Uloga pogrešno smotanih proteina u razvoju neurodegenerativnih bolesti

Belačić, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:976053

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ULOGA POGREŠNO SMOTANIH PROTEINA U RAZVOJU NEURODEGENERATIVNIH BOLESTI

THE ROLE OF MISFOLDED PROTEINS IN NEURODEGENERATIVE DISEASES PATHOLOGY

SEMINARSKI RAD

Katarina Belačić

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergradute Study of Molecular Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ita Gruić-Sovulj

Zagreb, 2016.

SADRŽAJ

1. Uvod 1

2. Smatanje proteina 2

2.1. Sinteza i razine struktura proteina 2

2.2. Regulacija smatanja proteina 3

2.3. Mehanizmi smatanja proteina 4

2.3.1. Spontano smatanje proteina 4

2.3.2. Smatanje proteina potpomognuto molekularnim šaperonima 4

3. Pogrešno smatanje proteina 5

3.1. Uzroci pogrešnog smatanja proteina 5

3.2. Stanični odgovor na pogrešno smotane proteine 7

3.3. Posljedice pogrešnog smatanja proteina 9

4. Uloga pogrešno smotanih proteina u razvoju neurodegenerativnih bolesti 11

4.1. Neurodegenerativne bolesti 11

4.2. Proteinski agregati 13

4.2.1. Amiloidni agregati 14

4.2.2. Ne-amiloidni agregati 16

4.3. Proteinski agregati karakteristični za pojedina neurodegenerativna oboljenja 17

4.3.1. Alzheimerova bolest 17

4.3.2. Parkinsonova bolest 19

4.3.3. Huntingtonova bolest 20

4.3.4. Amiotrofična lateralna skleroza 20

4.3.5. Transmitivna spongioformna encefalopatija 24

4.4. Fenomen priona 25

4.5. Mehanizmi neurodegeneracije 26

4.6. Uzrok, posljedica ili epifenomen 29

5. Terapija 31

6. Zaključak 33

7. Popis literature 34

8. Sažetak 38

9. Summary 39

1. UVOD

Proteini su najbrojnije biološke makromolekule. Nalaze se unutar svih stanica i u svim dijelovima stanica. Proteini generalno posreduju u svakom staničnom procesu te su vrlo raznolika skupina bioloških makromolekula, na tisuće različitih se može nalaziti unutar samo jedne stanice. Proteinske molekule su finalni produkti protoka informacije koja započinje s DNA i preko RNA završava sintezom proteina (Lehninger, 2008). Svaki protein ima svoju trodimenzionalnu strukturu odnosno nativnu konformaciju koja određuje njegovu funkciju. Protein svoju nativnu konformaciju poprima procesom smatanja. Interes znanstvenika koji se bave proteinima trenutno je usredotočen na razotkrivanje molekularnih temelja procesa smatanja proteina, pogrešnog smatanja proteina i agregacije, kao i mehanizama toksičnosti proteinskih agregata za živa bića (Stefani, 2008). Istražuje se kako navedeni procesi utječu na vijabilnost stanice i trenutno su oni jedna od vrlo važnih tema u molekularnoj i strukturnoj biologiji te molekularnoj medicini (Stefani, 2008). Intenzivan trud uložen unazad zadnjih par godina, kako bi se stekao uvid u smatanje, pogrešno smatanje i agregaciju proteina, potaknut je sviješću da bi se mogao razotkriti „kod smatanja“ urođen u skoro svaki polipeptidni lanac kao i otkrivanje biokemijskih temelja brojnih degenerativnih poremećaja od kojih neki mogu imati dramatičan socijalni utjecaj, kao naprimjer neurodegenerativne bolesti (Stefani, 2008).

2. SMATANJE PROTEINA

2.1. Sinteza i razine strukture proteina

Proteini su građeni od niza aminokiselina specifičnog redoslijeda, vrste i broja, što predstavlja primarnu strukturu proteina. Aminokiseline u proteinu su međusobno povezane peptidnim vezama koje se stvaraju na ribosomima u procesu translacije. Postoji 20 različitih aminokiselina koje grade proteine, tzv. proteinogene aminokiseline, a njihov slijed u proteinu određen je slijedom deoksiribonukleotida gena u DNA koji kodira taj protein. U procesu translacije ribosom prevodi slijed ribonukleotida mRNA, nastalu transkripcijom odgovarajućeg gena u DNA, u slijed aminokiselina u proteinu. Novosintetizirani protein je biološki neaktivan dok ne poprimi svoju nativnu trodimenzionalnu strukturu. Predložena su dva modela koja nastoje objasniti proces smatanja proteina. Prvi model pretpostavlja da je proces smatanja proteina hijerarhijski, odnosno da prvo nastaju lokalne sekundarne strukture, α-zavojnice i β-ploče, čije nastajanje, između ostalog, određuju ionske interakcije između nabijenih skupina aminokiselina koje su međusobno blizu u primarnoj strukturi polipeptida. Nakon toga se uspostavljaju interakcije između dijelova polipeptida koji su međusobno daleko u primarnoj strukturi, primjerice između dvije α-zavojnice, formirajući stabilne supersekundarne strukture. Proces se nastavlja dok se ne uspostavi trodimenzionalna konformacija cijelog proteina (Lehninger, 2008; Hartl, 2010). Prema drugom, alternativnom modelu, proces smatanja proteina započinje spontanim kolapsom polipeptida u kompaktno stanje. Kolaps je poglavito upravljan hidrofobnim interakcijama između nepolarnih bočnih lanaca aminokiselina. Kompaktno stanje karakteriziraju uspostavljene sekundarne strukture, α-zavojnice i β-ploče, ali i neuređena konformacija bočnih lanaca većine aminokiselina (Lehninger, 2008). Daljnje konformacijske promjene unutar kompaktnog stanja rezultiraju poprimanjem nativne konformacije (Hartl, 2010). Najvjerojatnije je da proces smatanja većine proteina uključuje kombinaciju karakteristika oba modela (Lehninger, 2008). Trodimenzionalni raspored atoma koji grade protein predstavlja tercijarnu strukturu proteina (Hartl, 2010). Broj mogućih trodimenzionalnih struktura proteina je vrlo velik ($>10^{30}$) stoga su veći proteini (oni koji sadrže >500 aminokiselina) podjeljeni na domene koje se smataju nezavisno jedna od druge kako bi se smanjio broj mogućih načina smatanja. Proteini građeni

od više podjedinica imaju i kvarternu strukturu. (Hartl, 2010). U eukariotskim stanicama, smatanje proteina se odvija u nekoliko različitih odjeljaka: u malim organelima kao što su mitohondriji, kloroplasti i peroksisomi te u većim i prostranijim organelima kao što je endoplazmatski retikulum u kojem se smataju membranski proteini i proteini za sekreciju. Smatanje proteina se također odvija u jezgri, a najvećim dijelom u citoplazmi (Valastyan, 2014).

2.2. Regulacija smatanja proteina

Informacija koja regulira proces smatanja proteina i određuje njegovu tercijarnu strukturu sadržana je u primarnoj strukturi proteina, odnosno slijedu nukleotida gena koji ga kodira (Lehninger, 2008). Proces smatanja globularnih proteina termodinamički je favoriziran hidrofobnim efektom. Hidrofobni efekt se očituje tendencijom hidrofobnih aminokiselina da se udružuju stvarajući hidrofobnu srž proteina, dok hidrofilne aminokiseline ostaju na površini proteina i ostvaruju interakcije s vodenim medijem u kojem se nalaze kao što je citoplazma, stroma kloroplasta i matriks mitohondrija (Hartl, 2010). Sklonost hidrofilnih i hidrofobnih aminokiselina da zauzmu navedeni prostorni raspored rezultira kolapsom proteina iz lančaste u globularnu strukturu. Dodatne konformacijske promjene unutar globularne strukture dovode do nastanka najstabilnije, biološki aktivne konformacije proteina. Izuzetak je smatanje proteina čiji se dijelovi nalaze unutar membrana (Hartl, 2010). Transmembranski dijelovi navedenih proteina imaju hidrofobne aminokiseline na površini koje stvaraju interakcije s hidrofobnim masnim kiselinama membranskih lipida, a hidrofilne u unutrašnjosti. Takvi proteini se sintetiziraju unutar endoplazmatskog retikuluma i nakon formiranja nativne konformacije prenose se unutar membrana vezikula koje nastaju od membrana endoplazmatskog retikuluma. Spajanjem membrane stanice/organela s membranom navedene vezikule, membranski proteini dospijevaju na mjesto izvršavanja funkcije (Alberts, 2007).

2.3. Mehanizmi smatanja proteina

2.3.1. Spontano smatanje proteina

Spontano smatanje proteina je isključivo regulirano njegovom primarnom strukturom. Istraživanja su pokazala da skupinu proteina koji se spontano smataju čini vrlo mali broj proteina i oni su većinom mali i urođeno stabilni. Njihovo smatanje je navođeno prethodno opisanim hidrofobnim efektom i rezultat spontanog smatanja je biološki aktivan protein. Ovaj mehanizam smatanja proteina ne zahtijeva izvor energije (Lehninger, 2008).

2.3.2. Smatanje proteina potpomognuto molekularnim šaperonima

Većina proteina zahtijeva pomoć drugih proteina, tzv. molekulskih šaperona za pravilno smatanje. Zasada su ustanovljena dva načina kojima molekulski šaperoni omogućuju i potpomažu pravilno smatanje proteina. Prvi način je vezanje molekulskog šaperona na nesmotane regije bogate hidrofobnim aminokiselinama djelomično ili pogrešno smotanog proteina i spriječavanje agregacije takvih proteina „zaštitom“ hidrofobnih površina od interakcija s hidrofobnim površinama drugog proteina. Skupinu proteina koji imaju navedenu ulogu čine proteini Hsp70 (engl. *heat shock proteins*, proteini toplinskog šoka). Ciklusi vezanja i otpuštanja proteina na Hsp70 zahtijevaju energiju u obliku hidrolize ATP-a i sudjelovanje nekoliko drugih proteina (Lehninger, 2008), a rezultiraju supresijom agregacije i omogućavanjem produktivnog smatanja proteina (Hartl, 2010). Drugi način na koji šaperoni omogućavaju pravilno smatanje proteina je stvaranje mikrookoline oko proteina u kojoj se smatanje može odvijati pravilno. Skupinu molekulskih šaperona s takvim načinom djelovanja čine tzv. šaperonini. Šaperonini imaju strukturu cilindra s centralnom šupljinom i poklopcem (Hartl, 2010). Najpoznatiji šaperonin je kompleks GroEL/GroES iz bakterije *Escherichia coli*. Nesmotani proteini se vežu unutar šupljine GroEL kompleksa, a GroES zatvori šupljinu poput poklopca. Za izvršavanje funkcije GroEL/GroES šaperonina također je potrebna hidroliza ATP-a jer njome dolazi do konformacijskih promjena GroEL kompleksa i ciklusa vezanja i otpuštanja GroES poklopca što omogućava smatanje vezanog polipeptida. Proces smatanja proteina je reguliran veličinom i svojstvima unutarnje površine šupljine GroEL kompleksa (Lehninger, 2008).

3. POGREŠNO SMATANJE PROTEINA

3.1. Uzroci pogrešnog smatanja proteina

Iako su mnogi aspekti smatanja proteina sadržani unutar biofizičkih svojstava samog proteina, proces smatanja proteina je poprilično kompleksan i podložan greškama. Proteini se sastoje od složenog rasporeda struktura nastalih smatanjem koje zajedno uspostavljaju konačnu termodinamički stabilnu strukturu. Za većinu proteina smatanje u pravilnu trodimenzionalnu strukturu rezultira umjerenim smanjenjem slobodne energije u usporedbi s mnogobrojnim pogrešno smotanim stanjima. Stoga konformacije nastale pogrešnim smatanjem ponekad mogu biti favoriziranije od konformacije uspostavljene ispravnim smatanjem (Valastyan, 2014). Pogrešno smatanje proteina može biti posljedica mnogobrojnih uzroka na različitim razinama: promjene u molekuli DNA (mutacije), pogreške nastale tijekom transkripcije DNA u mRNA, pogreške nastale tijekom translacije na ribosomu ili pak uslijed djelovanja okoline u kojoj se protein nalazi.

Mutacije u kodirajućim dijelovima DNA koji kodiraju neki protein u većini slučajeva rezultiraju promjenom primarne strukture proteina (Hartl, 2010). Mutacije mogu dovesti do pogrešnog smatanja proteina tako što destabiliziraju nativnu konformaciju proteina i/ili stabiliziraju pogrešno smotano stanje proteina (Valastyan, 2014). Pošto primarna struktura proteina određuje smatanje i funkciju proteina, mutacije koje dovode do njene promjene mogu rezultirati pogrešno smotanim neomorfnim proteinima koji imaju drugačiju funkciju u odnosu na funkciju proteina koji bi nastao pravilnim smatanjem (Moghal, 2014). Pogreške u transkripciji najvjerojatnije imaju isti mehanizam uzrokovanja pogrešnog smatanja proteina kao i mutacije, međutim njihov doprinos ukupnoj populaciji krivo smotanih proteina je vrlo mali i zanemariv jer se vrlo mali broj proteina sintetizira na temelju pogrešno prepisane molekule mRNA u odnosu na ukupnu populaciju tog proteina u stanici pošto su mRNA kratkoživuće molekule u stanicama.

Prilikom sinteze proteina na ribosomu u procesu translacije postoji nekoliko događaja koji mogu rezultirati pogrešno sintetiziranim proteinom što može prouzročiti njegovo pogrešno smatanje. Jedna od komponenti zadužena za točnost procesa translacije je reakcija

katalizirana enzimima aminoacil-tRNA-sintetazama. Aminoacil-tRNA-sintetaze sparuju molekule tRNA s pripadnim proteinogenim aminokiselinama pri čemu nastaju aminoacilirane-tRNA, supstrati za sintezu proteina. Kako bi ribosom sintetizirao pravilan protein, aminoacil-tRNA-sintetaza mora povezati isključivo pripadnu aminokiselinu i tRNA ,primjerice reakciju aminoacilacije $tRNA^{Gly}$ s aminokiselinom glicin katalizira enzim glicil-tRNA-sintetaza. Sinteza molekula aminoacil-tRNA se odvija u dva koraka: u prvom koraku dolazi do aktivacije aminokiseline koristeći se energijom iz ATP-a te nastaje aminoacil-adenilat, a u drugom koraku se aktivirana aminokiselina prenosi na 2′ ili 3′-OH skupinu riboze adenilata na 3′ kraju pripadne tRNA (Lehninger, 2008). U slučaju da aminoacil-tRNA-sintetaza pogriješi i veže nepripadnu aminokiselinu unutar aktivnog mjesta, može doći do njene aktivacije. Neke aminoacil-tRNA-sintetaze u takvim slučajevima imaju sposobnost da spriječe aminoacilaciju tRNA s pogrešno aktiviranom aminokiselinom, tzv. popravkom pogreške prije prijenosa na tRNA, tj. hidrolizom nepripadnog aminoacil-adenilata. Ako dođe do prijenosa nepripadne aminokiseline na tRNA, neke aminoacil-tRNA-sintetaze sadrže odvojenu domenu za popravak pogreške nakon prijenosa na tRNA. Taj popravak obuhvaća hidrolizu esterske veze između nepripadne aminokiseline i pripadne tRNA. Ako ipak tRNA s vezanom nepripadnom aminokiselinom napusti aminoacil-tRNA-sintetazu, veže ju elongacijski faktor Tu (EF-Tu) i donosi na A mjesto ribosoma (Lehninger, 2008). EF-Tu:GTP sve tRNA s vezanim pripadnim aminokiselinama veže s vrlo sličnim afinitetima. Suprotno, molekule tRNA s vezanim nepripadnim aminokiselinama se na EF-Tu:GTP vežu s vrlo velikim rasponom afiniteta koji variraju od 60 puta slabijim do 120 puta jačim u usporedbi s afinitetom vezanja tRNA s vezanom pripadnom aminokiselinom. Navedena razlika u afinitetima vezanja omogućava EF-Tu diskriminaciju bar nekih tRNA s vezanim nepripadnim aminokiselinama i onemogućava njihovo sudjelovanje u biosintezi proteina (Cvetesic, 2013). Međutim EF-Tu ne diskriminira neke tRNA s vezanim nepripadnim aminokiselinama koje su vrlo slične pripadnima te slično termodinamski doprinose vezanju. Prema tome vjernost sinteze proteina najviše ovisi o točnosti reakcija i mehanizmima popravka aminoacil-tRNA-sintetaza (Cvetesic, 2013). Ako obje razine popravka aminoacil-tRNA-sintetaza ne isprave grešku i dođe do sinteze i otpuštanja krivo sparene aminoacil-tRNA može doći do mistranslacije. Mistranslacija je proces tijekom kojeg dolazi do pogrešne ugradnje aminokiseline u protein na mjesto određeno kodonom za neku drugu aminokiselinu.

Navedeni proces može rezultirati gubitkom strukture i funkcije proteina (Moghal, 2014). Osim ugradnje aminokiseline koja nije u skladu s genetskim kodom, može doći i do ugradnje neproteinogenih (proteomimetičkih) aminokiselina koje su strukturni analozi proteinogenih aminokiselina i u pravilu se ne bi trebale nalaziti u građi proteina. Neproteinogene aminokiseline u stanici natječu se s proteinogenim aminokiselinama za reakciju aminoacilacije tRNA. Aminoacil-tRNA-sintetaze nisu nužno dovoljno efikasne u diskriminaciji nekih neproteinogenih aminokiselina koje su slične po strukturi, obliku i naboju proteinogenim aminokiselinama te ih prebacuju na tRNA (Rodgers, 2014). Ugradnja neproteinogenih aminokiselina u proteine spriječava se istim mehanizmima kao i ugradnja nepripadnih proteinogenih aminokiselina. Međutim u vrlo malom broju slučaja, unatoč svim mehanizmima spriječavanja ugradnje neproteinogene aminokiseline u protein, ipak može doći do njihove ugradnje (Moghal, 2014). Ugradnja neproteinogenih aminokiselina je nasumičan proces i iako ne postoje ciljni proteini u koje se one ugrađuju, proteini skloni agregaciji ili „intrinzično neuređeni proteini“ poput α-sinukleina i proteina tau bi mogli biti podložniji efektu mistranslacije (Rodgers, 2014). Opseg kojim zamjena aminokiseline mistranslacijom destabilizira strukturu proteina ovisi, između ostalog, o vrsti aminokiseline zamjene i o lokaciji zamjenjene aminokiseline u nativnoj strukturi proteina; unutrašnja ili izložena otapalu (Ozawa, 2005).

Osim primarne strukture proteina i njegova okolina može utjecati na proces smatanja. „Okolišni“ faktori unutar stanice koji bi mogli uzrokovati pogrešno smatanje proteina uključuju promjene u koncentracijama metalnih iona, patoloških šaperona i pH vrijednosti, izloženost oksidativnom stresu, nagomilavanje makromolekula i povećana koncentracija pogrešno smotanih proteina (Soto, 2003).

3.2. Stanični odgovor na pogrešno smotane proteine

Stanice imaju nekoliko načina kojima se nose s problemom pogrešnog smatanja proteina. Za početak stanica konstitutivno eksprimira molekulske šaperone koji pomažu proteinima da se pravilno smotaju ili, ako dođe do pogrešnog smatanja, sudjeluju u induciranom odgovoru na akumulaciju nedovoljno/pogrešno smotanih proteina kojim se nastoji povratiti nativna konformacija proteina. Stanični odgovor na nedovoljno/pogrešno smotane proteine u endoplazmatskom retikulumu naziva se odgovor na nesmotane proteine

(UPR, engl. *unfolded protein response*), dok se u jezgri i citosolu naziva odgovor na toplinski šok (HSR, engl. *heat shock response*) (Valastyan, 2014). Molekulski šaperoni i njihovi regulatori su zaduženi za održavanje proteostaze, homeostaze proteoma, tako što sudjeluju u inicijalnom smatanju proteina kao i u ponovnom smatanju pogrešno smotanih proteina (Hartl, 2011). Dio su odgovora na nedovoljno/pogrešno smotane proteine u endoplazmatskom retikulumu – UPR. Endoplazmatski retikulum je u stanici zadužen za sintezu, smatanje, modifikaciju i provjeru kvalitete membranskih i sekretornih proteina. Proces smatanja proteina u endoplazmatskom retikulumu je vrlo osjetljiv na promjene u homeostazi tog organela kao što su smanjena koncentracija Ca^{2+}, oksidativni stres, hipoksija, nedostatak energije, promijenjena glikozilacija, upala te povećana sinteza proteina, ekspresija pogrešno smotanih proteina ili prisutnost slobodnih proteinskih podjedinica. Akumulacija nedovoljno/pogrešno smotanih proteina u endoplazmatskom retikulumu aktivira UPR koji rezultira povećanjem kapaciteta za smatanje proteina u endoplazmatskom retikulumu, smanjenom globalnom sintezom proteina i pojačanom degradacijom pogrešno smotanih proteina (Syan Cao, 2012). Za proteine citosola i jezgre postoji sličan signalni put – odgovor na toplinski šok (HSR). HSR je organizirani genetički odgovor na široki spektar okolišnih i fizioloških stresora koji rezultira trenutnom indukcijom gena koji kodiraju molekulske šaperone, proteaze i druge proteine nužne za zaštitu i popravak staničnih oštećenja povezanih s pojavom pogrešno smotanih proteina (Westerheide, 2005). Navedeni stanični odgovori, UPR i HSR, aktivni su u slučaju kada je mogući popravak pogrešno smotanih proteina u smislu da oni ponovno mogu poprimiti nativnu konformaciju, međutim kada se ustanovi da to više nije moguće aktiviraju se drugi sustavi zaduženi za razgradnju pogrešno smotanih proteina (Valastyan, 2014). Krajnje pogrešno smotani proteini u endoplazmatskom retikulumu uklanjaju se iz sustava za smatanje proteina i prenose u citosol gdje se razgrađuju putevima koji se zajedno nazivaju ER – povezana razgradnja (ERAD, engl. *Endoplasmic reticulum - associated degradation*) (Smith, 2011). U stanici postoje dva glavna puta koji kontroliraju katabolizam proteina, sustav ubikvitin – proteasom (UPS) i autofagija. Ubikvitin – proteasomski sustav je, između ostalog, zadužen za razgradnju pogrešno smotanih proteina te je dio ERAD puteva. Pogrešno smotani proteini u citosolu se ubikvitiniraju i time postaju supstrati za 26S proteasom koji razgrađuje proteine na male peptide. Ubikvitinirani, pogrešno

smotani proteini se mogu razgraditi i procesom autofagije u kojem se oni unose u lizosome za razgradnju proteazama (Nedelsky, 2008).

3.3. Posljedice pogrešnog smatanja proteina

Pogrešno smatanje proteina se danas povezuje sa stotinama bolesti (Valastyan, 2014). Bolesti povezane s pogrešnim smatanjem proteina (engl. *protein conformational diseases*) obuhvaćaju grupu oboljenja u kojima je ključni događaj pogrešno smatanje i agregacija proteina te akumulacija agregata u tkivu. U tu grupu pripadaju najučestaliji oblici neurodegenerativnih oboljenja kao i neki rijetki nasljeđeni poremećaji (Soto, 2003). Razlozi zbog kojih pogrešno smatanje proteina dovodi do bolesti su višestruki. Kada protein ne uspije poprimiti nativnu konformaciju, nakon sinteze ili kasnije tokom njegovog života u stanici, on više ne može izvršavati svoju biološku funkciju. Kod primjerice nasljeđenih mutacija u proteinu, koje uzrokuju pogrešno smatanje proteina, u stanici nema aktivnog oblika tog proteina, odnosno takav protein ne izvršava svoju funkciju što dovodi do bolesti jer stanica nije sposobna izvršavati određenu radnju u nedostatku aktivnosti tog proteina (Hartl, 2010). Drugi način na koji pogrešno smatanje proteina može dovesti do nastanka bolesti zbog gubitka funkcije proteina je putem dominantno – negativnog mehanizma koji rezultira time da mutantni, pogrešno smotani protein djeluje kao antagonist funkcije divljeg tipa tog istog proteina. Pri tome dolazi do gubitka funkcije navedenog proteina čak i u heterozigota. (Valastyan, 2014). Mnogi proteini koji se sintetiziraju u citosolu, a imaju funkciju u nekom organelu trebaju se transportirati u taj organel. Kako bi se pravilno transportirali, većina proteina za to treba pravilnu konformaciju stoga njihovo pogrešno smatanje može dovesti do pogrešne lokalizacije proteina u stanici. Na taj način pogrešno smatanje proteina može uzrokovati bolest na dva načina: gubitkom funkcije proteina na njegovoj pripadnoj lokalizaciji unutar stanice ili dobitkom nove funkcije, potencijalno toksične, ako se protein akumulira na nepripadnoj lokaciji u stanici (Valastyan, 2014). Osim krive lokalizacije, toksičnost pogrešno smotanih proteina može biti rezultat samog produkta pogrešnog smatanja, odnosno promjene konformacije proteina koja dovodi do nastanka dominantnog fenotipa tako što nova konformacija proteina nosi toksična svojstva (Valastyan, 2014). Pogrešnim smatanjem protein poprima stabilnu, alternativnu, odnosno ne-nativnu konformaciju koja u većini slučajeva rezultira agregacijom proteina i akumulacijom agregata

u tkivu (Soto, 2003). Za agregate se pretpostavlja da su toksični za stanicu jer interferiraju s nizom staničnih funkcija (Hartl, 2010). Akumulaciju nefunkcionalnih pogrešno smotanih proteina sprječavaju stanični sustavi za degradaciju proteina, poput ERAD-a ili autofagija, međutim ako dođe do njihove pretjerane aktivacije pogrešno smotanim proteinima oni mogu razgrađivati mistranslatirane proteine koji nisu u potpunosti nefunkcionalni i na taj način dovesti do razvoja bolesti (Valastyan, 2014).

4. ULOGA POGREŠNO SMOTANIH PROTEINA U RAZVOJU NEURODEGENERATIVNIH BOLESTI

4.1. Neurodegenerativne bolesti

Neurodegenerativne bolesti su bolesti koje primarno zahvaćaju živčane stanice, neurone, unutar centralnog živčanog sustava ljudi. Do danas niti jedna neurodegenerativna bolest nije izlječiva i sve rezultiraju progresivnom degeneracijom i/ili smrću neurona. Također mogu utjecati na apstraktno razmišljanje, voljne pokrete, emocije, spoznavanje, pamćenje i sl. (Mulligan, 2013). U neurodegenerativna oboljenja pripadaju Alzheimerova bolest (AD), Parkinsonova bolest (PD), Huntingtonova bolest (HD), transmitivna spongioformna encefalopatija (TSE) i amiotrofična lateralna skleroza (ALS). Uzroci za različita neurodegenerativna oboljenja su raznoliki: do nastanka AD većinom dolazi zbog neurotoksičnih procesa prisutnih u svih ljudi ili je rezultat nasljeđenih mutacija, PD se pojavljuje sporadično (uzrok je nepoznat), međutim pokazuje korelaciju s određenim životnim faktorima rizika poput trauma glave i izloženost određenim toksinima. 5-10 % AD i PD slučajeva pokazuju nasljedni karakter. Kod ALS-a, kao i kod AD i PD, u oko 10% slučajeva radi se o nasljednom obliku (fALS, engl. *familial amyotrophic lateral sclerosis*) dok je ostalih 90% slučajeva nepoznatog porijekla odnosno sporadično (sALS, engl. *sporadic ALS*) (Mulligan, 2013). Svi slučajevi HD pokazuju nasljedni karakter, dok TSE može biti nasljedna, sporadična ili stečena izlaganjem infektivnom agensu, proteinu prionu (PrP) (Mulligan, 2013). Unatoč različitim kliničkim neurološkim simptomima i napredovanju bolesti, sva navedena oboljenja dijele neke zajedničke karakteristike: većina mogu imati i nasljedni i sporadični izvor, pojavljuju se kasnije u životu i njihovu patologiju karakterizira gubitak neurona i abnormalnost sinapsi (Soto, 2011). Jedna nedavno uočena zajednička karakteristika svih neurodegenerativnih oboljenja, za koju se prepostavlja da je zajednički molekularni mehanizam patologije, je akumulacija pogrešno smotanih proteina u agregate unutar ili izvan neurona ili glija stanica koje grade centralni živčani sustav (Polymenidou, 2011). To također daje zajednički molekularni mehanizam za različite bolesti koje mogu biti nasljeđene, sporadične ili uzrokovane infekcijom (Mulligan, 2013). Kod sporadičnih neurodegenerativnih oboljenja kao što su klasična Creutzfeldt-Jakobova bolest (cCJD, engl.

classical Creutzfeldt - Jakob disease) koja je jedan od oblika TSE, te većina slučajeva AD i ALS, smatra se da ili stohastički procesi niske vjerojatnosti mogu uzrokovati nastanak kritične jezgre za agregaciju proteina tijekom duljeg perioda ili da stalno prisutno polagano odlaganje agregata može rezultirati akumulacijom dovoljne količine materijala da dođe do neurotoksičnosti tijekom duljeg vremenskog razdoblja ciljano u živčanim stanicama s obzirom da se one ne dijele. S druge strane neurodegenerativna oboljenja koja su rezultat nasljeđivanja, naprimjer fTSE, HD, 5-10% AD, PD i ALS slučajeva, općenito uključuju genetičke mutacije koje potiču agregaciju proteinskog produkta mutiranog gena (Mulligan, 2013). Postoje indikacije da aminoacil-tRNA-sintetaze mogu sudjelovati u etiologiji raznih bolesti među kojima su i neurodegenerativne bolesti (Park, 2008). Jedan od primjera, još uvijek predmet istraživanja, je lizil-tRNA-sintetaza koja stvara interakcije s mutantnim proteinom SOD1, ali ne i s divljim tipom. Pokušava se ustanoviti da li oligomerizacija i agregacija mutantnog SOD1 s lizil-tRNA-sintetazom doprinosi inhibiciji normalne aktivnosti lizil-tRNA-sintetaze. Kada bi se to pokazalo točnim, neurološke degeneracije u pacijenata oboljelih od fALS-a, za koje je dokazano da sadrže mutantni SOD1, bi za uzrok mogle imati i defekt u procesu sinteze proteina (Park, 2008). Osim navedenih uzroka agregacija, danas se razmatra i istražuje mogućnost da ugradnja neproteinogenih aminokiselina u proteine može rezultirati neurodegenerativnim oboljenjima jer može dovoditi do nastanka proteinskih agregata. L-3,4-dihidroksifenilalanin (Levodopa, L-DOPA) je neproteinogena aminokiselina koja oponaša proteinogenu aminokiselinu L-tirozin, a koristi se za terapiju oboljelih od PD. Novija istraživanja pokazuju da su proteini koji sadrže L-DOPA citotoksični u uvjetima *in vitro* i da su sposobni uzrokovati sporu i progresivnu kroničnu toksičnost u uvjetima *in vivo*. Na temelju navedenih saznanja proizašla su pitanja da li možda L-DOPA ubrzava progresiju PD. Ugradnja L-DOPA u proteine dokazana je u stanicama bakterija i sisavaca. Eksperimentalno je utvrđeno da bakterijska fenil-tRNA-sintetaza te eukariotska citoplazmatska i mitohondrijska fenil-tRNA-sintetaza kataliziraju prijenos L-DOPA na $tRNA^{Phe}$ čime omogućuju njenu ugradnju u proteine na mjesto aminokiseline fenilalanin (Moor, 2011). L-DOPA se ponaša kao vrlo jaki adheziv i agens za povezivanje proteina i drugih polimera u koje je ugrađena te može uzrokovati nastanak proteinskih agregata u stanici jer spriječava njihovo uklanjanje proteolitičkom razgradnjom (Rodgers, 2014). β-*N*-metilamino-L-alanin (BMAA) je neproteinogena aminokiselina koju sintetiziraju

cijanobakterije roda Nostoc, a u ljudski organizam dospijeva putem hrane. Pretpostavljena ugradnja BMAA u proteine umjesto L-serina dovodi do nastanka proteinskih agregata u uvjetima *in vitro* te se ona povezuje s nastankom sALS-a (Dunlop, 2013). Još jedna od zajedničkih karakteristika neurodegenerativnih oboljenja je da u većini slučajeva nastupaju kasnije u životu (Mulligan, 2013). Eksperimenti na modelnim organizmima ukazuju na to da kako organizam stari tako opada i kapacitet stanica za provjeru kvalitete proteina, odnosno s godinama ljudsko tijelo gradacijski gubi sposobnost spriječavanja akumulacije pogrešno smotanih proteina. U određenom trenutku to može rezultirati katastrofalnim krahom homeostaze proteina i manifestacijom bolesti (Hartl, 2010).

Prve indikacije da su pogrešno smatanje proteina i agregacija povezani s neurodegenerativnim oboljenjima proizlazi iz neuropatoloških istraživanja na mrtvacima koji su za života bolovali od neke neurodegenerativne bolesti (Soto, 2003). Iako su glavne proteinske komponente agregata karakteristične za svaku neurodegenerativnu bolest, primjerice α-sinuklein u PD, huntington u HD ili Aβ-peptid u AD, nekoliko proteina se pogrešno smata i akumulira u više bolesti kao što je TDP-43 u ALS i frontotemporalnoj demenciji (FTLD). Suprotno, neurodegenerativne bolesti mogu biti povezane s više od jedne vrste akumuliranih proteina kao što je slučaj s Aβ-peptidom i proteinom tau kod AD (Polymenidou, 2011).

4.2. Proteinski agregati

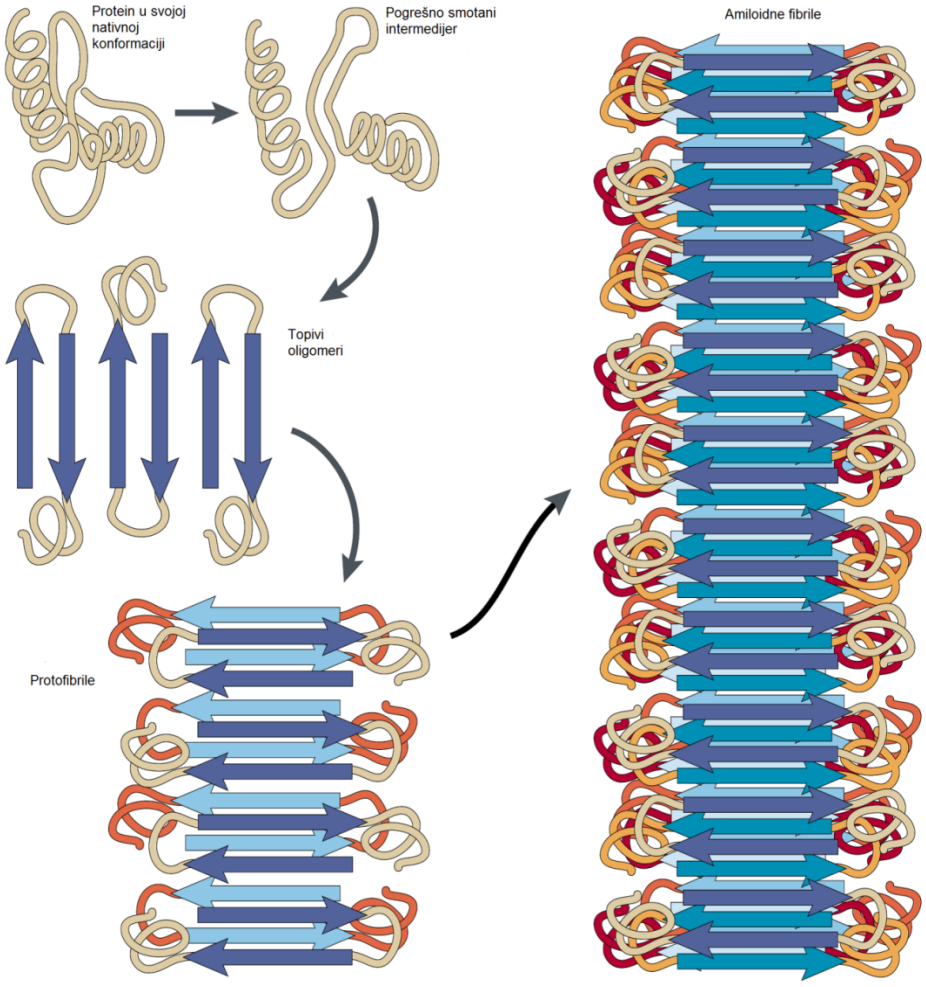
Smatra se da pogrešno smatanje proteina dovodi do površinskog izlaganja hidrofobnih aminokiselina koje su u nativnoj strukturi zakopane u unutrašnjost proteina te da su te aminokiseline uključene u interakcije između proteina koje ne postoje kada je protein pravilno smotan (Mulligan, 2013). Takav pogrešno smotani protein s hidrofobnim dijelovima izloženim vodenom okolišu ima visoku tendenciju da stvori agregat s drugim pogrešno smotanim proteinima kako bi stabilizirao svoju konformaciju (Soto, 2003). Agregacija proteina rezultira akumulacijom agregata unutar tkiva u obliku unutarstaničnih ili izvanstaničnih nakupina koje imaju neke slične morfološke i strukturne karakteristike kao i karakteristične interakcije koje ostvaruju s određenim bojama u svrhu njihove vizualizacije. No, smatra se da nakupine različitih proteina također mogu imati neka različita kemijska i

biološka svojstva koja ponajviše ovise o tome da li su nakupine unutar ili izvan stanice (Soto, 2003).

4.2.1. Amiloidni agregati

Unatoč različitim strukturama proteina i peptida koji stvaraju amiloidne agregate, u uvjetima *in vivo* ili *in vitro*, agregati imaju iste temeljne strukturne karakteristike i uređenu srž (Stefani, 2008). Amiloidni agregati pod transmisijskim elektronskim mikroskopom imaju izgled dugih, nerazgranatih niti promjera oko 5 do 10 nm (Mulligan, 2013). Orginalno pojam „amiloidni“ koristio se za izvanstanične proteinske nakupine kod osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti ili sistemskih amiloidnih oboljenja, međutim danas se taj naziv proširio i za neke unutarstanične agregate (Soto, 2003). Spektroskopskom metodom cirkularnog dikroizma otkriveno je da su pogrešno smotani proteini unutar amiloidnih agregata vrlo bogati β-pločama što je karakteristična sekundarna struktura koja se nalazi i u nativnim konformacijama proteina (Mulligan, 2013). Difrakcija X-zraka je potvrdila veliki udio β-struktura u amiloidnim agregatima pri čemu je uočena križna β-struktura koju karakteriziraju β-ploče koje se pružaju okomito na os nakupine (Stefani, 2008). Amiloidni agregati nastaju postupno (Slika 1.). Kada dođe do pogrešnog smatanja proteina takav protein je nestabilan u vodenom okolišu. Nestabilni, pogrešno smotani intermedijer je stabiliziran interakcijama s drugim molekulama pri čemu nastaju oligomeri bogati β-pločama. Nastali oligomeri služe kao jezgre nukleacije koje usmjeravaju daljnji rast agregata. Nakupine više takvih oligomera čine protofilament. Protofilamenti su fleksibilni, štapićasti i nerazgranati polimeri 3-6 nm široki i do 100 nm dugi. Kinetička istraživanja su pokazala da su protofilameti metastabilne intermedijerne strukture koje se produljuju sjedinjenjem manjih protofilamenata, a brzina produljenja ovisi o koncentraciji oligomera, temperaturi, ionskoj jakosti i pH vrijednosti okoliša. Protofilamenti su direktni prekursori amiloidnih agregata (Soto, 2003). Amiloidni agregat ima oblik filamenta, a čine ga dva ili više protofilamenta koji se obavijaju jedan oko drugog u strukturu nalik na uže (Stefani, 2008). Dosada nije poznato da li pogrešno smatanje proteina dovodi do agregacije ili oligomerizacija proteina dovodi do promjene konformacije proteina što onda rezultira agregacijom (Soto, 2003). U opisanom modelu nastanka amiloidnih agregata strukturna promjena nativne konformacije proteina dovodi do djelomično pogrešno smotanog proteina, međutim potpuno pogrešno smatanje ovisi o oligomerizaciji

djelomično pogrešno smotanih proteina (Soto, 2003). Amiloidne nakupine su netopljive u vodenom okolišu, a stabilizirane su međumolekulskim interakcijama između okosnica β-ploča proteina s dodatnom stabilizacijom hidrofobnim i elektrostatskim interakcijama bočnih lanaca aminokiselina. Susjedne podjednice unutar nakupine imaju potencijal da se pomiču jedna u odnosu na drugu što povećava vjerojatnost da visoka entropija lanca povezana s velikim brojem mogućih minimalnih promjena konformacija, koje potencijalno doprinose agregiranom stanju, ima ulogu u stabilizaciji amiloidne nakupine (Mulligan, 2013). Osim zajedničkih strukturnih svojstava, amiloidni agregati posjeduju karakteristična svojstva bojanja, vežu fluorescentne tioflavinske boje, kao i Kongo crvenu boju te su otporniji na proteolitičku razgradnju (Soto, 2003).



Slika 1. Shematski prikaz postupne agregacije pogrešno smotanih proteina u amiloidne agregate u obliku fibrilarnih niti (Soto, 2003).

4.2.2. Ne-amiloidni agregati

Nemaju svi proteinski agregati prethodno opisanu amiloidnu strukturu i navedena amiloidna svojstva agregata. Primjerice laki lanci imunoglobulina mogu stvarati amiloidne i ne-amiloidne agregate pri čemu se ne-amiloidni agregati ne bojaju Kongo crvenilom i imaju granularni izgled gledano pod elektronskim mikroskopom. Prije se općenito pretpostavljalo da u neurodegenerativnim oboljenjima agregacija proteina rezultira nastankom amiloidnih agregata. U slučaju amiloidne-lateralne skleroze (ALS) provedeni su eksperimenti u uvjetima *in vitro* u kojima se pokušalo potaknuti i pratiti pogrešno smatanje proteina za koje je još prije ustanovljeno da su pogrešno smotani u osoba oboljelih od ALS-a. Zbog navedene pretpostavke o agregatima prisutnih u neurodegenerativnim oboljenjima, pogrešno smatanje je potaknuto uvjetima koji potiču stvaranje amiloidnih agregata kao što su vibracije visokih frekvencija na hidrofobnoj teflonskoj podlozi. Međutim, kasnije se pokazalo da izlaganje proteina koji u uvjetima *in vivo* ne stvaraju amiloidne agregate sličnim uvjetima rezultira pogrešnim smatanjem proteina i formiranjem amiloidnih agregata. Takvi rezultati pobudili su sumnju da su *in vitro* modeli korišteni za istraživanje pogrešnog smatanja proteina u slučaj ALS-a dali rezultate temeljene na umjetnom fenomenu koji nije povezan s bolešću (Mulligan, 2013). Histološka analiza proteinskih agregata unutar motoričkih neurona osoba oboljelih od ALS-a pokazala je da se agregati ne bojaju Kongo crvenilom i Tioflavinom S. Navedeni rezultati su ukazali na ne-amiloidni karakter agregata osoba oboljelih od ALS-a (Mulligan, 2011). Daljnje analize ne-amilodinih agregata izoliranih iz pacijenata oboljelih od ALS-a otkrivaju granularni fibrilarni materijal i amorfni materijal unutar agregata (Mulligan, 2013). Glavna karakteristična ultrastruktura ne-amiloidnih nakupina je postojanje 15-20 nm debelog filamenta prekrivenog granulama (Kerman, 2010). Ne-amiloidni agregati se ne bojaju bojama karakterističnima za amiloidne agregate, primjerice Kongo crvenilom i Tioflavinom S (Kerman, 2010).

Analize amiloidnih agregata nuklearnom magnetskom rezonancijom pokazale su da oni uobičajeno sadrže polipeptide u izrazito ne-nativnim konformacijama koje su bogate β-pločama i stabilizirane interakcijama između skupina koje grade peptidnu okosnicu. Suprotno, primjerice, proces pogrešnog smatanja koji rezultira nastankom agregacijski kompetentnog proteina SOD1 u osoba oboljelih od ALS-a nema većeg utjecaja na nativnu

strukturu proteina, dapače, većina nativne strukture u djelomično pogrešno smotanom proteinu SOD1 je očuvana. Agregati proteina SOD1 izolirani iz tkiva osoba oboljelih od ALS-a ne pokazuju karakteristična bojanja i morfološka svojstva amiloidnih agregata. Navedene činjenice otvaraju mogućnost da zadržavanje strukture nalik nativnoj konformaciji razlikuje kaskadu pogrešnog smatanja i agregacije proteina u ne-amiloidnih bolesti poput ALS-a i one u amiloidnih bolesti (Mulligan, 2013).

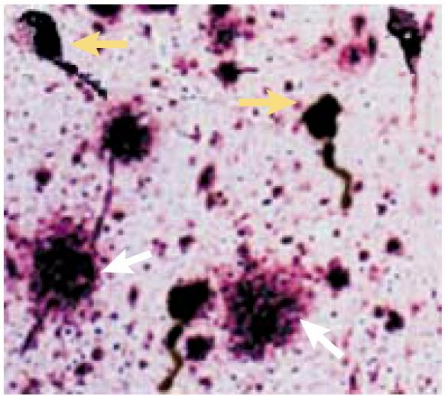
4.3. Proteinski agregati karakteristični za pojedina neurodegenerativna oboljenja

4.3.1. Alzheimerova bolest

Prije otprilike jednog stoljeća, Alois Alzheimer opisao je neuropatološka obilježja Alzheimerove bolesti u obliku neuritskih amiloidnih plakova i neurofibrilarnih klupka. Amiloidni plakovi se nakupljaju izvan stanica u parenhimu mozga i oko krvnih žila mozga, a njhova glavna komponenta je amiloidni – β protein (Aβ - peptid) duljine 40 ili 42 aminokiseline (Soto, 2003). Aβ-peptid nastaje procesiranjem transmembranskog proteina β-amiloid prekursor proteina (βAPP). Dulja varijanta Aβ-peptida (Aβ42) ima puno veću sklonost stvaranja agregata. Familijalni oblik AD uzrokovan je mutacijama u genima presenilin1, presenilin2 ili genu koji kodira βAPP. Mutacije u navedenim genima su vrlo rijetke, a uzroci puno češćeg sporadičnog oblika AD, koji se pojavljuje u kasnijoj životnoj dobi, su većim dijelom još uvijek nepoznati (Kumar, 2011). βAPP se sastoji od dvije velike α-uzvojnice koje se protežu kroz membranu pri čemu izvanstanična i citosolna domena imaju zasebne funkcije (Lehninger, 2008). Uvid u strukturu gena koji kodira βAPP, odnosno u raspored egzona i introna, otkrio je da Aβ–peptid nastaje iz dijelova dvaju egzona i da nastaje proteolitičkom razgradnjom βAPP (Mori, 1992) nakon koje odlazi u izvanstanične prostore, a nalazi se i u cerebrospinalnoj tekućini (Kumar, 2011). Aβ-peptid nastaje β-sekretornim putem. β-sekretaza cijepa βAPP na N-kraju Aβ domene što rezultira odvajanjem izvanstanične domene βAPP-a i nastankom C-terminalnog fragmenta (CTF-β) vezanog za membranu. Zatim γ-sekretaza cijepa unutarmembransku regiju CTF-β pri čemu nastaje Aβ-peptid. Alternativno βAPP može biti pocijepan α-sekretornim putem, tzv. ne-amiloidni put, unutar Aβ domene čime se onemogući nastanak Aβ peptida (Kumar, 2011). Najintezivnija istraživanja stvaranja agregata su provedena na Aβ amiloidnim plakovima. Pokazano je da u uvjetima *in vitro* Aβ peptidi stvaraju amiloidne fibrile koje su morfološki, imunološki,

spektroskopski, ultrastrukturno i po karakterističnom bojanju slični fibrilarnim agregatima izoliranim iz amiloidnih plakova osoba oboljelih od AD (Soto, 2003). Istraživanja koja su se provodila na fragmentima Aβ peptida kraćima od 42 aminokiseline i njihovim određenim mutantnim verzijama pokazala su da je unutrašnja hidrofobna regija između 17. i 21. aminokiseline u primarnoj strukturi proteina najbitnija za rane korake u pogrešnom smatanju i agregaciji ukazujući na to da je nastanak Aβ plakova djelomično upravljan hidrofobnim interakcijama (Soto, 2003). Struktura amilodnih plakova nastalih agregacijom Aβ peptida sastoji se od izdužene dvoslojne paralelne β-ploče. Neki čak mogu sadržavati strukuture u obliku lijevo orijentiranih β-zavojnica (Lehninger, 2008).

Neurofibrilarna klupka se nalaze u citoplazmi neurona gdje sadrže agregate hiperfosforiliranog proteina tau koji u svojoj nativnoj konformaciji služi za stabilizaciju mikrotubula (Soto, 2003). Iako je pokazano da većina pogrešno smotanih proteina koji tvore agregate imaju strukturu bogatu β-pločama, iznimka su agregati proteina tau koji su u obliku sparenih fibrila građenih većinom od α-uzvojnica (PHF, engl. *paired helical filaments*) (Soto, 2003). Količina proteina tau u mozgu osobe oboljele od AD je 4-8 puta veća od količine u mozgu zdrave osobe istih godina i taj porast u količini je u obliku hiperfosforiliranog proteina tau (Alonso, 2001). Za razliku od normalnog proteina tau koji sadrži 2-3 fosfatne skupine, hiperfosforilirani protein tau sadrži 5-9 mola fosfata po molu proteina. Smatra se da do agregacije proteina tau dolazi zbog interakcija između ponavljajućih mikrotubul-veznih domena i da je hiperfosforilacija uzrok agregacije u klupka jer neutralizira inhibitorni bazični naboj bočnih regija mikrotubul-veznih domena i omogućava nastajanje PHF struktura (Alonso, 2001). Nasljedne mutacije u genu koji kodira protein tau ne dovode do pojave AD, ali uzrokuju tzv. tauopatije u koje pripadaju frontotemporalna demencija i parkinsonizam koje su također razorne neurdegenerativne bolesti (Lehninger, 2008).



Slika 2. Izvanstanični amiloidni plakovi (bijele strelice) i unutarstanična neurofibrilarna klupka (žute strelice) u tkivu oboljelih od Alzheimerove bolesti (Soto, 2003).

4.3.2. Parkinsonova bolest

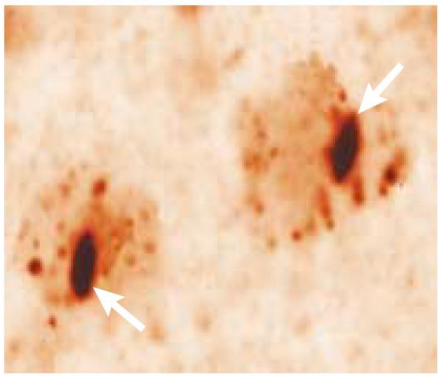
Pacijenti koji boluju od PD u citoplazmi neurona koji grade dio mozga tzv. *supstantia nigra* sadrže sferične, filamentozne proteinske agregate koji se nazivaju Lewy-jeva tjelešca (Lehninger, 2008). Glavna komponenta Lewy-jevih tjelešaca su fragmenti proteina α-sinukleina (Soto, 2003) koji se u svom nativnom obliku normalno nalazi u jezgri i sinapsama (Polymenidou, 2011). Dosadašnja istraživanja ukazuju na to da je fragment na N kraju proteina od 1. do 87. aminokiseline u primarnoj strukturi proteina ključan za agregaciju α-sinukleina. Taj fragment sadrži hidrofobni ne-amiloidni komponentni peptid (engl. *hydrophobic non-amyloid component peptide*) koji je prethodno dokazan unutar amiloidnih plakova kod AD i pokazano je da ima amiloidogenična svojstva (Soto, 2003).



Slika 3. Unutarstanična Lewy-eva tjelešca u tkivima oboljelih od Parkinsonove bolesti (Soto, 2003).

4.3.3. Huntingtonova bolest

Tipično obilježje osoba oboljelih od HD su nakupine proteina huntingtona obogaćenog s poliglutaminskim sljedovima u jezgrama neurona. Agregacija huntingtona povezuje se s nasljednom mutacijom ekspanzije CAG (kodon za glutamin) ponavljanja u HTT genu. Pokazano je da poliglutaminski slijed povećava unutrašnju sklonost proteina da agregira (Mulligan, 2013). Agregacija huntingtona u uvjetima *in vitro* ovisi o duljini poliglutaminskog slijeda (Soto, 2003). Glutamin ima polarni bočni lanac s amidnom skupinom koja može stvarati vodikove veze s molekulama vode. Navedeno svojstvo bočnog lanca glutamina vjerojatno ima utjecaj na proces smatanja proteina s poliglutaminskim slijedom pri čemu se taj slijed izlaže na površinu proteina i moguće stvara interakcije s izloženim poliglutaminskim slijedom drugog proteina ili više njih. Alternativni model koji objašnjava agregaciju proteina s poliglutaminskim slijedom temelji se na glutamin-ovisnim interakcijama između proteina tzv. polarni zatvarač (engl. *polar zipper*). U modelu polarnog zatvarača formiraju se β-ploče koje su stabilizirane kooperativnim vodikovim vezama koje uključuju amidnu skupinu bočnog lanca glutamina i amidnu skupinu peptidne okosnice (Soto, 2003).



Slika 4. Inkluzije u jezgrama neurona u tkivima oboljelih od Huntingtonove bolesti (Soto, 2003).

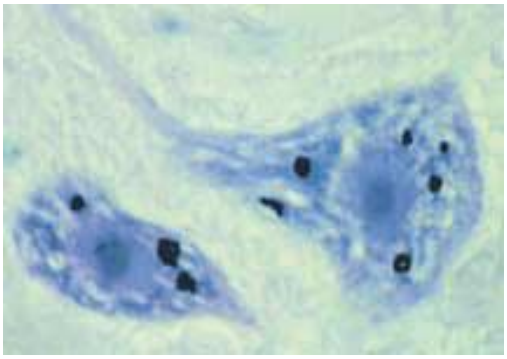
4.3.4. Amiotrofična lateralna skleroza

Do nedavno se smatralo da svi proteinski agregati povezani s neurodegenerativnim oboljenjima imaju amiloidnu strukturu. Već spomenuti eksperimenti u uvjetima *in vitro* (poglavlje 3.4.2.) na proteinima koji stvaraju agregate i elektronsko mikroskopiranje agregata iz tkiva pacijenata oboljelih od ALS-a su ukazali na ne-amiloidni karakter tih agregata

(Mulligan, 2013). Različite vrste ALS slučajeva sadrže proteinske agregate koji se razlikuju po svojim glavnim proteinskim komponentama: sALS uglavnom karakteriziraju agregati koji sadrže TAR – DNA vezujući protein 43 (TDP-43). S druge strane fALS uključuje agregaciju optineurina, RNA/DNA – vezujućeg proteina ili Cu, Zn superoksid dismutaze (SOD1) koja ima primarnu ulogu u obrambenom mehanizmu stanice protiv oksidativnih oštećenja (Mulligan, 2013; Polymenidou, 2011).

Protein SOD1 je građen od 153 aminokiseline i u svom nativnom stanju se nalazi kao vrlo stabilan dimer visoko otporan na proteolitičku razgradnju. Točkaste mutacije gena koji kodira SOD1, a koje su uočene kod osoba oboljelih od ALS-a, mogu se pojaviti na bilo kojem mjestu i dosada ih je poznato više od 165 vrsta (Mulligan, 2013). Mutacije dovode do djelomične destabilizacije strukture i konačno do akumulacije pogrešno smotanog SOD1 proteina (Polymenidou, 2011). Zanimljivo je da te mutacije imaju vrlo mali ili nikakav utjecaj na aktivnost SOD1 enzima. Danas se smatra da zajednički efekt ALS-povezanih mutacija uključuje povećanje sklonosti SOD1 da se pogrešno smota i agregira u citoplazmi motoričkih neurona (Mulligan, 2013). Dugo se tražio zajednički mehanizam kojim ALS-povezane mutacije proteina SOD1 promoviraju pogrešno smatanje i agregaciju. Pri fiziološkim uvjetima većina ALS-povezanih SOD1 mutanata poprima nativnu konformaciju skoro jednako kao i divlji tip proteina, a kristalografska istraživanja su pokazala da većina ALS-povezanih mutacija ne uzrokuje veće promjene u nativnoj strukturi SOD1. Na temelju toga zaključilo se da globalna destabilizacija proteina SOD1 ALS-povezanim mutacijama ne može objasniti ALS fenotip. (Mulligan, 2013). Hipoteza oksidativnog oštećenja nudi riješenje za pogrešno smatanje i agregaciju SOD1 mutanata koji su sami po sebi otporni na agregaciju. Protein SOD1 je u konstantnoj opasnosti od oksidativne štete pošto mu je funkcija u stanici uklanjanje superoksidnog aniona pri čemu nastaje kisik i vodikov peroksid, također slobodni radikal. Prema hipotezi oksidativnog oštećenja pogrešno smatanje proteina SOD1 koji sadrži ALS-povezanu mutaciju je potaknuto oksidativnim oštećenjem proteina SOD1. Iz navedenog proizlazi da zajedničko svojstvo ALS-povezanih mutacija nije poticanje pogrešnog smatanja i odmatanja proteina SOD1, već da one doprinose kompetentnosti proteina SOD1 da poprimi agregaciji sklonu, djelomično pogrešno smotanu konformaciju u uvjetima koji potiču denaturaciju proteina i/ili kidanje kovalentnih veza. Suprotno, divlji tip proteina SOD1 u navedenim uvjetima ne poprima agregacijski sklonu, djelomično pogrešno smotanu

konformaciju (Mulligan, 2013). Nedavna istraživanja mehanizama pogrešnog smatanja SOD1 kao rezultat oksidativne štete u uvjetima *in vitro* pokazala su da oksidativna šteta potiče ne-amiloidnu agregaciju koja je vrlo slična onoj u tkivima ALS-pacijenata i da analizirani SOD1 mutanti imaju veću sklonost pogrešnog smatanja i agregacije kao odgovor na oksidativni stres u usporedbi s proteinom divljeg tipa (Mulligan, 2013).



Slika 5. Unutarstanični agregati proteina SOD1 u tkivu oboljelih od amiotrofične lateralne skleroze (Soto, 2003).

Glavna komponenta citoplazmatskih proteinskih agregata u sALS je TDP-43 koji se također može pojaviti i u proteinskim agregatima u slučajevima fALS. U oba slučaja dolazi do smanjenja njegove količine u jezgri gdje obavlja svoju funkciju (Polymenidou, 2011). Do sada je identificirano 30 različitih mutacija u genu koji kodira TDP-43 (TARDBP) u pacijenata oboljelih od sALS ili fALS. TDP-43 sadrži dva RNA-vezna motiva i većinom nestrukturiranu C-terminalnu domenu. Ta domena obuhvaća od 277. do 414. aminokiseline u primarnoj strukturi proteina (Sun, 2011) i sadrži glutamin/asparagin bogatu (Q/N - bogatu) domenu koja dijeli sličnosti sa strukturom kvaščevih priona za koje je dokazana samo-agregacija. Za citoplazmatske agregate izolirane iz pacijenata oboljelih od sALS-a ustanovljeno je da se uglavnom sastoje od C-terminalnog fragmenta (CTF) stoga je C-terminalna domena nužna za agregaciju TDP-43 i mutanti TDP-43 koji sadrže samo TDP-CTF peptid pokazuju povećanu sklonost agregaciji u uvjetima *in vitro* i *in vivo*. Također C-terminalna domena unutar TDP-43 agregata je otpornija na djelovanje proteaza, svojstvo slično patogenom proteinu prionu (PrP^{Sc}) (Polymenidou, 2011). Na temelju tih saznanja smatra se da do agregacije TDP-43 dolazi zbog prionskih svojstava C-terminalne domene i da ALS – povezane mutacije vrlo vjerojatno potiču proces agregacije u određenim, dosada

nepoznatim, uvjetima jer je u nekoliko slučajeva fALS-a također ustanovljena agregacija i pogrešna lokalizacija proteina TDP-43 (Polymenidou, 2011). TDP-43 se nalazi agregiran unutar stresnih granula koje nastaju uređenom agregacijom nekoliko različitih RNA-vezujćih proteina u kompleksu s RNA (Polymenidou, 2011).

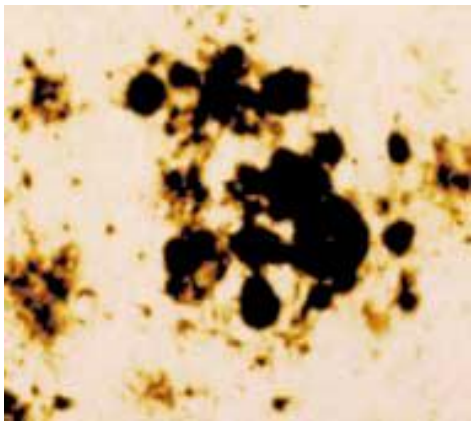
ALS-povezane mutacije otkrivene u genu koji kodira protein optineurin dovode do nastanaka citoplazmatskih agregata optineurina i poremećene lokalizacije u stanici. Optineurin sadrži 526 aminokiselina te je strukturno i funkcionalno povezan s već opisanim proteinom TDP-43 jer je i on RNA-vezujući protein (Polymenidou, 2011). U neuronima je lokaliziran u jezgri, ali se kasnije transportira u izbojke dendrita u ekscitacijskim post-sinapsama u kompleksu s RNA i drugim RNA-vezujućim proteinima (Sun, 2011). ALS-povezane mutacije se uglavnom nalaze u dijelu proteina koji sadrži signalnu sekvencu koja ga usmjerava u jezgru, NLS domeni (engl. *nuclear localization sequence*), koja obuhvaća regiju od 500. do 526. aminokiseline u primarnoj strukturi proteina (Sun, 2011) te u glicin-bogatoj domeni duljine oko 100 aminokiselina koja se nalazi unutar prvih 239 aminokiselina i nalikuje na domene proteina priona (Polymenidou, 2011). ALS-povezane mutacije u NLS domeni potiču akumulaciju i zadržavanje proteina optineurina u citoplazmi (Polymenidou, 2011) što je logično jer je promijenjen dio sekvence zadužen za usmjeravanje transporta iz citoplazme u jezgru. Povišena količina optineurina u citoplazmi neurona dovodi do njegove agregacije koja pak potiče njegovu ugradnju u tzv. stresne granule kao i u slučaju proteina TDP-43. Stresne granule se stvaraju u određenim stresnim uvjetima. S druge strane ALS-povezane mutacije u glicin-bogatoj domeni ne potiču njegovu lokalizaciju u citoplazmi niti integraciju u stresne granule, ali mogu imati direktan utjecaj na njegovu sklonost agregiranju (Polymenidou, 2011). Još uvijek se istražuje da li je patogeneza posredovana agregacijom TDP-43 i agregacijom optineurina unutar stresnih granula rezultat gubitka njihove funkcije u jezgri, nastankom toksičnih svojstava, njihovim sudjelovanjem u formiranju citoplazmatskih inkluzija ili, najvjerojatnije, kombinacija svega navedenog (Polymenidou, 2011).

Nastanak stresnih granula nije potaknuto samim proteinom TDP-43, odnosno optineurinom već jednim drugim RNA-vezujućim proteinom TIA1. TIA1 sadrži Q/N-bogatu domenu sličnu domenama proteina priona koja je odgovorna za nukleaciju i formiranje stresnih granula (Gilks, 2004). Smatra se da agregirani protein TIA1 zarobljava mRNA i

druge proteine među kojima su i TDP-43 i optineurin unutar citoplazmatskih stresnih granula pri čemu molekule mRNA služe kao kostur granule čime određuju uređenost agregiranja unutar same granule (Polymenidou, 2011). U zdravim stanicama, formiranje stresnih granula je dinamički regulirano i reverzibilno (Kedersha, 2000). Međutim konformacijske promjene TDP-43, odnosno proteina optineurina i njihova inače normalna agregacija unutar stresnih granula mogu dovesti do patogene i ireverzibilne agregacije u uvjetima kroničnog stresa i poremećajima u razgradnji stresnih granula (Polymenidou, 2011). Saznanje da stresne granule sudjeluju u nastanku patoloških inkluzija proteina TDP-43 i optineurina pronađenih u ALS pacijenata potvrđuje navedeno gledište (Polymenidou, 2011).

4.3.5. Transmitivna spongioformna encefalopatija

Transmitivna spongioformna encefalopatija ili prionska bolest se, kao što samo ime sugerira, može prenositi sa zaražene jedinke na zdravu jedinku unosom zaraznog materijala probavom ili internalizacijom (Polymenidou, 2011). U mozgu osobe oboljele od TSE karakteristična je akumulacija agregata proteina priona (PrP) koji je otporan na proteaze i njegovi agregati su često strukturno slični amiloidnim plakovima viđenim kod AD (Soto, 2003). Prioni su infektivni proteini koji mogu imati najmanje dvije različite konformacije koje se razlikuju po svojim fizikalnim svojstvima, a ponajviše u topljivosti. Animalni prioni imaju dvije različite konformacije, topivu PrP^{C} konformaciju bogatu α-uzvojnicama i netopivu PrP^{Sc} konformaciju bogatu β-pločama (Gilks, 2004). PrP^{Sc} potiče promjenu konformacije normalnog transmembranskog proteina PrP^{C} i njegovu ugradnju u neurotoksične oligomere i agregate (Polymenidou, 2011). Pretvorba PrP u oblik koji uzrokuje bolest može biti uzrokovana PrP mutacijama koje favoriziraju PrP^{Sc} konformaciju ili izlaganjem PrP drugog organizma koji se nalazi u PrP^{Sc} konformaciji (Mulligan, 2013). Većina PrP^{Sc} agregata nalazi se u izvanstaničnim prostorima (Polymenidou, 2011). Najvažniji segment za agregaciju PrP^{Sc} je hidrofobni fragment između 106. i 126. aminokiseline u primarnoj strukturi proteina (Soto, 2003) pa je prema tome agregacija najvjerojatnije upravljana hidrofobnim interakcijama kao kod AD.



Slika 6. Izvanstanični amiloidni plakovi proteina priona u osoba oboljelih od transmitivne spongioformne encefalopatije (Soto, 2003).

4.4. Fenomen priona (engl. *prion-like phenomena*)

Termin „nalik na prion“ koristi se za molekularne događaje koji dijele sličnosti s infektivnim ciklusom proteina priona sisavaca kojeg karakterizira sposobnost izazivanja konformacijske promjene proteina s kojim ostvaruje interakciju čime pridonosi širenju inicijacije i širenju proteinskih agregata. Ustanovljeno je da pogrešno smotani proteini koji se akumuliraju u neurodegenerativnim oboljenjima, primjerice Aβ-peptid u AD, α-sinuklein u PD i SOD1 u ALS, u interakciji s proteinom nativne konformacije izazivaju promjenu njegove konformacije koja rezultira nastankom agregata. Takav mehanizam nalikuje pretvorbi Prp^{C} u PrP^{Sc} uslijed interakcije s PrP^{Sc} nakon koje slijedi agregacija PrP^{Sc} (Polymenidou, 2011). U slučaju AD pokazano je da se nastajanje Aβ agregata može inducirati u transgeničnom mišu koji sadrži gen koji kodira humani βAPP intracerebralnom infuzijom razrjeđenih ekstrakata neokorteksa ljudi oboljelih od AD (Kane, 2000). Sličan pristup se primjenio i za protein tau. Uzgojene su linije transgeničnih miševa koje eksprimiraju divlji tip i linije koje eksprimiraju mutantni protein tau. Injekcijom ekstrakta mozga miševa koji su eksprimirali mutantni protein tau u mozak miševa koji su eksprimirali divlji tip proteina tau inducirala se agregacija divljeg tipa u filamente. Došlo je i do širenja agregacije na mjesta u koja ekstrakt nije bio injektiran, ali su ta mjesta anatomski povezana s mjestom injekcije i međusobno, što ukazuje da je širenje agregata proteina tau aktivno inducirano, a ne rezultat pasivne difuzije. (Clavaguera, 2009). Iako zasada nema eksperimentalnih dokaza da proteini koji sadrže poliglutaminske sljedove, poput huntingtona u HD, mogu inicirati širenje

agregacije u životinjama (Polymenidou, 2011), pokazano je da to mogu napraviti u kulturi stanica (Ren, 2009). Takvo ponašanje u kulturi stanica također je ustanovljeno za protein tau i α-sinuklein (Polymenidou, 2011). Osim toga, nedavno se pokazalo da fibrilarne strukture dobivene od potpunog ili kraćeg rekombinantnog α–sinukleina mogu ući u primarne neurone, najvjerojatnije adsorptivnom endocitozom, i promovirati ugradnju endogenog α–sinukleina u netopljiva Lewy-eva tjelešca, agregate karakteristične u PD (Volpicelli-Daley, 2011). Za agregate koji sadrže SOD1 i TDP-43 pokazano je da u uvjetima *in vitro* mogu potaknuti pogrešno smatanje velike količine divljeg tipa proteina nativne konformacije (Chia, 2010; Furukawa, 2011). Nadalje, u kulturi stanica pogrešno smotani SOD1 i TDP-43, dodani egzogeno ili eksprimirani unutar stanica, induciraju pogrešno smatanje i agregaciju nativnih oblika proteina SOD1 i TDP-43 (Furukawa, 2011; Grad, 2011). Još važnije otkriće je bilo da se inducirana agregacija endogenog SOD1 ne zaustavlja nakon uklanjanja pogrešno smotanih proteina SOD1 (Grad, 2011). To sugerira da već formirani agregati potiču pogrešno smatanje i agregaciju novosintetiziranih proteina SOD1 izvorno nativne konformacije (Polymenidou, 2011). Osim za PrP^{Sc}, trenutno nema niti jednog dokaza da se neki drugi inducirani agregati karakteristični za neurodegenerativna oboljenja mogu širiti između organizama i dovesti do stečenog oblika bolesti (Polymenidou, 2011). Zbog navedene razlike znanstvenik Aguzzi je predložio uvođenje pojma „prionoid“ kako bi se razlikovao fenomen priona ograničen na širenje bolesti unutar bolesnog organizma, a ne između organizama kao što je slučaj s PrP (Aguzzi, 2009).

4.5. Mehanizmi neurodegeneracije

Tipične karakteristike neurodegenerativnih oboljenja su: selektivni gubitak neurona, promjene sinapsi i upale određenih dijelova živčanog sustava. Selektivni gubitak neurona se odvija procesom programirane stanične smrti ili apoptoze (Soto, 2003). Već se dugi niz godina razmatra poveznica između pogrešnog smatanja i agregacije proteina i programirane stanične smrti neurona, odnosno pojave neurodegenerativnih oboljenja općenito. Na temelju dosadašnjih istraživanja izneseno je nekoliko hipoteza kojima se ta poveznica nastoji objasniti.

Jedna od teorija se temelji na tome da pogrešnim smatanjem i agregacijom protein više ne može obavljati svoju biološku funkciju te da je neurodegeneracija posljedica gubitka te

funkcije. Kao podršku ove hipoteze navodio se protein SOD1 u slučaju ALS-a koji je u svom nativnom obliku zadužen za pretvorbu toksičnih superoksidnih aniona u vodikov peroksid i kisik. Smatralo se da bi pogrešno smatanje i agregacija SOD1 mogla dovesti do akumulacije superoksidnih radikala koji bi oksidativnim oštećenjima biološki važnih makromolekula doveli do programirane stanične smrti. Međutim, istraživanja u kojima su se napravile linije miševa s deletiranim genom koji kodira SOD1 nisu potvrdili hipotezu jer u miševima nije bilo znakova neurodegeneracije dok je nadekspresija mutantnih varijanti SOD1 dovela do neurodegeneracije unatoč nepromjenjenoj ili povećanoj razini aktivnosti proteina SOD1. Slične pretpostavke su iznesene i za druge proteine uključene u patogenezu neurodegenerativnih oboljenja, npr. huntington za kojeg je u uvjetima *in vitro* pokazano da ima anti-apoptotsku aktivnost i PrP^C koji štiti neurone od Bax-inducirane apoptoze interakcijom s Bcl2, anti-apoptotskim faktorom. Za βAPP i α-sinuklein ustanovila se anti-apoptotska aktivnost slična onoj kod PrP^C. Istraživanja na miševima koji imaju deletirane gene koji kodiraju navedene proteine dala su dvojne rezultate, u nekima nije bilo značajnih abnormalnosti dok su u drugima zabilježena oštećenja funkcije neurona (Soto, 2003).

Druga hipoteza je da proteinski agregati djeluju kao iritanti i uzrokuju kroničnu upalnu reakciju koja dovodi do promjena sinapsi i programirane stanične smrti neurona. Dokazi koji podržavaju ovu hipotezu su: dalekosežna astrocitoza i aktivacija mikroglija stanica s najvećim intenzitetom u blizini proteinskih agregata, akumulacija proteina upalnog procesa unutar cerebralnih proteinskih agregata u koji su uključeni proteini komplementa, inhibitori komplementa, citokini upalnog procesa, proteaze i inhibitori proteaza, zatim povišena razina proteina upalnog procesa poput citokina, kemokina i faktora rasta u mozgu. Dokazano je da pogrešno smotani i agregirani proteini u uvjetima *in vitro* mogu inducirati mikroglija stanice i astrocite da sintetiziraju i oslobađaju proteine upalnog procesa. Jedan dio znanstvenika zastupa ideju da upalni proces izazvan pogrešnim smatanjem i agregacijom proteina zapravo ima pozitivan efekt. Primjerice kada se u laboratorijsku životinju koja je imala amiloidne plakove u mozgu injekcijom unio Aβ peptid koji je aktivirao imunološki sustav došlo je do smanjenja samih amiloidnih plakova. Međutim kada se taj pristup eksperimentalno primjenio kao tretman u lječenju osoba oboljelih od AD, nekoliko slučajeva je rezultiralo meningoencefalitisom i povišenom razinom bijelih krvnih stanica u cerebrospinalnoj tekućini što ukazuje da je došlo do centralnog upalnog procesa. Imajući sve u vidu, smatra se da je

upalni proces kao posljedica pogrešnog smatanja i agregacije proteina dvosjekli mač u slučaju neurodegenerativnih oboljenja jer istovremeno ima i pozitivne i negativne efekte (Soto, 2003).

Najprihvaćenija hipoteza koja objašnjava neurodgeneraciju u neurodegenerativnih bolesti je hipoteza toksičnosti. Prema toj hipotezi pogrešno smatanje i agregacija proteina rezultira time da pogrešno smotani i agregirani proteini imaju toksičan učinak na neurone (Soto, 2003). Čini se kako je stjecanje toksičnih svojstava pogrešnim smatanjem proteina uključenih u patogenezu neurodegenerativnih bolesti zajedničko svim neurodegenerativnim oboljenjima (Mulligan, 2013). Široko prihvaćeno stajalište je da nastali agregati imaju vrlo važnu ulogu u nastanku neurodegenerativnih bolesti i njihovoj daljnjoj progresiji (Polymenidou, 2011). Dokazano je da je oligomerizacija interakcijama između β-ploča proteina koji nisu uključeni u bolesti citotoksična. To ukazuje na mogućnost da je stjecanje toksičnosti neodovojivo od pogrešnog smatanja i agregacije proteina (Soto, 2003). Samoorganizacija pogrešno smotanih proteina dovodi do nastanka nenormalnih topivih oligomera i netopivih agregata, pri čemu je jedan ili više intermedijera u agregacijskoj kaskadi odgovorno za neurotoksičnost (Mulligan, 2013), ali najvjerojatnije različitim mehanizmima (Soto, 2003). Tako se za oligomerne strukture pretpostavlja da induciraju signalni put koji rezultira apoptozom, a da agregati zauzimaju prostore u tkivima i kidaju veze između neurona (Soto, 2003). Također se pretpostavlja da mehanizam toksičnosti agregata ovisi o tome da li se oni nalaze unutar ili izvan stanice. Izvanstanični agregati bi interakcijom s određenim receptorima mogli aktivirati signalni put koji dovodi do apoptoze, a unutarstanični najvjerojatnije zarobljavaju stanične komponente esencijalne za život stanice (Soto, 2003). Osim navedenog prepostavljaju se i neki drugi mehanizmi stjecanja toksičnih svojstava, najvjerojatnije putem povećane hidrofobnosti, stvaranjem slobodnih radikala, inhibicijom ubikvitin-proteasom sustava i drugih sustava zaduženih za degradaciju proteina (Illieva, 2009), oštećenjem stanične membrane i membrana organela, koagregacijom sa signalnim ili transkripcijskim faktorima pri čemu dolazi do gubitka funkcija ostalih staničnih komponenti ili ometanjem funkcije mitohondrija (Mulligan, 2013). Primjerice za Aβ-peptid i PrP pretpostavljeni mehanizam neurotoksičnosti uključuje kidanje membrane i njenu depolarizaciju stvaranjem ionskih kanala što rezultira promjenama u ionskoj homeostazi i poremećaju prijenosa signala unutar stanice što dovodi do stanične smrti (Soto, 2003).

Moguće je da pogrešno smotani proteini imaju potencijal uzrokovati više različitih toksičnih efekata (Mulligan, 2013). Smatra se da topivi oligomeri u agregacijskoj kaskadi imaju veći kapacitet uzrokovati štetu u odnosu na relativno inertne i netopive agregate (Mulligan, 2013). Jedno alternativno gledište je da agregati, detektirani imunocitokemijski, ne predstavljaju toksičnu vrstu već su dio obrambenog odgovora stanice koji za cilj ima zaštitu od toksičnijih oligomernih struktura koje se dosada nisu uspjele detektirati većinom tehnika (Polymenidou, 2011). Međutim, koncept o statičnoj i ireverzibilnoj strukturi agregata počeo se mijenjati nakon što su rezultati novijih istraživanja pokazali da su proteinske komponente agregata, kao i ostali povezani proteini, u dinamičkoj ravnoteži s topivim varijantama istih proteina što još više otežava razumijevanje doprinosa raznih mehanizama u procesu neurodegeneracije (Soto, 2003).

4.6. Uzrok, posljedica ili epifenomen

Iako su cerebralni agregati prepoznati kao tipična karakteristika neurodegenerativnih bolesti prije nekoliko godina, neuropatološka istraživanja još uvijek nisu uspjela odrediti da li su oni direktno umješani u patogenezu neurodegenerativnih oboljenja. Kao argument koji se suprotstavlja primarnoj ulozi proteinskih agregata u neurodegeneraciji navodi se slaba korelacija između količine amiloidnih nakupina u mozgu i ozbiljnosti kliničkih simptoma. Nadalje, pojava različitih agregata u istoj bolesti i proteinski agregati u klinički zdravim osobama dodatno zbunjuju u pokušaju razotkrivanja neuropatološke poveznice između proteinskih agregata i neurodegenerativnih bolesti. Jedna od mogućih interpretacija je da proteinski agregati imaju različite uloge u različitim bolestima (Soto, 2003).

Dokazi koji ukazuju na to da pogrešno smatanje i agregacija proteina imaju uzročnu ulogu u razvoju neurodegenerativnih bolesti dobiveni su genetičkim istraživanjima. Mutacije u genima koji kodiraju proteinske komponente fibrilarnih agregata su genetički povezane s nasljednim oblicima svih neurodegenerativnih oboljenja. Nasljedni, familijarni oblici neurodegenerativnih bolesti obično ispoljavaju simptome puno ranije i puno su ozbiljniji od sporadičnih slučajeva. Osim navedenog, nasljedne oblike bolesti također karakterizira puno veća količina proteinskih agregata u odnosu na sporadični oblik (Hardy, 1998). Stvaranje transgeničnih životinja koje u svom genomu sadrže mutantne verzije gena koji kodiraju pogrešno smotane proteine povezane s određenim neurodegenerativnim bolestima pomoglo je

u dokazivanju doprinosa pogrešnog smatanja proteina u patogenezi. U nekoliko transgeničnih životinja u kojih je došlo do nastanka proteinskih agregata moglo se prepoznati nekoliko patoloških i kliničkih obilježja različitih neurodegenerativnih bolesti (Soto, 2003). Takvi rezultati ukazuju na neupitnu važnost procesa pogrešnog smatanja i agregacije u patologiji bolesti. Međutim, u nekim transgeničnim modelima životinja za AD i TSE, oštećenje mozga i klinički simptomi uočeni su iako nije bilo prisutnih proteinskih agregata (Moechars, 1999). Nadalje, neki životnjski i ljudski slučajevi TSE ne pokazuju prisutnost proteinskih agregata. Takvi rezultati pak ukazuju na to da su možda pogrešno smotani oligomerni oblici ili mali agregati koji se ne odlažu u tkivu uzrok neurodegenerativnih oboljenja (Soto, 2003). Još jedan od snažnih dokaza da pogrešno smatanje proteina ima ključnu ulogu u razvoju neurodegenerativnih bolesti ustanovljen je na temelju istraživanja prijenosa TSE i prirode zaraznog agensa u navedenoj bolesti. Činjenica da se kompletne patološke i kliničke karakteristike TSE mogu prenositi s jednog na drugi organizam samim prijenosom proteina PrP^{Sc} je dobra indikacija da je pogrešno smatanje proteina PrP najvjerojatnije uzrok nastanka TSE (Soto, 2003).

Iako većina rezultata dosadašnjih istraživanja ukazuju na to da je molekularni uzrok neurodegenerativnih oboljenja akumulacija pogrešno smotanih i agregiranih proteina, konačni dokaz ove, još uvijek, hipoteze bi bilo uspješno izlječenje bolesti u ljudi spriječavanjem nastanka agregata ili reverzijom konformacijskih i agragacijskih promjena proteina (Soto, 2003).

5. TERAPIJA

Unatoč impresivnom napretku u razumijevanju patogeneze neurodegenerativnih bolesti, nijedna od njih se još uvijek ne može uspješno liječiti (Soto, 2003). Trenutne tehnike liječenja koje se koriste usmjerene su na kompenzaciju gubitka neurona povišenjem količine odgovarajućeg neurotransmitera u centralnom živčanom sustavu bez direktnog usporavanja ili zaustavljanja neurodegeneracije (Mulligan, 2013). Primjer je neproteinogena aminokiselina L-DOPA koja se koristi za podizanje razine dopamina u pacijenata oboljelih od PD. Time se samo privremeno kompenzira gubitak dopaminergičkih neurona. Slično se koriste inhibitori acetilkolin-esteraze kako bi se smanjila razgradnja neurotransmitera acetilkolina, odnosno povećala njegova količina u pacijenata oboljelih od AD koju karakterizira gubitak acetilkolinergičkih neurona (Mulligan, 2013). Jedan dio lijekova u terapiji neurodegenerativnih bolesti cilja na usporavanje neurodegeneracije. Primjer su riluzol i memantin koji samo marginalno uspore napredovanje AD i ALS-a smanjenjem bazalne razine ekscitotoksičnosti glutamata u centralnom živčanom sustavu (Mulligan, 2013). Pošto navedeni lijekovi djeluju na svepristune posljedice neurodegenerativnih bolesti, a ne na fundamentalne mehanizme na kojima se zasniva razvoj bolesti, teško da će i određenim modifikacijama ti lijekovi u budućnosti moći u potpunosti zaustaviti napredak bolesti (Mulligan, 2013). Dakle potrebno je razviti lijekove koji bi ciljali na fundamentalne mehanizme odgovorne za sam nastanak neurodegenerativnih bolesti, a da bi se to moglo potrebno je detaljno razumijevanje tih mehanizama. Ako bi se ustanovilo da je pogrešno smatanje proteina i agregacija centralni događaj u patogenezi neurodegenerativnih bolesti, terapija usmjerena na uzrok bolesti bi trebala ciljati na pogrešno smatanje proteina (Soto, 2003). Predložena su četiri takva pristupa. U jednom pristupu bi se ciljalo na stabilizaciju nativne konformacije proteina primjerice tretmanom s kemijskim šaperonima ili proteinskim inžinjeringom kojim bi se sintetizirali proteini s modificiranim DNA slijedom koji bi povećao stabilnost proteina, smanjio tendenciju da se pogrešno smota i dao svojstvo da takav protein suprimira agregaciju divljeg tipa istog proteina (Villegas, 2000). Drugi pristup bi uključivao inhibiciju i reverziju konformacijskih promjena proteina korištenjem peptida za destabilizaciju β-ploča pogrešno smotanih proteina. Ti peptidi sadrže motiv koji prepoznaje određene dijelove proteina koji se pogrešno smataju i dizajnirani su tako da zaustave

pogrešno smatanje polipeptidnog lanca u strukture β-ploča (Soto, 2003). Idući pristup se temelji na kompetitivnoj inhibiciji interakcija između proteina. Moglo bi se dizajnirati dva razreda kompetitivnih inhibitora: inhibitori koji sprječavaju interakcije između pogrešno smotanih monomera ili inhibitori koji bi se vezali na rubove β-ploča agregata i spriječili njihov rast (Soto, 2003). Zadnji pristup se usredotočuje na uklanjanje pogrešno smotanih i agregiranih proteina. Taj pristup se temelji na imunizaciji oboljelog sintetičkim proteinima koji agregiraju u određenoj bolesti kako bi imunološki sustav oboljelog stvarao antitijela protiv agregata tih proteina. Pristup imunizacije je eksperimentalno proveden na transgeničnim životinjskim modelima te je pokazano da taj pristup dovodi do smanjenja veličine i broja amiloidnih plakova, smanjenja oštećenja mozga i popravaka ponašanja (Schenk, 1999).

6. ZAKLJUČAK

Istraživanja unazad 20ak godina pružila su dokaze o zajedničkom mehanizmu neurodegeneracije u kojem je kritični događaj pogrešno smatanje, agregacija i akumulacija proteina u centralnom živčanom sustavu. Svaka neurodegenerativna bolest je povezana s abnormalnostima u smatanju različite vrste proteina, ali molekularni putevi koji dovode do pogrešnog smatanja i agregacije te mehanizmi kojima ti procesi dovode do apoptoze neurona se čine sličnima. Ta saznanja pružaju mogućnost za zajedničku terapijsku strategiju liječenja neurodegenerativnih bolesti. Razvoj terapije utemeljene na konceptu pogrešnog smatanja i agregacije proteina kao uzroka bolesti bi također pokazala da je upravo promjena konformacije proteina ključni događaj u patologiji i pružila bi objašnjenje koji od pretpostavljenih puteva, koji povezuju pogrešno smatanje i agregaciju proteina s neurodegenerativnim bolestima, je točan. Zasada je u ovom području puno nepoznanica koje se daljnim radom trebaju rasvjetliti. Neka od ključnih pitanja su: zašto su pogrešno smotani proteini toksični za stanicu? Koja su svojstva pogrešno smotanih proteina općenita, a koja specifična za pojedinu bolest? Zašto sustav za kontrolu homeostaze proteina gubi svoju efikasnost starenjem organizma? Koja je točna uloga pogrešnog smatanja i agregacije proteina u razvoju neurodegenerativnih bolesti? I konačno kako se može spriječiti nastanak toksičnih agregata ili ukloniti već prisutne agregate?

7. POPIS LITERATURE

1. Aguzzi, A., Rajendran, L. (2009): The Transcellular Spread of Cytosolic Amyloids, Prions, and Prionoids, Neuron, 64: 783-790
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Peter, W., Wilson, J., Hunt, T. (2007): Molecular Biology of The Cell, 5th edition, Garland Science, Taylor and Francis Group, New York, 800
3. Alonso, A. C., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. (2001): Hyperphosphorylation induces self-assembly of τ into tangles of paired helical filaments/straight filaments, Proceedings of the National Academy of Science, 98, (12): 6923-6928
4. Chia, R., Tattum, M. H., Jones, S., Collinege, J., Fisher, E.M., Jackson, G. M. (2010): Superoxide Dismutase 1 and tgSOD1^{G93A} Mouse Spinal Cord Seed Fibrils, Suggesting a Propagative Cell Death Mechanism in Amyotrophic Lateral Sclerosis, Proceedings of the National Academy of Science ONE, 5, (5): e10627
5. Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R. A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A. K., Beibel, M., Staufenbiel, M., Jucker, M., Goedert, M., Tolnay, M. (2009): Transmission and spreading of thauopathy in transgenic mouse brain, Nature Cell Biology, 11, (7): 909-913
6. Cvetesic, N., Akmacic, I., Gruic-Sovulj, I. (2013): Lack of discrimination against non-proteinogenic aminoacid norvaline by elongation factor Tu from *Escherichia coli*, Croatica Chemica Acta, 86, 1: 73-82
7. Dunlop, R. A., Cox, P. A., Banack, S. A., Rodgers, K. J. (2013): The Non-Protein Amino Acid BMAA is Misincorporated into Human Proteins in Place of L-Serine Causing Protein Misfolding and Aggregation, Proceedings of the National Academy of Science ONE, 8, (9): 75376-75384
8. Furukawa, Y., Kaneko, K., Watanabe, S., Yamanaka, K., Nukina, N. (2011): A Seeding Reaction Recapitulates Intracellular Formation of Sarkosyl-insoluble Transactivation Response Element (TAR) DNA-binding-protein-43 Inclusions, The Journal of Biological Chemistry, 286: 18664-18672

9. Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L. M., Anderson, P. (2004): Stress Granule Assembly is Mediated by Prion-like Aggregation of TIA-1, Molecular Biology of Cell, 15: 5383-5398
10. Grad, L. I., Guest, W. C., Yanai, A., Pokrishevsky, E., O´Neil, M. A., Gibbs, E., Semenchenko, V., Yousefi, M., Wishart, D. S., Plotkin, S. S., Cashman, N. R. (2011): Intermolecular transmission of superoxid dismutase 1 misfolding in living cells, Proceedings of the National Academy of Science, 108: 16398-16403
11. Gyu Park, S., Schimmel, P., Kim, S. (2008): Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease, Proceedings of the National Academy of Science, 105, (32): 11043-11049
12. Hardy, J., Gwinn-Hardy, K. (1998): Genetic Classification of Primary Neurodegenerative Disease, Science, 282: 1075-1079
13. Hartl, U. F. (2010): Protein folding: mechanisms and role in disease, MPG
14. Hartl, U. F., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. (2011): Molecular chaperons in protein folding and proteostasis, Nature, 475: 324-332
15. Ilieva, H., Polymenidou, M., Cleveland, D. W. (2009): Non-cell Autonomous Toxicity in Neurodegenerative Disorders: ALS and beyond, The Journal of Cell Biology, 187: 761-772
16. Kane, M. D., Lipinski, W. J., Callahan, M. J., Bian, F., Durham, R. A., Schwarz, R. D., Roher, A. E., Walker, L. C. (2000): Evidence for Seeding of β-amyloid by Intracerebral Infusion of Alzheimer Brain Extracts in β-amyloid Precursor Protein - Transgenic Mice, The Journal of Neuroscience, 20, (10): 3606-3611
17. Kedersha, N., Cho, M. R., Li, W., Yacono, P. W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D. E., Anderson, P. (2000): Dynamic Shuttling of TIA-1 Accompanies the Recruitment of mRNA to Mammalian Stress Granules, The Journal of Cell Biology, 151: 1257-1268
18. Kerman, A., Liu, H., Croul, S., Bilbao, J., Rogaeva, E., Zinman, L., Robertson, J., Chakrabartty, A. (2010): Amyothropic lateral sclerosis is a non-amyloid disease in wich extensive misfolding of SOD1 in unique to the familial form, Acta Neuropathologica, 119: 335-344
19. Kumar, S., Walter, J. (2011): Phosphorylation of amyloid beta (Aβ) peptides – A trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer´s disease, AGING, 3, 8: 1-10

20. Lehninger, A. L., Nelson, D., Cox, M. M. (2008): Lehninger: Principles of biochemistry, 5th edition, W.H. Freeman and Company, New York

21. Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., Reverse, D., Baekelandt, V., Naidu, A., Tesseur, I., Spittaels, K., Van Den Haute, C., Checler, F., Godaux, E., Cordell, B., Van Leuven, F. (1999): Early Phenotypic Changes in Transgenic Mice That Overexpress Different Mutants of Amyloid Precursor Protein in Brain, Journal of Biological Chemistry, 274, (10): 6483-6492

22. Moghal, A., Mohler, K., Ibba, M. (2014): Mistranslation of the genetic code, FEBS Letters, 588: 4305-4310

23. Moor, N., Klipcan, L., Safro M. G. (2011): Bacterial and Eukaryotic Phenylalanyl-tRNA-Synthetases Catalyze Misaminoacylation of $tRNA^{Phe}$ with 3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanine, Chemistry and Biology, 18: 1221-1229

24. Mori, H., Takio, K., Ogawara, M., Selkoe, D. J. (1992): Mass Spectrometry of Purified Amyloid β Protein in Alzheimer´s Disease, The Journal of Biological Chemistry, 267, (24): 17082-17086

25. Mulligan, V. K., Chakrabartty, A. (2013): Protein misfolding in the late-onset neurodegenerative diseases: Common themes and the unique case of amyotrophic lateral sclerosis, Proteins: Structure, Function and Bioinformatics, 81: 1285-1303

26. Nedelsky, N. B., Todd, P. K., Taylor, J. P. (2008): Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: Collaborators in neuroprotection, Biochimica et Biophysica Acta, 1782: 691-699

27. Ozawa, K., Headlam, M. J., Mouradov, D., Watt, S. J., Beck, J. L., Rodgers, K. J., Dean, R. T., Huber, T., Otting, G., Dixon, N. E. (2005): Translational incorporation of L-3,4-dihydroxyphenylalanine into proteins, FEBS Journal, 272: 3162-3171

28. Polymenidou, M., Cleveland, D. W. (2011): The seeds of Neurodegeneration: Prion-like Spreading in ALS, Cell, 147: 498-508

29. Ren, P., Lauckner, J. E., Kachirskaia, I., Heuser, J. E., Melki, R., Kopito, R. R. (2009): Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates, Nature Cell Biology, 11, (2): 219-225

30. Rodgers, K. J. (2014): Non-protein amino acids and neurodegeneration: The enemy within, Experimental Neurology, 253: 192-196

31. Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandevert, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, G., Seubert, P. (1999): Immunization withamyloid-b attenuates Alzheimer disease-like pathology in the PDAPP mouse., Nature, 400: 173-177
32. Siyan Cao, S., Kaufman, R. J. (2012): Unfolded protein response, Current Biology, 22, (16): 622-626
33. Smith, M. H., Ploegh, H. L., Wissman, J. S. (2011): Road to Ruin: Targeting Proteins for Degradation in Endoplasmic Reticulum, Science, 334, (6059): 1086-1090
34. Soto, C. (2003): Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases, Nature Reviews | Neuroscience, 4: 49-60
35. Stefani, M. (2008): Protein Folding and Misfolding on Sufaces, International Journal of Molecular Science, 9: 2515-2542
36. Sun, Z., Diaz, Z., Fang, X., Hart, M. P., Chesi, A., Shorter, J., Gitler, A. D. (2011): Molecular Determinants and Genetic Modifiers of Aggregation and Toxicity for the ALS Disease Protein FUS/TLS, PLOS Biology, 9, (4): e1000614
37. Valastyan, J. S., Lindquist, S. (2014): Mechanisms of protein-folding diseases at a glance, Disease Models & Mechanisms, 7: 9-14
38. Villegas, V., Zurdo, J., Filimonov, V. V., Aviles, F. X., Dobson, C. M., Serrano, L. (2000): Protein engineering as a strategy to avoid formation of amyloid fibrils, protein Science, 9: 1700-1708
39. Volpicelli-Daley, L. A., Luk, K. C., Patel, T. P., Tanik, s. A., Riddle, D. M., Stieber, A., Meany, D. F., Trojanowski, J. Q., Lee, V . M.-Y. (2011): Exogenous α-Synuclein Fibrils Induce Lewy Body Pathology Leading to Synaptic Dysfunction and Neuron Death, Neuron, 72, (1): 57-71
40. Westerheide, S. D., Morimoto, R. I. (2005): Heat Shock Response Modulators as Therapeutic Tools for Diseases of Protein Conformation, The Journal of Biological Chemistry, 280, (39): 33097-33100
41. Wisniewski, T., Sadowski, M. (2008): Preventing β-amyloid fibrillization and deposition: β-sheet and pathological chaperone inhibitors, BMC Neuroscience, 9, (2): 55 -60
42. http://www.neurodegenerationresearch.eu/about/what/ (Pristupljeno 6. 4. 2016.)

8. SAŽETAK

Kako bi protein mogao izvršavati svoju biološku funkciju, on se mora pravilno smotati, odnosno zadobiti pravilnu trodimenzionalnu strukturu. Ako dođe do pogrešnog smatanja proteina kao posljedica može biti gubitak funkcije tog proteina, kriva lokalizacija unutar stanice, nepravilna razgradnja pogrešno smotanog proteina, promjena strukture kojom protein dobiva nova toksična svojstva i/ili akumulacija proteinskih agregata unutar ili izvan stanice. Mnoga patološka stanja kao izvor imaju problem pri smatanju proteina. Rezultati nedavnih istraživanja ukazuju da je mogući zajednički uzrok i patološki mehanizam različitih neurodegenerativnih bolesti pogrešno smatanje, agregacija i akumulacija proteina u mozgu koja rezultira apoptozom neurona.

Cilj ovog završnog rada bio je istražiti postojeća saznanja o molekularnim mehanizmima i uzrocima pogrešnog smatanja i agregacije proteina, stanični odgovor na pogrešno smatanje i agregaciju proteina, uloga pogrešnog smatanja i agregacije proteina u neurodegeneraciji i potencijalnih ciljnih meta za terapiju neurodegenerativnih bolesti. Neurodegenerativne bolesti su povezane s akumulacijom pogrešno smotanih proteina unutar i izvan neurona i glija stanica u centralnom živčanom sustavu. Postavljene su tri hipoteze koje nastoje objasniti povezanost pogrešnog smatanja i agregacije proteina s neurodegeneracijom: hipoteza gubitka funkcije, hipoteza toksičnosti i hipoteza upale mozga kao posljedice pogrešnog smatanja i agregacije proteina. Unatoč velikom napretku u razumijevanju patogeneze neurodegenerativnih bolesti, dosada niti jedna nije izlječiva.

9. SUMMARY

In order to fulfill their various biological roles, proteins must fold into precise three-dimensional structure. Failure to fold properly can either cause a loss of normal function, mislocalization, improper degradation, structural alterations that establish novel toxic functions and/or acumulation of protein aggregates inside or outside the cell. Many pathological conditions are fundamentally rooted in the protein folding problem. Recent evidence indicates that diverse neurodegenerative diseases for a common cause and pathological mechanism have misfolding, aggregation and acumulation of proteins in the brain resulting in neuronal apoptosis.

The aim of this report was to review the existing knowledge of the molecular mchanisms and causes of protein misfolding and aggregation, cell methods for combating this problem, its role in neurodegeneration and the potential targets for therapeutic intervention in neurodegenerative diseases. Neurodegenerative diseases are associated with the acumulation of misfolded proteins inside and outside of the neuronal and glial cells in the central nervous system. Three hypothesis have been proposed to explain how protein misfolding and aggregation might be associated with neurodegeneration: the loss-of function hypothesis, the gain-of toxic function hypothesis and the brain inflammation hypothesis. Despite impressive progress in understanding the pathogenesis of neurodegenerative diseases, none of this disorders can be successfully treated.