Utjecaj cinkovih i bakrovih metalnih iona na stvaranje amiloidnih nakupina (kod oboljelih od Alzheimerove bolesti)

Renka, Sanja

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:217:792575

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







Sanja Renka

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Kemijski odsjek
Prirodoslovno-matematički fakultet
Sveučilište u Zagrebu

Utjecaj cinkovih i bakrovih iona na stvaranje amiloidnih nakupina (kod oboljelih od Alzheimerove bolesti)

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Ivica Đilović

Zagreb, 2016.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:	25. srpnja 2016.
Datum predaje korigirane verzije Završnog rada:	8. rujna 2016.
Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:	16. rujna 2016.

Mentor rada: doc. dr. sc. Ivica Đilović Potpis:

Sadržaj

§ Sažetak iv

§ 1. Uvod 5

§ 2. Prikaz odabrane teme 7

2.1. Kratak uvod u patologiju Alzheimerove bolesti 7

2.1.1. Amiloidni β-peptid 7

2.1.2. Metalni ioni u Alzheimerovoj bolesti 8

2.2. Struktura i interakcije Aβ-peptida bez i s metalnim ionima 9

2.2.1. Struktura Aβ-peptida bez metalnih iona – monomeri, amiloidi i oligomeri 9

2.2.2. Struktura kompleksa Aβ-monomera i bakrovih(II) i cinkovih iona 12

2.2.3. Struktura kompleksa Aβ-amiloida i Aβ-oligomera s bakrovim(II) i cinkovim ionima 13

2.2.4. Stabilnost i afinitet vezanja metalnih iona na Aβ-peptid 13

2.3. Mehanizmi agregacije Aβ-peptida bez metalnih iona 15

2.4. Utjecaj bakrovih(II) i cinkovih iona na agregaciju Aβ-peptida 17

2.4.1. Agregacija Aβ-peptida inducirana metalnim ionom 18

2.4.2. Stvaranje amorfnih odnosno amiloidnih nakupina vezanjem metalnih iona 20

2.4.3. Utjecaj vezanja metalnih iona na termodinamiku agregacije Aβ-peptida 22

2.4.4. Utjecaj vezanja metalnih iona na kinetiku agregacije Aβ-peptida 24

2.5. Zaključak 26

§ 3. Literaturna vrela 27

§ Sažetak

Cilj ovog rada je dati uvid u dosadašnja saznanja o interakcijama metalnih iona s amiloidogenim peptidom (Aβ-peptid), karakterističnim za Alzheimerovu bolest te o njihovom utjecaju na stvaranje amiloidnih nakupina.

Najprije će ukratko biti riječ o patološkim obilježjima Alzheimerove bolesti koje uključuju nastajanje Aβ-peptida i poremećenu homeostazu metalnih iona.

Detaljnije će biti razmotrena primarna i sekundarna struktura Aβ-peptida i njegovih agregiranih nakupina, a zatim struktura kompleksa bakrovih(II) i cinkovih iona s Aβ-peptidom. Između ostalog, raspravit će se i neka važna svojstva kao što su stabilnost spomenutih kompleksa i afinitiet vezanja metalnih iona.

Opisani su mogući mehanizmi agregacije Aβ-peptida bez i s metalnim ionima. U tom dijelu bit će prikazani rezultati i zaključci istraživanja vezanih za metalo-specifični utjecaj na agregaciju Aβ-peptida, stvaranje amiloidnih nakupina u odnosu na amorfne te utjecaj na termodinamiku i kinetiku agregacije Aβ-peptida.

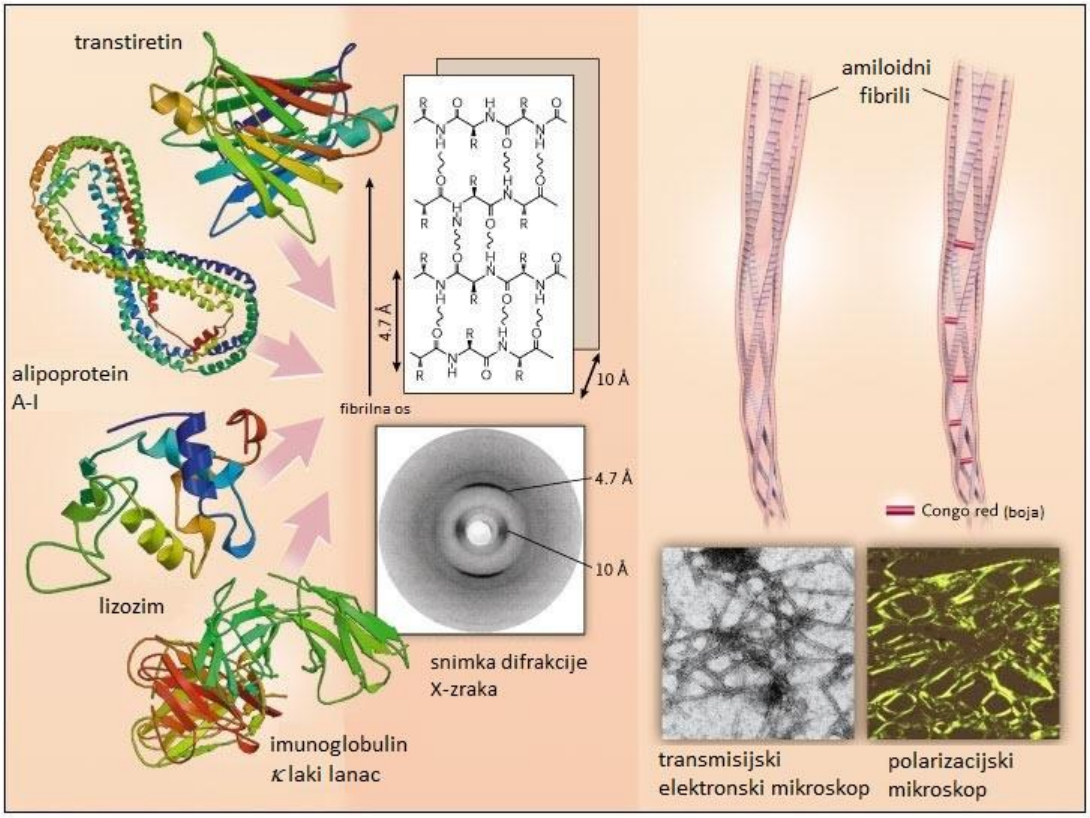
§ 1. Uvod

Najučestalija neurodegenerativna bolest današnjice je demencija Alzheimerova tipa, karakteristična za stariju životnu dob. Zbog propadanja živčanih stanica, napredovanjem bolesti dolazi do promjene raspoloženja i ponašanja, gubitka pamćenja te poteškoća u obavljanju svakodnevnih aktivnosti. Trenutačno zahvaća više od 30 milijuna ljudi, a njihov broj se svakim danom ubrzano povećava. Pretpostavlja se da će se broj oboljelih zbog sve duljeg životnog vijeka udvostručavati svakih dvadeset godina. Usprkos brojnim istraživanjima i otkrićima u području medicine i prirodnih znanosti još uvijek ne postoji jedinstveno rješenje koje bi spriječilo i zaustavilo napredovanje bolesti.

Amilodi (netopljive nakupine proteina) danas se smatraju odgovornima za dvadesetak ljudskih bolesti. Nađeno je kako nastaju od barem 18 različitih proteina čiji je krajnji produkt strukturno sličan – dakle, trodimenzijske strukture različitih proteina konvergiraju u gotovo jedinstvenu strukturu amiloida (slika 1).

U Alzheimerovoj bolesti amiloidni fibrili su krajnji produkt agregacije Aβ-peptida. Grade senilne plakove te su najzastupljeniji u moždanom tikvu. Osim amiloidnih fibrila uočene su i razne druge nakupine Aβ-peptida poput Aβ-protofibrila i različitih oligomera.

U literaturi postoji veliki broj dokaza koji upućuju na to da su metalni ioni povezani sa neurodegenerativnim bolestima u procesu stvaranja amiloida. Veće koncentracije cinkovih i bakrovih(II) iona vezanih za Aβ-peptide su pronađene u senilnim plakovima. U svrhu pronalaska zadovoljavajuće terapije, potrebno je razumijeti ulogu metalnih iona u procesu nastanka plakova, odnosno objasniti njihovu interakciju s Aβ-peptidom kao i njihov utjecaj na agregaciju.



Slika 1. Prikaz različitih proteina koji agregacijom stvaraju amiloidene fibrile slične strukture.[1]

§ 2. Prikaz odabrane teme

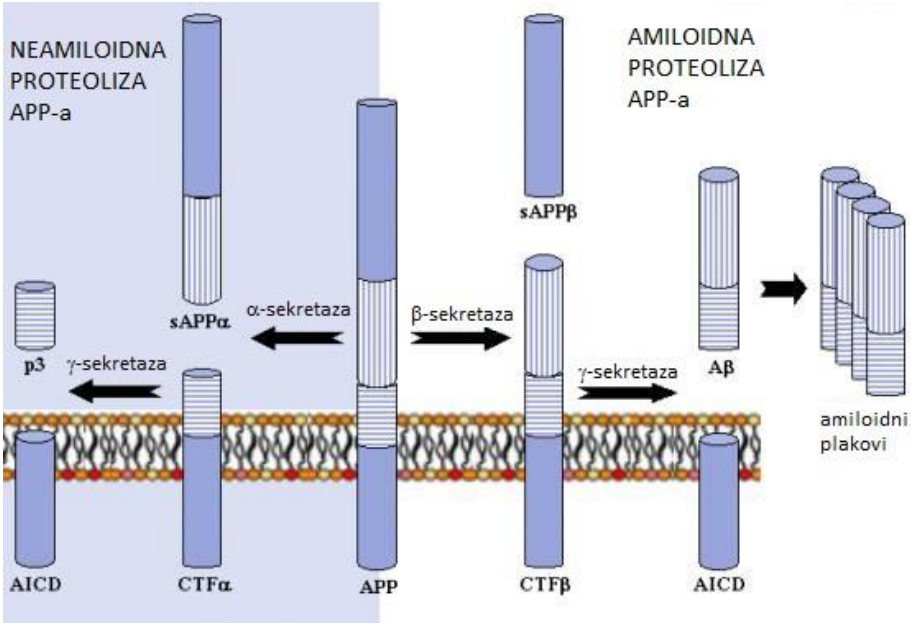
2.1. Kratak uvod u patologiju Alzheimerove bolesti

Alois Alzheimer je 1906. po prvi puta opisao bolest s dva glavna obilježja: izvanstanično taloženje Aβ-peptida u obliku senilnih plakova i unutarstanični neurofibrilarni snopići hiperfosforiliranog τ-proteina. Prema hipotezi amiloidne kaskade senilni plakovi i njihovi prekursori (manji agregati Aβ-peptida) potiču stvaranje neurofibrilarnih snopića.

2.1.1. Amiloidni β-peptid

Amiloidni β-peptid (Aβ-peptid) je izgrađen od 39 do 42 aminokiselinska ostatka te obuhvaća N-terminalnu hidrofilnu i C-terminalnu hidrofobnu domenu. Nastaje iz transmembranske prekursorne molekule zvane amiloidni prekursorni protein (APP) koja se može cijepati na dva načina: neamiloidno i amiloidno. Neamiloidno cijepanje uključuje cijepanje APP-a α-sekretazom čime se otpušta N-terminalni fragment. Ostatak proteina potom se cijepa γ-sekretazom i otpušta neamiloidni P3-peptid. Amiloidna proteoliza je sličan proces, međutim APP se najprije cijepa β-sekretazom, a potom γ-sekretazom čime se u izvanstanični prostor otpušta N-terminalni fragment i Aβ-peptid (slika 2).[2,3]

Kod oboljelih od Alzheimerove bolesti povećano je stvaranje Aβ-peptida, pogotovo $A\beta_{42}$-peptida koji je skloniji agregaciji. Nije poznat mehanizam koji izaziva njihovu agregaciju, no prikupljeni dokazi ukazuju na to da interakcije Aβ-peptida i iona prijelaznih metala [pogotovo bakrovih(II) i cinkovih iona] pospješuju agregaciju te da je njihova poremećena homeostaza u mozgu povezana s razvojem Alzheimerove bolesti.

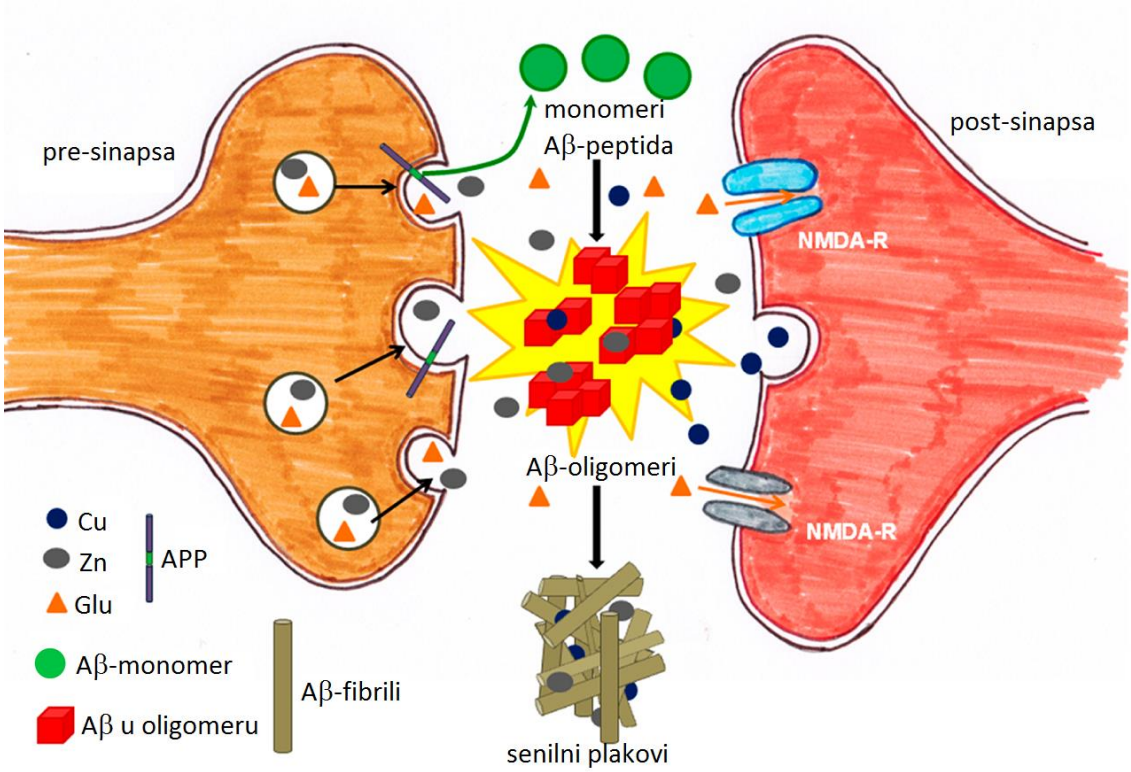


Slika 2. Amiloidno i neamiloidno cijepanje amiloid prekursornog proteina (APP).[4]

2.1.2. Metalni ioni u Alzheimerovoj bolesti

Bakrovi(II) i cinkovi ioni u tijelu su čvrsto vezani za enzime i proteine, dok se u mozgu nalaze u sinaptičkim vezikulicama kao slabo vezani ioni za ligande poput glutamata. Takvi neuroni nađeni su u ključnom području mozga odgovornom za memoriju (hipokampus). Budući da su slabo vezani, mogu stvarati interakcije sa ostalim ligandima.

Agregacija Aβ-monomera odvija se u sinaptičkoj pukotini gdje se tijekom neurotransmisije otpuštaju velike količine bakrovih i cinkovih iona (slika 3). Monomeri se nalaze i kod zdravih osoba u manjim količinama pa je ključan podatak u etiologiji bolesti formiranje nakupina Aβ-peptida. Kako su velike koncentracije navedenih iona nađene u senilnim plakovima pretpostavlja se da su upravo oni odgovorni za stvaranje nakupina i njihovu toksičnost. Metalni ioni mogu u taj proces biti uključeni na različite načine, a uglavnom tako da moduliraju put agregacije ili stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) koje uzrokuju oksidativnu štetu na Aβ-peptidu, zbog čega oni postaju skloniji agregaciji.



Slika 3. Shema sinaptičke pukotine gdje se Aβ-peptidi, cinkovi i bakrovi ioni zajedno mogu naći u većoj koncentraciji. Monomeri Aβ-peptida (zeleni kružići) dobiju se amiloidnim cijepanjem APP-a. Bakrovi i cinkovi ioni otpuštaju se tijekom neurotransmisije i uključeni su u proces agregacije Aβ-peptida što dovodi do stvaranja amiloidnih plakova nađenih u mozgu oboljelih od Alzheimerove bolesti.[5]

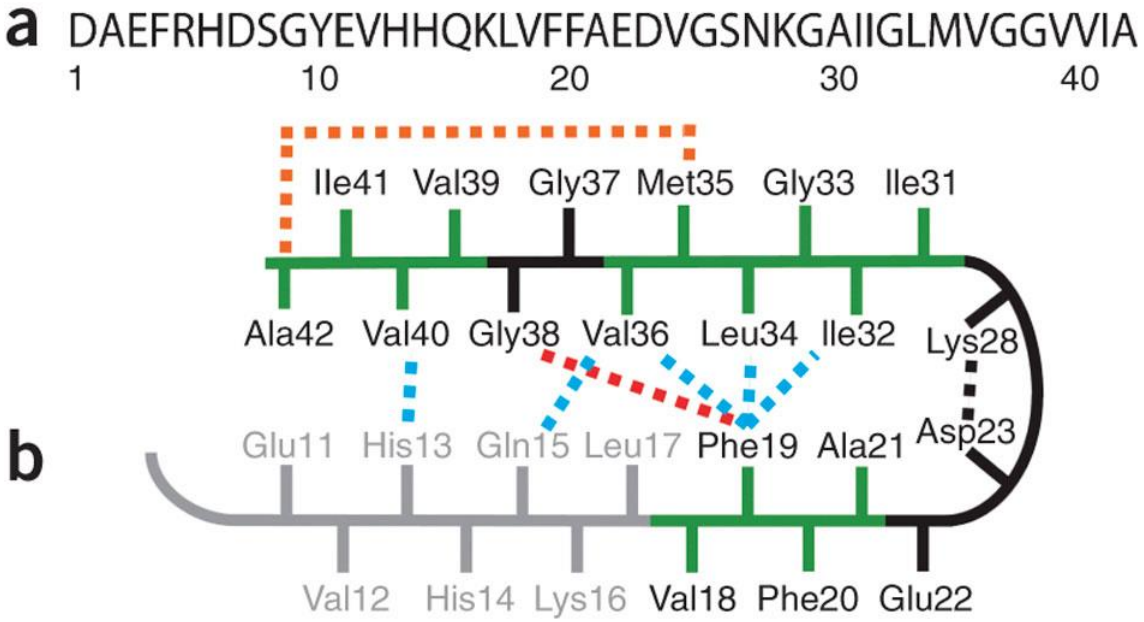
2.2. Struktura i interakcije Aβ-peptida bez i s metalnim ionima

2.2.1. Struktura Aβ-peptida bez metalnih iona – monomeri, amiloidi i oligomeri

Nativno nestrukturirani proteini (eng. *intrinsicallay disordered proteins*, IDP) su jako fleksibilni, bez jasno definirane trodimenzijske strukture. U tu skupinu proteina spadaju i Aβ-monomeri. NMR-spektri vodenih otopina proteina pokazuju kemijske pomake karakteristične za zavojitu strukturu,[6] a ustanovljeno je da su u različitim okruženjima moguće različite konformacije. Primjerice, u hidrofobnom okruženju peptidi imaju visok udio strukture α-zavojnice.

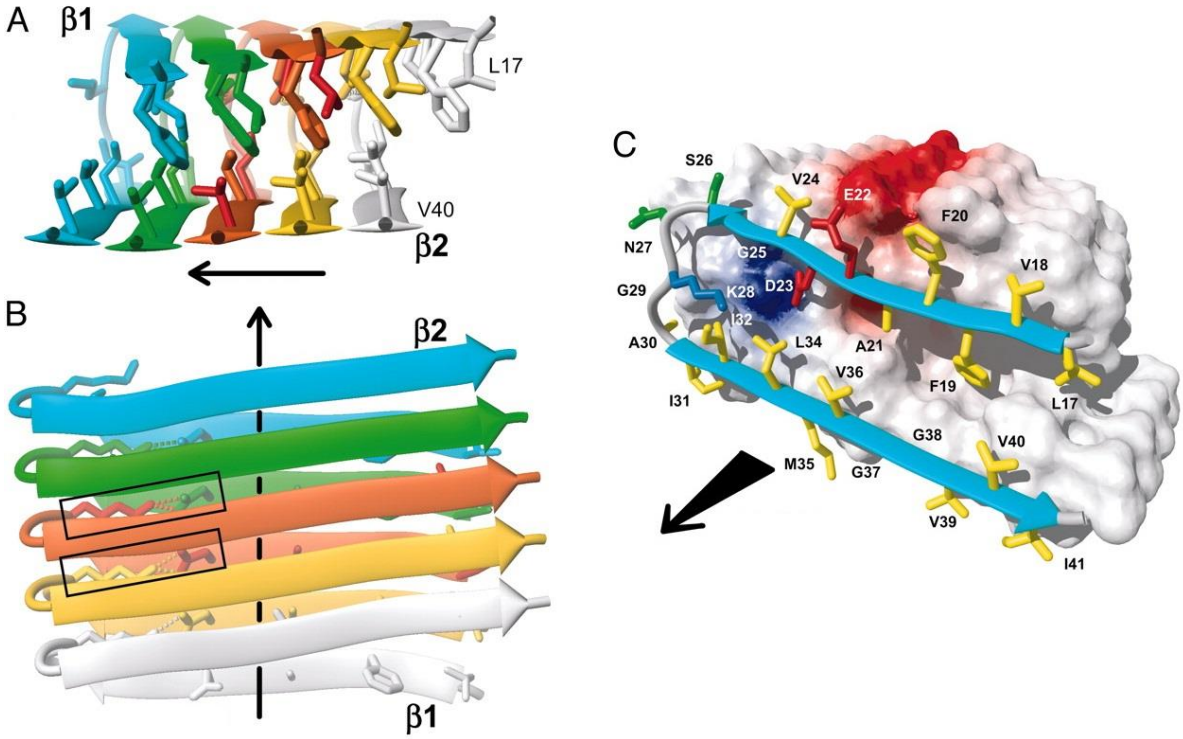
Zbog velikog udjela hidrofobnih aminokiselinskih ostataka moguće je stvaranje dviju paralelnih β-struktura (slika 4). Hidrofobne interakcije ostvaruju se između neparnih

aminokiselinskih ostataka (Leu17, Phe19 i Ala21) i parnih aminokiselinskih ostataka (Gly38, Val36, Leu34, Ile32) susjednih β-struktura i stvarajući jezgru $A\beta_{42}$-fibrila. Daljni rast fibrila je jednosmjerni, odnosno nadolazeći *n*-ti $A\beta_{42}$-monomer stvara hidrofobne interakcije između svoje β_1-strukture i β_2-strukture u (*n*−1) $A\beta_{42}$-monomeru (slika 5a). Asocijacija se dodatno stabilizira ionskim interakcijama u području β-okreta te vodikovim vezama između β-struktura (slika 5b). Vezanjem novog $A\beta_{42}$-monomera sprječava se disocijacija *n*-tog monomera – proces rasta fibrila ukazuje na kooperativnost.[3]



Slika 4. Primarna struktura **a)** i shema sekundarne strukture i interakcijâ aminokiselinskih ostataka **b)** u $A\beta_{42}$-monomeru nastalom iz ljudskog APP-a. Nestrukturirani ostatci su sive boje, a ostali čine motiv β-ukosnice. Interakcije označene crvenim, narančastim i plavim crticama su uglavnom hidrofobnog karaktera ili je riječ o slabijim vodikovim vezama. Konformacija okreta dodatno je stabilizirana je privlačenjem suprotno nabijenih bočnih ogranaka Asp32 i Lys28 (crna isprekidana linija).[7]

Aβ-amiloidi su netopljive nakupine proteina, s karakteristikama β-sekundarne strukture koja je okomita na fibrilnu os (slika 5). Vodikove veze koje stabiliziraju sekundarnu strukturu paralelne su smjeru fibrilne osi i ostvaruju se između N−H skupina jednog i C=O skupina drugog lanca. Strukturu također stabiliziraju već spomenute hidrofobne i ionske interakcije između bočnih ogranaka aminokiselina.



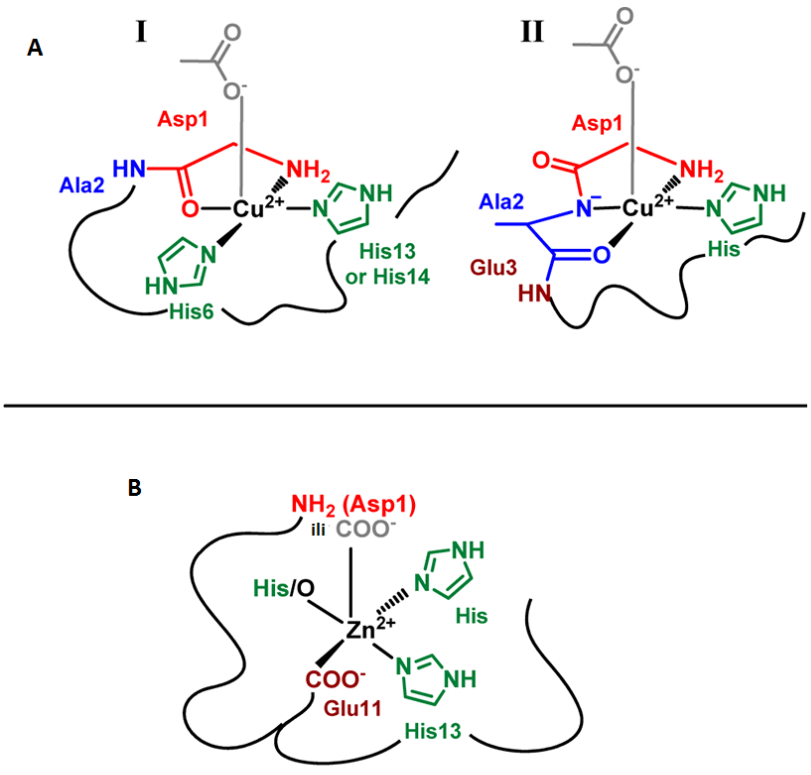
Slika 5. Struktura i interakcije u amiloidnim fibrilima. **a)** Prikaz interakcija između Aβ-monomera označenih različitim bojama. **b)** Prikaz β-strukture okomite na fibrilnu os (crne strelice) i ionskih interakcija (točkaste linije). **c)** Mapa elektrostatskog potencijala: hidrofobni dijelovi (žuto), polarni (zeleno), negativno nabijeni (crveno) i pozitivno nabijeni (plavo).[3]

Sve intermedijerne vrste između monomera i amiloidnih fibrila nazivaju se oligomeri. Agregacija Aβ-peptida je dinamičan proces u kojem dolazi do izmjene različitih intermedijera. Pokušaj stabilizacije intermedijera za strukturnu analizu može uzrokovati same promjene u intermedijeru, stoga je određivanje trodimenzijske strukture mukotrpan posao. Često je teško raspoznati je li oligomer stvarno intermedijer ili struktura koja ne agregira dalje u fibrile. Danas se oligomeri smatraju najtoksičnijim vrstama uglavnom zbog ometanja sinaptičke funkcije produkcijom reaktivnih kisikovih vrsta (ROS).

2.2.2. *Struktura kompleksa Aβ-monomera i bakrovih(II) i cinkovih iona*

Za razliku od metaloenzima s definiranom 3D-strukturom i jedinstvenim veznim mjestom za metalni ion, Aβ-monomer je fleksibilan i posjeduje više različitih koordinacijskih mjesta za vezanje bakrovih(II) i cinkovih iona. Pri fiziološkim uvjetima monomer s metalnim ionima stvara mononuklearni kompleks.

U kompleksiranom Aβ-peptidu bakrov(II) ion je koordiniran s četiri liganda u ekvatorijalnom te često, s dodatnim ligandom u aksijalnom položaju (slika 6). Nađena su dva različita tipa koordinacijske sfere. U prvom tipu, bakrov(II) ion je koordiniran sa $–NH_2$ terminalnim aminom, C=O iz peptidne veze Asp1−Ala2, imidazolnim prstenom iz His6 i imidazolnim prstenom iz His13 ili His14. Za razliku od prvog tipa, drugi tip koordinacijske sfere sadrži ekvatorijalno vezani $–NH_2$ terminalni amin, deprotonirani amid iz Asp1−Ala2 peptidne veze, C=O iz Ala2−Glu3 peptidne veze i imidazolni prsten iz His6, His13 ili His14. U aksijalnom položaju može se nalaziti direktno vezani karboksilat ili molekula vode preko vodikovih veza.



Slika 6. Vezna mjesta bakrovih(II) i cinkovih iona u Aβ-peptidu.[5]

Kompleks bakrovih(II) iona i Aβ-peptida je dinamičan jer dolazi do stalne međusobne izmjene histidinskih ostataka, a literaturni podaci o četvrtom odnosno petom ligandu se često razlikuju. Može se zaključiti da kompleks postoji u različitim oblicima koje ovise o manjim promjenama u okolišu (pH-vrijednost, koncentracija peptida i soli, otapala...), duljini peptida i njegovoj strukturi. Takvo ponašanje kompleksa je očekivano, budući da Aβ-peptid nema točno definirano vezno mjesto za metalni ion.

U kompleksu cinkovih iona i Aβ-peptida, ion je koordiniran s tri imidazolna prstena histidinskih ostataka, karboksilatnom skupinom Glu11 i Asp1 vezanim preko $–NH_2$ terminalne skupine ili karboksilatne skupine (slika 6).[2,5-7]

2.2.3. Struktura kompleksa Aβ-amiloida i Aβ-oligomera s bakrovim(II) i cinkovim ionima

Nešto je manje poznato o veznim mjestima za metalne ione u agregiranim oblicima peptida (oligomeri i fibrili), ali su općenito slična onima kod monomernih peptida. Elektronskom paramagntskom rezonancijom (EPR) nisu dobivene značajne razlike u strukturi kompleksa Aβ-monomera i fibrila kompleksiranih bakrovim ionima. Osim toga, NMR spektroskopija u čvrstom stanju potvrdila je da se u koordinacijskoj sferi metalnih iona nalaze His13 i His14 aminokiselinski ostaci i karboksilati (terminalni C atom, Glu3, 11 i/ili Glu22), slično kao kod Aβ-monomera. U nedostatku suprotnih dokaza, postoji mogućnost da su u koordinacijsku sferu uključeni i neki drugi aminokiselinski ostaci. Analiza je također pokazala da vezanje bakrovih(II) i cinkovih iona ne uzrokuje promjene u sekundarnoj strukturni, već uglavnom utječe na N-terminalni dio i područje β-okreta. N-terminalni dio Aβ-peptida (vezno mjesto metala) je fleksibilno čak i u amiloidnim fibrilima.[5]

2.2.4. Stabilnost i afinitet vezanja metalnih iona na Aβ-peptid

Važno svojstvo kompleksa Aβ-peptida s metalnim ionom je njegova stabilnost u otopini. Kompleksi bakrovih(II) iona s peptidima od 1 do 16 i 1 do 28 aminokiselinskih ostataka su relativno stabilni pri fiziološkim uvijetima, dok je u slučaju Aβ-peptida pune veličine (39-42 aminokiselinska ostatka) uočena precipitacija.

Afinitet vezanja metalnih iona na Aβ-peptid često se razmatra prilikom traženja potencijalnih inhibitora agregacije. Afiniteti vezanja dani su konstantom disocijacije pri

određenoj pH-vrijednosti, u prisutnosti pufera i soli, te su korigirani zbog afiniteta samih pufera. Konstanta disocijacije (K_d) može se odrediti nekom od sljedećih titracijskih metoda: spektrofluorometrijski mjerenjem fluorescencije triptofana, kolorimetrijski dodatkom kompetirajućih liganada i mikrokalorimetrijski (najčešća metoda). Zbog različitih eksperimentalnih uvjeta (koncentracije metalnih iona, sastojci pufera, pH-vrijednosti) i korištenih metoda literaturni podaci za konstantu disocijacije se razlikuju.

Usprkos poteškoćama prilikom mjerenja K_d izvedeni su neki glavni zaključci. Prvo, Aβ-peptid može vezati bakrove(II) i cinkove ione u svim oblicima (monomeri, fibrili ili amorfne nakupine) i to sa sličnim afinitetom. Drugo, vezanje metalnih iona je slabije nego kod strukturiranih proteina. Konstanta disocijacije za kompleks Aβ-peptida i bakrovih iona varira između 50 nmol dm^{-3} i 50 pmol dm^{-3}, a za kompleks s cinkovim ionima od 1 μmol dm^{-3} do 300 μmol dm^{-3}. Istovremeno je pokazano da početni kompleks s cinkovim ionima sa K_d vrijednosti oko 60 μmol dm^{-3}, u 30 minuta inkubacije prelazi u stabilniji kompleks s K_d oko 2 μmol dm^{-3} i dovodi do stvaranja nefibrilarnih nakupina.[2]

Postavlja se pitanje imaju li amiloidi veći afinitet za vezanje metalnih iona od monomera, čime bi se moglo objasniti nakupljanje metala u senilnim plakovima. Kao što je prikazano u prethodnom odlomku, za nakupine formirane u prisutnosti cinkovih iona zabilježen je porast afiniteta, ali nije ustanovljeno da se preferentno vežu na amiloide. Smatralo se da je afinitet bakrovih iona također neovisan o stupnju agregacije peptida, ali su nedavna istraživnja pokazala drugačije. Štoviše, kod vezanja bakrovih(II) iona, agregirani Aβ-peptid kompetira ljudskom serumskom albuminu [protein za vezanje bakrovih(II) iona i održavanje njegove visoke koncentracije u mozgu].[5]

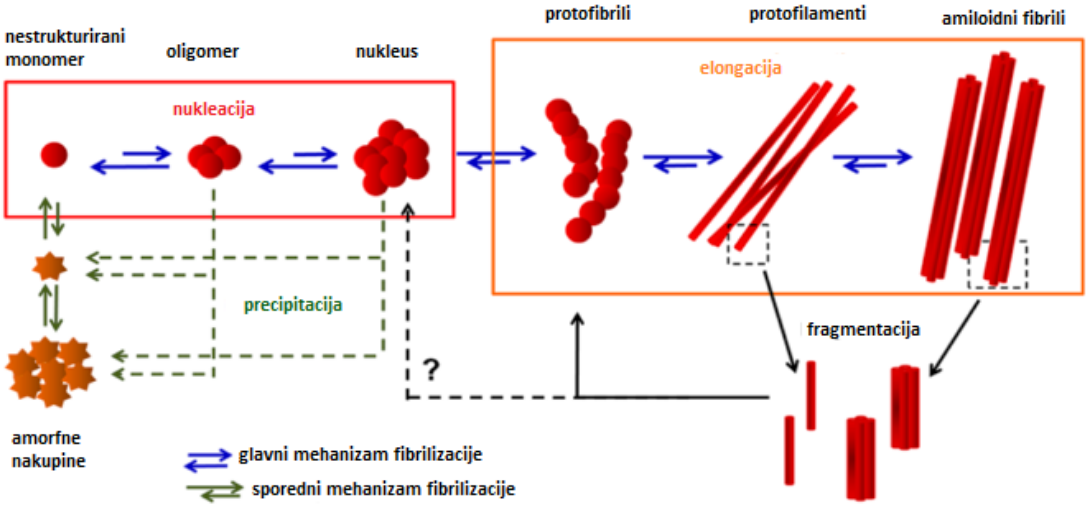
Kod oboljelih od Alzheimerove bolesti, u sinaptičkoj pukotini su povećane koncentracije bakrovih(II) i cinkovih iona. Zabilježene koncentracije su iznad konstante disocijacije kompleksa Aβ-peptida i metalnog iona što objašnjavanja njihovo nakupljanje u senilnim plakovima.

2.3. Mehanizmi agregacije Aβ-peptida bez metalnih iona

Monomeri Aβ-peptida stvaraju tipične amiloidne fibrile s β-strukturom, a proces fibrilizacije pokazuje sigmoidalnu vremensku krivulju koja ukazuje na autokatalitički proces. Osim toga, ova vrsta peptida ima tendenciju stvaranja amorfnih nakupina, koji za razliku od amiloidnih fibrila nemaju dobro uređenu strukturu.

Stvaranje fibrila iz Aβ-monomera je kompleksan i dinamičan proces koji uključuje više koraka od konformacijskih promjena peptida do agregacije i stvaranja β-strukture. Nastajanje fibrila ovisi o termodinamičkim i kinetičkim faktorima, a u svakom koraku postoje različiti intermedijeri koji mogu i ne moraju biti direktno uključeni u put agregacije. Iako točan mehanizam agregacije nije u potpunosti dokučen, ključni koraci u formiranju i polimerizacijii fibrila su nukleacija i elongacija (slika 7). Sukladno tomu, kinetika reakcije ovisi o dva glavna parametra: konstanti nukleacije (k_n) i konstanti elongacije (k_e).

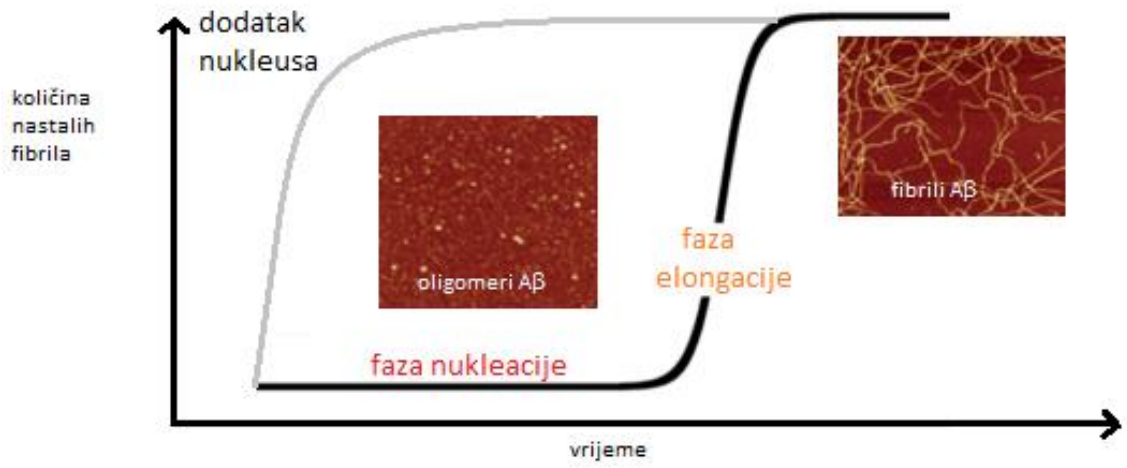
Prvi i odlučujući korak u stvaranju amiloidnih fibrila je nukleacija odnosno formiranje nukleusa (jezgra agregacije). Ove čestice imaju visok stupanj uređene β-strukture koje stvaraju temelj za interakciju s nadolazećim peptidima preko lanca vodikovih veza. Njihovo termodinamički nepovoljno stvaranje ostaje nerazjašnjeno. Ono u čemu se razlikuju jest stupanj oligomerizacije Aβ-peptida (monomer, dimer, trimer...). Nedavna istraživanja su pokazala kako fibrile može stvoriti nukleus od samo dva asocirana Aβ-peptida (dimer).[2]



Slika 7. Shematski prikaz puteva agregacije Aβ-peptida.[5]

U fazi elongacije dolazi do rasta fibrila. Na nukleus se vežu monomeri ili oligomeri, a nastali intermedijeri poprimaju strukturu β-ploče. Proces elongacije može se ubrzati dodatkom fragmentiranih fibrila koji djeluju kao novi nukleusi.

Proces stvaranja nukleusa je najsporiji i stoga je ključan u stvaranju fibrila. Nakon što je stvoren temelj za daljnu agregaciju, proces elongacije ide vrlo brzo i spontano budući da su amiloidni fibrili termodinamički stabilniji od nukleusa. Stupanj fibrilizacije ovisi o vremenu i ima spomenutu sigmoidalnu krivulju. Međutim, dodaju li se u otopinu već stvoreni Aβ-nukleusi ubrzat će se stvaranje fibrila, a krivulja poprima oblik hiperbole (slika 8).[2,5,6]



Slika 8. Kinetika rasta fibrila. Tipična sigmoidalna krivulja fibrilizacije i hiperbolna krivulja rasta fibrila uz dodatak Aβ-nukleusa. Slike su dobivene mikroskopijom atomskih sila (MAS) i prikazuju Aβ-peptid u fazi nukleacije i elongacije.[5]

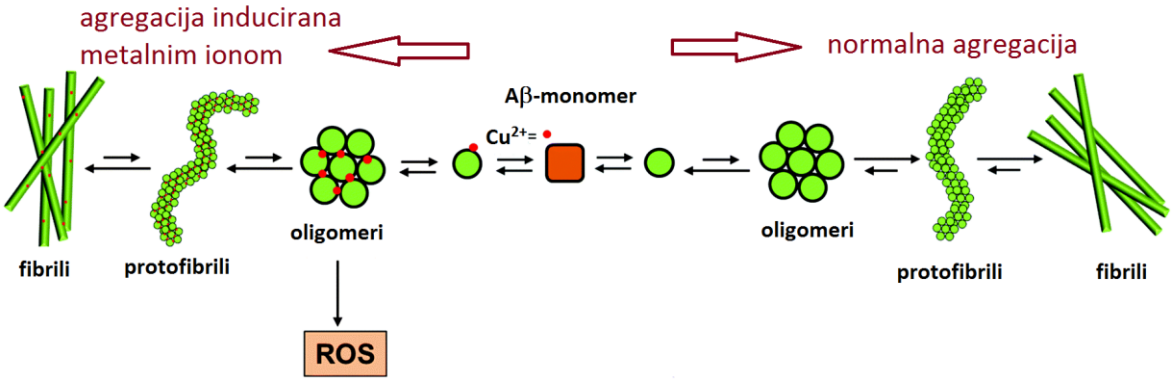
Agregacija proteina može se odvijati jednim od tri mehanizma. U homogenoj nukleaciji, stvaranje nakupina ovisi samo o koncentraciji monomera i neovisno je o koncentraciji svorenih fibrila. U procesu fragmentacije, stvaranje fibrila ovisi o koncentraciji već stvorenih fibrila. U trećem mogućem procesu nukleacije, brzina nastajanja nakupina ovisi o koncentraciji i monomera i postojećih fibrila. Eksperimentom je pokazano da agregacija Aβ-peptida slijedi treći put agregacije.[8]

2.4. Utjecaj bakrovih(II) i cinkovih iona na agregaciju Aβ-peptida

Unatoč malom afinitetu vezanja, metalni ioni imaju važan utjecaj na agregaciju Aβ-peptida. Istraživanja se uglavnom temelje na proučavanju utjecaja cinkovih i bakrovih(II) iona. Željezovi(II) i bakrovi(I) ioni otežavaju analizu jer zbog moguće oksidacije zahtijevaju anaerobne uvjete, dok se željezovi(II) ioni često talože u obliku hidroksida.

Općenito, bakrovi(II) i cinkovi ioni na formiranje amiloida mogu utjecati poticanjem drugog puta agregacije npr. stvaranjem amorfnih nakupina, ili moduliranjem glavnog puta agregacije, bilo termodinamički ili kinetički (slika 9).

Budući da su bakrovi(II) i cinkovi ioni različito koordinirani Aβ-peptidom (opisano u poglavlju 2.2.2.), generiraju različite strukture peptida koje utječu na daljnje stvaranje amiloida. Eksperimentalna istraživanja su doista pokazala razlike u strukturi, kinetici i intermedijerima između agregacije Aβ-peptida s bakrovim(II) i cinkovim ionima. Npr. u istraživanju metodom mikroskopije atomskih sila, pri množinskoj koncentraciji Aβ-peptida od 100 μmol dm^{-3}, uočeno je da dodatkom metalnih iona dolazi do inhibicije stvaranja fibrila. U prisutnosti cinkovih iona stvorile su se globularne nakupine, dok su bakrovi(II) ioni potaknuli stvaranje nakupina vrlo neuređene strukture.[5]



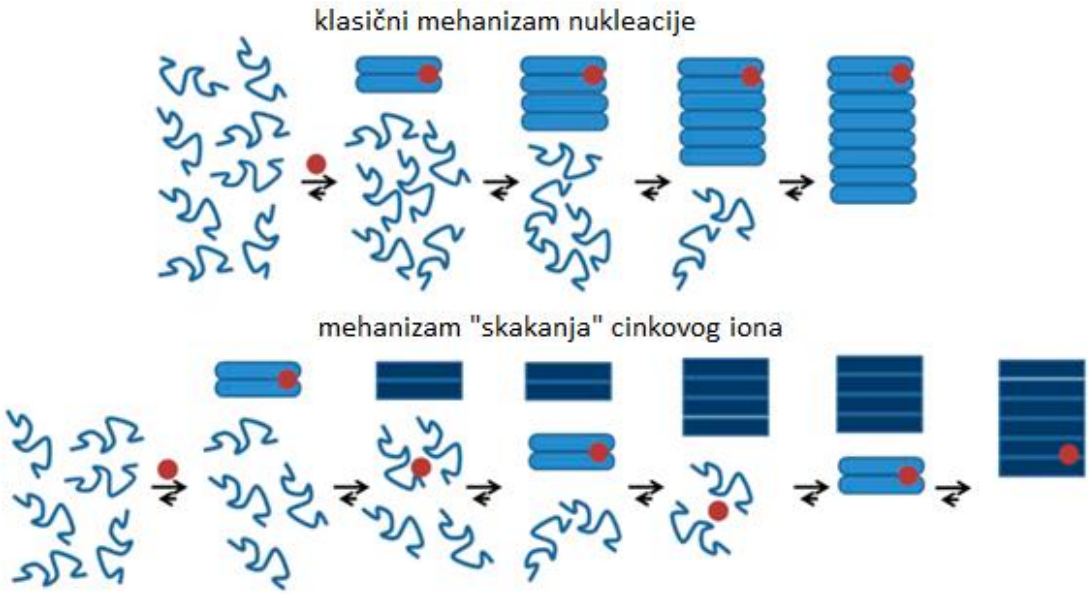
Slika 9. Usporedba normalne (desno) i metalnim ionima inducirane fibrilizacije Aβ-peptida (lijevo). Vidljivo je da vezanje metalnih iona nema značajan utjecaj na samu strukturu nastalih fibrila, međutim oni mogu modulirati put agregacije.[9]

2.4.1. Agregacija Aβ-peptida inducirana metalnim ionom

Interakcija metalnog iona i Aβ-peptida može se opisati s tri procesa: asocijacije i disocijacije, prijenosa metalnog iona između različitih veznih mjesta unutar peptida i prijenosa metalnog iona između dva različita peptida.

Reakcije izmjene metalnih iona između peptida odvijaju se brže od NMR-vremenske skale (milisekunde). Rezultati na modelu peptida su pokazli da izmjena metalnih iona može imati važnu ulogu u agregaciji, budući da se odvija brže nego sam proces agregacije (slika 10).

Istraživanje interakcija cinkovih iona i amiloidnog peptida ($A\beta_{11-28}$) pokazala su da pri višim koncentracijama peptida privremeno vezanje metalnog iona potiče agregaciju. Osim toga, vezanje cinkovih iona na oligomer potaknuo je agregaciju monomernog Aβ-peptida mehanizmom izmjene metalnih iona, a ne klasičnom nukleacijom kako je bilo za očekivati.[6]



Slika 10. Mogući mehanizmi agregacije inducirani cinkovim ionom. U gornjem prikazu vezanje metalnog iona na Aβ-peptid stvara nukleus koji onda služi kao predložak za daljni rast amiloida. U donjem prikazu metalni ion se veže na Aβ-peptid, inducira nastajanje nukleusa, a potom disocira. Prema tom modelu niske koncentracije metalnih iona dovoljne su za iniciranje agregacije.[6]

Formiranje Aβ-dimera u kojima su monomeri povezani metalnim ionom može potaknuti agregaciju budući da je dimer prvi korak prilikom nukleacije. Njihovo nastajanje je moguće uzimajući u obzir dinamiku vezanja metala i fleksibilnost N-terminalnog kraja. Problem je u tome što takve vrste postoje u vrlo kratkom vremenskom intervalu i nije moguće zaključiti jesu li baš one prekursori agregacije.

Iz literature je poznato da se bakrovi(II) i cinkovi ioni brzo vežu na Aβ-peptid čime nastaje glavni kompleks. Brzom izmjenom metalnih iona između peptida stvaraju se kratkoživući dimeri premošteni metalnim ionom. Za bakrove(II) ione ti dimeri najvjerojatnije nisu prekursori agregacije jer EPR mjerenjima nisu uočene razlike u vezanju bakrovih(II) iona na monomer ili drugo agregirano stanje. U slučaju cinkovih iona, zabilježena je veća konstanta za vezanje na agregirano stanje. Iako cinkovi ioni imaju veću tendenciju stvaranja premoštenih dimera, nije sigurno jesu li ti dimeri prekursori.[5]

Nakon vezanja metalnih iona promjene u strukturi i dinamici ostatka peptida vode do vrsta sklonijih agregaciji. Moguće da je uzrok tome kontakt centralnih hidrofobnih regija (oko Phe19/20) različitih Aβ-peptida ili pak β-okret (Val24−Lys28) koja zbližava dvije hidrofobne regije peptida (Phe19/20 i 32-40). Smatra se kako time dolazi do stabilizacije β-strukture (najučestaliji strukturni motiv u fibrilima) čime se potiče agregacija. Osim toga, učeno je i stvaranje djelomične α-zavojnice koja kao intermedijer također može imati ulogu u agregaciji.

Jedan od važnijih parametara za razmatranje u procesu agreagcije je i ukupni naboj kompleksa s metalnim ionom. Zbog interakcija hidrofobnih dijelova peptida agregacija je najbrža pri neto naboju peptida jednakom nuli (izoelektrična točka). Pri višim ili nižim pH-vrijednostima otopine u odnosu na izolektričnu točku, nabijeni dijelovi peptida se međusobno odbijaju zbog čega im je topljivost nešto veća. Istraživanja na amiloidogenom peptidu, u uvjetima brze agregacije (svega nekoliko minuta), pokazala su kako pri ukupnom naboju nula dolazi do precipitacije amorfnih nakupina. Nasuprot tome, pri pozitivnom naboju (+2) stvaraju se amiloidni fibrili. Najveća brzina agregacije uočena je oko izoelektrične točke od ≈5,5.

Vezanje metalnog iona na Aβ-peptid uzrokuje promjene u ukupnom naboju. Pri pH-vrijednosti 7,4 peptid ima naboj −3, a metalni ioni +2. Prema tome, kompleks bakrovih(II) i cinkovih iona sa Aβ-peptidom, ukupnog naboja −1 bi trebao biti skloniji bržoj agregaciji. Osim

naboja metalnih iona u obzir treba uzeti i izmjenu hidrona uslijed njegovog vezanja. Bakrov(II) ion, za razliku od cinkovog, može deprotonirati atom dušika iz peptidne veze. To sugerira kako je cinkov ion efikasniji u induciraju agregacije jer vezanjem za Aβ-peptid stvara gotovo neutralan kompleks. S druge pak strane, to može biti točno samo pri većim koncentracijama Aβ-peptida kada je afinitet vezanja metalnih iona skoro zanemariv. Konstanta disocijacije kompleksa s cinkovim ionima je reda veličine 10^{-6}. Cinkovi ioni pri mikromolarnim koncentracijama peptida su samo djelomično vezani, dok se bakrovi(II) ioni vežu gotovo u potpunosti.[5]

2.4.2. Stvaranje amorfnih odnosno amiloidnih nakupina vezanjem metalnih iona

Proučavanjem utjecaja metalnih iona na kinetiku agregiranja Aβ-peptida dobiveni su kontradiktorni i pomalo zbunjujući rezultati. Za bakrove(II) i cinkove ione zabilježena je i inhibicija i inicijacija nastanka fibrila, dok u nekim slučajevima nije došlo do promjene.

Proučavanje dinamike peptida NMR-om pokazalo je kako se kompleksiranjem Aβ-peptida s bakrovim(II) ili cinkovim ionima postiže motiv β-okreta koji je sklon agregaciji. S druge strane, u nekim istraživanjima je pokazano kako vezanje bakrovih(II) iona na Aβ-peptid produžuje potrebno vrijeme za postizanje β-okreta u odnosu na peptid bez metalnog iona.

Jedan od razloga ovih kontradikcija je to što u ranijim rezultatima istraživanja nije bila navedena priroda tih nakupina. Kasnije je nađeno da su nakupine inducirane metalnim ionom pretežno nefibrilarne odnosno amorfne.

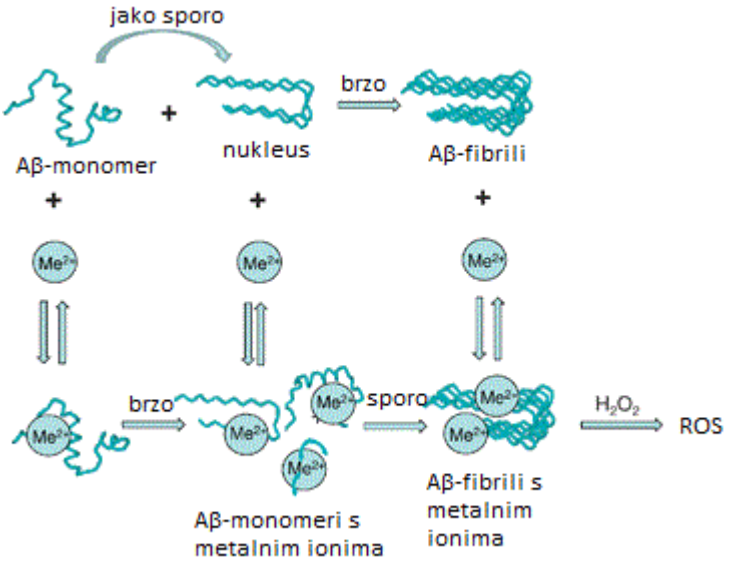
Amorfne nakupine Aβ-peptida, čiji je nastanak induciran metalnim ionima, nisu krajnji produkt agregacije već se iz njih razvijaju fibrili Aβ-peptida. Ta činjenica pokazuje da su amiloidni fibrili termodinamički stabilniji od amorfnih nakupina. Pri 37 °C, formiranje fibrila u prisutnosti metalnih iona ne traje dulje od 24 sata.

Generalno je prihvaćeno da cinkovi ioni induciraju brzu agregaciju Aβ-peptida (kraćih i dužih) u nefibrilarne nakupine, te da se pri većim koncentracijama peptida selektivno precipitiraju oligomeri. U nekim slučajevima, u prisutnosti cinkovih iona, uočeno je povećano stvaranje fibrilarnih struktura i njihova agregacija u plakove. Bakrovi(II) ioni također mogu inducirati agregaciju Aβ-peptida, ali je u njihovoj prisutnosti inhibirana agregacija cinkovim

ionima, što upućuje na to da su kompleksi s bakrovim topljiviji od kompleksa s cinkovim ionima.[2]

Metalni ioni s Aβ-peptidima stvaraju amorfne ili amiloidne nakupine (fibrile) ovisno o eksperimentalnim uvjetima. Ako su uvjeti takvi da je agregacija Aβ-peptida brza (npr. visoke koncentracije Aβ, $A\beta_{40-42}$ i metalnih iona, pH-vrijednost blizu pI...), vezanje metalnih iona dodatno ubrzava agregaciju i stvaranje amorfnih nakupina. Za stvaranje fibrila uređene strukture potrebno je više vremena pa se zato brzom agregacijom stvaraju neuređene amorfne nakupine. Sukladno tomu, sustav u kojem je agregacija Aβ-peptida spora (viša pH-vrijednost, niske koncentracije Aβ i $A\beta_{40-42}$-peptida) skloniji je stvaranju amiloidnih fibrila prilikom vezanja metalnih iona.

U stanju mirovanja, bez prisutnosti fibrilnih zrna (nukleusi) i metalnih iona, stvaranje fibrila je vrlo sporo i traje do tjedan dana. Cjelokupni proces može biti ubrzan u prisutnosti metalnih iona, budući da oni vrlo brzo stvaraju amorfne nakupine koje se potom sporijim procesom razvijaju u fibrile. Stoga, u uvjetima kada je agregacija Aβ-peptida spora prisutnost metalnih iona može ubrzati proces i povećati doseg nastalih fibrila (slika 11).

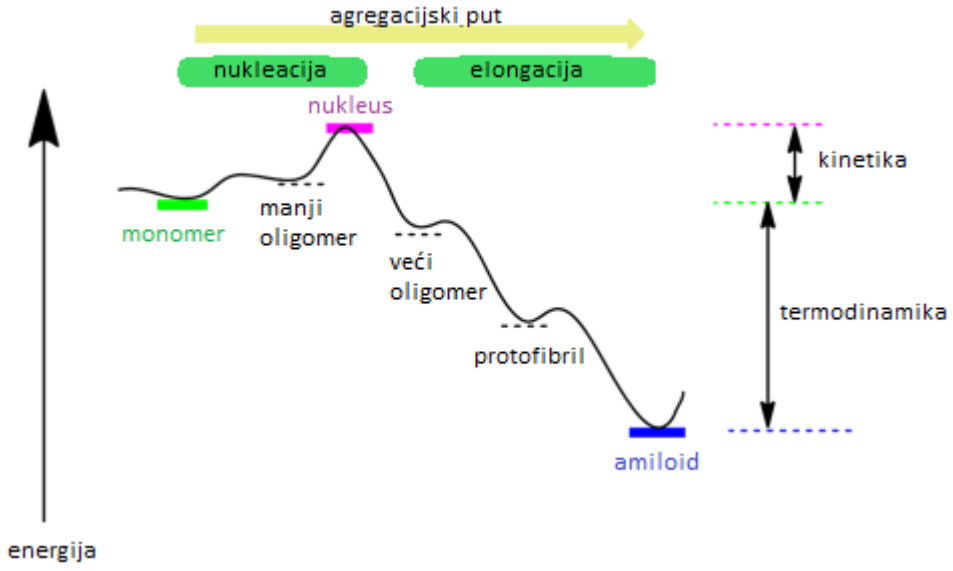


Slika 11. Dva različita puta fibrilizacije Aβ-peptida *in vitro* u prisutnosti metalnih iona. U prisutnosti fibrilnih zrna, stvaranje Aβ-fibrila je brz proces koji se usporava dodatkom metalnih iona zbog stvaranja amorfnih nakupina. Bez prisutnosti fibrilnih zrna, metalni ioni se vežu na Aβ-peptide stvarajući amorfne nakupine koje se potom razvijaju u fibrile.[2]

S druge strane, u prisutnosti fibrilnih zrna, vezanjem Aβ-monomera dolazi do brze fibrilizacije. Dodatkom metalnih iona u takav sustav može doći do njihovog vezanja na kraj rastućih fibrila. Također se stvara kompleks monomera s metalnim ionom u obliku amorfnih nakupina, čime se smanjuje koncentracija slobodnog peptida za fibrilizaciju. Time se usporava proces fibrilizacije (slika 11). Ono što je iznenađujuće jest da u takvim uvjetima cinkovi ioni, koji tvore nestabilniji kompleks sa Aβ-peptidom od bakrovih(II) iona, jače inhibiraju agregaciju. To može biti uzrokovano činjenicom da cinkovi u odnosu na bakrove ione brže stvaraju nefibrilarne nakupine, a može doći i do vezanja na rastući kraj fibrila. Vezanje metalnih iona je samo djelomično reverzibilan proces jer su oni zarobljeni unutar fibrila.[2,5]

2.4.3. Utjecaj vezanja metalnih iona na termodinamiku agregacije Aβ-peptida

Termodinamički gledano (slika 12), metalni ioni mogu utjecati na agregaciju destabilizacijom monomera (povećanjem njihove energije) ili stabilizacijom amiloida (smanjenjem njihove energije).[5]



Slika 12. Reakcijska koordinata stvaranja amiloida (plavo) iz monomera (zeleno). Kako je nukleus stanje najviše energije na reakcijskoj koordinati, njegovo formiranje je termodinamički nepovoljno. Iz nukleusa nastaje niz intermedijera niže energije do stvaranja fibrila.

Moguća su tri načina određivanja utjecaja metalnih iona na termodinamiku agregacije Aβ-peptida. Prvo, sedimentacijom i filtracijom nastalih fibrila u prisutnosti i bez prisutnosti metalnih iona. Ova metoda ne daje pouzdane rezultate pošto se ne može sa sigurnošću znati je li talog fibrilan ili amorfan. Također treba biti siguran da je agregacija upotpunosti završena.

Drugi, i bolji pristup je određivanje kritične koncentracije c_{kr} tj. minimalne koncentracije koja vodi do stvaranja amiloida. Ona je jednaka koncentraciji Aβ-monomera u prisutnosti amiloida u ravnoteži, a može se izraziti i kao k_{off}/k_{on}.

$$n(monomeri\ A\beta) \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftarrows}} amiloid\ (A\beta)_n$$

Do ovog zaključka su došli Wetzel i suradnici[5] tako što su dobili istu kritičnu koncentraciju krećući se od čisto monomernog ili čisto amiloidnog uzorka. Kao što je spomenuto, ova metoda se oslanja na ravnoteži između samo dva oblika monomerni i amiloidni. To može biti problem ako se uzme u obzir mehanizam agregacije u kojem nastaju i drugi intermedijeri.

U jednom istraživanju dobiveno je da se kritična koncentracija peptida u prisutnosti stehiometrijske količine cinkovih iona ne mijenja. Problem je bio to što se koristio fosfatni pufer i nisu se mogla napraviti mjerenja sa većom koncentracijom cinkovih iona jer bi došlo do taloženja cinkovog fosfata. Drugo je pak istraživanje pokazalo malu razliku kritične koncentracije Aβ-peptida bez i u prisutnosti cinkovih iona [bez, c_{kr} = 1,06 ± 0,18 μmol dm^{-3} i s cinkovim ionima c_{kr} = 1,36 ± 0,15 μmol dm^{-3}].[5]

Treća metoda za određivanje količine nastalih fibrila uključuje određivanje intenziteta flourescencije tioflavina-T (ThT) pri kraju agregacijskog procesa. ThT je benzotiazolna boja koja ima svojstvo fluorescencije nakon vezanja na amiloidne fibrile te se zato koristi za njihovo dijagnosticiranje *ex vivo* i *in vitro*. Ova je metoda također upitna iz nekoliko razloga: (i) zbog paramagnetičnosti bakrovih(II) iona može doći do smanjivanja fluorescencije, iako to nije slučaj kod Aβ-peptida; (ii) metalni ion može konkurirati ThT-u za vezno mjesto; (iii) metalni ion se može vezati za Aβ-peptid te promijeniti strukturu i vezno mjesto za ThT-a. Mjerenja rađena s cinkovim ionima pokazala su smanjenje fluorescencija ThT-a, iako se kritična koncentracija i ostali parametri nisu značajno promijenili.[5]

Nakon provedenih studija, pretpostavilo se kako cinkovi i bakrovi ioni ne utječu značajno na termodinamiku agregacije Aβ-peptida već je najveći utjecaj na kinetiku procesa. Iz tog razloga nisu se radila daljnja istraživanja u ovom području.

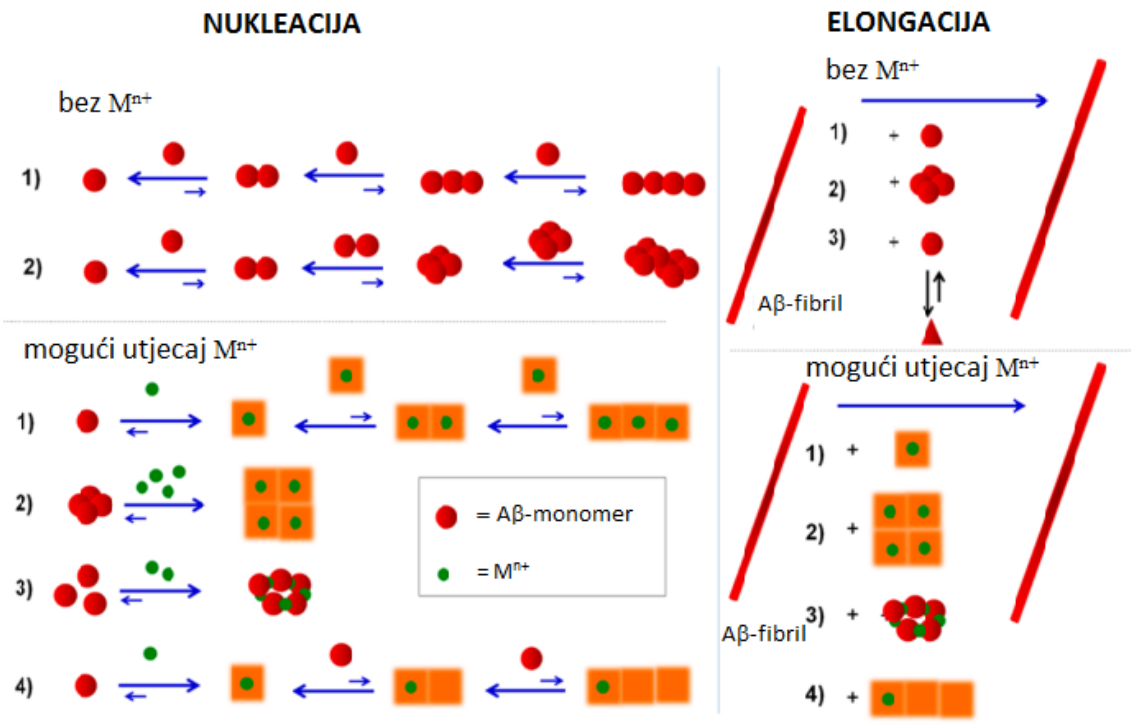
2.4.4. Utjecaj vezanja metalnih iona na kinetiku agregacije Aβ-peptida

Kao što već opisano, proces fibrilizacije sastoji se od nukleacije, elongacije i fragmentacije, a djelovanje metalnih iona na ove korake ovisi o eksperimentalnim uvjetima. U korištenoj literaturi navodi se da nema izvješća o utjecaju metalnih iona na fragmentaciju, dok je u fazi elongacije uočen blagi pad brzine agregacije prilikom vezanja metalnih iona na Aβ-peptid.[5]

Najveći utjecaj cinkovih i bakrovih(II) iona na kinetiku agregacije Aβ-peptida zabilježen je u fazi nukleacije. Mjerenja su pokazala smanjenje fluorescencije ThT-a, odnosno inhibiciju stvaranja amiloidnih fibrila. Metalni ioni su inducirali brzo stvaranje amorfnih nakupina koje su se kasnije razvile u fibrile.

Nije točno poznat mehanizam djelovanja metalnih iona na fazu nukleacije i elongacije. Neke od pretpostavki su prikazane na slici 13.

Iz navedenoga se može zaključiti da vezanje metalnih iona nema značajan utjecaj na osnovni mehanizam nukleacije i elongacije jer su krajnji produkti (fibrili) relativno slični. Glavna razlika je u kinetici te strukturi i stabilnosti intermedijera.



Slika 13. Mogući utjecaji metalnih iona na proces nukleacije i elongacije u agregaciji Aβ-peptida. Na slici lijevo je prikazan korak nukleacije. Bez prisutnosti metalnih iona nastajanje nukleusa odvija se dodatkom monomera (1) ili dodatkom oligomera (2). Vezanje metalnih iona može utjecati na kinetiku nukleacije promjenom energije nukleusa (prijelaznog stanja) i/ili stabilizacijom monomera. Do toga može doći prilikom stvaranja kompleksa i promjenom strukture monomera (1), oligomera (2), ili premoštavanjem Aβ-peptida metalnim ionom (3). Također vezanje metalnog iona može katalizirati daljnje agregiranje Aβ-peptida (4). Desno na slici prikazan je rast fibrila u fazi elongacije. Bez metalnih iona najčešće se odvija dodatkom monomera (1) ili oligomera (2). Metalni ioni mogu utjecati tako da (de)stabiliziraju konformere koji se onda bolje ili lošije vežu na kraj rastućeg fibrila. Primjeri struktura koje se u interakciji s metalnim ionima koji se mogu vezati na fibrile su: monomeri (1), oligomeri (2), monomeri premošteni metalnim ionom (3). Kao i u fazi nukleacije moguć je katalitički put (4) u kojem vezanje metalnog iona pomaže dodatku monomera na kraj fibrila.[5]

2.5. Zaključak

Jedan od najvažnih, ali i najtežih zadataka na ovom području je razmijevanje *in vivo* agregacije Aβ-peptida i različitih intermedijera te uloga bakrovih i cinkovih iona u samom procesu. Najveći problem je kontroliranje agregacije i ispitivanje intermedijera zbog čega dolazi do velikog neslaganja između eksperimentalno dobivenih rezultata. Unatoč tome mogu se iznijeti neki glavni zaključci.

Prvo, afinitet vezanja bakrovih(II) i cinkovih iona na Aβ-peptid je dovoljno velik čime dolazi do stvaranja monomernih kompleksa u sinaptičkoj pukotini. Bakrovi(II) i cinkovi ioni skloni su stvaranju amorfnih nakupina koje se nakon nekog vremena razvijaju u fibrile. Time je inhibirana trenutačna fibrilizacija Aβ-peptida. S druge strane u uvjetima malih koncentracija Aβ-peptida i metalnih iona agregacija je spora i potiče se stvaranje amiloidni fibrila.

Drugo, metalni ioni imaju najveći utjecaj na kinetiku agregacije u fazi nukleacije. Utjecaj je metalo-specifičan odnosno bakrovi(II) i cinkovi ioni daju različite koncentracije i tipove agregiranih intermedijera.

Treće, vezanje metalnih iona mijenja strukturu i naboj Aβ-peptida. Smanjenje ukupnog naboja peptida također uzrokuje agregaciju, ali više favorizira precipitaciju, dok se strukturne promjene u Aβ-peptidu čine važnije za stvaranje amiloidnih fibrila.

Dosadašnja istraživanja temeljena na interakcijama metalnih iona i Aβ-peptida mogu pomoći pri otkrivanju uspješne terapije. Tijekom prošlog stoljeća razmatrani su različiti metalni kelatori koji bi na sebe vezali bakrove i cinkove ione i tako smanjili njihovo nakupljanje u amiloidnim plakovima. Zamjenjivanje metalnih iona s intertnim ionima rutenija, platine i rodija također su dali dobre rezultate u pogledu inhibiranja agregacije Aβ-peptida.

Interakcije metalnih iona s amilodnim peptidima poput Aβ-peptida, priona, α-sinukleina i drugih otvaraju bezbroj mogućnosti za znanstvenike, od sinteze kelatora do analize kompleksa metala i amiloidnih peptida pri fiziološkim uvjetima.

§ 3. Literaturna vrela

1. http://www.humpath.com/spip.php?article13257 (preuzeto i prilagođeno 7. rujna 2016.)
2. V. Tõugu, A. Tiiman i P. Palumaa, *Metallomic* **3** (2011) 250-261.
3. D. J. Hayne, S. Lim I P. S. Donnelley, *Chem. Soc. Rev.* **43** (2014) 6701-6715.
4. https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_7/Page2.htm (preuzeto 5. srpnja 2016.)
5. P. Faller, C. Hureau i O. Berthoumieu, *Inorg. Chem.* **52** (2013) 12193-12206.
6. P. Faller, C.Hureau i G. La Penna, *Acc. Chem. Res.* **47** (2013) 2252-2259.
7. M. Ahmed, J. Davis, D. Aucoin, T. Sato, S. Ahuja, S. Aimoto, J. I Elliott, W. E Van Nostrand i S. O Smith, *Nature Structural & Molecural Biology* **17** (2010) 561-565.
8. J. Nasica-Labouze, P. H. Nguyen, F. Sterpone, O. Berthoumieu, N.-V. Buchete, S. Coté, A. De Simone, A. J. Doig, P. Faller, A. Garcia, A. Laio, S. Li Mai, S. Melchionna, N. Mousseau, Y. Mu, A. Paravastu, S. Pasquali, D. J. Rosenman, B. Strodel, B. Tarus, J. H. Viles, T. Zhang, C. Wang i P. Derreumaux, *Chem. Rev.* **115** (2014) 3518-3563.
9. https://www.researchgate.net/figure/280631671_fig2_Fig-2-A-b-aggregation-and-structure-a-Schematic-illustration-of-A-b-peptide (preuzeto i prilagođeno 7. rujna 2016.)
10. http://dementia.hiim.hr/neuro.htm (preuzeto 8. srpnja 2016.)