

Utjecaj metabolizma lipida na disfunkciju lizosoma i nastanak neurodegenerativnih bolesti

Kveštak, Daria

Undergraduate thesis / Završni rad

2010

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:217:019535>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-17**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

**UTJECAJ METABOLIZMA LIPIDA NA DISFUNKCIJU
LIZOSOMA I NASTANAK NEURODEGENERATIVNIH
BOLESTI**

**THE ROLE OF LIPIDS IN LYSOSOME DYSFUNCTION AND
THE PATHOGENESIS OF NEURODEGENERATIVE DISEASES**

SEMINARSKI RAD

Daria Kveštak

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: dr. sc. Silva Katušić Hećimović

Suvoditelj: doc. dr. sc. Dubravka Hranilović

Zagreb, 2010.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. Uvod | 2 |
| 2. Struktura i funkcija lizosoma | 2 |
| 3. Promjena metabolizma lipida u lizosomalnim bolestima nakupljanja lipida i povezanost s neurodegenerativnim bolestima, posebno s Alzheimerovom bolesti..... | 6 |
| 4. Disfunkcija endosomalnog/lizosomalnog sustava u neurodegenerativnim bolestima | 9 |
| 4.1. Disfunkcija endosomalnog/lizosomalnog sustava u Alzheimerovoj bolesti | 9 |
| 4.2. Disfunkcija endosomalnog/lizosomalnog sustava u Parkinsonovoj bolesti | 12 |
| 4.3. Disfunkcija endosomalnog/lizosomalnog sustava u Huntingtonovoj bolesti..... | 13 |
| 5. Zaključak | 14 |
| 6. Literatura | 15 |
| 7. Sažetak | 17 |
| 8. Summary | 18 |

1. Uvod

Lizosomi imaju važnu ulogu u recikliranju i unutarstaničnoj razgradnji makromolekula no postoji sve više dokaza da su lizosomi uključeni i u proces patogeneze različitih neurodegenerativnih bolesti uključujući Alzheimerovu bolest, Parkinsonovu bolest te Huntingtonovu bolest. U ovom ću se seminarskom radu stoga kratko osvrnuti na strukturu i funkciju lizosoma, promjenu metabolizma lipida u lizosomalnim bolestima nakupljanja lipida te na disfunkciju endosomalno/lizosomalnog sustava u neurodegenerativnim bolestima.

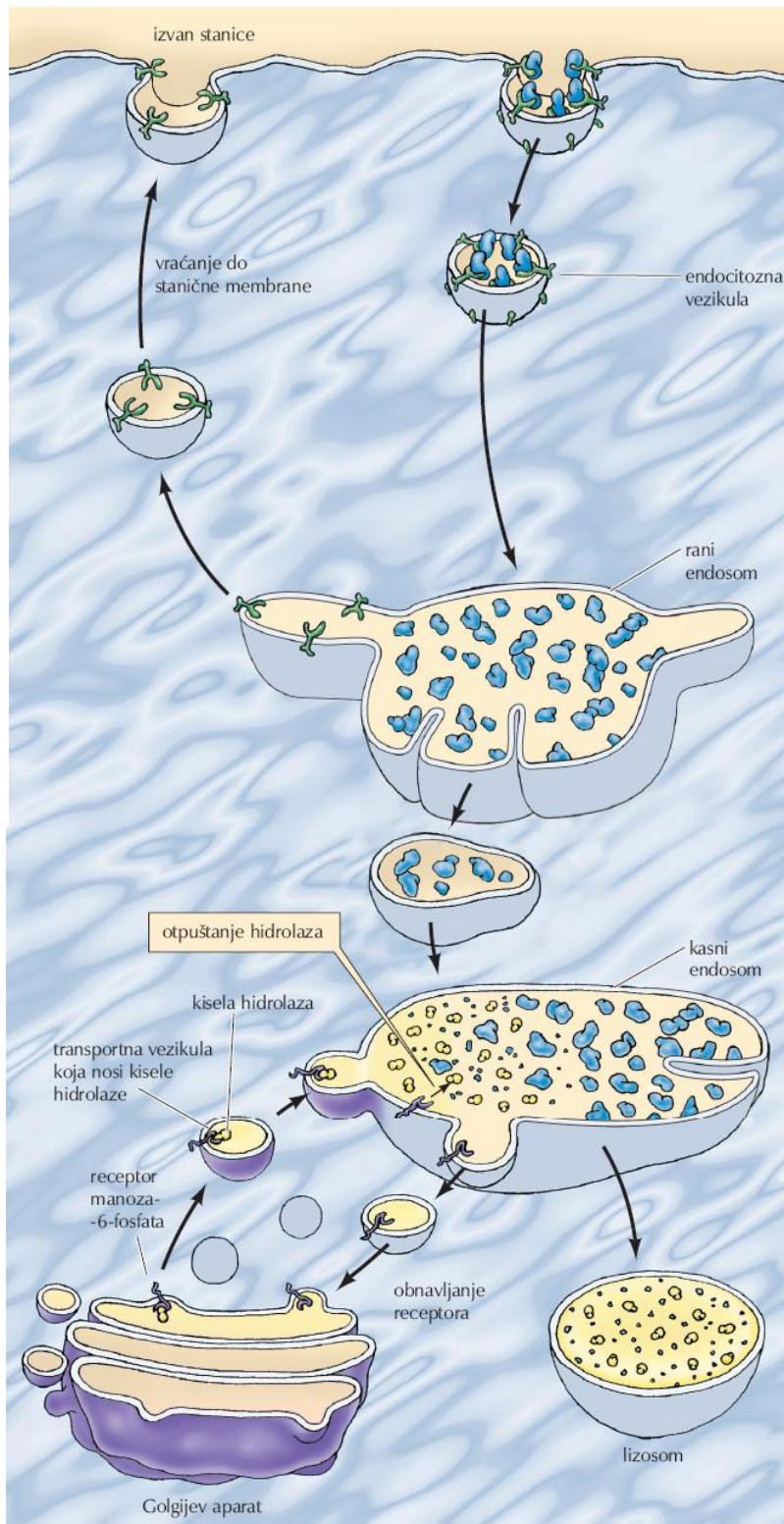
2. Struktura i funkcija lizosoma

U stanicama postoje dva glavna puta za razgradnju koji uključuju ili različite proteolitičke enzime unutar lizosoma (degradacijski endocitički put) ili multikatalitičku proteolitičku srž ubikvitin-proteasomalnog puta. Ubikvitin-proteasomalni put služi za razgradnju različitih staničnih proteina, kao npr. pogrešno savijenih proteina ili starih *housekeeping* proteina, za regulaciju staničnog ciklusa razgradnjom ciklina te staničnog imunog odgovora. Proteini koji su predodređeni za razgradnju navedenim putem obilježeni su kovalentno vezanim molekulama ubikvitina kao signalima prepoznavanja 26S podjedinice proteasoma. Navedeni je proces ovisan o ATP-u i ubikvitinu [1]. Uz ovaj put razgradnje, degradacijski endocitički put, koji uključuje lizosome, djeluje kao probavni sustav stanice i služi kako u razgradnji tvari unesenih izvana u stanicu procesom endocitoze ili fagocitoze, tako i u probavi dotrajalih ili suvišnih dijelova same stanice procesom autofagije [2].

Lizosomi su organeli okruženi membranom. Sadržavaju oko 50 kiselih hidrolaza, enzima za razgradnju, koji hidroliziraju proteine, nukleinske kiseline, ugljikohidrate i lipide. Kisele hidrolaze aktivne su u kiselom pH između 4,6 i 5 koji se održava u lizosomima, a pri neutralnom pH svojstvenom ostatku citoplazme nisu aktivni. U svom najjednostavnijem obliku lizosomi izgledaju kao gusti okrugli mjehurići, ali mogu poprimiti vrlo različitu veličinu i oblik ovisno o svojstvima onoga što probavljaju. Lizosomi su stoga morfološki raznoliki organeli, koji su definirani zajedničkom ulogom u razgradnji unutarstaničnih sastojaka [2]. Uključeni su i u različite fiziološke procese kao što su homeostaza kolesterola, popravak plazma membrane, obrana od patogena, stanična smrt i stanična signalizacija [3].

Za funkciju lizosoma potrebne su dvije skupine proteina: kisele hidrolaze i integralni lizosomalni membranski proteini. Lizosomalni membranski proteini nalaze se uglavnom na lizosomalnoj membrani i imaju različite funkcije kao što su zakiseljavanje lumena lizosoma, unos proteina iz citosola, fuzija membrana i transport probavljenih produkata u citoplazmu. Glavna skupina lizosomalnih proteaza su katepsini koji su podijeljeni u tri podskupine prema aminokiselini u aktivnom mjestu koja je odgovorna za katalitičku aktivnost enzima. U podskupini cistein katepsina nalaze se katepsini B, C, F, H, K, L, N, O, S, T, U, W i X, u skupini aspartil katepsina, katepsini D i E te u skupini serin katepsina, katepsini A i G. Katepsini se sintetiziraju na ribosomima vezanim na membrani kao N-glikozilirani prekursori te se zatim prenose u endoplazmatski retikulum pa u Golgijev kompleks. Tijekom transporta u Golgijev kompleks, ugljikohidratni dijelovi prokatepsina se modificiraju što uključuje stvaranje manoza 6-fosfatnih (M6P) ostataka. Nakon vezanja na M6P-specifične receptore, kompleks enzim-receptor izlazi iz *trans*-Golgijeve mreže u klatrinom obloženoj vezikuli i transportira se prema kasnim endosomima. Nakon fuzije s kasnim endosomom dolazi do disocijacije liganda. Aktivni katepsini nastaju nakon što proteaze pocijepaju propeptid u kiselim uvjetima kasnih endosoma ili lizosoma. Aktivnost katepsina regulirana je različitim mehanizmima kao što su regulacija sinteze, procesiranje zimogena, endogeni inhibitori i stabilnost pH. Katepsini imaju važnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima kao što su degradacija proteina, prezentacija antigena i procesiranje hormona [4].

Jedna od glavnih uloga lizosoma jest probava sastojaka unesenih izvana endocitozom u stanicu. Međutim, uloga lizosoma u probavi sastojaka unesenih endocitozom ne odnosi se samo na njihovu funkciju, već i na njihov nastanak. Lizosomi zapravo nastaju stapanjem transportnih vezikula koje pupaju iz *trans* Golgijeve mreže s endosomima, a sadržavaju molekule unesene endocitozom sa stanične membrane. Nastanak endosoma i lizosoma predstavlja raskrižje između sekrecijskoga puta, tijekom kojeg se lizosomski enzimi doraduju, i endocitoznog puta, kojim se izvanstanične molekule unose sa stanične površine. Sastojci iz okoline unose se u stanicu putem endocitoznih mjehurića obloženih klatrinom, koji pupaju sa stanične membrane i potom se stapaju s ranim endosomima. Sastojci membrane obnavljaju se tako da se vraćaju i ugrađuju natrag u staničnu membranu, a rani endosomi postupno dozrijevaju u kasne endosome, koji su prethodnici lizosoma. Jedna od važnih promjena tijekom dozrijevanja endosoma jest snižavanje unutarnjeg pH do oko 5,5, što je ključno za lizosomske kisele hidrolaze koje dolaze iz *trans* Golgijeve mreže (Slika 1.) [2].



Slika 1. Endocitoza i nastanak lizosoma. Molekule izvan stanice unose se u endocitozne vezikule, koje se stapaju s ranim endosomima. Sastojci membrane vraćaju se na staničnu membranu recikliranjem iz ranih endosoma, a rani endosomi dozrijevaju u kasne endosome. Transportne vezikule, koje nose kisele hidrolaze iz Golgijeva aparata, stapaju se s kasnim endosomima, koji dozrijevaju u lizosome kad steknu cijeli raspon lizosomskih enzima. Kisele se hidrolaze odvajaju od receptora manoza-6-fosfata kad se transportna vezikula stopi s kasnim endosomom, a receptori se vraćaju u Golgijev aparat. Slika je dijelom preuzeta iz Cooper, Stanica: molekularni pristup [2]

Degradacijski endocitički put započinje na plazmatskoj membrani i završava u lizosomima. Između ove dvije "postaje" endocitirani sadržaj prolazi kroz različite endosomalne intermedijere koji se razlikuju po sadržaju, morfologiji i pH. Stalna izmjena dolaznih i odlaznih membrana i višestruka fuzija rezultira postepenom pregradnjom endosomalnih intermedijera u zrelije stadije endosoma, procesom sazrijevanja [5]. Rani endosomi (EE, od engl. *early endosomes*) su glavni primatelji dolazećih endocitoznih vezikula s plazmatske membrane i endogenih proteina, kao što su kisele hidrolaze vezane na manoza-6-fosfat receptor, iz trans Golgijeve mreže (TGN). Glavna funkcija ranih endosoma je razvrstavanje primljenog sadržaja u skupine za recikliranje ili degradaciju. Sadržaj namijenjen za lizosome ostaje u vakuolama ranih endosoma, a sadržaj koji je potrebno reciklirati ulazi u tubularne endosome za sortiranje, tj. reciklirajuće endosome (RE, od engl. *recycling endosomes*). U blago kiselim uvjetima ranih endosoma lizosomalne hidrolaze disociraju s manoza-6-fosfat receptora i ostaju u lumenu endosoma, a manoza-6-fosfat receptor se vraća u TGN za novi transport. Kasni endosomi (LE, od engl. *late endosomes*) su globularne vakuole okružene dvoslojem klatrina. Sadrže veliki broj intraluminalnih vezikula. Kasni endosomi ne sadrže značajne količine tvari za recikliranje na plazma membranu, ali umjesto toga imaju povišenu razinu proteina koji su namijenjeni degradaciji u lizosomima i značajne razine lizosomskih hidrolaza. Kasni endosomi imaju povećan degradacijski kapacitet te povećanu sposobnost fuzije s ostalim kasnim endosomima (homofuzija) i prelizosomima (heterofuzija) [3].

Prema fiziološkim funkcijama u različitim stadijima, lizosomi se mogu podijeliti na primarne lizosome, sekundarne lizosome i rezidualna tijela. Primarni lizosomi su unutarstanični organeli okruženi membranom, koji sadrže različite hidrolitičke enzime uključujući kisele fosfataze, glukoronidaze, sulfataze, ribonukleaze i kolagenaze. Navedeni se enzimi sintetiziraju u hrapavom endoplazmatskom retikulumu te se zatim pakiraju u vezikule u Golgijevom aparatu. Primarni lizosomi fuzioniraju s vakuolama okruženim membranom koje sadrže tvari koje je potrebno probaviti te na taj način formiraju sekundarne lizosome. Rezidualna tijela sadrže samo neprobavljive ili sporo probavljive tvari te enzime čija je aktivnost gotovo iscrpljena [4].

3. Promjena metabolizma lipida u lizosomalnim bolestima nakupljanja lipida i povezanost s neurodegenerativnim bolestima, posebno s Alzheimerovom bolesti

Uzrok lizosomalnih bolesti nakupljanja lipida (Tablica 1.) u većini slučajeva je neispravna aktivnost lizosomalnih proteina što rezultira akumuliranjem nerazgrađenih metabolita unutar lizosoma. Danas je poznato više od 30 lizosomalnih bolesti nakupljanja lipida, a svrstavaju se prema neispravnosti enzima ili proteina.

Tablica 1. Lizosomalne bolesti nakupljanja lipida. Tablica je preuzeta i prilagođena iz članka Futerman A.H., The cell biology of lysosomal storage disorders [6]

| Bolest | Nefunkcionalni protein | Nataložena supstanca |
|--|--|--|
| Sfingolipidoze | | |
| Fabryjeva bolest | α -galaktozidaza A | globotriazilceramid |
| Farberova bolest | ceramidaza | ceramid |
| Gaucherova bolest | β -glukozidaza saposin-C aktivator | glukozilceramid glukozilceramid |
| Niemman-Pickova bolest tipa A i B | sfingomijelinaza | sfingomijelin |
| GM1 ganglioziidoze | β -galaktozidaza | GM1 gangliozyd |
| GM2 ganglioziidoze (Tay-Sachs) | β -heksozaminidaza A | GM2 gangliozyd i slični glikolipidi |
| GM2 ganglioziidoze (Sandhoff) | β -heksozaminidaza A i B | GM2 gangliozyd i slični glikolipidi |
| Mukopolisaharidoze (MPS) | | |
| MPS I (Hurler, Scheie, Hurler/Scheie) | α -iduronidaza | dermatan sulfat i heparan sulfat |
| MPS II (Hunter) | iduronat-2-sulfataza | dermatan sulfat i heparan sulfat |
| MPS IIIA (Sanfilippo) | heparan N-sulfataza (sulfamidaza) | heparan sulfat |
| MPS IIIB (Sanfilippo) | N-acetil- α -glukozaminidaza | heparan sulfat |
| MPS IIIC (Sanfilippo) | acetil-CoA: α -glukozamid, N-acetiltransferaza | heparan sulfat |
| Morquio B | β -galaktozidaza | keratan sulfat |
| MPS VI (Maroteaux-Lamy) | N-acetilgalaktozamin-4-sulfataza | dermatan sulfat |
| MPS VII (Sly) | β -glukuronidaza | heparan sulfat, dermatan sulfat, hondroitin-4-sulfataza |
| Oligosaharidoze i glikoproteinoze | | |
| Pompeova bolest (glikogenoza tipa II) | β -glukozidaza | glikogen |

| Bolesti uzrokovane defektom u integralnom membranskom proteinu | | |
|---|--------------------------------------|--|
| Cistinoza | cistinozin | cistin |
| Danonova bolest | LAMP2 | dijelovi citoplazme, glikogen |
| Mukolipidoza (ML) IV | mukolipin-1 | lipidi i mukopolisaharidi |
| Niemann-Pickova bolest tip C | NPC1 i 2 | kolesterol i sfingolipidi |
| Ostale | | |
| Galaktosijalidoza | katapsin A | sijaliloligosaharidi |
| Neuronska ceroidna lipofuscinoza (NCL)1 (Battenova bolest) | CLN1 (protein palmitoiltoesteraza-1) | lipidni tioesteri |
| (NCL)2 (Battenova bolest) | CLN2 (tripeptidil amino peptidaza-1) | podjedinica c mitohondrijske ATP sintaze |

Niemann-Pickova bolest tipa C (NPC) je autosomalna recesivna bolest koja nastaje usljed mutacija u genu *NPC1*, a rjeđe u genu *NPC2*. Osim tipa C skupini Niemann-Pickovih bolesti (NPD) pripadaju i tipovi A i B. NPC se razlikuje od tipova A i B po tome što ima funkcionalnu sfingomijelinazu dok kod preostala dva tipa ona djelomično ili u potpunosti nedostaje pa ne dolazi do pretvaranja sfingomijelina u ceramid. Sfingomijelin je jedan od četiri glavna fosfolipida plazma membrane stanica sisavaca te je važan strukturni lipid membrana neurona. Sfingomijelin se sintetizira u Golgijevom aparatu dodatkom ceramida na fosfokolin uz enzim sfingomijelin sintazu [6]. Patološka promjena u funkciji endocitoze zamijećena u postmitotičkim neuronima može se povezati s promjenama u metabolizmu sfingomijelina/ceramida i nakupljanjem unutarstaničnog ceramida [7].

Bolest NPC karakterizira nakupljanje neesterificiranog kolesterola i glikolipida u endosomalno/lizosomalnom sustavu. Kolesterol se normalno koristi za izgradnju stanice ili formiranje estera. Kod osoba s bolesti NPC postoji velika količina slobodnog kolesterola (neesterificiranog kolesterola) koja se ne koristi za izgradnju stanice ili formiranje estera kolesterola, već se nakuplja u stanicama širom tijela, posebno u slezeni, jetri, koštanoj srži i mozgu. Takav „neprerađeni“ kolesterol, kao i glikolipidi, nakupljeni u mozgu uzrokuju progresivno neurološko oštećenje. Mutacije u jednom od gena *NPC*, *NPC1* ili *NPC2*, uzrokuju smrtonosnu neurodegenerativnu Niemann-Pickovu bolest tipa C (NPC) povezanu s abnormalnim nakupljanjem kolesterola u stanici. Gen *NPC1* kodira za protein koji je lokaliziran u membranama unutar stanice i uključen je u transport kolesterola i lipida unutar stanice tj. odgovoran je za prijenos kolesterola iz ranih endocitoznih vezikula do plazmatske

membrane i/ili do endoplazmatskog retikuluma. Nedostatak navedenog proteina dovodi do abnormalnog nakupljanja lipida i kolesterola u kasnim endosomima/lizosomima. Gen *NPC2* stvara protein koji veže i transportira kolesterol. Povišena razina kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima kod NPC ometa transport proteina između ovih odjeljaka. Svi tipovi NPD svrstani su u bolesti nakupljanja sfingolipida (SLD) koje karakterizira nedostatak lizosomskih hidrolaza ili nakupljanje neprobavljenih lipida u lizosomima. Do promjene metabolizma sfingolipida dolazi i kod neuronske ceroidne lipofuscinoze (Battenova bolest), gdje se hidrofobni peptidi/proteini ne mogu normalno razgraditi u lizosomima [8].

Iako se NPC i Alzheimerova bolest razlikuju, imaju neke zajedničke karakteristike kao što su stvaranje neurofibrilarnih snopića, disfunkcija lizosoma i utjecaj genotipa apolipoproteina E4. Smatra se da lipoproteinske čestice koje sadrže apolipoprotein E (apoE) imaju ulogu u prijenosu lipida i kolesterola iz cerebrospinalne tekućine do neurona u središnjem živčanom sustavu. Astroglia je glavni izvor apoE u mozgu. Kod pojedinaca koji imaju dvije kopije apoE4 alela postoji rizik od razvoja Alzheimerove bolesti (AB) [9]. Ova saznanja ukazuju da lipidi imaju važnu ulogu u razvoju AB. Terapija statinima, lijekovima koji snižuju razinu kolesterola, smanjuje unutarstaničnu i vanstaničnu razinu peptida amiloid- β 1-42 ($A\beta$ 1-42) u kulturi neurona hipokampusa i miješanih kortikalnih neurona. Unutarstanično nakupljanje neprobavljenih, netopivih $A\beta$ agregata može dovesti do slabe regulacije sfingomijelinaze i aktivacije hidrolize sfingomijelina na plazmatskoj membrani. Abnormalno nakupljanje ceramida može dovesti do promjena endosomalnog/lizosomalnog protonskog gradijenta i promjene endocitoznog prijenosa kao i metabolizma kolesterola [10]. Aktivacija metabolizma sfingomijelina i nakupljanje ceramida može poslužiti kao objašnjenje za abnormalno procesiranje lizosomskih hidrolaza i povećan volumen endocitičkih vezikula zamjećanih kod Alzheimerove bolesti i ostalih neurodegenerativnih bolesti. Pokazano je da povećana razina ceramida može ometati normalnu razinu katepsina D ili povećati stopu fuzije membranskih vezikula. Disfunkcija lizosoma u mozgu ima važnu ulogu u bolestima nakupljanja proteina, kao npr. u nastanku neurodegenerativnih bolesti.

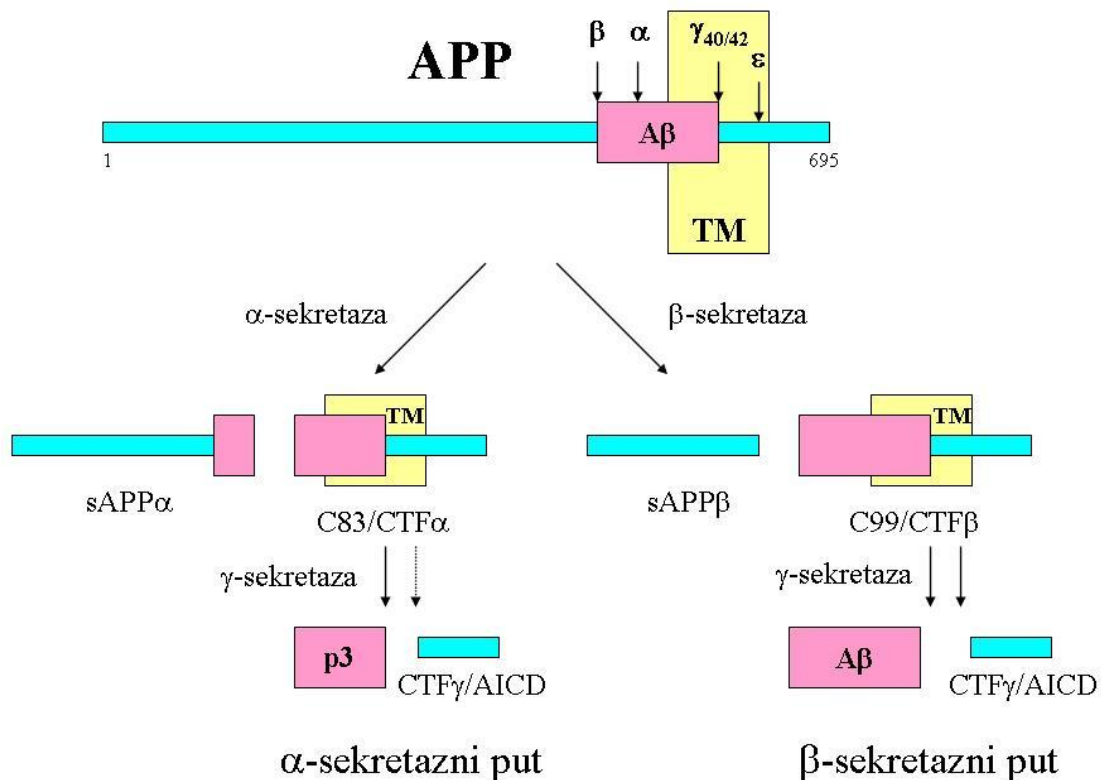
4. Disfunkcija endosomalnog/lizosomalnog sustava u neurodegenerativnim bolestima

Endosomalno/lizosomalni put odgovoran je za recikliranje i unutarstaničnu razgradnju makromolekula. Kod različitih patoloških stanja, kao i kod procesa starenja endosomalno/lizosomalni sustav može biti oštećen i postati nefunkcionalan. Oštećene lizosome karakterizira nakupljanje neprobavljenih tvari, kao što je lipofuscin, a u nekim se slučajevima hidrolaze mogu otpustiti u citosol i uzrokovati unutarstaničnu razgradnju. Nedostatak aktivnosti lizosomalnih enzima može spriječiti funkciju ovih organela i izazvati nakupljanje različitih molekula unutar stanice. Abnormalno nakupljanje neprobavljenih staničnih komponenti unutar neurona može dovesti do stanične smrti što tijekom vremena može doprinijeti razvoju različitih neurodegenerativnih bolesti [4,11].

4.1. Disfunkcija endosomalnog/lizosomalnog sustava u Alzheimerovoj bolesti

Alzheimerova bolest (AB) je progresivni neurodegenerativni poremećaj kojeg karakteriziraju kognitivni poremećaji te poremećaji u pamćenju. Senilni plakovi i neurofibrilarni snopići patološki su markeri karakteristični za ovu bolest, a pronađeni su u cerebralnom korteksu i hipokampusu. Senilni plakovi sastavljeni su od nataloženih β -amiloidnih peptida ($A\beta$), dok su neurofibrilarni snopići sastavljeni od abnormalno fosforiliranog proteina Tau. Patološko nakupljanje $A\beta$ i hiperfosforilacija Tau proteina mogu potaknuti gubitak sinapsi što se može povezati s gubitkom kognitivnih sposobnosti. Nakupljanje $A\beta$ može inducirati disfunkciju neurona i staničnu smrt što je jedna od karakteristika Alzheimerove bolesti [4,12].

Peptid $A\beta$ nastaje proteolitičkim cijepanjem prekursora proteina β -amiloid (APP) uz pomoć α -, β - i γ -sekretaze. α -Sekretaza cijepa u sredini peptida $A\beta$ i na taj način blokira stvaranje $A\beta$, dok β - i γ -sekretaza cijepaju na N- i C-krajevima $A\beta$ sekvence te potiču stvaranje peptida $A\beta$ (Slika 2.).



Slika 2. Procesiranje proteina APP. Protein APP se procesira α - i β -sekretaznim putem. S obzrom da je β -sekretazni put odgovoran za stvaranje peptida $A\beta$, još se naziva i amiloidogeni put razgradnje proteina APP.

Postoje dva stanična puta za stvaranje peptida $A\beta$: sekretorni i endosomalno/lizosomalni put. β -sekretaza je transmembranska aspartil proteaza koju kodira gen *BACE1*. Većinom se nalazi u endosomima i lizosomima te je uključena u endosomalno/lizosomalnom putu. γ -sekretaza je dio kompleksa multimernog proteina visoke molekulske mase. Njezina je aktivnost dokazana u autofagosomima i lizosomima. Proteini presenilin 1 (PS1) i presenilin 2 (PS2) čine aktivni centar γ -sekretaznog kompleksa, u koji još ulaze proteini nikastrin, Pen2 i Aph1 [13-15]. Endosomalno/lizosomalni put se smatra glavnim mjestom cijepanja proteina APP β -sekretaznim putem do peptida $A\beta$.

Provedena su istraživanja ukazala na povezanost morfologije i disfunkcije endosoma i lizosoma u Alzheimerovoj bolesti. Disfunkcija endosoma/lizosoma smatra se najranijom histološkom promjenom u AB. U pacijenata s Alzheimerovom bolesti uočeni su povećani endosomi, kao i u pacijenata s Down sindromom koji zbog trisomije kromosoma 21 imaju još jednu kopiju gena APP te se i kod njih javlja Alzheimerova demencija. Amiloidni plakovi su

puni aktivnih lizosomalnih proteaza što ukazuje da plakovi potječu iz oštećenih lizosoma. Katepsini D i E (unutarstanične aspartil proteaze) utječu na stvaranje A β peptida unutar endosomalno/lizosomalnog puta jer pokazuju sličnu aktivnost kao β - i γ -sekretaza. Inhibitori aktivnosti katepsina uzrokuju brzu izgradnju potencijalno amiloidnih proteinskih fragmenata. Neuspješna degradacija agregiranih A β 1-42 u kasnim endosomima ili sekundarnim lizosomima doprinosi unutarstaničnom nakupljanju A β kod AB. Cisteinska proteaza katepsin B u lizosomima degradira A β peptide. Delecija katepsina B povećava razinu A β 1-42 te pogoršava nakupljanje plakova. Inkubacija kulture neurona s citotoksičnim koncentracijama topljivih A β 1-42 izaziva brzo stvaranje slobodnih radikala unutar lizosoma i prekida protonski gradijent na membrani lizosoma što prethodi staničnoj smrti.

Tau, fosfoprotein povezan s mikrotubulima, ima važnu ulogu u održavanju morfologije lizosoma. Tau protein se normalno nalazi u aksonima neurona gdje stabilizira mikrotubule. Pod patološkim uvjetima, kao u Alzheimerovoj bolesti, hiperfosforilirani Tau nakuplja se u neuronima u obliku sparenih helikalnih filamenata koji formiraju neurofibrilarne snopiće. Eksperimentalno inducirana disfunkcija lizosoma aktivira razvoj značajki karakterističnih za ljudski mozak u starosti što uključuje proliferaciju endosoma/lizosoma, hiperfosforilaciju Tau proteina, proizvodnju fragmenata Tau proteina nalik onima koji su pronađeni u neurofibrilarnim snopićima, nakupljanje proteina veličine 16-30 kDa koji uključuju amiloidne sekvence. Inhibitor katepsina D blokira stvaranje hiperfosforiliranih Tau fragmenata u hipokampusu kod Alzheimerove bolesti. Autofagni/lizosomalni sustav ima ulogu u raščišćavanju Tau proteina, dok disfunkcija navedenog sustava rezultira stvaranjem netopljivih agregata Tau proteina u lizosomima. Tau protein prisutan je u fosforiliranom i agregiranom obliku ne samo u Alzheimerovoj bolesti, već i u ostalim patološkim stanjima. Frontotemporalna demencija vezana uz kromosom 17 (FTDP-17) je autosomalna dominantna bolest s promjenjivim kliničkim i neuropatološkim značajkama. Neuropatološke promjene uključuju frontotemporalnu atrofiju ponekad s atrofijom bazalnih ganglija, *substantiae nigre* i amigdale. FTDP-17 je uzrokovana mutacijom u genu za Tau protein [4]. Kako bi istražili kako promjene Tau proteina izazivaju neurodegeneraciju, Lim et al. [16] koristili su transgenične miševe koji ekspimiraju ljudski Tau s četiri tubulin vezujuća ponavljanja i tri FTDP-17 mutacije. Ultrastrukturalna analiza mutanata Tau pozitivnih neurona pokazala je pojavu predsnopića s filamentima Tau proteina i povećanim brojem lizosoma koji pokazuju promijenjenu morfologiju sličnu kao kod onih u Alzheimerovoj bolesti. Modifikacije Tau proteina mogu izazvati disfunkciju lizosoma i ukazuju da bi to mogao biti uzrok neurodegeneraciji kod tauopatija.

4.2. Disfunkcija endosomalnog/lizosomalnog sustava u Parkinsonovoj bolesti

Parkinsonova bolest je neurodegenerativni poremećaj kojeg karakterizira tremor u mirovanju, hipokinezija i posturalna nestabilnost. Uzrokovana je degeneracijom dopaminergičnih neurona unutar *substantiae nigre*. Patološki marker Parkinsonove bolesti je nakupljanje α -sinukleina (α -syn) u neuronima. α -Sinuklein se metabolizira ubikvitin-proteasomalnim putem, a mutacije α -sinukleina dovode do sporije razgradnje u ubikvitin-proteasomalnom putu, do nakupljanja proteina i na kraju do smrti stanice. Čini se da mutirani α -sinuklein oštećuje dopaminergične stanice čineći ih osjetljivijim na oksidativni stres, promičući agregaciju α -sinukleina i apoptozu ovisnu o dopaminu. Dijelovi mozga koji su pogođeni u Parkinsonovoj bolesti pokazuju neuronske intracitoplazmatske nakupine, Lewy tjelešca koja su bogata nakupinama α -sinukleina, ali i drugim proteinima kao što su dijelovi ubikvitin-proteasomalnog puta, molekularni *chaperoni* i lipidi.

Obitelj syn peptida je grupa presinaptičkih proteina kojoj pripadaju α -, β - i γ -syn. Ove proproteine karakterizira nesavijena struktura s visoko konzerviranim N-terminusom i odvojene C-terminalne kisele regije. α -syn razlikuje se od ostalih članova syn obitelji po tome što sadrži hidrofobnu središnju regiju. Živčani završeci uključeni u sinaptičku funkciju bogati su α -sinukleinom. Tijekom normalnog starenja i u Parkinsonovoj bolesti raste razina savijenih α -sinukleina u citoplazmi neurona *substantiae nigre*.

U jednom od provedenih *in vitro* istraživanja u kojem su koristili rekombinantne ili endogene α -sinukleine kao supstrat i pročišćeni katepsin D ili lizosome pokazali su da katepsin D razgrađuje α -sinuklein, a ograničena proteoliza rezultira stvaranjem krnjeg C-terminusa.

Neke studije pokazuju da su dvije odvojene α -syn mutacije A53T i A30P odgovorne za slične oblike Parkinsonove bolesti. Patogeni A53T i A30P vezani za receptor na membrani lizosoma inhibiraju vlastitu razgradnju te razgradnju drugih tvari. Stanična linija PC12 koja eksprimira mutirani, ali ne i divlji tip α -syn pokazuje smetnje ubikvitin ovisnog proteolitičkog sustava, akumulaciju autofagno-vezikularnih struktura i smanjenje lizosomalne hidrolize i proteasomalne funkcije [4].

4.3. Disfunkcija endosomalnog/lizosomalnog sustava u Huntingtonovoj bolesti

Huntingtonova bolest je autosomalno dominantno neurodegenerativno oboljenje koje karakteriziraju nekontrolirani pokreti popraćeni kognitivnim oštećenjima i emocionalnim poremećajima. Patološke značajke Huntingtonove bolesti su atrofija, gubitak neurona i astrogliaza u neostriatumu. Iako su kod Huntingtonove bolesti pogođene različite populacije neurona striatuma, najosjetljiviji su projekcijski neuroni striatuma koji sadrže γ -aminomaslačnu kiselinu i tvar P ili enkefalin. Kao i kod Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, kod Huntingtonove bolesti dolazi do pogrešnog savijanja proteina. Uzrokovano je ekspanzijom tripleta CAG u genu *IT15 (HD)* što rezultira povećanom poliglutaminskom regijom na N-terminusu proteina huntingtina. Broj ponavljanja tripleta CAG je u rasponu od 9 do 35 u zdravih osoba, dok je kod oboljelih pronađeno 36-121 ponavljanja. Formiranje nakupina unutar jezgre i citoplazmatskih agregata u neuronima biološki je marker mutiranog huntingtin gena. Inkluzije i agregati su kolokalizirani s drugim staničnim proteinima uključenim u proteolizu, transport vezikula i degradaciju proteina. Cijepanjem huntingtin proteina otpušta se N-terminalni fragment koji sadrži poliglutaminsku regiju. Fragmenti koji sadrže poliglutaminsku regiju normalne duljine ne akumuliraju se unutar stanice dok se fragmenti koji sadrže povećanu poliglutaminsku regiju mogu saviti u strukturu koja se ne može razgraditi proteasomalnim putem te se akumulira u citoplazmi ili jezgri. U *in vitro* uvjetima mutirani huntingtin uzrokuje staničnu smrt. Nakupljanje mutiranog huntingtin proteina može se povezati i s padom funkcije proteasoma tijekom starenja. Mutirani huntingtin protein ili inhibicija proteasoma u *in vitro* uvjetima može povećati količinu lizosomalnih proteaza.

Inhibicija autofagije s 3-metiladeninom povećava akumulaciju mutiranog huntingtin proteina i njegovih agregata dok poticanje autofagije dodatkom rapamicina reducira akumulaciju mutiranog huntingtin proteina i njegovih agregata. Autofagija je uključena u aktivaciju katepsina i kaspaze-3 potaknuta prekomjernom ekspresijom huntingtin gena. *In vitro* istraživanja pokazala su da katepsin D uspješno razgrađuje divlji tip huntingtin proteina dok je mutirani protein huntingtin otporniji na katepsin D. Autofagija može potaknuti cijepanje i razgradnju huntingtin proteina aktivacijom kaspaze-3 i katepsina D [4].

5. Zaključak

U ovom seminarskom radu dala sam kratak osvrt na strukturu i funkciju lizosoma, promjenu metabolizma lipida u lizosomalnim bolestima nakupljanja lipida te na disfunkciju endosomalno/lizosomalnog sustava u neurodegenerativnim bolestima, posebno u Alzheimerovoj bolesti. Pretpostavlja se da promijenjen metabolizam lipida može biti primarni uzrok nastanka neurodegenerativnih bolesti, kao npr. Alzheimerove, Parkinsonove i Huntingtonove bolesti, na način da uzrokuje disfunkciju endosomalnog/lizosomalnog puta te nakupljanje različitih proteina i stvaranje netopivih agregata.

6. Literatura

1. Jayhyuk Myung, Kyung Bo Kim, Craig M. Crews, The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Proteasome Inhibitors, Inc. *Med Res Rev*, 21, No. 4, 245±273, 2001.
2. Geoffrey M. Cooper, Stanica: molekularni pristup, Medicinska naklada, Zagreb, 2004.
3. Saftig P. and Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function, *Nature reviews*, 2009.
4. Lisha Zhang, Rui Sheng, and Zhenghong Qin, The lysosome and neurodegenerative diseases, *Acta Biochim Biophys Sin*, 2009.
5. Dunn, K. W. & Maxfield, F. R. Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J. Cell Biol.* **117**, 301–310, 1992.
6. Futerman AH and van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev*, 5: 554–565, 2004.
7. K. Ditaranto-Desimone, M. Saito, T.L. Tekirian, M. Berg, G. Dubowchik, B. Soreghan, S. Thomas, N. Marks, A.J. Yang, Neuronal endosomal/lysosomal membrane destabilization activates caspases and induces abnormal accumulation of the lipid secondary messenger ceramide, *Brain Res. Bull.* 59, 523– 531, 2003.
8. Brian Soreghan, Stefani N. Thomas, Austin J. Yang, Aberrant sphingomyelin/ceramide metabolic-induced neuronal endosomal/lysosomal dysfunction: potential pathological consequences in age-related neurodegeneration, *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 1515– 1524, 2003.
9. E.H. Corder, A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, G.W. Small, A.D. Roses, J.L. Haines, M.A. Pericak-Vance, Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families, *Science* 261, 921– 923, 1993.
10. T. Yamazaki, T.Y. Chang, C. Haass, Y. Ihara, Accumulation and aggregation of amyloid beta-protein in late endosomes of Niemann-pick type C cells, *J. Biol. Chem.* 276, 4454–4460, 2001.
11. Ralph A. Nixon, Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases, *Neurobiology of Aging* 26, 373–382, 2005.
12. Cleary, J. P. *et al.* Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. *Nature Neurosci.* **8**, 79–84, 2005.

13. Li M, Chen LY, Lee DHS, Yu LC and Zhang Y. The role of intracellular amyloid β in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, 83: 131–139, 2007.
14. Wolfe M.S., Haass, C., The role of presenilins in γ -secretase activity, *J. Biol. Chem.*, 2001.
15. Haass, C., Selkoe, D.J., Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid b-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 8, 101–112, 2007.
16. Lim F, Hernández F, Lucas JJ, Gómez-Ramos P, Morán MA and Ávila J. FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain. *Mol Cell Neurosci*, 18: 702–714, 2001.

7. Sažetak

Lizosomi su primarni katabolički odjeljci eukariotskih stanica. Za funkciju lizosoma neophodne su dvije skupine proteina: kisele hidrolaze i integralni lizosomalni membranski proteini. Lizosomi su uključeni u različite fiziološke procese kao što su homeostaza kolesterola, popravak plazma membrane, obrana od patogena, stanična smrt i stanična signalizacija. Uzrok lizosomalnih bolesti nakupljanja lipida je u većini slučajeva neispravna aktivnost lizosomalnih proteina što rezultira akumuliranjem nerazgrađenih metabolita unutar lizosoma. Postoji sve više dokaza da su lizosomi uključeni i u proces patogeneze različitih neurodegenerativnih bolesti uključujući Alzheimerovu bolest, Parkinsonovu bolest te Huntingtonovu bolest. Promijenjen metabolizam lipida uzrokuje disfunkciju endosomalnog/lizosomalnog puta. Pretpostavlja se da je nefunkcionalna razgradnja proteina inducirana disfunkcijom endosomalno/lizosomalnog sustava primarni uzrok nakupljanja proteina te nastanka neurodegenerativnih bolesti. U ovom sam seminarskom radu dala kratak osvrt na strukturu i funkciju lizosoma, promjenu metabolizma lipida u lizosomalnim bolestima nakupljanja lipida te na disfunkciju endosomalno/lizosomalnog sustava u neurodegenerativnim bolestima.

8. Summary

Lysosomes are the primary catabolic compartments of eukaryotic cells. Two classes of proteins are essential for the lysosome function: lysosomal hydrolases and integral lysosomal membrane proteins. Lysosomes are involved in various physiological processes, such as cholesterol homeostasis, plasma membrane repair, pathogen defence, cell death and cell signalling. Lysosomal storage disorders (LSD) are mainly caused by the defective activity of lysosomal proteins, which results in the intra-lysosomal accumulation of undegraded metabolites. There is increasing evidence that lysosomes are also involved in the pathogenesis of a variety of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Huntington's disease. Endosomal/lysosomal dysfunction is caused by altered lipid metabolism. It is hypothesized that abnormal protein degradation and deposition caused by endosomal/lysosomal dysfunction may be the primary trigger of age-related neurodegeneration. In this review, the structure and function of lysosomes, the role of abnormal lipid metabolism in relation to aberrant endosomal/lysosomal function and the relationship between lysosome dysfunction and various neurodegenerative diseases is described.