

Amiloidi i njihov utjecaj na Alzheimerovu bolest

Franjković, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:486133>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Karla Franjković

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

AMILOIDI I NJIHOV UTJECAJ NA ALZHEIMEROVU BOLEST

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za Biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2017.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

14. srpnja 2017.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

21. rujna 2017.

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	2
2.1. Promjene u stanici u razvitku Alzheimerove bolesti.....	2
2.1.1. Uloga APP-a.....	2
2.1.2. Hiperfosforilacija tau proteina	3
2.1.3. GSK3 β i CDK5 u Alzheimerovoj bolesti	4
2.2. β-amiloidi	4
2.2.1. Amiloidna hipoteza.....	5
2.2.2. Nastajanje oligomera i njihov utjecaj na sinaptičku disfunkciju	6
2.3. Trodimenzionalna struktura kratkih amiloidnih peptida.....	7
2.3.1. NMR čvrstih faza	9
2.4. Amiloidni fibrili.....	9
2.5. Alzheimerova bolest.....	12
2.5.1. Rizični faktori	12
2.5.2. Dijagnosticiranje Alzheimerove bolesti	13
2.5.3. Terapija Alzheimerove bolesti	13
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	15

§ Sažetak

Alzheimerova bolest (AD) najčešći je neurodegenerativni poremećaj povezan sa starenjem i karakteriziran je patološkim agregatima amiloidnog β -proteina ($A\beta$) i tau proteina. Na temelju genetskih dokaza, biokemijskih podataka i životinjskih modela, za $A\beta$ je predloženo da je odgovoran za patogenezu AD (amiloidna hipoteza). U ovom radu je opisana tendencija $A\beta$ molekula da stvaraju agregate u obliku oligomera, protofibrila i zrelih fibrila. Iako se zreli fibrili u završnoj fazi smatraju uzrokom patogeneze AD, nedavne studije koje koriste sintetske $A\beta$ peptide, detaljnu 3D strukturu opisanu NMR-om i rendgenskom kristalografijom, model stanične kulture, modele $A\beta$ prekursora transgeničnih miševa i ljudske uzorke kao što su cerebrospinalne tekućine i postmortalni mozgovi AD pacijenata, sugeriraju da su predfibrilarni oblici (oligomeri $A\beta$) štetniji nego vanstanični fibrilni oblici.

§ 1. UVOD

Neurodegenerativne bolesti smatraju se najzagonetnijim i najtežim problemom u biomedicini. Manifestiraju se progresivnim gubitkom strukture i funkcije neurona što rezultira njihovom smrću te su takve bolesti neizlječive.

Najpoznatija je Alzheimerova bolest koja najčešće pogađa stariju populaciju te se zbog duljeg životnog vijeka smatra kako će se broj oboljelih udvostručiti svakih dvadeset godina. Alzheimerova bolest ostaje veliki izazov za međunarodnu zajednicu usprkos više od jednog stoljeća istraživanja.

Smatra se da je molekularni temelj ove bolesti agregacija proteina. Do agregacije proteina dolazi zbog pogrešno smotanih proteina gdje specifični polipeptidni lanac gubi ili nije u mogućnosti postići svoju nativnu trodimenzijsku strukturu, zbog čega se stvaraju razna stanja različito smotanih, nesmotanih ili djelomično smotanih peptida. U tim nenativnim stanjima, protein je labavo pakiran i njegova hidrofobna jezgra postaje izložena okolini čime se pojačava sklonost nukleaciji inicijalnih oligomernih sklopova gdje se sadržaj sekundarne beta strukture uglavnom povećava. Ta učestalija pojava beta strukture rezultira ispreplitanjem beta niti s drugim beta bogatim proteinima i posljedično stvaranjem agregata.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Promjene u stanici u razvitku Alzheimerove bolesti

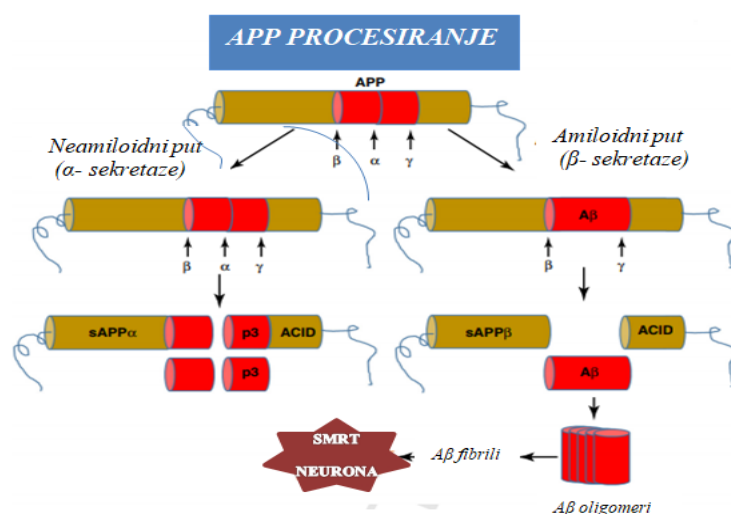
Događaji na razini stanice koji su uključeni u patogenezu i razvitak Alzheimerove bolesti uključuju razgradnju proteina prekursora amiloida (APP), formiranje β -amiloida, hiperfosforilaciju tau proteina te aktivaciju GSK3b i CDK5 u neuronima.

2.1.1. Uloga APP-a

Protein prekursor amiloida (APP) sastavni je dio membrane živčanih stanica. Enzimi (sekretaze α , β , γ) cijepaju APP i time nastaju manji proteinski fragmenti i β -amiloid ($A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$).

Amiloidna hipoteza govori o prisutnosti dva različita puta za cijepanje APP-a: "amiloidni" i "neamiloidni" put.

U neamiloidnom putu sudjeluju α -sekretaze, cijepanje se odvija u sredini $A\beta$ domene što uzrokuje stvaranje $sAPP\alpha$ (veliki topljivi protein koji se izlučuje izvanstanično) i C-terminalnog fragmenta C83; daljnje cijepanje vrši γ -sekretaza stvarajući P3 (peptid koji se sastoji od 24 ili 26 aminokiselina) i ACID domene. Ovi manji fragmenti se otpuštaju iz neurona. Cijepanje α -sekretazom je glavni put hidrolize APP-a koji je posredovan dezintegrinom i metaloproteinazom ADAM10 ili ADAM17.



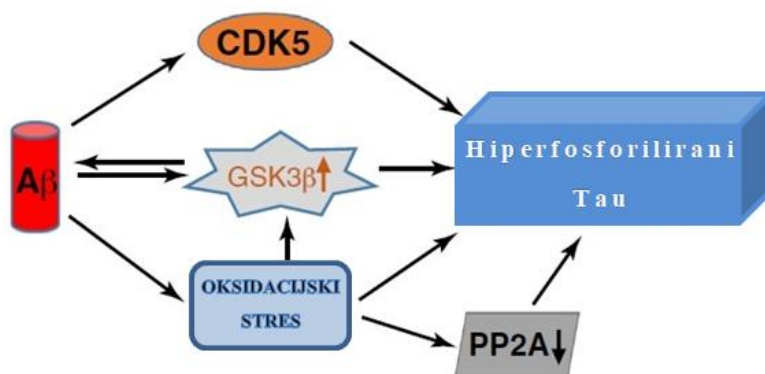
Slika 1: Amiloidni i neamiloidni put proteolize APP-a⁷

U amiloidnom putu cijepanje vrši β -sekretaza, a ono se javlja na početku $A\beta$ domene i nastaju sAPP β i C-terminalni fragment C99. Daljnje cijepanje C99 proizvodi $A\beta$ (39, 40, 42 i 43) i ACID fragmente. $A\beta$ fragmenti koji se akumuliraju u subcelularnim odjeljcima, uključujući mitohondrije, lizosome i endoplazmatski retikulum, uzrokuju disfunkciju ovih odjeljaka u neuronima. $A\beta$ -inducirana sinaptička disfunkcija i mitohondrijsko oštećenje rezultiraju aberantnom aktivacijom redoks-posredovanih događaja, kao i povećanjem citoplazmatskog kalcija. Ovi događaji uzrokuju daljnju kaskadu reakcija, uključujući hiperfosforilaciju tau proteina i aktivaciju kaspaza, protein fosfataza i kalcij kalmodulin ovisne kinaze II (CaMKII). To dovodi do endocitoze AMPA receptora (AMPAR), kao i NMDA receptora (NMDAR).^{5,7}

2.1.2. Hiperfosforilacija tau proteina

Tau protein je neuronski protein koji ima ulogu u stabilizaciji mikrotubula na neuronskim aksonima i inhibiciji apoptoze, osobito u aksonima. Kada je tau protein hiperfosforiliran, netopljiv je i destabilizira mikrotubule jer je smanjen afinitet vezanja za njih. To rezultira abnormalnom autoagregacijom hiperfosforiliranog tau proteina u paru spiralnih ili ravnih niti, stvarajući intracelularne neurofibrilarne čvorove (NFT).

NFT formacija širi se na različita područja mozga tijekom progresije Alzheimerove bolesti, što u konačnici uzrokuje smrt neurona. Tau-hiperfosforilacija posljedica je neurotoksičnog djelovanja $A\beta$. Proizvodnja i agregacija $A\beta$ dovodi do nastanka oligomera koji inducira neurodegenerativnu trijadu sinaptičkih promjena i gubitak neurona putem o tau-ovisnih i tau-neovisnih mehanizama. Povećana proizvodnja $A\beta$ i $A\beta$ inducirano oksidativnog stresa dovodi do hiperfosforilacije tau proteina i formiranja NFT-a.⁷



Slika 2: Hiperfosforilacija Tau-proteina⁷

2.1.3. GSK3 β i CDK5 u Alzheimerovoj bolesti

Utvrđeno je da oksidacijski stres uzrokuje tau hiperfosforilaciju kroz izravnu interakciju s GSK3 β i PP2A. Aktivnost GSK3 β u mitohondrijima povezana je s povećanjem oksidacijskog stresa. Dakle, čini se da GSK3 β ima značajnu ulogu u patogenezi Alzheimerove bolesti i uključuje A β produkciju i A β -posredovanu neuronsku smrt povećanjem tau hiperfosforilacije u paru spiralnih niti. Inhibicija GSK3 β sprječava A β agregaciju i tau hiperfosforilaciju. Tau fosforilacija izravno utječe na interakciju A β i CDK5 / P35, za koje se zna da utječu na kalpain-aktivirano cijepanje p35 u p25 C-terminalni fragment. Ovi cijepani fragmenti imaju dulje poluživote, odvojeni su od membrana i sposobni su fosforilirati dodatne proteine. Stoga, CDK5 može biti ključni cilj terapijske primjene stišavanja gena.⁷

2.2. β -amiloidi

Protein A β , glavni sastojak amiloidnih plakova, zajedno s neurofibrilarnim čvorovima (NFT), marker je za neuropatološku potvrdu Alzheimerove bolesti. A β je peptid koji ima između 39 i 42 aminokiselina; peptid od 42 aminokiseline čini agregate i smatra se da je umiješan u patogenezu bolesti i temelj je amiloidne hipoteze. A β su proizvodi proteolitičkog cijepanja proteina prekursora amiloida (APP), integralnog membranskog proteina.

Patogena uloga A β u Alzheimerovoj bolesti potvrđuje se nizom istraživanja. Glavna potpora tome proizlazi iz toga da su mutacije u APP-u ili u genima prezenilina, koje dovode do pretjerane ekspresije A β , povezane s nasljednim oblicima Alzheimerove bolesti. Nadalje, transgenični miševi koji nose humane mutacije imaju snažnu sličnost s Alzheimerovom bolešću. A β pokazuje da je toksičan za neurone u kulturi, ali i kada se primjenjuje intracerebralno na pokusne životinje. U skladu s tom hipotezom, A β se pojavljuje kao molekula s različitim citotoksičnim učincima (na primjer, A β može utjecati na mitohondrijsku redoksnu aktivnost čime se povećava proizvodnja slobodnih radikala, može oštetiti unutarstaničnu homeostazu kalcija, povećati oslobađanje citokina, povećati enzimsku aktivnost fosfolipaza A2, C i D).

Pokazano je i da A β može negativno regulirati sintezu i oslobađanje acetilkolina iz kolinergičkog sustava. Međutim, nedavni dokazi sugeriraju alternativne mehanizme za patogenezu Alzheimerove bolesti i opisuju kako se A β , što je samo jedan od mnogih proizvoda hidrolize APP-a, može smatrati reaktivnim entitetom na potencijalno patogene podražaje. Čak i geni uključeni u metabolizam A β , čije mutacije mogu uzrokovati nasljednu

Alzheimerovu bolest, mogu biti uključeni u dodatne mehanizme osim onih povezanih s metabolizmom A β .^{4,5}

2.2.1. Amiloidna hipoteza

U osamdesetim godinama dvadesetog stoljeća biokemičari su se usredotočili na izolaciju amiloida kako bi identificirali njegovu glavnu komponentu. Glenner i Wong pročistili su mikrovaskularne amiloidne naslage iz meninga mozga i dali su djelomični slijed podjedinice proteina koji su imenovali amiloid β -protein (A β). Vrlo brzo nakon toga, Beyreuther i suradnici identificirali su isti protein kao podjedinicu jezgara amiloidnih plakova koje su izolirane iz korteksa. Otprilike u isto vrijeme, tau protein je identificiran kao glavni sastojak neurofibrilarnih nakupina koji se akumuliraju unutar mnogih neurona u mozgu oboljelih od Alzheimerove bolesti. Tau je visoko topljivi citoplazmatski protein koji se veže za tubulin tijekom njegove polimerizacije u mikrotubule u neuronima i time stabilizira ove važne citoskeletne organele.⁴

Glenner je pokazao i da se amiloidne naslage koje se javljaju u krvnim žilama mozga mladih odraslih osoba s Downovim sindromom sastoje od A β . Sredovječni pacijenti s Downovim sindromom razvijaju amiloidne plakove i neurofibrilne nakupine koji su tipični za Alzheimerovu bolest. Na toj osnovi, pretpostavljeno je da gen, koji kodira A β , može biti odgovoran za razvitak Alzheimerove bolesti. To je potvrđeno naknadnim kloniranjem gena APP-a, koji kodira veliki membranski glikoprotein tipa 1, te njegovim lokaliziranjem na kromosomu 21. Ovi biokemijski nalazi ukazuju na APP gen kao mjesto na kojem genetičari trebaju tražiti mutacije koje uzrokuju Alzheimerovu bolest. Prva takva mutacija otkrivena je u obitelji s nasljednom cerebrovaskularnom amiloidozom s višestrukim hemoragijama. Ubrzo nakon toga, pronađena je specifična mutacija APP u obitelji s ranim početkom Alzheimerove bolesti.⁴

Ti su nalazi doveli do formalnog prijedloga hipoteze o bolesti u kojoj bi pretjerano nakupljanje i taloženje A β potaknulo kompleksnu kaskadu koja rezultira simptomima Alzheimerove bolesti. Amiloidna hipoteza navodi da postupno nakupljanje i agregacija ovog malog hidrofobnog peptida inicira sporu, ali smrtonosnu kaskadu koja dovodi do sinaptičkih promjena, mikroglialne i astrocitne aktivacije, modifikacije normalno topljivog tau proteina u oligomere, a zatim u netopljive uparene spiralne niti i progresivno neuronsko propadanje povezano s višestrukim nedostatkom neurotransmitera.⁴

Smatra se da postupne promjene u ravnotežnim razinama amiloidnog β -proteina ($A\beta$) u mozgu pokreću amiloidnu kaskadu. Razine $A\beta$ mogu biti povišene povećanom proizvodnjom i / ili smanjenim klirensom. Omjer $A\beta_{42} / A\beta_{40}$ može se povećati mutacijama u tri različita gena (protein prekursor amiloida (APP), presenilin-1 (PS1) i presenilin-2 (PS2)) koji uzrokuju nasljedne oblike Alzheimerove bolesti. Ovo relativno povećanje $A\beta_{42}$ povećava oligomerne oblike, što uzrokuje u početku suptilne, a zatim sve teže i trajne promjene sinaptičke funkcije. Paralelno, $A\beta_{42}$ tvori mikroskopski vidljive naslage u parenhimu mozga, prvo kao relativno benigne difuzne (nefibrilarne) plakove. Kako difuzni plakovi postaju fibrilarni, opažaju se lokalni upalni odgovori (mikrogliozna i astrocitoza). S vremenom ti događaji rezultiraju oksidacijskim stresom, promijenjenom ionskom homeostazom i drugim biokemijskim promjenama. Kaskada kulminira široko rasprostranjenom sinaptičkom, odnosno neuronskom disfunkcijom i smrću stanica, što dovodi do progresivne demencije.⁴

2.2.2. Nastajanje oligomera i njihov utjecaj na sinaptičku disfunkciju

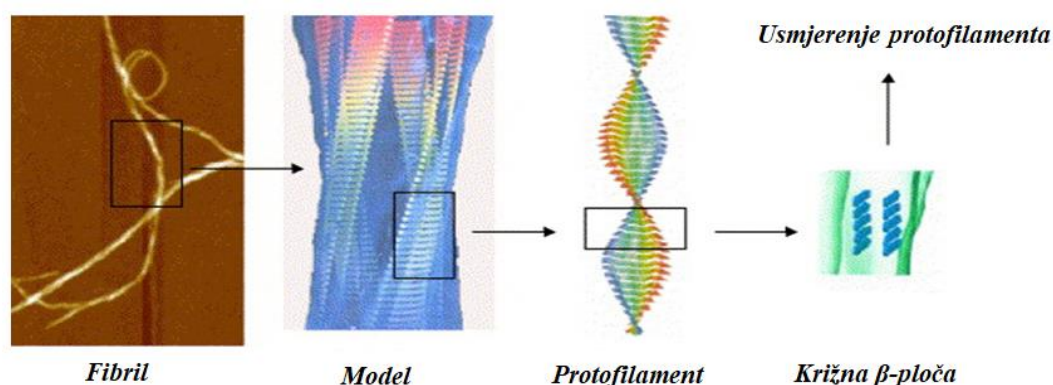
Mutacije koje se javljaju na krajevima $A\beta$ regije povećavaju proizvodnju visoko amiloidogene $A\beta_{42}$ izoforme, dok mutacije unutar $A\beta$ područja povećavaju oligomerizaciju peptida. Samo peptid $A\beta_{42}$ ima snažnu sklonost oligomerizaciji *in vivo*. Važnost oligomerizacije amiloid β -proteina ($A\beta$) u patogenezi Alzheimerove bolesti proizašla je iz opažanja da neke mutacije u β -amiloidnom prekursorskom proteinu (APP), i da sve mutacije u presenilin-1 (PS1) ili presenilin-2 (PS2) koje uzrokuju bolest, poboljšavaju proizvodnju $A\beta_{42}$ peptida. Povećano nastajanje $A\beta_{42}$ peptida rezultira apsolutnim povećanjem $A\beta_{42}$ razina ili povećanjem omjera $A\beta_{42} / A\beta_{40}$ (to jest, $A\beta_{42}$ može se povećati na štetu $A\beta_{40}$). Više hidrofobni peptid $A\beta_{42}$, sa svojim C-terminalnim alaninskim i izoleucinskim ostacima, agregira brže i formira stabilne $A\beta$ oligomere. Štoviše, $A\beta_{42}$ ima tendenciju stvaranja stabilnih trimernih i / ili tetramernih oligomera, dok to nije slučaj kod $A\beta_{40}$.

Naslijeđene mutacije u $A\beta$ regiji povećavaju sklonost peptida da agregira. Proces agregacije odražava se u početnom mikroskopskom taloženju $A\beta_{42}$ u obliku ranih (difuznih) plakova u mozgu. Relativno povećanje razine $A\beta_{42}$ prema $A\beta_{40}$ dovoljno je da se aktivira AD fenotip. Otkriće u transgeničnim miševima govori da povećanje samo $A\beta_{40}$ ne dovodi do stvaranja plaka, već može zapravo poslužiti za usporavanje taloženja $A\beta_{42}$ u mozgu.⁴

2.3. Trodimenzijska struktura kratkih amiloidnih peptida

Eisenberg i suradnici odredili su 3D strukturu kratkih fibriliformirajućih peptidnih segmenata amiloidnih proteina (npr. Sup35, inzulin, Ab, tau i amilin) rendgenskom kristalografijom. Proučavani peptidi su vrlo topljivi u vodi, ali isto tako mogu formirati mikrokristale i niti. Korištenjem specifičnih mikrofokusiranih X-zraka istraživači su otkrili nekoliko struktura mikrokristala visoke rezolucije i pokazalo se da su sastavljeni od križnih β -ploča za koje je pretpostavljeno da su osnovica strukture amiloidnih niti.

Više eksperimentalnih rezultata podržava ideju da je peptidna konformacija u mikrokristalima slična onoj u amiloidnim nitima: mikrokristali i niti rastu u istim uvjetima te mogu nastati jedno iz drugog - niti mogu rasti iz vrha kristala; kristali kao takvi mogu biti ishodište za rast niti.¹



Slika 3: Prikaz strukturne organizacije amiloidnih fibrila³

Također, mjerenje difrakcijske slike iz praha kristala i niti je pokazalo vrlo slične uzorke. U početnoj rendgenskoj strukturi određenoj iz mikrokristala peptida GNNQQNY iz Sup35, peptidi stvaraju savršene β -ploče paralelne s kratkim krajem osnovnog uzorka kristala. Slično njihovoj očekivanoj orijentaciji u nitima, individualne β -niti su okomite na duži krak mikrokristala. β -ploče se pakiraju u kristale na 2 različita načina nazvanim "suho" i "mokro" pakiranje.²

Suho pakiranje je rezultat Van der Waalsovih sila i vodikovih veza (Asn/Gln ljestve) između susjednih komplementarnih lanaca. Ovakvo strukturno pakiranje se naziva "sterički zatvarač" i također je dokumentirano u $A\beta$ nitima.

Za razliku od suhog pakiranja, mokro je većinom posljedica vodikovih veza između susjednih lanaca te preko molekula vode u sličnom stilu kao intermolekulski kontakti

proteinskih kristala. Ovo pokazuje da je stabilna strukturna jedinica mikrokristala par β -ploča koje stvaraju minimalni križni uzorak.²

Objavljene su i druge visokorezolucijske mikrokristalne strukture peptida raznolikih aminokiselinskih slijedova. Sve strukture su u "beskonačnoj" β -ploča konformaciji gdje ploče tvore uzorak preko "steričkog zatvarača" što pokazuje prevalenciju križnog- β -ploča motiva sa steričkim zatvaračem kao interakciju susjednih komplementarnih lanaca peptida i oligomerizaciju u amiloidnim nitima.²

Međutim, postoje bitne razlike u strukturama po kojima možemo razlikovati steričke zatvarače kroz 3 kategorije - paralelne ili anti-paralelne β -niti; lice-lice ili lice-naličje odnos β -ploča; te usmjerenje β -ploča gore-gore ili gore-dolje. Kombinacija ovih strukturnih organizacija rezultira s 8 mogućih klasa steričkog zatvarača od kojih je 5 eksperimentalno detektirano. Neki peptidi mogu formirati različite mikrokristale s različitim klasama steričkog ciferšlusa što objašnjava amiloidne polimorfizme i prionske niti na molekularnoj razini. Kompleksna struktura može biti derivat kombinacija steričkih zatvarača u strukturi od više peptidnih segmenata unutar jednog polipeptidnog lanca, kao što je primjer 3D struktura HET-s amiloidnih niti.²

Budući da amiloidni fibrili nisu kristalinični i netopivi su u vodi, detaljne strukturalne studije jednokristalne kristalografije X-zraka i višedimenzionalne NMR su teške. Stoga su uspostavljene metode niske rezolucije za fizičku i strukturnu karakterizaciju amiloidnih fibrila. Početni uvid u sekundarnu strukturu prisutnu u amiloidnim fibrilima došao je iz svojstava bojenja amiloida in vivo. Kongo crveno veže amiloidnu cjelinu i pokazuje žuto-zelenu birefringenciju pod križno polariziranom svjetlošću, što ukazuje na prisutnost uređene strukture u amiloidnom agregatu. Slično tome, tioflavin T fluorescencija inducirana amiloidnim vezivanjem također upućuje na prisutnost uređene strukture u agregatima. Ponavljajuća priroda strukture amiloidnih β -ploča može se odrediti i rendgenskom difrakcijom vlakana.¹

Kružni dikroizam (CD) i Fourierova transformirana infracrvena spektroskopija (FTIR) koriste se za mjerenje sadržaja β -ploča amiloida, dok elektronska mikroskopija (EM) može definirati granice i oblik amiloidnih fibrila na razlučivost od približno 10 -25 Å. Nasuprot tome, spektroskopija elektronske paramagnetne rezonancije (EPR) i zaustavljena izmjena vodika / deuterija povezana s masenom spektrometrijom ili dvodimenzionalna nuklearna magnetska rezonancijska spektroskopija (NMR) daju značajne pojedinosti o lokalnoj strukturi

amiloidnih fibrila. Kombiniranjem podataka izvedenih iz tih metoda predloženi su neki strukturni modeli, ali ove tehnike ne mogu dati strukture atomske razlučivosti.¹

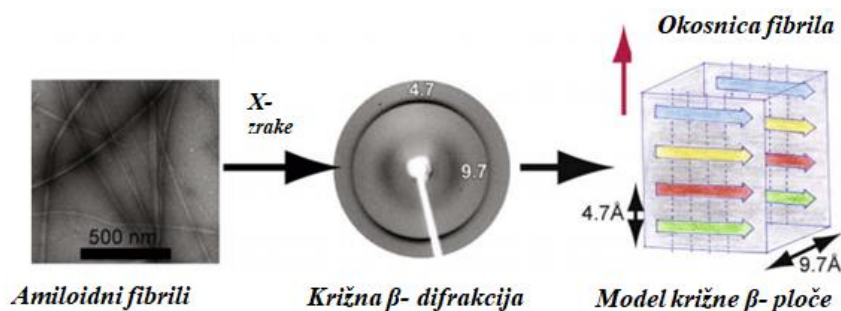
2.3.1. NMR čvrstih faza

Napredak u NMR tehnikama čvrstog stanja omogućuje precizno mjerenje intermolekulskih udaljenosti i okretnih kutova osnovnog skeleta amiloidnih fibrila. Lansbury i suradnici prvo su opisali primjenu NMR čvrstog stanja u određivanju anti-paralelne prirode A β (34-42) fibrila na temelju intramolekulskih ¹³C-¹³C udaljenosti i ¹³C kemijskih pomaka. Balbach i suradnici izvijestili su o višestrukim kvantnim NMR i rotacijskim efektima dvostruke rezonancije za A β (16-22) fibrile koji su ukazivali na anti-paralelnu strukturu β -ploča. Za A β predložena je konformacija paralelnih β -ploča bazirano na višestrukim kvantnim NMR eksperimentima. Tycko i suradnici prikupili su više ograničenja i uspostavili strukturne modele za polimorfni A β (1-40).²

2.4. Amiloidni fibrili

Rudolf Virchow uveo je pojam "amiloid" kako bi opisao makroskopsku abnormalnost tkiva koja pokazuje blijedi, voskasti izgled i daje pozitivnu reakciju bojenja joda koja je karakteristična za materijale slične škrobu. Klasična histološka definicija amiloida je izvanstanični proteinski talog koji veže Kongo-crvenilo i proizvodi žuto-zelenu birefringenciju pod polariziranom svjetlošću. Budući da difrakcija rendgenskih zraka vlakana usklađenih amiloidnih fibrila daje karakteristični difrakcijski uzorak s meridionalnom refleksijom na 4,7 Å i ravnotežnom refleksijom pri 8-11 Å, predloženo je uređenje križnog- β -ploča strukturnog motiva.

U strukturi križne- β -ploče, pojedinačne niti svake β -ploče idu okomito na osovinu fibrila (razmak od 4,7Å), dok su β -ploče (10 Å razmak) paralelne s osovinom fibrila.



Slika 4: EM i rendgenska slika amiloidnih fibrila²

Pod elektronskim mikroskopom (EM) amiloidni fibrili su dugi, nerazgranati filamenti s promjerom od 6-12 nm, što ukazuje da se amiloidni fibrili sastoje od uređenog rasporeda tisuća kopija peptida / proteina. Ove strukturne karakteristike amiloidnih fibrila se koriste za redefiniranje amiloidnog entiteta kao fibrilarni proteinski agregat s temeljnim motivom križne- β -ploče.²

Amiloidni fibrili povezani su s više od dvadeset ljudskih bolesti, uključujući Alzheimerovu, Parkinsonovu i prionske bolesti. Osim amiloida koji su povezani s bolestima, postoje i amiloidi s prirodnim biološkim aktivnostima. Bakterija *Escherichia coli* formira izvanstanične amiloidne fibrile koji su uključeni u površinske i međustanične kontakte koji potpomažu ponašanje zajednice i kolonizaciju domaćina. Protein ljuske jajeta (chorin) je amiloid koji štiti oocite i razvoj embrija od opasnosti iz okoline. Prionski amiloidi u kvascu povezani su s poboljšanim preživljavanjem domaćina u određenim uvjetima okoline.

HET-s prionski protein gljive *Podospora anserina* tvori zarazne amiloide koji su dio native funkcije zvane heterokaronska nekompatibilnost. Pmel17 tvori funkcionalni humani amiloid koji se čini važnim za formiranje pigmentacije kože.²

Iako je očito da aktivnost funkcionalnih netoksičnih i toksičnih amiloida povezanih s bolestima mora biti pripisana njihovoj 3D strukturi, postoji malo ili nimalo saznanja o strukturnim razlikama odgovornim za razlike u toksičnosti. Nedostatak toksičnosti funkcionalnih HET fibrila može biti posljedica njihove hidrofilne površine koja može potisnuti nespecifične hidrofobne interakcije s drugim proteinima ili membranom.

Alternativno, funkcionalni amiloidni proteini mogu se nakupiti u visoko specifične amiloidne fibrile bez prisutnosti konformacijskih međuprodukata kao što su protofibrili i oligomeri za koje se sugerira da su toksične specije u Alzheimerovoj bolesti. Iako se još uvijek uglavnom sastoje od β -ploča, ovi konformacijski međuprodukti pokazuju zajednički strukturni motiv koji se razlikuje od fibrila što je dokazano nastankom oligomer-specifičnih i fibril-specifičnih protutijela. Slijedeći ovu hipotezu, sugerira se da amiloidni fibrili povezani s bolesti imaju korisnu funkciju sekvestracijom toksičnih oligomera nastalih tijekom agregacije u ne-toksični zreli amiloid.

Iako svi amiloidi dijele strukturni motiv križnih β -ploča, oni sadrže razne biofizičke i biološke osobine. Formiranje amiloida može rezultirati gubitkom funkcije uključenog polipeptida kao što se zbiva kod prionskih kvasaca, ili dobitak funkcije kao u slučaju HET prionskog sustava.

Pmel17 amiloidi služe kao predložak za vezanje liganda, dok drugi amiloidi induciraju specifični otrovni odgovor. Prionski amiloidi su zarazni, dok drugi amiloidi nisu, a to su varijacije u amiloidnoj strukturi koja su odgovorne za raznolikost prionskih sojeva. Neki amiloidi mogu biti vrlo stabilni u teškim fizikalnim i biokemijskim okruženjima dok drugi jednostavno otpuštaju monomere. Neki polipeptidi tvore amiloide u fiziološkim uvjetima, drugi samo u ekstremnim (nefiziološkim) uvjetima. Amiloidi su vrlo specifični u njihovom agregatnom ponašanju i obično sadrže samo jednu sekvencu polipeptida, iako je koagregacija moguća u određenim okolnostima.²

Jednostavni preklop križne β -strukture, koji je jednodimenzionalni kristal koji može rasti neograničeno, još uvijek omogućuje više svojstava. Zapravo, ponavljajuća priroda može biti ključna za njihove višestruke aktivnosti jer je ponavljajuća konformacija sposobna pretvoriti neku nespecifičnu funkciju u specifičnu putem kooperativnosti.

Anfinsenova hipoteza govori da trodimenzijska struktura prirodnog proteina u normalnom fiziološkom okruženju (otapalo, pH, ionska jakost, prisutnost drugih komponenata kao što su metalni ioni ili prostetske skupine, temperatura i dr.) je ona u kojoj je Gibbsova slobodna energija cijelog sustava najniža, tj. prirodna konformacija određena je ukupnim međuatomskim interakcijama, a time i aminokiselinskim slijedom, u danom okruženju.

Amiloidni proteini i naročito funkcionalni amiloidni polipeptidi imaju (barem) dva stabilna konformacijska stanja: topljivo monomerno i netopljivo fibrilarno. Budući da slobodna energija otopine ovisi o koncentraciji otopljene tvari, stanje otopljene tvari može se promijeniti s koncentracijom. Dakle, potpuno je u skladu s Anfinsenovom hipotezom da amiloidni proteini zauzimaju jednu strukturu u razrijeđenoj otopini, a drugu strukturu - amiloidno stanje - kada su u visokoj koncentraciji. Drugim riječima, za mnoge bjelančevine amiloidno stanje je termodinamički stabilno stanje pri visokim koncentracijama, stanje stabilizirano visokom gustoćom intermolekularnih vodikovih veza i komplementarnim steričkim interakcijama. U međuvremenu, amiloidno stanje nije energijski najpovoljnija konformacija pri nižoj koncentraciji proteina.²

2.5. Alzheimerova bolest

Alzheimerovu bolest prvi je opisao bavarski psihijatar Alois Alzheimer na temelju amiloidnih plakova pronađenih u mozgu umrle pacijentice koja je patila od poremećaja gubitka kratkotrajnog pamćenja. To je ireverzibilna, progresivna neurodegenerativna bolest mozga koja se očituje propadanjem kognitivnih funkcija te pojavom amiloidnih plakova, depozita β -amiloida. Na nju otpada više od 65% starijih demencija što ju čini najčešćim uzrokom demencije.

Zbog duljeg životnog vijeka žena u odnosu na muškarce, Alzheimerova bolest je puno češća kod njih. Bolest se razvija kroz osam stadija. U prvom i drugom stadiju nema vidljive pojave simptoma. Treći stadij očituje se blagim kognitivnim deficitom i zaboravljivošću. U četvrtom i petom stadiju dolazi do uočavanja simptoma, prepoznavanja problema, nemogućnosti izvršavanja jednostavnih zadataka i agitacije dok se u šestom stadiju javlja depresija, inkontinencija i nemogućnost brige o samome sebi. U sljedećem stadiju potrebna je hospitalizacija oboljele osobe i konstantna njega, a u konačnici dolazi do nemogućnosti kretanja, govora, gubitka svijesti i smrti.

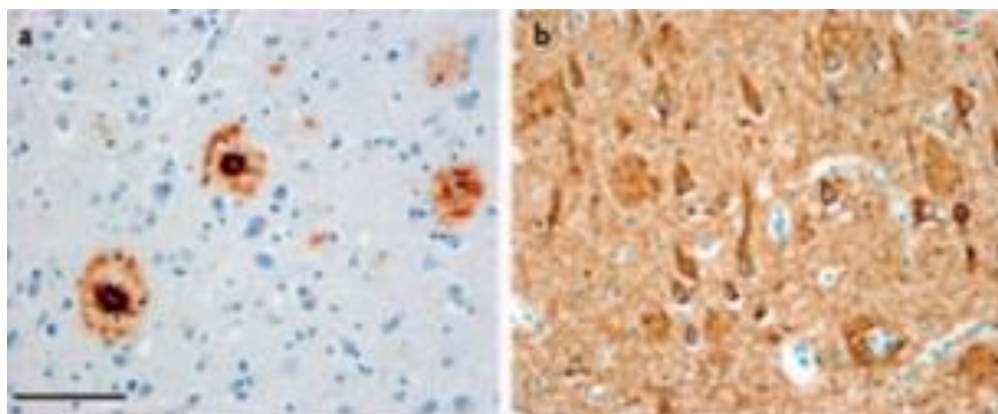
2.5.1. Rizikni faktori

Kao čimbenici rizika za nastajanje bolesti najčešće se navode pušenje, visok krvni tlak, alkohol, dijabetes, hipertenzija, hiperlipidemija, hiperglikemija, pozitivna obiteljska anamneza, spol i dob. Smatra se da je mali broj slučajeva Alzheimerove bolesti (1%- 5%) povezan s genetskom mutacijom.

Životna dob i dalje ostaje najznačajniji rizikni faktor za razvoj demencije, posebno Alzheimerove bolesti (AD). Incidencija AD-a udvostručuje se svakih 10 godina nakon napunjene 60-te godine života. Prekomjerna konzumacija alkohola može uzrokovati demenciju koja je često ireverzibilna i visokog stupnja. Djelovanje alkohola može biti izravno, toksično na mozak i neizravno koje se manifestira kao deficit vitamina, traume glave i poremećaju zgrušavanja krvi. Dijabetes povećava rizik od AD-a čak za 50 – 100% no mehanizam nastanka demencije još uvijek je nejasan. Hipertenzija povećava rizik od moždanog udara i nastanka vaskularne demencije koja je karakterizirana kognitivnim propadanjem zbog moždanog infarkta. Uslijed povećane aktivnosti APOE (apolipoprotein E-veže i sudjeluje u klirensu $A\beta$) gena raste rizik od obolijevanja.

2.5.2. Dijagnosticiranje Alzheimerove bolesti

Simptomi i znakovi Alzheimerove bolesti slični su onima kod drugih demencija. U postavljanju dijagnoze koriste se neurološki i psihološki testovi. Uz anamnestičke podatke, u postavljanju dijagnoze služimo se neurološkim i psihološkim testovima. Najpoznatiji test je MMS (eng.= *mini mental score*), tj. test procjene mentalnog stanja. Takvim testom vrši se provjera pažnje, orijentacije, budnosti, memorije, razumijevanja, govora, čitanja, pisanja, računanja, imenovanja, ponavljanja. Svaki se odgovor boduje (od 0 do 30 bodova), a rezultat služi procjeni težine demencije uz mogućnost praćenja progresije bolesti. Dijagnoza se potvrđuje neuroradiološkim metodama, CT-om (kompjutoriziranom tomografijom) ili MRI-om (magnetnom rezonancijom) mozga, na kojima se vidi jaka atrofija moždane kore difuzno i hipokampalne regije. Analizom likvora može se utvrditi povećanje proteinske komponente. U postavljanju dijagnoze može pomoći i EEG (elektroencefalografija) te PET (pozitronska emisija tomografija).⁹



Slika 5: Mikroskopska slika s $A\beta$ plakovima i tau neurofibrilarnim zapletima⁴

2.5.3. Terapija Alzheimerove bolesti

Unatoč impresivnom napretku u istraživanju i razmišljanju patogeneze Alzheimerove bolesti, ne postoji djelotvoran lijek za njezino uspješno liječenje, pa se aktivno traže terapijski alati koji mogu neutralizirati neurodegenerativne procese.

Postoje dva terapijska pristupa, terapija koja modificira bolest i simptomatska terapija, ovisno o njihovim ciljevima i mehanizmima, za koje se očekuje da će dovesti do različitih ishoda. Simptomatskom terapijom mogu se ublažiti simptomi bolesti bez usporavanja ili zaustavljanja progresije, dok modifikatori bolesti zaustavljaju ili značajno usporavaju neurodegeneraciju djelujući na patološke procese koji dovode do neurološkog poremećaja.

Simptomatsko liječenje blage ili umjerene Alzheimerove bolesti ima blagi učinak na vraćanje pamćenja i drugih kognitivnih funkcija. Nažalost, taj je učinak je prolazan i neznatjan.

Selektivni gubitak kolinergičkih neurona u Alzheimerovoj bolesti rezultira manjkom acetilkolina (ACh) u specifičnim područjima mozga koji su zaslužni za učenje i pamćenje. Smatra se i da su promjene u serotoninergičkom i dopaminergičkom sustavu odgovorne za poremećaje ponašanja koji su zapaženi u bolesnika. Stoga se u terapiji koriste inhibitori acetilkolin-esteraze kako bi se smanjila razgradnja neurotransmitera acetilkolina, odnosno povećala njegova količina u pacijenata. Lijek koji blokira toksične učinke glutamata u centralnom žičanom sustavu i ima cilj usporiti tijek bolesti je memantin.

Danas se veliki naponi ulažu u razvijanje lijekova kojima bi se ciljalo na temeljne mehanizme odgovorne za nastanak bolesti. Predloženi su različiti pristupi koji djeluju na pretpostavljene događaje bitne za razvoj Alzheimerove bolesti. Smatra se da bi se moglo ciljati na stabilizaciju native konformacije proteina primjerice tretmanom s kemijskim šaperonima ili proteinskim inženjeringom. Time bi se sintetizirali proteini s modificiranim DNA slijedom koji bi povećao stabilnost proteina te smanjio tendenciju da se pogrešno smota.

Serin / treonin-kinaza cdk5 zajedno s kofaktorom p251 (ili dužim kofaktorom, p35) hiperfosforilira tau, što dovodi do stvaranja parnih spiralnih niti i taloženja citotoksičnih neurofibrilarnih formacija i do poremećaja kao što je Alzheimerova bolest. Pretpostavlja se da su derivati 2-aminotienil potencijalni inhibitori cdk5 / p25 i da bi se mogli koristiti za liječenje Alzheimerove bolesti i drugih neurodegenerativnih poremećaja.

Na transgeničnim životinjama eksperimentalno je provedena imunizacija sintetičkim proteinima kojom je imunološki sustav oboljelog stvarao antitijela protiv agregata tih proteina te je pokazano da se time dovodi do smanjenja veličine i broja amiloidnih plakova.⁸

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. R. Riek, *The Three-Dimensional Structures of Amyloids*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017
2. S. K. Maji, L. Wang, J. Greenwald, R. Riek, *Structure-activity relationship of amyloid fibrils*, FEBS Letters 583 (2009) 2610–2617
3. M. Stefani, *Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world*, Biochimica et Biophysica Acta 1739 (2004) 5 – 25
4. C. Haass, D. J. Selkoe, *Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide*, Nature Publishing Group, volume 8, February 2007.
5. P. Sorrentino, A. Iuliano, A. Polverino, F. Jacini, G. Sorrentino, *The dark sides of amyloid in Alzheimer's disease pathogenesis*, FEBS Letters 588 (2014) 641–652
6. F. Chiti, C. M. Dobson, *Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease*, Annu. Rev. Biochem. 2006. 75: 333–66
7. C. S. Kuruva, P. Hemachandra Reddy, *Amyloid beta modulators and neuroprotection in Alzheimer's disease: a critical appraisal*, Drug Discovery Today , 00, October 2016 R
8. H. Khanam, A. Ali, M. Asif, Shamsuzzama, *Neurodegenerative diseases linked to misfolded proteins and their therapeutic approaches: A review*, European Journal of Medicinal Chemistry (2016)
9. http://www.cybermed.hr/centri_a_z/alzheimerova_demencija/dijagnosticiranje_alzheimerove_demencije, preuzeto 20.8.2017.