Doar observând diferențele morfologice dintre celulele nediferențiate și cele diferențiate, se poate concluziona că celulele diferențiate reprezintă un model in vitro mult mai precis. În ceea ce privește măsurarea nivelurilor de α -sinucleină, deși SH-SY5Y este un model neuronal in vitro simplu, un avantaj semnificativ al acestui studiu este utilizarea unei linii celulare care nu a fost modificată genetic pentru a supra-exprima α -sinucleina sau pentru a exprima o proteină alterată. Astfel, orice rezultate ale creșterii nivelului de α -sinucleină apar pe o stare nativă și bazală de expresie și aduc informații valoroase cu privire la patogeniza inițierii BP.

Pentru a obține o mai bună înțelegere a rolului microbiotei intestinale în patogeniza BP, este imperativ să se analizeze modul în care expunerea la acești compuși microbieni afectează neuronii dopaminergici. Pe de o parte sistemul nervos enteric conține neuroni dopaminergici, iar în context de alterare a barierei intestinale compușii microbieni produși de microbiota ajung la nivelul acestora, pe de altă parte compușii microbieni, alterând bariera intestinală, pot intra în

fluxul sanguin, alterează bariera hemato-encefalică și pot interacționa cu neuronii dopaminergici din substanța nigra.

Astfel, descoperirea că modificările patologice ale BP apar inițial în tractul gastrointestinal a adus în atenție rolul microbiotei intestinale în această boală neurodegenerativă. Prin urmare, pentru a dezvălui rolul precis al microorganismelor în inițierea BP, este esențial să se evalueze în mod activ moleculele produse de microbiota intestinală care pot induce supra-expresia sau agregarea α -sinucleinei. Amfifilele bacteriene, cum ar fi rhamnolipidul și LPS, și amiloizii funcționali, cum ar fi curli și PSM α 1, sunt molecule produse de microbiota intestinală care au atras atenția cercetătorilor în BP de-a lungul timpului.

Rhamnolipidul este o moleculă bacteriană amfifilă produsă de *Pseudomonas aeruginosa* care poate coloniza tractul gastrointestinal și cavitatea nazală. Există o lipsă de evaluare a efectelor rhamnolipidului în patogeniza BP, iar studii directe asupra nivelurilor de rhamnolipid în BP sunt limitate. Importanța evaluării existenței unei posibile legături între rhamnolipid și BP este amplificată de faptul că rhamnolipidul are potențialul de a fi utilizat pe scară largă ca alternativă biologică pentru detergenții de uz casnic sau produsele cosmetice care înlocuiesc surfactanții chimici. Acest studiu indică un efect dependent de concentrație asupra viabilității neuronale, citotoxicității, adeziunii celulare și morfologiei. Mai mult, acest studiu a dovedit o creștere a α -sinucleinei în neuronii dopaminergici, dependentă de concentrație, care depășește supra-expresia indusă de rotenonă (Figurile 2 și 3).

LPS este endotoxina bacteriilor Gram-negative, are un efect pro-inflamator puternic prin stimularea receptorului Toll-like 4 (TLR-4) și este o moleculă amfifilă care favorizează formarea biofilmului bacterian. Acest studiu a arătat rezultate interesante după tratamentul neuronal cu LPS, cum ar fi o lipsă de modificare a viabilității celulare, a citotoxicității și aderenței celulare în comparație cu controlul, indiferent de concentrații, însă cu o creștere a expresiei și a nivelurilor intracelulare de α -sinucleină. (Figurile 2 și 3).

În ceea ce privește tratamentul cu amiloizii funcționali, curli CsgA și PSM α 1, în intervalul ales de concentrații am observat o modificare discretă a viabilității neuronale și a citotoxicității la cea mai mare concentrație a ambilor compuși (32 μ g/ml). De asemenea, am observat o tendință de scădere a aderenței în tratamentul curli CsgA. În afară de acestea, nu s-au observat alte modificări și nu a existat o creștere a ARNm al α -sinucleinei sau a nivelurilor intracelulare ale α -sinucleinei. Aceste observații nu exclud posibilul rol al amiloizilor

funcționali de inducere a agregării intraneuronale a α -sinucleinei, care nu a fost evaluat în acest studiu.

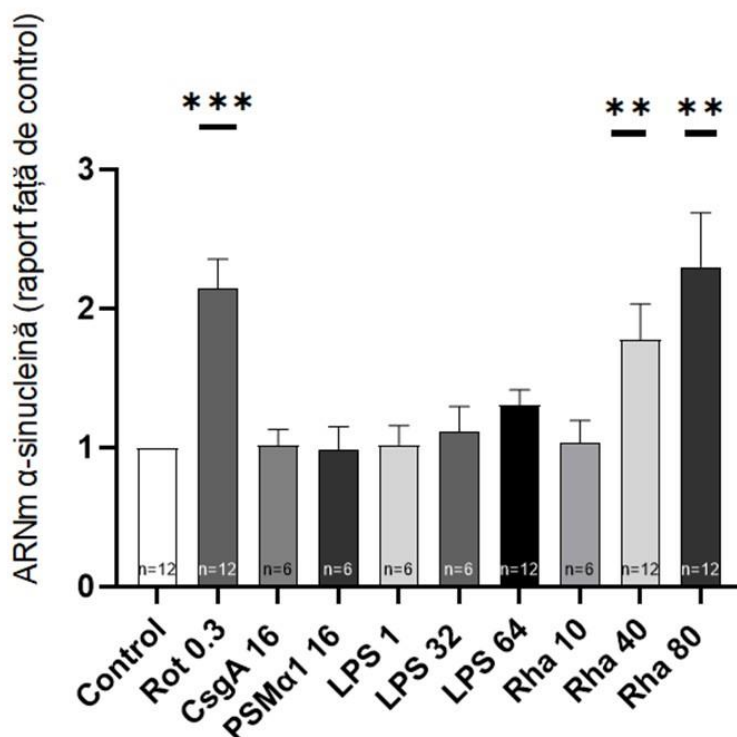


Figura 2. qRT-PCR pentru ARNm α -sinucleină efectuat la 48 de ore după tratamentul cu compuși bacterieni (curli CsgA 16 ug/ml, PSMa1 16 ug/ml, LPS 1 ug/ml, 32 ug/ml și 64 ug/ml, rhamnolipid 10 ug/ml, 40 ug/ml și 80 ug/ml) pe celule SH-SY5Y diferențiate dopaminergic. Rotenona 0.3 uM a fost folosită drept control pozitiv. Datele sunt afișate ca o creștere în raport cu controlul, care a fost normalizat la 1. Nivelurile de α -sinucleină au fost normalizate la GAPDH. Datele sunt exprimate ca media $\pm$ SEM a trei experimente independente efectuate cel puțin în duplicat. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

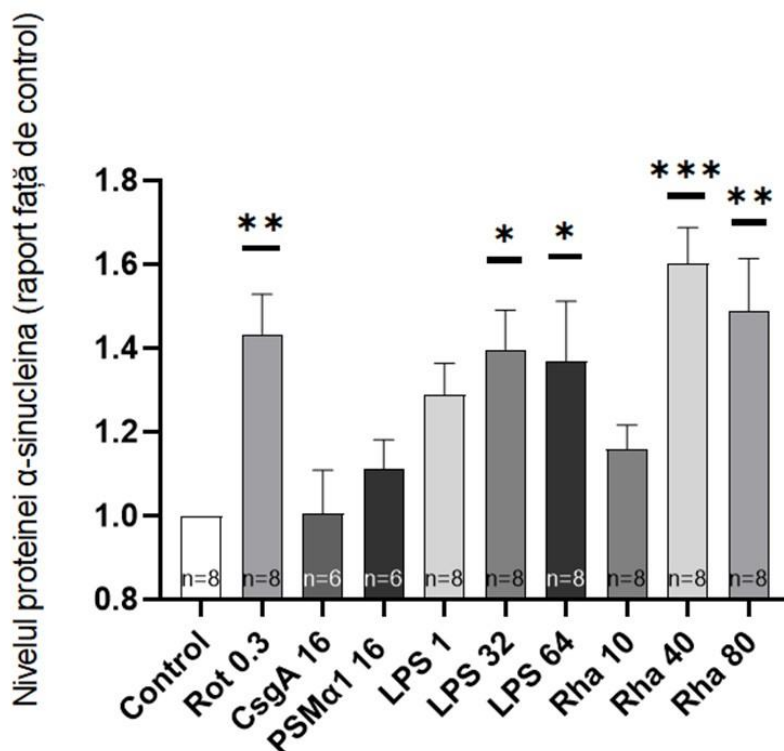


Figura 3. Western Blot pentru α -sinucleină efectuat la 48 de ore după tratamentul cu compuși bacterieni (curli CsgA 16 ug/ml, PSMa1 16 ug/ml, LPS 1 ug/ml, 32 ug/ml și 64 ug/ml, rhamnolipid 10 ug/ml, 40 ug/ml și 80 ug/ml) pe celule SH-SY5Y diferențiate dopaminergic. Rotenona 0,3 uM a fost utilizată drept control pozitiv. Datele proteinei intracelulare α -sinucleină au fost normalizate la GAPDH. Datele sunt afișate ca o creștere în raport cu controlul, care a fost normalizat la 1. Datele sunt exprimate ca medie $\pm$ SEM a patru experimente independente efectuate în duplicat (pentru curli CsgA 16 ug/ml și PSMa1 16 ug/ml – trei experimente independente efectuate în duplicat). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Deși nu am evaluat agregarea intracelulară a α -sinucleinei, știm din formele genetice de BP, cum ar fi duplicarea sau triplicarea α -sinucleinei, că nivelurile intracelulare crescute de α -sinucleină favorizează incontestabil inițierea agregării, începutul procesului de agregare fiind doar o chestiune de timp (Singleton *et al.*, 2003b; Chartier-Harlin *et al.*, 2004b; Iannielli *et al.*, 2022).

Acest studiu nostru in vitro oferă perspective semnificative asupra mecanismelor potențiale prin care moleculele derivate din microbiotă, în special rhamnolipid și LPS, contribuie la patogeneza

BP. Deși nu rezolvă definitiv complexitatea din jurul inițierii patologiei BP în tractul gastrointestinal, subliniază rolul critic pe care acești compuși microbieni îl pot juca. Supra-expresia α -sinucleinei observată în urma expunerii la amfifilele bacteriene introduce un nou mecanism al modificărilor patologice din BP induse de microbiota intestinală, extinzând conceptul actual al inducerii agregării α -sinucleinei în mod direct de către acești compuși.

Sinteza studiului 2 – Efectul compușilor microbieni derivați din microbiota intestinală asupra celulelor epiteliale intestinale

Linia celulară Caco-2, provenită dintr-un adenocarcinom colorectal, este frecvent utilizată în cadrul modelelor experimentale care evaluează epiteliul intestinal. Menținute în monostrat în cadrul inserturilor cel puțin 21 zile, astfel încât să polarizeze și să aibă contact atât bazo-lateral, prin membrana inserturilor cu pori, cât și apical, celulele se diferențiază în enterocite, formând joncțiuni strânse. Astfel, această linie celulară este frecvent utilizată în stadiu diferențiat în modele in vitro în care se testează efectul diferiților compuși asupra barierei intestinale. În același timp, reprezintă un model util în evaluarea efectelor diferiților compuși asupra funcției celulelor epiteliale intestinale, fără a fi necesară utilizarea celulelor în stadiu diferențiat.

După evaluarea efectelor compușilor derivați din microbiota intestinală asupra neuronilor dopaminergici (studiul 1), pasul următor a fost de a evalua efectele acestor compuși asupra celulelor epiteliale intestinale, celule cu care bacteriile microbiotei intestinale se află într-o continuă interacțiune. Celulele epiteliale intestinale pot reprezenta prima piesă de domino care cade și care declanșează agregarea α -sinucleinei și inițierea BP. Pe lângă tratamentul cu compușii microbieni, s-a evaluat efectul rotenonei asupra Caco-2. Excluzând studiile de permeabilitate a barierei cu celule Caco-2 diferențiate în monostrat, în literatură nu sunt studii care să evalueze efectul rotenonei asupra celulelor Caco-2, în ceea ce privește viabilitatea, citotoxicitatea și, mai ales, expresia de α -sinucleină.

Compușii microbieni, mai ales endotoxina bacteriană LPS, au un rol inflamator la nivelul barierei intestinale producând o permeabilizare a acesteia. Astfel, este facilitată pătrunderea bacteriilor și compușilor microbieni în țesutul local, eventual cu pătrunderea în fluxul sangvin. În același timp, s-a evidențiat că acești compuși microbieni exercită efecte locale la nivelul

celulelor din peretele intestinal. În celulele enteroendocrine se produce o creștere a nivelului de α -sinucleină și o alterare a α -sinucleinei intracelulare în urma expunerii la LPS.

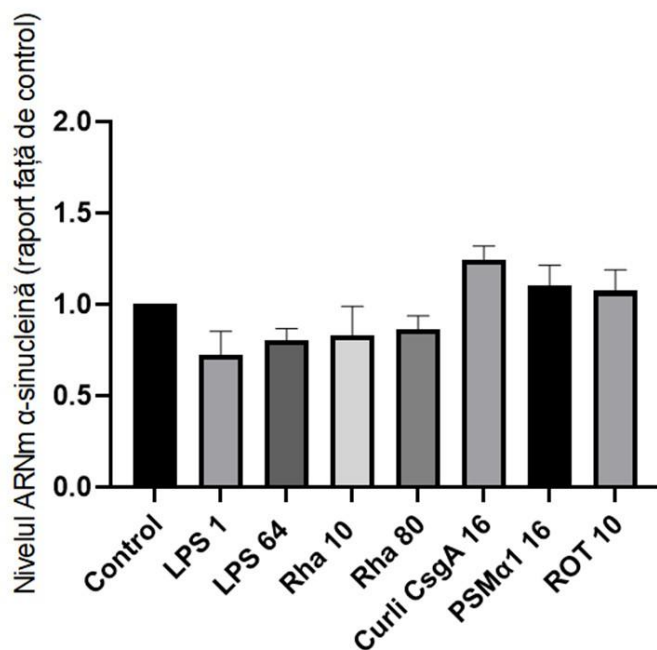


Figura 4. qRT-PCR pentru ARNm α -sinucleină efectuat la 48 de ore după tratamentul celulelor epiteliale intestinale Caco-2 cu rotenonă 10 μ M și cu compuși bacterieni (curli CsgA 16 μ g/ml, PSMa1 16 μ g/ml, LPS 1 μ g/ml și 64 μ g/ml, rhamnolipid 10 μ g/ml și 80 μ g/ml). Datele sunt afișate ca o creștere în raport cu controlul, care a fost normalizat la 1. Nivelurile de α -sinucleină au fost normalizate la GAPDH. Datele sunt exprimate ca media $\pm$ SEM a două experimente independente efectuate în duplicat sau quadruplicat.

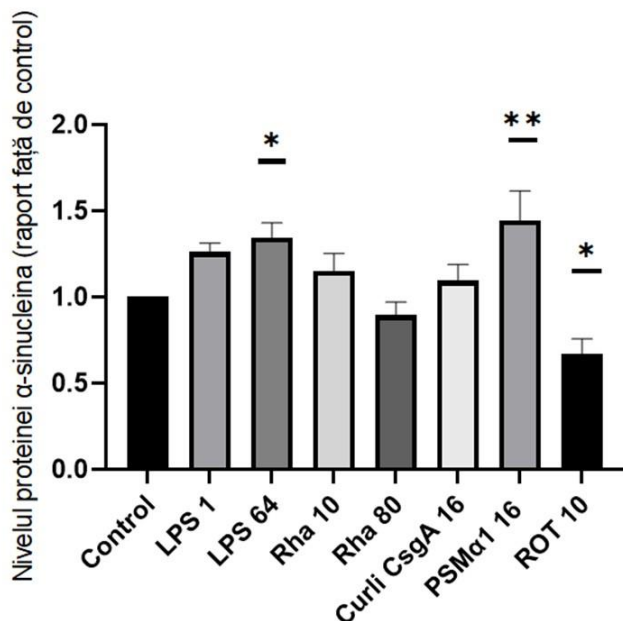


Figura 5. Western Blot pentru α -sinucleină efectuat la 48 de ore după tratamentul celulelor epiteliale intestinale Caco-2 cu rotenonă 10 μ M și cu compuși bacterieni (curli CsgA 16 μ g/ml, PSMa1 16 μ g/ml, LPS 1 μ g/ml și 64 μ g/ml, rhamnolipid 10 μ g/ml și 80 μ g/ml). Rezultatele proteinei intracelulare α -sinucleină au fost normalizate la GAPDH. Datele sunt afișate ca o creștere în raport cu controlul, care a fost normalizat la 1. Datele sunt exprimate ca medie $\pm$ SEM a patru experimente independente efectuate în duplicat. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Rhamnolipidul nu a avut un efect semnificativ asupra nivelului α -sinucleinei intracelulare din celulele Caco-2 (Figurile 4 și 5). Viabilitatea celulelor a scăzut sub forma unui efect dependent de doză, însă fără a se asocia cu un efect citotoxic, care a apărut abia la cea mai mare concentrație, de 160 μ g/ml. Astfel, putem concluziona că rhamnolipidul nu are un efect semnificativ asupra celulelor epiteliale intestinale. Acest efect este contrar celui evidențiat în neuronii dopaminergici, unde rhamnolipidul a determinat o creștere importantă a nivelurilor α -sinucleinei (studiul 1).

Similar cu efectul din studiul 1 asupra neuronilor dopaminergici, LPS nu a determinat o modificare a viabilității și citotoxicității celulelor epiteliale intestinale. În schimb, a avut un efect foarte interesant asupra nivelului de α -sinucleină (Figurile 4 și 5). LPS a determinat o ușoară scădere a expresiei α -sinucleinei, între 20-28% față de control, în paralel cu o creștere de până

la 35% a cantității intracelulare a α -sinucleinei. Acest efect de scădere a expresiei și cu creștere a cantității intracelulare necesită o evaluare ulterioară suplimentară în vederea stabilirii cauzei. Însă ipoteza de la momentul acesta, ținând cont de mecanismele fiziopatologice ale agregării α -sinucleinei și care au fost discutate în secțiunea introductivă, este că LPS determină alterarea sistemelor de degradare proteică, care determină secundar acumularea intracelulară de α -sinucleină și ca răspuns la aceasta determină o scădere a expresiei proteinei. Studii care să evalueze activitatea celor două sisteme de degradare proteică, ubiquitină-proteazomi și autofagie-lizozomi, pot dovedi această ipoteză.

PSM α 1 a avut un efect similar cu al LPS, determinând o creștere a nivelului intracelular de α -sinucleină cu menținerea în limite normale a expresiei α -sinucleinei (Figurile 4 și 5). Acest efect sugerează în mod similar o alterare a degradării proteice, de data aceasta nefiind urmată de o scădere a expresiei. PSM α 1 nu a avut un efect citotoxic și a prezentat doar un discret efect de scădere a viabilității celulare la cea mai mare concentrație, de 32 μ g/ml.

Pe de altă parte, curli CsgA a avut un efect diferit de cel al LPS și PSM α 1, determinând o creștere atât a expresiei α -sinucleinei (25%), cât și a cantității intracelulare a α -sinucleinei (10%) (Figurile 4 și 5). Această creștere poate fi importantă în expunerea cronică și repetată în condiții fiziologice. Curli a determinat o ușoară scădere treptată a viabilității la creșterile de concentrație, fără un efect citotoxic semnificativ, cu excepția celei mai mari concentrații, de 32 μ g/ml, unde s-a observat un ușor efect citotoxic.

Ar fi de menționat și efectul interesant al rotenonei, care nu a modificat expresia α -sinucleinei, în schimb a determinat o scădere cu până la 33% a nivelului intracelular de α -sinucleină (Figurile 4 și 5). Acest efect necesită o investigație suplimentară, știind faptul că rotenona determină o alterare selectivă a neuronilor dopaminergici cu efecte celulare precum disfuncție mitocondrială, alterare conformațională a α -sinucleinei și creșterea expresiei α -sinucleinei, însă efectul acesteia în urma expunerii la celule epiteliale intestinale nu a fost analizat din punct de vedere al α -sinucleinei.

În concluzie, aceste efecte constatate sugerează că celulele epiteliale intestinale joacă un rol important, care fusese anterior neglijat, în ceea ce privește inițierea agregării α -sinucleinei, iar mecanismele prin care compușii microbieni își exercită efectul asupra lor par să fie multiple.

Sinteza studiului 3 – Efectul compușilor microbieni într-un sistem de co-cultură între celule epiteliale intestinale și neuroni dopaminergici

În acest studiu am dorit să răspundem la întrebarea legată de inițierea agregării α -sinucleinei la nivel intestinal și rolul microbiotei intestinale în acest proces: există o transmisie a agregatelor de α -sinucleină de la alte celule din tubul intestinal la nivelul neuronilor sau există o comunicare inter-celulară între neuroni și alte celule din tubul intestinal care, în urma unui stres venit de la nivelul lumenului intestinal (produs de compușii microbieni derivați din microbiota intestinală), produce o modificare în neuroni care determină inițierea agregării α -sinucleinei?

Astfel, am pus la punct un sistem de co-cultură între celulele epiteliale intestinale Caco-2 și celulele neuronale diferențiate dopaminergic SH-SY5Y (Figura 6). Doar celulele epiteliale intestinale au fost anterior tratate cu compușii microbieni, simulând astfel condițiile de la nivelul tubului digestiv unde aceste celule se găsesc în contact permanent cu microbiota intestinală și metaboliții acesteia. Acest sistem nu a permis comunicarea directă între cele două tipuri de celule, comunicarea inter-celulară realizându-se doar prin intermediul factorilor solubili în mediu, situație care simulează mai bine condițiile fiziologice din tubul intestinal unde celulele epiteliale intestinale nu au contact direct cu neuronii.

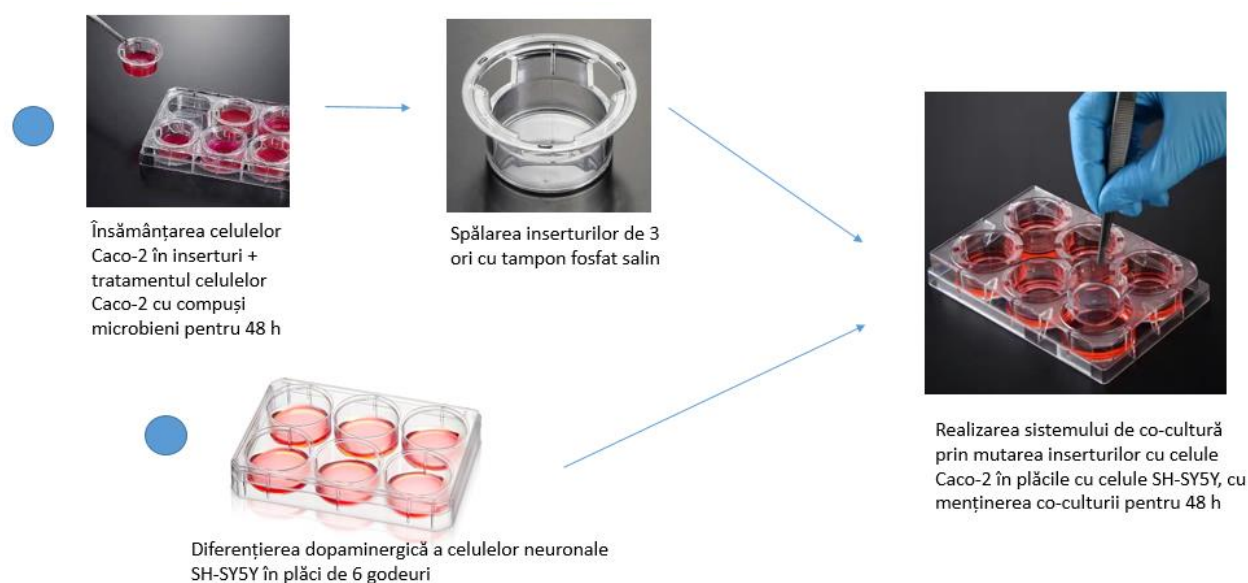


Figura 6. Schema protocolului de co-cultură realizat în cadrul experimentelor

Celulele epiteliale Caco-2 au fost însămânțate în inserturi și ulterior au fost tratate cu compușii microbieni și rotenonă, cu concentrațiile utilizate anterior. După 48 h de incubare, inserturile cu celulele Caco-2 au fost spălate în mod repetat, astfel încât să nu mai existe urme de mediu cu tratament și au fost mutate în plăci care conțineau celule neuronale diferențiate dopaminergic SH-SY5Y (efectuându-se anterior diferențierea dopaminergică, în paralel cu tratamentul celulelor Caco-2). Neuronii nu au fost anterior tratați în mod direct cu compușii microbieni sau rotenonă. Este de menționat că, pe parcursul co-culturii, celulele Caco-2 nu au intrat în contact direct cu neuronii SH-SY5Y, insertul fiind suspendat, însă s-au aflat în același mediu, insertul fiind cu pori de 0.4 μ M. După 48 h de co-cultură, inserturile cu celulele Caco-2 au fost înlăturate și neuronii SH-SY5Y au fost prelucrați în vederea măsurării nivelului de α -sinucleină prin qRT-PCR și Western Blot. Controlul a fost reprezentat de tratamentul celulelor Caco-2 cu solvenul compușilor, trecând prin toate etapele protocolului de co-cultură.

La tratamentul cu curli CsgA s-a observat o ușoară scădere a expresiei de α -sinucleină, la 22% față de control, cu o creștere a cantității intracelulare de α -sinucleină (Figurile 7 și 8). Acest efect este similar cu efectul LPS asupra celulelor Caco-2 din studiul 2 și ridică ipoteza unei alterări a degradării proteice la nivel neuronal de această dată, cu o scădere compensatorie a expresiei α -sinucleinei. Studii sunt necesare pentru a evalua cu precizie acest mecanism.

Tratamentul cu PSM α 1 nu a relevat modificări ale expresiei proteinei însă nivelul intracelular de α -sinucleină a crescut semnificativ, la 43% față de control. Tratamentul cu LPS a determinat o creștere intracelulară de α -sinucleină între 16 și 22%, cu o lipsă a afectării expresiei proteinei (Figurile 7 și 8). Astfel, aceste efecte similare sunt considerate la acest moment ca având în spate același mecanism ipotetic de alterare a degradării proteice. Evaluarea celor două sisteme de degradare proteică, ubiquitina-proteazomi și autofagie-lizozomi, poate confirma ipoteza actuală.

Rotenona a determinat o creștere semnificativă a expresiei α -sinucleinei, de 2.6 ori mai mult decât controlul, însă creșterea nivelului intracelular al α -sinucleinei nu a fost similar, de doar 13% (Figurile 7 și 8). Acest efect necesită explorat suplimentar, neavând la acest moment o ipoteză din punct de vedere biologic, situație similară cu rezultatele de la tratamentul cu rotenonă asupra celulelor Caco-2.

În concluzie, rezultatele acestui studiu subliniază importanța pe care comunicarea dintre țesutul epitelial intestinal și sistemul nervos enteric o poate avea în inițierea agregării α -sinucleinei.

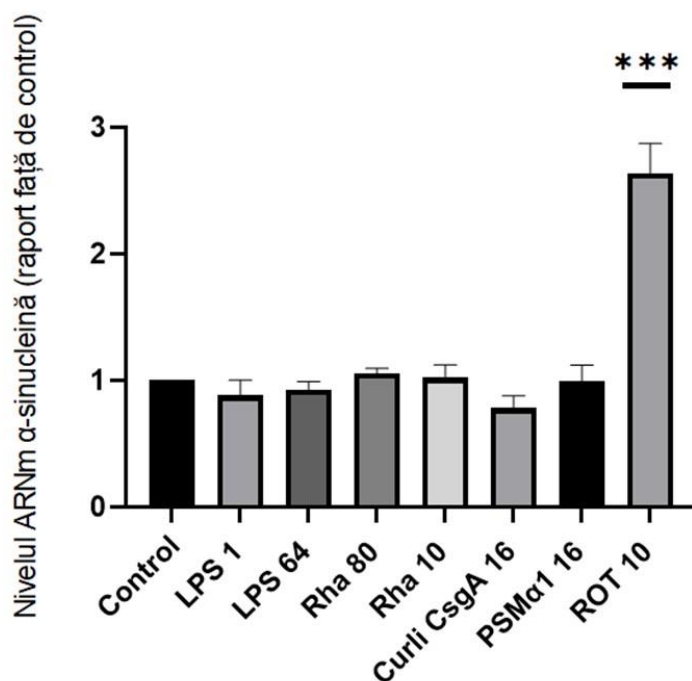


Figura 7. qRT-PCR pentru ARNm α -sinucleină din celulele neuronale SH-SY5Y după 48 de ore de co-cultură cu celulele Caco-2 anterior tratate 48 h cu rotenonă 10 uM și cu compuși bacterieni (curli CsgA 16 ug/ml, PSMα1 16 ug/ml, LPS 1 și 64 ug/ml, rhamnolipid 10 și 80 ug/ml). Datele sunt afișate ca o creștere în raport cu controlul, care a fost normalizat la 1. Nivelurile de α -sinucleină au fost normalizate la GAPDH. Datele sunt exprimate ca media $\pm$ SEM a cel puțin două experimente independente efectuate în duplicat sau quadruplicat. *** $p < 0.001$

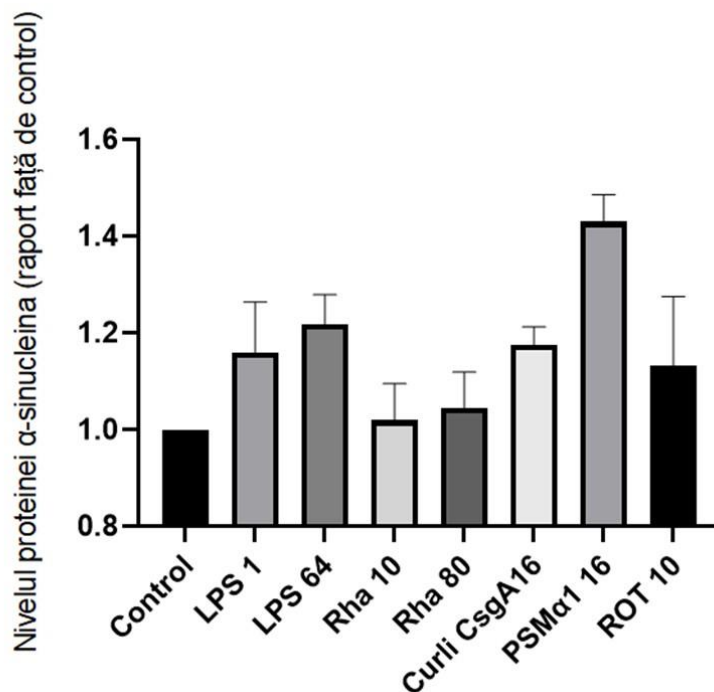


Figura 8. Western Blot pentru α -sinucleină din celulele neuronale SH-SY5Y diferențiate dopaminergic după 48 de ore de co-cultură cu celulele epiteliale intestinale Caco-2 anterior tratate 48 h cu rotenonă 10 μ M și cu compuși bacterieni (curli CsgA 16 μ g/ml, PSM α 1 16 μ g/ml, LPS 1 μ g/ml și 64 μ g/ml, rhamnolipid 10 μ g/ml și 80 μ g/ml). Rezultatele proteinei intracelulare α -sinucleină au fost normalizate la GAPDH. Datele sunt afișate ca o creștere în raport cu controlul, care a fost normalizat la 1. Datele sunt exprimate ca medie $\pm$ SEM a cel două (pentru curli CsgA și PSM α 1) sau patru experimente independente efectuate în duplicat. Analiza statistică: one-way ANOVA, testul Dunnett

Concluzii și contribuții proprii

În cadrul celor 3 studii prezentate consider că am atins toate obiectivele de etapă propuse. Voi prezenta pe scurt rezultatele semnificative obținute în cadrul acestei lucrări, în special cele relevante din punct de vedere al fiziopatologiei BP, ci anume evaluarea nivelului de α -sinucleină.

1. Toate moleculele derivate din microbiota intestinală folosite în cadrul experimentelor, rhamnolipid, LPS, curli CsgA și PSM α 1, contribuie la fenomenul de inițiere a mecanismelor patologice din BP prin creșterea nivelului de α -sinucleină intracelular în celulele epiteliale (reprezentate in vitro prin linia Caco-2) și/sau în neuronii dopaminergici (reprezențați in vitro prin linia SH-SY5Y diferențiată).

2. Sistemul de co-cultură între celulele epiteliale intestinale Caco-2 și celulele neuronale diferențiate dopaminergic SH-SY5Y reprezintă un model experimental in vitro potrivit și fiabil pentru studierea interacțiunii dintre epiteliul intestinal și sistemul nervos enteric.

3. Rhamnolipidul are un efect de creștere semnificativă a expresiei și a cantității intracelulare de α -sinucleină în celulele neuronale diferențiate dopaminergic SH-SY5Y, care depășește efectul de creștere determinat de rotenonă.

4. LPS are un efect de creștere a expresiei și a cantității intracelulare de α -sinucleină în celulele neuronale diferențiate dopaminergic SH-SY5Y

5. LPS are un efect de creștere a cantității intracelulare de α -sinucleină (fără un efect de creștere a expresiei) atât în celulele epiteliale intestinale Caco-2, cât și în celulele SH-SY5Y din co-cultura cu celulele Caco-2 anterior tratate

6. Curli CsgA are un efect de creștere a expresiei de α -sinucleină în celulele epiteliale intestinale Caco-2.

7. Curli CsgA are un efect de creștere a cantității intracelulare de α -sinucleină (fără un efect de creștere a expresiei) în celulele SH-SY5Y din co-cultura cu celulele Caco-2 anterior tratate.

8. PSM α 1 are un efect de creștere a cantității intracelulare de α -sinucleină (fără un efect de creștere a expresiei) în celulele epiteliale intestinale Caco-2 și în celulele SH-SY5Y din cocultura cu celulele Caco-2 anterior tratate.

Ipoteza științifică în ceea ce privește rezultatele care au constatat o creștere a cantității intracelulare de α -sinucleină, fără o creștere a expresiei α -sinucleinei, este că tratamentul determină o alterare intracelulară a sistemelor de degradare proteică cu acumulare secundară a α -sinucleinei. Studii ulterioare necesită evaluarea acestui efect.

Așa cum am menționat anterior, deși nu am evaluat agregarea intracelulară a α -sinucleinei, știm din formele genetice de BP care determină duplicare (creștere de 1.5 ori a α -sinucleinei intracelulare) sau triplicare (creștere de 2 ori a α -sinucleinei intracelulare), că nivelurile intracelulare de α -sinucleină crescute favorizează incontestabil inițierea agregării, aceasta fiind doar o chestiune de timp.

În concluzie, am demonstrat că microbiota poate juca un rol semnificativ în inițierea BP la nivel intestinal prin faptul că moleculele derivate din microbiota intestinală au capacitatea de a crește nivelul de α -sinucleină intracelulară în celulele epiteliale intestinale sau în celulele neuronale, fenomen care favorizează agregarea α -sinucleinei. Astfel, am îndeplinit obiectivul principal al acestei lucrări. Consider că această lucrare poate avea un impact semnificativ în cercetările care evaluează rolul microbiotei în inițierea BP, reprezentând un punct de plecare pentru numeroase studii in vitro sau in vivo.

Bibliografie selectivă

- Bhattacharyya, D. *et al.* (2019) 'Lipopolysaccharide from Gut Microbiota Modulates α -Synuclein Aggregation and Alters Its Biological Function', *ACS chemical neuroscience*, 10(5), pp. 2229–2236. doi: 10.1021/ACSCHEMNEURO.8B00733.
- Braak, H. *et al.* (2003) 'Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease', *Neurobiology of Aging*, 24(2), pp. 197–211. doi: 10.1016/S0197-4580(02)00065-9
- Chen, S. G. *et al.* (2016) 'Exposure to the Functional Bacterial Amyloid Protein Curli Enhances Alpha-Synuclein Aggregation in Aged Fischer 344 Rats and *Caenorhabditis elegans*', *Scientific reports*, 6. doi: 10.1038/SREP34477.
- Danzer, K. M. *et al.* (2009) 'Seeding induced by α -synuclein oligomers provides evidence for spreading of α -synuclein pathology', *Journal of Neurochemistry*, 111(1), pp. 192–203. doi: 10.1111/J.1471-4159.2009.06324.X,.
- Desplats, P. *et al.* (2009) 'Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of α -synuclein', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), pp. 13010–13015. doi: 10.1073/PNAS.0903691106,.
- Gorecki, A. M. *et al.* (2024) 'Imaging flow cytometry reveals LPS-induced changes to intracellular intensity and distribution of α -synuclein in a TLR4-dependent manner in STC-1 cells', *Methods*. doi: 10.1016/J.YMETH.2024.10.009.
- Haikal, C. *et al.* (2021) 'The Bacterial Amyloids Phenol Soluble Modulins from *Staphylococcus aureus* Catalyze Alpha-Synuclein Aggregation', *International journal of molecular sciences*, 22(21). doi: 10.3390/IJMS222111594.
- Hurley, M. J. *et al.* (2023) ' α -Synuclein expression in response to bacterial ligands and metabolites in gut enteroendocrine cells: an in vitro proof of concept study', *Brain Communications*, 5(6). doi: 10.1093/BRAINCOMMS/FCAD285.
- Keshavarzian, A. *et al.* (2015) 'Colonic bacterial composition in Parkinson's disease',

- Movement Disorders*, 30(10), pp. 1351–1360. doi: 10.1002/MDS.26307.
- Kordower, J. H. *et al.* (2008) ‘Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson’s disease’, *Nature Medicine*, 14(5), pp. 504–506. doi: 10.1038/NM1747,.
- Lopes, F. M. *et al.* (2010) ‘Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies’, *Brain research*, 1337, pp. 85–94. doi: 10.1016/J.BRAINRES.2010.03.102.
- Najarzadeh, Z. *et al.* (2019) ‘Bacterial amphiphiles as amyloid inducers: Effect of Rhamnolipid and Lipopolysaccharide on FapC fibrillation’, *Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics*, 1867(11). doi: 10.1016/J.BBAPAP.2019.140263.
- Presgraves, S. P. *et al.* (2004) ‘Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists’, *Neurotoxicity research*, 5(8), pp. 579–598. doi: 10.1007/BF03033178.
- Sampson, T. R. *et al.* (2016) ‘Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson’s Disease’, *Cell*, 167(6), pp. 1469-1480.e12. doi: 10.1016/J.CELL.2016.11.018/ATTACHMENT/D4F49F21-9693-4F57-9D34-5E243AB4FCFB/MMC1.PDF.
- Sampson, T. R. *et al.* (2020) ‘A gut bacterial amyloid promotes α -synuclein aggregation and motor impairment in mice’, *eLife*, 9. doi: 10.7554/ELIFE.53111.
- Scheperjans, F. *et al.* (2015) ‘Gut microbiota are related to Parkinson’s disease and clinical phenotype’, *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 30(3), pp. 350–358. doi: 10.1002/MDS.26069.
- Singleton, A. B. *et al.* (2003) ‘alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson’s disease’, *Science (New York, N.Y.)*, 302(5646), p. 841. doi: 10.1126/SCIENCE.1090278.
- Tofaris, G. K. (2022) ‘Initiation and progression of α -synuclein pathology in Parkinson’s disease’, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 79(4). doi: 10.1007/S00018-022-04240-2.
- Wang, C. *et al.* (2021) ‘Genome-wide screen identifies curli amyloid fibril as a bacterial

component promoting host neurodegeneration’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(34). doi: 10.1073/PNAS.2106504118/-/DCSUPPLEMENTAL.

Xicoy, H., Wieringa, B. and Martens, G. J. M. (2017) ‘The SH-SY5Y cell line in Parkinson’s disease research: a systematic review’, *Molecular neurodegeneration*, 12(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/S13024-017-0149-0.

Zaman, M. and Andreasen, M. (2020) ‘Cross-talk between individual phenol- soluble modulins in staphylococcus aureus biofilm enables rapid and efficient amyloid formation’, *eLife*, 9, pp. 1–17. doi: 10.7554/ELIFE.59776.

Lista lucrărilor publicate

1. Ioghen OC, Gaina G, Lambrescu I, Manole E, Pop S, Niculescu TM, Mosoia O, Ceafalan LC, Popescu BO. Bacterial products initiation of alpha-synuclein pathology: an in vitro study. Scientific Reports. 2024 ;14(1):30306. doi: 10.1038/s41598-024-81020-x

Revistă ISI, Factor de impact = 3.8

Capitolul 8, pag 43-61; Capitolul 9, pag 70-92

2. Ioghen OC, Ceafalan LC, Popescu BO. SH-SY5Y Cell Line In Vitro Models for Parkinson Disease Research-Old Practice for New Trends. Journal of Integrative Neuroscience. 2023 ;22(1):20. doi: 10.31083/j.jin2201020

Revistă ISI, Factor de impact = 2.5

Capitolul 6, pag 32-39

3. Ioghen OC, Ioghen MR, Popescu BO. Neurodegeneration: A Tale of Microbes and Neurons. Modern Medicine. 2025; 32(1); <https://doi.org/10.31689/rmm.2025.32.1.7>

Revistă BDI, indexată SCOPUS, Scimago Journal Rank, DOAJ, Google Scholar, Scipio of UEFISCDI, INDEX COPERNICUS, Sciencegate, Researcher Life

Capitolul 4, pag 22-26, Capitolul 5, pag 27-31