

# Uloga šaperona u razvoju i liječenju Alzheimerove bolesti

---

**Bodulić, Kristian**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*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:217:444077>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-16**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Uloga šaperona u razvoju i liječenju Alzheimerove bolesti**

**The role of chaperones in development and treatment of  
Alzheimer's disease**

**SEMINARSKI RAD**

**Kristian Bodulić**

**Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate study of molecular biology)**

**Mentor: Prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj**

Zagreb, 2018.

# Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. A $\beta$ -peptid i APP.....	2
2.1. APP: svojstva i procesiranje.....	3
2.2. Nastanak, svojstva i agregacija A $\beta$ -peptida.....	5
3. Posljedice akumulacije A $\beta$ -peptida.....	9
3.1. Protein tau i neurofilamentni zapleti.....	11
4. Šaperoni i njihova uloga u razvoju Alzheimerove bolesti.....	14
4.1. Manji proteini Hsp.....	16
4.2. Hsp70.....	19
4.3. Šaperonini.....	26
4.4. Hsp90.....	31
5. Liječenje Alzheimerove bolesti.....	35
5.1. Šaperonske terapije.....	37
6. Zaključak.....	39
7. Literatura.....	40
8. Sažetak.....	48
9. Summary.....	49

# 1. Uvod

Alzheimerova bolest je progresivna neurodegenerativna bolest koju karakteriziraju poremećaji kognitivnih sposobnosti, gubitak kratkoročnog i dugoročnog pamćenja, promjene u ponašanju, gubitak komunikacijskih vještina, poremećaji u motoričkim i senzoričkim funkcijama, a naposljetku i smrt.<sup>1</sup> Smatra se da njezino nastupanje potpomažu genetski čimbenici, arteroskleroza, hipertenzija, depresija, starija životna dob i brojni drugi faktori. Najčešće se javlja u osoba starijih od 65 godina pri čemu iznimku čine pacijenti s genetskim predispozicijama za ovu bolest koji oboljevaju ranije.<sup>2-4</sup> Ova bolest je najčešći uzrok demencije u 21. stoljeću, a smatra se da je 2017. godine od nje i drugih oblika demencija bolovalo oko 44 milijuna ljudi što predstavlja zabrinjavajuće velik broj koji će, sudeći po trendu, u sljedećim godinama rasti.<sup>5</sup> Zbog svega navedenog u zadnjih nekoliko desetljeća pažnja biomedicinske znanosti usmjerena je na ovu temu, napisan je velik broj radova koji su u velikoj mjeri uspjeli razlučiti biokemijske, genetičke i fiziološke mehanizme nastanka ove bolesti, ali i predložiti velik broj strategija liječenja koji se i danas podvrgavaju kliničkim testiranjima.

Alzheimerovu bolest karakterizira akumuliranje beta-amiloida (A $\beta$ ) koji nastaje procesiranjem proteina prekursora amiloida (engl. *amyloid precursor protein*, APP) što u konačnici uzrokuje apoptozu i poremećaje u sinaptičkim vezama neurona.<sup>6</sup> Smatra se da akumulacija agregata A $\beta$ -peptida u neuronima dovodi do brojnih nepravilnosti poput ionske neravnoteže i poremećaja u metabolizmu raznih iona, oksidativnog stresa, poremećaja u acetilkolinskim i glutamatskim receptorima te stvaranja heteroagregata s raznim proteinima što ometa pravilnu funkciju tih proteina.<sup>7-9</sup> Kao posljedica ovih događaja nastaje i prepoznatljiv znak Alzheimerove, ali i brojnih drugih bolesti, neuralni plakovi, koji predstavljaju mjesta ekstracelularne akumulacije filamenata A $\beta$ -peptida. Neuralne plakove također karakteriziraju neuroni s oštećenim aksonima, dendritima i brojnim drugim citoplazmatskim nepravilnostima, ali i pobuđene mikroglija stanice koje uzrokuju upalu.<sup>10</sup> Drugi prepoznatljiv znak ove bolesti je nastajanje unutarstaničnih neurofilamentnih zapleta hiperfosforiliranog proteina tau koji se u normalnim staničnim uvjetima veže za mikrotubule i regulira njihovu aktivnost.<sup>11</sup> U zadnjih nekoliko godina predložene su različite metode liječenja koje se temelje na smanjenju produkcije A $\beta$ -peptida, ali takav pristup se zasad nije pokazao uspješnim.<sup>12-14</sup> Ipak, postignut je određeni uspjeh u ublažavanju posljedica nastalih akumulacijom A $\beta$ -peptida, ponajprije u smanjenju oksidativnog stresa i upalnog procesa te u ponovnom uspostavljanju acetilkolinskih i glutamatskih sinaptičkih veza.<sup>15,16</sup>

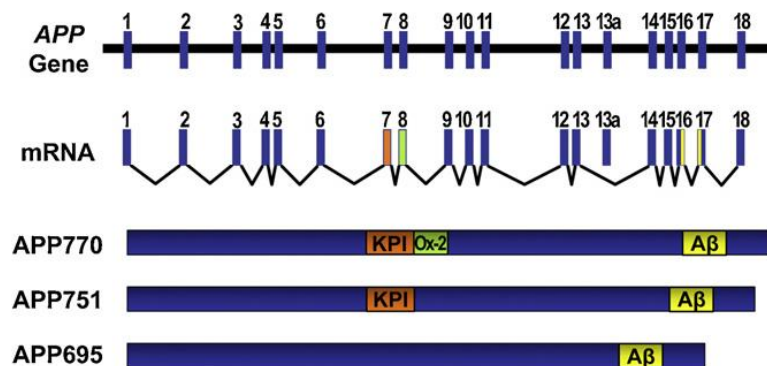
Jedna od mogućih metoda liječenja ove bolesti je i upotreba šaperona, funkcionalno povezane skupine proteina koji potpomažu smatanje, razmatanje i prijenos proteina preko membrane zbog čega predstavljaju bitnu komponentu u metabolizmu proteina. U pacijenata koji boluju od Alzheimerove bolesti primijećena je povećana ekspresija određenih obitelji šaperona te je utvrđena njihova uloga u procesiranju proteina APP i sprječavanju agregacije A $\beta$ -peptida, kao i u čišćenju te u formiranju nastalih agregata.<sup>17,18</sup> U zadnjih nekoliko godina stavljen je naglasak na šaperone kao medijatore nastajanja i očuvanja agregata koji karakteriziraju brojne neurodegenerativne bolesti, ali i na mogućnost njihove primjene u smanjenju koncentracije amiloidnih agregata već spomenutim mehanizmima. Ovakav pristup djelovanja na šaperone mogao bi dovesti do djelotvornih terapeutika koji bi omogućili sprječavanje i liječenje Alzheimerove bolesti. Budući da je napisan velik broj znanstvenih radova koji se bave ovom problematikom, korisno je objediniti i prodiskutirati njihove rezultate što je i glavni cilj ovog rada. Prije toga, bit će objašnjeni biokemijski i fiziološki mehanizmi nastanka i progresije ove bolesti.

## 2. A $\beta$ -peptid i APP

A $\beta$ -peptidi su važan sastojak neuralnih plakova koji se smatraju jednim od glavnih znakova Alzheimerove bolesti. Nastaju proteolizom proteina APP djelovanjem nekoliko enzima u sekretornom putu. Uloge proteina APP i njegovih derivata, uključujući i A $\beta$ -peptide, još uvijek nisu u potpunosti razjašnjene, no smatra se da djeluju kao tvari bitne za zaštitu i prehranu stanica, kao inhibitori serinskih proteaza poput faktora XIa, važnog faktora u zgrušavanju krvi, ali i kao važni čimbenici u međustaničnim interakcijama i staničnoj adheziji. Također, *in vivo* studije na laboratorijskim miševima (*Mus musculus*) s deletiranim genom za APP pokazale su njegovu važnost za pravilne motoričke i lokomotorne funkcije. S druge strane, prema hipotezi amiloidne kaskade, vodećoj hipotezi koja opisuje patofiziologiju Alzheimerove bolesti, gomilanje A $\beta$ -peptida osnovni je preduvjet za nastanak i progresiju ove bolesti što uzrokuje molekularnu kaskadu koja dovodi do pojave simptoma.<sup>19,20</sup> Zbog toga su u daljnjem tekstu objašnjeni mehanizmi nastanka različitih derivata proteina APP uključujući oblike A $\beta$ -peptida, svojstva i mehanizme njegova agregiranja u različite vrste agregata i njihovo toksično djelovanje na stanice.

## 2.1. APP – svojstva i procesiranje

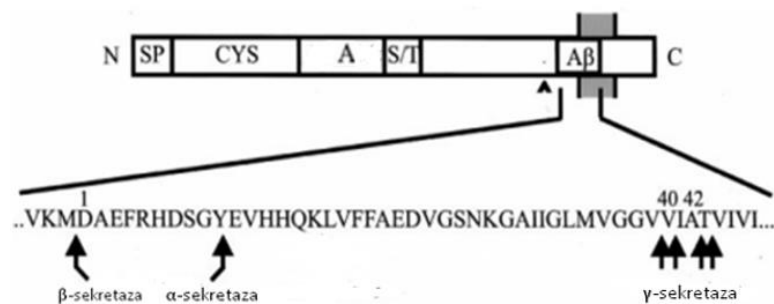
APP je naziv za heterogenu grupu proteina molekularnih masa između 110 i 140 kDa koji su prisutni u mnogim tjelesnim stanicama, posebice u neuronima. Spomenuta heterogenost proizlazi iz alternativnog prekrajanja (Slika 1.) i iz velikog broja posttranslacijskih modifikacija poput N- i O-glikozilacije, fosforilacije i sulfatacije. Izoforme koje se sastoje od 751 i 770 aminokiselina eksprimirane su u različitim tjelesnim stanicama uključujući i neurone dok je izoforma koja sadrži 695 aminokiselina eksprimirana gotovo isključivo u neuronima. APP je visoko očuvan protein koji je pronađen u svim sisavcima, a djelomičan homolog pronađen je i kod vinske mušice.<sup>21,22</sup>



**Slika 1.** Gen, mRNA i izoforme proteina APP. Gen za protein APP sastoji se od 19 egzona: egzoni 7 (KPI – alternativnost inhibicije serinskih proteaza) i 8 (Or-2) se alternativno prekrajuju čime nastaju APP695, APP751 i APP770 izoforme pri čemu APP695 ne sadrži egzone 7 i 8, APP751 ne sadrži egzon 8 dok APP770 sadrži oba spomenuta egzona. Preuzeto iz Hall i sur. 2012.<sup>23</sup>

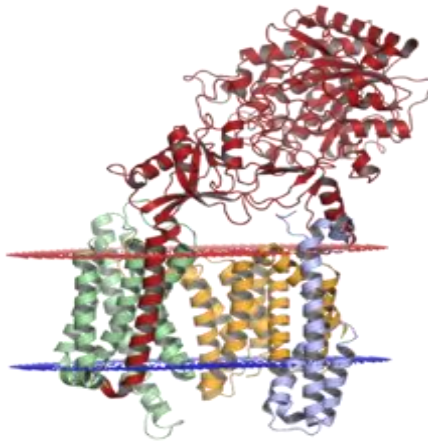
APP je glikoprotein građen od većeg izvanstaničnog N-terminalnog kraja, manjeg unutarstaničnog C-terminalnog kraja i jedne transmembranske domene. Ovaj se protein tijekom svoje sinteze transportira u endoplazmatski retikulum (ER) nakon čega se translocira u Golgijev kompleks preko kojeg obično dopijeva do površine membrane sekretornim vezikulama. Sazrijevanje proteina APP odvija se u ER-u i Golgijevu kompleksu pri čemu dolazi do brojnih posttranslacijskih modifikacija poput N-glikozilacije određenih aspartatskih ostataka i O-glikozilacije te sulfatacije određenih tirozinskih ostataka. Također, dolazi i do njegove proteolize koju vrši nekoliko aspartatskih proteaza:  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretaze (Slika 2). Na protein APP prvo mogu djelovati  $\alpha$ - ili  $\beta$ -sekretaza pri čemu se  $\alpha$ -sekretaza nalazi na površini stanice dok je  $\beta$ -sekretaza prisutna u Golgijevom kompleksu, endosomima i na površini stanice. Utvrđeno je da  $\alpha$ -sekretaza cijepa poslije 12. aminokiseline s amino kraja od transmembranske

domene proteina APP što rezultira otpuštanjem velikog topljivog ektodomenskog fragmenta ( $\alpha$ -APPs) u izvanstanični prostor i nastajanje transmembranskog COOH terminalnog fragmenta (CTF) koji sadrži 88 aminokiselina (88C). S druge strane,  $\beta$ -sekretaza cijepa poslije 16. aminokiseline prije mjesta cijepanja  $\alpha$ -sekretaze pri čemu nastaje manji ektodomenski fragment ( $\beta$ -APPs), koji se otpušta u izvanstanični prostor, i veći transmembranski CTF, 99C. Utvrđeno je da se  $\gamma$ -sekretaza nalazi u ER-u, Golgijevom kompleksu i ekskretornim vezikulama pri čemu cijepa različite proteine važne za život stanice. Njezino cijepanje C99 fragmenta nastalog djelovanjem  $\beta$ -sekretaze zadnji je korak u nastajanju  $A\beta$ -peptida pri čemu mjesto cijepanja značajno utječe na produkt: moguće je nastajanje  $A\beta$ -peptida s različitim brojem aminokiselina. Aktivnost  $\beta$ -sekretaze određuje brzinu pretvorbe proteina APP u  $A\beta$ -peptid budući da ova reakcija ima najveću energiju aktivacije u opisanom reakcijskom nizu.<sup>21,24</sup>



**Slika 2.** Mjesta cijepanja  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretaza te prikaz funkcionalnih domena proteina APP. SP = signalni peptid, CYS = domena bogata cisteinima, A = kisela regija, S/T = domena bogata serinima i treoninima,  $A\beta$  = amiloidna regija. Preuzeto i prilagođeno iz Nunan i sur. 2000.<sup>25</sup>

Dugo vremena sa sigurnošću nije identificirana  $\gamma$ -sekretaza, a glavni kandidati za njezinu funkciju bili su presenilin-1 i presenilin-2 (PS1 i PS2), proteini s 8 transmembranskih domena čije mutacije pogoduju nastanku Alzheimerove bolesti. Provedeni su brojni eksperimenti kojim se pokušala potvrditi funkcija presenilina kao  $\gamma$ -sekretaza, poput selektivne mutageneze aspartata u aktivnom mjestu ovih aspartatskih proteaza koja je inhibirala njihovu aktivnost ili utvrđivanja lokalizacije presenilina koja ide u prilog  $\gamma$ -sekretaznoj aktivnosti. Danas se zna da  $\gamma$ -sekretaznu aktivnost u čovjeka ima enzimski kompleks s četiri domene (Slika 3.) od kojih je jedna PS1 ili PS2 pri čemu takav kompleks ima različite uloge od kojih je možda najzanimljivije sudjelovanje u visoko konzerviranom signalnom putu Notch. Mutacije u ovom proteinskom kompleksu su u čovjeka relativno rijetke, a najčešće uzrokuju pojavu Alzheimerove bolesti između 40. i 50. godine života.<sup>26-28</sup>



**Slika 3.** Trodimenzionalna struktura kompleksa  $\gamma$ -sekretaze s označenim domenama: crveno = nikastrin, narančasto = presenilin, plavo = PE2 (engl. *presenilin enhancer 2*), zeleno = AP1 (engl. *anterior pharynx defective 1*). Smatra se da nikastrin, PE2 i AP1 moduliraju aktivnost enzima u ovisnosti o fiziološkim uvjetima. Preuzeto s [https://en.wikipedia.org/wiki/Gamma\\_secretase#/media/File:5a63.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Gamma_secretase#/media/File:5a63.png)<sup>29</sup>

Kao što je već spomenuto, djelovanjem  $\gamma$ -sekretaze nastaju različiti oblici  $A\beta$ -peptida od kojih svaki ima drugačiju ulogu u nastanku Alzheimerove bolesti zbog čega je te oblike važno detaljnije opisati.

## 2.2. Nastanak, svojstva i agregacija $A\beta$ -peptida

$A\beta$ -peptid je polipeptid čija je masa približno 4 kDa, a u stanici ispunjava već opisane, ali vjerojatno i mnoge druge biološke uloge. Pristupa je u izvanstaničnoj tekućini i u mnogim stanicama u tijelu, posebice u neuronima, a utvrđeno je da ima sposobnost prelaska krvno-moždane barijere. Njegove izoforme mogu se sastojati od 37 do 49 aminokiselina pri čemu su najčešći oblici s 40, odnosno 42 aminokiseline:  $A\beta_{40}$  (80-90%) i  $A\beta_{42}$  (5-10%). Varijanta s 42 aminokiseline je hidrofobnija od varijante s 40 aminokiselina zbog toga što sadrži izoleucinski ostatak i alanin na C-terminalnom kraju (Slika 4.).<sup>30</sup>

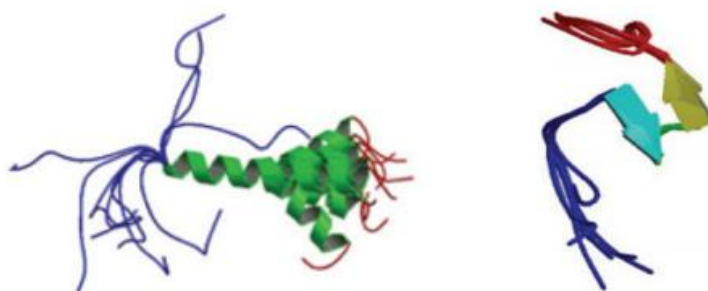
$A\beta_{40}$ : DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV  
 $A\beta_{42}$ : DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

**Slika 4.** Primarna struktura izoformi  $A\beta_{40}$  i  $A\beta_{42}$  s podebljanim razlikovnim aminokiselinama. Primjećuje se amfipatsko obilježje ovog peptida: N-terminalni kraj je pretežno hidrofilan dok je C-terminalni kraj pretežno hidrofoban<sup>30</sup>

Trodimenzionalna struktura izoforme  $A\beta_{40}$  dobivena nuklearnom magnetskom rezonancom (NMR) u vodenoj otopini otkriva konformaciju  $\alpha$ -heliksa između 15. i 36. aminokiselinskog ostatka s C-terminalnog kraja čija su dva segmenta odvojena zglobovom



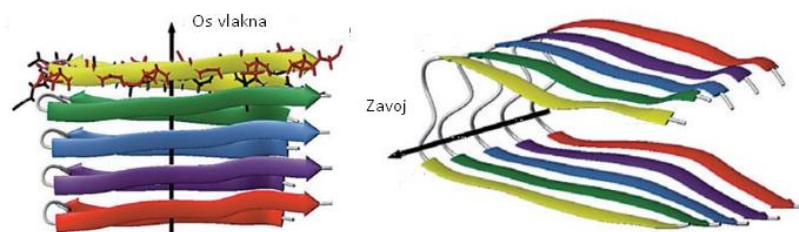
regijom koja ima konformaciju  $\beta$ -okreta, dok je peptid između 1. i 14. ostatka, koji su većinom polarni, nestrukturiran. Istraživanja ukazuju da je glavni čimbenik prijelaza iz strukture  $\alpha$ -heliksa u strukturu  $\beta$ -ploče spomenuta zglobna regija. NMR analiza dijela A $\beta$ -peptida između 10. i 35. aminokiselinskog ostatka u vodi pokazuje kompaktni skup zavoja i lanaca koji nemaju sekundarnu strukturu  $\alpha$ -heliksa ni  $\beta$ -ploče. Ovakav peptid stabiliziran je elektrostatskim i Van der Waalsovima interakcijama, a otprilike 25% njegove površine je hidrofobno i metastabilno što bi moglo dovesti do promjene konformacije i nastanka  $\beta$ -ploče (Slika 5.). Također, komparativne NMR analize izoformi A $\beta_{40}$  i A $\beta_{42}$  ukazuju na značajne razlike u strukturi ova dva peptida: u varijanti s 42 aminokiseline utvrđena je pristunost ukosnice između 38. i 41. aminokiseline koja smanjuje fleksibilnost C-terminalnog kraja pri čemu je primjećeno brže uspostavljanje strukture  $\beta$ -ploče kod izoforme A $\beta_{42}$ . Sukladno tome, primjećena je veća mogućnost formiranja agregata, odnosno veću toksičnost izoforme A $\beta_{42}$  što se slaže s činjenicom da veći omjer koncentracija izoformi A $\beta_{42}$  i A $\beta_{40}$  uzrokuje brže napredovanje i veću agresivnost bolesti te da je koncentracija izoforme A $\beta_{42}$  puno veća u amiloidnim plakovima iako je vrsta A $\beta_{40}$  dominantna forma ovog proteina u mozgu.<sup>31,32</sup>



**Slika 5.** NMR-om dobivene strukture A $\beta_{40}$  (lijevo) i A $\beta$  (10-35) (desno). U izoformi A $\beta_{40}$  vidi se struktura dvaju  $\alpha$ -heliksa odvojenih zglobnom regijom koju grade  $\beta$ -zaokret dok se u peptidu A $\beta$  (10-35) vidi kompaktna serija okreta i lanaca bez sekundarnih struktura  $\alpha$ -zavojnice i  $\beta$ -ploče. Preuzeto iz Chen i sur. 2017.<sup>32</sup>

Vežanje A $\beta$ -peptida u agregate prvi je korak u kaskadi događaja koji dovode do Alzheimerove bolesti. Nastajanje agregata započinje stvaranjem dimera i trimera A $\beta$ -peptida preko topljivih oligomera i protofibrila do filamenata. Dimeri A $\beta$ -peptida izolirani su iz moždanog tkiva pacijenata te su testirani *in vivo* i *in vitro* pri čemu je u njihovoj strukturi utvrđeno postojanje hidrofobne jezgre. Topljivi oligomeri se, s druge strane, smatraju najcitotoksičnijim agregatima A $\beta$ -peptida, a sastoje se od 3 do 50 A $\beta$ -peptida. Pronađeni su u

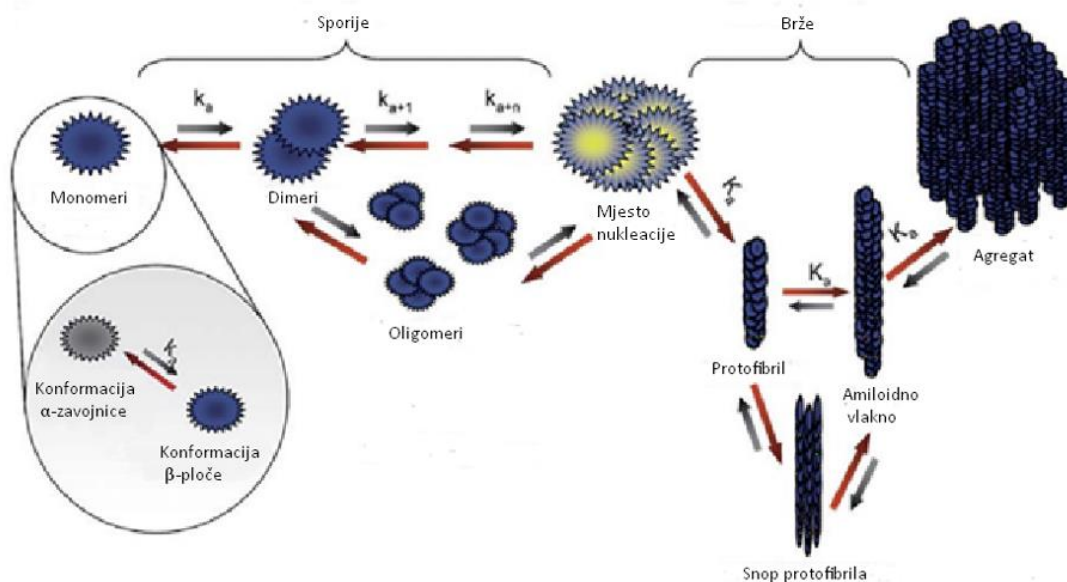
hranjivom mediju *in vitro* uzgajanih stanica s povećano eksprimiranim proteinom APP i u mozgu pacijenata koji boluju od Alzheimerove bolesti. Strukturna karakterizacija oligomera pokazala se kao težak zadatak zbog njihove nestabilnosti i česte promjene struktura. Međutim, upotrebom različitih stabilizatora, poput detergenata, pokazano je da se sastoje od velikog broja paralelnih i antiparalelnih  $\beta$ -ploča stabiliziranih intermolekularnim vodikovim vezama, a određene studije govore da  $\beta$ -ploče u oligomerima formiraju  $\beta$ -okret- $\beta$  (engl.  *$\beta$ -turn- $\beta$* ) motiv. Pretpostavlja se da su oligomeri intermedijarni oblik između monomera i amiloidnih filamenata i da se nalaze u ravnoteži s protofibrilima, toksičnim prekursorima amiloidnih filamenata. Filamenti se također sastoje od paralelnih i antiparalelnih  $\beta$ -ploča, a predstavljaju termodinamski stabilan, strukturalno organiziran i netopljiv niz ponavljajućih  $\beta$ -amiloidnih podjedinica koje su okomite na os filameta (Slika 6.). Utvrđeno je da filamenti *in vitro* mogu tvoriti različite strukture te će biti zanimljivo vidjeti postoji li diskriminacija struktura *in vivo*. Ovakvi filamenti karakteristični su za amiloidne plakove, međutim, smatra se da količina plakova nije proporcionalna neurotoksičnosti, već da ti plakovi nastaju kao rezultat izlučivanja  $A\beta$ -peptida iz stanica. *In vitro* eksperimentima utvrđeno je nastajanje triju vrsta agregata: i) agregati koji se sastoje samo od izoforme  $A\beta_{42}$ , ii) agregati koji se sastoje od izoformi  $A\beta_{42}$  i  $A\beta_{40}$  te iii) agregati koji se sastoje isključivo od izoforme  $A\beta_{40}$  pri čemu prva spomenuta vrsta agregira najbrže. Također, dokazano je da se izoforme  $A\beta_{42}$  puno lakše ugrađuju u agregate izoformi  $A\beta_{40}$  nego obrnuto. Isto tako, transgenični miševi s višestruko eksprimiranom izoformom  $A\beta_{40}$  nisu razvili neuralne plakove što zajedno s prethodno navedenim eksperimentima naglašava važnost izoforme  $A\beta_{42}$  u prvim koracima nastajanja Alzheimerove bolesti pri čemu vjerojatno agregacija peptida  $A\beta_{42}$  prethodi agregaciji peptida  $A\beta_{40}$ , ali i utječe na njihovu patogenost.<sup>32,33</sup>



**Slika 6.** Struktura filameta  $A\beta$ -peptida. Prikazan je niz ponavljajućih  $A\beta$ -podjedinica koje su okomite na os filameta (lijevo) te dvije  $A\beta$ -podjedinice povezane karakterističnim zavojem aminokiselinskog slijeda SNKGA. Preuzeto i prilagođeno iz Finder i sur. 2007.<sup>34</sup>

Mehanizmi nastanka agregata izoformi  $A\beta_{42}$  i  $A\beta_{40}$  su slični, iako postoje zanimljive razlike. Smatra se da se mehanizam nastanka agregata peptida  $A\beta_{42}$  (Slika 7.) zasniva na

formiranju mjesta nukleacije, odnosno pentamera ili heksamera peptida  $A\beta_{42}$  koji rastu polimerizacijom s drugim peptidima  $A\beta_{42}$  stvarajući veće oligomere poput dodekamera. Ovaj korak ograničava brzinu same reakcije pri čemu je dokazano da mjesta nukleacije moraju biti  $A\beta$ -peptidi budući da drugi proteini ne omogućavaju nastavak reakcije. S druge strane, formiranje oligomera peptida  $A\beta_{40}$  ne uključuje nastajanje mjesta nukleacije, a u *in vitro* eksperimentima formiranja takvih oligomera rana reakcijska smjesa sastojala se od ravnotežnih koncentracija monomera, dimera, trimera i tetramera ovog proteina. Postoje dva modela prelaska iz stanja monomera u stanje oligomera: prema prvom modelu monomeri postoje u ravnoteži između konformacija  $\alpha$ -heliksa i  $\beta$ -ploče pri čemu konformacija  $\beta$ -ploče povlači ravnotežu prema nastajanju oligomera. Međutim, prema drugom modelu tranzicija u konformaciju  $\beta$ -ploče događa se tek na razini oligomera što potkrepljuju dokazi o postojanju oligomera  $A\beta$ -peptida u obliku  $\alpha$ -heliksa. Također, formacija amiloidnih vlakana vjerojatno je omogućena hidrofobnim vezama između protofibrila koji formiraju filamente, a postoje i dokazi da je to kooperativan proces s konstantom brzinom elongacije. Svi oblici agregata  $A\beta$ -peptida toksični su za stanicu, a posebno su štetni oligomeri koji nastaju kao intermedijer u agregaciji  $A\beta$ -peptida.<sup>34</sup> Toksični utjecaji ovih oblika  $A\beta$ -peptida opisani su u sljedećem dijelu teksta.



**Slika 7.** Prikaz procesa agregacije  $A\beta$ -peptida u amiloidne fibrile koji se sastoji od niza reakcija definiranih konstantama ravnoteže  $K$  pri čemu formiranje mjesta nukleacije ograničava brzinu reakcije. Preuzeto i prilagođeno iz Finder i sur. 2007.<sup>34</sup>

### 3. Posljedice akumulacije A $\beta$ -peptida

Iako A $\beta$ -peptidi imaju različite uloge u zdravom organizmu, njihovom akumulacijom dolazi do kaskade događaja koji uzrokuju apoptozu neurona i prekid sinaptičkih veza što za posljedicu ima razvoj Alzheimerove bolesti. Količina i agregacija A $\beta$ -peptida u moždanom tkivu ponajprije ovise o njegovoj produkciji, omjeru njegovih izoformi i njegovu izlučivanju, odnosno pročišćavanju. Smatra se da nagomilavanju A $\beta$ -peptida, a time i pojavi Alzheimerove bolesti pogoduje nekoliko faktora, ponajprije genetski čimbenici, dulji životni vijek i različiti drugi poremećaji poput arteroskleroze i hipertenzije koje smanjuju sposobnost izlučivanja i pročišćavanja agregata A $\beta$ -peptida. Glavne genetske predispozicije za Alzheimerovu bolest su mutacije u proteinu APP koje povisuju omjer A $\beta_{42}$ /A $\beta_{40}$ , ali i samu količinu A $\beta$ -peptida, mutacije u regulatornim regijama koje povećavaju količinu proteina APP, a time i količinu A $\beta$ -peptida, pogrešne mutacije u genima za PS1 ili PS2 koje također dovode do povećanog omjera A $\beta_{42}$ /A $\beta_{40}$  te alel  $\epsilon 4$  gena za apolipoprotein E koji sudjeluje u pročišćavanju agregata A $\beta$ -peptida. S druge strane, starija životna dob uzrokuje nagomilavanje sve veće koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) koje oštećuju lipide, proteine i DNA, ali i pojačavaju toksične efekte agregata A $\beta$ -peptida. Također, starenjem dolazi do sve češćih nasumičnih mutacija i promjena u kompaktnosti kromatina koje za posljedicu mogu imati poremećaje u funkcijama presenilina, promjene u strukturi A $\beta$ -peptida, ali i smanjen kapacitet šaperona, ubikvitin-ligaza i ostalih medijatora stanične proteostaze o čemu će biti riječ kasnije u tekstu.<sup>2,35,36</sup>

Smatra se da su mehanizmi kojima agregati A $\beta$ -peptida dovode do apoptoze neurona i prekida sinaptičkih veza raznoliki te da zajedno pokreću molekularnu kaskadu koja dovodi do nastanka i progresije Alzheimerove bolesti (Slika 8.). Veliki značaj ima povećan nastanak vrsta ROS (superoksidni ion, vodikov peroksid, dušikov (II) oksid...) koji oštećuju lipide, proteine i molekule DNA. One u neuronima mogu uzrokovati različite poremećaje kao što su narušavanje integriteta stanične membrane, prestanak rada enzima važnih za metabolizam neurona poput glutamin-sintetaze ili kreatin-kinaze, ali i poremećaje u signalnim putevima i ionskoj ravnoteži, posebice u homeostazi kalcija. Također, oksidativni stres uzrokuje prestanak funkcije brojnih ATPaza i kolinergičkih receptora, ali i poremećaje u natrij-ovisnom transportu glutamata što narušava integritet sinaptičkih funkcija neurona.<sup>9</sup> Isto tako, dolazi do stvaranja toksičnih tvari na površini stanične membrane poput 4-hidroksinonenala koji uzrokuje oksidaciju lipida i prestanak funkcije transportera glukoze i glutamata.<sup>37-39</sup> Raznolik utjecaj vrsta ROS na stanicu uzrok je njihove izuzetne toksičnosti zbog čega ne čudi činjenica da su one čest medijator u

raznim neurodegenerativnim bolestima. Smatra se da su glavni mehanizmi kojim agregati A $\beta$ -peptida induciraju nastanka vrsta ROS promjene u metabolizmu željeza i djelovanje na mitohondrije.<sup>35</sup> Naime, A $\beta$ -peptidi se akumuliraju na mitohondrijskoj vanjskoj membrani čime blokiraju translokaciju brojnih mitohondrijskih metabolita i proteina uzrokujući poremećaje u transportnom lancu elektrona. Također, agregati A $\beta$ -peptida aktiviraju mitohondrijske fuzijske proteine Fis1 (engl. *mitochondrial fission 1 protein*) i Drp1 (engl. *dynamamin-related protein 1*) čime dolazi do fragmentacije mitohondrija, a sudjeluju i u vezanju brojnih apoptotičkih faktora što uzrokuje apoptozu neurona.<sup>40</sup> Još jedan faktor koji može uzrokovati apoptozu neurona je odgovor na nepravilno smotane proteine (engl. *unfolded protein response*, UPR) koji zbog nakupljanja velike količine nepravilno smotanih proteina u ER-u. uzrokuje smanjenu stopu translacije. Glavni enzim ovog odgovora je kinaza PERK (engl. *protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*) koja fosforilacijom deaktivira eukariotski inicijacijski faktor 2a (EIF2a). Također, dolazi do aktivacije ATF6 (engl. *activating transcription factor 6*) i inozitol-vezujućeg enzima (engl. *inositol-requiring enzyme 1*, IRE1) koji pozitivno reguliraju transkripciju šaperona koji djeluju na nesmotane proteine. Ukoliko ovi procesi ne uspiju smanjiti količinu nesmotanih proteina nastupa apoptoza pri čemu dolazi do izlaska kalcijevih iona iz ER-a koji aktiviraju sustav kaspaza.<sup>41</sup> Osim odgovora UPR karakterističnog za ER, postoji i mitohondrijski odgovor UPR koji uzrokuje povećana koncentracija nesmotanih i krivo smotanih proteina u mitohondriju i nepravilan rad sustava koji vrši oksidativnu fosforilaciju. Ovaj odgovor također ima za posljedicu smanjenu stopu opće translacije, ali i povećanu stopu transkripcije mitohondrijskih šaperona i proteaza čija je uloga ponovno smatanje ili razgradnja nesmotanih i nepravilno smotanih proteina.<sup>42</sup> Osim navedenih mehanizama toksičnosti agregata A $\beta$ -peptida, važno je spomenuti njihovo uzrokovanje kronično pojačanog imunskog odgovora pri čemu dolazi do aktivacije mikroglia stanica i astrocita. Aktivacijom ovih stanica dolazi do lučenja proupalnih medijatora poput eikozanoida, kemokina, komplementa i citokina poput tumorskog faktora nekroze  $\alpha$  (eng. *tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF $\alpha$ ), transformirajućeg faktora rasta  $\beta$  (eng. *transforming growth factor  $\beta$* , TGF $\beta$ ) i raznih interleukina od kojih su najvažniji interleukini 1, 4, 6 i 10 (IL1, IL4, IL6, i IL10). Navedeni spojevi uzrokuju kroničnu upalu i posljedično apoptozu neurona svojim neurotoksičnim djelovanjem (indukcija stvaranja vrsta ROS, suprimiranje antioksidacijskih enzima, djelovanje komplementa...)<sup>43</sup> Također, velika važnost pridaje se proteinu tau čija se hiperfosforilirana varijanta povezuje s nastankom neurofilamentnih zapleta. Budući da različite vrste šaperona igraju ulogu u formiranju, ali i pročišćavanju neurofilamentnih zapleta, u nastavku teksta detaljnije je objašnjena uloga proteina tau u nastanku i progresiji Alzheimerove bolesti.

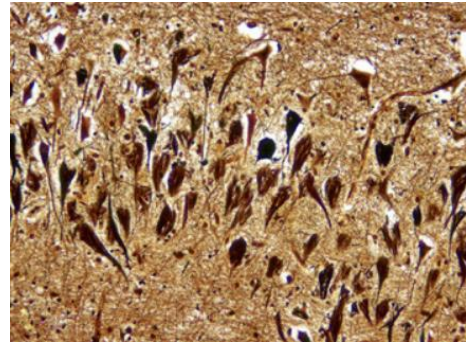
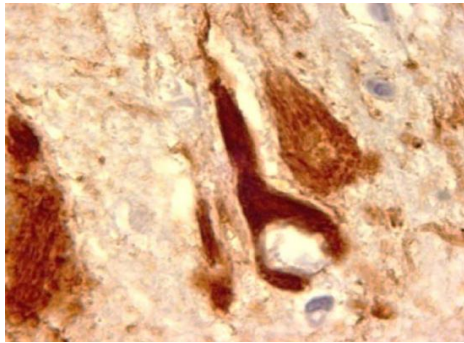


**Slika 8.** Shema povezanosti događaja koji dovode do pojave i progresije Alzheimerove bolesti. Akumuliranje i agregacija A $\beta$ -peptida dovode do ekstracelularnog odlaganja filamenata A $\beta$ -peptida te do brojnih već opisanih toksičnih intracelularnih efekata koji izazivaju apoptozu neurona i prekid sinaptičkih veza što uzrokuje pojavu demencije.

### 3.1. Protein tau i neurofilamentni zapleti

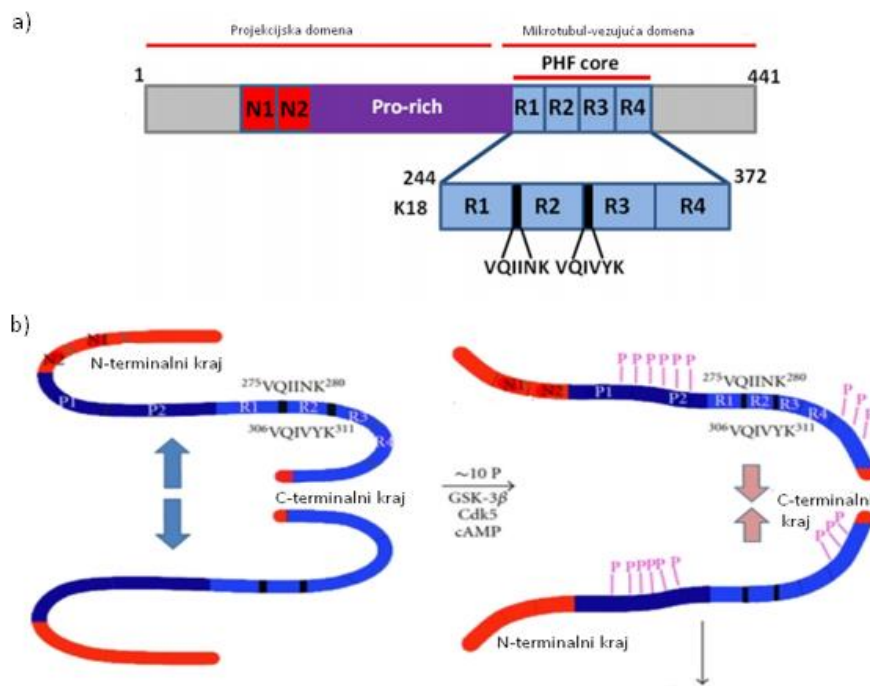
Protein tau normalan je sastojak citoplazme zdrave stanice, a spada u skupinu proteina MAP (engl. *microtubule associating protein*). Dolazi u obliku 6 izoformi nastalih alternativnim prekrajanjem, a uloga mu je sastavljanje tubulina u mikrotubule i njihova stabilizacija. U Alzheimerovoj bolesti ovaj protein je abnormalno fosforiliran što uzrokuje njegovu agregaciju u neurofilamentne zaplete (Slika 9.). Ovakvi zapleti sastoje se od helikalnih filamenata (PHF) i rjeđih ravnih filamenata svih izoformi proteina tau, a uzrokuju poremećaje u tvorbi i funkciji mikrotubula. Dok je u mozgu zdrava čovjeka protein tau prisutan isključivo kao topljiv protein, u pacijenata koji boluju od Alzheimerove bolesti on se nalazi i u obliku oligomera te filamenata

pri čemu je njegova ukupna količina od 4 do 8 puta veća. Također, procijenjeno je da protein tau pročišćen iz agregata ima 3 do 4 puta veći stupanj fosforilacije od normalnog proteina tau.<sup>44</sup>



**Slika 9.** Neurofilamentni zapleti proteina tau karakteristični za Alzheimerovu bolest pri povećanju od 400 puta obojani PHF-1 specifičnim antitijelima (lijevo), odnosno Bielschowskyjevim srebrom (desno). Preuzeto s <http://neuropathology-web.org/chapter9/chapter9bAD.html><sup>45</sup>

Protein tau sastoji se od projekcijske domene koja se ne veže za mikrotubule, a građena je od regije bogate prolinom i od dvije kisele regije (N1 i N2) te mikrotubul-vezujuće domene koju karakterizira različit broj R ponavljajućih regija (regije R1, R2, R3 i R4) ovisno o izoformi proteina tau (Slika 10.). Središnji dio proteina tau karakterizira struktura  $\beta$ -ploče, a N-terminalni i C-terminalni krajevi u normalnim uvjetima inhibiraju agregaciju u oligomere i filamente. Međutim, hiperfosforilacijom tih krajeva dolazi do promjene konformacije proteina zbog promjena u nekovalentnim interakcijama što omogućava agregaciju proteina tau u neurofilamentne zaplete (Slika 10.) pri čemu je proces agregacije relativno spor, a teče u nekoliko faza. Smatralo se da na početku procesa nastaju dimeri proteina tau zbog disulfidnih veza između cisteina u mikrotubul-vezujućim domenama i ionskih interakcija nakon čega dolazi do formiranja oligomera mehanizmom nukleacije koja je, kao i kod agregacije A $\beta$ -peptida, reakcija koja ograničava brzinu. Također, primijećeno je da kratki fragmenti proteina tau koji se sastoje isključivo od ponavljajućih regija polimeriziraju puno brže od normalnih proteina tau. Ipak, novija istraživanja pokazuju da disulfidne veze nemaju važnu ulogu u formiranju dimera i ukazuju na važnost heksapeptidnih fragmenata  $_{275}\text{VQIINK}_{28}$  (PHF6\*) i  $_{306}\text{VQIVYK}_{311}$  (PHF6) u formiranju tau dimera. PHF6\* fragment nalazi se u svim izoformama proteina tau dok se PHF6 fragment nalazi na početku R3 ponavljajuće regije što znači da je prisutan samo u 4R izoformi koja zaista pokazuje najveću sposobnost formiranja dimera.<sup>46,47</sup>



**Slika 10.** a) Protein tau sastoji se od projekcijske i mikrotubul-vezujuće domene koju karakteriziraju R-ponavljajuće regije čiji broj ovisi o izoformi proteina tau pri čemu tri izoforme imaju 3 R regije, a tri izoforme 4 R regije. Na slici su označene heksamerne regije, koje imaju važnu ulogu u formiranju dimera. b) Agregacija proteina tau pospješena je njegovim središnjim dijelom koji ima strukturu  $\beta$ -ploče dok je N- i C-terminalni krajevi inhibiraju. Hiperfosforilacijom N- i C-terminalnih krajeva dolazi do promjene u nekovalentnim interakcijama što dovodi do mogućnosti formiranja dimera, odnosno do početka agregacije ovog proteina. Preuzeto i prilagođeno iz Jouanne i sur. 2017.<sup>46</sup>

Smatra se da je hiperfosforilacija proteina tau u Alzheimerovoj bolesti pretežito posljedica utjecaja oligomera  $A\beta$ -peptida na kalpain, serinsku proteazu čije je djelovanje važno za regulaciju funkcije ciklin-ovisne kinaze 5 (engl. *cyclin-dependent kinase 5*, CDK5). Naime, signalni put CDK5 važan je za sinaptičku plastičnost i razvoj neurona zbog toga što sudjeluje u regulaciji različitih proteina poput transkripcijskih faktora, kadherina, ali i proteina tau. Ova kinaza aktivirana je ciklinima od kojih je za ovaj tekst važan ciklin p35 koji kalpain cijepa u ciklin p25 koji uzrokuje povećanu aktivnost CDK, a time i hiperfosforilaciju proteina tau. Smatra se da je u pacijenata s Alzheimerovom bolešću regulacija kalpaina poremećena zbog nepravilnosti u homeostazi kalcija koju uzrokuju agregati  $A\beta$ -peptida, no ova pretpostavka još uvijek nije dovoljno istražena. Osim CKD5, ustanovljeno je da GSK-3 $\beta$  kinaza (engl. *glycogen*



*synthase kinase 3β*) također uzrokuje hiperfosforilaciju proteina tau čija povećana aktivnost može biti rezultat odgovora UPR.<sup>48,49</sup>

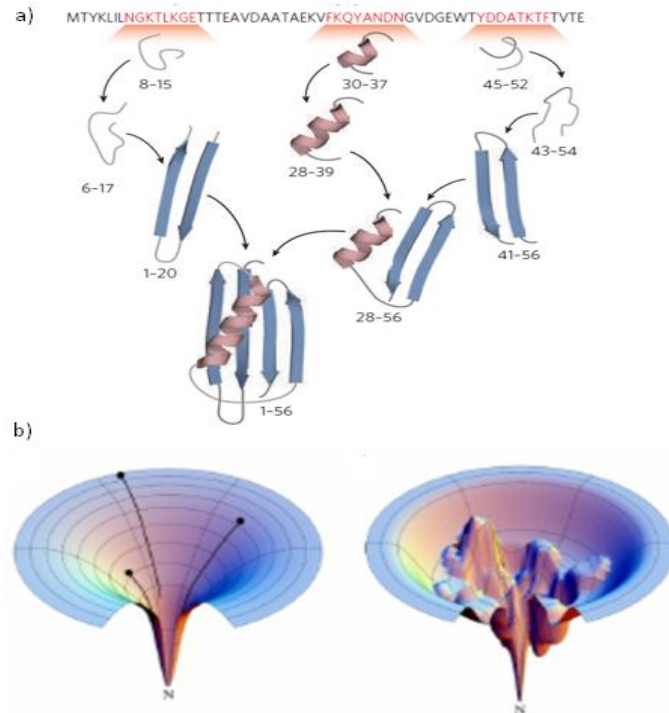
Toksičnost agregata hiperfosforiliranog proteina tau temelji se na gubitku njegove funkcije kao medijatora sastavljanja i stabilizacije mikrotubula. Međutim, smatra se da se oko 40% hiperfosforiliranog proteina tau nalazi u citoplazmi gdje sudjeluje u destabilizaciji mikrotubula pri čemu za sebe veže normalni protein tau i ostale proteine koji sudjeluju u regulaciji mikrotubula (MAP1 i MAP2). Također, smatra se da gomilanje proteina tau u tijelu i dendritima neurona uzrokuje promjene u funkciji hrapavog ER-a i Golgijeva kompleksa što dovodi do povećanog stupnja N-glikozilacije proteina tau, ali i fragmentacije tih organela, vjerojatno kao rezultat odgovora UPR. Poznato je da hiperfosforilacija proteina tau isto tako sprječava njegovu razgradnju ubikvintin-proteosomalnim putem i neuralnim proteazama aktiviranih kalcijem.<sup>44</sup> Ipak, kao učinkovitim čistaćima hiperfosforiliranog proteina tau pokazali su se određeni šaperoni o čemu će biti riječ u sljedećem dijelu teksta.

#### **4. Šaperoni i njihova uloga u razvoju Alzheimerove bolesti**

Molekularni šaperoni su funkcionalno povezane obitelji proteina čija je uloga stabiliziranje nepravilno smotanih proteina, odmatanje proteina za prijenos kroz membranu ili degradaciju i pomaganje u pravilnom smatanju te sastavljanju makromolekula u veće komplekse čime sudjeluju u održavanju stanične proteostaze. Prema svojoj funkciji podijeljeni su u 3 tipa: i) holdaze koje vežu intermedijere u smatanju proteina čime sprečavaju njihovu agregaciju, ii) foldaze koje sudjeluju u smatanju proteina pri čemu troše energiju hidroliziranjem veza molekule ATP-a i iii) unfoldaze koje sudjeluju u razmatanju proteina također koristeći energiju pohranjenu u vezama molekule ATP-a. Šaperoni svoje ime često dobivaju po molekulskoj masi u kilodaltonima, poput proteina toplinskog šoka (engl. *heat shock proteins*, Hsp). Također, šaperoni su visoko očuvani u evoluciji, a prisutni su u sve tri domene života gdje mogu imati nespecifične i specifične uloge. Esencijalni su za staničnu vijabilnost te je većina njih konstitutivno eksprimirana u normalnim staničnim uvjetima. Ipak, budući da su proteini u stresnim uvjetima (npr. visoka temperatura, veće promjene pH, hipoksija...) obično podložniji agregaciji, ekspresija većine šaperona je u takvim uvjetima povećana. Takav je slučaj i sa šaperonima Hsp čija je ekspresija regulirana transkripcijskim faktorom toplinskog šoka (engl. *heat shock factor*, HSF) koji se u stresnim uvjetima veže za promotore gena za protein Hsp čime potiče njihovu ekspresiju<sup>50,51</sup>

Smatanje proteina, odnosno uspostava njegove trodimenzionalne strukture jedan je od najvažnijih događaja u metabolizmu proteina, koji omogućava njegovu funkciju. Tercijarnu strukturu proteina određuje njegov aminokiselinski sastav, odnosno njegova primarna struktura koja je definirana u genetskom kodu organizma. Nastanak tercijarne strukture je iznimno složen proces vođen nekovalentnim interakcijama koji se temelji na hijerarhijskim razinama (Slika 11.): prvo dolazi do stvaranja sekundarnih struktura od strane pojedinih aminokiselina u polipeptidnom lancu. Nakon sastavljanja ovakvih lokalnih struktura dolazi do njihovih međusobnih interakcija koje usmjeravaju smatanje proteina. Potrebno je istaknuti hidrofobne interakcije kao važne medijatore smatanja: agregacija nepolarnih aminokiselinskih ostataka uzrokuje pozitivnu promjenu entropije što osigurava spontanost reakcije. Ovakav proces se nastavlja sve dok se ne formiraju proteinske domene i cijeli protein pri čemu je složenost strukture proteina proporcionalna brzini smatanja. Smatanje se može opisati i termodinamski koristeći modele lijevka (Slika 11.): nesmotana stanja karakterizirana su visokim stupnjem slobodne energije pri čemu sužavanje lijevka predstavlja sve manji broj konformacija koje protein može poprimiti. Dno lijevka predstavlja nativnu konformaciju proteina s nižom slobodnom energijom od nenativne konformacije što uvjetuje spontanost procesa.<sup>52</sup>

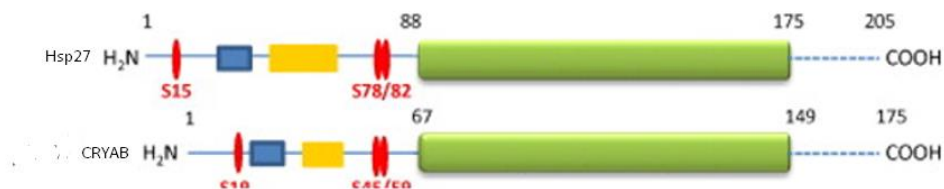
Iako je trodimenzionalna struktura proteina definirana njegovom primarnom strukturom, mnogi proteini ne mogu postići nativnu konformaciju samostalno, već im je potrebna pomoć holdaza i foldaza koje direktno usmjeravaju pravilno smatanje proteina ili omogućuje mikrokoliš u kojem će se smatanje događati.<sup>52</sup> Također, šaperoni sudjeluju u sprječavanju nastanka i agregacije hidrofobnih A $\beta$ -peptida, čije nagomilavanje uzrokuje zasićenje šaperonskih sustava i molekularnih događaja koje dovode do pojave simptoma Alzheimerove bolesti. U nastavku teksta detaljno su opisane obitelji šaperona bitne za nastajanje, agregiranje i pročišćavanje proteina APP, A $\beta$ -peptida i proteina tau.



**Slika 11.** a) Prikaz hijerarhijskog modela smatanja proteina: lokalno nastajanje sekundarnih struktura uvjetovano je nekovalentnim interakcijama. b) Dva oblika termodinamskih lijevaka koji predstavljaju smatanje dvaju različitih proteina. Termodinamski lijevci svakog proteina se razlikuju i ovise o njegovoj složenosti. Desno je prikazan termodinamski lijevak proteina s velikim brojem relativno stabilnih intermedijera koji postižu lokalne minimume slobodne energije. Preuzeto iz Nelson i sur. 2013.<sup>52</sup>

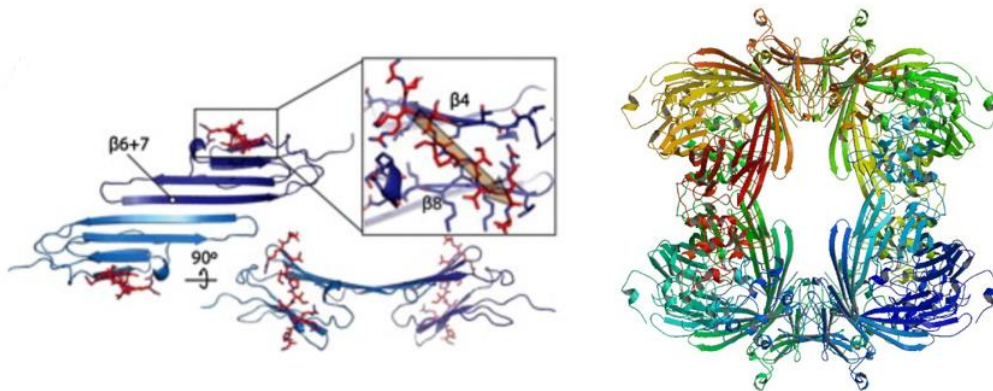
#### 4.1. Manji proteini Hsp

Manje proteine toplinskog šoka (engl. *small heat shock proteins*, sHsp) karakterizira molekulska masa između 12 i 43 kDa. Sadrže C-terminalnu domenu veličine od 80 do 100 aminokiselinskih ostataka koja se zove  $\alpha$ -kristalin domena (engl.  *$\alpha$ -crystallin domain*, ACD) koju omeđuju manje očuvan N-terminalni kraj i varijabilno C-terminalno produljenje (Slika 12.). U genomu čovjeka identificirano je 10 proteina sHsp koji su prisutni u različitim tkivima gdje igraju važnu ulogu u obrani stanice u uvjetima stresa.<sup>53</sup>



**Slika 12.** Karakteristična građa proteina sHsp na primjeru proteina Hsp27 i  $\alpha$ -kristalina B (engl.  *$\alpha$ -crystallin B protein*, CRYAB). Zeleno: karakteristična domena ACD, žuto: N-terminalni kraj važan u formiranju oligomera, crveno: mjesta fosforilacije, plavo: motiv WDPF važan za fosforilaciju. Preuzeto i prilagođeno iz Acunzo i sur. 2012.<sup>54</sup>

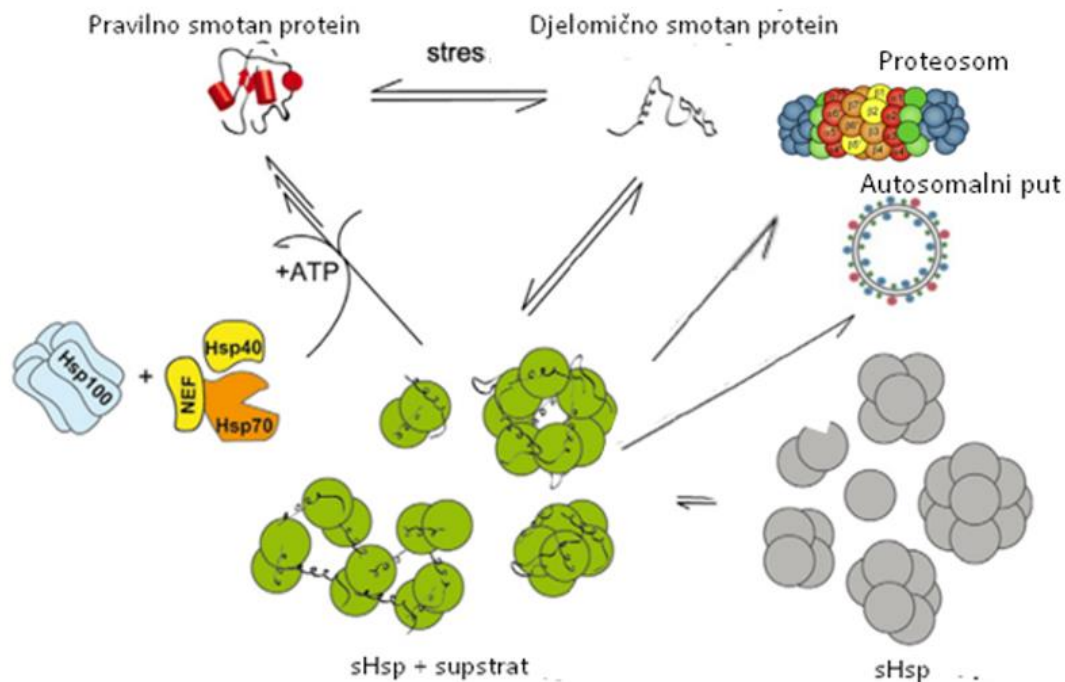
Domena ACD ima ulogu u formiranju dimera proteina sHsp koju omogućuje antiparalelno spajanje  $\beta 6$  i  $\beta 7$  lanaca svakog monomera čime nastaje struktura  $\beta$ -sendviča. Ovako formiran dimer služi kao gradivna jedinica oligomera koji su bitni za djelovanje ovih proteina. Stvaranje većih oligomera uključuje velik broj interakcija u kojima sudjeluju domena ACD, N-terminalni kraj i C-terminalno produljenje (Slika 13.). Naime, interakcije C-terminalnog produljenja jednog dimera s  $\beta 4$  i  $\beta 8$  lancima drugih dimera uzrokuju nastajanje heksamera, a pretežito hidrofobne interakcije između N-terminalnih krajeva uzrokuju nastajanje većih oligomera. Fosforilacija ovih proteina važna je posttranslacijska modifikacija koja uvjetuje stvaranje oligomera navedenih proteina i promjenu aktivnosti u ovisnosti o uvjetima u kojima se nalazi stanica.<sup>53</sup>



**Slika 13.** Lijevo: prikaz reakcija formiranja dimera proteina sHsp interakcijama između  $\beta 6$  lanca i  $\beta 7$  lanca monomera. Povećano je prikazana regija koja sadrži  $\beta 4$  i  $\beta 8$  lance koji su važni za formiranje heksamera proteina sHsp. Desno: trodimenzionalna struktura oligomera proteina CRYAB, važnog člana skupine proteina sHsp koji sprječava agregaciju A $\beta$ -peptida. Preuzeto iz Bakthisaran i sur. 2015.<sup>53</sup> i s <https://www.rcsb.org/structure/2YGD><sup>55</sup>

Proteini sHsp javljaju se u različitim tipovima stanica gdje obično u stresnim uvjetima djeluju na proteine zadužene za prijenos signala, metabolizam, transkripciju i translaciju te mnoge druge procese. Također, potrebno je istaknuti ulogu ovih šaperona u sprječavanju mitohondrijskog puta apoptoze vežući i inaktivirajući razne elemente tog puta poput aktivatora kaspaza te u stabilizaciji velikog broja citoskeletnih elemenata. Glavni ciljevi njihova djelovanja su reaktivacija proteina u njihovo aktivno stanje ili degradacija proteina koji ne mogu ponovno poprimiti svoju funkciju (Slika 14.). Najčešće djeluju kao holdaze vežući djelomično denaturirane proteine sprječavajući njihovu nespecifičnu agregaciju što znači da obično ne reagiraju s proteinima u nativnoj konformaciji ili potpuno nesmotanim proteinima. Završetkom stresnih uvjeta supstrati ovakvih šaperona najčešće se otpuštaju te se ponovno

smataju uz djelovanje foldaza, npr šaperona Hsp70 ili se degradiraju proteosomalnim, odnosno autosomalnim putem.<sup>53</sup>



**Slika 14.** Shema djelovanja šaperona sHsp. Supstrati šaperona sHsp su djelomično smotani proteini pri čemu ovi šaperoni sprječavaju njihovu agregaciju vežući se za njih. Također, moguća je i razgradnja djelomično smotanih proteina proteosomalnim ili autosomalnim sustavom. Ovi šaperoni predstavljaju prvi odgovor stanice na stresne uvjete, a sudjeluju u velikoj mreži šaperona pri čemu daljnu ulogu u pravilnom smatanju supstrata ovih šaperona imaju foldaze poput šaperona Hsp60, Hsp70 i Hsp90. Preuzeto i prilagođeno iz Halsbeck i sur. 2015.<sup>56</sup>

Dokazane su brojne uloge proteina sHsp u prevenciji agregacije A $\beta$ -peptida. Primjerice, utvrđeno je da se šaperon CRYAB, ali i drugi proteini sHsp, poput Hsp22 i Hsp27 vežu za amiloidne filamente te sprječavaju njihovu elongaciju, a protein Hsp22 veže se za monomere A $\beta$ -peptida pri čemu sprječava formiranje strukture  $\beta$ -ploče, a time i njihovu agregaciju.<sup>57-59</sup> Isto tako, postoje dokazi o ulozi proteina Hsp27 u promjeni fluidnosti i propusnosti stanične membrane što povećava njezinu stabilnost uzrokujući povećanu otpornost membrane na toksičnost A $\beta$ -peptida ali i smanjenje njihove produkcije budući da aktivnosti  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretaze ovise o fluidnosti membrane.<sup>60</sup> Dokazana je i uloga proteina Hsp27 u zaštiti stanice od oksidativnog stresa pri čemu taj šaperon povećava koncentraciju glutationa i smanjuje koncentraciju željezovih iona.<sup>61</sup> Isto tako, šaperon Hsp27 veže se za hiperfosforilirani protein tau pri čemu pospješuje njegovu defosforilaciju promjenom konformacije, ali i degradaciju neovisnu o ubikvintinu. Na te načine sprječava destabilizirajući učinak hiperfosforiliranih

proteina tau na mikrotubule.<sup>62</sup> Dakle, proteini sHsp igraju ulogu u smanjenju produkcije i agregacije A $\beta$ -peptida, ali i u djelomičnoj zaštiti stanica od toksičnih efekata A $\beta$ -peptida pri čemu smanjuju stupanj oksidacije lipida, proteina i DNA, povećavaju integritet staničnih membrana, uzrokuju defosforilaciju i razgradnju proteina tau te inhibiraju djelovanje proapoptotskih molekula.

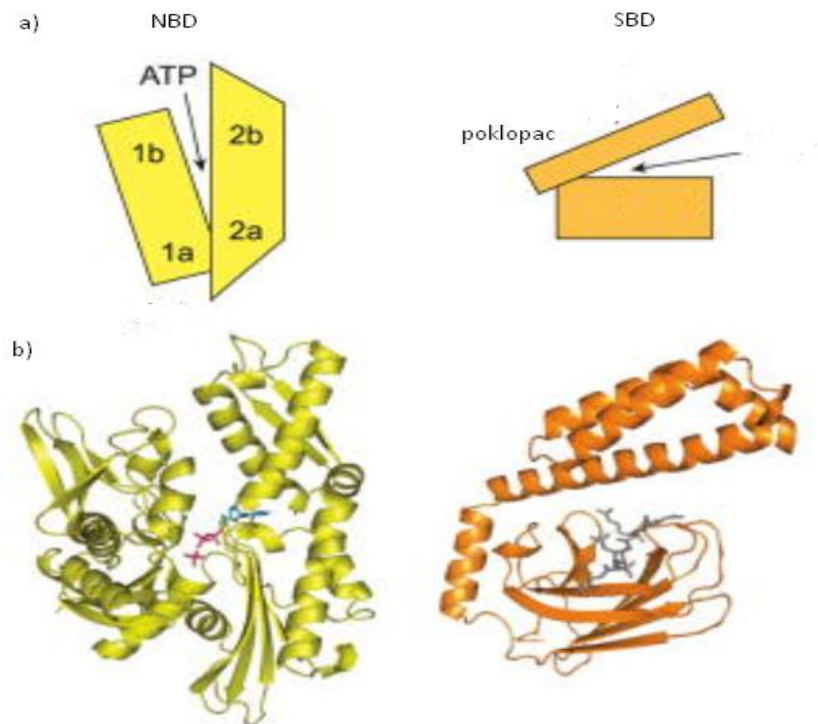
Međutim, utvrđeno je i djelovanje šaperona sHsp na povećanje toksičnosti A $\beta$ -peptida. Primjerice, velikim brojem hidrofobnih interakcija između šaperona CRYAB i srži A $\beta$ -peptida nastaju toksični B/A $\beta$  kompleksi u kojima A $\beta$ -peptidi imaju oksidiran Met35 što pospješuje redukciju Cu<sup>2+</sup> u Cu<sup>+</sup> koja je bitna za stvaranje određenih vrsta ROS poput hidroksilnih radikala.<sup>63,64</sup> Također, neurofilamentni zapleti nastali akumuliranjem proteina tau uzrokuju povećanju ekspresiju šaperona Hsp22 u susjednim astrocitima što doprinosi čišćenju izvanstaničnih agregata A $\beta$ -peptida, ali i lučenju proupalnih citokina poput IL6 koji pojačavaju protuupalni odgovor organizma i ubrzavaju apoptozu neurona.<sup>43,65</sup> Ipak, uloga šaperona sHsp u Alzheimerovoj i drugim neurodegenerativnim bolestima još uvijek nije dovoljno istražena te će biti zanimljivo vidjeti povezanost ovih šaperona i molekularnih događaja u ovim bolestima na kronološkoj razini, ali i mogućnost korištenja znanja o ovim šaperonima u terapijske svrhe.

## 4.2. Hsp70

Hsp70 je naziv za skupinu šaperona molekulske mase od 70 kDa koji su važni za različite procese u metabolizmu proteina. Neki od tih procesa su smatanje nosintetiziranih proteina, ponovno smatanje pogrešno smotanih proteina, translokacija različitih sekretornih proteina i proteina organela kroz membranu, konformacijske promjene prilikom prijenosa signala te sudjelovanje u proteosomalnoj razgradnji proteina. U čovjeka je zasad otkriveno 17 članova ove skupine pri čemu je ustanovljena njihova lokalizacija u mitohondrijima, ER-u i citosolu stanica. Za njihovo djelovanje neizostavan je ATP koji regulira vezanje supstrata, a obično su potrebni i košaperoni koji reguliraju njihovu aktivnost. Mehanizam smatanja proteina ovim šaperonima još uvijek nije potpuno razjašnjen, ali utvrđena su dva modela njihova djelovanja. Prvi model podrazumijeva pasivnu ulogu ovih šaperona, a temelji se na kontinuiranom vezanju i otpuštanju supstrata koji se samostalno smata pri čemu je koncentracija supstrata dovoljno mala da ne dođe do stvaranja agregata (uloga holdaze). Drugi model se također temelji na kontinuiranom vezanju i otpuštanju supstrata, ali podrazumijeva i lokalno razmatanje pojedinih sekundarnih struktura koje omogućava savladavanje kinetičke

barijere za pravilno smatanje pri čemu se energija u vezama molekule ATP-a osim za vezanje supstrata koristi i za promjenu konformacije šaperona. Još jedno važno djelovanje ovih šaperona je blokiranje apoptoze ometajući vezanje proapoptotskih molekula za svoje receptore, a poznato je i djelovanje ovih šaperona u aktivaciji urođene i adaptivne imunosti.<sup>66-69</sup>

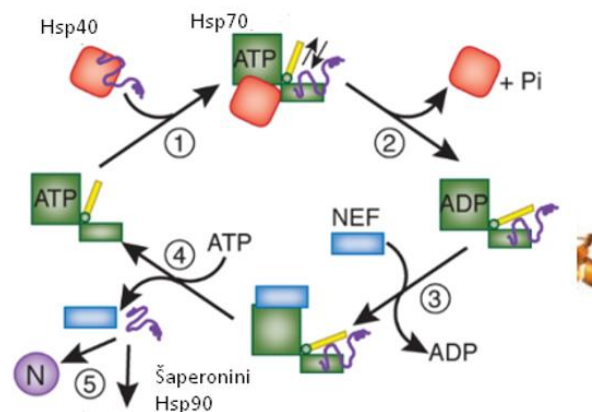
Šaperoni Hsp70 sastoje se od ATP-vezujuće N-terminalne domene (engl. *nucleotide binding domain*, NBD) koja ima funkciju ATPaze, C-terminalne supstrat-vezujuće domene (engl. *substrate binding domain*, SBD) i konzervirane poveznice između njih (Slika 15.). Domena NBD sastoji se od dva fleksibilna reznja i otvorenja između njih za koje se veže molekula ATP-a zajedno s jednim  $Mg^{2+}$  i dva  $K^{+}$  kationa. Mjesto vezanja ATP-a karakterizirano je dvama zavojima koji vežu  $\beta$ - i  $\gamma$ -fosfatne skupine i hidrofobnim adenozin-vezujućim džepom. S druge strane, domena SBD se također sastoji od dvije regije od kojih prvu karakterizira struktura hidrofobnog žlijeba za koji se veže supstrat, a drugu  $\alpha$ -helikalna struktura koja čini poklopac nad mjestom vezanja supstrata. Mjesto vezanja supstrata sastoji se od sendviča dvaju  $\beta$ -ploča i četiri zavoja od kojih dva sudjeluju u vezanju supstrata, a druga dva u zatvaranju  $\alpha$ -helikalnog poklopca pomoću ionskih interakcija i vodikovih veza. Za pravilnu funkciju ovih proteina bitna je suradnja između ovih dvaju domena: vezanjem molekule ATP-a za domenu NBD uzrokuje povećanje fleksibilnosti između spomenutog poklopca i mjesta vezanja supstrata u domeni SBD. To uvjetuje prijenos mnogih konformacijskih promjena kroz subdomene domene NBD što uzrokuje otvaranje mjesta vezanja supstrata. Također, vezanjem supstrata za domenu SBD uzrokuje ubrzanje hidrolize molekule ATP-a u domeni NBD.<sup>67,70</sup>



**Slika 15.** a) Shematski prikaz domena NBD i SBD proteina Hsp70. Domena NBD sastoji se od dvaju režnjeva koji su podijeljeni na dva dijela: prvi režanj sastoji se od subdomena 1a i 1b, a drugi od subdomena 2a i 2b pri čemu subdomene 1a i 2a formiraju dno udubljenja za koje se veže ATP. Domena SBD sastoji se od  $\beta$ -ploče s hidrofobnim žlijebom za vezanje supstrata i  $\alpha$ -helikalnog poklopca koji regulira dostupnost mjesta vezanja supstrata. b) Trodimenzionalni prikaz domena NBD i SBD šaperona Hsp70. Preuzeto i prilagođeno iz Young, 2010.<sup>70</sup>

Postoji puno košaperona koja interagiraju sa šaperonom Hsp70 i reguliraju njegovo djelovanje od kojih su najvažniji protein Hsp40 i faktor izmjene nukleotida (engl. *nucleotide exchange factor*, NEF). Košaperon Hsp40 veže se za nesmotane peptide gdje, osim što ima funkciju holdaze, služi u prenošenju takvih peptida na šaperon Hsp70 nakon čega dolazi do hidrolize molekule ATP-a u domeni NBD šaperona Hsp70 što uzrokuje zatvaranje  $\alpha$ -helikalnog poklopca njegove domene SBD. Izmjenom molekule ADP-a s novom molekulom ATP-a potpomognutom košaperonom NEF otvara se  $\alpha$ -helikalni poklopac domene SBD što uzrokuje otpuštanje supstrata gdje ciklus može započeti ispočetka (Slika 16.). Ovako procesiran polipeptid može samostalno završiti proces smatanja, ponovno se vezati za iste ili druge članove Hsp70 skupine i ući u novi ciklus smatanja ili dovršiti smatanje pomoću drugih šaperona, poput šaperona Hsp60 ili Hsp90<sup>70</sup> o kojima će biti riječ kasnije u tekstu.

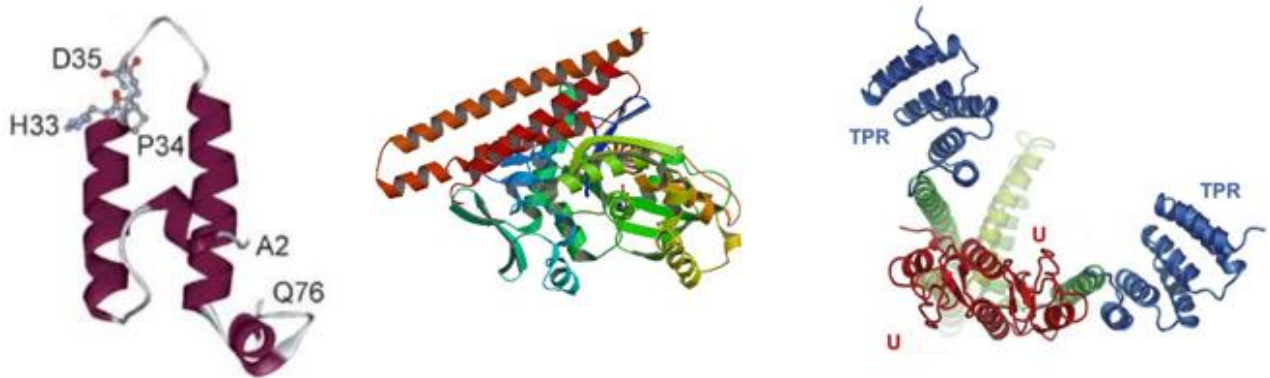




**Slika 16.** Ciklus djelovanja šaperona Hsp70 i njegovih košaperona. Nakon završetka ciklusa šaperona Hsp70 protein može završiti svoje smatanje na više načina poput ponovnog ulaska u ciklus šaperona Hsp70, samostalnog smatanja ili ulaska u ciklus drugih foldaza poput šaperona Hsp90 ili Hsp60. Preuzeto i prilagođeno iz Suresh, 2015.<sup>71</sup>

Spomenuti košaperoni imaju važnu ulogu u ciklusu šaperona Hsp70. Zadaću košaperona Hsp40 obično vrši obitelj proteina s domenom J (engl. *J-domain proteins*, JDP) čija se J domena nalazi na N-terminalnom kraju proteina (Slika 17.). Ona služi za vezanje šaperona Hsp70 što dovodi do prijenosa supstrata i njihove promjene konformacije uzrokujući otprilike 1000 puta povećanu brzinu hidrolize molekule ATP-a. Utvrđeno je da se ovi proteini svojom J domenom vežu za rascjep između subdomene 1a i 2a šaperona Hsp70 pri čemu je za vezanje važna i regija poveznice. Također, za ove proteine karakteristična je i supstrat-vezujuća C-terminalna domena koja, još uvijek nerazriješenim mehanizmom, veže različite hidrofobne nesmotane, odnosno nepravilno smotane peptide. Smatra se da ova domena ima ulogu holdaze pri čemu spjrečava agregaciju vezanih proteina te da omogućuje vezanje supstrata za protein Hsp70 povećanim afinitetom. S druge strane, ulogu proteina NEF u eukariota najčešće vrše proteini s domenom Bag (engl. *bcl-2-associated athanogene*) koja se nalazi na njihovu C-terminalnom kraju (Slika 17.), a stimulira otpuštanje molekule ADP-a sa šaperona Hsp70. Mehanizam ovog djelovanja temelji se na vezanju domene Bag za konformaciju s otvorenim  $\alpha$ -helikalnim poklopcem šaperona Hsp70 čime je stabilizira i omogućava otpuštanje molekule ADP-a. Važno je spomenuti i protein CHIP (engl. *carboxyl terminus of Hsc70 interacting protein*) koji također djeluje kao košaperon Hsp70 obitelji s ulogom ubikvitinacije supstrata šaperona Hsp70 koja dovodi do njegove proteosomalne razgradnje. Ovaj protein u svom N-terminalnom kraju sadrži domenu TPD (engl. *tetratricopeptide domain*), koja se sastoji od nekoliko antiparalelnih parova

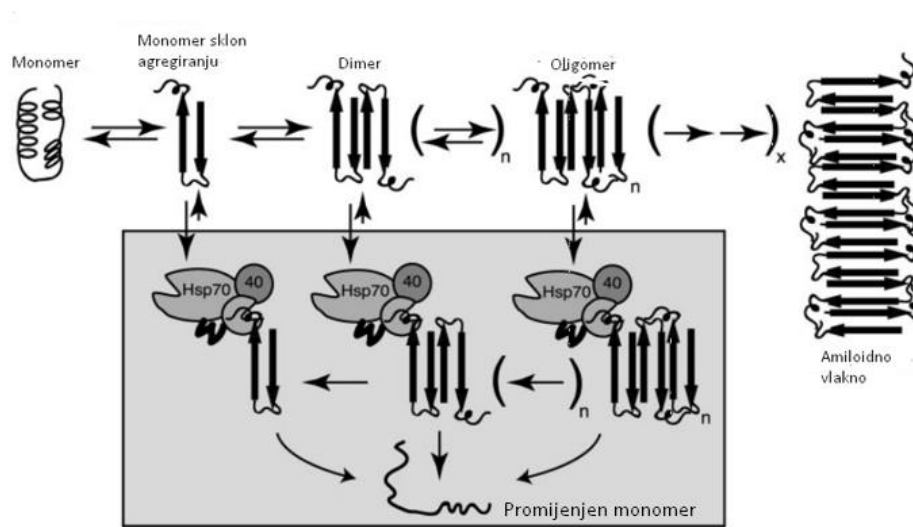
$\alpha$ -heliksa, a služi za interakciju sa domenom SBD šaperona Hsp70 i domenu U-kutije (engl. *U-box domain*) na C-terminalnom kraju koja ima karakteristike E3 ubikvintin-ligaze. Između te dvije domene nalazi se povezujuća domena s visokim udjelom nabijenih aminokiselina i dva signala za translokaciju u jezgru koja također pomaže u vezanju proteina CHIP za šaperon Hsp70 (Slika 17.). Smatra se da vezanjem za šaperon Hsp70 košaperon CHIP usporava reakciju smatanja proteina inhibirajući hidrolizu molekule ATP-a te omogućava ubikvitinaciju i transport supstrata do proteosoma.<sup>70,72</sup>



**Slika 17.** Lijevo: trodimenzionalna struktura domene J kojom se proteini JDP vežu za rascjep između subdomena 1a i 2a šaperona Hsp70 ubrzavajući hidrolizu molekule ATP-a. Sredina: Kristalna struktura domene Bag (crveno) u interakciji s ATPaznom domenom Hsc70 člana Hsp70 obitelji šaperona. Desno: Trodimenzionalni prikaz molekule košaperona CHIP. Ovaj košaperon funkcionira u obliku dimera pri čemu se sastoji od N-terminalne domene TPD sastavljene od ponavljanja TPR (engl. *tetratricopeptide repeat*), C-terminalne U-kutije stabilizirane vodikovim vezama i nabijene regije između njih. Preuzeto i iz Mayer i sur. 2005, <http://www.rcsb.org/structure/1HX1> i Zhang i sur. 2005.<sup>67,73,74</sup>

Ustanovljena je povećana ekspresija mnogih šaperona Hsp70 i njihovih košaperona u mozgu osoba koje boluju od Alzheimerove bolesti što se primarno povezuje s ulogom ovih šaperona u zaštiti stanice od toksičnih učinaka agregata A $\beta$ -peptida. Utvrđeno je vezanje mnogih članova ove skupine šaperona za hidrofobne dijelove monomera i oligomera A $\beta$ -peptida uz pomoć košaperona Hsp40 pri čemu se smanjuje količina agregata A $\beta$ -peptida. Najvjerojatniji model djelovanja ovih šaperona na agregate A $\beta$ -peptida je njihovo vezanje za izložene hidrofobne regije ovih peptida sa strukturom  $\beta$ -ploče koja je podložna agregaciji. Ovakvim vezanjem dolazi do povećanja slobodne energije, odnosno do povećanja nestabilnosti ovakvih konformacija što dovodi do poželjne konformacije ovih peptida koja nije sklona agregaciji (Slika 18.). Također, pokazano je da se šaperoni Hsp70 vežu i za amiloidne

filamente pri čemu nemaju sposobnost njihove razgradnje, vjerojatno zbog nedostupnih hidrofobnih regija u unutrašnjosti filamenata.<sup>75,76</sup>

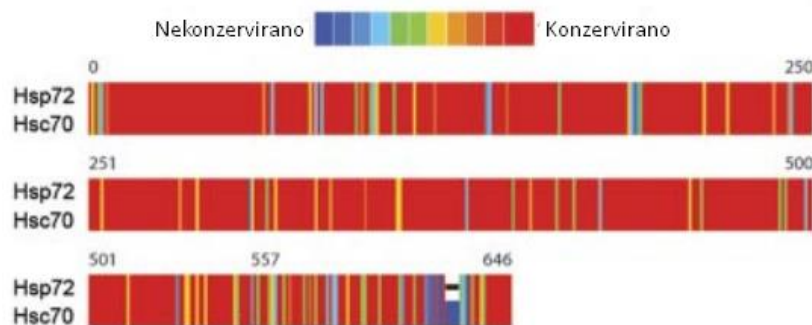


**Slika 18.** Model djelovanja šaperona Hsp70 na agregate Aβ-peptida. Šaperon Hsp70 veže se za hidrofobne regije Aβ-peptida sklonog agregaciji i mijenja mu konformaciju. Ovaj model poklapa se s eksperimentalnim podacima koji pokazuju da stupanj inhibicije formiranja agregata Aβ-peptida ovisi o koncentraciji ATP-a i košaperona Hsp40 te proteina NEF. Preuzeto i prilagođeno iz Evans i sur. 2006.<sup>75</sup>

Osim sprječavanja agregacije Aβ-peptida, šaperoni Hsp70 na mnoge druge načine smanjuju njihovo toksično djelovanje. Primjerice, ovi šaperoni mogu djelovati kao transkripcijski faktori i pojačati ekspresiju brojnih gena koji kodiraju za proteine važne za funkcioniranje sinapsi i život neurona. Neki od tih proteina su proteini odgovorni za transport i biosintezu amina, proteini važni za prijenos živčanih impulsa, ali i proteini koji djeluju kao aktivatori MAPK kaskade koja ima bitnu ulogu u održavanju plastičnosti sinapsi i neuroprotektivnih mehanizama. Također, ustanovljeno je da ovi šaperoni poboljšavaju pročišćavanje agregata Aβ-peptida povećavajući ekspresiju enzima IDE (engl. *insulin degrading enzyme*). Isto tako, bitno je ponovno istaknuti ulogu šaperona Hsp70 u sprječavanju apoptoze koja je važna za njegovu neuroprotektivnu funkciju. Određena istraživanja su ustanovila da se šaperoni Hsp70 vežu za kaspazu 3 čime sprječavaju njezino vezanje za receptor što uzrokuje gubitak njezine funkcije. Međutim, druga istraživanja pokazuju da šaperoni Hsp70 u inhibiciji apoptoze djeluju prije aktivacije kaspaza pri čemu sprječavaju promjenu mitohondrijskog membranskog potencijala te curenje kalcija iz mitohondrija. Mehanizmi

inhibicije ovih događaja od strane šaperona Hsp70 još uvijek nisu poznati te su predmet istraživanja.<sup>67,77,78</sup>

Utvrđeno je da šaperoni Hsp70 obitelji na različite načine djeluju na agregate proteina tau. Zanimljiva je razlika u djelovanju dvaju najčešćih citosolnih varijanti šaperona Hsp70 obitelji, šaperona Hsc70, čija je ekspresija inducirana stresnim uvjetima, i šaperona Hsp72 koji je konstitutivno eksprimiran. Naime, unatoč 80%-tnoj sličnosti u primarnoj strukturi ova dva šaperona (Slika 19.), šaperon Hsc70 pospješuje vezanje proteina tau za mikrotubule dok šaperon Hsp72 djeluje obrnuto što znači da šaperon Hsc70 usporava, a šaperon Hsp72 pospješuje pročišćavanje agregata hiperfosforiliranog proteina tau. Štoviše, pri velikim koncentracijama šaperona Hsp72 šaperon Hsp70 ne može vršiti svoju funkciju te dolazi do degradacije proteina tau iz čega proizlazi da omjer koncentracija ovih dvaju šaperona određuje sudbinu proteina tau u stanici. Smatra se da se ovi šaperoni vežu za heksapeptide PHF6\* i PHF6 proteina tau pri čemu razlike u primarnoj strukturi domena SBD šaperona uvjetuju jače vezanje šaperona Hsp72 za regije R2 i R3 proteina tau od šaperona Hsc70 što objašnjava relativnu inhibiciju funkcije šaperona Hsc70 od strane šaperona Hsp72. Razliku u funkciji ova dva proteina objašnjava različit afinitet njihovih domena SBD za košaperon CHIP. Utvrđeno je da šaperon Hsp72 u uvjetima visoke koncentracije monomera proteina tau pojačano veže protein CHIP što uzrokuje čišćenje proteina tau proteosomalnom razgradnjom pri čemu se košaperon CHIP veže za domenu SBD šaperona i mikrotubul-vezujuću domenu proteina tau.<sup>72,79</sup>



**Slika 19.** Prikaz poravnanja sekvenci šaperona Hsp72 i Hsc70. Ova dva proteina dijele 80% primarne strukture pri čemu se najveće razlike uočavaju u njihovim C-terminalnim domenama. Preuzeto i prilagođeno iz Jinwal i sur. 2013.<sup>79</sup>

Potrebno je spomenuti i protein Grp78 (engl. 78 kDa *glucose regulated protein*) kao člana obitelji Hsp70 koji djeluje unutar ER-u pri čemu ima brojne uloge poput translokacije

novosintetiziranih proteina u ER i započinjanja odgovora UPR aktivacijom proteina PERK, IRE1 i ATF6. Također, ovaj šaperon djeluje kao holdaza i foldaza na novosintetizirane nesmotane proteine, a ustanovljeno je i njegovo djelovanje u proteosomalnoj razgradnji krivo smotanih proteina povezanoj s ER-om. Naime, smatra se da šaperon Hsp70 u ovom obliku proteosomalne razgradnje vrši ulogu prepoznavanja nepravilno smotanih proteina vežući se za njihove hidrofobne regije, cisteine koji nisu povezani disulfidnim vezama ili mjesta koja su glikozilirana krivim saharidom. U pacijenata oboljelih od Alzheimerove bolesti utvrđena je povećana koncentracija ovog šaperona u moždanom tkivu, ali i fosforilacija medijatora odgovora UPR poput proteina PERK i IRE1 što ukazuje na njihovu važnu ulogu u pojavi i progresiji ove bolesti. Također, određena istraživanja pokazuju da se isti ovi događaji odvijaju i u staničnoj kulturi dodatkom ekstracelularnih oligomera i filamenata A $\beta$ -peptida. Moguće je da agregati A $\beta$ -peptida posredno uzrokuju odgovor UPR preko destabilizacije dinamike ER-a djelujući na mikrotubule ili preko uzrokovanja oksidativnog stresa, ali i neposredno preko akumulacije proteina APP i njegovih derivata u ER-u. Smatra se da je glavni neuroprotektivni mehanizam odgovora UPR u Alzheimerovoj bolesti njegovo djelovanje na metabolizam proteina APP pri čemu šaperon Grp78 ima ulogu redistribuiranja proteina APP i njegovih derivata iz kasnih u rane dijelove sekretornog puta. Utvrđeno je da ovakvo djelovanje šaperona Grp78 smanjuje izlučivanje A $\beta$ -peptida, ali dovodi i do promjena u njihovu procesiranju. Također, ovaj šaperon veže protein APP koji se procesira u ER-u mijenjajući mu konformaciju i sprječavajući djelovanje  $\beta$ -sekretaze na njega. Međutim, neka istraživanja pokazuju da odgovor UPR može djelovati i na povećano lučenje A $\beta$ -peptida pri čemu određeni transkripcijski faktori, prvenstveno faktor ATF4, povećavaju stupanj transkripcije gena za  $\beta$ -sekretazu te gena za komponente  $\gamma$ -sekretaze. Isto tako, utvrđeno je da su apoptoza i povećana koncentracija vrsta ROS uzrokovane odgovorom UPR bitan faktor u neurodegeneraciji. Ipak, mehanizmi indukcije odgovora UPR u Alzheimerovoj bolesti, kao i mehanizmi djelovanja odgovora UPR na njezin tijek još uvijek nisu potpuno razrješeni. Pretpostavlja se da starija životna dob pozitivno utječe na proapoptotsku ulogu ovog šaperona pri čemu njegova zaštitna uloga postaje manje izražena što je potkrepljeno dokazima poput smanjene ekspresije šaperona Grp78 i drugih šaperona ER-a te promjene morfologije ER-a u starijoj životnoj dobi.<sup>80,81</sup>

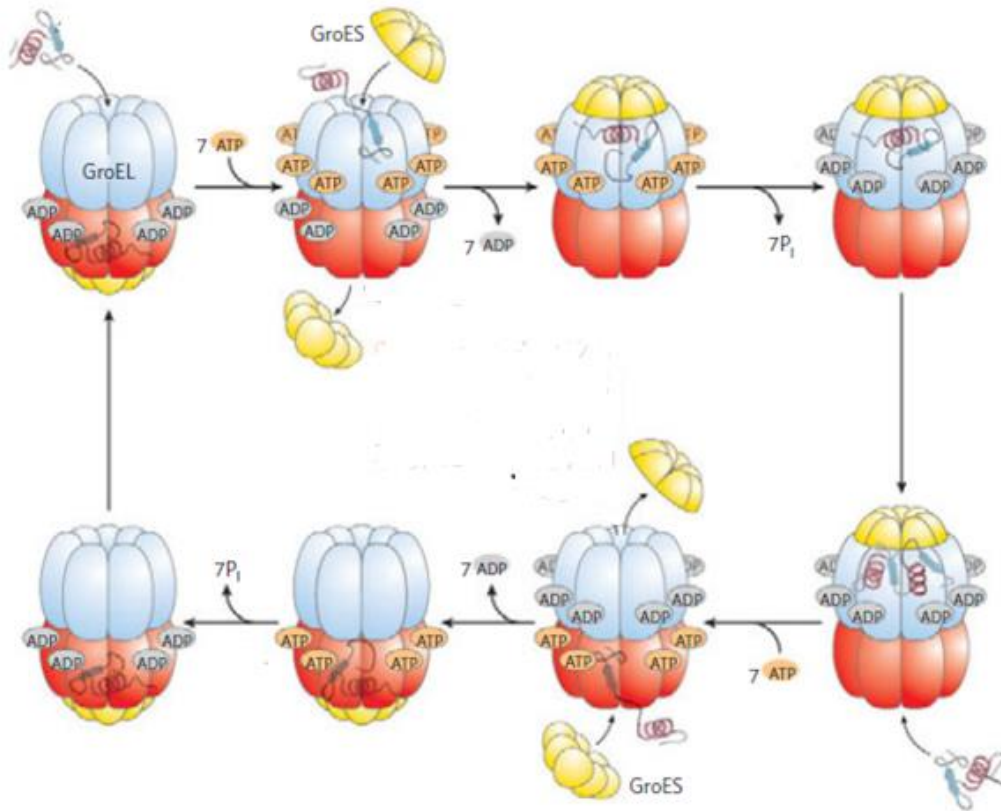
### 4.3. Šaperonini

Šaperonini su vrsta šaperona koju karakterizira građa od dva prstena koji čine kompleks molekulske mase od 800 kDa. Dije se u dvije skupine pri čemu prvu skupinu karakteriziraju šaperonini Hsp60 koji se pojavljuju u bakterijama, kloroplastima, mitohondrijima i citosolu

eukariotskih stanica dok druga skupina svoje predstavnike ima u arheja i eukariota pri čemu se njezina eukariotska varijanta zove TRiC (engl. *T-complex protein-1 ring complex*). Ovi šaperoni sudjeluju u smatanju i translokaciji proteina, a od šaperona Hsp70 se razlikuju po mehanizmu smatanja budući da šaperoni Hsp60 pomažu smatanje ciklusima enkapsulizacije proteina ovisnim o ATP-u. Prvu skupinu ovih šaperona karakterizira građa prstenova od 7 podjedinica i funkcionalna povezanost sa šaperoninom Hsp10 koji formira poklopac mjesta za smatanje. S druge strane, šaperonine druge skupine čine prstenovi koji se sastoje od 8 ili 9 podjedinica koji su neovisni o aktivnosti šaperonina Hsp10 budući da je funkcija poklopca sadržana u njihovim podjedinicama.<sup>82</sup>

Najproučeniji šaperoninski sustav prve skupine je bakterijski sustav GroEL/GroES koji sudjeluje u smatanju više od 250 bakterijskih citosolnih proteina. Šaperonin GroEL ima oblik cilindra koji se sastoji od dva prstena građenih od sedam podjedinica molekulske mase od 57 kDa koje čine ekvatorijalna ATPazna domena, intermedijarna šarka i apikalna supstrat-vezujuća domena. Ekvatorijalnu domenu karakteriziraju  $\alpha$ -heliksi koji sudjeluju u međusobnim interakcijama podjedinica jednog prstena, ali i u interakcijama između dva prstena šaperonina GroEL dok intermedijarna šarka sudjeluje u povezivanju apikalne i ekvatorijalne domene, ali i u konformacijskim promjenama koje uzrokuje vezanje šaperonina GroES. Apikalna domena osim u vezanju supstrata sudjeluje i u vezanju šaperonina GroES te u vezanju molekule ATP-a što je važno za mehanizam ovog šaperonskog sustava. S druge strane, šaperonin GroES je heptamerni prsten građen od podjedinica molekulske mase od 10 kDa koji pokriva krajeve cilindra šaperonina GroEL. Utvrđeno je da se supstrat veže za očuvane hidrofobne i aromatske aminokiselinske ostatke u apikalnoj domeni šaperonina GroEL nakon čega se za C-terminalni dio apikalne domene veže 7 molekula ATP-a i šaperonin GroES. Ovi događaji dovode do nastajanja hidrofilnog negativno nabijenog kaveza u kojem dolazi do smatanja proteina u vremenu ograničenom brzinom hidrolize molekule ATP-a (od 10 do 15 sekundi). Vezanjem molekule ATP-a za donji prsten u, kojem se nalazi nesmotani protein, dolazi do disocijacije šaperonina GroES s gornjeg prstena i početka smatanja drugog proteina u donjem prstenu (Slika 20.). Mehanizam ljudskog sustava Hsp60/Hsp10 sličan je mehanizmu sustava GroEL/GroES pri čemu ipak postoji nekoliko razlika, posebice u njihovim strukturama. Primjerice, ljudska varijanta ovog sustava sadrži 3 očuvana cisteinska ostatka koji predstavljaju nukleofilna mjesta vezanja elektrofilnih supstrata Hsp60 šaperona. Također, ljudska varijanta šaperona Hsp60 postoji u obliku jednog i dva prstena pri čemu dimerizaciju prstenova uzrokuje vezanje

molekule ATP-a i šaperonina Hsp10 za šaperonin Hsp60, a eksperimentalno je utvrđena njegova aktivnost u oba oblika.<sup>52,82</sup>



**Slika 20.** Mehanizam djelovanja sustava GroES/GroEL. Šaperonin GroES (žuto) je heptamer koji blokira jedan od prstena šaperonina GroEL nakon vezanja nesmotanog proteina pri čemu se prsten u kojem se odvija smatanje naziva cis (plavo) dok se suprotni prsten naziva trans (crveno). Nakon hidrolize sedam molekula ATP-a cis prstena dolazi do vezanja nesmotanog proteina za trans prsten, disocijacije šaperona GroES, molekula ADP-a i supstrata. Preuzeto i prilagođeno iz Nelson i sur. 2013.<sup>52</sup>

Glavni predstavnik druge skupine šaperonina, TRiC, je heterooligomerni kompleks koji se sastoji od dva prstena građenih od 8 paralognih podjedinica, a karakterizira ih sličan raspored domena kao i u šaperonina Hsp60. Glavna razlika između ova dva šaperonina je u građi apikalnih domena koje u šaperonina TRiC sadržavaju i  $\alpha$ -helikalne dijelove s ulogom poklopca koji nadomještaju funkciju šaperonina GroES. Maksimalna molekulska masa supstrata TRiC šaperonina iznosi 120 kDa što znači da ovaj šaperonin vjerojatno sudjeluje u smatanju većih proteina od šaperonina Hsp60. Također, hidroliza molekula ATP-a od strane šaperonina TRiC je puno sporija što supstratu daje više vremena za smatanje. Procjenjuje se da šaperonini druge skupine pomažu smatanje oko 10 % citosolnih proteina ljudskih stanica od kojih su najčešći

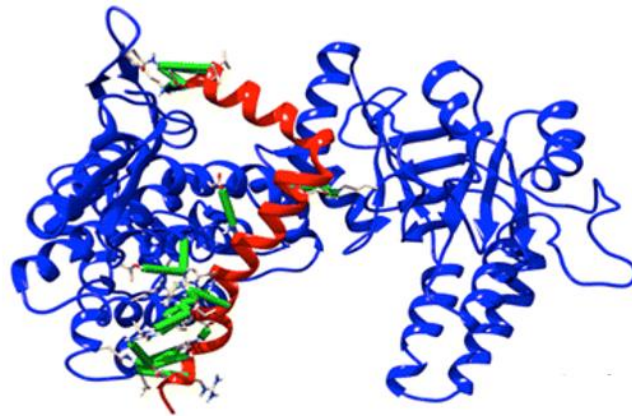
aktini i tubulini pri čemu te proteine do šaperonina vode članovi obitelji šaperona Hsp70 kroz čiji je ciklus supstrat već prošao. Također, utvrđeno je postojanje košaperona prefoldina, koji sudjeluju u dovođenju aktina do sustava TRiC pri čemu pomažu smatanje i postizanje pravilne kvarterne strukture aktinskih filamenata. Treba napomenuti da šaperonini druge skupine sudjeluju isključivo u smatanju novosintetiziranih peptida te da im ekspresija u stresnim uvjetima nije povećana.<sup>82</sup>

Obje skupine šaperonina imaju funkcije holdaze budući da vezanjem supstrata sprječavaju njegovo agregiranje s drugim nesmotanim ili nepravilno smotanim proteinima. Također, neka istraživanja pokazuju da šaperonini ubrzavaju smatanje proteina pri čemu sterička ograničenja nametnuta od strane šaperonina entropijski destabiliziraju nesmotana stanja i potiču njihovu konverziju u nativnu konformaciju. Smatra se da glavnu ulogu u ovom djelovanju imaju polarni aminokiselinski ostatci u šaperoninskom kavezu koji potiču smatanje proteina u nativnu strukturu vežući molekule vode. Na taj način dolazi do stvaranja lokalnog okoliša koji potiče raspoređivanje hidrofobnih aminokiselinskih ostataka u unutrašnjost strukture što doprinosi povećanju entropije okoline i smanjenja slobodne energije takvih konfiguracija. Također, utvrđeno je da supstrati ovih šaperonina često imaju topologije koje karakteriziraju domene  $\alpha/\beta$  a i  $\alpha+\beta$ . Takvi proteini često tijekom smatanja stvaraju stabilne intermedijere s lokalnim minimumom slobodne energije pri čemu kontinuirano vezanje i otpuštanje ovih supstrata od strane šaperonina dovodi do ponavljajućeg razmatanja ovakvih intermedijera i usmjeravanja proteina u formiranje nativne strukture.<sup>82</sup>

*In vitro* je utvrđeno da šaperonin Hsp60 sprječava stvaranje amiloidnih vlakana u mitohondrijima i citosolu mišjih i ljudskih neurona pri čemu se nekovalentnim interakcijama veže za A $\beta$ -peptide te još uvijek nepoznatim mehanizmom, koji vjerojatno uključuje vezanje A $\beta$ -peptida u hidrofilni kavez šaperonina, sprječava njihovu agregaciju (Slika 21.). Prema najnovijem modelu, ovaj šaperonin veže se za monomere A $\beta$ -peptida koji su poprimili konformaciju  $\beta$ -ploče koja je sklona agregiranju. Ovakvim vezanjem šaperon Hsp60 ima ukogu holdaze koja uključuje vezanje šaperonina za A $\beta$ -peptid pasivno sprječavajući njihovu agregaciju ili foldaze koja uključuje promjenu konformacije A $\beta$ -peptida u oblik manje sklon agregaciji. Još uvijek nije utvrđeno koja je od ovih funkcija bitnija za sprječavanje formiranja agregata A $\beta$ -peptida. Međutim, eksperimenti koji pokazuju prestanak formiranja agregata A $\beta$ -peptida nakon uklanjanja šaperonina Hsp60 iz reakcijske smjese daju prednost mehanizmu foldaze. Također, utvrđena je uloga šaperonina Hsp60 u povećanoj ekspresiji citokina IL18 u mikroglija stanicama koji pojačava upalni odgovor čime dolazi do povećanog stupnja



pročišćavanja izvanstaničnih vlakana A $\beta$ -peptida, ali i apoptoze neurona uzrokovane neurotoksičnim djelovanjem proupalnih citokina.<sup>83-85</sup>



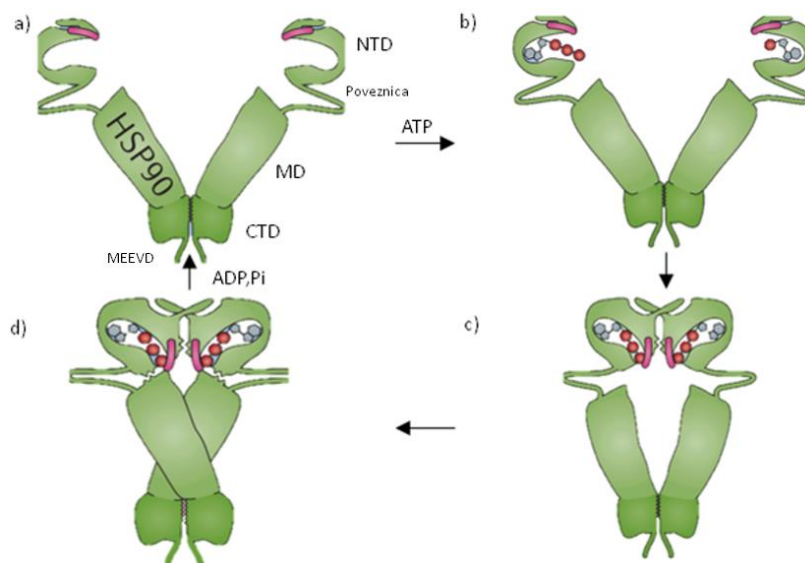
**Slika 21.** Trodimenzionalni prikaz vezanja šaperonina Hsp60 (plavo) i A $\beta$ -peptida (crveno) dobiven *in silico*. Vezanje ova dva proteina stabilizirano je nekovalentnim interakcijama od kojih su najznačajnije vodikove veze (zeleno) i elektrostatske interakcije. Preuzeto iz Padmadas i sur. 2018.<sup>84</sup>

Prema nekim istraživanjima, akumulacija A $\beta$ -peptida u mitohondrijima osim već navedenih toksičnih učinaka na stanicu (Poglavlje 3.) utječe i na oslobađanje šaperonina Hsp60 koji zatim prenosi protein APP i njegove derivate u mitohondrij. Vezanjem ovih proteina za šaperonin Hsp60 inhibira fiziološke uloge tog šaperonina u mitohondriju što uzrokuje gomilanje velikog broja nesmotanih i krivo smotanih peptida te aktivaciju mitohondrijskog odgovora UPR.<sup>86</sup>

Djelovanje šaperonina TRiC na A $\beta$ -peptide još uvijek nije u potpunosti istraženo. Određeni eksperimenti pokazuju da mutanti modelnog organizma *Caenorhabditis elegans* s deletiranim genom za šaperonin TRiC pokazuju smanjenu produkciju i toksičnost agregata A $\beta$ -peptida što ukazuje na ulogu ovog šaperonina kao medijatora agregacije i toksičnosti A $\beta$ -peptida. Također, analizama interakcije proteina utvrđeno je da šaperonin TRiC interagira s različitim proteinima koji sudjeluju u fosforilaciji obitelji proteina MAP što bi moglo predstavljati još jedan mehanizam toksičnog djelovanja ovog šaperonina u Alzheimerovoj bolesti.<sup>87</sup> Iz svega navedenog proizlazi da mehanizmi djelovanja obje skupine šaperonina na nastanak agregata A $\beta$ -peptida i produkte njihove toksičnosti još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Buduća će istraživanja vjerojatno povezati funkciju i mehanizme smatanja supstrata šaperonina s njihovim djelovanjem na čimbenike koji doprinose pojavi Alzheimerove bolesti.

#### 4.4. Hsp90

Hsp90 obitelj šaperona karakteriziraju proteini molekulske mase od 90 kDa koji imaju brojne uloge u stanici poput smatanja proteina, sastavljanja multiproteinskih kompleksa i vezanja liganada za njihova vezna mjesta čime uz druge obitelji šaperona na nezamjenjiv način sudjeluju u staničnoj homeostazi. Članovi ove skupine pronađeni su u bakterija i eukariota pri čemu bakterijski homolog nije eksprimiran u normalnim uvjetima te isključivo ima ulogu u uvjetima stresa dok su eukariotski homolozi, koji se nalaze u citosolu, mitohondriju i ER-u, konstitutivno eksprimirani i važni za vijabilnost stanice neovisno o uvjetima. Ovi šaperoni funkcioniraju kao homodimeri te je utvrđeno da je dimerizacija nužna za njihovu *in vivo* funkciju, a najčešće smataju proteine koji su već prošli kroz ciklus šaperona Hsp70. Građeni su od N-terminalne domene (NTD) za koju se veže molekula ATP-a, srednje domene (engl. *middle domain*, MD) koja je važna za hidrolizu molekule ATP-a i vezanje šaperona za supstrat te C-terminalne domene (CTD) važne za dimerizaciju šaperona i interakciju s košaperonima. Domene NTD i MD povezane su fleksibilnom nabijenom poveznicom koja modulira njihov kontakt i funkciju šaperona. Ovi se šaperoni bez prisustva ATP-a nalaze u otvorenoj konformaciji u obliku slova V pri čemu vezanjem molekule ATP-a dolazi do konformacijskih promjena i postizanja zatvorene strukture sa sposobnošću hidrolize molekule ATP-a (Slika 22.). Ove konformacijske promjene predstavljaju reakciju koja određuje brzinu hidrolize molekule ATP-a pri čemu u njima sudjeluju sve tri domene. Također, utvrđeno je i postojanje važnih interakcija između domena NTD dvaju monomera koje dovode do dimerizacije, koja je uz formiranje zatvorenog sustava najbitnija za hidrolizu molekule ATP-a nakon koje dolazi do otpuštanja molekule ADP-a i fosfatnog iona ( $P_i$ ) te do ponovnog poprimanja otvorene konformacije šaperona.<sup>88,89</sup>



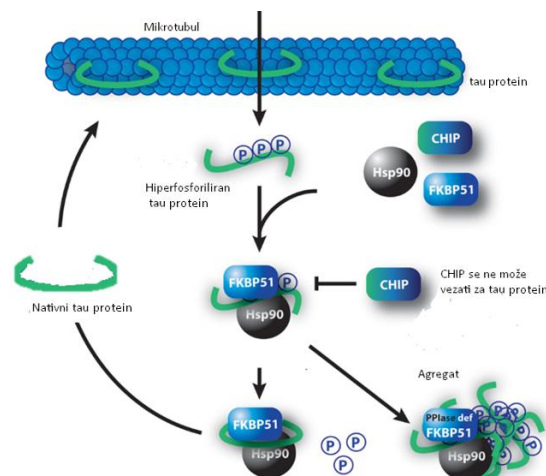
**Slika 22.** Trodimenzionalne strukture različitih konformacija šaperona Hsp90. Članovi ove obitelji građeni su od domene NTD koja veže ATP, domene MD važne za hidrolizu molekule ATP-a i domene CTD važne za formiranje dimera. Također, u ovim proteinima pristupa je i fleksibilna poveznica između domena NBD i MD te aminokiselinski slijed MEEVD u domeni CTD važan za vezanje košaperona. Vezanjem molekule ATP-a za otvorenu konformaciju (a) dolazi do rearanžmana u domeni NTD pri čemu se zatvara vezno mjesto molekule ATP-a od strane konzerviranog zavoja koji ima ulogu poklopca (b). Zatim dolazi do dimerizacije domena NTD (c) i asocijacije domena MD (d) pri čemu unutar domena MD nastaje katalitički zavoj bitan za hidrolizu molekule ATP-a nakon koje se ciklus ponavlja. Preuzeto i prilagođeno iz Schopf i sur. 2017.<sup>88</sup>

Mehanizam vezanja šaperona Hsp90 za svoje supstrate još uvijek nije potpuno razjašnjen, ali istraživanjima vezanja različitih supstrata za ovaj šaperon utvrđeno je da su sve tri domene šaperona uključene u vezanje pri čemu različiti supstrati mijenjaju mehanizam vezanja. Primjerice, za velik broj supstrata utvrđena je važnost amfipatskog heliksa domene CTD koji uranja između domena MD dimera gdje zajedno s hidrofobnim aminokiselinskim ostacima domene MD sudjeluje u vezanju supstrata. Također, šaperoni Hsp90 obično su regulirani košaperonima koje vrlo često karakterizira domena TPD kojom se vežu za aminokiselinski motiv MEEVD u domeni CTD šaperona Hsp90. Najpoznatiji primjeri ovih košaperona su: i) HOP (engl. *Hsp70-Hsp90 organizing protein*) koji služi kao prijenosnik supstrata sa šaperona Hsp70 na šaperone Hsp90 u eukariota, ii) Ppt1 (engl. *protein phosphatase T*) koji regulira aktivnost šaperona Hsp90 njegovom defosforilacijom te iii) već spomenuti košaperon CHIP s aktivnošću E3 ubikvintin-ligaze. Isto tako, postoje brojni drugi košaperoni sustava Hsp90 čija je uloga regulacija različitih dijelova ciklusa šaperona djelujući na faktore poput brzine ATPazne aktivnosti domene MD čime se regulira vrijeme smatanja supstrata ili na vezanje supstrata za šaperon čime se proširuje specifičnost ovih šaperona. Utvrđeno je da se

šaperon Hsp90 veže za više stotina različitih proteina što mu daje važnu ulogu modulatora raznih procesa od regulacije stresa, smatanja novosintetiziranih i krivo smotanih proteina pa sve do replikacije DNA, razvoja organizma, imunskog odgovora i vezanja steroidnih hormona za svoje receptore. Također, procjenjuje se da se oko 60 % kinaza i 30 % E3 ubikvintin-ligaza čovjeka veže za ovaj šaperon što povećava njegovu važnost. Zanimljivo je djelovanje šaperona Hsp90 na kinaze pri čemu dolazi do stabilizacije otvorene konformacije kinaze koja lakše veže ATP što uzrokuje njezinu aktivaciju i disocijaciju sa šaperona. Također, mnoga istraživanja pokazuju da ovi šaperoni, osim što imaju važnu ulogu u smatanju receptora steroidnih hormona, sudjeluju i u stabilizaciji konformacija pogodnih za vezanje supstrata. Dakle, osim funkcija šaperona Hsp90 koje su slične drugim šaperonskim sustavima, poput smatanja nesmotanih i krivo smotanih proteina, ovi šaperoni imaju i specifičnije uloge u stanici pri čemu je procijenjeno da vežu i reguliraju otprilike 20 % proteoma.<sup>82,88</sup>

Članovi obitelji šaperona Hsp90 na mnoge načine utječu na napredak Alzheimerove bolesti pri čemu je utvrđeno njihovo djelovanje na agregaciju A $\beta$ -peptida, formiranje i čišćenje agregata proteina tau te na imunski odgovor mikroglia stanica. Brojna istraživanja dokazala su da ovaj šaperon inhibira agregaciju A $\beta$ -peptida, ali mehanizam ovog djelovanja još uvijek nije u potpunosti razriješen. Smatra se da šaperoni Hsp90 u ovom slučaju djeluju kao holdaze koje se neovisno o ATP-u vežu za A $\beta$ -peptide u konfiguraciji podložnoj agregiranju što je neobično budući da je vezanje šaperona Hsp90 obično ovisno o ATP-u. Zajedno sa saznanjima o djelovanju šaperona Hsp70 na ove peptide moguće je pretpostaviti model po kojem kombinirana uloga ovih dviju obitelji šaperona uzrokuje smanjenu stopu agregacije A $\beta$ -peptida. Također, zanimljiviji je utjecaj članova obitelji šaperona Hsp90 na agregaciju i količinu proteina tau u stanicama neurona. Utvrđena su različiti načini djelovanja šaperona Hsp90 na ovaj protein koji ovisi o vezanom košaperonu (Slika 23.). Primjerice, takrolim-vezujući protein 1 (engl. *tacrolimus binding protein 1*, FKBP1), koji spada u košaperone s domenom TPD, a sadrži i fosfatazne domene F1 te F2, ima najveći afinitet za protein tau. Ovaj košaperon uzrokuje stabilizaciju proteina tau koja za posljedicu može imati ponovno smatanje ovog proteina ili povećanu mogućnost formiranje agregata. Ovo djelovanje košaperona FKBP1 potvrđeno je eksperimentima u kojima je povećana ekspresija gena za ovaj košaperon u mišjim modelima uzrokovala značajno veći stupanj agregacije proteina tau od kontrolne skupine. Pretpostavlja se da se mehanizam ovog djelovanja zasniva na blokiranju razgradnje proteina tau 20S proteosomom. Smatra se da vezanje šaperona Hsp90 i košaperona FKBP1 maskira neuređenost i podložnost agregaciji proteina tau što uzrokuje nemogućnost prepoznavanja od strane

proteosoma. Naime, u normalnim uvjetima šaperoni Hsp90 osiguravaju dovoljnu koncentraciju proteina tau za obavljanje njegove biološke uloge u regulaciji gradnje mikrotubula, dok u uvjetima njegova gomilanja i hiperfosforilacije pospješuju agregaciju i toksičnosti proteina tau čime ugrožavaju život živčanih stanica. Također je otkriveno da starenjem dolazi do smanjenja stupnja metilacije gena za košaperon FKBP1 čime se pojačava njegova ekspresija što bi moglo predstavljati jedan od mehanizma nastanka nenasljeđenog oblika Alzheimerove bolesti. Međutim, određena istraživanja pokazuju da se šaperonski sustav koji se sastoji od šaperona Hsp40, Hsp70 i Hsp90 veže za hiperfosforilirani protein tau pri čemu dolazi do vezanja košaperona s ulogama fosfataza koji defosforiliraju takav oblik proteina tau. U slučaju neuspjele defosforilacije za Hsp90 šaperone se veže košaperon CHIP koji dovodi do ubikvitinacije i posljedične proteosomalne razgradnje proteina tau. Ovo je još jedan odličan primjer ovisnosti funkcije šaperona o vezanim košaperonima koji na različite načine utječu na supstrat pri čemu je defosforilacija hiperfosforiliranog proteina tau prva, a njegova proteosomalna degradacija druga linija obrane od stvaranja toksičnih agregata. Dakle, šaperon Hsp90 može dvojako djelovati na agregaciju proteina tau pri čemu je vezanje određenih košaperona ono što određuje način njegova djelovanja. Ono ponajprije ovisi o njihovim relativnim koncentracijama koje, osim zbog promjenjene ekspresije gena ovih košaperona tijekom starenja, mogu biti poremećene upravo zbog toksičnog djelovanja agregata A $\beta$ -peptida i proteina tau što čini začarani krug ove bolesti i ubrzava njezinu progresiju.<sup>75, 90, 91</sup>



**Slika 23.** Shema djelovanja košaperona sustava Hsp90 na protein tau. Vidljiva je kompeticija za vezanje različitih košaperona za protein tau pri čemu se košaperon CHIP ne može vezati za protein tau na koji je već zajedno s šaperonom Hsp90 vezan košaperon FKBP51 koji stabilizira ovaj protein te može uzrokovati njegovo ponovno smatanje u nativno stanje ili agregaciju s drugim proteinima i šaperonom Hsp90. Preuzeto i prilagođeno iz Jinwal i sur. 2010.<sup>91</sup>

Iz svega ovog je vidljivo da različite vrste šaperona imaju važne uloge u mnogim aspektima nastanka i progresije Alzheimerove bolesti. Ipak, većinom su opisane njihove pojedinačne uloge, a u budućim istraživanjima će biti zanimljivo detaljnije vidjeti ne samo mehanizam djelovanja ovih šaperona, već i njihovo zajedničko djelovanje u obliku šaperonske mreže koja sprječava, odnosno smanjuje toksične efekte nagomilavanja i agregacije A $\beta$ -peptida. Moguće je da u postepenom smanjenju efikasnosti ove šaperonske mreže tijekom života leži glavni razlog pretežitog javljanja ove bolesti u starijih osoba. Ipak, brojna istraživanja pokazuju da pojedinačne uloge ovih šaperona koje su zasad poznate također mogu biti iskorištene u strategijama liječenja ove bolesti što je tema sljedećeg poglavlja.

## 5. Liječenje Alzheimerove bolesti

U zadnjih nekoliko desetljeća napravljena su brojna istraživanja o mogućim primjenama strategija za sprječavanje i usporavanje napretka Alzheimerove bolesti pri čemu se nekoliko njih pokazalo relativno uspješnim. Napravljen je određen napredak u terapijama koje smanjuju brzinu progresije bolesti, ali lijekovi koji bi potpuno spriječili njezin nastanak i napredovanje još uvijek nisu razvijeni.<sup>92</sup> Budući da je amiloidna hipoteza općenito prihvaćen model nastanka ove bolesti, velik broj dosad razvijenih terapija temelji se na smanjivanju koncentracije monomera A $\beta$ -peptida i njihovih agregata te smanjivanjem udjela A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub>, najčešće djelovanjem na  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretazu gdje je djelomičnom ili potpunom inhibicijom ovog enzima u laboratorijskog miša uočeno značajno smanjenje koncentracije A $\beta$ -peptida u moždanom tkivu, a samim time i poboljšana kognitivna funkcija. Međutim, brojne terapije koje su koristile ovu strategiju nisu se pokazale uspješnim u kliničkim istraživanjima gdje, iako je utvrđeno smanjenje koncentracije A $\beta$ -peptida u moždanom tkivu, ipak nije došlo do usporavanja napretka bolesti ni do povećanih kognitivnih funkcija.<sup>14,93,94</sup> Osim ovog problema, velik nedostatak ove strategije je uključenost  $\gamma$ -sekretaze u cijepanje brojnih transmembranskih proteina koji su ključni za život neurona (Poglavlje 2.1.) što je u kliničkim istraživanjima uzrokovalo različite negativne nuspojave poput krvarenja u mozgu.<sup>95</sup> Neuspjeh ove strategije, odnosno nedostatak poveznice između smanjene koncentracije A $\beta$ -peptida i povećanih kognitivnih funkcija pacijenata i sprječavanja napretka bolesti ne znači nužno da amiloidna hipoteza nije točna. Primjerice, moguće je da su A $\beta$ -peptidi samo pokretači događaja koji dovode do pojave i širenja bolesti, a da glavnu ulogu u tome imaju sekundarni efekti (Poglavlje 3.) što bi značilo da bi uspješna strategija bila djelovanje na sustav sekretaza u kritičnom

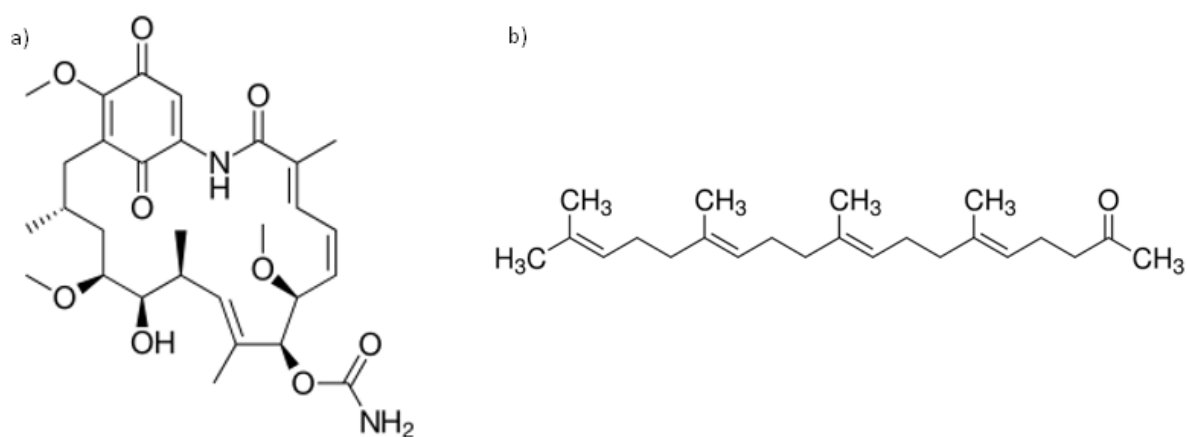
trenutku koji dovodi do početka ove bolesti.<sup>96</sup> Slične strategije koje bi uzrokovale smanjenu izvanstaničnu koncentraciju A $\beta$ -peptida u moždanom tkivu pacijenata zasnivaju se na imunoterapiji. Ideja ovakvih terapija je pasivno imuniziranje pacijenata korištenjem protutijela koja su specifična za određeni dio A $\beta$ -peptida što bi uzrokovalo njihovo uništavanje komplementom ili fagocitozom od strane mikroglia stanica. Većina ovakvih terapija također se pokazala neuspješnim u kliničkim istraživanjima uzrokujući negativne nuspojave i smanjujući koncentraciju izvanstaničnog A $\beta$ -peptida bez utjecaja na kognitivne funkcije pacijenata. Ipak, kliničko istraživanje u kojem je korišteno protutijelo specifično za regiju od 16. do 24. aminokiseline A $\beta$ -peptida pokazalo se djelomično uspješno smanjujući koncentraciju izvanstaničnih agregata A $\beta$ -peptida i brzinu progresije bolesti što pokazuje i na takve agregate kao medijatore neurotoksičnosti i daje povod za nastavak istraživanja u ovom smjeru.<sup>97</sup>

Osim djelovanja na A $\beta$ -peptide, postoje razne terapije čije su mete sekundarni toksični čimbenici poput agregacije proteina tau, gomilanja vrsta ROS i propadanja sinaptičkih veza. Strategija razgradnje hiperfosforiliranog proteina tau korištenjem aktivne imunizacije antitijelima specifičnih za njegov određeni dio pokazala se relativno uspješnom. Ona se temelji na ubacivanju sintetičkog peptida koji oponaša hiperfosforilirani protein tau u stanice pomoću liposomalnog cjepiva što uzrokuje jak imunski odgovor organizma i smanjenje koncentracije hiperfosforiliranog proteina tau, a time i povećanu stabilnost citoskeleta ovih neurona.<sup>98</sup> Postoje i pristupi kojima je cilj stabilizirati mikrotubule čime se smanjuje toksično djelovanje agregata proteina tau, a rađena su i istraživanja o mogućnostima inhibicije kinaza koje fosforiliraju protein tau. Međutim, budući da ovakve kinaze igraju važnu ulogu u biosignalizaciji stanice, ovakve strategije često nailaze na probleme negativnih nuspojava na čemu će vjerojatno naglasak biti u budućim istraživanjima.<sup>99,100</sup> Potrebno je spomenuti i studije koje su pokazale da određeni antiupalni lijekovi smanjuju brzinu progresije bolesti pri čemu mehanizam ovog djelovanja još uvijek nije u potpunosti istražen, a pretpostavlja se da je glavni učinak djelovanja ovakvih lijekova smanjenje neurotoksičnosti kroničnog upalnog procesa.<sup>10</sup> Također, pokazano je da povećano uzimanje antioksidansa poput vitamina E povoljno utječe na smanjenje brzine progresije Alzheimerove bolesti što je i očekivano obzirom na ulogu vrsta ROS u nastanku i širenju ove bolesti.<sup>14</sup> Pristup koji je pokazao najveći uspjeh u relativnom očuvanju kognitivnih funkcija pacijenata je djelovanje na neurotransmitere pri čemu su razvijeni razni inhibitori enzima acetilkolinesteraze, koji u sinaptičkim pukotinama razgrađuje acetilkolin. Inhibicijom ovog enzima dolazi do veće postojanosti i poboljšanog prijenosa acetilkolina što rezultira sporijim propadanjem kognitivnih funkcija ovih pacijenata.<sup>101</sup> Ipak, budući da nijedan od ovih

pristupa zasad nije doveo do značajnijeg napretka u sprječavanju nastanka i progresije ove bolesti, sve više i više istraživanja temelji se na korištenju i modificiranju šaperonske mreže koja ima ulogu u procesiranju i održavanju amiloida.

## 5.1. Šaperonske terapije

Budući da su se šaperoni pokazali kao važni čimbenici koji sudjeluju u patofiziologiji Alzheimerove bolesti, ne čudi ogroman porast broja znanstvenih istraživanja koja se bave mehanizmima njihove funkcije i mogućnostima primjene u terapiji u zadnjih nekoliko godina. Najčešće strategije ovakvih terapija su povećavanje koncentracije određenih šaperona koji su se pokazali kao učinkoviti inhibitori stvaranja ili agregacije A $\beta$ -peptida i hiperfosforiliranog proteina tau te nastajanja prekomjerne količine vrsta ROS. Primjerice, u kulturi stanica i na modelnim organizmima razvijaju se mnogi lijekovi koji povećavaju ekspresiju različitih članova obitelji šaperona Hsp70. Najpoznatiji primjeri su geldanamicin i geranilgeranilaceton (Slika 24.), lijekovi koji induciraju ekspresiju različitih šaperona Hsp70 koji sprječavaju formiranje agregata proteina tau. Također, istraživanja gdje je šaperon Hsp70 povećano eksprimiran pomoću egzogenog plazmida pokazuju pozitivne rezultate smanjujući agregaciju proteina tau i sprječavajući apoptozu neurona što baca zanimljivo svjetlo na mogućnosti genske terapije kao mehanizma borbe protiv ove bolesti.<sup>102,103</sup>



**Slika 24.** Struktura tvari koje povećavaju ekspresiju šaperona Hsp70 i Hsp90 u modelu laboratorijskog miša: a) geldanamicin, b) geranilgeranilaceton. Preuzeto s <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Geldanamycin.svg><sup>105</sup> i <http://www.adooq.com/geranylgeranylacetone.html><sup>106</sup>



Osim pojačanom ekspresijom, koncentracija ovakvih šaperona može se povećati njihovim egzogenim dodatkom. Primjerice, na modelu laboratorijskog miša utvrđena je smanjena koncentracija A $\beta$ -peptida i povećanje kognitivne sposobnosti nakon intranazalno primljenog egzogenog šaperona Hsp70. Osim direktnog djelovanja ovako ubačenih šaperona na smatanje proteina, pretpostavlja se njihov utjecaj i na pojačanje imunskog odgovora što uzrokuje lakše pročišćavanje izvanstaničnih agregata, ali i na smanjenje vrsta ROS. Budući da šaperoni Hsp70 sudjeluju u brojnim drugim staničnim procesima, u eventualnoj primjeni ovakvih ili sličnih lijekova u terapiji bit će potrebno paziti na očekivane negativne nuspojave uzrokovane poremećenom koncentracijom ovih šaperona.<sup>104</sup>

Izuzev povećanja koncentracija šaperona koji povoljno djeluju na sprječavanje toksičnih učinaka akumulacije A $\beta$ -peptida i proteina tau postoje i strategije kojima je cilj inhibirati određene šaperone koji uzrokuju pojačani stupanj agregacije i toksičnosti ovih peptida. Jedan od ovakvih pristupa je i korištenje inhibitora šaperona Hsp90 koji sprječavaju hidrolizu molekule ATP-a vežući se za domenu NTD ili CTD šaperona Hsp90. Međutim, ovakvi inhibitori toksični su za stanicu zbog brojnih uloga šaperona Hsp90 u staničnim procesima čijom inhibicijom može doći do apoptoze. Već spomenuti geldanamycin ispostavio se kao relativno djelotvoran inhibitor šaperona Hsp90 djelujući na njegovu domenu NTD što je dovelo do razvijanja nove generacije lijekova baziranih na njemu. Jedan od tih lijekova je 17-(alkilamino)-17-demetoksigeldanamycin koji uzrokuje pročišćavanje i sprječavanje agregacije proteina tau pri čemu je njegovo toksično djelovanje značajno manje od toksičnog djelovanja geldanamicina. Također, budući da košaperoni određuju afinitet šaperona Hsp90 prema svojim supstratima, postoje modeli korištenja inhibitora kojima je cilj selektivno djelovati na interakcije šaperona Hsp90 sa svojim košaperonima vežući se za njihovu domenu CTD. Ova strategija pokazuje puno potencijala zbog mogućnosti smanjivanja negativnih nuspojava koje uzrokuje potpuna inhibicija sustava Hsp90 pri čemu su nuspojave ipak moguće zbog relativne sličnosti mehanizama vezanja različitih košaperona za domenu CTD šaperona Hsp90. Također, predviđa se razvijanje terapija kojima se djeluje direktno na košaperone. Primjerice, poznate su tvari koje se vežu za domenu F1 ili F2 košaperona FKBP1 čime sprječavaju njegovo pozitivno djelovanje na stabilizaciju i agregaciju proteina tau. Ovakav pristup zasad se nije pokazao uspješnim budući da mnogi drugi proteini imaju domene sa sličnom ulogom domenama F1 i F2, a nije zanemariva ni činjenica da ovaj košaperon sudjeluje i u mnogim drugim staničnim procesima koji su zbog ovakvih tvari inhibirani. Iz ovih razloga posebna pozornost počinje se pridavati inhibitorima domena TPD šaperona Hsp90. Ipak, ispostavilo se da su domene TPD

svih košaperona koji ih sadrže izuzetno očuvane što znači da bi ovakvi lijekovi također djelovali na više meta i potencijalno ugrozili život stanice zbog čega će se u budućnosti naglasak staviti na inhibiciju modulatora sustava Hsp90-FKBP1. Uspješnim bi se mogli pokazati i pristupi koji se fokusiraju na druge košaperone poput košaperona Pt1 ili CHIP čijom bi se povećanom ekspresijom postigla veća kompeticija vezanja ovih košaperona za sustav Hsp90 što bi uzrokovalo defosforilaciju proteina tau i njegovu proteosomalnu razgradnju.<sup>107</sup> Ipak, navedeni pristupi terapije šaperonima, ali i mnogi drugi, još uvijek se testiraju na animalnim i staničnim modelima, a njihova eventualno uspješna primjena kao lijekova ovisit će o uspješnosti kliničkih testiranja kojima će biti cilj utvrditi reakcije ljudskog organizma na kvantitativno i kvalitativno moduliranje kompleksne šaperonske mreže. Potencijal ovakvih pristupa vidi se iz rezultata uspješnih eksperimenata na spomenutim modelima, a dobri rezultati kliničkih istraživanja značili bi velik korak naprijed u borbi protiv Alzheimerove, ali i drugih neurodegenerativnih bolesti.

## 6. Zaključak

Amiloidna hipoteza Alzheimerove bolesti predviđa akumulaciju i agregiranje A $\beta$ -peptida te njihovo toksično djelovanje na različite stanične procese koje uzrokuje apoptozu neurona i prekid sinaptičkih veza što dovodi do pojave demencije. Dakle, moglo bi se reći da je Alzheimerova bolest po ovoj hipotezi poremećaj uzrokovan neuspjehom održavanja stanične proteostaze, odnosno regulacije koncentracije i kvalitete proteina u stanici. Ovakvom razmišljanju okrenula se i biomedicinska znanost koja posljednjih godina naglasak u liječenju ove bolesti stavlja na šaperone kao medijatore stanične proteostaze čija kvantitativna ili kvalitativna modulacija ima potencijal sprječavanja i usporavanja napretka Alzheimerove bolesti. Iz teksta je vidljivo da upotreba različitih šaperona u kulturi stanica ili životinjskim modelima ima potencijal smanjivanja agregacije A $\beta$ -peptida i proteina tau koji se vjerojatno temelji na njihovim pojedinačnim ulogama. Buduća istraživanja kojima će ovi šaperoni biti posloženi u funkcionalnu mrežu neće samo doprinijeti boljem razumijevanju mehanizama njihova djelovanja, već i razvoju novih modela lijekova koji bi u konačnici mogli značiti uspješno liječenje ove bolesti djelujući na njezin uzrok, a ne na njezine simptome. Ipak, unatoč relativno neuspješnim rezultatima kliničkih testiranja, potencijal još uvijek imaju i pristupi smanjivanja sekrecije i agregacije A $\beta$ -peptida u kojima će cilj biti izolirati ključan trenutak za ovakvo djelovanje što će biti omogućeno tek potpunim razumijevanjem mehanizama nastanka različitih oblika ovog peptida. Smatram da bi se oba navedena pristupa u budućnosti mogli

pokazati uspješnima pri čemu će taj uspjeh ovisiti o naglasku na razumijevanju mehanizama procesiranja amiloidnih proteina i održavanja proteostaze, a ne na razmišljanju u okviru već poznatih činjenica koje nisu dale željene rezultate.

## 7. Literatura

1. <https://www.nia.nih.gov/health/what-are-signs-alzheimers-disease> (datum pristupa 13. kolovoza 2018.)
2. L. M. Bekris, C. Yu i T. D. Bird, 2010. Review Article: Genetics of Alzheimer Disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 23(4), 213-227.
3. C. Y. Santos, P. J. Snyder, W. Wu, M. Zhang, A. Echeverria i J. Alber, 2017. Pathophysiologic relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: A review and synthesis. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring* 7, 69-87.
4. R. L. Ownby, E. Crocco, V. John i D. Loewenstein, 2006. Depression and Risk for Alzheimer Disease. *Archives of General Psychiatry* 63(5), 530-538.
5. <https://www.alzheimers.net/resources/alzheimers-statistics/> (datum pristupa 27. srpnja 2018.)
6. C. L. Masters, G. Simms, N.A. Weinman, G. Multhaup B.L. McDonald i K. Beyreuther, 1985. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(12), 4245-4249.
7. A. Budimir, 2011. Metal ions, Alzheimer's disease and chelation therapy. *Acta Pharmaceutica* 61(1), 1-14.
8. K. Hensley, J.M. Carney, M.P. Mattson, M. Aksenova, M. Harris, J. F. Wu, R. A. Floyd i D. A. Butterfield, 1994. A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(8), 3270-3274
9. P.T. Francis, 2005. The interplay of neurotransmitters in Alzheimer's disease. *CNS Spectrums* 10, 6-9
10. P. L. McGeer i E. L. McGeer, 1995. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews* 21(2), 195-218.
11. I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski i L. I. Binder, 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(13), 4913-4917
12. S. Gauthier, P. S. Aisen, S. H. Ferris, D. Saumier, A. Duong, D. Haine, J. Suhy, J. Oh, W. Lau i J. Sampalis, 2009. Effect of tramiprosate in patients with mild-to-moderate Alzheimer's

disease: exploratory analyses of the MRI sub-group of the Alphase study. *The Journal of Nutrition Health and Aging* 13(6), 550-557.

13. B. K. Martin, C. Szekely, J. Brandt, S. Piantadosi, J. C. Breitner, S. Craft, D. Evans, R. Green i M. Mullan, 2008. Cognitive function over time in the Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial (ADAPT): results of a randomized, controlled trial of naproxen and celecoxib. *JAMA Neurology* 65(7), 896-095

14. M. Sano, C. Ernesto, R. G. Thomas, M. R. Klauber, K. Schafer, M. Grundman, P. Woodbury, J. Growdon, C. W. Cotman, E. Pfeiffer, L. S. Schneider i L. J. Thal, 1997. Cognitive function over time in the Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial (ADAPT): results of a randomized, controlled trial of naproxen and celecoxib. *The New England Journal of Medicine* 336(17), 1216-1222

15. P. L. McGeer, M. Schluzer i E. G. McGeer, 1996. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* 47(2), 425-432.

16. V. Cumar i M. Calache, 1991. Treatment of Alzheimer's disease with cholinergic drugs. *International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology* 29(1), 23-37.

17. R. J. Ellis, 1993. The general concept of molecular šaperones. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 339(1289), 257-261.

18. J. Koren, U. K. Jinwal, D. C. Lee, J. R. Jones, C. L. Shults, A. G. Johnson, L. J. Anderson i C. A. Dickey, 2009. Šaperone signalling complexes in Alzheimer's disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13(4), 619-630.

19. H. A. Pearson i C. Peers, 2006. Physiological roles for amyloid  $\beta$  peptides. *The Journal of Physiology* 575, 5-10.

20. G. R. Dawson, G. R. Seabrook, H. Zheng, D. W. Smith, S. Graham, G. O'Dowd, B. J. Bowery, S. Boyce, M. E. Trumbauer, H. Y. Chen, L. H. T. Van der Ploeg i D. J. S. Sirinathsinghij, 1999. Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Neuroscience* 90(1), 1-13

21. J. Walter i C. Haass. 2000. Posttranslational modifications of amyloid precursor protein: ectodomain phosphorylation and sulfation. *Methods in Molecular Medicine* 32, 149-168

22. T. A. Bayer, R. Cappai, C. L. Masters, K. Beyreuther i G. Multhaup, 1999. It all sticks together--the APP-related family of proteins and Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry* 4(6), 524-528.

23. A. M. Hall, E. D. Roberson, 2012. Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin* 88(1), 3-12.

24. J. R. O'Brien, P. C. Wong, 2011. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annual Review of Neuroscience* 34, 185-204.

25. J. Nunan i D. H. Small, 2000. Regulation of APP cleavage by K-, L- and Q-secretases. *FEBS Letters* 483, 6-10.

26. J. D. Buxbaum, K. N. Liu, Y. Luo, K. L. Stocking, J. J. Peschon, R. S. Johnson, B. J. Castner, D. P. Cerretti i R. A. Black, 1998. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *Journal of Biological Chemistry* 273(43), 27765-27767.
27. R. Vassar, 2004. BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience* 23, 105-114.
28. B. De Strooper, T. Iwatsubo i W. S. Wolfe, 2012. Presenilins and  $\gamma$ -Secretase: Structure, Function, and Role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(1), a006304.
29. Opabinia regalis, [https://en.wikipedia.org/wiki/Gamma\\_secretase#/media/File:5a63.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Gamma_secretase#/media/File:5a63.png) (datum pristupa 27. srpnja 2018.)
30. [https://www.genscript.com/peptide/RP10017-\\_Amyloid\\_1\\_42\\_human.html](https://www.genscript.com/peptide/RP10017-_Amyloid_1_42_human.html) (datum pristupa 27. srpnja. 2018.)
31. T. Qiu, Q. Liu, Y. Cheng, Y. zhao i Jo Y. Lei, 2015. A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40: similarities and differences. *Journal of Peptide Science* 21(7), 522-529.
32. G. Chen, T. Xu, Y. Yan, Y. Zhou, Y. Jiang, K. Melcher i H. E. Xu, 2017. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica* 38(9), 1205-1235.
33. L. Gu, Z. Guo, 2013. Alzheimer's A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *Journal of Neurochemistry* 126(3), 305-311.
34. V. H. Finder i R. Glockshuber, 2007. Amyloid- $\beta$  Aggregation. *Neurodegenerative Disasses* 4, 13-27.
35. W. Huang, X. Zhang i W. Cheng, 2016. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical reports* 4(5), 519-522.
36. F. W. van Leeuwen, D. P. de Kleijn, H.H. van der Hurk, A. Neubauer, M. A. Sonnemans, J. A. Sluijs, S. Köycü, R. D. Ramdijal, A. Salehi, G. J. Martens, F. G. Grosveld, J. Peter, H. Burbach i E. M. Hol, 1988. Frameshift mutants of beta amyloid precursor protein and ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients. *Science* 279(5348), 242-247.
37. D. A. Butterfield, K. Hensley, P. Cole, R. Subramaniam, R. Aksenov, M. Aksenova, P. M. Bummer, B. E. Haley i J. M. Carney, 1997. Oxidatively induced structural alteration of glutamine synthetase assessed by analysis of spin label incorporation kinetics: Relevance to Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 68, 2451-2457.
38. D. Rapaka, V. R. Bitra, J. R. Medapati i A. Akula, 2014. Calcium regulation and Alzheimer's disease. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4(2), 513-518.
39. S. J. Siegel, J. Bieschke, E. T. Powers i J. W. Kelly, 2007. The Oxidative Stress Metabolite 4-Hydroxynonenal Promotes Alzheimer Protofibril Formation. *Biochemistry* 46(6), 1503-1510.

40. I. G. Onyango, J. Dennis i S. M. Khan, 2016. Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease and the Rationale for Bioenergetics Based Therapies. *Aging and Disease* 7(2), 201-214.
41. R. Bravo, V. Para, D. Gatica, A. E. Rodriguez, N. Torrealba, F. Paredes, Z. V. Wang, A. Zorzano, J. A. Hill, E. Jaimovich, A. F. G. Quest i S. Lavandero, 2013. Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response: Dynamics and Metabolic Integration. *International Review of Cell and Molecular Biology* 301, 215-290.
42. T. Shpilka i C. M. Haynes, 2017. The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implications in ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19, 109–120
43. P. L. McGeer, H. Akiyama, S. Itagaki i E. G. McGeer, 1989. Immune system response in Alzheimer's disease. *Canadian Journal of Neurological Sciences* 16(4), 516-527.
44. K. Iqbal, F. Liu, C. Gong i I. Grundke-Iqbal, 2010. Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies, *Current Alzheimer Research* 7(8), 656-664.
45. <http://neuropathology-web.org/chapter9/chapter9bAD.html> (datum pristupa 30. strpnja 2018.)
46. M. Jouanne, S. Rault i A. Voisin-Chiret, 2017. Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 139, 153-167.
47. P. Ganguly, T. D. Do, L. Larini, N. E. LaPointe, A. J. Sercel, M. F. Shade, S. C. Feinstein, M. T. Bowers i J. Shea, 2015. Tau Assembly: The Dominant Role of PHF6 (VQIVYK) in Microtubule Binding Region Repeat R3. *Journal of Physical Chemistry B* 119(13), 4582-4593.
48. T. Kimura, K. Ishiguro i S. Hisanaga, 2014. Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7, 65.
49. D. A. Njiholt, A. Nölle, E. S. van Haastert, H. Edelijn, R. F. Toonen, J. J. Hoozemans i W. Scheper, 2013. Unfolded protein response activates glycogen synthase kinase-3 via selective lysosomal degradation. *Neurobiology of Aging* 34(7), 1759-1771.
50. R. U. H. Mattoo i P. Goloubinoff, 2014. Molecular šaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71(17), 3311-3325.
51. R. J. Ellis, 2006. Molecular šaperones: assisting assembly in addition to folding. *Trends in Biochemical Sciences* 31(7), 395-401.
52. D.L. Nelson, M.M. Cox, 2013, Lehninger Principles of Biochemistry, 6th. ed. New York, W.H.Freeman, 144-147.
53. R. Bakthisaran, R. Tangirala i C. M. Rao, 2015. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1854(4), 291-319.
54. J. Acunzo, M. Katsogiannou i P. Rocchi, 2012. Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), B-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44(10), 1622-1631.

55. <https://www.rcsb.org/structure/2YGD> (datum pristupa 2. kolovoza 2018.)
56. M. Halsbeck i E. Vierling, 2015. A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *Journal of Molecular Biology* 427(7), 1537-1548
57. A. Sgarbossa, D. Buselli i F. Lenci, 2008. In vitro perturbation of aggregation processes in beta-amyloid peptides: a spectroscopic study. *FEBS Letters* 582, 3288-3292.
58. M. M. Wilhelmus, I. Otte-Höller, P. Wesseling, R. M. de Waal, W. C. Boelens i M. M. Verbeek, 2006. Specific association of small heat shock proteins with the pathological hallmarks of Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 32(2), 119-130.
59. M. M. Wilhelmus, W. C. Boelens, P. Otte-Höller, L. C. Marison i M. W. Robert, 2006. Small heat shock protein HSPB8: its distribution in Alzheimer's disease brains and its inhibition of amyloid- $\beta$  protein aggregation and cerebrovascular amyloid- $\beta$  toxicity. *Acta Neuropathologica* 111, 139-149.
60. M. E. Tóth, V. Szegedi, E. Varga, G. Juhász, J. Horváth, E. Borbély, B. Csibrány, R. Alföldi, N. Lénárt, B. Penke i M. Sántha, 2015. C3. Overexpression of Hsp27 ameliorates symptoms of Alzheimer's disease in APP/PS1 mice. *Cell Stress and Šaperones* 18(6), 759-771.
61. A. P. Arrigo, S. Viot, S. Chaufor, W. Firadus, C. Kretz-Remy i C. Diaz-Latoud, 2005. Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxidants & Redox Signaling* 7(3-4), 414-422
62. H. Shimura, Y. Miura-Shimura i K. S. Kosik, 2004. Binding of tau to heat shock protein 27 leads to decreased concentration of hyperphosphorylated tau and enhanced cell survival. *Journal of Biological Chemistry* 279(17), 17957-17962.
63. S. Narayanan, B. Kamps, W. C. Boelens i B. Reif, 2006.  $\alpha$ B-crystallin competes with Alzheimer's disease beta-amyloid peptide for peptide-peptide interactions and induces oxidation of Abeta-Met35. *FEBS Letters* 580(25), 5941-5946.
64. K. J. Barhnam, F. Haeffner, G. D. Ciccotosto, C. C. Curtain, D. Tew, C. Mavros, K. Beyreuther, D. Carrington, C. L. Masters, R. A. Cherry, R. Cappai i A. I. Bush, 2004. Tyrosine gated electron transfer is key to the toxic mechanism of Alzheimer's disease beta-amyloid. *FASEB Journal* 18(12), 1427-1429.
65. K. Seidel, J. Vinet, W.F. Dunnen, E.R. Brunt, M. Meister, A. Boncoraglio, M.P. Zijlstra, H.W. Boddeke, U. Rüb, H.H. Kampinga, S. Carra, 2012. The HSPB8-BAG3 šaperone complex is upregulated in astrocytes in the human brain affected by protein aggregation diseases. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38, 39-53.
66. M. Tavoria, T. Gabriele, I. Kola i R. L. Anderson, 1996. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress and Šaperones* 1(1), 23-28.
67. M. P. Mayer i B. Bukau, 2005. Hsp70 šaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62(6), 670-684.
68. J. S. H. Gaston, 2002. Heat shock proteins and innate immunity. *Clinical & Experimental Immunology* 127(1), 1-3.

69. B. Javid, P. A. MacAry i P. J. Lehner, 2007. Structure and Function: Heat Shock Proteins and Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology* 179(4), 2035-2040.
70. J. C. Young, 2010. Mechanisms of the Hsp70 šaperone system. *Biochemistry and Cell Biology* 88(2), 291-300.
71. H. G. Suresh, 2015. Fatty acid synthetase reversibly sequesters into storage granules upon nutrient limitation, Helderberg, Sveučilište u Helderbergu.
72. A. L. Edkins, 2015. CHIP: a co-šaperone for degradation by the proteasome. *Subcellular Biochemistry* 78, 219-242.
73. <http://www.rcsb.org/structure/1HX1> (Datum pristupa 3. kolovoza 2018.)
74. M. Zhang, M. Windheim, S. M. Roe, M. Pegg, P. Cohen, C. Prodromou i L. H. Pearl, 2005. Šaperoned Ubiquitylation—Crystal Structures of the CHIP U Box E3 Ubiquitin Ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a Complex. *Molecular Cell* 20(4), 525-538.
75. C. G. Evans, S. Wisén i J. E. Gestwicki, 2006. Heat Shock Proteins 70 and 90 Inhibit Early Stages of Amyloid  $\beta$ -(1–42) Aggregation *in Vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 33182-33191.
76. R. Lu, M. Tan, H. Wang, A. Xie, J. Yu i L. Tan, 2014. Heat Shock Protein 70 in Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, 435203.
77. M. B. Evgen'ev, G. S. Krasnov, I. V. Nesterova, D. G. Garbuz, V. L. Karpov, A. V. Morozov, A. V. Snezhkina, A. N. Samokhin, A. Sergeev, A. M. Kulikov i N. V. Bobkova, 2017. Molecular Mechanisms Underlying Neuroprotective Effect of Intranasal Administration of Human Hsp70 in Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 59, 1415-1426.
78. B. Sabirzhanov, B. A. Stoica, M. Hanscom, C. Piao i A. I. Faden, 2012. Over-expression of HSP70 attenuates caspase-dependent and caspase independent pathways and inhibits neuronal apoptosis. *Journal of Neurochemistry* 123(4), 542-554.
79. U. K. Jinwal, E. Akoury, J. F. Abisambra, J. C. O'Leary, A. D. Thompson, L. J. Blair Y. Jin, J. Bacon, B. A. Nordhues, M. Cockman, J. Zhang, B. Borysov, V. N. Uversky, J. Biernat, E. Mandelkow, J. E. Gestwicki, M. Zweckstetter i C. A. Dickey, 2013. Imbalance of Hsp70 family variants fosters tau accumulation. *The FASEB Journal* 27(4), 1450-1459.
80. M. Wang, S. Wey, Y. Zhang, R. Ye i A. S. Lee, 2009. Role of the Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP in Development, Cancer, and Neurological Disorders. *Antioxidants & Redox Signaling* 11(9), 2307-2316.
81. M. S. Gorbatyjuk i O. S. Gorbatyuk, 2013. The Molecular Šaperone GRP78/BiP as a Therapeutic Target for Neurodegenerative Disorders: A Mini Review. *Journal of Genetic Syndromes and Gene Therapy* 4(2), 128.
82. R. M. Vabulas, S. Raychaudhuri, M. Hayer-Hartl i F. U. Hartl, 2010. Protein Folding in the Cytoplasm and the Heat Shock Response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(12), a004390.



83. M. R. Mangione, S. Vilasi, C. Marino, F. Librizzi, C. Canale, D. Spigolon, F. Bucchieri, A. Fucarino, R. Passantino, F. Cappello, D. Bulone i P. San Biagio, 2016. Hsp60, amateur šaperone in amyloid-beta fibrillogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 11, 2474-2483.
84. N. Padmadas, P. K. Panda i S. Durairaj, 2018. Binding Patterns Associated A $\beta$ -HSP60 p458 Conjugate to HLA-DR-DRB Allele of Human in Alzheimer's Disease: An In Silico Approach. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences* 10(1), 93-104.
85. S. Swaroop, A. Mahadevan, S. K. Shankar, Y. K. Adlakha i A. Basu, 2018. HSP60 critically regulates endogenous IL-1 $\beta$  production in activated microglia by stimulating NLRP3 inflammasome pathway. *Journal of Neuroinflammation* 15, 177.
86. K. C. Walls, P. Coskun, J. L. G. Perez, N. Zadourian, K. Freude, S. Rasool, M. B. Jones, K. N. Green i F. M. LaFerla, 2012. Swedish Alzheimer mutation induces mitochondrial dysfunction mediated by Hsp60 mislocalization of amyloid precursor protein (APP) and beta-Amyloid. *Journal of Biological Chemistry* 287(36), 30317–30327.
87. E. Khabirova, A. Moloney, S. J. Marciniak, J. Williams, D. A. Lomas, S. G. Oliver, G. Favrin, D. B. Sattelle i D. C. Crowther, 2014. The TRiC/CCT šaperone is implicated in Alzheimer's disease based on patient GWAS and an RNAi screen in A $\beta$ -expressing *Caenorhabditis elegans*. *PLOS One* 9(7), e102985.
88. F. H. Schopf, M. M. Biebl i J. Buchner, 2017. The HSP90 šaperone machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(6), 345-360.
89. S. E. Jackson, 2012. Hsp90: Structure and Function. *Topics in Current Chemistry* 328, 155-240.
90. A. Salminen, J. Ojala, K. Kaarniranta, M. Hiltunen i H. Soinien, 2011. Hsp90 regulates tau pathology through co-šaperone complexes in Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* 93(1), 99-110.
91. U. K. Jinwal, J. Koren, S. I. Borysov, A. B. Schmid, J. F. Abisambra, L. J. Blair, A. G. Johnson, J. R. Jones, C. L. Shults, J. C. O'Leary. Y. Jin, J. Buchner, M. B. Cox i C. A. Dickey, 2010. The Hsp90 Cošaperone, FKBP51, Increases Tau Stability and Polymerizes Microtubules. *Journal of Neuroscience* 13, 591-599.
92. R. L. Frozza, M. V. Lourenco i F. G. De Felice, 2018. Challenges for Alzheimer's Disease Therapy: Insights from Novel Mechanisms Beyond Memory Defects. *Frontiers in Neuroscience* 12, 37.
93. S. Gauthier, P. S. Aisen, S. H. Ferris, D. Saumier, A. Doung, D. Haine, D. Gaerceanu, J. Suly, J. Oh i W. Lau, 2009. Effect of tramiprosate in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: exploratory analyses of the MRI sub-group of the Alphase study. *The Journal of Nutrition, Health and Aging* 13(6), 550-557.
94. G. K. Wilcock, S. E. Black, S. B. Hendrix, K. H. Zavitz, E. A. Swabb i M. A. Laughlin, 2008. Efficacy and safety of tarenflurbil in mild to moderate Alzheimer's disease: a randomised phase II trial. *The Lancet Neurology* 7(6), 483-493.
95. B. De Strooper, R. Vassar i T. Golde, 2010. The secretases:enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology* 6(2), 99-107.

96. D. M. Niedowicz, P. T. Nelson i M. P. Murphy, 2011. Alzheimer's Disease: Pathological Mechanisms and Recent Insights. *Current Neuropharmacology* 9, 674-684.
97. J. Güell-Bosch, L. Montoliu-Gaya, G. Esquerda-Canals i S. Vilegas, 2016. Aβ immunotherapy for Alzheimer's disease: where are we? *Neurodegenerative Disease Management* 6(3), 179-181.
98. C. Theunis, N. Crespo-Biel, V. Gafner, M. Pihlgren, M. P. López-Deber, P. Reis, D. T. Hickman, O. Adolfsson, N. Chuard, D. M. Ndao, P. Borghgraef, H. Devijver, F. Van Leuven, A. Pfeifer i A. Muhs, 2013. Efficacy and Safety of A Liposome-Based Vaccine against Protein Tau, Assessed in Tau.P301L Mice That Model Tauopathy. *Plos One* 8(8), e72301.
99. C. Ballatore, K. R. Brunden, D. M. Huryn, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee i A. B. Smith, 2012. Microtubule stabilizing agents as potential treatment for Alzheimer's disease and related neurodegenerative tauopathies. *Journal of Medicinal Chemistry* 55(21), 8979-8996.
100. A. Martinez i D. I. Perez, 2008. GSK-3 inhibitors: a ray of hope for the treatment of Alzheimer's disease? *Journal of Alzheimer's Disease* 15(2), 181-191.
101. P. Anand i B. Singh, 2013. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research* 36(4), 375-399.
102. B. A. Kirby, C. R. Merrill, H. Ghanbari i W. C. Wallace, 1994. Heat shock proteins protect against stress-related phosphorylation of tau in neuronal PC12 cells that have acquired thermotolerance. *Journal of Neuroscience* 14(9), 5687-5693.
103. T. Hirakawa, K. Rokutan, T. Nikawa i K. Kishi, 1996. Geranylgeranylacetone induces heat shock proteins in cultured guinea pig gastric mucosal cells and rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 111(2), 345-357.
104. N. V. Bobkova, D. G. Garbuz, I. Nesterova, N. Medvinskaya, A. Samokhin, I. Alexandrova, V. Yashin, V. Karpov, M. S. Kukharski, N. N. Ninkina, A. A. Smirnov, E. Nudler, i M. Evgen'Ev. Therapeutic effect of exogenous Hsp70 in mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 38(2), 425-435.
105. Calvero, <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Geldanamycin.svg> (Datum pristupa 10. kolovoza 2018.)
106. <http://www.adooq.com/geranylgeranylacetone.html> (Datum pristupa 10. kolovoza 2018.)
107. L. J. Blair, J. J. Sabbagh i C. A. Dickey, 2014. Targeting Hsp90 and its co-šaperones to treat Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 18(10), 1219-1232.

## 8. Sažetak

Alzheimerova bolest je progresivni neurodegenerativni poremećaj uzrokovan akumulacijom i agregacijom  $\beta$ -amiloidnih peptida koja rezultira brojnim toksičnim čimbenicima poput neurofilamentnih zapleta hiperfosforiliranog proteina tau, povećanog stupnja nastajanja reaktivnih kisikovih vrsta, kroničnog upalnog odgovora, ionske neravnoteže i u konačnici apoptoze neurona te prekid sinaptičkih veza što uzrokuje demenciju. Budući da ova bolest u svojoj osnovi sadrži poremećaje u staničnoj proteostazi i metabolizmu proteina, kao važan čimbenik njezine patofiziologije pokazali su se šaperoni. To su proteini koji sudjeluju u brojim staničnim procesima poput smatanja nosintetiziranih i nepravilno smotanih proteina, translokacije proteina preko membrane, razmatanja makromolekulskih agregata i aktivacije brojnih enzima te receptora čime na nezamjenjiv način reguliraju staničnu proteostazu. U zadnjih nekoliko godina utvrđene su uloge različitih šaperonskih obitelji u sprječavanju, ali i pogodovanju agregacije  $\beta$ -amiloida i proteina tau, modulaciji imunskog odgovora i smanjenju oksidativnog stresa stanice te direktnom sprječavanju apoptoze neurona. Iz ovog razloga sve više strategija liječenja Alzheimerove bolesti temelji se na modulaciji šaperonskog sustava što bi moglo predstavljati velik korak u liječenju ove, ali i drugih neurodegenerativnih bolesti. Ipak, preduvjet za uspješnost takvih istraživanja je razlučivanje mehanizama šaperonskih sustava u kontekstu šaperonske mreže što bi odgonetnulo detaljniju ulogu ovakvih sustava u navedenim bolestima čime bi se otvorile nove perspektive njihova liječenja.

## 9. Summary

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder caused by abnormal accumulation and aggregation of amyloid- $\beta$  peptide which results in various toxic effects such as neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated tau protein, increased concentration of reactive oxygen species, chronic inflammation and ionic disequilibrium, all of which ultimately lead to neuronal apoptosis and loss of synapses, thus causing dementia. The most important element of this disease is a disruption of cell proteostasis which is why molecular chaperones have shown to be one of the main factors in its pathophysiology. Molecular chaperones are proteins that are involved in many cellular events such as folding of newly synthesized and/or unfolded proteins, membrane translocation of macromolecules, unfolding of protein aggregates and maintaining the function of many enzymes and receptors. Recently, many functions of chaperones in prevention and amelioration of the aggregation of amyloid proteins have been found. Furthermore, their role has been recognized in modulating the immune system, in reducing the concentration of reactive oxygen species and in preventing cell apoptosis directly. This is why many of new strategies of treating Alzheimer's disease are based on modulating the chaperone systems which could be a big step in curing this and many other neurodegenerative diseases. For these strategies to succeed, intensive research regarding mechanisms of chaperone function in the context of the chaperone network will have to be conducted. This would reveal a detailed role of these systems in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases.