

# Uloga peptida amiloid- $\beta$ i $\alpha$ -sinukleina u neurodegenerativnim bolestima

---

**Katalinić, Petra**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*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:217:903251>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-19**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Petra Katalinić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

**ULOGA PEPTIDA AMILOID- $\beta$  I  $\alpha$ -  
SINUKLEINA U  
NEURODEGENERATIVNIM BOLESTIMA**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Zagreb, 2022.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

14. srpnja 2022.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

9. rujna 2022.

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Potpis:



# Sadržaj

## § SAŽETAK

VII

### § 1. Error! Bookmark not defined.

#### § 2. 3

##### 2.1. 3

###### 2.1.1. 3

###### 2.1.2. 4

##### 2.2. 4

###### 2.2.1. 5

###### 2.2.2. 6

###### 2.2.3. 7

###### 2.2.4. 8

##### 2.3. 10

##### 2.4. 12

###### 2.4.1. 12

###### 2.4.2. 13

###### 2.4.3. 14

###### 2.4.4. 15

###### 2.4.5. 16

### § 3. Error! Bookmark not defined.



## § Sažetak

Neurodegenerativne bolesti, odnosno bolesti živčanog sustava zahvaćaju široku populaciju diljem svijeta čija su najznačajnija obilježja gubitak pamćenja i smanjene kognitivne sposobnosti. Najučestalije neurodegenerativne bolesti su Alzheimerova i Parkinsonova bolest. Alzheimerova bolest (AD) najčešći je oblik demencije, a karakterizira ju progresivan gubitak pamćenja. Smatra se da je amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ), koji nastaje proteolitičkim cijepanjem većeg glikoproteina, amiloid prekursor proteina (APP) (eng. *amyloid precursor protein*), glavni uzrok ove bolesti. Oligomerizacijom  $A\beta$  peptida nastaju amiloidni plakovi koji se talože u mozgu i predstavljaju neuropatološki znak AD-a. Cijepanjem APP-a enzimom  $\gamma$ -sekretaza nastaje niz fragmenata duljine od oko 40 aminokiselina. Sam  $A\beta$  karakterizira struktura  $\beta$ -naborane ploče u kojoj je peptidna okosnica okomita na os peptida. Bolesti doprinosi i unutarstanično agregiranje pogrešno savijenog tau proteina što također uzrokuje gubitak pamćenja i zbunjenost te na kraju rezultira gubitkom kognitivnih sposobnosti tijekom vremena.

Parkinsonova bolest drugi je najzastupljeniji neurodegenerativni poremećaj s prevalencijom blizu 2% nakon 65. godine života. Karakterizira ga podrhtavanje u mirovanju, krutost mišića i bradikinezija. Patološka obilježja su prisutnost i nakupljanje Lewyjevih tjelešaca, koja se sastoje od intrizično neuređenog proteina  $\alpha$ -sinukleina, u crnoj supstanci u mozgu. Uzrok ove neurodegeneracije još nije poznat. Genetski faktori, iako su u počecima istraživanja bili podcijenjeni, postali su važan faktor u istraživanju Parkinsonove bolesti. Kroz godine istraživanja, sve je jasnije kako poremećaj normalne funkcije i/ili agregacija proteina može dovesti do smrti živčanih stanica što dovodi do ozbiljnih zdravstvenih poteškoća.



## § 1. UVOD

Amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) nastaje proteolitičkim cijepanjem transmembranskog amiloid prekursor proteina (APP) pomoću enzima  $\beta$ - i  $\gamma$ - sekretaze. Smatra se da je nakupljanje  $A\beta$  prvi događaj koji dovodi do nastanka amiloidnih plakova i patogeneze u Alzheimerovoj bolesti (AD) koja je najčešći oblik demencije. Trenutačno nije poznato koji su fiziološki i patološki oblici  $A\beta$  zaslužni za ovo stanje niti kojim mehanizmom djeluju. Štoviše, za sada nisu otkriveni učinkoviti lijekovi koji bi zaustavili napredovanje AD-a.<sup>1</sup> Ubrzan način života i nezdrava prehrana dovode do kroničnih bolesti kao što su dijabetes i hipertenzija koje mogu biti daljnji pokretač za nastajanje AD-a.<sup>2</sup> U slučaju Parkinsonove bolesti (PD) važnu ulogu imaju i genetski čimbenici. Oslabljene motoričke funkcije jedan su glavnih obilježja ove bolesti, a do kognitivnih poremećaja dolazi tek u napredovalim fazama bolesti.<sup>3</sup> Intrizično neuređen protein poznat kao  $\alpha$ -sinuklein smatra se glavnim uzročnikom PD-a.<sup>4</sup>  $\alpha$ -sinuklein glavna je komponenta Lewyjevih tjelešaca koji se nakupljaju u mozgu i kao takvi predstavljaju dijagnostički marker.<sup>5</sup> Osim PD-a, pogrešno savijanje i nakupljanje  $\alpha$ -sinukleina u središnjem i perifernom živčanom sustavu uzrokuje i druge poremećaje koji se nazivaju sinukleinopatijama.<sup>6</sup>

U ovom radu su obrađena struktura, nastajanje i procesi agregacije proteina amiloid- $\beta$  i  $\alpha$ -sinuklein koji dovode do neurodegenerativnih poremećaja AD-a, odnosno PD-a.

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Neurodegenerativne bolesti

#### 2.1.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AD) je neurodegenerativni poremećaj koji narušava razvoj mentalnih sposobnosti te prekida neurokognitivnu funkciju. To stanje opisano je neurodegeneracijom, gubitkom živčanih stanica te nastankom amiloidnih plakova. Prema statističkim podacima prikupljenim diljem svijeta, ženske osobe su sklonije razvoju ove bolesti nego muškarci. Postoji veći rizik od razvoja AD-a u kasnijoj dobi kod osoba s kardiovaskularnim bolestima, hipertenzijom i dijabetesom. Smatra se da opisana stanja dovode do povećanog rizika nastanka AD, što je učestalije u razvijenijim zemljama zbog načina života. Interakcija oligomera amiloid-beta ( $A\beta$ ) proteina sa sadržajem živčanih stanica rezultira raznim patološkim i fiziološkim anomalijama koje uključuju mitohondrijsku disfunkciju, oksidativni stres, smanjenu regulaciju metabolizma kalcija, pojačanu aktivnost kinaze glikogen sintaze te stimulaciju stanične smrti.<sup>2</sup>

Napredak AD-a je povezan s ranim i naglim porastom razine  $A\beta_{42}$  što doprinosi agregaciji i agregiranju  $A\beta_{42}$  u amiloidne plakove te se napredovanje bolesti ubrzava.  $A\beta_{42}$  i  $A\beta_{40}$  su petidi, produkti nastali proteolitičkim cijepanjem APP-a. Kod osoba koje nisu oboljele od AD-a, povećanje razine  $A\beta$  ( $A\beta_{40}$  i  $A\beta_{42}$ ) događa se kroz nekoliko desetaka godina. Za AD je karakteristično rano i progresivno agregiranje  $A\beta_{42}$  što rezultira padom razine istog u krvnoj plazmi. Do sada se pokazalo najpreciznijim pratiti omjer  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  kod postavljanja dijagnoze bolesti jer je kod svake osobe broj zasebnih  $A\beta_{40}$  i  $A\beta_{42}$  individualan. Kod zdravih pojedinaca, većinu nastalog  $A\beta$  čini kraća varijanta -  $A\beta_{42}$ . Smanjenje omjera  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  u krvnoj plazmi veže se uz početak i napredovanje AD-a.<sup>7</sup>

U biomedicini, učinkovito liječenje AD-a predstavlja velik izazov. Za sada ne postoji tretman niti lijek koji bi izliječio ovu bolest. Dostupni lijekovi uglavnom su namijenjeni simptomatskom liječenju. Nepoznavanje točnog uzroka bolesti te krvno-moždana barijera koja ograničava učinkovitost lijekova dva su glavna čimbenika koja ometaju istraživanje za razvoj lijekova. Ipak, poznato je da je za uspješno liječenje bolesti potrebna kombinirana terapija,

budući da više čimbenika utječe na napredovanje bolesti. Do sada, svi potencijalni lijekovi nisu zadovoljili kriterije nakon 2. ili 3. faze ispitivanja, tako da je pronalazak prikladne terapije još u tijeku.<sup>2</sup>

### 2.1.2. Parkinsonova bolest

Parkinsonova bolest (PD) pripada skupini neurodegenerativnih bolesti karakteriziranih pogrešnim smatanjem te agregiranjem nakupina  $\alpha$ -sinukleina, poznatih kao sinukleionopatije.<sup>4</sup> PD pripada najčešćim poremećajima kretanja te je nakon AD najčešća neurodegenerativna bolest. Ovom bolešću zahvaćeno je ukupno 1-2% ukupne populacije starije od 65 godina. Klinički je karakterizirana trima simptomima: krutošću mišića, bradikinezijom (sporim pokretom) te podrhtavanjem u mirovanju. Također, uobičajeni simptomi mogu biti nedostatak ravnoteže, izražaji lica poput maske i festinirajući hod čija su obilježja brži i kraći koraci. Kognitivni poremećaji prisutni su u značajnoj mjeri kod bolesnika u uznapredovanim stadijima bolesti.

Glavna neuropatološka karakteristika bolesti su Lewyjeva tjelešca koja su građena od  $\alpha$ -sinukleina. Kasnije je uspostavljena veza između nakupina Lewyjevih tjelešaca i crne supstance (lat. *Substantia nigra*). Naime, nakupine Lewyjevih tjelešaca u crnoj supstanci dovode do gubitka živčanih stanica i u konačnici do ranije opisanih simptoma PD. Važno je napomenuti, iako je crna supstanca glavno mjesto gdje dolazi do gubitka živčanih stanica, prisutnost Lewyjevih tjelešaca nije ograničeno samo na to područje mozga. Tjelešca se uglavnom nalaze u živčanim stanicama, a glijalne stanice su rijetko zahvaćene.

Većina osoba oboljelih od PD nema istih slučajeva u obiteljskoj povijesti, no genetski čimbenici tu imaju veliku ulogu. Dugo se smatralo kako je okoliš presudan u uzrokovanju ove bolesti no istraživanjima se pokazalo da su genske predispozicije puno važniji faktor.<sup>3</sup>

## 2.2. Amiloid- $\beta$

### 2.2.1. Amiloid $\beta$ i njegova uloga

Jedno od najvažnijih otkrića u razumijevanju Alzheimerove bolesti bila je povezanost oboljelih s nakupljanjem amiloidnih naslaga u njihovom mozgu. Riječ je o peptidu koji se sastoji od otprilike 40 aminokiselina, danas je poznat kao amiloid-beta ( $A\beta$ ), čija je struktura vidljiva na Slici 1.  $A\beta$  nastaje proteolitičkim cijepanjem njegovog prekursora proteina- APP enzimom koji se naziva  $\gamma$ -sekretaza. Cijepanjem APP-a nastaju peptidi  $A\beta$  različitih duljina. Dva glavna oblika  $A\beta$  koja nastaju u normalnim uvjetima cijepanja APP-a su  $A\beta_{40}$  i  $A\beta_{42}$ . Kod prosječnog i zdravog pojedinca, većinu nastalog  $A\beta$  čini kraća varijanta-  $A\beta_{40}$ .<sup>7</sup>

Pretpostavlja se da je  $A\beta$  samo nepoželjan nusprodukt metabolizma APP-a, stoga terapija koja cilja njegovo smanjenje ne bi trebala biti štetna. Ipak, ova pretpostavka može biti pogrešna jer još uvijek ne postoji dovoljno dokaza o normalnoj fiziološkoj funkciji  $A\beta$ .<sup>8</sup>

Toksični učinci  $A\beta$  široko su proučavani te su opisani niže u ulomcima. Osim što dovodi do patoloških stanja opisanih AD-om, pozitivno utječe i na neke psihološke procese kao što su stvaranje i diferencijacija živčanih stanica, sinaptička plastičnost, formiranje pamćenja, homeostaza kalcija, odvajanje metala od tkiva te antioksidativni procesi.<sup>9</sup>



Slika 1. Struktura agregiranog peptida amiloid- $\beta$ . Struktura je pohranjena i slika je preuzeta iz PDB baze podataka (<https://www.rcsb.org/>), (PDB ID: 7MQY). (ref. 10)

### 2.2.2. Nastajanje amiloida $\beta$

A $\beta$  nastaje cijepanjem mnogo većeg prekursora- amiloid prekursor proteina (APP), prikazan na Slici 2. APP je integralni membranski protein zastupljen u mnogim tkivima, osobito u sinapsama neurona koje imaju glavnu ulogu u uzrokovanju AD-a. Sastoji se od jedne domene koja se proteže kroz membranu, velikog izvanstaničnog glikoziliranog N-kraja te kraćeg citoplazmatskog C-kraja. To je molekula prekursor koja se sintetizira u endoplazmatskom retikulumu, prenosi u Golgijev aparat gdje se završava sazrijevanje te se na kraju prenosi u staničnu membranu. Može se cijepati na dva načina. U neamiloidogenom putu, APP cijepaju enzimi  $\alpha$ -sekretaza i  $\gamma$ -sekretaza. Cijepanjem enzimima  $\beta$ -sekretazom i  $\gamma$ -sekretazom nastaju peptidi koji imaju između 37 i 49 aminokiselina, odnosno nastaju različiti fragmenti A $\beta$  od kojih su najznačajniji u uzrokovanju AD-a A $\beta$ 40 i A $\beta$ 42. Enzima za cijepanje APP-a ima u izobilju u neuronima što može ubrzati nastanak A $\beta$  i narušiti opstanak neurona. Nakon sinteze, A $\beta$  može biti otpušten u izvanstanični prostor ili ostati povezan s membranom ili lipidnim splavima. Vežanje A $\beta$  za gangliozid GM1, koji se nalazi na lipidnoj splavi, favorizira agregaciju A $\beta$  peptida.<sup>1</sup>

Opaženo je da mutacije u genima povezanim s  $\gamma$ -sekretazom rezultiraju povećanim količinama A $\beta$ , a u nekim slučajevima povećana je količina samo A $\beta$ 42. Iako razne mutacije APP-a mogu utjecati na vrstu, količinu i mjesto nastajanja A $\beta$  peptida, dominantna vrsta koja se taloži u moždanom tkivu je A $\beta$ 42. A $\beta$ 42 nastao na početku cijepanja APP-a sposoban je uzrokovati daljnje agregiranje dugih i kratkih oblika A $\beta$ . Povišene razine A $\beta$ 42 u plazmi povezane su s povećanim rizikom od AD-a, a te se razine tijekom vremena smanjuju kod novooboljelih. Smanjena razina A $\beta$ 42 u plazmi nakon ranog napredovanja bolesti je u skladu s konceptom ubrzane akumulacije A $\beta$ 42 u neuronskim naslagama kako bolest napreduje.<sup>7</sup>



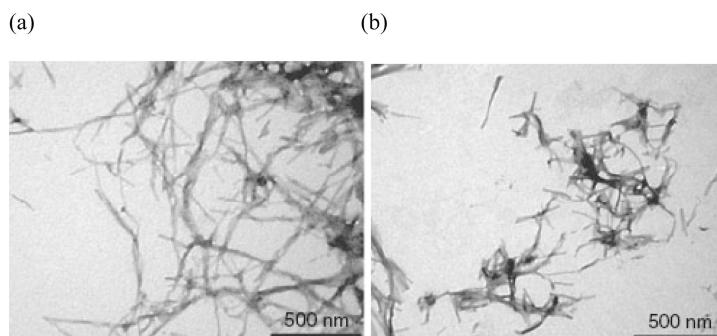
Slika 2. Struktura peptida amiloid prekursor proteina. Struktura je pohranjena i slika je preuzeta iz PDB baze podataka (<https://www.rcsb.org/>), (PDB ID: 3SV1). (ref. 11)

### 2.2.3. Struktura amiloida $\beta$

Pojam amiloid je specifično povezan s proteinima i peptidima koji posjeduju strukturu  $\beta$ -nabrane ploče u kojoj je peptidna okosnica okomita na os peptida (eng. *cross structure*), što je potvrđeno rendgenskom difrakcijom uzoraka uzetih iz A $\beta$  fragmenata. Struktura  $\beta$ -nabrane ploče postoji u dvije konformacije- paralelnoj i antiparalelnoj.  $\beta$ -dijelovi tvore vlakna (Slika 3.), a sama vlakna se mogu dalje agregirati u veće snopove. Svojstva proteina amiloid- $\beta$  i sličnih fragmenata istraživana su pomoću metoda koje koriste cirkularni dikroizam (CD) te nuklearnu magnetsku rezonanciju (NMR).<sup>12</sup>

Deprotonacija dva kisela ogranka aminokiselina u  $\alpha$ -zavojnici dovodi do konformacijske promjene koja prethodi agregaciji A $\beta$ . Hidrofoban C-kraj pokretač je za prijelaz iz strukture  $\alpha$ -zavojnice u  $\beta$ -nabranu ploču te ima važnu ulogu u određivanju stanja agregacije proteina u AD. Van der Waalsove interakcije i elektrostatska privlačenja održavaju peptide stabilnima. Oko 25% površine je hidrofobno te je struktura metastabilna. Peptid se ponaša kao tipičan transmembranski protein u lipidnom okruženju formirajući nakupine vlakana što dovodi do izravnog mehanizma neurotoksičnosti.

Istraživanja NMR-om također upućuju na postojanje različitih konformacija. Tako je primjerice kod A $\beta$ 42 C-kraj više strukturiran te ostaci koji tvore  $\beta$ -ukosnicu smanjuju fleksibilnost C-kraja što se može povezati sa sklonošću A $\beta$ 42 prema stvaranju amiloidnih plakova.<sup>1</sup>



Slika 3. Morfološki prikaz vlakna amiloid- $\beta$  snimljen transmissijskom elektronskom mikroskopijom, dobivenih iz inkubiranih 500 nm otopina. Prikaz a) odgovara A $\beta$ 40, a prikaz b) A $\beta$ 42. Slika je preuzeta iz ref. 12.

#### 2.2.4. Oligomerizacija i nastajanje amiloidnih plakova

A $\beta$  monomeri agregiraju u različite strukture uključujući oligomere i vlakna. Vlakna amiloida veća su i netopiva te mogu dalje agregirati u amiloidne plakove, dok su amiloidni oligomeri topivi i mogu se proširiti cijelim mozgom.

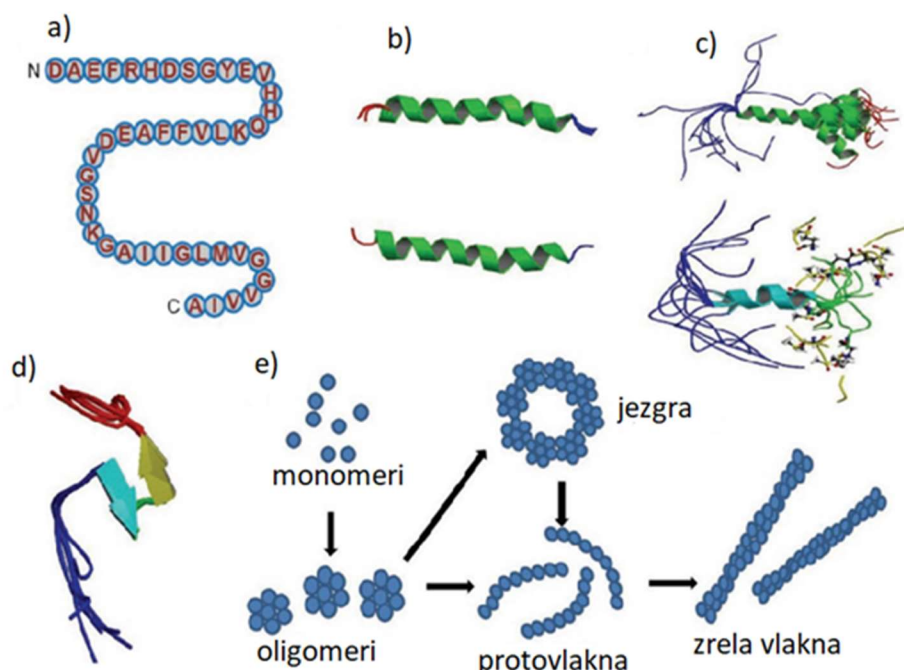
U mozgu osoba oboljelih od AD-a nalazi se povećan broj oligomera A $\beta$ , što je postavljeno u hipotezi oligomera (eng. *Oligomer hypothesis*). Ta hipoteza govori da topivi A $\beta$  oligomeri (za razliku od netopivih) uzrokuju zatajenje sinapse i oštećenje pamćenja, što rezultira oslabljenim radom mozga. Strukturna karakterizacija oligomera nije jednostavna jer njihove strukture nisu stalne i stabilne već prolazne, no mogu se stabilizirati deterdžentima za daljnje proučavanje. 2010. godine je izveden eksperiment u kojem su u uvjetima niske temperature te niske koncentracije soli izolirani pentamerni oligomeri strukture  $\beta$ -nabrane ploče s motivom beta-turn-beta. Ustanovljeno je da oligomeri imaju stabilnu jezgru te su dodatno stabilizirani vodikovim vezama što je u skladu sa strukturom  $\beta$ -nabrane ploče. Paralelnost monomernih A $\beta$  proteina predstavlja ključ u organiziranju amiloidnih oligomera. Proces oligomerizacije prikazan je na Slici 4.

Prema nekim teorijama, oligomeri predstavljaju međuprodukte u ranoj fazi razvoja vlakana. U ranim fazama nastajanja oligomera, pojavljuju se agregati sfernog oblika koji se zatim izdužuju i spajaju te nastaju prekursori za protovlakna na putu stvaranja vlakana. A $\beta$  tvori mnogo struktura, monomernih i oligomernih, od kojih svi rezultiraju vlaknima slične strukture. Agregiranje A $\beta$  u duga, nerazgranata vlakna kao i gubitci živčanih stanica obilježja su AD-a. Topivi oligomeri A $\beta$  mogu se vezati za brojne molekule u izvanstaničnom prostoru, uključujući stanične receptore, metale te stanične membrane. Oligomeri koji se mogu pronaći u staničnoj membrani imaju tendenciju vezanja prijelaznih metala kao što su bakar, cink i željezo. Veza s metalima ima ulogu u ubrzanju agregacije A $\beta$  peptida.

A $\beta$  može tvoriti agregate dvama reakcijskim putevima- agregacijom koja je ovisna o metalu te agregacijom koja je neovisna o metalu. Agregati neovisni o metalu tvore topive oligomere i amiloidna vlakna, dok agregati ovisni o metalu tvore kovalentno povezane oligomere. Akumuliranjem prvih oblika A $\beta$  oligomera talože se vlakna i amiloidni plakovi. Amiloidni plakovi se prvenstveno sastoje od agregiranih A $\beta$  peptida i živčanih vlakana. A $\beta$  je protein koji se stvara u normalnim uvjetima tijekom života dok su amiloidni plakovi neuropatološki znak AD-a. Oni, međutim, nisu dobra mjera oštećenja u mozgu osoba oboljelih od AD-a. Naime, neke mutacije APP-a uzrokuju stvaranje više agregata A $\beta$  koji dovode do AD-a, ali ne uzrokuju stvaranje amiloidnih plakova.

Nadalje, agregacijom A $\beta$  mogu nastati slobodni radikali, poznati kao reaktivne kisikove vrste (ROS) (eng. *reactive oxygen species*) koji vrlo brzo reagiraju s proteinima ili lipidima te naposljetku nastaju toksični oksidirani proteini i peroksidirani lipidi. Oksidirani proteini su štetni za cjelovitost membrane te više nisu pod utjecajem enzima važnih za funkciju živčanih stanica kao što su glutamin sintetaza te kreatin kinaza. Posljedično, gubitkom živčanih stanica dolazi do inhibicije enzima ATP-aze, gubitka Ca<sup>2+</sup> homeostaze te poremećaja signalnih puteva. Oksidativni stres koji je uzrokovan agregacijom A $\beta$  može izazvati i oksidaciju deoksiribonukleinske kiseline (DNA).<sup>1</sup>





Slika 4. Strukture Aβ monomera, vlakana i oligomera. 4.a) primarni aminokiselinski slijed peptida Aβ42, 4.b) struktura α-zavojnice Aβ, 4.c) struktura Aβ peptida u kojoj domene koje sadrže C-kraj i čine dvije trećine peptida tvore konformaciju α-zavojnice, a drugi kraj peptida je nestrukturiran. Na 4.d) prikazu Aβ peptid tvori spiralnu strukturu koja je kolabirala, 4.e) prikaz predstavlja put za pretvorbu Aβ monomera u oligomere ili zrela vlakna. Slika je preuzeta i obrađena iz ref. 1.

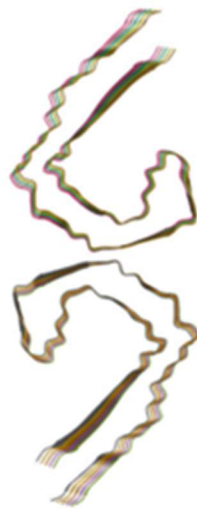
### 2.3. Tau proteini

Tau proteini su intrinzično neuređene molekule, odnosno molekule bez stalne i uređene trodimenzionalne strukture, čiji je prikaz vidljiv na Slici 5. Obično se vežu za mikrotubule te pripadaju obitelji mikrotubula povezanih s proteinima (MAP). Skloni su posttranslacijskim modifikacijama kao što su fosforilacija, acetilacija ili njegovo skraćivanje što dovodi do promjene u strukturi. Navedene modifikacije dovode do gubitka fiziološke uloge tau proteina i vezanja za mikrotubule, te posljedično dolazi do patoloških stanja opisanih AD-om.

Postoji i do 85 mogućih mjesta fosforilacije u najdužoj izoformi tau proteina. Fosforilacija ovih mjesta značajna je za regulaciju polimerizacije mikrotubula, kontrolu aksonalnog transporta i neurotransmiterskih receptora. Stupanj tau fosforilacije ovisi o aktivnosti određenih enzima kao što su kinaza koja regulira afinitet mikrotubula (MARK),

ciklin ovisna kinaza 5 (Cdk5), kinaza glikogen sintaze i protein kinaza. Ove kinaze reguliraju fosforilaciju tau proteina u reakciji esterifikacije aminokiselina prisutnih u molekuli tau (serina, treonina ili tirozina). Nakon fosforilacije, proteini gube sposobnost vezanja za mikrotubule i formiraju čvorove neurovlakana. Čvorovi neurovlakana, nastali agregacijom fosforiliranog tau proteina, razgrađuju mrežu mikrotubula živčanih stanica što dovodi do inhibicije bilo koje biokemijske komunikacije u ili iz stanice i razaranja citoskeleta.<sup>2,4</sup>

Tau proteini se sastoje od dvije domene; N-terminalne i C-terminalne domene koje se mogu razlikovati u primarnoj strukturi tau proteina. N-terminalna domena pokazuje veću varijabilnost među tau proteinima različitih vrsta. Te dvije glavne domene podijeljene su na osnovi interakcija njihovih mikrotubula: C-terminalna domena je opisana kao domena za sklapanje, dok je N-terminalna domena opisana kao projekcijska domena. Tau molekula favorizira oblik nalik spjalici, a posttranslacijske modifikacije inhibiraju stvaranje takve strukture što rezultira povećanom sklonošću agregacije proteina.<sup>4</sup>



Slika 5. Struktura tau proteina. Struktura je pohranjena i slika je preuzeta iz PDB baze podataka (<https://www.rcsb.org/>), (PDB ID: 7NRQ). (ref. 13)

## 2.4. $\alpha$ -sinuklein

### 2.4.1. Uloga $\alpha$ -sinukleina

Sinukleini su proteini kojih ima u izobilju u mozgu, a njihove fiziološke funkcije su slabo poznate. Obitelj sinukleina posjeduje tri člana:  $\alpha$ -sinuklein,  $\beta$ -sinuklein i  $\gamma$ -sinuklein koji se sastoje od 127 do 140 aminokiselina te pokazuju sličnost u primarnoj strukturi od 55% do 62%. Također, njihove domene imaju sličnu strukturu i funkciju.  $\alpha$ - i  $\beta$ -sinuklein koncentrirani su u živčanim završetcima u neposrednoj blizini sinapse, dok je  $\gamma$ -sinuklein prisutan u svim živčanim stanicama.<sup>3</sup>

$\alpha$ -sinuklein (Slika 6.) je mali, intrizično neuređen protein za čiju se agregaciju smatra da je ključan korak u uzrokovanju Parkinsonove bolesti. Također, glavna je komponentna Lewyjevih tjelešaca. Ime je dobio po lokalizaciji u stanici; „sin“ dolazi od sinapse, a „nuklein“ od jezgre. Iako je  $\alpha$ -sinuklein vrlo topiv citoplazmatski protein, veže se na stanične membrane različitih svojstava i sastava preko svojih amino- krajeva. Te se interakcije smatraju pogubnima za neke normalne funkcije  $\alpha$ -sinukleina, a mogu i imati ključnu ulogu u agregaciji proteina i njihovim mehanizmima toksičnosti.<sup>3,4</sup>

Jedan korak u otkrivanju funkcije ovog proteina je promatranje liganda za interakciju s  $\alpha$ -sinukleinom koji mogu ukazati na signalne puteve ili regulatorne uloge. Osim toga, proteini koji sudjeluju u interakcijama mogu i sami biti kandidati za ulogu u razvoju PD, budući da mutacije koje utječu na njihovu interakciju s  $\alpha$ -sinukleinom također uzrokuju neurodegeneraciju.  $\alpha$ -sinuklein se veže za kinazu reguliranu izvanstaničnim signalom (ERK) (eng. *extracellular signal-regulated kinase*), defosforilirani-BAD te na protein kinazu C (PKC) opadajućim afinitetom, kao i na šaperone 14-3-3. Ekspresija divljeg tipa (WT) (eng. *wild-type*) ili A53T  $\alpha$ -sinukleina u stanicama bubrega ljudskog embrija vodi inhibiciji aktivnosti PKC. S obzirom da su ERK, BAD i PKC esencijalni za vijabilnost stanice,  $\alpha$ -sinuklein može imati ulogu u istim signalnim putevima kao i navedeni proteini.

Osim spomenutih interakcija, tau protein se također veže za  $\alpha$ -sinuklein. Tau vezna domena za mikrotubule integrira s C-krajevima spomenutih WT i A53T  $\alpha$ -sinukleina. Posljedično, samo tau protein koji nije vezan za mikrotubule može stupiti u interakciju s  $\alpha$ -sinukleinom. Dodatno,  $\alpha$ -sinuklein stimulira PKA koja fosforilira aminokiselinske ostatke

Ser262 i Ser356 tau proteina. Fosforilacija Ser262 inhibira vezanje tau proteina na mikrotubule, što upućuje da bi  $\alpha$ -sinuklein mogao imati ulogu i u regulaciji funkcije tau proteina.

$\alpha$ -sinuklein potencijalno sudjeluje u aktivnosti sinapsi. Činjenica da se radi o presinaptičkom proteinu koji interagira sa sinaptičkim vezikulama i fosfolipidnim membranama upućuje na njegovu uključenost u sinaptičku plastičnost.<sup>14</sup>

#### 2.4.2. Struktura $\alpha$ -sinukleina

$\alpha$ -sinuklein je protein kodiran genom SNCA. SNCA sadrži 7 egzona od kojih 5 kodira za  $\alpha$ -sinuklein. Kao što je ranije spomenuto, to je mali protein koji se nalazi u neuronima.

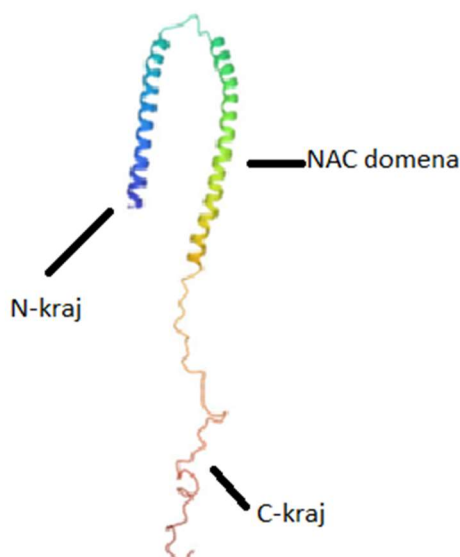
Njegova primarna struktura se može podijeliti u tri glavne domene:

- 1) Domena koja sadrži N-kraj, posjeduje ponavljajuću sekvencu KTKEGV i ima sklonost prema stvaranju  $\alpha$ -zavojnice.
- 2) Središnja domena poznata kao komponenta bez A $\beta$  (NAC), (eng. *non-amyloid-beta component*), koja je vrlo hidrofobna i uključena u agregaciju  $\alpha$ -sinukleina.
- 3) Domena koja sadrži C-kraj obogaćena negativno nabijenim aminokiselinama te prolinskim ostacima što omogućuje fleksibilnost polipeptida.

$\alpha$ -sinuklein se smatra intrizično neuređenim proteinom bez jedinstvene i definirane konformacije, ali se na N-terminalnoj domeni nalazi struktura  $\alpha$ -zavojnice. Upravo je ta domena zaslužna za vezanje  $\alpha$ -sinukleina za membranu. NAC domena ključna je u procesu stvaranja vlakana, što je potvrđeno činjenicom da  $\alpha$ -sinuklein bez NAC domene i  $\beta$ -sinuklein kojemu nedostaje 11 aminokiselina iz navedene domene imaju smanjenu mogućnost stvaranja vlakana. C- terminalna domena je manje očuvana od N- domene te sadrži većinu kiselih ostataka aminokiselina.<sup>4,15</sup>

$\alpha$ -sinuklein se s razlogom naziva „*protein-kameleon*“ jer poprima razne konformacije koje se kreću od različitih elemenata sekundarne strukture pa sve do širokog spektra struktura velike molekulske mase. Osjetljiv je na mnoge posttranslacijske modifikacije koje utječu na njegove fiziološke ili patološke funkcije. Jedna od tih modifikacija je fosforilacija koja je najviše proučavana zbog svoje bliske veze s Parkinsonovom bolešću. Fosforilirani  $\alpha$ -sinuklein na Ser-129 se nalazi u naslagama raznih sinukleinopatija, utječe na agregaciju te povećava oksidativni stres. Fosforilacija na Ser87 može inhibirati agregaciju  $\alpha$ -sinukleina. U ostale

značajne posttranslacijske modifikacije se ubraja nitriranje tirozina što pojačava oligomerizaciju i ubikvitinaciju  $\alpha$ -sinukleina.<sup>4</sup>



Slika 6. Struktura peptida  $\alpha$ -sinukleina s odgovarajućim domenama. Struktura je pohranjena i slika je preuzeta iz PDB baze podataka (<https://www.rcsb.org/>), (PDB ID: 1XQ8). (ref. 16)

### 2.4.3. Agregacija $\alpha$ -sinukleina

Intrizično neuređeni proteini kao što je  $\alpha$ -sinuklein obično posjeduju aminokiselinske sljedove koji sprječavaju agregaciju. Takvi sljedovi često su obogaćeni nabijenim aminokiselinskim ostacima i prolinima, a lišeni su hidrofobnih regija. U slučaju  $\alpha$ -sinukleina, tzv. NAC domena je najsklonija agregaciji.  $\alpha$ -sinuklein pokazuje značajan stupanj kompaktnosti zbog elektrostatskih i hidrofobnih interakcija dugog dometa. Interakcije se javljaju između C-kraja i NAC domene te između N- i C-kraja te sprječavaju agregaciju. Međutim, mutacije, promjene uvjeta okoline i/ili posttranslacijske modifikacije mogu poremetiti nativnu konformaciju  $\alpha$ -sinukleina, što dovodi do pogrešnog smatanja i agregacije.

Agregacija  $\alpha$ -sinukleina slična je onima drugih amiloidogenih neuređenih proteina, a sam proces se može podijeliti u tri faze:

- 1) Faza zaostajanja u kojoj se monomeri nakupljaju i formiraju agregacijske jezgre.
- 2) Faza elongacije kada količina vlakana raste eksponencijalno.
- 3) Stacionarna faza u kojoj dolazi do iscrpljenja količine monomera te do smanjenja brzine rasta oligomera.

Fazu zaostajanja prate velike strukturne promjene te ta faza predstavlja korak koji ograničava brzinu cijelog procesa. Nastali oligomeri pretvaraju se u protovlakna, a potomji se udružuju u zrela amiloidna vlakna. Amiloidna vlakna rastu brzo tijekom elongacijske faze dodavanjem monomera na krajevima vlakana. Ova faza je termodinamički povoljna zbog zbijanja i kompaktnosti proteina te smanjenja njegove ukupne površine. Izostankom monomera u stacionarnoj fazi, polipeptidi se sastavljaju u vlakna. U sve tri faze postoji dinamička ravnoteža gdje različite konformacije i agregacijska stanja koegzistiraju istovremeno.<sup>4</sup>

#### 2.4.4. Sinukleinopatije

Sinukleinopatije se odnose na skupinu poremećaja karakteriziranih pogrešno smotanim  $\alpha$ -sinukleinom koji se nakuplja u perifernom i središnjem živčanom sustavu. Naslage  $\alpha$ -sinukleina nastaju u perifernim živcima, uključujući one u koži i crijevnoj sluznici, napredujući prema moždanim stanicama, ovisno o vrsti poremećaja koji nastaje. Razlike u staničnom položaju i obrascu agregiranja  $\alpha$ -sinukleina dovode do različitih vrsta sinukleinopatija kao što su PD, demencija Lewyjevih tjelešaca (DLB), multipla sistemska atrofija (MSA) i čisto autonomno zatajenje (PAF). Još jedno obilježje sinukleinopatija je uzrokovanje poremećaja sna kojeg prate brzi pokreti očiju (REM), a sam REM može prethoditi autonomnim ili motornim disfunkcijama te dovesti do razvitka MSA, PD ili DLB.<sup>6,17</sup>

Opaženo je kako osobe oboljele od PAF-a imaju izražene drugačije simptome nego osobe kojima su dijagnosticirane druge sinukleinopatije. Većina osoba s PAF-om pokazuje polagan i progresivan gubitak autonomne funkcije kroz mnogo godina. Dakle, zajedničko s drugim sinukleinopatijama su im suptilni znakovi neurološke ili motorne disfunkcije. S druge strane, kod istih osoba javljaju se i simptomi hiperfleksije, bradikinezije, drhtavice i nenormalan hod koji ne zadovoljavaju dijagnostičke kriterije za MSA, PD ili DLB. Također, PAF se može u konačnici razviti u MSA, PD ili DLB.<sup>6</sup>

Iako se razlikuju prema simptomima i ozbiljnosti poremećaja koje uzrokuju, sve sinukleinopatije dovode do disfunkcije autonomnog živčanog sustava koje smanjuju kvalitetu

života. Česti simptomi koji se javljaju uključuju zatvor, urinarnu i spolnu disfunkciju te probleme s krvožilnim sustavom.<sup>17</sup>

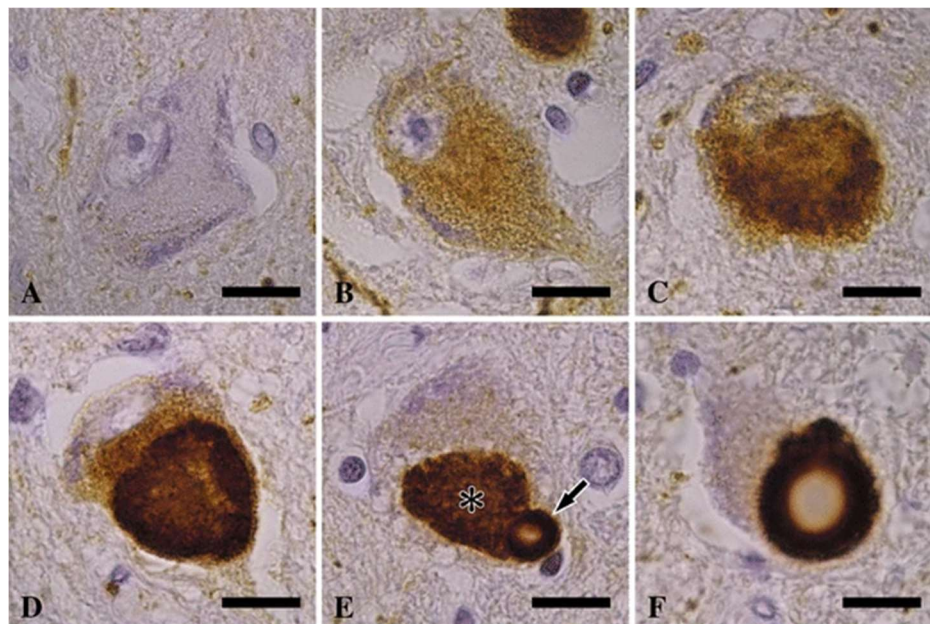
#### 2.4.5. Lewyjeva tjelešca

Lewyjeva tjelešca (LB) odnose se na živčane inkluzije proteinskog sastava čija je glavna komponenta  $\alpha$ -sinuklein te se nalaze u crnoj supstanci.<sup>5</sup> Prisutnost  $\alpha$ -sinukleina korelira s akumulacijom netopivog  $\alpha$ -sinukleina. Identifikacija mutacije A53T u genu za  $\alpha$ -sinuklein predstavlja prvi poznati uzrok bolesti uzrokovanim Lewyjevim tjelešcima. Iako je  $\alpha$ -sinuklein glavna sastavnica LB, oni sadrže ukupno više od 90 molekula.<sup>5,15</sup>

Osim toga, predstavljaju dijagnostički marker jer je gubitak stanica utvrđen na većini lokacija u kojima se javljaju. Njihova prisutnost kod osoba bez simptoma PD upućuju na predsimptomatsku fazu bolesti. Raspodjela LB kod osoba oboljelih od PD je visoko specifična, uključeni su samo određeni neuroni srednje do veće veličine. Također, njima je zahvaćen cijeli autonomni živčani sustav. Selekcija specifičnih stanica i odsutnost transsinaptičke ili retrogradne degeneracije jedni su od glavnih karakteristika procesa oboljenja.

U crnoj supstanci, gdje su locirana LB, pronađena su i blijeda tijela (eng. *pale bodies*). U ranoj fazi PD, veća je količina blijedih tijela nego LB te se smatra da su ona usko povezana s nastankom LB ili mogu poslužiti kao materijal da se LB nastavljaju širiti. Sam proces nastanka LB može se podijeliti u nekoliko faza kao što je vidljivo na Slici 7. Na prikazu 7.A proces nastanka Lewyjevih tjelešaca još nije počeo. Prva faza opažena je kao blijedo obojenje citoplazme je vidljivo u živčanim stanicama (Slika 7.B). Ta faza je prvi vidljivi dokaz nakupljanja jako velike količine  $\alpha$ -sinukleina. U drugoj fazi je vidljivo nepravilno oblikovano obojenje umjerenog intenziteta u živčanim stanicama (Slika 7.C). Treća faza odgovara prikazu blijedog tijela koja povremeno pokazuju perifernu kondenzaciju (Slika 7.D). Jedan ili više malih LB su smješteni u na perifernim dijelovima blijedih tijela. Mala LB koja se na početku nalaze u sklopu blijedih tijela se kasnije razvijaju u tipična LB, a ostaci blijedih tijela nestanu. Na prikazu 7.E se nalazi pojačano agregiranje  $\alpha$ -sinukleina i odvajanje blijedog tijela. Četvrta faza predstavlja prstenasto obojenje tipičnog LB s jezgrom u sredini koju okružuje vijenac

(Slika 7.F). Treba napomenuti da je  $\alpha$ -sinuklein uključen i u ranoj fazi nastajanja LB. Razvojni proces LB podijeljen je ukupno u 6 faza, a početak njegovog formiranja vezan je uz promjenu agregiranja  $\alpha$ -sinukleina.<sup>5</sup>



Slika 7. Različite faze sazrijevanja Lewyjevih tjelešaca u crnoj supstanci. Slika je preuzeta iz ref. 18.

Lewyjeva tjelešca uzročnici su kliničkih poremećaja među kojima razlikujemo Parkinsonovu bolest (PD) i Demenciju s Lewyjevim tjelešcima (DLB). DLB postoji kao samostalna bolest ili se može preklapati s neuropatološkim značajkama AD-a. Za razliku od PD, DLB karakteriziran je velikim brojem Lewyjevih tjelešaca u mozgu. Kao i PD, DLB je povezan s nakupinama Lewyjevih tjelešaca u crnoj supstanci.<sup>17</sup> Osim navedenih poremećaja, LB se javljaju i u mnogim drugim kao što su AD, Downov sindrom, Hallervorden-Spatzova bolest, progresivno autonomno zatajenje, poremećaj sna koji prate brzi pokreti očiju (REM), Parkinsonizam, Gaucherova bolest i Pickova bolest.<sup>15</sup>

Jedan od najvećih problema gotovo svih neurodegenerativnih poremećaja se nalazi u nedostupnosti odgovarajućeg lijeka ili terapije. Daljnja istraživanja čiji će fokus biti stavljen na funkciju i točne mehanizme djelovanja proteina koji uzrokuju opisana stanja mogu dovesti do vrlo važnih otkrića u liječenju ovih bolesti. U ovom radu su navedene samo neke poznate funkcije proteina amiloid- $\beta$  i  $\alpha$ -sinukleina koje mogu olakšati proces razumijevanja razvitka Alzheimerove i Parkinsonove bolesti.





§ 3. **LITERATURNI IZVORI**

1. G.F. Chen, T.H. Xu, Y. Yan, Y.R. Zhou, Y. Jiang, K. Melcher, H.E. Xu, *Acta Pharmacol. Sin.* **38** (2017) 1205–1235.
2. S. Srivastava, R. Ahmad, S.K. Khare, *Eur. J. Med. Chem.* **216** (2021) 113320.
3. M. Goedert, *Prim. Auton. Nerv. Syst. Second Ed.* **2** (2004) 204–207.
4. A. Villar-Piqué, T. Lopes da Fonseca, T.F. Outeiro, *J. Neurochem.* **139** (2016) 240–255.
5. Gibb WRG, Lees AJ, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **51** (1998) 745–752.
6. E.A. Coon, W. Singer, *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* **26** (2020) 72–92.
7. M.A. Findeis, *Pharmacol. Ther.* **116** (2007) 266–286.
8. G.K. Gouras, T.T. Olsson, O. Hansson, *Neurotherapeutics* **12** (2015) 3–11.
9. K. Rajasekhar, M. Chakrabarti, T. Govindaraju, *Chem. Commun.* **51** (2015) 13434–13450.
10. S.J. Karuppan, A. Vogt, Z. Fischer, A. Ladutska, J. Swiastyn, H.F. McGraw, S. Bouyain, *J. Biol. Chem.* **298** (2022) 101541.
11. X. Xie, X. Yan, Z. Wang, H. Zhou, W. Diao, W. Zhou, J. Long, Y. Shen, *J. Mol. Cell Biol.* **5** (2013) 48–56.
12. I.W. Hamley, *Chem. Rev.* **112** (2012) 5147–5192.
13. Y. Shi, A.G. Murzin, B. Falcon, A. Epstein, J. Machin, P. Tempest, K.L. Newell, R. Vidal, H.J. Garringer, N. Sahara, M. Higuchi, B. Ghetti, M.K. Jang, S.H.W. Scheres, M. Goedert, *Acta Neuropathol.* **141** (2021) 697–708.
14. C.B. Lücking, A. Brice, *Cell. Mol. Life Sci. C.* **57** (2000) 1894–1908.
15. C.W. Shults, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103** (2006) 1661–1668.
16. T.S. Ulmer, A. Bax, N.B. Cole, R.L. Nussbaum, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 9595–9603.
17. J.J. Mendoza-Velásquez, J.F. Flores-Vázquez, E. Barrón-Velázquez, A.L. Sosa-Ortiz, B.M.W. Illigens, T. Siepmann, *Front. Neurol.* **10** (2019) 1–8.
18. K. Wakabayashi, K. Tanji, S. Odagiri, Y. Miki, F. Mori, H. Takahashi, *Mol. Neurobiol.* **47** (2013) 495–508.