

# Biokemijska osnova prionskih bolesti

---

Jukić, Luka

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:217:899058>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-28**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Luka Jukić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **BIOKEMIJSKA OSNOVA PRIONSKIH BOLESTI**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2018.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

20. kolovoza 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

21. rujna 2018.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Potpis:



# Sadržaj

|  |             |
|--|-------------|
| <b>§ SAŽETAK.....</b>  | <b>VII</b>  |
| <b>§ 1. UVOD.....</b>  | <b>1</b>    |
| <b>§ 2. BIOKEMIJSKA OSNOVA PRIONSKIH BOLESTI.....</b>  | <b>2</b>    |
| <b>2.1. Prionski protein.....</b>  | <b>2</b>    |
| 2.1.1. Pojam priona i osnovna razlika između prionskih bolesti i bolesti pogrešno smotanih proteina .2 |             |
| 2.1.2. Osnovne značajke prionskog proteina .....   | 3           |
| 2.1.3. Struktura prionskog proteina .....  | 4           |
| 2.1.4. Funkcija PrP <sup>C</sup> .....   | 6           |
| 2.1.5. Toksičnost PrP <sup>C</sup> proteina.....   | 8           |
| 2.1.6. Interakcija PrP <sup>C</sup> proteina s ostalim proteinima.....                                 | 9           |
| <b>2.2. Prionske bolesti .....</b>   | <b>9</b>    |
| 2.2.1. Uvod u prionske bolesti.....  | 9           |
| 2.2.2. Sporadična Creutzfeldt-Jakobova bolest (sCJD).....  | 10          |
| 2.2.3. Varijantna Creutzfeldt-Jakobova bolest (vCJD).....  | 11          |
| 2.2.4. Iatrogenična Creutzfeldt-Jakobova bolest (iCJD).....  | 11          |
| 2.2.5. Genetska Creutzfeldt-Jakobova bolest (gCJD).....  | 11          |
| 2.2.6. Gerstmann-Sträussler-Scheinker sindrom (GSS).....   | 12          |
| 2.2.7. Fatalna obiteljska nesanica (FFI) .....   | 12          |
| 2.2.8. Kuru .....  | 13          |
| 2.2.9. Liječenje prionskih bolesti .....   | 13          |
| <b>2.3. Usporedba prionskih bolesti s ostalim amiloidnim bolestima.....</b>                            | <b>14</b>   |
| 2.3.1. Općenito o amiloidima.....  | 14          |
| 2.3.2. Struktura amiloida .....  | 15          |
| 2.3.3. $\beta$ -amiloidi.....  | 17          |
| 2.3.4. $\alpha$ -sinuklein.....  | 19          |
| <b>§ 3. ZAKLJUČAK .....</b>  | <b>21</b>   |
| <b>§ 4. LITERATURNI IZVORI.....</b>  | <b>XXII</b> |



## § Sažetak

Prionske bolesti su bolesti čije se nastajanje povezuje s krivim smatanjem i agregiranjem prionskog proteina, PrP. Zarazne su i neizlječive bolesti koje dijele mnoge osobine s bolestima pogrešno smotanih proteina, ali se od njih u mnogočemu razlikuju. Zdravi stanični prionski protein (PrP<sup>C</sup>) nalazi se u svim stanicama većine organizama, a njegova struktura određena je raznim metodama i može se podijeliti na dvije domene i nekoliko karakterističnih strukturnih cjelina u sklopu domena.. Struktura krivo smotanog prionskog proteina (PrP<sup>Sc</sup>) razlikuje od strukture PrP<sup>C</sup> proteina i pokazuje veći udio  $\beta$ -nabranih struktura. Funkcija PrP<sup>C</sup> proteina još nije sa sigurnošću poznata, pa se trenutno PrP<sup>C</sup> proteinu pripisuju mnoge potencijalne funkcije. Također nije poznato što točno inducira toksičnost prilikom obolijevanja od prionskih bolesti, kao niti mehanizam pogrešnog smatanja i agregiranja PrP<sup>C</sup> proteina. Dosad su otkriveni mnogi proteini koji mogu služiti kao takozvani partneri PrP<sup>C</sup> proteinu vežući se za njega i tako tvoreći različite agregate čija funkcija i eventualna toksičnost još nisu istraženi.

Simptomi većine prionskih bolesti najčešće su povezani s neurodegenerativnim oštećenjima, a same prionske bolesti mogu se po načinu dobivanja podijeliti na spontane (sporadične), genetske i stečene. Najpoznatije prionske bolesti su Creutzfeldt-Jakobova bolest i njezine podvrste, fatalna obiteljska nesanica, Gerstmann-Straussler-Scheinkerov sindrom i Kuru. Postoji nekoliko smjerova u razvijanju lijeka za prionske bolesti, ali se može reći da još nema pravih pomaka na tom području. Glavna razlika između prionskih bolesti i bolesti pogrešno smotanih proteina (amiloidoza) je ta što su prionske bolesti zarazne, dok bolesti pogrešno smotanih proteina nisu. S prionskim bolestima povezuje ih proces krivog smatanja zdravih proteina i njihovo agregiranje, stoga je za razumijevanje prionskih bolesti izrazito važno razumjeti i bolesti pogrešno smotanih proteina, njihovu strukturu, i način agregiranja. Također je korisno usporediti bolesti karakteristične za amiloidoze; proteine koji sudjeluju u pogrešnom smatanju i simptome obolijevanja s prionskim bolestima zbog mogućih poveznica tih dviju skupina bolesti.



## § 1. UVOD

Prionske bolesti su rijetke, zasad neizlječive bolesti čijem se istraživanju posljednjih desetljeća pridaje mnogo značaja. Vrijeme inkubacije im može varirati od nekoliko godina do nekoliko desetljeća, čineći njihovo otkrivanje i eventualno liječenje iznimno zahtjevnim. Glavni simptomi oboljenja prionskih bolesti se očituju u progresivnom gubitku funkcije, propadanjem i na kraju odumiranjem neurona što uzrokuje napadaje, psihozu, nesanicu, gubitak pamćenja i mnoge druge poremećaje. Dugo vremena u znanstvenoj zajednici nije postojao konsenzus oko toga što su uzročnici tih bolesti, dok je danas većinski prihvaćena teorija da prionske bolesti uzrokuju infektivni proteini, takozvani prioni. Isto je doživljeno kao šokantno otkriće, prije svega jer u to vrijeme nisu bile poznate bolesti čiji su uzročnici proteini. Za to otkriće je 1997. godine dodijeljena Nobelova nagrada za fiziologiju znanstveniku S. B. Prusineru. Središnji događaj u procesu obolijevanja od prionskih bolesti formiranje je agregata nepravilno smotanih proteina čija funkcija i način nastajanja još nisu u potpunosti poznati. Najispitivanije prionske bolesti su Creutzfeldt-Jakobova bolest (CJD), fatalna obiteljska nesanica (FFI), Gerstmann-Straussler-Scheinkerov sindrom (GSS) i Kuru. Iako vrlo rijetke, prionske bolesti su, zbog svojih neobičnih svojstava kao što je način zaraze, formiranje agregata i mehanizama toksičnosti, poprilično istraživane s ciljem njihova boljeg razumijevanja i razvijanja metoda adekvatnog liječenja.<sup>2</sup>

Ovaj rad daje sažet prikaz biokemijske osnove prionskih bolesti objašnjavajući strukture prionskog proteina, opisujući njegove moguće funkcije i razlog toksičnosti. Nadalje pobliže objašnjava poznate prionske bolesti i njihovo nastajanje, navodi njihove karakteristike, specifičnosti, međusobne sličnosti i razlike, te kako je moguće razviti različite metode liječenja prionskih bolesti. Prionske bolesti usporedit će se s bolestima uzrokovanih krivo smotanim proteinima za koje se smatra da nalikuju prionskim bolestima po mnogim obilježjima, a sve to s ciljem boljeg razumijevanja prionskih bolesti te procesa u kojima sudjeluju.

## § 2. BIOKEMIJSKA OSNOVA PRIONSKIH BOLESTI

### 2.1. Prionski protein

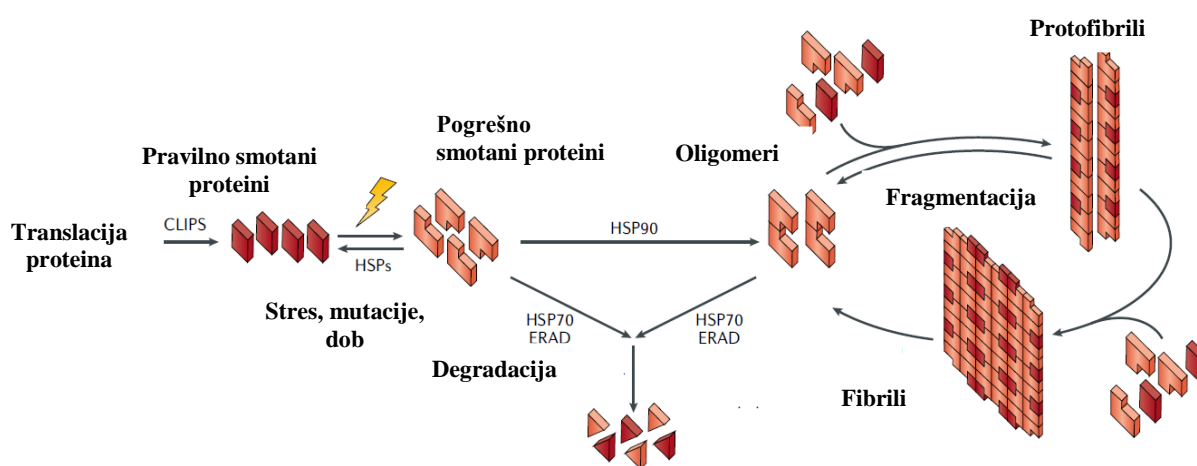
#### 2.1.1. Pojam priona i osnovna razlika između prionskih bolesti i bolesti pogrešno smotanih proteina

Za razumijevanje prionskih bolesti ponajprije treba objasniti što su to točno prioni i kako prionske bolesti razlikovati od ostalih bolesti čiji su uzročnici pogrešno smotani proteini. Pojam „prion“ prvotno je predstavljao samo uzročnika prionskih bolesti (još poznatih i pod nazivom transmisibilne spongiformne encefalopatije), s naglaskom na tome da se radilo o infektivnoj čestici proteinske prirode nepoznate strukture. Upravo to je bilo suprotno svom dotadašnjem poimanju infektivnih bolesti, što je to otkriće učinilo izrazito bitnim. Danas se često bolesti uzrokovane pogrešno smotanim proteinima pogrešno poistovjećuju s prionskim bolestima na temelju mnogih zajedničkih obilježja.

Tijekom smatanja proteina može doći do kojekakvih pogrešaka koje mogu biti uzrokovane mutacijama, stresom ili dobi. Takvi pogrešno smotani proteini agregiraju tvoreći uređene strukture s visokim udjelom  $\beta$ -struktura, takozvane amiloide, što dovodi do razvoja različitih neurodegenerativnih poremećaja, koji ovise o vrsti pogrešno smotanog proteina. Takvi agregati imaju mogućnost umnožavanja procesom nukleacije i fragmentacije, a najmanja jedinica takvih agregata koja ima sposobnost umnažanja naziva se propagon.<sup>1</sup> U procesu nukleacije i fragmentacije posebna vrsta chaperona, zvani CLIPS kontroliraju pravilno smatanje nosintetiziranih proteina, ali i uz djelovanje CLIPS zbog raznih faktora dolazi do pogrešnog smatanja proteina. Pogrešno smotani proteini mogu ponovno ući u proces smatanja ili biti razgrađeni, ali mogu i agregirati tvoreći oligomere s većim udjelom  $\beta$ -nabranih struktura. Takvi oligomeri daljnjom agregacijom tvore uređene strukture, amiloidna vlakna i protofibrile, koji su sastavljeni od pogrešno i ispravno smotanih proteina. Fragmentacijom takvih struktura može se iznova započeti proces stvarajući nove propagone (Slika 2.1.1.). Najčešće bolesti uzrokovane krivim smatanjem proteina su Alzheimerova bolest, Huntingtonova bolest, ALS (amiotropična lateralna skleroza), a postoji još i niz drugih.<sup>1</sup> Prionske bolesti također se smatraju bolestima uzrokovanih krivo smotanim proteinima, no u usporedbi s drugim bolestima, one nastaju agregacijom isključivo jedne vrste proteina, točnije pogrešno smotanih prionskih proteina (*prion protein* - PrP). Prionske bolesti su infektivne

bolesti te su kroz povijest bile pokretači različitih epidemija. Nadalje, struktura krivo smotanog prionskog proteina dijeli karakteristike s određenim virusima. Prionske bolesti mogu se prenositi između istih ili između različitih vrsta organizama, uključujući i ljude, dok takve karakteristike zasada nisu pronađene kod bolesti krivo smotanih proteina. Zbog toga se sve češće spominje termin prionoid, koji predstavlja proteinske agregate s mogućnošću umnažanja, ali za koje još nije utvrđeno posjeduju li svojstvo zaraznosti između organizama.<sup>1,10</sup>

Iako postoje značajne razlike između prionskih bolesti i bolesti pogrešno smotanih proteina, one i dalje dijele određene sličnosti, zbog čega je zanimljiva usporedba njihovih struktura, mehanizama djelovanja i toksičnosti, o čemu će bit riječ u daljnjem dijelu rada. .



Slika 2.1.1. Proces nukleacije i fragmentacije. Ilustracija preuzeta i prilagođena prema: C. Schenkel, A. Aguzzi, *Nature Reviews Genetics* **19** (2018) 405-419.

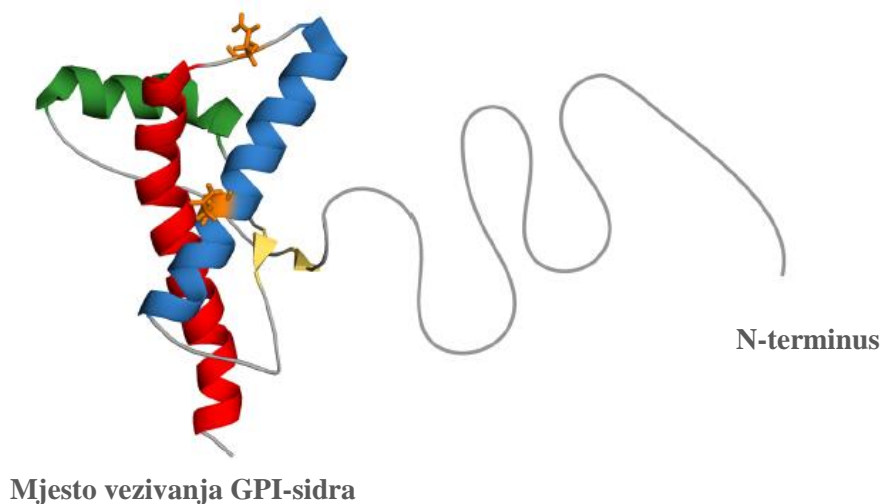
### 2.1.2. Osnovne značajke prionskog proteina

Osamdesetih godina prošlog stoljeća proveden je niz istraživanja s ciljem otkrivanja proteina uzročnika skrepi bolesti ovaca. Jedno takvo istraživanje je primjerice uspoređivalo proteine nađene u zdravom moždanom tkivu hrčaka s proteinima pronađenim u moždanim tkivima hrčaka zaraženih skrepi bolešću. U zaraženim tkivima otkriven je polipeptid otporan na proteaze mase od 27 do 32 kDa koji je nazvan PrP<sup>27-32</sup>. Kasnije je otkriveno da je PrP kodiran kromosomalnim genom nazvanim PRNP koji translacijom sintetizira protein mase od 33 do 35 kDa. Gen PRNP je jako dobro očuvan, što je vidljivo u relativno malim razlikama u tom genu među vrstama živih bića koje ga posjeduju. Protein karakterističan za zaražena tkiva dobio je oznaku PrP<sup>Sc</sup>, dok je protein pronađen u zdravim tkivima nazvan PrP<sup>C</sup> (*cellular prion*

*protein*) Prionski protein je pronađen u većini dosad ispitivanih kralježnjaka te prilikom pogrešnog smatanja staničnog PrP<sup>C</sup> nastaje PrP<sup>Sc</sup> (naziv dolazi od krivo smotanog prionskog proteina pronađenog u tkivima ovaca oboljelih od skrepi bolesti), koji se dovodi u vezu s nastajanjem prionskih bolesti. Dolazi do nastajanja agregata PrP<sup>Sc</sup> koji pokreću cijeli niz pogrešnih smatanja i agregiranja što naposljetku uzrokuje i vidljive simptome prionskih bolesti. Razlog i način na koji dolazi do pogrešnog smatanja još nije otkriven, kao niti uzrok toksičnosti pa i sama funkcija PrP<sup>C</sup> u stanicama zdravih organizama. Sve spomenuto povod je mnogim nesuglasicama unutar znanstvene zajednice, a dosad predložene teorije još nisu općeprihvaćene. U nastavku rada biti će detaljnije opisane moguće funkcije prionskog proteina.<sup>3,4</sup>

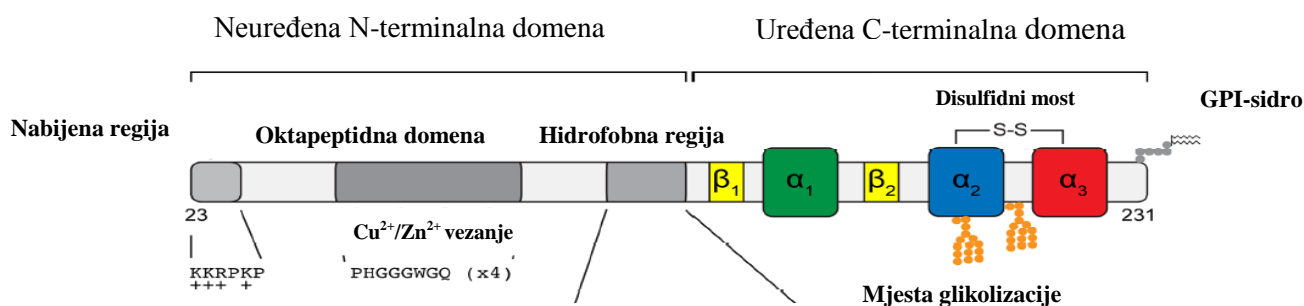
### 2.1.3. *Struktura prionskog proteina*

Proučavanjem strukture staničnog PrP<sup>C</sup> proteina nuklearnom magnetskom rezonancijom i kristalografskim metodama određena je struktura proteina koja se sastoji od 209 aminokiselina. Prionski protein sastoji se od dvije domene; neuređenog N-terminusa i globularnog, uređenog C-terminusa za koji je vezan glikozilfosfatidilinozitol (GPI). Uređeni C-terminus posjeduje dva mjesta na kojima može doći do glikolizacije. Za postizanje takve strukture protein se endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom tijelu mora dodatno posttranslacijski doraditi tako da dođe do vezivanja dodatnih ugljikohidratnih dijelova za asparagin polipeptidnog lanca i asocijacije GPI-a na C-terminus koji se ponaša kao svojevrsno sidro držeći PrP<sup>C</sup> vezan za vanjski dio membrane. Proteolitičkim cijepanjem PrP<sup>C</sup> proteina može doći do nastajanja C-terminusa vezanog za membranu i dva fragmenta N-terminusa, C1 i N1, ili alternativno do disocijacije PrP<sup>C</sup> proteina od GPI pa tako i odvajanja od membrane, ovisno o mjestu gdje dolazi do trganja peptidne veze. Smatra se da N1 fragment ima zaštitnu ulogu dok uloga C1 fragmenta još nije poznata.<sup>3,4</sup>



Slika 2.1.3.1. Struktura ljudskog PrP<sup>C</sup> proteina. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema: J. C. Watts, M. E. C. Bourkas, H. Arshad, *Acta Neuropathol.* **135** (2018) 159-178.

U N-terminalnoj domeni postoji nekoliko karakterističnih sljedova aminokiselina s posebnom ulogom kao što je primjerice slijed oktapeptida, koji se ponavlja četiri puta. Taj slijed sadrži histidin, koji može služiti za vezanje dvovalentnih metalnih iona kao što su ioni bakra, cinka, nikla i drugih. Ustanovljeno je postojanje hidrofobne regije bitne za procese dimerizacije i očuvane u većini živih bića koji sadrže PrP<sup>C</sup> protein. Za razliku od N-terminalne domene, C-terminalna domena sastoji se od tri  $\alpha$ -zavojnice povezane jednim disulfidnim mostom, a između njih se nalaze dva lanca, koji sačinjavaju antiparalelnu,  $\beta$ -nabranu strukturu. Zanimljivo je da je struktura koju poprima PrP<sup>C</sup> protein jedinstvena, odnosno nisu još pronađeni proteini takve strukture, zbog čega je nemoguće sa sigurnošću odrediti funkciju PrP<sup>C</sup> samo na temelju njegove strukture.<sup>3,4</sup>



Slika 2.1.3.2. Organizacija i podjela strukture PrP<sup>C</sup> na domene. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema: J. C. Watts, M. E. C. Bourkas, H. Arshad, *Acta Neuropathol.* **135** (2018) 159-178.

Struktura pogrešno smotanog prionskog proteina, PrP<sup>Sc</sup>, razlikuje se od strukture normalnog PrP<sup>C</sup> proteina. Cilj trenutnih istraživanja je potpuno određivanje strukture PrP<sup>Sc</sup> proteina, budući da su dosad uspješno određeni tek neki elementi cjelokupne strukture (udio  $\beta$ -struktura i  $\alpha$ -zavojnica u proteinu). Smatra se da je puno veći udio  $\beta$ -nabranih struktura u PrP<sup>Sc</sup> proteinu nego u normalnom PrP<sup>C</sup> proteinu. Kristalografskim mjerenjima ustanovljeno je da, prema veličini PrP<sup>Sc</sup> proteina u amiloidnim vlaknima, najvjerojatnije sadrži četiri lanca u  $\beta$ -nabranoj strukturi. Struktura PrP<sup>Sc</sup> proteina je izrazito stabilna što se očituje u nemogućnosti njezina narušavanju preko K-proteaza i denaturacije, a takva stabilnost pripisuje se brojnim vodikovim vezama između aminokiselina u  $\beta$ -nabranim strukturama, kao i Van der Waalsovima i hidrofobnim interakcijama.<sup>6</sup>

#### 2.1.4. Funkcija PrP<sup>C</sup>

Funkcija normalnog prionskog proteina u zdravim stanicama živih bića intenzivno se istražuje već desetljećima s ciljem da - osim samog otkrivanja njegove funkcije - ponudi i mogućnost razvoja različitih metoda liječenja prionskih bolesti. Funkcija PrP<sup>C</sup> zasad nije određena i predmet je intenzivnih istraživanja. Postoji mnogo pretpostavki o njegovoj možebitoj funkciji, ali dosad niti jedno istraživanje nije dalo konkretne dokaze. Pretpostavka je da PrP<sup>C</sup> protein ima određenu funkciju jer je PRNP gen, gen koji kodira protein, iznimno dobro očuvan u genomima većine kralježnjaka, odnosno da je tijekom razvitka živih bića na Zemlji postojala tendencija da se gen odupre promjeni. Zbog toga se može pretpostaviti da je gen baš u takvom obliku osiguravao opstanak tadašnjih organizama. U usporedbi s količinama ostalih proteina sadržanih u organizmima, PrP<sup>C</sup> je sadržan u relativno visokim koncentracijama u živim bićima, posebice u središnjem živčanom sustavu i neuronima, što iznova ukazuje na postojanje funkcije PrP<sup>C</sup> proteina. Kad PrP<sup>C</sup> ne bi imao važnu funkciju, organizmima bi bilo beskorisno trošiti mnogo energije na njegovu sintezu u tolikim količinama.

Za određivanje funkcije prionskog proteina korišteni su prije svega miševi kao modelni organizmi s uklonjenim PRNP genom, te stoga nisu više bili u stanju sintetizirati PrP<sup>C</sup> protein. Kod tih miševa proučavane su promjene u fenotipu kao moguće posljedice nedostatka PrP<sup>C</sup> proteina. Ustanovljeno je da su se miševi bez PRNP gena normalno razvijali i nisu pokazivali po život bitna odstupanja. Zabilježena su međutim tek neka fenotipska obilježja, koja nisu presudna za preživljavanje jedinki, a najizraženiji su poremećaji ritma spavanja, aktivnosti sinapsa i deficiti vezani uz osjet njuha. Neka od tih obilježja moguće je

povezati sa simptomima pojedinih prionskih bolesti kao što je primjerice fatalna obiteljska nesanica. Osim što je ustanovljeno da PrP<sup>C</sup> protein nije neophodan za preživljavanje, miševi bez PRNP gena također su pokazali otpornost na zarazu prionskim bolestima, odnosno nije došlo do pojave klasičnih simptoma oboljenja prionskim bolestima. Iz toga proizlazi da je zdravi PrP<sup>C</sup> protein ključan faktor u nastajanju prionskih bolesti. Daljnjim promatranjem miševa bez PRNP gena ustanovljeno je da nakon treće serije miševa dolazi do većih fizioloških problema, odnosno neurodegenerativnih poremećaja izraženih u obliku odumiranja Purkinjeovih tjelešaca. Iako je to u početku pripisivano nedostatku PrP<sup>C</sup> proteina, daljnjim istraživanjima ustanovljeno je da uslijed uklanjanja PRNP gena dolazi do prekomjerne ekspresije DpI proteina, koji je kodiran PRND genom. Takva pojava uzrokuje odumiranje Purkinjeovih stanica, a ne, kao što se pogrešno pretpostavljalo, nedostatak PrP<sup>C</sup> proteina.

Daljnja istraživanja pokazala su da su stanice koje ne sadrže PrP<sup>C</sup> protein podložnije apoptozi (staničnoj smrti) od stanica koje ga sadrže te se zato smatra da prionski protein ima funkciju zaštite stanica tako da smanji razinu apoptoze. Određena istraživanja ipak daju drugačije rezultate, pokazujući da to nema veze s prisutnošću PrP<sup>C</sup> proteina već s pretjeranom ekspresijom DpI proteina. Često se prionskom proteinu pripisuje enzimska funkcija superoksid dismutaze u zaštiti od ROS-a (Reactive Oxygen Species). Na takav zaključak navode stanice otpornije na toksičnost izazvane vodikovim peroksidom. Toj hipotezi ide još u prilog što PrP<sup>C</sup> veže ione bakra i pojava da su u stanicama bez PrP<sup>C</sup> utvrđena veća oštećenja na proteinima i lipidima. Iako primamljiva, ta hipoteza ima mnoge nedostatke i rezultati različitih istraživanja nisu u potpunosti uspjeli potvrditi dismutaznu aktivnost PrP<sup>C</sup> proteina. Funkcija prionskog proteina često se povezuje s procesima stanične signalizacije zbog postojanja GPI-sidra i zato jer pretjerana ekspresija PrP<sup>C</sup> proteina može utjecati na različite signalne puteve, ali - kao i za većinu ovih hipoteza - nema čvrstih dokaza koji bi ju mogli poduprijeti. Mnoge se druge funkcije pripisuju PrP<sup>C</sup> proteinu kao što su, između ostalog, uloga u sinapsama, uloga u sklopu imunološkog sustava i aktivnost u procesima endocitoze. Problem sa svim hipotezama, koje opisuju moguću ulogu PrP<sup>C</sup> proteina, je da još niti jedno istraživanje nije iznjedrilo čvrste, nepobitne dokaze te da je, usprkos mnogim istraživanjima, funkcija PrP<sup>C</sup> proteina u najmanju ruku i dalje zagonetna. Jedino preostaje nadati se i iščekivati da će buduća istraživanja doprinijeti revolucionarnim otkrićima zbog kojih će se moći odrediti funkcija PrP<sup>C</sup> proteina.<sup>2,3,4</sup>

### 2.1.5. Toksičnost PrP<sup>C</sup> proteina

Na početku istraživanja prionskih bolesti postavljene su dvije generalne pretpostavke o mogućem uzroku toksičnosti. Prema jednoj uzrok bi mogao biti gubitak funkcije normalnog PrP<sup>C</sup> proteina koji se zbog pogrešnog smatanja pretvara u PrP<sup>Sc</sup> protein čije je nastajanje karakteristično za obolijevanje prionskim bolestima. Prema drugoj pretpostavci uzrok je samo nastajanje PrP<sup>Sc</sup> proteina i njegovo daljnje agregiranje. Istraživanja na miševima bez PrP<sup>C</sup> proteina pokazala su da organizmi mogu normalno funkcionirati bez tog proteina te da ujedno ne podliježu zarazi prionskim bolestima i stvaranju PrP<sup>Sc</sup> proteina. Izrezivanjem PRNP gena, pa tako i prestankom sinteze PrP<sup>C</sup> proteina kod miševa oboljelih od prionskih bolesti, koji su već sadržavali veće količine PrP<sup>Sc</sup> proteina, došlo je do prestanka razvijanja simptoma i propadanja živčanih stanica - iz toga se može pretpostaviti da je zdravi PrP<sup>C</sup> protein igra ključnu ulogu u procesu toksičnosti prionskih bolesti. Navodni toksični utjecaj PrP<sup>Sc</sup> proteina nadalje je ispitivan tako da su se tkiva s pretjerano eksprimiranim PrP<sup>C</sup> ubacivala u miševe koji nemaju PrP<sup>C</sup> protein i koje su potom zarazili. Dobiveni rezultati pokazali su da su elementi prionskih bolesti prisutni najvećim dijelom u ubačenom tkivu, a ne i na stanicama domaćina, kod kojih su potvrđeno postojanje akumuliranih količina PrP<sup>Sc</sup> proteina u mozgu. Iz niza eksperimenata sličnih rezultata zaključilo se da sam PrP<sup>Sc</sup> protein nije zaslužan za toksičnost.

Nakon analize zaključaka provedenih eksperimenata u obzir su uzeti druga moguća tumačenja uzroka toksičnosti, iako se još čeka konačna potvrda neke od tih teorija. Prvo tumačenje govori da novonastali PrP<sup>Sc</sup> protein, dobiven pogrešnim smatanjem PrP<sup>C</sup> proteina, međudjeluje s PrP<sup>C</sup> proteinom mijenjajući njegovu funkciju i uzrokujući toksičnost. Takvo tumačenje ukazuje na to da je nužna prisutnost PrP<sup>C</sup> proteina u organizmu. Provođeni su eksperimenti u kojima je količina PrP<sup>C</sup> proteina u organizmima mijenjana, a količina nastalog PrP<sup>Sc</sup> proteina bila je jednaka u svim jedinkama. Simptomi su nastupali različito brzo, ovisno o ishodišnim količinama PrP<sup>C</sup> proteina. Iz ovoga se može zaključiti da je normalni PrP<sup>C</sup> protein važan čimbenik u formiranju prionskih bolesti o čemu se govori u drugom tumačenju prema kojem tijekom pogrešnog smatanja PrP<sup>C</sup> nastaje intermedijer, uzročnik toksičnosti. Zbog različitih eksperimentalno opaženih funkcija PrP<sup>C</sup> proteina, koje imaju zaštitnu ulogu, sumnja se da toksičnost možda potječe zbog signalnog puta koji nastaje interakcijom PrP<sup>Sc</sup> proteina s promijenjenim PrP<sup>C</sup> proteinom. Provedeni su eksperimenti na miševima s modificiranim PRNP genom na takav način da dođe do sinteze PrP<sup>C</sup> proteina bez GPI, koji



služi kao svojevrsno sidro. Ustanovljeno je da kod tih miševa nastaju oštećenja moždanog tkiva koja su uzrokovana amiloidima, ali ne i nužno simptomi koji bi potvrđivali postojanje prionskih bolesti. Ukoliko se uz sintezu PrP<sup>C</sup> proteina bez GPI dodatno potakne sinteza PrP<sup>C</sup> proteina doći će do nastajanja neurodegenerativnih oštećenja koja su karakteristična za obolijevanje prionskim bolestima.<sup>3</sup>

### 2.1.6. Interakcija PrP<sup>C</sup> proteina s ostalim proteinima

Uloga koja se često pripisuje PrP<sup>C</sup> proteinu, sudjelovanje je u biosignalizaciji, među ostalim zbog toga što proteini, koji, kao i PrP<sup>C</sup> protein, sadrže GPI sidro u svojoj strukturi, imaju slične funkcije. Nagada se da je neka vrsta interakcije, vezanja PrP<sup>C</sup> proteina s drugim proteinima u signalnom putu, ključna za pravilnu provedbu signala u organizmima. Ako dolazi do pogrešnog smatanja PrP<sup>C</sup> proteina, može doći do drugačijih interakcija s tim proteinima, odnosno izmijenjenog i nepravilnog signalnog puta koji za posljedicu ima toksičnost i pojavu simptoma oboljenja prionskih bolesti. Do danas je otkriven čitav niz proteina s kojima se može vezati PrP<sup>C</sup> protein koji nisu nužno smješteni u jednom dijelu stanice, nego mogu biti primjerice smješteni u citoplazmi ili u membrani. Također mogu imati različite funkcije, što govori o afinitetu PrP<sup>C</sup> proteina prema ostalim proteinima. Mjesta vezanja mnogih proteina-partnera na PrP<sup>C</sup> proteinu još nisu određena isto kao ni funkcija samih proteina, što određivanje funkcije PrP<sup>C</sup> proteina te tijekom i razumijevanje mogućeg signalnog puta čini nemogućim. Osim što se vežu sa zdravim proteinima, za PrP<sup>C</sup> i PrP<sup>Sc</sup> proteine mogu se vezati i različiti proteinski agregati (amiloidi) u organizmu. Takvo vezanje može biti toksično, kao što je primjerice slučaj kod vezanja agregata zaslužnih za Alzheimerovu bolest, tzv. A $\beta$  agregata.<sup>2,4</sup>

## 2.2. Prionske bolesti

### 2.2.1. Uvod u prionske bolesti

Prionske bolesti su bolesti čiji su uzročnici prioni i one su još uvijek smrtonosne. Drugi naziv za prionske bolesti su prenosive spongiformne encefalopatije. Ističu se u akumulaciji PrP<sup>Sc</sup> proteina u mozgu, a glavni simptomi oboljenja prionskim bolestima vidljivi su u različitim napadajima, gubitku pamćenja, psihozi, propadanju živčanih tkiva i mnogim drugim teškim poremećajima. Prionske bolesti su zarazne bolesti te ih se može podijeliti u tri kategorije: sporadične, genetske i stečene. Većina ljudi obolijeva od sporadičnog oblika, dok manji broj obolijeva od genetskog i stečenog oblika. Prionske bolesti jako su rijetke bolesti, a najčešća

prionska bolest je Creutzfeldt-Jakobova bolest, koja se ovisno o načinu dobivanja može podijeliti na više vrsta. U ostale učestale prionske bolesti ubrajaju se: Fatalna obiteljska nesanica (FFI), Gerstmann-Sträussler-Scheinkerov sindrom (GSS) i Kuru.<sup>2,4,5</sup>

Tablica 2.2.1. Najpoznatije ljudske i životinjske prionske bolesti. je preuzeta i prilagođena prema: J. W. Ironside, D. L. Ritchie, M. W. Head, *Handb. Clin. Neurol.* **145** (2017) 393-403.

### Prionske bolesti kod životinja i ljudi

| Prionske bolesti kod životinja | Prionske bolesti kod ljudi                          |
|--------------------------------|---|
| Skrepi                         | Creutzfeldt-Jakobova bolest (CJD)                   |
| Nor98 skrepi                   | Sporadična CJD                                      |
| Kronična bolest propadanja     | Genetska CJD  |
| Kravlje ludilo (BSE)           | Ijatrogenična CJD                                   |
| Klasična BSE                   | Varijantna CJD                                      |
| Atipična BSE                   | Fatalna obiteljska nesanica (FFI)                   |
|                                | Gerstmann-Sträussler-Scheinkerov sindrom (GSS)      |
|                                | Cerebralna amiloidna angiopatija prionskog proteina |
|                                | Varijabilna proteazno osjetljiva prionopatija       |

#### 2.2.2. Sporadična Creutzfeldt-Jakobova bolest (sCJD)

Sporadičnom Creutzfeldt-Jakobovom bolesti uglavnom oboljevaju ljudi zrele dobi, a uzrok oboljenja zasad nije poznat. Smatra se da dolazi do spontanog oboljenja ili do određenih mutacija, iako to nije potvrđeno. Kad bi vrijedilo da je nastanak bolesti spontan, logično bi bilo da konstantnim produljenjem životnog vijeka ljudi dolazi do većeg broja oboljenja, iako to zasad nije zabilježeno. Period inkubacije je dug, a većina pacijenata umre relativno brzo nakon što se pojave prvi simptomi. Bolest je rijetka pa je njezino proučavanje i eventualno eksperimentalno liječenje dodatno otežano.<sup>2,4,5</sup>

### 2.2.3. Varijantna Creutzfeldt-Jakobova bolest (vCJD)

Varijantna Creutzfeldt-Jakobova bolest blisko je povezana s kravljim ludilom, prionskom bolešću koja napada krave. Brojni dokazi govore da je vCJD nastala tako da su se ljudi zarazili prionima, uzročnicima kravljeg ludila, iako ni to još nije u potpunosti potvrđeno. Bolest je najviše ljudi usmrtila u Ujedinjenom Kraljevstvu, a isto tako je potvrđeno nekoliko slučajeva zaraza putem transfuzije krvi. Glavna razlika između varijantne Creutzfeldt-Jakobove bolesti i ostalih vrsta Creutzfeldt-Jakobove bolesti je ta što se prva pojava simptoma oboljenja događa u ranijoj dobi nego kod ostalih CJD te je trajanje bolesti duže. Predviđa se da će porasti broj oboljelih od varijantne Creutzfeldt-Jakobove bolesti zbog relativno dugog vremena inkubacije i mogućnosti zaraze od ljudi kod kojih još nisu nastupili simptomi zaraze, kao što je na primjer zaraza putem transfuzije krvi. Međutim valja napomenuti da se po mnogo čemu razlikuje način zaraze od strane ljudi i zaraze od strane krava.<sup>2,4,5</sup>

### 2.2.4. Iatrogenična Creutzfeldt-Jakobova bolest (iCJD)

Iatrogenične prionske bolesti su one koje se slučajno prenose na osobu putem različitih medicinskih zahvata. Najčešći zahvati prilikom kojih dolazi do zaraze iCJD su različite transplantacije, posebice transplantacija rožnice od pacijenata oboljelih od sporadične Creutzfeldt-Jakobove bolesti, doniranjem hormona rasta od strane oboljelih donora ili pak zbog kontaminirane laboratorijske opreme. Simptomi obolijevanja od iCJD ovise o načinu zaraze, a uključuju simptome slične sporadičnoj Creutzfeldt-Jakobovoj bolesti. Suprotno tome kod oboljelih putem zaraženog hormona rasta zabilježeni su simptomi koji se očituju u raznim cerebralnim degeneracijama.<sup>2,4,5</sup>

### 2.2.5. Genetska Creutzfeldt-Jakobova bolest (gCJD)

Genetska Creutzfeldt-Jakobova bolest (gCJD) spada u skupinu genetskih prionskih bolesti, nasljednih bolesti koje se uglavnom ističu određenom mutacijom gena za sintezu prionskog proteina, PRNP gena. Takve bolesti su dominantne autosomalne bolesti (mutacija se događa na tjelesnom kromosomu). Postoji više mjesta na PRNP genu na kojima može doći do mutacija, a najčešće su točkaste mutacije (zamjena samo jednog nukleotida u polinukleotidnom lancu) oko regije između druge i treće  $\alpha$ -zavojnice koja se nalazi u C-domeni zdravog PrP<sup>C</sup> proteina. Mutacije se također mogu dogoditi insercijom (ubacivanjem jednog ili više nukleotidnih parova u polinukleotidni lanac) u području regija u kojima se ponavljaju oktapeptidi u N-domeni pa čak i na N-terminusu. Simptomi variraju i ovise o

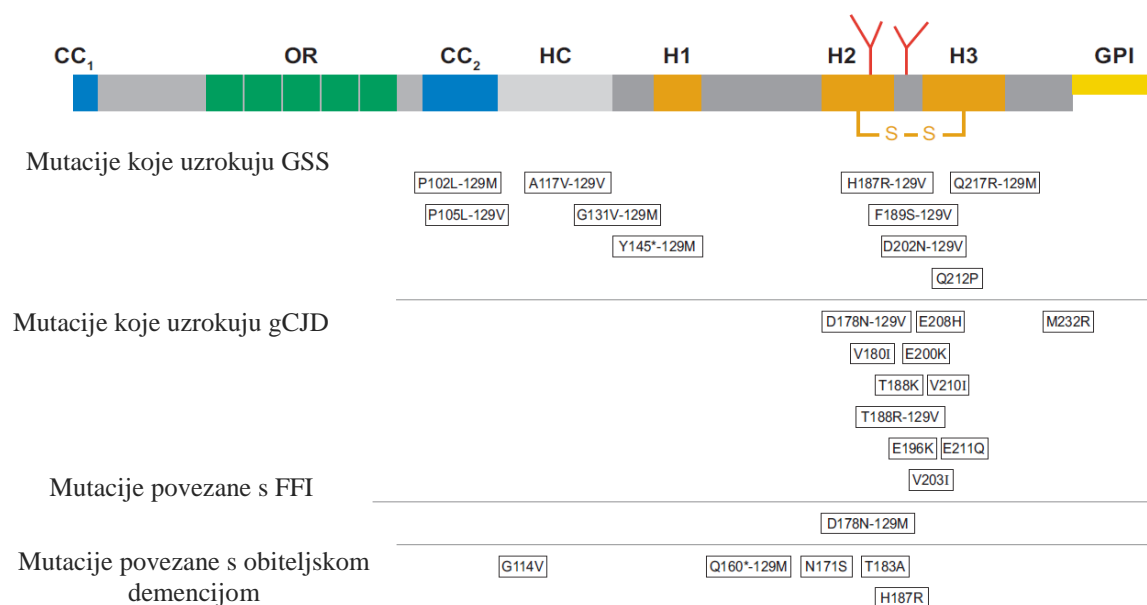
težini mutacija, a u osnovi su slični simptomima obolijevanja sporadičnom Creutzfeldt-Jakobovom bolešću. Naspram ostalih CJD, genetička Creutzfeldt-Jakobova bolest je rijetka bolest, kod koje se prvi simptomi gotovo uvijek javljaju u srednjoj životnoj dobi.<sup>2,4,5</sup>

#### 2.2.6. *Gerstmann-Sträussler-Scheinker sindrom (GSS)*

Gerstmann-Sträussler-Scheinkerov sindrom spada u prionske bolesti, točnije rečeno, u genetske prionske bolesti zbog mogućnosti nasljeđivanja. Kao i sve prionske bolesti, GSS je zarazna bolest, makar je vjerojatnost zaraze relativno niska te se samo za GSS karakteristične mutacije mogu prenijeti tako da uzrokuju nastajanje simptoma i formiranje bolesti. Isto kao gCJD, GSS je nasljedna dominantna autosomalna bolest koja je karakterizirana različitim mutacijama na PRNP genu. Mutacije se događaju na sličnim mjestima kao i kod gCJD, ali još dodatno može doći do mutacija oko hidrofobne regije koja se nalazi u neuređenoj N-domeni i kod prve  $\alpha$ -zavojnice koja se nalazi u C-domeni. Najčešća mutacija koja se povezuje s GSS je supstitucija prolina za leucin na 102. kodonu. Gerstmann-Sträussler-Scheinkerov sindrom rijetka je prionska bolest čiji su glavni simptomi progresivni gubitak koordinacije i kontrole nad mišićima i gubitak pamćenja. Ovi simptomi dolaze do izražaja kroz relativno dug period koji uvijek završava smrću pacijenta.<sup>1,2,4,5</sup>

#### 2.2.7. *Fatalna obiteljska nesanica (FFI)*

Fatalna obiteljska nesanica iznimno je rijetka genetska prionska bolest koja je prvi put zabilježena u dvadesetom stoljeću u Italiji. Eksperimentima na miševima utvrđeno je da je zarazna i da nastaje mutacijama u C-domeni PrP<sup>C</sup> proteina zamjenom aspartata za asparagin na 178. i aspartata za metionin na 129. aminokiselini. Karakteriziraju ju simptomi koji su povezani s kontrolom ritma sna. Osim genetske vrste opisana je i sporadična fatalna obiteljska nesanica. Kod pacijenata oboljelih od te vrste FFI nisu pronađene mutacije na PRNP genu, već dolazi do zasad "slučajnog" oboljenja čiji mehanizam još nije utvrđen.<sup>1,2,4,5</sup>



Slika 2.2.7. Najčešća mjesta mutacija na PRNP genu koje uzrokuju prionske bolesti.

Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema: A. Aguzzi, F. Baumann, J. Bremer, *Annu. Rev. Neurosci.* **31** (2008) 439-477.

### 2.2.8. Kuru

Kuru je bolest koja se prvo pojavila na Papui Novoj Gvineji u izoliranim plemenima. Bolest se proširila do razine epidemije zbog toga što su u tim plemenima postojali obredi s elementima kanibalizma te se tako bolest uspješno prenosila. Simptomi obolijevanja od bolesti uključuju propadanje mišića što se očituje u za Kuru karakterističnoj drhtavici. Nakon što se prestalo konzumirati ljudsko meso u obredima, došlo je do postupnog nestajanja i iskorjenjivanja bolesti. Kasnije se eksperimentalno na primatima dokazalo da je bolest zarazna i da spada u skupinu prionskih bolesti sa svojstvima sličnim skrepi bolesti ovaca.<sup>2,4,5</sup>

### 2.2.9. Liječenje prionskih bolesti

Zasad za prionske bolesti ne postoji lijek. One su još uvijek smrtonosne, a trenutno se provode mnoga istraživanja koja bi mogla rezultirati stvaranjem efektivnog lijeka. Prilikom razvoja lijeka javljaju se brojni problemi, a jedan od glavnih problema je taj da potencijalni lijekovi efektivni *in vitro*, gotovo da i nemaju značaja u *in vivo* eksperimentima. Djelovanje eksperimentalnih lijekova uglavnom je usmjereno na nekoliko karakterističnih procesa koji pokušavaju eliminirati napredovanje prionskih bolesti. Ovdje se ubraja: sprječavanje replikacije priona, razvijanje imunog sustava domaćina, eliminacija PrP<sup>Sc</sup> ili sprječavanje

konverzije PrP<sup>C</sup> u PrP<sup>Sc</sup>. Nijedna od navedenih metoda nije se pokazala uspješnom niti je dala obećavajuće rezultate pa predstoje još mnogi znanstveni podvizi s ciljem pronalaska uspješnog lijeka i metode liječenja prionskih bolesti.<sup>4</sup>

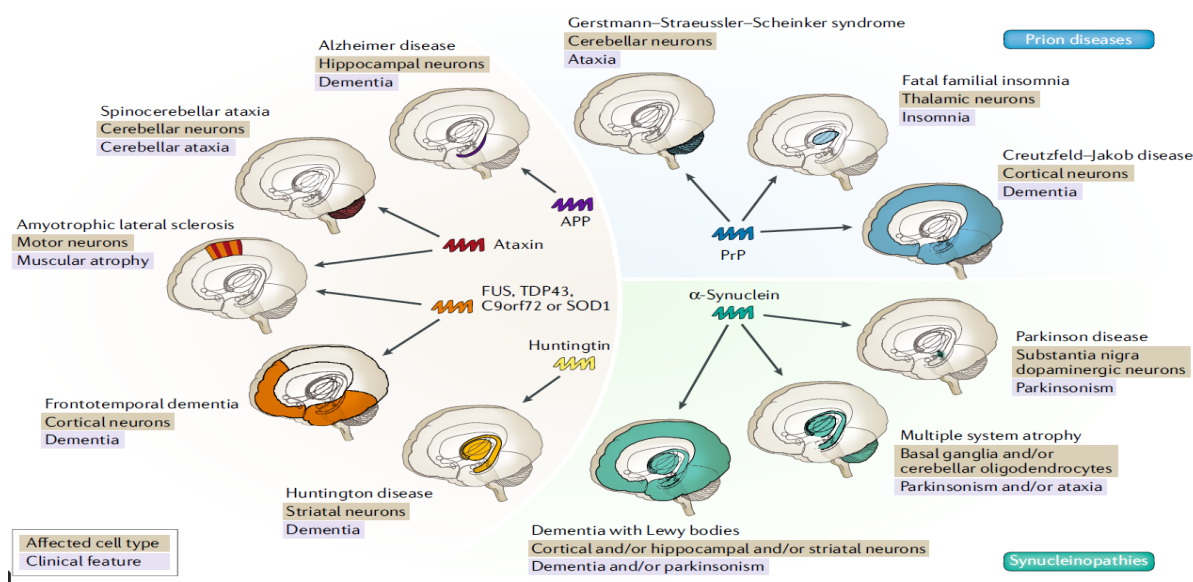
## 2.3. Usporedba prionskih bolesti s ostalim amiloidnim bolestima

### 2.3.1. Općenito o amiloidima

Amiloidoza je naziv za skupinu bolesti koje se povezuju s nastajanjem i agregacijom pogrešno smotanih proteina. Ti agregati se nazivaju amiloidi i za njih je karakteristično da su izdužene, nerazgranate strukture i imaju veliki udio  $\beta$ -nabranih ploča. Osim patogenih amiloida u organizmima postoje i amiloidi koji su funkcionalni te vrše određenu korisnu zadaću za organizam. Neki od najpoznatijih amiloida su: PMEL (*premelanosome protein*), integralni membranski glikoprotein koji pripomaže u biosintezi melanina, CBEP3 (*cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3*) koji veže RNA i služi u procesu poliadeniliranja te nekoliko polipeptida koji se nalaze u sjemenu. Glavna razlika između patogenih i funkcionalnih amiloida je u tome što je formiranje funkcionalnih amiloida posebno regulirano i kontrolirano ne bi li se minimalizirao rizik od razvijanja patogenih amiloida. Kao i kod prionskih bolesti zasad nije poznat pravi uzrok i mehanizam toksičnosti amiloida, a postoje dva glavna objašnjenja koja se međusobno ne isključuju. Smatra se da do razvoja toksičnosti dolazi ili zbog djelovanja novonastalih amiloida agregiranjem ili zbog gubitka pojedinačnih funkcija proteina koji mijenjaju strukturu prilikom procesa agregiranja. Rezultati najnovijih eksperimenata sugeriraju da su amiloidi ipak ti koji su toksični, iako se na konačnu potvrdu još čeka.

Patogeni amiloidi uglavnom su karakteristični za različite neurodegenerativne bolesti koje su smrtonosne. Mogu se prenositi među stanicama oboljelog organizma, ali same po sebi nisu zarazne, odnosno ne mogu se prenositi među različitim organizmima što je najvažnija razlika između prionskih i bolesti uzrokovanih pogrešno smotanim proteinima. Najpoznatije takve bolesti su: Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, Huntingtonova bolest, Amfiotropična lateralna skleroza (ALS), Pickova bolest. One su povezane s nastajanjem amiloida iz različitih proteina, a pri tome je za Alzheimerovu bolest karakteristično stvaranje amiloida iz čak dva različita proteina. Osim kod neurodegenerativnih bolesti amiloidi se povezuju s cijelim nizom različitih bolesti od kojih je najpoznatiji dijabetes tip 2. Kod istog najčešće dolazi do tvorbe amiloidnih struktura iz proteina amilina koji se skuplja u gušterači. Način stvaranja amiloidnih struktura nije u potpunosti poznat, a smatra se da postoje dva

mehanizma. Shodno prvom mehanizmu dolazi do disocijacije različitih oligomernih proteina prilikom čega novonastali monomeri djeluju kao osnove iz kojih se stvaraju amiloidna vlakna. U drugom mehanizmu ističe se da su funkcionalni monomeri u ravnoteži s denaturiranim monomerima koji dodatnim strukturnim promjenama i agregiranjem stvaraju amiloidna vlakna i tako pomiču ravnotežu. Sam mehanizam na temelju kojeg će doći do stvaranja amiloida ovisi o proteinu. Organizmi također imaju mogućnost razgradnje oštećenih i pogrešno smotanih proteina, pa tako i amiloida, pomoću autofaga kojima chaperoni donose proteine za razgradnju. Osim pomoću autofaga, proteini koji se trebaju razgraditi mogu doći do proteasoma gdje se ubikvinacijom razgrađuju. Kod neurodegenerativnih amiloidnih bolesti česta su oštećenja koja rezultiraju smanjenom aktivnošću proteasoma, čija je posljedica nepotpuna razgradnja pogrešno smotanih proteina.<sup>7,8</sup>



Slika 2.3.1. Vrste amiloidoza i prionskih bolesti, s prikazom zahvaćenih regija mozga, proteinskih uzročnika i simptomima. Ilustracija preuzeta i prilagođena prema: C. Schenkel, A. Aguzzi, *Nature Reviews Genetics* **19** (2018) 405-419

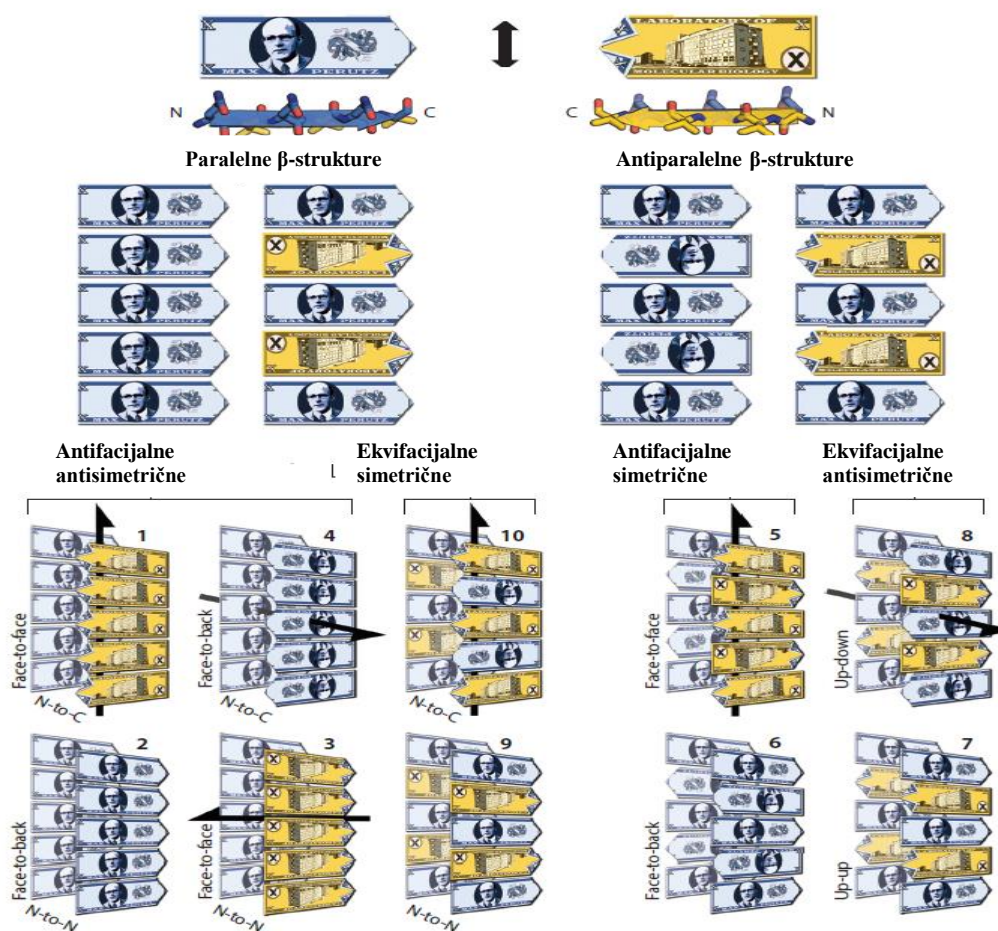
### 2.3.2. Struktura amiloida

Amiloidi su izrazito čvrste, nerazgranate strukture visokog stupnja uređenosti. Nastaju tako da su prilikom pogrešnog ili nepotpunog smatanja proteina neke regije, kao primjerice  $\beta$ -nabrane strukture, drugačije prostorne orijentacije od one u nativnoj konformaciji funkcionalnog proteina. Zbog toga što se ne nalaze u njima nativnoj prostornoj orijentaciji dolazi do drugačijih interakcija između tih proteina i time do agregiranja i stvaranja amiloida. U

amiloidima dolazi do spajanja preko  $\beta$ -nabranih struktura koje sadrže aminokiseline s aromatskim bočnim ogrankom i slaganjem tako spojenih  $\beta$ -nabranih struktura u, za amiloide karakteristični, cross- $\beta$  uzorak. Ostali dijelovi proteina koji tvore amiloide, a ne sudjeluju u direktnom vezanju, smješteni su okomito na smjer prostiranja amiloidnih vlakana. Vodikove veze drže lance  $\beta$ -nabrane strukture povezanim, dok njihova jakost ovisi o tome jesu li te  $\beta$ -nabrane strukture, koje sačinjavaju amiloidna vlakna, paralelne ili antiparalelne. Struktura amiloida okarakterizirana je raznim metodama od kojih su najkorisnije bile difrakcija rendgenskog zračenja, nuklearna magnetska rezonancija te krio-mikroskopija koja sve više ulazi u sferu proučavanja strukture amiloida. Sama čvrstoća amiloida proizlazi iz njihove strukture dvostruke  $\beta$ -nabrane ploče, budući da su takve strukture osim vodikovim vezama dodatno stabilizirane Van der Waalsovima interakcijama i entropijskim doprinosom. On je izražen po tome što prilikom agregacije i stvaranja takvih struktura dolazi do otpuštanja molekula vode koje okružuju još neagregirane osnove amiloida te tako dolazi do smanjenja stupnja uređenosti, odnosno povećanja ukupne entropije sustava.

Struktura amiloida može biti različita, a karakterizira ju postojanje simetrije. Beta nabrane ploče mogu biti paralelne ili antiparalelne. U paralelnim  $\beta$ -nabranim pločama lanci su istog smjera i vodikove veze između lanaca su slabije, dok su kod antiparalelnih  $\beta$ -nabranih ploča lanci suprotnih smjerova tvoreći jače vodikove veze. Nadalje postoji još jedna vrsta podjele  $\beta$ -nabranih ploča i to na ekvifacijalne i antifacijalne. U ekvifacijalnim pločama bočni su ogranci svakog lanca raspodijeljeni na obje strane  $\beta$ -nabrane ploče, dok su u antifacijalnim pločama parni bočni ogranci okrenuti na jednu, a neparni na drugu stranu. Iz tih dviju podjela proizlazi da amiloidi mogu poprimati deset različitih struktura.<sup>8</sup>



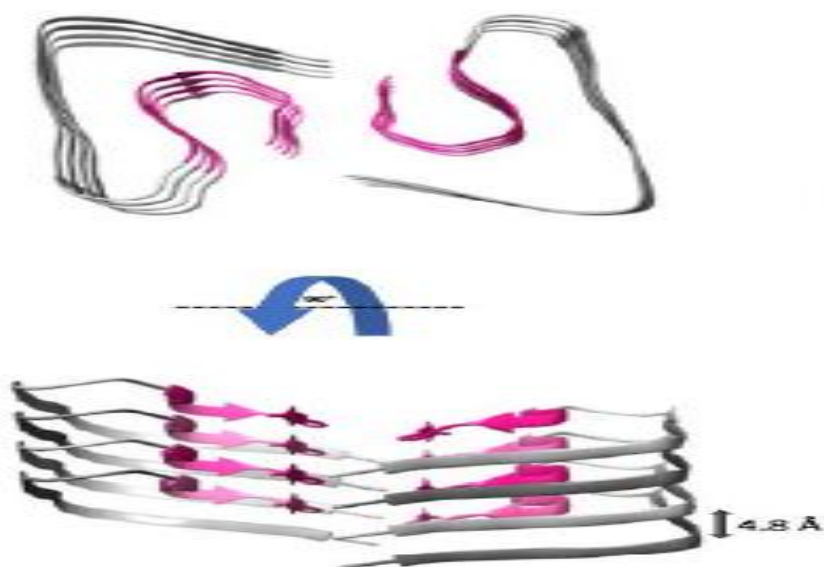


Slika 2.3.2. Deset različitih mogućih struktura koje proizlaze iz simetrije amiloida ilustrirane novčanicom. Ilustracija preuzeta i prilagođena prema: D. S. Eisenberg, M. R. Sawaya, *Annu. Rev. Biochem.* (2017) 69-95.

### 2.3.3. $\beta$ -amiloidi

Karakteristika Alzheimerove bolesti je nastajanje plakova na moždanom tkivu koji se sastoje od različitih polipeptida naziva  $\beta$ -amiloidi ( $A\beta$ ). Takvi polipeptidi sastoje se od 38 do 43 aminokiselina i nastaju djelovanjem proteolitičkih enzima na amiloidni prekursor protein (APP). Glavni enzimi koji djeluju su  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -sekretaze. Djelovanjem  $\alpha$  i  $\gamma$  sekretaze dolazi do normalnog cijepanja APP na dvije podjedinice, dok cijepanjem  $\beta$ -sekretazom nastaju amiloidi povezani s Alzheimerovom bolesti. Takvi amiloidi imaju mogućnost agregacije te tako tvore amiloidne niti. Postoji nekoliko vrsta  $A\beta$  amiloida, a najviše proučavani su  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ ,  $A\beta_{43}$ . Smatra se da je  $A\beta_{42}$  toksičniji od  $A\beta_{40}$ , dok je istraživanjima pokazano da je  $A\beta_{43}$  najotrovniji. Isti amiloidi mogu tvoriti polimorfe – različite strukture koje odgovaraju istom polipeptidnom lancu. Zasad su nuklearnom magnetskom rezonancijom utvrđene tri različite

strukture A $\beta$ 40 amiloida koje nastaju ovisno o uvjetima u kojima se nalaze. U svim trima strukturama monomere čine međusobno povezane paralelne  $\beta$ -nabrane strukture. Glavna razlika prve i druge strukture je ta da se prva struktura sastoji od dva monomera, dok se druga struktura sastoji od tri. Treća struktura je specifična zbog toga što poprima drugačiji prostorni izgled, a njezino nastajanje povezuje se s mutacijom zbog koje dolazi do uranjenog pojavljivanja prvih simptoma Alzheimerove bolesti.



Slika 2.3.3 Struktura A $\beta$ 42 dobivena krio-mikroskopijom. Ilustracija preuzeta i prilagođena prema: J. M. Flores- Fernandez, V. Rathod, H, Wille, *Pathogens*

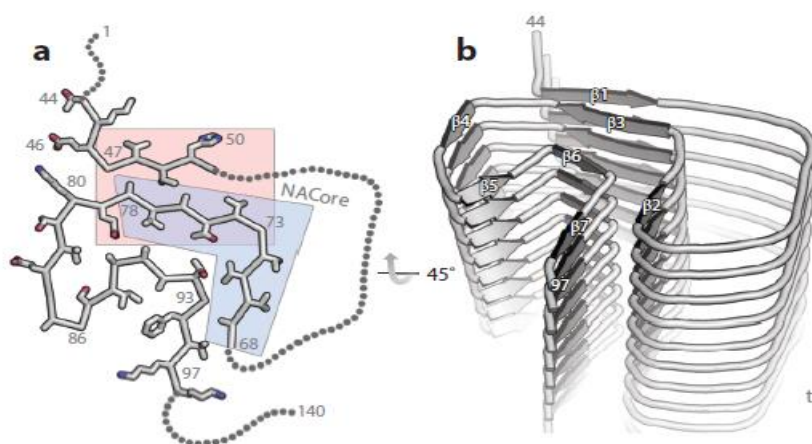
Zbog dvije dodatne aminokiseline na C-terminusu, izoleucina i alanina, smatra se da je A $\beta$ 42 toksičniji od A $\beta$ 40 jer su to aminokiseline s alifatskim bočnim ograncima koje pripomažu i ubrzavaju agregaciju. Osnovicu strukture amiloidnih vlakana čine dvije molekule A $\beta$ 42 čiji izgled asocira na dvostruku potkovu. Struktura je dodatno učvršćena vodikovim vezama između i u samim molekulama. Zasad su određena dva polimorfa A $\beta$ 42.

Danas se proučava postoji li mogućnost da Alzheimerova bolest posjeduje karakteristike prionskih bolesti, odnosno mogućnost prenošenja. Istraživanja na oboljelima od ijtrogenične Creutzfeldt-Jakobove bolesti, dobivene transfuzijom hormona rasta, pokazala su postojanje A $\beta$  amiloida, iz čega je proizašla sumnja da postoji mogućnost prenošenja Alzheimerove bolesti na sličan način kao i ijtrogenične Creutzfeldt-Jakobove bolesti. Također je dokazano da ubacivanje A $\beta$  agregata u miševu u kojima je eksprimiran APP uzrokuje povećano nastajanje A $\beta$  agregata pogrešnim smatanjem. Razlika između zaraze prionskim bolestima i zaraze Alzheimerovom bolešću je u tome da prilikom zaraze

Alzheimerovom bolešću APP mora biti eksprimiran da bi došlo do nastajanja A $\beta$ , dok kod prionskih bolesti PRNP ne treba biti eksprimiran. Još nema potvrde može li se Alzheimerova bolest prenositi, a kada bi se našla potvrda Alzheimerova bolest mogla bi se smatrati prionskom bolešću.<sup>6,7,8,10</sup>

#### 2.3.4. $\alpha$ -sinuklein

Kod pacijenata oboljelih od Parkinsonove bolesti određeno je postojanje proteinskih agregata koji su nazvani Lewyjeva tijela. Glavna sastavnica tih agregata je citosolni protein  $\alpha$ -sinuklein koji se najvećim dijelom nalazi u mozgu. Lewyjeva tijela akumuliraju se u mozgu, posebice u srednjem mozgu i moždanoj kori te su toksični, ali se ne smatraju najtoksičnijim oblikom  $\alpha$ -sinukleina. Simptomi oboljenja Parkinsonov bolešću su smetnje u kretanju, drhtanje, demencija, ukočenosti mnogi drugi koji se javljaju u kasnijim godinama života, a simptomi i dob u kojoj se pojavljuje Parkinsonova bolest variraju. Mutacije u genu koji kodira  $\alpha$ -sinuklein, SNCA, mogu uzrokovati ranije pojavljivanje simptoma Parkinsonove bolesti tako da te mutacije uzrokuju bržu agregaciju  $\alpha$ -sinukleina i nastajanje toksičnih oligomera. Funkcija  $\alpha$ -sinukleina nije još poznata, a nagađa se da sudjeluje u prijenosu signala između neurona te da je kritičan za normalnu sinaptičku aktivnost i kognitivne sposobnosti.



Slika 2.3.4. Struktura NAC segmenta  $\alpha$ -sinukleina koji sadrži sedam  $\beta$ -lanaca. Ilustracija preuzeta i prilagođena prema: D. S. Eisenberg, M. R. Sawaya, *Annu. Rev. Biochem.* (2017) 69-95.

U nativnoj konformaciji  $\alpha$ -sinuklein je neuređeni, nestrukturirani protein koji se sastoji od 150 aminokiselina. Informacije o njegovoj strukturi većinom su dobivene spektroskopijom

nuklearne magnetske rezonancije i difrakcijom rendgenskog zračenja pomoću kojih je određeno da se njegova struktura sastoji od tri domene. Prva domena je N-terminalna domena koja čini segment od prve do šezdesete aminokiseline i u njoj se nalazi  $\alpha$ -zavojnica s mogućnosti vezanja fosfolipida. Središnja domena, NAC domena, prostire se od šezdeset prve do devedeset pete aminokiseline, koja je najzanimljivija, jer u toj domeni dolazi do procesa agregacije. U sastav treće C-terminalne domene ulaze četrdeset i četiri aminokiseline, od devedeset i šeste do sto i četrdesete. Proučavanjem struktura amiloidnih vlakana, koja se formiraju agregacijom  $\alpha$ -sinukleina, određen je segment koji se sastoji od četrdeset i četvrte do devedeset i sedme aminokiseline. Segment se sastoji od sedam lanaca iz kojih daljnjim agregiranjem nastaju paralelne  $\beta$ -nabrane strukture amiloidnog vlakna u nastajanju (Slika 2.3.4.).

Zasad još nema pravih dokaza da se Parkinsonova bolest, odnosno  $\alpha$ -sinuklein, ponaša kao prionska bolest i nije zabilježena nijedna zaraza Parkinsonovom bolesti na bilo kakav način.<sup>6,7,8,9,10</sup>

## § 3. ZAKLJUČAK

Iako se prionske bolesti i prioni proučavaju već gotovo četiri desetljeća još nema pravih pomaka koji bi mogli rezultirati boljim shvaćanjem i razumijevanjem priona. Sama funkcija zdravog PrP<sup>C</sup> proteina u organizmima je nepoznata, kao i način nastajanja PrP<sup>Sc</sup> proteina i mehanizmi koji uzrokuju toksičnost. Tijekom godina istraživanja razvijane su mnoge teorije i pretpostavke o funkciji PrP<sup>C</sup> proteina, ali niti jedna još nije potvrđena. Prionski protein je zasada jedini protein čijim krivim smatanjem mogu nastati zarazne, prionske bolesti. Iz toga se može zaključiti da su prionske bolesti jedine dosad zabilježene zarazne bolesti s proteinskim uzročnikom.

Unatoč tome što su rijetke, prionske bolesti su teške, neizlječive bolesti, a smatra se da će se u budućnosti broj oboljelih prionskim bolestima povećati. Zato je određivanje funkcije PrP<sup>C</sup> proteina presudno za utvrđivanje procesa vezanih uz nastajanje prionskih bolesti i za razvijanje metoda liječenja prionskih bolesti. Također bi se određivanjem funkcije PrP<sup>C</sup> proteina mogao dobiti kvalitetan uvid u razvoj živih bića na Zemlji jer je PRNP gen, gen koji kodira PrP<sup>C</sup> protein, iznimno dobro očuvan u svim živim bićima. Jedino što trenutno preostaje je nadati se da će neka od mnogih sadašnjih istraživanja priona i prionskih bolesti uroditi plodom i dati odgovore na neka od mnogih otvorenih pitanja u vezi priona.

## § 4. LITERATURNI IZVORI

- 1 C. Schenkel, A. Aguzzi, *Nature Reviews Genetics* **19** (2018) 405-419.
- 2 A. Aguzzi, F. Baumann, J. Bremer, *Annu. Rev. Neurosci.* **31** (2008) 439-477.
- 3 J. C. Watts, M. E. C. Bourkas, H. Arshad, *Acta Neuropathol.* **135** (2018) 159-178.
- 4 A. Aguzzi, A. M. Calella, *Physiol. Rev.* **89** (2009) 1105-1152.
- 5 J. W. Ironside, D. L. Ritchie, M. W. Head, *Handb. Clin. Neurol.* **145** (2017) 393-403.
- 6 J. M. Flores- Fernandez, V. Rathod, H. Wille, *Pathogens*
- 7 E. Chuang, A. M. Hori, C. D. Hesketh, J. Shorter, *J. Cell Sci.* **131** (2018)
- 8 D. S. Eisenberg, M. R. Sawaya, *Annu. Rev. Biochem.* (2017) 69-95.
- 9 J. A. Steiner, E. Quansah, P. Brundin, *Cell Tissue Res.* **373** (2018) 161-173.
- 10 A. Aguzzi, A. K. K. Lakkaraju, *Trends Cell Biol.* **26** (2016)
- 11 D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Sedmo izdanje, W. H. Freeman and Company, New York, 2017, str. 147-151.