Uloga proteina toplinskog stresa u nastanku, razvoju i terapiji neurodegenerativnih bolesti

Žurić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:851777

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Iva Žurić

Uloga proteina toplinskog stresa u nastanku, razvoju i terapiji neurodegenerativnih bolesti

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na predmetu Biokemija Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Karmeli Barišić na pomoći pri izradi ovoga diplomskoga rada. Također hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci.

POPIS KRATICA

AD - Alzheimerova bolest (*engl.* Alzheimer's disease)

ADP - adenozin-difosfat (*engl*. adenosine-diphosphate)

ALS – amiotrofična lateralna skleroza (*engl.* amyotrophic lateral sclerosis)

APC – stanica koja predstavlja antigen (*engl.* antigen-presenting cell)

APP – amiloidni prekursorski protein (*engl.* amyloid precursor protein)

ATP – adenozin-trifosfat (*engl.* adenosine-triphosphate)

BDNF – neurotrofni faktor porijeklom iz mozga (*engl.* brain-derived neurotrophic factor)

CHIP – karboksilni kraj proteina koji je u interakciji s Hsc70 (*engl.* carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein)

CNS – središnji živčani sustav (*engl.* central nervous system)

CMA – autofagija posredovana šaperonima (*engl.* chaperone-mediated autophagy)

HSF-1 - faktor toplinskoga stresa-1 (*engl*. heat shock factor-1)

ERAD – degradacija proteina u endoplazmatskom retikulu (*engl*.endoplasmic-reticulum-associated protein degradation)

FTD – frontotemporalna demencija (*engl*. frontotemporal dementia)

HD – Huntingtonova bolest (*engl*. Huntington's disease)

HSE – element odgovoran za ekspresiju *HSP* (*engl*. heat shock element)

HSF – faktor odgovoran za ekspresiju *HSP* (*engl*. heat shock factor)

Hsp - proteini toplinskog stresa (*engl*. heat shock proteins)

MHC – glavni kompleks histokompatibilnosti (*engl*. major histocompatibility complex)

NDD – neurodegenerativna bolest (*engl*. neurodegenerative disease)

NF-κB - jezgreni čimbenik kappa B (*engl.* nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

PD – Parkinsonova bolest (*engl*.Parkinson's disease)

RPE – retinalni epitelni pigment (*engl.* retinal epithelial pigment)

ROS – reaktivne kisikove vrste (*eng.* reactive oxygen species)

SOD – superoksid-dismutaza (*engl.* superoxide-dismutase)

UPS – ubikvitin-proteasomski sustav (*engl.* ubiquitine-proteasome system)

VGFR – receptor za vaskularni faktor rasta (*engl.* vascular growth factor receptor)

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1.Proteostaza u stanici……1

1.2.Neuroni kao iznimno ranjive stanice 1

2. OBRAZLOŽENJE TEME 3

3. MATERIJALI I METODE 4

4. REZULTATI I RASPRAVA 5

4.1.Molekulske osnove neurodegenerativnih bolesti 5

4.2. Proteotoksičnost……10

4.3. Proteini toplinskog stresa……..21

4.4. Budućnost terapije neurodegenerativnih bolesti koja uključuje Hsp……31

5. ZAKLJUČAK……...46

6. LITERATURA……..47

7. SAŽETAK/SUMMARY……...49

7.1. SAŽETAK……..49

7.2. SUMMARY……50

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. Proteostaza u stanici

Sposobnost stanice da održava sve proteine svoga proteoma u konformaciji, koncentraciji i na lokaciji unutar stanice koja je potrebna za njihovu ispravnu funkciju naziva se proteinska homeostaza, odnosno proteostaza (Penke i sur., 2018). U prenapučenoj unutrašnjosti stanice i pod utjecajem različitih okolišnih i fizioloških stresora kao što su toplina, oksidacijski stres i upala, proteini postaju podložni formaciji ne-nativnih interakcija koje mogu dovesti do pogrešnog namatanja i agregacije proteina (Smith i sur., 2015).

Mehanizmi proteostaze nastoje balansirati između razgradnje proteina koji na bilo koji način odudaraju od svoje nativne konformacije i popravka istih. Stanice se uvelike razlikuju prema svojoj sposobnosti održavanja proteostaze. Poznato je da su neuroni posebno podložni pojavi narušene proteostaze i formaciji intracelularnih agregata, iako točan mehanizam još nije utvrđen (Penke i sur., 2018).

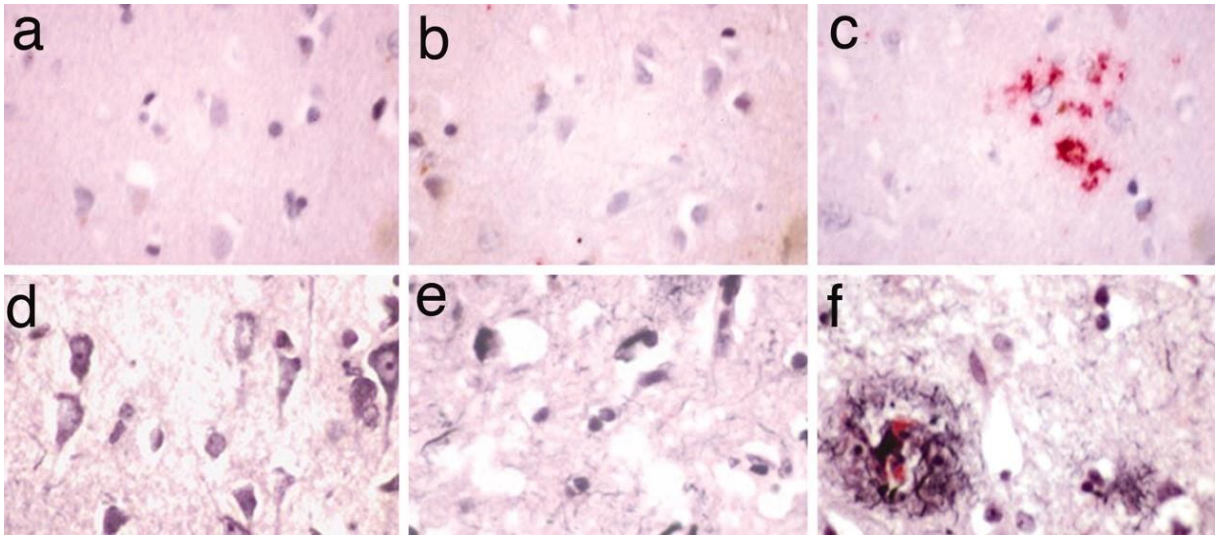
1.2.Neuroni kao izuzetno ranjive stanice

Neuron, zajedno s retinalnim epitelnim pigmentom (RPE), kardiomiocitima i stanicama poprečno-prugastih mišića, svrstava se u skupinu post-mitotičkih stanica koje se jako rijetko ili nikada tijekom životnog vijeka organizma ne zamjenjuju novim stanicama (http:/www.agingchart.org). U kardiomiocitima, RPE i u kortikalnim neuronima tijekom života odvija se posebno intenzivan oksidacijski metabolizam koji kao nusprodukt ima proizvodnju velike količine slobodnih radikala koji oštećuju strukture u stanici ako se ne detoksificiraju na prikladan način (http:/www.agingchart.org). Osim nakupljanja slobodnih radikala, kod starenja neurona također je primijećena disfunkcija mitohondrija, disregulacija metabolizma kalcija i opadanje učinkovitosti sustava za održavanje proteostaze (R Peters, 2006).

Neuroni zbog svog intenzivnog metabolizma u većoj mjeri ovise o adenozin-trifosfatu (ATP-u) nego druge stanice, pa su zbog toga podložniji oštećenjima koja mogu nastati uslijed energetskih kriza uzrokovanih promjenama membranskog potencijala i disfunkcijom mitohondrija (Brini M i sur., 2014). Nadalje, ion kalcija od presudne je važnosti za neurone jer sudjeluje u transmisiji signala i sinaptičkoj aktivnosti. Kalcij koji uđe u stanicu i onaj koji je otpušten iz endoplazmatskog retikula prilikom prijenosa signala potrebno je puferirati na

određenu koncentraciju u neuronu za što su zaduženi mitohondriji. Iz tog razloga, disfunkcija mitohondrija uzrokovana starenjem ili patološkim proteinskim inkluzijama dovodi do ekscitotoksičnosti. Razgranati i dugački ogranci neurona zahtjevaju lokalnu neprekidnu opskrbu ATP-om od strane mitohondrija. S obzirom na to, disfunkcija mitohondrija također dovodi i do poremećaja rasta i održavanja funkcionalnosti aksona (Brini M i sur.,2014; Chung i sur., 2018).

Starenjem dolazi do opadanja funkcionalnosti sustava za održavanje proteostaze na čelu s proteinima toplinskog stresa (Hsp) jer stanice gube sposobnost aktivacije transkripcijskih puteva koji su odgovorni za njihovu sintezu (Dattilo i sur., 2015). To dovodi do stvaranja proteinskih agregata u stanici, njima uzrokovanih oštećenja staničnih struktura i odlaska stanice u apoptozu uslijed proteotoksičnosti. U nekim slučajevima, prirodnom padu funkcionalnosti sustava za održavanje proteostaze pridruži se i genska mutacija ili neki vanjski čimbenici, što dodatno potakne stvaranje toksičnih proteinskih inkluzija, te tako dođe do razvoja neurodegenerativne bolesti (NDD). Na Slici 1. prikazane su karakteristične histološke slike mozga pacijenata oboljelih od NDD-a na kojima su vidljivi prošireni ventrikuli nastali uslijed stanične smrti neurona i ekstracelularne nakupine agregiranih proteina - amiloide (Penke i sur., 2018; Chang i sur., 2018).



Slika 1. Slika prikazuje ljudsko tkivo hipokampusa pacijenata s Alzheimerovom bolešću (c i f), Parkinsonovom bolešću (b i e) i zdravih kontrola (a i d). Hipokampus zdrave kontrole ne pokazuje prisustvo amiloidnih plakova (a i d). Hipokampus pojedinca s Parkinsonovom bolešću pokazuje blagu akumulaciju patoloških tau-filamenata bez amiloidnih plakova (b i e). Hipokampus pacijenta s izraženom patologijom Alzheimerove bolesti s velikim plakovima (f) koji sadrže amiloid, hiperfosforilirani tau-protein i stanične elemente (preuzeto iz Rajendran L i sur., 2006).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Neurodegenerativne bolesti koreliraju s dobi pojedinca i za njih još uvijek ne postoje učinkoviti lijekovi. Takve bolesti postaju jedan od ključnih problema s kojima se mora nositi današnja sve dugovječnija populacija. Karakteriziraju ih teški neurološki simptomi koji uključuju progresivno pogoršanje kognitivnih i motoričkih sposobnosti. Za sada postoji samo palijativna terapija koja u određenoj mjeri olakšava simptome, ali ne djeluje na uzrok bolesti. Znanost je došla do brojnih spoznaja vezanih za samu prirodu i progresiju neurodegenerativnih bolesti, ali napredak na polju otkrića i razvoja učinkovitih lijekova za sada je minimalan.

Do danas je već dobro poznato da starenje dovodi do opadanja učinkovitosti sustava za kontrolu kvalitete proteina, iako se o točnim razlozima još uvijek nagađa. Smanjena učinkovitost toga sustava dovodi do povećanja koncentracije pogrešno smotanih proteina, što polako nadjačava zaštitni kapacitet molekularnih šaperona, te dolazi do zatvaranja kruga u kojemu se pogrešno smotani proteini dalje nagomilavaju. To je mehanizam za koji se smatra da ima najviše udjela u razvoju degenerativnih promjena i koji će biti detaljno obrazložen u ovome radu.

Povećanje koncentracije molekulskih šaperona pokazalo se kao obećavajuća terapijska strategija za usporavanje progresije bolesti na molekulskoj razini. *In vivo* i *in vitro* pokusi demonstriraju supresiju proteotoksičnosti uslijed poticanja transkripcije gena za proteine toplinskoga stresa ili nekog drugog farmakološkog načina povećanja koncentracije proteina toplinskog stresa u neuronima.

Ovaj rad donosi pregled do sada poznatih neurodegenerativnih bolesti kojima je zajedničko stvaranje proteinskih agregata unutar i izvan neurona, te se zbog toga nazivaju proteinopatije. Također, donosi klasifikaciju proteina toplinskog stresa i njihove do sada poznate funkcije. Zaključno, bavi se i farmakološkim strategijama za podizanja koncentracije proteina toplinskog stresa u neuronu, bilo jednog ili više njih, što dokazano dovodi do usporavanja progresije neurodegenerativnih bolesti.

3. MATERIJALI I METODE

Prilikom izrade ovoga diplomskoga rada korišteni su znanstveni radovi dostupni u bazama:
PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed),
ScienceDirect (http://www.sciencedirect.com/),
Nature (http://nature.com).
Pregled baza znanstvenih radova učinjen je u razdoblju od 4. ožujka do 10. travnja 2019. godine po ključnim riječima ´heath shock proteins´, ´brain aging´, ´proteotoxicity´, ´Alzheimer´s disease´, ´proteinopathies´.
Svi pregledani radovi, ukupno 19 radova, su originalni znanstveni, pregledni znanstveni, te stručni radovi.
Osim znanstvenih radova dostupnih u bazama podataka korištena je i knjiga:
Cooper GM, Hausman RE. Stanica: Molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 281.-282., 345.-346.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Molekulske osnove neurodegenerativnih bolesti

4.1.1. Pregled proteinopatija

Neurodegenerativne bolesti (NDD) uzrokovane su progresivnom degeneracijom neurona u mozgu, oku i leđnoj moždini. Gubitak specifične populacije neurona definira kliničke manifestacije svake pojedine bolesti. NDD mogu biti sporadične ili familijarne, s time da uglavnom imaju iste simptome i mehanizme progresije što upućuje na to da dijele i model neuronalne disfunkcije. Glavna histopatološka oznaka NDD-a je prisutnost ubikvitiniranih proteinskih agregata - amiloida (Smith i sur., 2015). Osim amiloidnih depozita, kod NDD-a se nalaze i karakteristična oštećenja stanica u vidu povećanog lumena endoplazmatskog retikula, povećane permeabilnosti lizosoma i disfunkcije sustava za razgradnju proteina u stanici. Bolesti koje spadaju u tu skupinu su Alzheimerova bolest (AD), Parkinsonova bolest (PD), frontotemporalna demencija (FTD), prionske bolesti, Huntingtonova bolest (HD) i amiotrofična lateralna skleroza (ALS) koje skupno nazivamo proteinopatije. Postoje različite vrste amiloida koji su specifični za svaku pojedinu bolest, a zajedničko im je to da se radio o proteinima koji su po svojoj prirodi skloni agregaciji. Pregled bolesti i njihovih karakterističnih proteinskih inkluzija nalazi se u Tablici 1. (Penke i sur., 2018).

Tablica 1. Proteinopatije i njima pridruženi patološki promjenjeni proteini skloni agregaciji (Penke i sur., 2018).

Proteinopatije	Agregirani proteini
Alzheimerova bolest (AD)	β-amiloid (Aβ) hiperfosforilirani Tau (pTau) α-sinuklein
Parkinsonova bolest (PD)	α-sinuklein
Huntingtonova bolest (HD)	Huntingtin
Frontotemporalna demencija (FTD)	α-sinuklein
Amiotrofična lateralna skleroza (ALS)	TDP-43 superoksid dismutaza (SOD)
Prionske bolesti	prioni (PrP^{SC})

4.1.2. Parkinsonova bolest

Parkinsonova bolest (PD) uzrokovana je progresivnim gubitkom dopaminergičkih neurona u dijelu mozga nazvanom *supstantia nigra pars compacta*. Bolest pogađa oko 1% populacije u dobi od 65 i više godina. Prisutni su intracelularni proteinski agregati nazvani Lewyjeva tjelešca koja su primarno sastavljena od ubikvitiniranog α-sinukleina (Smith i sur., 2015). PD je primarno bolest kretanja. Simptomi započinju postupno, najčešće prvo na jednoj strani tijela, a kasnije zahvate obje strane. Oni uključuju drhtanje ruku, nogu, donje čeljusti i lica, ukočenost ruku, nogu i trupa, sporost pokreta i slabu koordinaciju. U kasnijim fazama bolesti, pacijenti imaju problema s govorom, hodanjem i obavljanjem jednostavnih zadataka. Osim toga, pojavljuju se i problemi sa spavanjem i depresija, te poteškoće pri žvakanju i gutanju (Rajasthan, 2015).

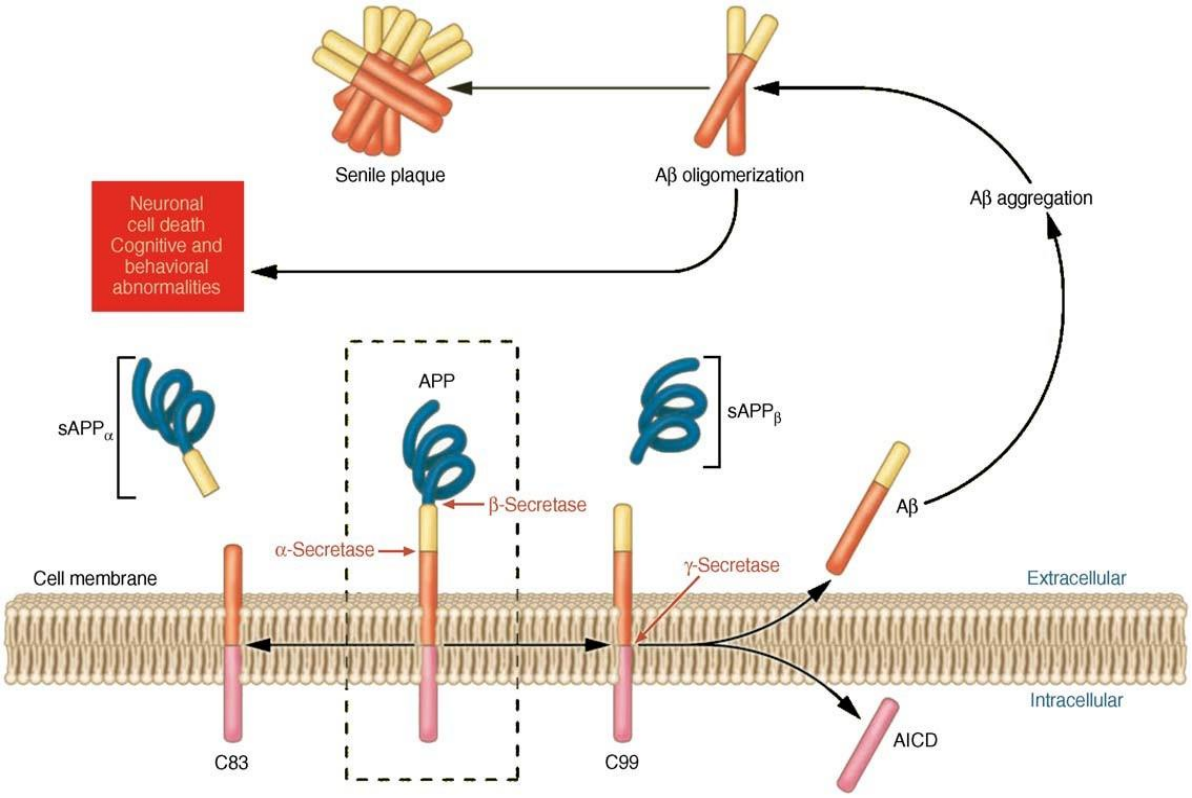
4.1.3. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AD) najčešći je oblik senilne demencije koji pogađa 10% populacije starije od 65 godina i blizu 50% populacije starije od 85 godina. Bolest primarno zahvaća hipokampus i moždani korteks odakle se širi u ostale dijelove mozga (Imbimbo i sur.,

2005). Patofiziologija AD-a povezana je s većim brojem faktora od kojih su neki: ekstracelularni depoziti β-amiloidnih plakova, akumulacija intracelularnih neurofibriliarnih filamenata, oksidacijska oštećenja neurona i pokretanje upalnih kaskada. Međutim, smatra se da je centralni patofiziološki mehanizam povećano stvararnje Aβ peptida koji je glavna gradivna komponeneta amiloidnih plakova (Imbimbo i sur., 2005).

Bolest je klinički karakterizirana progresivnim propadanjem kognicije i funkcionalnosti koje značajno negativno utječu na svakodnevni život. Morfološki je bolest povezana s atrofijom mozga i povećanim cerebralnim ventrikulima. S biokemijskog gledišta, najznačajniji je deficit neurotransmitera acetilkolina, enzima acetilkolin-transferaze i ostalih kolinergičkih biljega (Imbimbo i sur., 2005). Histološki su u tkivu vidljivi ekstracelularni depoziti koji se nazivaju još i cerebralni plakovi. Oni su građeni od guste proteinske jezgre koja sadrži Aβ peptid okružen mrtvim i oštećenim neuronima. Od ostalih patohistoloških znakova tu su i unutarstanični neurofibrilarni filamenti, građeni uglavnom od filamentoznog, hiperfosforiliranog oblika tau proteina koji je inače jedna od gradivnih komponenti mikrotubula (Imbimbo i sur., 2005).

Aβ protein koji gradi srž amiloidnih plakova, sastoji se od 40 ili 42 aminokiseline. On nastaje metaboličkim procesuiranjem transmembranskog glikoproteina poznatog kao APP čiji se metabolizam može odvijati u 2 smjera (Imbimbo i sur., 2005). Takozvanim *ne-amiloidogeničnim putem*, APP se procesuira uz pomoć enzima α-sekretaza koji kida APP unutar Aβ sekvence i otpušta njegov fragment sAPPα, za koji se čini da ima neuroprotektivnu aktivnost, dok se ostatak molekule koji ostaje vezan za membranu naziva C83 ili CTFα. Drugi metabolički put naziva se *amiloidogenični put* i u njemu sudjeluje β-sekretaza koja generira sAPPβ i C99. Karboksiterminalni fragment C99 kida enzim γ-sekretaza koja generira Aβ i APP intracelularnu domenu (AICD) (Imbimbo i sur., 2005). Oba puta procesuiranja APP-a prikazana su na Slici 2.



Slika 2. Metabolički putevi i enzimi preko kojih se metabolizira APP transmembranski glikoprotein (preuzeto iz Imbimbo i sur., 2005).

Za nekoliko mutacija u genu za APP glikoprotein koje dovode do familijarnih slučajeva AD-a, utvrđeno je da uzrokuju promjene na mjestima na kojima enzimi kidaju APP. Ove mutacije promoviraju generaciju Aβ peptida poticanjem proteolitičkog procesiranja APP-a preko β- i γ-sekretaze (Imbimbo i sur., 2005). Osim toga, pronađene su i mutacije u domenama kompleksa enzima γ-sekretaze, poznate pod nazivom presenilin 1 (PS-1) i presenilin 2 (PS-2), za koje se također pretpostavlja da uzrokuju familijarne slučajeve AD-a (Imbimbo i sur., 2005). Još uvijek se sa sigurnošću ne zna koji oblik Aβ agregata uzrokuje oštećenja u neuronima, ali općenito se smatra da su odgovorni topljivi Aβ oligimeri. Intracelularni Aβ su većinom dimeri i imaju globularnu strukturu, te se smatraju najpotentnijim neurotoksinima (Imbimbo i sur., 2005). Pokusima *in vivo* dokazano je da Aβ oligomeri blokiraju dugoročnu potencijaciju što je eksperimentalna paradigma za sinaptičku plastičnost. Agregati Aβ proteina uzrokuju i strukturno urušavanje sinapsi i disfunkciju aksona (Imbimbo i sur., 2005). Studije na kulturama stanica moždanog tkiva preminulog pacijenta s AD-om ili transgeničnog AD miša, sugeriraju da bi mehanizam neurotoksičnosti Aβ oligomera mogao biti stimulacija oksidacijskoga stresa i pokretanje signalnih kaskada koje vode stanicu u apoptozu. Intracelularni agregati svojstveni su ranom stadiju AD-a, dok su

veliki ekstracelularni plakovi primjećeni u kasnijim stadijima, te se za njih smatra da su puno inertniji od intracelularnih. Unatoč tome, neke studije pokazuju da je moguće da ekstracelularni plakovi imaju ulogu depoa toksičnijih oligomera Aβ, te da se oni otpuštaju iz tih depoa i u kasnijim stadijima bolesti (Imbimbo i sur., 2005).

4.1.4. Huntingtonova bolest i poliQ bolesti

Huntingtonova bolest (HD) genetska je autosomno dominantna bolest koja dovodi do progresivne degeneracije neurona u strijatumu i moždanom korteksu. Klinička slika bolesti obuhvaća motoričke, kognitivne i psihološke smetnje. HD je uzrokovana ekspanzijom CAG tripleta u genu zvanom *huntingtin (htt*). Translatirani protein Huntingtin nastao prepisivanjem toga gena sadrži dugi poliglutaminski niz (poliQ) koji je odgovoran za njegovu agregaciju (Smith i sur., 2015). Druge bolesti koje također pokazuju prisustvo CAG ekspanzije u genskom zapisu stanice posjeduju neke druge proteine koji su također pojačano skloni agregaciji i imaju dugi poliQ rep, te pokazuju sličnosti u patogenezi bolesti (Smith i sur., 2015). Do danas je opisno još 8 takvih bolesti osim HD-a. Točan mehanizam kojim agregirani poliQ proteini dovode do degeneracije i smrti stanice još je uvijek nepoznat. Većina do sada provedenih studija ukazuje na to da je citotoksičnost generalno svojstvo poliglutaminskog lanca dok sam protein na kojemu se nalazi poliQ lanac određuje težinu kliničke slike bolesti, dob u kojoj će se bolest aktivirati i podvrstu neurona koju će zahvatiti (Blum i sur., 2013).

4.1.5. Amiotrofična lateralna skleroza

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) jest neurodegenerativna bolest koja zahvaća gornje i donje motorne neurone u mozgu, moždanom deblu i kralježničnoj moždini. Progresijom bolesti dolazi do smrti motornih neurona što uzrokuje slabost mišića, gubitak mišićne mase i nemogućnost kontroliranja pokreta. Najčešće zabilježena mutacija koja dovodi do nasljednog oblika bolesti je mutacija gena za enzim superoksid-dismutazu 1 (SOD1) koja uzrokuje stvaranje intracelularnih SOD1 agregata (Smith i sur., 2015).

4.2. Proteotoksičnost

4.2.1. Uzroci pojave proteotoksičnih inkluzija u stanici

Kod svake pojedine proteinopatije dolazi do disregulacije jednog određenog proteina koji je odgovoran za početak i daljnji razvoj bolesti. Iako ti proteini nisu slični po svojoj građi niti po ulozi koju imaju u stanici, dokazano je da su na vrlo sličan način disregulirani kod svih proteinopatija. Zajedničko obilježje proteinopatija koje uzrokuje sličan obrazac disregulacije različitih proteina nazvano je proteotoksičnost. To se obilježje definira kao patološka promjena koja dovodi od akumulacije, pogrešne lokalizacije i/ili multimerizacije proteina specifičnih za pojedinu bolest (Chung i sur., 2018).

Uzroci pojave proteotoksičnosti u neuronima mogu biti sporadični i familijarni. Kod familijarnih oblika bolesti pronađen je defekt u genu koji kodira za inače fiziološki prisutan protein i uzrokuje njegovu patološku promjenjenost. Kod sporadičnih oblika bolesti pronalazi se isti patološki promjenjeni protein, ali ne i defekt u genu koji za njega kodira (Chung i sur., 2018).

Mutacije koje se dominantno pojavljuju u genima koji kodiraju za defektne proteine kod proteinopatija su točkaste i ekspanzijske mutacije. Do sada je identificirano 5 različitih točkastih mutacija koje nastaju na genima koji kodiraju za α-sinuklein kod PD-a, a to su *SNCA, A53T, A30P, E46K, H50Q* i *G51D* (Chung i sur., 2018). Kod AD-a su do sada identificirane čak 52 točkaste mutacije na genu koji kodira za amiloidni prekursorski protein, dok je na genu koji kodira za TDP-43, protein koji se povezuje s ALS-om i FTD-om, pronađeno 20 različitih mutacija koje dovode do razvoja bolesti. S ALS-om i FTD-om povezuje se i ekspanzijska mutacija u intronskoj regiji gena *C90RF72*. Transkripcijom i translacijom te GGGGCC regije nastaje 5 različitih proteina sa specifičnim dipeptidnim ponavljanjima zbog kojih ti proteini pokazuju sklonost agregaciji. Za poliQ bolesti je specifična ekspanzijska mutacija genskog tripleta koji kodira za aminokiselinu glutamin (CAG) unutar različitih gena koji se povezuju ponajprije s HD-om kao najzastupljenijom poliQ bolešću (Chung i sur., 2018).

Međutim, kod većine slučajeva NDD-a ne postoji mutacija unutar gena koji kodira za toksični protein tako da se ti slučajevi svrstavaju u skupinu sporadičnih oblika bolesti kod kojih se zapravo ne zna što je uzrok pojavi amiloidnih agregata. Slučajevi ALS-a i FTD-a kod kojih se nalazi abnormalna citoplazmatska akumulacija TDP-43 proteina bez prisutnosti genskih mutacija nazivaju se *TDP-43 patologijama* kako bi se naglasila razlika u odnosu na

naslijedni oblik bolesti. Na oblike bolesti se svrstavaju u skupinu *TDP-43 patologija* otpada većina slučajeva ALS-a i oko polovice slučajeva FTD-a. Slično tome, agregacija α-sinukleina bez prisutnosti mutacije u *SNCA* genu može se vidjeti kod PD-a i nekoliko drugih sličnih neuroloških slučajeva koji se nazivaju zajedničkim imenom *sinukleinopatije*. PD je zapravo vrlo rijetko uzrokovana mutacijom u *SNCA* ili nekom drugom karakterističnom genu (Chung i sur., 2018). Slični podatci postoje i za AD kod koje je u samo 5% slučajeva pronađena autosomalna dominantna mutacija gena koji uzrokuje bolest dok su svi ostali slučajevi sporadični (Imbimbo i sur., 2006).

Smatra se da su male intracelularne nakupine toksičnih proteina, koje još nisu izlučene iz stanice i vidljive mikroskopom, odgovorne za najteža oštećenja staničnih organela u neuronu koja će na kraju uzrokovati tešku disfunkciju i smrt neurona. Kod svih proteinopatija nailazi se na slične mehanizme kojima amiloidni dimeri i manji oligomeri oštećuju stanične organele. U idućih nekoliko poglavlja navedeni su najbitniji stanični organeli i mehanizmi putem kojih toksični agregati dovode do postupnog gubitka njihove funkcije. (Chung i sur., 2018).

4.2.2. Mehanizmi proteotoksičnosti u jezgri

Nuklearne inkluzije (NI) toksičnih proteina u neuronima primjećene su kod oko 20 različitih NDD. Točan mehanizam putem kojeg NI ispoljavaju svoj toksični učinak u jezgri još uvijek nije sa sigurnošću utvrđen, ali postoji nekoliko pretpostavljenih mehanizama. Znanstvenici se generalno slažu s pretpostavkom da su topljivi protofibrilarni ili oligomerni agregati zaslužni za ometanje važnih procesa u jezgri. Za mikroskopski vidljive NI u jezgri drži se da nisu toksični nego da su samo nusprodukt patološkog procesa ili čak štoviše da imaju zaštitnu ulogu. Neovisno o tome koji oblik proteinskih inkluzija izaziva smetnje u transkripciji i nukleocitoplazmatskom transportu u jezgri, ometanje tih procesa dovodi do teških oštećenja i smrti stanice (Chung i sur., 2018).

PoliQ bolesti najbolji su primjer NDD-a koje su povezane s nuklearnom proteotoksičnošću. Do danas je poznato 9 različitih poliQ bolesti koje su uzrokovane ekspanzijskom CAG (Q) mutacijom u genima koji kodiraju za proteine sklone agregaciji kod svake pojedine bolesti. Najzastupljenija poliQ bolest je HD čiji familijarni oblik uzrokuje ekspanzijska mutacija u genu *htt*. CAG ekspanzija se nakon transkripcije i translacije proteina očituje kao dugi lanac glutaminskih ostataka koji onda dovodi do agregacije i multimerizacije

s brojnim ciljnim proteinima u jezgri. Bitno je naglasiti da ti proteini u fiziološkim uvjetima nisu smješteni u jezgri nego je promijenjeni smještaj dio patološke slike bolesti (Chung i sur., 2018).

Enzim ataksin-3 je de-ubikvitinaza koju kodira gen *SCA3* i koja je u fiziološkim uvjetima smještena u citoplazmi. Kod autosomno dominantne bolesti spinocerebralne ataksije dolazi do ekspanzijske mutacije *SCA3* gena koji onda kodira defektni oblik enzima koji se, osim što je pojačano sklon agregaciji, predominantno smješta u jezgri (Zrinski Topić i sur., 2006).

NI se kod poliQ bolesti većinom sastoje od poliQ proteina, ubikvitina, Hsp-a i ciljnih jezgrinih proteina. Brojna istraživanja dokazala su prisutnost različitih transkripcijskih faktora u NI od kojih su neki CBP, TATA-vezni protein, nuklearni korepresor (NoCR) i REST/NRSF. Njihovo uklapanje u proteinske inkluzije onemogućuje im izvršavanje zadataka vezanih za transkripciju što znači da poliQ proteini sekvestracijom transkripcijskih faktora dovode do disregulacije transkripcije u jezgri (Chung i sur., 2018).

Osim odvijanja transkripcijskih procesa, u jezgri je zbog prisutnosti toksičnih agregata narušeno i odvijanje epigenetičkih procesa. PoliQ agregati sekvestriraju enzime i druge proteine koji sudjeluju u odvijanju reakcija bitnih za epigenetiku stanice. Dobar primjer za to je interakcija između mutiranih proteina huntingtina ili ataksina i enzima histon-acetiltransferaze koji je zadužen za acetilaciju histona (Chung i sur., 2018). Kada se histoni acetiliraju, veza između njih i DNA uzvojnice slabi što omogućuje prepisivanje genetskog materijala sa slobodne DNA uzvojnice (Cooper i Hausman, 2010). Sekvestracija enzima histon-acetiltransferaze i izostanak njegovog djelovanja ostavlja brojne posljedice na jezgru stanice, kao i na stanicu u cijelosti (Chung i sur., 2018).

Osim takvih neizravnih utjecaja toksičnih proteinskih agregata na epigenetiku stanice, opisani su i neki izravni utjecaji koji se tiču metilacije dušičnih baza kao mehanizma epigenetske regulacije. U kulturi stanica mozga zahvaćenog s HD-om pronađene su snižene razine 7-metilgvanina u usporedbi sa zdravom kontrolom za koje se smatra da ih uzrokuje mutirani huntingtin (Chung i sur., 2018). Nadalje, opisana je i interakcija između defektnog huntingtina i proteina koji se veže na regije u DNA uzvojnici koje nazivamo CpG otoci koji također mogu biti metilirani u sklopu epigenetskog zapisa stanice. Vezanjem mutiranog huntingtina na metil-CpG vezujući protein 2 (MeCP2) omogućena mu je direktna interakcija s metiliranim DNA regijama (Chung i sur., 2018).

Transkripcijske i epigenetske promjene doprinose širokom spektru neuronalnih patoloških fenotipova, od ranih neuropatskih značajki do onih karakterističnih za kasne faze

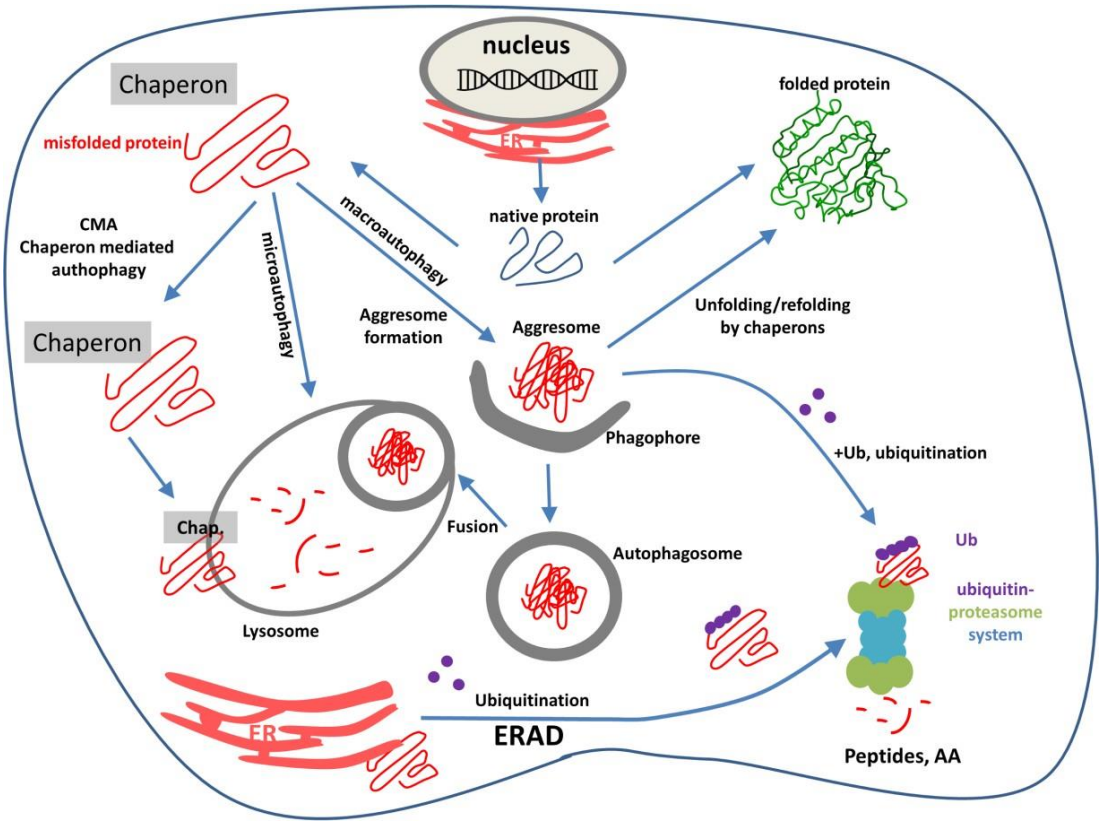
bolesti kada dolazi do smrti neurona. Studije ukazuju na to da poliQ proteini dovode do ranih promjena u morfologiji dendrita perturbacijom formiranja RNA granula i transkripcijskih kaskada koje reguliraju put prijenosa proteina iz endoplazmatskog retikula u Golgijev aparat koji se skraćeno naziva COPII put (Chung i sur., 2018).

Transkripcijska disregulacija je primjećena i kod AD-a i PD-a, iako kod njih tipično ne dolazi do nakupljanja proteinskih inkluzija u jezgri. Eksperimentalno je dokazano da kod AD-a i PD-a također dolazi do epigenetskih promjena. Eksperiment se sastojao od inhibicije enzima histon-deacetilaze (HDAC) koja je dovela do ublažavanja izražajnosti patološkog fenotipa na AD i PD neuronima (Chung i sur., 2018).

Osim ometanja procesa transkripcije i epigenetskih reakcija, defekti nukleocitoplazmatskog transporta koji su zamijećeni kod NND-a također su jako bitan čimbenik koji dovodi do oštećenja i konačne smrti neurona. Oni su zamjetni kod svih NDD-a, ali su najizraženiji kod ALS-a, HTD-a, AD-a i PD-a. Nukleocitoplazmatski se transport odnosi na izmjenu proteina i genetskog materijala između jezgre i citoplazme što je nužno za metabolizam, homeostazu i preživljenje stanice. Agregati toksičnih proteina ometaju transport sekvestracijom proteina koji grade kompleks nuklearnih pora (NPC) i direktnom blokadom nuklearnih pora smiještanjem u njihovom otvoru (Chung i sur., 2018).

4.2.3. Mehanizmi proteotoksičnosti u citoplazmi

Proteotoksičnost se u citoplazmi neurona ispoljava na drugačiji način nego u jezgri zbog specifičnog citoplazmatskog staničnog okoliša. U citoplazmi, za razliku od jezgre, postoje različiti sustavi za održavanje proteostaze u stanici koji su zaduženi za primjereno zbrinjavanje i uklanjanje pogrešno smotanih proteina. U tu skupinu spadaja ubikvitinsko-proteasomski sustav (UPS), degradacija povezana s endoplazmatskim retikulom (ERAD), autofagija posredovana molekulskim šaperonima (CMA), mikroautofagija i makroautofagija. Proteini koji čine komponente tih puteva u citoplazmi potencijalne su mete proteinskih inkluzija, čijim se stvaranjem gubi funkcija pojedinog proteina i dolazi do disregulacije procesa koji se odvijao tim putem (Chung i sur., 2018). Najvažniji putevi kojima se odvija razgradnja toksičnih proteinskih agregata prikazani su na Slici 3.



Slika 3. Glavni putevi preko kojih se održava proteostaza u stanici (preuzeto iz Penke i sur., 2018).

Citoplazma u usporedbi s jezgrom sadrži izražajniji citoskelet koji osim mehaničke potpore ima ulogu i u transportu proteina u stanici. Prisutnost velikog broja proteina koji su članovi sustava za održavanje proteostaze i izraženog citoskeleta, te sama činjenica da je stanica izuzetno mala, upućuje na to da neprimjereno zbrinuti proteinski agregati mogu izazvati značajna oštećenja staničnih struktura i onemogućiti odvijanje procesa koji su nužni za održavanje stanice na životu (Chung i sur., 2018).

UPS je sustav koji je najzaslužniji za održavanje proteostaze u stanici, a upravo on je najčešće oštećen kod NDD-a. Studije pokazuju da agregirani proteini bogati β-nabranim pločama i agregirani tau proteini kod AD-a blokiraju 20S i 19S proteasomske čestice i na taj način onemogućavaju degradaciju proteina preko UPS-a. Također je dokazano da genske mutacije nekih komponenata UPS-a, primjerice E3 ligaze Parkin, UCH-L1 i VCP, dovode do neurodegeneracije (Chung i sur., 2018).

Pogrešno smotani i agregirani proteini usmjeravaju se prema sustavima za razgradnju postupkom ubikvitinacije. Taj postupak obuhvaća vezanje većeg broja polipeptida ubikvitina na oštećeni protein koji onda zajedno tvore multiubikvitinski lanac koji predstavlja signal za razgradnju proteina od strane velikog proteaznog kompleksa - proteasoma (Cooper i

Hausman, 2010). Jedinice ubikvitina, koje grade multiubikvitinski lanac, na defektni protein postupno vežu enzimi iz skupine ligaza. Enzim te vrste čija bitna uloga je otkrivena kod NDD-a je CHIP koji je po svojoj funkciji E3 ligaza, a smještena je na C-kraju proteina koji je u interakciji s Hsp70 (Chung i sur., 2018). Mutirani protein G2019S LRRK2 koji se povezuje sa PD-om ubikvitinilira se uz pomoć CHIP-a. Dokazano je da pretjerana ekspresija CHIP-a u stanicama neurona u eksperimentalnim uvjetima dovodi do učinkovitije i brže razgradnje mutantnog proteina što predstavlja obećavajuću terapijsku opciju (Chung i sur., 2018). U suglasju s time je i istraživanje u kojemu je dokazano da miš, kod kojega je izvršen *knock-out* gena koji kodira CHIP, pokazuje egzacerbaciju poliQ patologije (Chung i sur., 2018). Skupini E3 ligaza pripada i UBE3A koja u neuronima ima ulogu usmjeravanja mutantnog Huntingtina prema proteasomskom sustavu. U neuronima zahvaćenim s HD-om, njena je funkcionalnost smanjena što podržava razvoj patoloških promjena na razini stanice (Chung i sur., 2018).

Uočeno je da se u neuronima u kojima je UPS krajnje kompromitiran, pojačava aktivnost autofagije kao sustava za uklanjanje toksičnih proteina iz stanice. Na taj je način nastup značajnije proteotoksičnosti malo usporen, ali smatra se da pojačana autofagija nije u mogućnosti potpuno nadomjestiti UPS. To je još jedna činjenica koja potkrjepljuje tvrdnju da je UPS najbitniji sustav za otklanjanje pogrešno smotanih i agregiranih proteina u stanici (Chung i sur., 2018). Otkriveno je i da su pojedini toksični proteini skloni agregaciji rezistentni prema ostalim sustavima za održavanje proteostaze u stanici. Dobar primjer za to su određene podvrste mutantnog Huntingtina koje su selektivno rezistentne prema autofagiji jer se nalaze u nekonvencionalnoj konformaciji koju ne prepoznaju receptori na vakuolama u kojima se odvija autofagija (Chung i sur., 2018).

Većina proteinskih inkluzija koje se pojavljuju kod NDD-a, osim mutantnog proteina sklonog agregaciji i ciljnog proteina, sadrže još i ubikvitin i neke molekularne šaperone. Ranije se smatralo da su molekularni šaperoni sadržani u agregatima zapravo pokušali spriječiti agregaciju proteina, ali u tome nisu uspjeli, pa se iz tog razloga nalaze unutar agregata. Novija istraživanja ukazuju na to da smještaj Hsp unutar proteinskih agregata ne mora ukazivati na preopterećenost sustava za degradaciju, nego bi stvaranje velikih agregata moglo predstavljati zaštitni mehanizam kojim se stanice brani od toksičnosti puno opasnijih oligomernih agregata (Chung i sur., 2018).

CMA je još jedan citoplazmatski sustav za razgradnju defektnih proteina, ali je puno specifičniji od UPS sustava. CMA se najčešće spominje u kontekstu PD-a i on je zadužen za razgradnju defektnih LRRK2 i α-sinukleina koji su karakteristični za PD (Chung i sur., 2018). Ovaj sustav prepoznaje i eliminira proteine koji na svojoj površini imaju izložen KFERQ

motiv što znači da nisu u svojoj ispravnoj konformaciji. Mutirani oblici LRRK2 i α-sinukleina imaju izložen KFERQ motiv na svojoj površini koji prepoznaju i vežu proteini Hsc70 i LAMP-2A koji su dio CMA sustava (Chung i sur., 2018). Međutim, mutiran oblik α-sinukleina veže se s LAMP-2A neuobičajeno velikim afinitetom i tako blokira njihov transport kroz membranu lizosoma što kompromitira funkciju CMA sustava. Iz ovih izvještaja možemo zaključiti da je CMA sustav glavni sustav za razgradnju proteina u neuronima koji su zahvaćeni PD-om. Njegova disfunkcija dovodi do povećanog nakupljanja toksičnih proteina, dok je s druge strane pojačana ekspresija nekih njegovih komponenata potencijalna buduća terapijska strategija u liječenju PD-a (Chung i sur., 2018).

Za neke NDD specifična je nekontrolirana agregacija proteina koji su inače dio staničnog citoskeleta. Najpoznatiji primjer je agregacija tau proteina kod PD-a. Tau protein je u svom fiziološkom obliku fosfoprotein povezan sa staničnim mikrotubulima koji ima ulogu u održavanju mehaničke stabilnosti stanice i jedna je od komponenata koje podržavaju aksonalni transport. Eksperimentalno je utvrđeno da je koncentracija tau proteina u neokorteksu bolesnika s AD-om 7 puta veća nego kod zdravog pojedinca iste dobi (Chung i sur., 2018). Bitno je naglasiti da je tau protein u svom patološkom agregiranom obliku hiperfosforiliran, što upućuje na fosforilaciju kao jedan od mehanizama razvoja patološkog procesa. Hiperfosforilacija tau proteina dovodi do njegove smanjene acocijacije s mikrotubulima i povećane međusobne agregacije. Osim nastanka toksičnih proteinskih inkluzija, to za poslijedicu ima i inhibiciju funkcije mikrotubula i defekte u aksonalnom transportu (Chung i sur., 2018).

4.2.4. Mehanizmi proteotoksičnosti u mitohondrijima

Mitohondriji imaju ključnu ulogu u preživljenju i normalnom odvijanju svih procesa u stanici jer su oni primarno odgovorni za proizvodnju ATP-a kod svih eukariotskih organizama. Tijekom progresije NDD-a dolazi do nakupljanja toksičnih proteina specifičnih za svaku pojedinu bolest u mitohondrijima što ometa odvijanje bitnih metaboličkih procesa i dovodi do njihove disfunkcije (Chung i sur., 2018).

APP koji nalazimo u neuronima zahvaćenim AD-om specifičan je po tome što na sebi nosi vodeću sekvencu koja ga nakon transkripcije i translacije usmjerava prema mitohondriju gdje se inače nikada ne nalazi kod zdravih pojedinaca (Chung i sur., 2018). On tamo ostvaruje interakcije sa bitnim mitohondrijskim proteinima koje onda dovode do razvoja

proteotoksičnosti. Jedna od značajnijih interakcija je vezanje β-amiloida, proteina koji se povezuje s AD-om, s enzimom amiloid beta-vezujućom alkohol dehidrogenazom (ABAD) što onda inducira mitohondrijsku toksičnost (Chung i sur., 2018). Dokazano je da β-amiloid također može interagirati s ciklofilinom D (Cyp D), proteinom koji je integralna komponeneta mitohondrijske tranzicijske pore (mPTP), što onda senzitizira njeno otvaranje i na taj način djeluje proteotoksično. Mutantni APP sadrži i jednu kiselu domenu koja pokazuje afinitet prema pori mitohondrijske translokaze vanjske membrane (TOM40) i prema translokazi unutarnje membrane (TIM23) koje onda začepljuje i tako onemogućava transport molekula iz mitohondrija u citoplazmu i obrnuto. Generalno je utvrđeno za AD da interakcija APP-a i β-amiloida s mitohondrijskim proteinima generira oksidacijski stres, smanjuje proizvodnju ATP-a, depolarizira mitohondrijski membranski potencijal i senzitizira otvaranje mPTP, te da sve to snažno pridonosi mitohondrijskoj disfunkciji koja se manifestira kod AD-a (Chung i sur., 2018).

Dio mutiranog oblika Huntingtina koji ostaje smješten u jezgri ometa transkripciju gena bitnih za biogenezu i funkciju mitohondrija te na taj način djeluje indirektno proteotoksično na mitohondrije (Chung i sur., 2018). Osim toga, opisan je i direktan utjecaj agregata Huntingtina na mitohondrije. N-terminalni fragment mutantnog Huntingtina vodi njegovu translokaciju u mitohondrij gdje onda interagira s kompleksom TIM23 i tako ometa procese transporta molekula između mitohondrija i citoplazme. Interakcije Huntingtina s komponentama mitohondrija dovode do brojnih disfunkcija od kojih su neke smetnje u regulaciji metabolizma kalcija, senzitizacija otvaranja mPTP i depolarizacija mitohondrijskog membranskog potencijala (Chung i sur., 2018).

α-sinuklein, protein koji je karakterističan za PD, ima veliki afinitet prema negativno nabijenim lipidima tako da se snažno veže za vanjsku membranu mitohondrija. Osim lipida, ovaj protein veže i neke mitohondrijske proteine, primjerice anionske kanale ovisne o naponu (VDAC) i TOM20 u njegovu oligomernome obliku. Te interakcije ometaju izmjenu ATP-a i ADP-a između mitohondrija i citosola što je jedan od najvažnijih procesa za održavanje metabolizma i preživljenje stanice (Chung i sur., 2018).

TDP-43 vezan je za patologiju ALS-a i FTD-a i on u svojem mutiranom obliku, jednako kao i svi prethodno spomenuti proteini, sadrži sekvencu koja ga usmjerava prema mitohondriju. Tamo TDP-43 ometa proces oksidativne fosforilacije vezanjem na ND3 i ND6 mRNA (Chung i sur., 2018).

Iz svega navedenog vidljivo je da velik broj heterogenih NDD-a pokazuje slične mehanizme proteotokskičnosti kod kojih se različiti, za bolest specifični, proteini pogrešno

lokaliziraju u mitohondriju. Oni ondje fizičkim interakcijama s komponentama mitohondrija dovode do razvoja proteotoksičnosti koja se ispoljava na sličan način kod svih bolesti. Takav nespecifičan mehanizam doveo je do pretpostavke da bi mitohondriji mogli služiti kao odlagalište pogrešno smotanih proteina u stanici. Na tom tragu je i jedno istraživanje koje je provedeno na stanicama kvasca u uvjetima toplinskog stresa. Pod tim uvjetima, generirani su pogrešno smotani proteini koji su onda prelazili iz citoplazme i mitohondrij pomoći mitohondrijske translokaze Tom79/Tom40 i tamo bili razgrađeni preko proteina Pim1. Takav mehanizam još uvijek nije dokazan kod ljudi i potrebna su dodatna istraživanja kako bi se ta problematika bolje razumjela (Chung i sur., 2018).

4.2.5. Propagacija toksičnih proteina

Kod svakog pojedinog NDD-a identificirana je regija u mozgu u kojoj se najranije mogu pronaći proteinske inkluzije koje se kasnije, s napretkom bolesti, šire u druge dijelove mozga. Histopatološkom analizom mozga pacijenta koji je bolovao od PD-a utvrđen je stereotipan put širenja proteinskih agregata iz autonomnog živčanog sustava i jezgara dorzalnih motornih neurona prema *substantii nigri*, bazalnom predjelu mozga, hipokampusu i neokorteksu. Kod AD-a je promjećeno širenje tau inkluzija iz transentorhinalnog korteksa prema hipokampusu i neokorteksu (Chung i sur., 2018).

Na temelju ovakvih opažanja postavljena je intrigantna hipoteza koja tvrdi da se proteotoksični agregati iz jednog ishodišta prenose u druge djelove mozga poput priona. Ta teorija je u potpunoj suprotnosti s do sada prihvaćenim mišljenjem prema kojem se proteinske inkluzije stvaraju u svakom neuronu pojedinačno. Novoj teoriji idu u prilog brojna istraživanja u kojima je dokazan prijelaz toksičnih inkluzija s neurona zahvaćenih bolešću na zdrave neurone. U jednom od takvih istraživanja, zdravi neuroni podrijetlom iz mezencefalona embrija presađeni su u mozak pacijenta koji je imao PD. Nakon nekog vremena uočava se da su izvorno zdravi neuroni počeli razvijati patološke promjene karakteristične za PD s inkluzijama koje sadrže α-sinuklein i ubikvitin (Chung i sur., 2018). U drugoj studiji provedenoj na tu temu, pluripotentne matične stanice koje nose gen za mutirani Huntingtin implantirane su u mozak zdravog miša. Ubrzo dolazi do propagacije mutantnog Huntingtina u stanicama domaćina, progresivnog gubitka njegovih stanica i bihevioralnih deficita karakterističnih za HD (Chung i sur., 2018). Sve do sada navedene studije potvrđuju činjenicu da se toksični agregati mogu prenositi s patološki promjenjenih na zdrave stanice

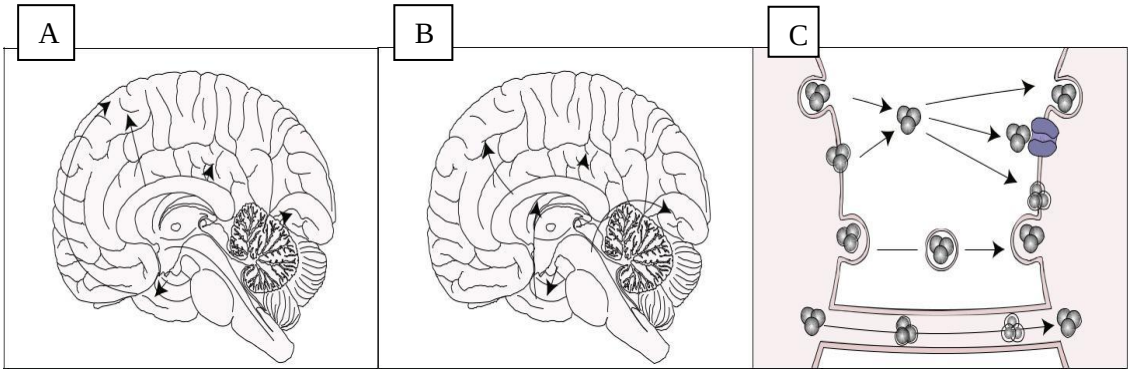
(Chung i sur., 2018).

Nadalje, postavlja se pitanje jesu li sami proteinski agregati dovoljni za širenje na nezahvaćene neurone ili im je potrebna pomoć neurona ili pojedinih komponenti iz moždanog tkiva zahvaćenog bolešću. Kako bi se to ispitalo, proveden je eksperiment u kojemu je ekstrakt mozga simptomatskog tau transgeničnog miša intracerebralno injektiran presimptomatskom tau tansgeničnom mišu. Dokazano je da injektirani ekstrakt mozga dovodi do indukcije stvaranja neurofibrilarnih filamenata na mjestu iniciranja, te također u udaljenim regijama mozga koje su od mjesta iniciranja udaljene jednu ili više sinapsi (Chung i sur., 2018). Konačni dokaz ove hipoteze jest iniciranje sintetičkog α-sinukleina ili tau filamenata u mozak presimptomatskog transgeničnog miša koje je izazvalo širenje agregata u druge dijelove mozga. Iz toga se može zaključiti da su sami toksični agregati dovoljni za njihovo širenje u druge dijelove mozga i isključena je mogućnost da im je potrebna pomoć nekih drugih komponenata iz homogenata mozga (Chung i sur., 2018).

Pojedine studije ukazuju na to da toksični agregati, osim što imaju sposobnost širenja po središnjem živčanom sustavu, na isti način mogu prelaziti i iz perifernog u središnji živčani sustav. U jednoj takvoj studiji, transgeničnom mišu koji eksprimira mutantni α-sinuklein, ali nema simptome bolesti, intramuskularnom injekcijom dani su sintetski α-sinukleinski fibrili. 2 do 4 mjeseca nakon iniciranja, primjećeno je širenje patogenih inkluzija i neuroinflamatornog odgovora po cijelom središnjem živčanom sustavu, kao i pojava motoričkih defekata koji su karakteristični za PD. Međutim, ako se ishijadični živac prereže, širenje proteinskih inkluzija i neuroinflamatornog odgovora značajno je odgođeno (Chung i sur., 2018). Iz navedenog eksperimenta može se zaključiti da je moguće širenje proteinskih agregata putem perifernog živčanog sustava i da je on potreban za propagaciju bolesti, barem u slučaju PD-a. Još jedan dokaz širenja agregata s periferije prema središnjem živčanom sustavu je i pokus u kojemu je lizat mozga pacijenta oboljelog od PD intestinalno apliciran asimptomatskom štakoru što je dovelo do pojave α-sinukleinskih inkluzija u dorzalnoj motornoj jezgri vagusa u produženoj moždini (Chung i sur., 2018).

Pretpostavljeno je nekoliko molekularnih mehanizama kojima bi se proteinski agregati mogli prenositi od jednog do drugog neurona. Smatra se da je egzocitoza jedan od glavnih sekretornih mehanizama koji je uključen u otpuštanje agregata iz donorske stanice (Chung i sur., 2018). On se u donorskoj stanici odvija putem endosoma u kojima su agregati pohranjeni prije otpuštanja, a samo otpuštanje ovisno je o kalciju (Chung i sur., 2018). Nadalje, proteinski agregati se mogu otpustiti u ekstracelularni prostor unutar sekretornih vezikula koje se nazivaju egzosomi. Njihov promjer je između 50 i 100 nm i oni obično

sudjeluju u intracelularnom transportu mRNA, malih regulacijskih RNA i specifičnih proteina (Chung i sur., 2018). Toksični agregati također se mogu prenositi putem nanostruktura koje nalikuju na tunel i povezuju citoplazmatske prostore dviju stanica. Unutarnji promjer takvih nanocijevi je 50-200 nm, a njihova dužina može biti čak do nekoliko staničnih promjera. Primjećeno je da α-sinukleinski fibrili koji se prenesu iz jednog neurona u drugi, u receptorskom neuronu imaju sposobnost potaknuti oligomerizaciju α-sinukleina receptorskog neurona (Chung i sur., 2018).



Slika 4. Dio slike A prikazuje put širenja α-sinukleinskih inkluzija u mozgu pacjenta s Parkinsonovom bolešću. Dio slike B prikazuje širenje tau inkluzija u mozgu pacijenta s Alzheimerovom bolešću. Dio slike C prikazuje tri puta prijenosa proteinskih inkluzija između stanica koji su redom: egzocitoza, egzosomski put prijenosa i prijenos putem tunelirajućih nanocijevi (preuzeto iz Chung i sur., 2018).

Brojna klinička istraživanja podupiru model propagacije NDD-a gore opisnim mehanizmom koji sliči prijenosu priona kod bolesti koje su njima uzrokovane. Međutim, zabilježeni su i slučajevi NDD-a kod kojih nije opažen stereotipan put širenja toksičnih inkluzija, te eksperimenti u kojima se toksični agregati nisu proširili s neurona zahvaćenih bolešću na zdrave neurone. S obzirom na to, daljnja istraživanja su potrebna kako bi se utvrdio klinički značaj modela propagacije proteinskih agregata stereotipnim putevima za razliku od modela u kojemu svaki neuron sam za sebe proizvodi proteinske agregate (Chung i sur., 2018).

4.3.Proteini toplinskog stresa

4.3.1. Opće značajke

Do otkrića Hsp-ova došlo je tako što su stanice žlijezda slinovnica vrste *Drosophila melanogaster* u jednom eksperimentu izložene povišenoj temperaturi (Whitley i sur., 1999). U takvim uvjetima, primjećena je pojačana transkripcijska aktivnost na staničnim kromosomima i to jedne specifične populacije gena. Produkti ekspresije tih gena bili su proteini koji su nazvani proteinima toplinskog stresa upravo zbog uvjeta u kojima se pojačano eksprimiraju. Kasnije je utvrđeno da ekspresiju tih gena osim povišene temperature mogu potaknuti brojni okolišni i metabolički stresori, kao na primjer anoksija, ishemija, teški metali, etanol, nikotin, kirurški stres i virusi (Whitley i sur., 1999).

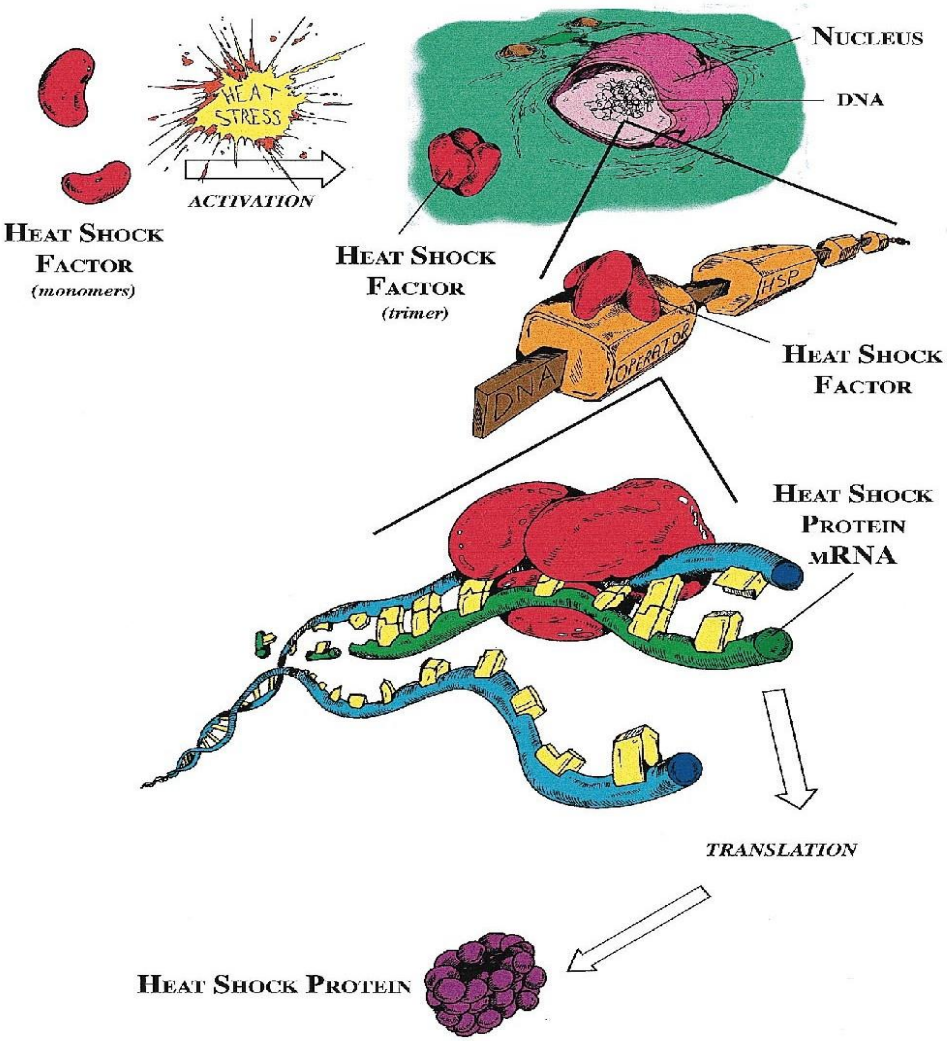
DNA sekvenca koja čini obitelj gena toplinskog stresa visoko je konzervirana i pronađena kod svih do sada proučavanih vrsta (Whitley i sur., 1999). Postoje konstitutivno eksprimirani proteini toplinskog stresa koji sudjeluju u održavanju proteostaze u stanici u fiziološkim uvjetima i inducibilni Hsp čija ekspresija je povećana u stanju stresa (Whitley i sur., 1999). Konstitutivno eksprimirani Hsp sudjeluju u brojnim procesima preko kojih stanica nastoji održati proteinsku homeostazu. Neki od tih procesa jesu ispravno namotavanje nascentnih polipeptidnih lanaca, asistencija pri translokaciji proteina između različitih staničnih odjeljaka, modulacija aktivnosti proteina putem stabilizacije i/ili maturacije do funkcionalno kompetentne konformacije, pomoć pri sastavljanju ili rastavljanju multiproteinskih kompleksa, ponovno namotavanje pogrešno smotanih proteina, spriječavanje agregacije proteina i poticanje razgradnje ireverzibilno oštećenih proteina (Datillo i sur., 2015). Njihovu važnost naglašava i podatak da je oko 30 % svih novosintetiziranih proteina u fiziološkim uvjetima pogrešno smotano i sklono agregaciji (Penke i sur., 2018).

Hsp koji sudjeluju u nadgledanju i asistiranju pri smatanju i transportu njihovih proteina 'klijenata' nazivaju se još i molekulski šaperoni. Definicija molekulskih šaperona kaže da su to oni proteini koji interagiraju, stabiliziraju ili pomažu drugim proteinima da postignu svoju nativnu i funkcionalno aktivnu konformaciju, bez da su sami prisutni u finalnoj strukturi (Smith i sur., 2018). Ključan podatak za razumijevanje uloge molekulskih šaperona jest činjenica da su sve informacije koje su potrebne za zauzimanje ispravne trodimenzionalne strukture proteina sadržane u njegovoj primarnoj strukturi. Dakle, molekulski šaperoni nemaju ulogu u vođenju ovog intrinzički autonomnog procesa, nego u osiguravanju protektivnog mikrookoliša za njegovo nesmetano odvijanje (Van Noort, 2008).

4.3.2. Transkripcijski faktori aktivirani toplinskim stresom (HSF)

Kada je proteostaza narušena, stanice nastoje povećati koncentraciju molekulskih šaperona kako bi što je više moguće prevenirale oštećenja proteina i, nakon prestanka djelovanja stresora, što brže i učinkovitije popravile sva oštećanja koja su nastala. Povećanje koncentracije Hsp uslijed stresa regulirano je transkripcijskim faktorima iz obitelji faktora toplinskog stresa (HSF) koja se kod kralježnjaka sastoji od 4 člana (Penke i sur., 2018). Osim njihove uloge u poticanju ekspresije Hsp u stanju stresa, oni su također bitni regulatori staničnog rasta i diferencijacije. HSF1 je najintenzivnije proučavani faktor i on je primarno zadužen za regulaciju odgovora stanice na stres (Penke i sur., 2018).

HSF1 se u fiziološkim uvjetima u stanicama sisavaca nalazi u citoplazmi u svom monomernom inaktivnom obliku u kompleksu s nekoliko određenih Hsp-ova. Uslijed indukcije stresa koja dovodi do pojave pogrešno smotanih proteina, Hsp iz kompleksa s HSF1 odlaze zbrinuti pogrešno smotane proteine dok HSF1 ostaje sam, što predstavlja signal za njegovu aktivaciju (Penke i sur., 2018). Nadalje, HSF1 prolazi brojne post-translacijske modifikacije, od kojih su neke hiperfosforilacija, deacetilacija i sumoilacija, koje omogućavaju HSF1 da se trimerizira i translocira u jezgru (Penke i sur., 2018). U jezgri se trimerizirani HSF1 veže za element odgovoran za ekspresiju gena toplinskog stresa (HSE) koji se nalazi unutar promotorske regije gena koji su odgovorni za stanični odgovor na stres. Vezanje HSF1 na HSE konačno pokreće transkripciju i translaciju gena za Hsp. Cijeli ciklus aktivacije HSF-a jako je brz proces što potvrđuje činjenica da se HSF vezan na DNA može detektirati unutar nekoliko minuta od djelovanja toplinskog stresa na stanicu (Penke i sur., 2018).



Slika 5. Aktivacija HSF i njegovo poticanje transkripcije Hsp (preuzeto iz Whitley i sur., 1999).

Indukcija HSF1 toplinskim stresom kod starijih štakora slabi što sugerira slabljenje ovog regulatornog mehanizma starenjem (Penke i sur., 2018). Funkcionalnost staničnog odgovora na stres također je smanjena u mozgu zahvaćenom NDD-om, što je dokazano na primjeru malog mozga štakora koji je model za AD kod kojeg je koncentracija HSF1 u neuronima bila snižena (Penke i sur., 2018). Eksperimentalno je dokazano da pretjerana ekspresija HSF1 kod vrste *Caenorhabditis elegans* odgađa nastup agregacije poliQ proteina i produžuje životni vijek organizma (Penke i sur., 2018). Ova istraživanja upućuju na činjenicu da se starenjem smanjuje funkcionalnost staničnog odgovora na stres i da bi to mogao biti uzrok razvoja NDD-a kod starijih osoba. Jednako tako, poticanje ekspresije HSP različitim farmakološkim agensima i njihov protektivni učinak na stanice predstavlja obećavajuću strategiju za odgađanje nastanka NDD-a (Penke i sur., 2018).

4.3.3. Podjela proteina toplinskoga stresa

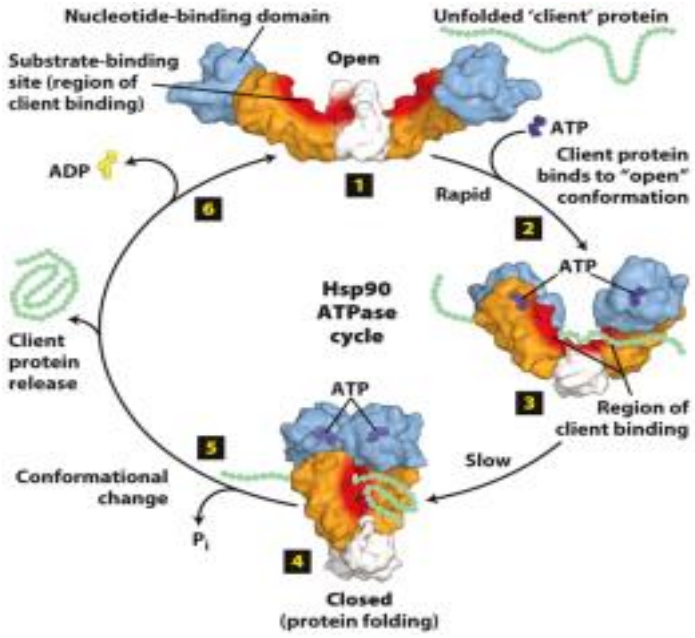
Hsp-ovi su tradicionalno klasificirani prema njihovim relativnim molekulskim masama. Međutim, njihov rastući broj i rezultirajuća inkonzistentnost u njihovom imenovanju potaknula je znanstvenika Kampinga i njegove suradnike da uvedu novu nomenklaturu humanih Hsp-ova. Oni su trenutno svrstani u sljedeće skupine: HspH (Hsp110), HspC (Hsp90), HspA (Hsp70), DNAJ (Hsp40), HspB (mali HSP) i obitelj šaperonina HspD/E (Hsp60/Hsp10) i CCT (TRiC) (Penke i sur., 2018).

HspC/Hsp90 obitelj proteina predstavlja najbrojniju skupinu proteina u stanici koja čini 1-2 % sveukupnog proteinskog sadržaja stanice (Penke i sur., 2018). Ova obitelj Hsp-ova obuhvaća konstitutivno eksprimirane i inducibilne članove koji se nalaze u citosolu i HspC4/GRP44 koji je specifičan za endoplazmatski retikul (Penke i sur., 2018). Hsp90 jest molekularni šaperon čija je funkcija ovisna o ATP-u i koji sudjeluje u aktivaciji i stabilizaciji proteina koji su bitni za funkciju stanice poput proteinskih kinaza, regulatora staničnog ciklusa, receptora s površine stanice i transkripcijskih faktora (Smith i sur., 2015). Iz toga se može zaključiti da Hsp90 ima bitnu ulogu u staničnim procesima koji uključuju prijenos signala, progresiju staničnog ciklusa, apoptozu i degradaciju proteina.

Mehanizam kojim Hsp90 potpomaže zauzimanje pravilne konformacije kod svojih proteina klijenata još nije do kraja objašnjen, ali sigurno je da obuhvaća uzastopne cikluse vezanja i otpuštanja supstrata koji su popraćeni konformacijskim promjenama Hsp90. Pojednostavljeno se može reći da Hsp90 ciklički izmjenjuje svoju otvorenu i zatvorenu konformaciju uz odgovarajuće vezanje i otpuštanje proteina klijenta, a energiju za konformacijske prijelaze dobiva od hidrolize ATP-a. Ciklusi vezanja i otpuštanja supstrata ponavljaju se dok on ne zauzme svoju ispravnu konformaciju (Smith i sur., 2015).

Hsp90 postoji u obliku homodimera kod kojega se svaka podjedinica sastoji od 3 domene: N-terminalne ATP-vezujuće domene (N-domena), središnje domene koja veže supstrat (M-domena) i C-terminalne dimerizacijske domene (C-domena). U odsutnosti ATP-a, Hsp90 zauzima otvorenu konformaciju V-oblika i u toj konformaciji se veže supstrat u području M-domene. Vezanje ATP-a u području N-domene inducira konformacijsku promjenu koja izaziva zatvaranje otvora iznad džepa u kojemu je vezan ATP poput poklopca koji zatvara posudu. Nakon zatvaranja džepa u kojemu se nalazi ATP, N-domene dimeriziraju i formiraju kompaktnu strukturu sa zatvorenom konformacijom. Formiranje zatvorene konformacije inducira hidrolizu ATP-a koja izaziva disocijaciju N-domena i povratak Hsp90

u njegovu otvorenu konformaciju u kojoj je moguće otpustiti supstrat (Smith i sur., 2015).



Slika 6. Redoslijed konformacijskih promjena koje Hsp90 prolazi tijekom procesa u kojem proteinu klijentu pomaže zauzeti funkcionalnu konformaciju (preuzeto sa https://www.studyblue.com)

Reakcijski ciklus Hsp90 reguliran je pomoću različitih ko-šaperona koji ispoljavaju specifične preferencije prema vezanju za različite Hsp90 konformacije i utječu na neke stadije ciklusa, kao što su vezanje proteina klijenta i hidroliza ATP-a (Smith i sur., 2015).

HspA/Hsp70 obitelj sastoji se od konstitutivno eksprimiranih članova (HspA8/Hsc70), inducibilnih članova (HspA1/Hsp70) i članova specifičnih za određeni stanični odjeljak kao što je HspA5/GRP78 koji se nalazi u endoplazmatskom retikulu. HspA5/GRP78 ima ključnu ulogu u sintezi i ispravnom smatanju novosintetiziranih proteina te njihovom transportu iz jezgre u citoplazmu preko endoplazmatskog retikula (Penke i sur., 2018). Hsp70 je uključen u cijeli niz staničnih procesa koji obuhvaćaju pravilno smatanje novosintetiziranih proteina, ponovno smatanje pogrešno smotanih i agregiranih proteina, transport proteina preko membrana staničnih odjeljaka i degradaciju proteina (Smith i sur., 2015). Ove se funkcije Hsp70 oslanjaju na njegovu sposobnost da stupa u interakciju s hidrofobnim regijama koje su izložene na površini pogrešno smotanih proteina. Nakon vezanja supstrata, Hsp70 prolazi uzastopne cikluse vezanja i otpuštanja proteina klijenta koji su ovisni o ATP-u sve dok on ne

postigne svoju funkcionalnu konformaciju (Smith i sur., 2015). Hsp70 se sastoji od N-terminalne ATPazne domene (NBD) i C-terminalne domene koja veže supstrat (SBD). Domene Hsp70 podijeljene su u subdomene koje zajedno formiraju hidrofobni džep i poklopac. NBD i SBD su povezane s fleksibilnom regijom koja omogućava NBD-u da alosterički kontrolira konformaciju SBD-a. Kada je unutar NBD vezan ATP, hidrofobni džep i poklopac su u otvorenoj konformaciji i SBD ima nizak afinitet vezanja supstrata. Hidroliza ATP-a do ADP-a dovodi SBD u stanje u kojemu ima velik afinitet za vezanje supstrata i to tako što zatvara poklopac iznad hidrofobnog džepa i omogućuje stabilno vezanje supstrata. Otpuštanje ADP-a i ponovno vezanje ATP-a uzrokuje otvaranje poklopca i otpuštanje supstrata (Smith i sur., 2015).

Reakcijski ciklus Hsp70 ima dva koraka koji određuju brzinu reakcije. Prvi je hidroliza ATP-a, zbog niske bazalne ATPazne aktivnost Hsp70, a drugi je disocijacija ADP-a, zbog visokih razina ATP-a u citoplazmi u fiziološkim uvjetima. Iz tog razloga, Hsp70 treba pomoć ko-šaperona koji mogu olakšati ta dva reakcijska koraka i tako ubrzati cijeli ciklus reakcija. ATPaznu aktivnost Hsp70 mogu stimulirati članovi DnaJ (Hsp40) obitelji putem svoje konzervirane J domene. Disocijacija ATP-a zahtjeva otvaranje hidrofobnog džepa, a taj proces mogu katalizirati faktori za izmjenu nukleotida (NEFs) koji obuhvaćaju Hsp110, HspBP1, SIL1 i BAG obitelj proteina (Smith i sur., 2015).

DnaJ/Hsp40 su bitni regulatori aktivnost Hsp70 zbog svoje sposobnost da stimuliraju hidrolizu ATP-a i promoviraju interakciju Hsp70 s određenim proteinima klijentima. Svi članovi DnaJ obitelji sadrže konzerviranu regiju sastavljenu od 70 aminokiselina i strukturiranu u obliku 4 α-heliksa koja se zove J domena. U sklopu J domene, heliks II i heliks III formiraju antiparalelnu strukturu unutar koje se nalazi petlja koja povezuje 2 heliksa, a sastoji se od histidin-prolin-aspartat (HPD) motiva. Taj motiv je ključan za snižavanje aktivacijske energije hidrolize ATP-a (Smith i sur., 2015).

Svi članovi obitelji Hsp40 sadrže J domenu, ali se razlikuju prema strukturi ostatka molekule i iz tog razloga imaju specijalizirane funkcije. Jedna od tih funkcija je usmjeravanje molekule Hsp40 na specifičnu unutarstaničnu lokaciju gdje potiče interakciju Hsp70 s određenim proteinima klijentima koji se nalaze na toj lokaciji (Smith i sur., 2015). Nadalje, određeni Hsp40 imaju domene koje vežu klijente i sposobne su ih dostaviti Hsp70 šaperonu kako bi ih on mogao vezati na svoju SBD. Postoje također i specijalizirane domene koje imaju ulogu u usmjeravanju klijenata prema sustavima za degradaciju proteina (Smith i sur., 2015). Najpoznatiji Hsp40 s takvom funkcijom je protein koji je u interakciji sa C-

terminalnim krajem Hsc70 proteina, odnosno CHIP. On je sposoban ostvariti interakcije s članovima obitelji Hsp70 i reducirati njihovu šaperonsku i ATPaznu aktivnost (Penke i sur., 2018). Osim toga, CHIP može djelovati i kao E3-ubikvitin-ligaza i tako ubikvitinirati i uputiti prema razgradnji u proteasomu proteine klijente prethodno vezane na Hsp70 ili na HspB obitelj šaperona (Penke i sur., 2018). Na ovaj način, CHIP povezuje molekularni šaperonski sa staničnim degradacijskim sustavom i promovira degradaciju ireverzibilno oštećenih proteina. Odluka o tome hoće li određeni protein biti upućen u degradaciju ili će se pokušati ispravno smotati u kojoj sudjeluje CHIP, zove se 'molekulska trijaža' i centralni je događaj u postupku stanične kontrole kvalitete proteina (Penke i sur., 2018). Disfunkcija toga sustava može dovesti do akumulacije pogrešno smotanih proteina što je dokazanu u pokusu s mišem kojemu je *knock-out* postupkom izbačen gen koji kodira za CHIP i koji je posljedično pokazao značajno skraćen životni vijek i ubrzano starenje (Penke i sur., 2018).

HspB, odnosno obitelj malih Hsp, razlikuje se od ostalih šaperona po tome što je njihovo djelovanje neovisno o ATP-u. Humani genom kodira 10 malih Hsp čija je masa 12 - 42 kDa. Strukturna komponenta, koja im je svima zajednička, jest α-kristalinska domena koja se sastoji od 100 aminokiselina. Ostatak strukture čine, za svakog pojedinog člana specifični, C- i N-terminalni ostatci koji sudjeluju u prepoznavanju supstrata i formiranju oligomera (Smith i sur., 2015). Aktivnost HspB proteina posredovana je fosforilacijom serinskih ostataka i ovisi o njihovom oligomernom statusu. HspB proteini konstitutivno su eksprimirani u nekoliko tipova stanica, ponajviše u očnoj leći u kojoj imaju ulogu glavnih strukturnih proteina koji održavaju transparentnost leće. HspB5 (αB-kristalin), HspB1 (Hsp27) i Hsp (MKBP) konstitutivno su eksprimirani u srčanom i skeletnim mišićima (Penke i sur., 2018). Njihova najvažnija uloga jest vezanje za pogrešno smotane proteine i preveniranje formacije netopljivih proteinskih agregata dok ih ATP-ovisni Hsp-i ne budu u mogućnosti preuzeti i prevesti u njihovu ispravnu konformaciju. HspB detektirani su kao integralni dio proteinskih agregata *in vivo* što upućuje na njihovu ulogu 'agregaza'. Iako su i konstitutivno eksprimirani, koncentracija u stanici poveća se za vrijeme toplinskog stresa, te oni odmah počnu sekvestrirati destabilizirane proteine u jedan dio stanice. Nakon otklanjanjanja stresora, kada se razina ATP-a u stanici povisi do uobičajenih vrijednosti, pogrešno smotani proteini disociraju od HspB šaperona i vežu se na ATP-ovisne Hsp-e koji će im omogućiti ponovno zauzimanje ispravne konformacije (Penke i sur., 2018).

HspD/E (Hsp60/Hsp10) i CCT (TRiC) zovu se još i šaperonini. Po strukturi su veliki prstenasti kompleksi koji zatvaraju centralnu šupljinu. Supstrati su im najčešće još nepotpuno smotani proteini koje inkapsuliraju u svojoj centralnoj šupljini i na taj način štite njihove izložene hidrofobne produžetke od agregacije, te omogućavaju supstratima zauzimanje ispravne konformacije unutar zaštićenog mikrookoliša (Smith i sur., 2015). Šaperonini se dijele u dvije podskupine. U prvu spada Hsp60 koji se kod eukariota nalazi u mitohondriju i koji za svoju funkciju treba pomoć ko-šaperona Hsp10. Taj ko-šaperon ima ulogu poklopca koji se smiješta povrh centralne šupljine Hsp60. U drugu skupinu spadaju šaperonini pronađeni u termosomima arheja i u citosolu eukariota (CCT ili TRiC) koji ne trebaju pomoć ko-šaperona (Smith i sur., 2015).

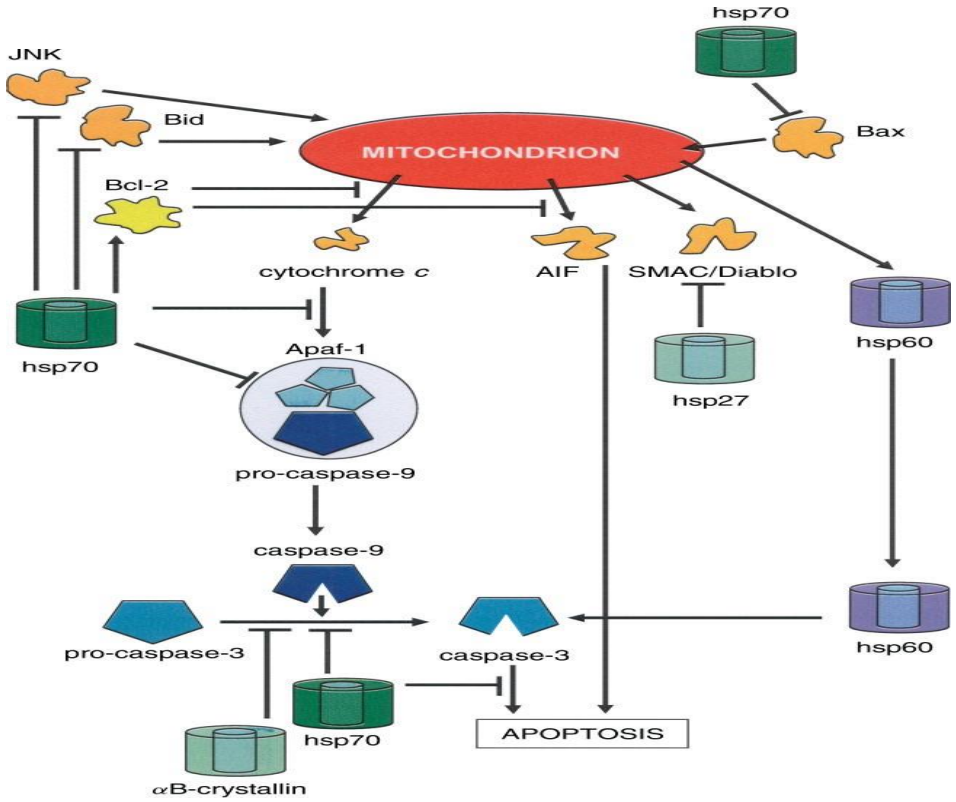
4.3.4. Novootkrivene uloge molekulskih šaperona

Osim asistencije koju pružaju proteinima prilikom njihovog zauzimanja ispravne konformacije, molekulski šaperoni imaju još cijeli niz drugih uloga što potvrđuju nedavno provedene studije. Jedna od njih je spriječavanje ili poticanje odlaska stanice u apoptozu djelovanjem na određene članove apoptotičke kaskade.

Postoje dva puta preko kojih se može inducirati apoptoza kod sisavaca, a to su intrinzični i ekstrinzični put (Van Noort, 2007). Intrinzični se put aktivira permeabilizacijom vanjske membrane mitohondrija koja dovodi do otpuštanja faktora koji pokreću apoptotičku kaskadu. Neki od tih faktora su citokrom c, EndoG, faktor koji inducira apoptozu (AIF) i HtrA2. Otpuštanje citokroma c iz mitohondrija omogućuje njegovo vezanje s adaptorskim proteinom Apaf-1 u citoplazmi s kojim formira kompleks. Taj kompleks regrutira i aktivira prokaspazu 9 koja je onda sposobna aktivirati prokaspazu 3. Kaspaza 3 je konačni izvršitelj apoptoze jer ima mogućnost proteolitički degradirati brojne stanične komponente. Ekstrinzični apoptotički put induciraju ligandi koji se vežu na receptore smrti eksprimirane na staničnoj membrani koji sadrže domene smrti. TNF receptor 1 i Fas su neke od najpoznatijih domena smrti čija uloga je regrutiranje adaptora iz citoplazme i indukcija samo-aktivacije pro-kaspaze 8 koja inicira apoptozu stanice aktivacijom kaspaze-3 (Van Noort, 2007).

Protektivni učinak Hsp70 koji se ispoljava inhibicijom apoptoze dokazan je na mišijem modelu cerebralne ishemije, a jednak učinak sličnim mehanizmom dokazan je i za α-kristaline na modelu autoimunog encefalomijelitisa (Van Noort, 2007). Jedan od mehanizama putem kojih se to odvija jest inhibicija aktivacije pro-apoptotičkog faktora Bid koji u svom aktiviranom obliku promovira otpuštanje citokroma c iz mitohondrija. Za aktivaciju faktora

Bid nužna je aktivirana kaspaza 8 koju su Hsp70 i αB-kristalini sposobni inhibirati i na taj način onemogućiti odlazak stanice u apoptozu (Van Noort, 2007). Hsp za svoju ulogu u regulaciji apoptoze, jednako kao i za ostale uloge, trebaju pomoć ko-šaperona. Prirodni ko-šaperon Hsp70 je Hsp40, dok Hsp60 uvijek prati njegov ko-šaperon Hsp10. Hsp mogu interagirati i s drugim apoptotičkim molekulama nizvodno od mitohondrija i blokirati kaskadu reakcija koje bi dovele do smrti stanice. Čini se da Hsp70 inhibira formaciju apoptosomskog kompleksa između citokroma c i Apaf-1 direktnom interakcijom s Apaf-1 koja prevenira formaciju njegovog aktivnog oblika samo-oligomerizacijom. αB-kristalini pokazuju sposobnost vezanja pro-kaspaze 3 i preveniranja njene aktivacije putem kaspaze-8 ili kaspaze-9 (Van Noort, 2007). Međutim, ne djeluju svi šaperoni na način da inhibiraju apoptotičke procese. Pokazalo se da Hsp60 u kombinaciji sa svojim ko-šaperonom Hsp10, promovira aktivaciju kaspaze-3. Hsp60 je smješten u mitohondriju, a ireverzibilno oštećenje mitohondrija je definitivni signal za odlazak stanice u apoptozu jer je nespojivo s preživljenjem stanice. Uslijed ireverzibilnog oštećenja mitohondrija i njegove permeabilizacije, Hsp60 izlazi u citoplazmu i djeluje na kaspazu 3 koja je finalni izvršitelj apoptoze stanice. To predstavlja jedini smisleni mehanizam koji se aktivira u slučaju nepovratnog oštećenja stanice kakvo je ireverzibilno oštećenje mitohondrija. Na sličan način Hsp utječu na signalnu kaskadu usmjerenu k apoptozi koja je pokrenuta djelovanjem na ekstracelularne receptore. Vezanjem signalnih molekula na Fas domene receptora smrti koje se nalaze na membrani stanice, pokreće se intracelularna signalizacija usmjerena prema apoptozi koju zaustavljaju Hsp70 i mali Hsp, najvjerojatnije svojim inhibitornim djelovanjem na aktivaciju fosfolipaze A2 (Van Noort, 2007).



Slika 7. Regulacija intrinzičnog puta apoptoze proteinima toplinskog stresa (preuzeto iz Van Noort, 2007).

Smatra se da Hsp također sudjeluju u procesiranju stranih antigena i njihovoj prezentaciji na površini antigen-prezentirajućih stanica (APC). Hsp70 i Hsp90 su povezani sa transporterom koji sudjeluje u procesiranju antigena namijenjenih uklapanju u MHC I prezentacijski kompleks i izlaganju na površini stanice. Za Hsp90 i Gp96 je dokazano da su šaperoni peptida koji prolaze kroz endoplazmatski retikul nakon njihove obrade preko ubikvitin-proteasomskog sustava. Nakon izlaska iz endoplazmatskog retikula, ti će peptidi biti uklopljeni u MHC I klasu molekula i prezentirani na površini stanice (Van Noort, 2007). Nedavno je dokazano i da Hsp90 i Hsp70 služe kao šaperoni peptidima koji će biti uklopljeni u MHC II kompleks molekula, što se odvija preko endosomalno-lizosomalnog puta (Van Noort, 2007).

Još jedna od intracelularnih funkcija Hsp jest i regulacija upalnog odgovora unutar neurona i glija stanica. U jednom je eksperimentu dokazano da Hsp70 interferira sa fosforilacijom IκB koju provodi IKK. Ta interakcija dovodi do smanjene produkcije upalnih medijatora čija ekspresija se pokreće pomoću transkripcijskog faktora NF-κB. Hsp27 također inhibira NF-κB interferancijom s funkcijom IKK (Van Noort, 2007). Nedavno se pojavila do sada nevjerojatna pretpostavka da neki Hsp imaju ulogu ekstracelularnih signalnih molekula koji djeluju na membranske receptore i pokreću unutarstanične signalne kaskade poput ostalih

upalnih medijatora (Van Noort, 2007). Čini se da Hsp mogu u stanici, ovisno o situaciji, pokrenuti pro-upalni ili protu-upalni odgovor. Eksperimentima se pokušavala potvrditi činjenica da se Hsp izlučuju u ekstracelularni prostor i to je zaista i potvrđeno u nekoliko istraživanja (Van Noort, 2007). Još 1986. godine je opaženo da se Hsp mogu prenositi iz glija stanica u neurone (Van Noort, 2007). Smatra se da je razlog tome zaštita koju glija stanice pružaju ranjivijim neuronima predajom svojih Hsp, koji onda posljedično podižu razinu tolerancije na stres u neuronima. Postavlja se pitanje mehanizma kojim se Hsp izlučuju iz glija stanica. Prva najjednostavnija pretpostavka bila je da se uslijed nekroze stanice koji je uzrokvao stres Hsp oslobode u izvanstanični prostor. Ta pretpostavka se nije pokazala vjerojatnom jer je ekstracelularne Hsp bilo moguće detektirati i u uvjetima blagog stresa koji nije mogao dovesti do nekroze stanice. Najnovija istraživanja donose pretpostavku da se Hsp izlučuju izvan stanice unutar sekretornih vezikula - egzosoma ili endosomalno-lizosomalnim putem (Van Noort, 2007).

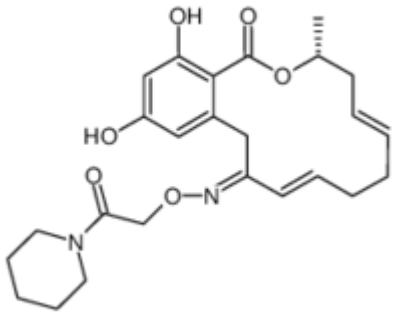
4.4. Budućnost terapije neurodegenerativnih bolesti koja uključuje Hsp

4.4.1. Inhibitor Hsp90

S obzirom na to da je AD progresivni neurološki poremećaj koji se danas dijagnosticira milionima ljudi širom svijeta, znanstvenici pokušavaju pronaći prikladnu terapiju koja bi odgodila nastanak, usporila progresiju i olakšala simptome bolesti. Terapijski pristup koji se do sada razvijao, nastojao je smanjiti razine Aβ amiloida putem inhibicije β- i γ-sekretaza. Međutim, taj pristup polučio je jako skroman uspjeh u kliničkim ispitivanjima (Wang i sur., 2017).

Drugi terapijski pristup temelji se na inhibiciji Hsp90 za koju je primjećeno da smanjuje količinu patoloških agregata u neuronima. U prethodnim istraživanjima utvrđeno je da inhibicija Hsp90 dovodi do povećanog klirensa patoloških agregata prisutnih u stanici, ali točan mehanizam preko kojeg se to odvija još uvijek nije poznat (Wang i sur, 2017). Unatoč tome, generalno je prihvaćeno da se radi o indukciji odgovora na toplinski stres u stanici koji rezultira povećanjem koncentracije ostalih šaperona, kao na primjer Hsp70, njegovih ko-šaperona Hsp40/DnaJ, Hsp27 i drugih (Wang i sur, 2017). U uvjetima u kojima na stanicu ne djeluje stres, HSF1 se u citoplazmi nalazi u kompleksu s nekoliko šaperona, među kojima je i

Hsp90 (Martin Vabulas i sur, 2010). Inhibitor Hsp90 veže se za N-terminalno ATP-vezujuće mjesto što dovodi do otpuštanja HSF1 iz njihovog kompleksa s Hsp90 u citoplazmi, trimerizacije i translokacije u jezgru. HSF1 se u jezgri veže za element odgovoran za aktivaciju transkripcije gena toplinskog odgovora (HSE) i aktivira transkripciju brojnih ciljnih gena koji uključuju gene za odgovor na toplinski stres i neke sinaptičke gene (Wang i sur., 2017). Spoj koji se za sada pokazao kao najsigurniji i najefikasniji na mišijem modelu AD-a je OS47720 ili Pochoxime C (Wang i sur., 2017).



Slika 8. Pochoxime C

Iako su se različite molekule koje su pokazivale svojstvo inhibicije Hsp90 proučavale u svrhu otkrića novih lijekova za različite karcinome i NDD, sve su pokazale dosta skroman klinički učinak. Dva najveća nedostatka svih spojeva bili su sistemska toksičnost i ograničeno prodiranje u središnji živčani sustav (Wang i sur., 2017).

Uz Pochoxime C, dvije molekule koje su imale najviše potencijala postati novi lijek za NDD bili su 17-AAG i geldanamicin. U predkliničkoj fazi ispitivanja, za sve tri molekule ispitivana su svojstva vezana za farmakokinetiku, farmakodinamiku, sistemsku toksičnost i druga. Kao glavni nedostatak 17-AAG pokazala se ograničena permeabilnost u središnji živčani sustav, dok je kod geldanamicina najveći problem sistemska toksičnost. U jednom od eksperimenata, uspoređivana je sistemska toksičnost spojeva na 3 laboratorijska miša. Svaki miš je jednom dnevno primao jednu intraperitonealnu injekciju odabranog spoja i praćena su toksična oštećenja organa. Miš koji je primao geldanamicin preminuo je unutar 24 sata, dok su druga 2 miša nastavila primati 17-AAG, odnosno Pochoxime C. Do 5. dana, ¾ miševa koji su primali 17-AAG počeli su pokazivati znakove teške letargije i oštećenja organa, dok miševi koji su primali Pochoxime C do kraja eksperimenta nisu pokazali nikakve znakove

oštećenja (Wang i sur., 2017).

Zadovoljavajuća je i farmakokinetika Pochoxima C jer pokazuje jako dobru biodostupnost i prodiranje u središnji živčani sustav. Farmakodinamski učinci obuhvaćaju indukciju toplinskog stresnog odgovora i pojačanu ekspresiju sinaptičkih proteina sinaptofizina, PSD94 i BDNF (Wang i sur., 2017). Uzrok tome je činjenica da je HSE koji se nalazi na DNA i na koji se veže aktivirani HSF1, odgovoran za pokretanje transkripcije ne samo gena toplinskog odgovora, nego i gena koji kodiraju za sinaptičke proteine (Wang i sur., 2017).

Kako bi se utvrdilo vremensko trajanje farmakodinamskih efekata i ciljna tkiva na koja djeluje inhibitor Hsp90, mjerene su koncentracije Hsp70 i sinaptičkog proteina PSD95 kroz 2 dana u različitim tkivima. Inhibicija Hsp90 dovela je do najznačajnije ekspresije Hsp70 u jetri, dok je u hipokampusu zamjećena slaba ekspresija Hsp70, ali su zato razine PSD95 bile znatno povišene. Motorni neuroni u kralježničnoj moždini su pokazali jako slabu indukciju Hsp70 koju skoro nije uopće bilo moguće detektirati. Ovaj pronalazak je konzistentan sa prijašnjim istraživanjima u kojima je primjećeno da motorni neuroni imaju jako visok prag za aktivaciju toplinskog stresnog odgovora, što objašnjava njihovu izuzetnu ranjivost i činjenicu da oni podliježu najbržoj progresivnoj degeneraciji tijekom NDD-a (Wang i sur., 2017).

Najbitniji zaključak koji slijedi iz prethodno opisanih eksperimenata je da je indukcija toplinskog stresnog odgovora u neuronima hipokampusa relativno slaba, ali je zato indukcija proizvodnje sinaptičkih proteina jaka i dugotrajna. Ovi pronalasci impliciraju potencijalno bitnu ulogu HSF1 u očuvanju neuroloških funkcija koje obično povezujemo s hipokampusom, a to su učenje i pamćenje. Postoji nekoliko teorija o razlogu slabe indukcije toplinskog stresnog odgovora u neuronima koje ne moraju biti međusobno isključive, a to su:

1) prisutnost intrinzičnih represora za HSE u neuronima,
2) činjenica da je sam HSF1 na drugačiji način reguliran u neuronima
3) postojanje intrinzičnog inertnog neuronalnog *iHSP70* promotora (Wang i sur., 2017).

Povećane koncentracije sinaptičkih proteina u neuronima dovode do povećanja neuroplastičnosti mozga indukcijom formiranja izdanaka neurona i jačanjem sinapsi. Nakon samo jedne injekcije Pochoxima C zabilježena je ekspresija gena koji kodiraju za sinaptičke proteine u trajanju dužem od 3 dana što se može pripisati brojnim mehanizmima koji između ostalog obuhvaćaju i transkripcijsku regulaciju. Osim indukcije transkripcije gena na razini DNA, smatra se da su za povećanje koncentracije sinaptičkih proteina odgovorni i drugi za sada nepoznati mehanizmi. To ne čudi s obzirom na činjenicu da proteina koji se smatraju klijentima Hsp90 u neuronu ima preko 800 i inhibicija samog Hsp90 mogla bi neizravno

utjecati na svaki od njih. Neki od tih proteina jesu membranski receptori koji su ključni za neuronalnu transmisiju (AMPAR), kao i proteini koji reguliraju posttranskripcijske mikroRNA i translacijske procese (Wang i sur., 2017).

Neometana neuronalna komunikacija između različitih struktura u mozgu nužna je za normalno odvijanje kognitivnih procesa. Odraz neuronalne akivnosti između dviju ili više regija u mozgu je stupanj poklapanja oscilatornih moždanih valova između tih regija. Mjerenje stupnja poklapanja može se provesti umetanjem elektroda na mjesta između kojih želimo mjeriti moždanu aktivnost. Abnormalnosti u koherenciji oscilacija valova povezuje se s AD-om kod ljudi i kod eksperimentalnih životinja, te se zbog toga predviđa da bi mjerenje koherencije moždane aktivnosti u budućnosti moglo služiti kao biomarker za AD. Koherencija u polju lokalnog potencijala (LPF) između prefrontalnog korteksa i hipokampusa povezana je s pozornošću, radnom memorijom i pamćenjem. Kako bi se utvrdilo utječe li Pochoxime C na koherenciju moždanih valova, mišu koji je eksperimentalni model za AD ugrađene su dvije elektrode u hipokampus kako bi se odredila koherencija moždanih valova unutar hipokampusa. Osim toga, provedeno je i mjerenje poklapanja oscilacija valova između prefrontalnog korteksa i hipokampusa također umetanjem elektroda u ta područja u mozgu. 24 sata nakon intraperitonealne injekcije Pochoxima C zabilježeno je znatno poboljšanje koherencije između dviju regija hipokampusa kao i između hipokampusa i prefrontalnog korteksa. Ti rezultati upoćuju na mogućnost poboljšanja kognitivnih funkcija kod pacijenata s AD-om koji bi bili na terapiji Pochoximom C što bi uvelike utjecalo na njihovu kvalitetu života i predstavljalo značajan pomak u terapiji AD-a (Wang i sur., 2017).

Iako brojne studije tvrde da inhibicija Hsp90 dovodi od klirensa toksičnih agregata, prilikom proučavanja Pochoxima C nije uočeno smanjenje koncentracije toksičnih agregata kod miša koji je model za AD čak niti nakon 6 mjeseci terapije (Wang i sur., 2017). Ovi kontradiktorni rezultati mogu biti odraz razlike između *in vivo* i *in vitro* pokusa jer je većina studija u kojima je zabilježen klirens proteinskih agregata provedena *in vitro* bez prikladnog neuroglijalnog okoliša koji je prisutan u mozgu. Smatra se da je manjak redukcije agregata nakon kronične primjene Pochoxima C rezultat skromne indukcije toplinskog stresnog odgovora u neuronima. Od prije je poznato da visoke razine Hsp70 i njegovih ko-šaperona potiču degradaciju toksičnih proteinskih agregata, što je eksperimentalno dokazano pretjeranom ekspresijom Hsp70 i njegovih ko-šaperona u mozgu miša s AD-om, te pretjeranom ekspresijom Hsp40 u mozgu miša sa PD-om. Čini se da tako visoku ekspresiju Hsp70 i ostalih šaperona nije moguće postići inhibicijom Hsp90 na živom modelu (Wang i sur., 2017).

Za razvoj efikasnog terapijskog pristupa za liječenje NDD, potrebno je uzeti u obzir i činjenicu da se ekspresija HSF1 proteina smanjuje normalnim starenjem organizma, te također zbog pojave NDD-a. Kod ostarjelog zdravog miša, ekspresija HSF1 u hipokampusu je smanjena za 20%. Smanjenje razine HSF1 uzrokuje proteotoksični stres koji još dodatno potiču agregirani toksični proteini karakteristični za svaki pojedini NDD bolest. Kronična primjena Pochoxima C dovela je ne samo do normalizacije HSF1 ekspresije, nego i do povišene razine bazalne ekspresije djelovanjem na *hsf1* gen mehanizmom koji još nije do kraja objašnjen (Wang i sur., 2017).

Smatra se da farmakološki agensi koji djeluju tako da aktiviraju i stabiliziraju ekspresiju HSF1 imaju potencijala za upotrebu u terapiji kroničnih NDD-a kao što je AD (Wang i sur., 2017). Između 4 trenutno poznata CNS-permeabilna Hsp90 inhibitora, Pochoxime C je jedini koji je pokazao jako dobro *in vivo* djelovanje kod AD-miša koje se odnosi na potpuni manjak sistemske toksičnosti u terapijskim dozama tijekom kronične primjene. Za njegov mehanizam djelovanja je značajno da iako je inhibitor Hsp90, učinak na klirens proteinskih agregata je minimalan, dok mu je primarno djelovanje pojačana ekspresija sinaptičkih proteina i time uzrokovano jačanje sinapsi (Wang i sur., 2017). Svi ostali inhibitori Hsp90 djeluju isključivo preko klirensa amiloida pojačavanjem odgovora na toplinski stres u stanici što nije rezultiralo značajnim uspjehom zbog slabog toplinskog stresnog odgovorora koji nije uspio potaknuti niti Pochoxime C (Wang i sur., 2017). Terapija Pochoximom C kod miša koji je eksperimentalni model za AD dovela je do vidljivog poboljšanja simptoma i usporavanja progresije bolesti dok kod ostala 3 inhibitora koji djeluju samo na klirens agregata to nije primjećeno. Iz toga proizlazi pretpostavka da se AD razlikuje od ostalih NDD-a po tome što je ona u većoj mjeri bolest u kojoj su oštećene sinapse, dok su ostale NDD u svojoj osnovi proteinopatije (Wang i sur., 2017).

Najbitniji zaključak koji je proizašao iz proučavanja Pochoxima C je da on kod miša koji je model za AD i koji ima prisutan velik broj amiloidnih agregata u mozgu djeluje tako da štiti i jača sinapse, dok količina agregata ostaje nepromijenjena. Predmet daljnjih istraživanja je pretpostavka da kombinirana terapija koja bi se sastojala od Pochoxima C, koji štiti i jača sinapse, i nekog anti-amiloidnog agensa (npr. inhibitora β-sekretaze) može biti obećavajuća terapijska opcija za liječenje simptomatskih pacijenata s AD-om (Wang i sur, 2017).

4.4.2. α-kristalini

Upala u središnjem živčanom sustavu obuhvaća niz procesa i molekula koji se uvelike razlikuju od upale na periferiji organizma zbog specifičnog okoliša koji čine dugo živući neuroni i glija stanice. Glija stanice imaju jako važnu ulogu u središnjem živčanom sustavu koja se sastoji od održavanja homeostaze i zaštite neurona od infiltracije patogena i razvoja tumorskih stanica. Rezidentne glija stanice se razvijaju i migriraju u svoj okoliš jako rano tijekom embriogeneze iz čega možemo iščitati njihovu ključnu ulogu u razvoju središnjeg živčanog sustava i zaštiti izuzetno ranjivih neurona tijekom cijelog života. Bitno je također naglasiti da su glija stanice dio urođenog imunološkog sustava i imaju sposobnost jako brzo detektirati promjenu uvjeta u središnjem živčanom sustavu i pojavu opasnosti od oštećenja, te kao takve predstavljaju prvu liniju obrane od svih vrsta inzulta (Dulle i Fort, 2016).

Potrebno je uzeti u obzir činjenicu da je imunosni odgovor općenito skup međusobno isprepletenih mreža proupalnih i protuupalnih signala, te je uključen još i cijeli niz receptora na koje se mogu vezati obje vrste signalnih molekula i tako pokrenuti različite signalne kaskade unutar stanice. Iz tog razloga, nužno je jako precizno regulirati ravnotežu između proupalnih i protuupalnih molekula kako bi se održala prikladna razina zaštite sustava, a da ne bi došlo do oštećanja stanica vlastitim imunosnim odgovorom. Međutim, često se događa da uslijed kroničnih inzulta, kao što su nezaliječene infekcije ili ozlijede, promjene u metabolizmu neurona ili povišene razine agregiranih proteina prevagnu funkciju imunosnoga sustava iz protektivne u štetnu (Dulle i Fort, 2016).

Brojna provedena istraživanja ukazuju na postojanje uzročno posljedičnog odnosa između nekontrolirane upale u središnjem živčanom sustavu i degenerativnih oštećenja mozga. U svezi s tim opažanjem postavlja se pitanje uloge malih molekularnih šaperonia (α-kristalina) koji su široko rasprostanjeni u središnjem živčanom sustavu i smješteni u neuronima i u glija stanicama, te pojačano ukoncentrirani na mjestu upale. To zapažanje je navelo znanstvenike na detaljnije proučavanje α-kristalina i dovelo do zaključka da mali molekulski šaperoni imaju puno širi spektar uloga od same asistencije koju pružaju proteinima tijekom njihovog zauzimanja ispravne konformacije, a najznačajnija od njih je uloga u imunoregulaciji (Dulle i Fort, 2016).

Do otkrića novih uloga α-kristalina o njima su bile poznate neke općenite činjenice koje se tiču njihove pripadnosti obitelji proteina toplinskog stresa čija funkcija nije ovisna o ATP-u. Za njih su karakteristični mali monomeri, sposobnost formiranja oligomernih

struktura i visoka varijabilnost proteinske sekvence između članova obitelji (Dulle i Fort., 2016). Neposredno nakon otkrića oni su klasificirani u skupinu ko-šaperona koji nemaju svoje značajnije uloge nego samo pomažu Hsp-ovima ovisnima o ATP-u prilikom obavljanja njihovih zadataka koji se tiču pravilnog smotavanja proteina, usmjeravanja nepovratno oštećenih proteina prema sustavima za degradaciju i drugih. Stvaranje poveznice između upalnog odgovora u mozgu i neurodegeneracije dovelo je do otkrića njihovih značajnih individualnih funkcija koje su puno zahtjevnije od funkcije ko-šaperona, pa su zbog toga smješteni u skupinu malih molekularnih šaperona. U početku se smatralo da su αA- i αB-kristalini zastupljeni samo u leći oka, tek je kasnije otkriveno da su zapravo široko rasprostranjeni u različitim tkivima, između ostalih i u središnjem živčanom sustavu (Dulle i Fort, 2016). Trenutno je najistaknutije područje istraživanja vezano za α-kristaline njihova funkcija u glija stanicama, potencijalna uloga α-kristalina u ekstracelularnom signaliziranju unutar mreže glija stanica u mozgu i njihova uloga u aktivaciji glija stanica (Dulle i Fort, 2016).

U skladu s tradicionalnom ulogom molekularnih šaperona jest otkriće da je ekspresija αB-kristalina povećana kod mišijeg modela PD-a u mikroglija stanicama u kojima je prisutna i povećana količina proteinskih agregata. Pretpostavlja se da αB-kristalini nastoje umanjiti postojeću povećanu količinu patoloških agregata i prevenirati njihovo daljnje nakupljanje (Dulle i Fort, 2016).

Jedna od novootkrivenih uloga koju α-kristalini imaju u imunosnom odgovoru prepoznata je proučavanjem mozga pacijenta oboljelog od AD-a. Primjećeno je da se u mozgu zahvaćenom AD-om nalazi puno veća koncentracija α-kristalina u mikroglija stanicama nego što je to slučaj kod zdrave kontrole iste dobi. Značajna je činjenica to što povećana koncentracija α-kristalina nije pronađena u svim stanicama u mozgu nego samo u onim mikroglijama koje okružuju nakupine amiloidnih plakova što sugerira uključenost αB-kristalina u prepoznavanje i fagocitozu ekstracelularnih amiloidnih depozita koji provode mikroglija stanice (Dulle i Fort, 2016). Ekspresija drugog bitnog pripadnika obitelji kristalina, αA-kristalina, ograničenija je od ekspresije αB-kristalina, tako da ne postoji puno podataka o njegovoj ekspresiji u mikroglija stanicama u mozgu. Međutim, za njega je dokazano da ima bitnu ulogu u aktivaciji mikroglija stanica (Dulle i Fort, 2016).

Povišene razine α-kristalina u glija stanicama koje su lokalizirane oko toksičnog agregata ne moraju imati ulogu isključivo u prepoznavanju i fagocitozi amiloidnih agregata. Taj fenomen može biti vezan za još jednu nekonvencionalnu ulogu α-kristalina koja se odnosi na njihovu sposobnost regulacije apoptoze. Postoje naznake da mali Hsp-ovi imaju

sposobnost vezanja pro-apoptotičkih molekula u stanici koje se aktiviraju u stanju stresa i da na taj način odgađaju odlazak stanice u apoptozu dok se krizna situacija ne pokuša prevladati drugim za to namijenjenim staničnim mehanizmima. Ugrožavajuća situacija se ne uspije uvijek riješiti jer uslijed jakog stresa dolazi do preopterećenja staničnog stresnog odgovora tako da stanica ipak na kraju ode u apoptozu (Dulle i Fort, 2016).

Nadalje, pretpostavlja se da bi uloga α-kristalina mogla biti vezana za specifičnu sposobnost mikroglija stanica da prelaze iz stanja mirovanja u aktivirano stanje kada detektiraju neku vrstu inzulta u svom okolišu. U odsutnosti patogena ili patoloških ekstracelularnih signala, mikroglija stanice su u stanju mirovanja koje je karakterizirano specifičnom staničnom morfologijom koja obuhvaća malo tijelo mikroglije s nekoliko tankih i izduženih nastavaka. U stanju mirovanja mikroglije konstantno pregledavaju svoj okoliš kako bi što prije detektirale egzogene patogene, ozljedu ili tuđe antigene u svom okolišu (Dulle i Fort, 2016). Ako dođe do aktivacije mikroglije, stanično tijelo se proširi, a nastavci se skrate tako da stanica poprimi ameboidni oblik. Aktivirane mikroglije sposobne su migrirati do mjesta inzulta i tamo pokrenuti imunosni odgovor izlučivanjem proupalnih citokina. U slučaju da uzrok pokretanja imunosnog odgovora nije uklonjen dulje vrijeme, mikroglije mogu proći još jednu preobrazbu u kojoj dobiju sposobnost fagocitoze, tako da mogu fagocitirati apoptotičke stanice i stanične ostatke koji su rezultat akutne upale koja je duže vrijeme perzistirala i zbog toga prešla u kroničnu upalu (Dulle i Fort, 2016). Pretpostavlja se da bi kristalini mogli imati ulogu u regulaciji promjene morfologije mikroglije tijekom prelaska iz stanja mirovanja u aktivirano stanje. Od prije je poznato da αB-kristalini ostvaruju interakciju s nekim proteinima koji grade stanični citoskelet, a za promjenu oblika i migraciju stanice potrebna je reorganizacija staničnog citoskeleta. Na temelju toga znanstvenici smatraju da bi povišene razine malih Hsp u mikroglijama na mjestu upale mogle igrati ulogu u skraćivanju nastavaka i migraciji aktiviranih mikroglija (Dulle i Fort, 2016).

U središnjem živčanom sustavu osim neurona i mikroglija stanica postoje i makroglija stanice u koje spadaju između ostalih i astrociti. Jednako kao i mikroglija stanice, astrociti mogu egzistirati u mirujućem i u reaktivnom stanju, ovisno o uvjetima u svom okolišu. U mirujućem stanju astrociti imaju vrlo bitnu ulogu koja obuhvaća održavanje sinaptičke homeostaze, održavanje fizioloških razina iona i neurotransmitera i dopremu hranjivih tvari neuronima iz okolnih krvnih žila. U reaktivnom stanju astrociti mijenjaju svoju morfologiju i putuju prema području ozljede u središnjem živčanom sustavu kako bi osigurali imunosnu potporu (Dulle i Fort, 2016). Povećane razine α-kristalina u astrocitima zabilježene su kod velikog broja bolesti povezanih sa upalom u središnjem živčanom sustavu. Bolesti za koje je

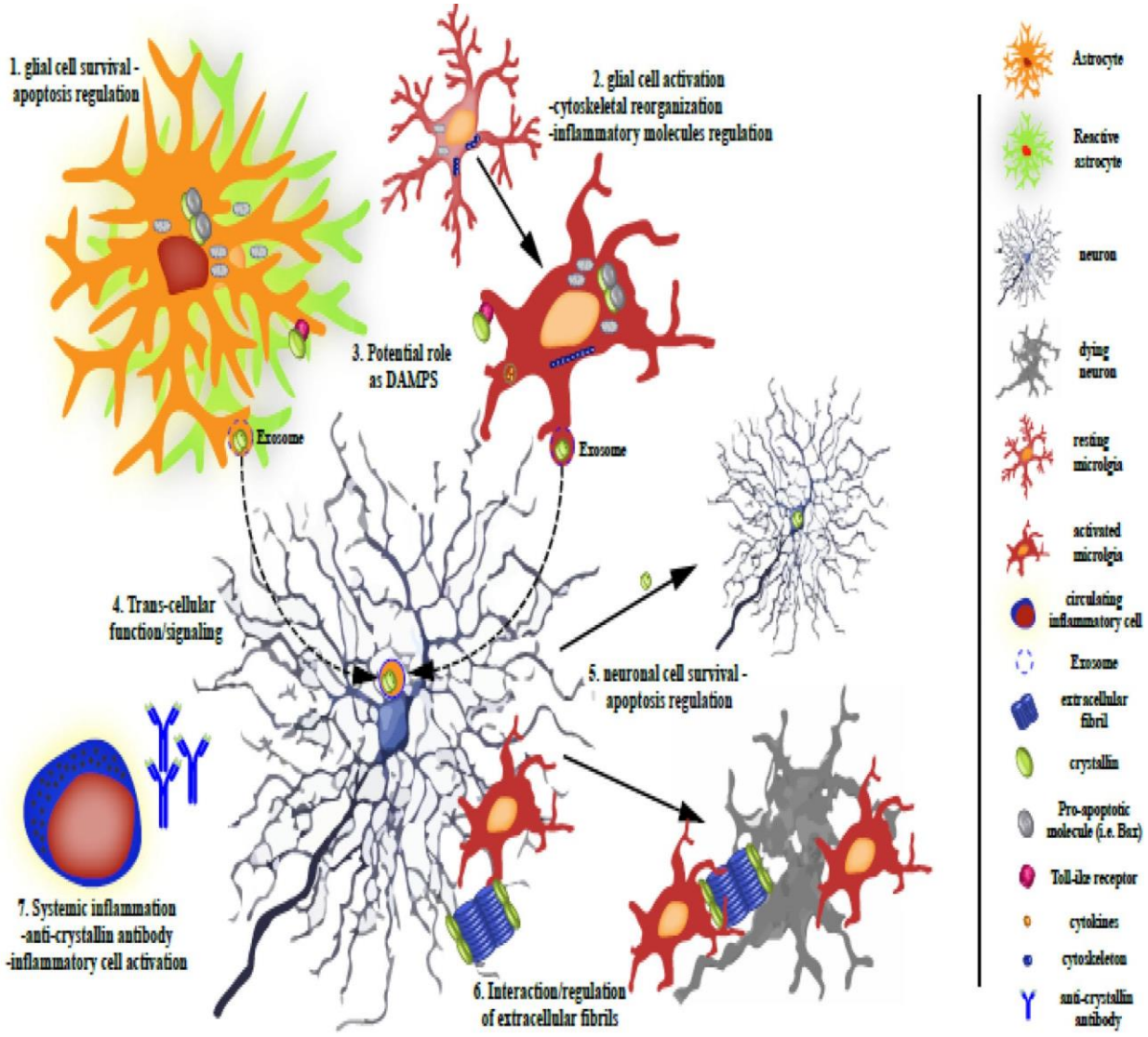
karakteristična aktivacija astrocita, tj. reaktivna astroglioza su AD, PD, Aleksandrova bolest, prionske bolesti, tauopatije, multipla skleroza, mozdani udar, traumatske ozljede i retinopatija kao posljedica dijabetesa (Dulle i Fort, 2016). Analogno funkciji α-kristalina u mikroglija stanicama, za astrocite se pretpostavlja da povećana ekspresija α-kristalina za vrijeme ili nakon aktivacije astrocita upućuje na njihovu ulogu u regulaciji funkcije reaktivnih astrocita (Dulle i Fort, 2016).

Uslijed kronične patološke upale u središnjem živčanom sustavu brojni interleukini od kojih su samo neki TNF-α i TGF-β2, vežu na membranske receptore glija stanica. Interleukini potiču ekspresiju αkristalina u aktiviranim glija stanicama što upućuje na to da α-kristalini, osim u pokretanju upalnog odgovora, imaju ulogu i u nastavku borbe protiv patogena ili nekog drugog inzulta za vrijeme kronične upale (Dulle i Fort, 2016).

Iako molekule koje sudjeluju u imunom odgovoru uvijek imaju višestruke funkcije ovisno o staničnom okolišu i fazi imunog odgovora, α-kristalini većinom djeluju protuupalno na mikroglije i astrocite tako što smanjuju produkciju citokina i ublažavaju urođeni upalni odgovor. U nekim drugim uvjetima, α-kristalini mogu djelovati na potpuno suprotan način, poticanjem ekspresije proupalnih citokina u glija stanici kao odgovor na različite podražaje iz okoliša. Te činjenice upućuju na eventualnu sposobnost α-kristalina da kontroliraju i pravilno usmjeravaju imunološki odgovor. Eksperiment koji je tu pretpostavku i potvrdio proveden je uz pomoć kulture primarnih mikroglija stanica koje su inkubirane zajedno sa pročišćenim α-kristalinima i promatrane su razine citokina. Rezultat istraživanja bio je da su ekstracelularni α-kristalini potaknuli proizvodnju proupalnih citokina TNFα i enzima iNOS kod astrocita koji su do tada bili u stanju mirovanja. U kulturi stanica su osim neaktiviranih astrocita bili prisutni i već aktivirani astrociti kod kojih dodani α-kristalini nisu izazvali nikakvu promjenu. Ova i slične studije upućuju na protuupalnu ulogu α-kristalina putem koje oni ublažavaju imunološki odgovor za vrijeme trajanja upale, ali ujedno i doprinose početnoj aktivaciji mikroglijalnih stanica (Dulle i Fort, 2016).

Nakon otkrića ekstracelularne signalizacije putem α-kristalina, pojavilo se pitanje načina na koji se mali Hsp izlučuju iz stanice. α-kristalini koji se trebaju izlučiti u ekstracelularni prostor smješteni su u vezikulnim strukturama koji osim njih sadrže i dio citoplazme, a nazvani su egzosomi. Jedna velika vezikula unutar stanice sadrži nekoliko egzosoma i njena uloga je stapanje sa staničnom membranom i otpuštanje svoga sadržaja u ekstracelularni prostor. Kada se nađu izvan stanice, egzosomi se mogu vezati na membranske receptore drugih stanica, ući u susjedne stanice, osloboditi svoj sadržaj i utjecati na signalne puteve u tim stanicama (Dulle i Fort, 2016). Još uvijek nije sa sigurnošću utvrđeno koja je

svrha ekstracelularne signalizacije putem α-kristalina. Pretpostavlja se da je svrha izlučivanja kristalina iz stanica njihova uloga u negativnoj povratnoj sprezi između stanica uključenih u upalni proces koji prevenira kroničnu, štetnu upalu. Druga teorija predlaže da bi egzosomi izlučeni iz gliija stanica mogli biti upućeni neuronima i pružati im neuroprotekciju direktnim promoviranjem preživljenja neurona (Dulle i Fort, 2016).



Slika 9. Pregled uloga koje α-kristalini imaju u upalnom stanju CNS-a (preuzeto iz Dulle i Fort, 2016).

Razvoj terapijskih strategija za bolesti koje u svojoj podlozi imaju upalu je izazovno zbog cijelog niza receptora i signalnih kaskada koje su uključene u upalni odgovor. Djelovanje na jedan signalni put nije obećavajuća strategija zbog silne isprepletenosti i

međudjelovanja molekula i signalnih puteva u upalnim bolestima. Svojstvo kristalina na kojemu počiva njihova primjena kao lijeka za NDD jest njihova sposobnost da, osim što spriječavaju štetan upalni odgovor, preveniraju i neurodegeneraciju što dovodi do redukcije i ublažavanja simptoma bolesti (Dulle i Fort, 2016).

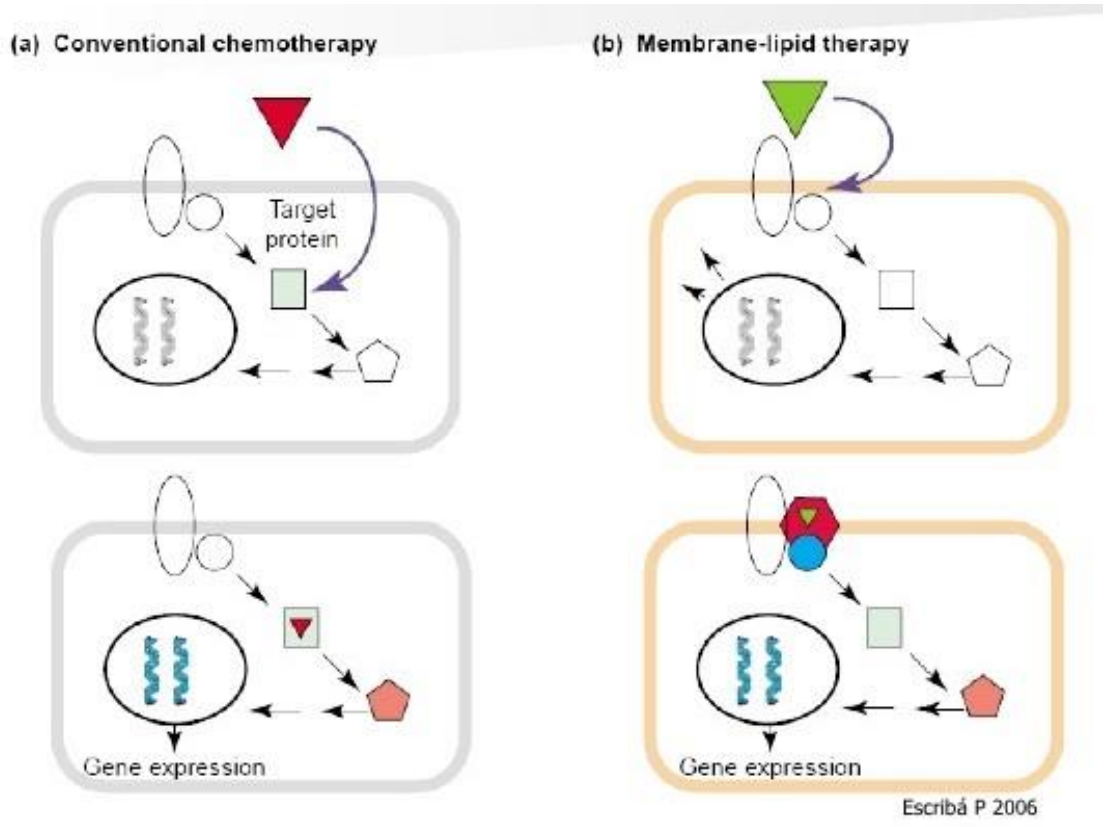
Kvalitetno pročišćavanje i održavanje pravilne konformacije proteinskih lijekova jako je bitno za očuvanje njihovog farmakološkog djelovanja, a istovremeno je i jako zahtjevno. Pokazalo se da se umjesto cijelih proteina mogu koristiti manji peptidi koji zadržavaju farmakološko djelovanje proteina, te dodatno imaju i druga povoljna svojstva. Takvi peptidi imaju šaperonsku aktivnost jako sličnu kristalinima i na jednak način interagiraju s glija stanicama tako da ublažavaju imunosni odgovor (Dulle i Fort, 2016). Još neke od njihovih prednosti su mogućnost sintetiziranja u visokim koncentracijama, bez kontaminanata i puno manja podložnost post-translacijskim modifikacijama. α-kristalini u stanici često podliježu reakcijama post-translacijske fosforilacije koja onda mijenjaju njihovu funkciju. Mjesta u strukturi kristalina koja se najčešće fosforiliraju nisu nužna za zadržavanje farmakološke aktivnosti, tako da se mogu izostaviti kod peptida, što onda povećava biodostupnost samog lijeka. Nadalje, kompletni kristalinski proteini mogu djelovati kao antigeni i aktivirati stečeni imunosni odgovor, dok se peptidi mogu dizajnirati tako da ne sadrže epitope koje prepoznaju protutijela što smanjuje rizik od aktivacije stečenog imunološkog sustava (Dulle i Fort, 2016). Konačno, kristalinski peptidi izuzetno su povoljni potencijalni lijekovi jer njihova fizikalna i kemijska svojstva dopuštaju njihovo vezanje na nanočestice ili mikro-vezikule koje ih mogu dostaviti do specifičnih ciljnih tkiva (Dulle i Fort., 2016).

4.4.3. Membranska lipidna terapija

Otkriće koje je usmjerilo znanstvenike prema dizajniranju lijekova koji se interkaliraju u staničnu membranu i tako mijenjaju unutarstaničnu signalizaciju, bila je indukcija toplinskog stresnog odgovora u stanici bez primjećene denaturacije unutarstaničnih proteina (Penke i sur., 2018). Tradicionalno je prihvaćen mehanizam u kojemu pogrešno smotani i agregirani proteini u stanici induciraju pojačanu ekspresiju Hsp-a koji onda saniraju novonastalu situaciju ponovnim smatanjem proteina koji su izgubili svoju ispravnu konformaciju ili degradacijom nepovratno oštećenih proteina (Penke i sur., 2018). S obzirom na to da je više studija rezultiralo tim istim zaključkom, postavilo se pitanje o postojanju alternativnog 'termosenzora' koji može pokrenuti stanični stresni odgovor. Postavljena je hipoteza *membranskog senzora* prema kojoj fizička svojstva membrane i organizacija

mikrodomena u staničnoj membrani imaju ključnu ulogu u pokretanju staničnog odgovora na toplinski stres (Penke i sur., 2018). Različiti stresni agensi mogu utjecati na ta svojstva promjenom fluidnosti membrane i denaturacijom membranskih proteina, što upućuje na činjenicu da je plazmatska membrana izuzetno osjetljiva meta. Hiperfluidizacija plazmatske membrane dovodi do reorganizacije mikrodomena bogatih kolesterolom što dovodi od aktivacije staničnog toplinskog odgovora (Penke i sur., 2018). Ta se činjenica može iskoristiti u kreiranju terapijske strategije jer, osim toplinskoga stresa, hipefluidizaciju stanične membrane mogu uzrokovati i brojne tvari koje nazivamo membranski fluidizatori koje na jednak način mogu potaknuti ekspresiju različitih Hsp (Penke i sur., 2018).

Starenje, NDD, dijabetes i karcinomi povezani su s promijenjenom lipidnom kompozicijom i fizikalnim svojstvima plazmatske membrane. Promjene u membranskoj kompoziciji dovode do promjena u membranskoj lipidnoj strukturi i organizaciji mikrodomena što posljedično utječe na signalne kaskade unutar stanice (Penke i sur., 2018). Suboptimalna ekspresija i funkcija molekularnih šaperona koja proizlazi iz toga pridonosi razvoju NDD-a. Osim toga, promjene lipidne fluidnosti i kompozicije stanične membrane kod starenja i AD-a potiču vezanje amiloidnih plakova na membranu i čine ju osjetljivijom na oštećenja uzrokovana β-amiloidima. Na tim činjenicama počiva koncept membranske lipidne terapije prema kojemu djelovanje na određene komponente plazmatske membrane, kao na primjer na specifične lipide ili proteine, može utjecati na unutrastanične signalne puteve regulacijom membranske strukture i kompozicije (Penke i sur., 2018). Novi farmaceutici iz te skupine ispoljavaju svoje učinke normalizacijom ekspresije molekularnih šaperona kod njihovog deficita. Bitno je naglasiti da bi ovi terapeutici trebali specifično djelovati samo na ciljno tkivo jer generalizirano povećanje ekspresije Hsp-a korelira sa karcinogenezom. Ko-induktori Hsp-a ne mogu povećati ekspresiju molekularnih šaperona bez pratećeg stresa koji od prije djeluje na stanicu, a izazvan je u ovom slučaju starenjem ili nekom određenom bolešću (Penke i sur., 2018).



Slika 10. Mehanizam djelovanja standardne terapije u usporedbi s membranskom lipidnom terapijom (preuzeto i prilagođeno sa www.picturesboss.com).

U skupinu ko-induktora Hsp-a spadaju male molekule čija je struktura bazirana na strukturi β-blokatora propranolola. Skupno se zovu derivati hidroksimične kiseline i tu spadaju bimoklomol, arimoklomol, NG-094 i BGP-15. Na molekulskoj razini, derivati hidroksimične kiseline interagiraju s membranskim lipidima (Penke i sur., 2018).

Bimoklomol interagira s kiselim membranskim lipidima i djeluje kao membranski fluidizator pri normalnim temperaturama, dok za vrijeme toplinskog stresa stabilizira membrane inhibicijom faznog prijelaza u fizikalno stanje veće fluidnosti (Penke i sur., 2018). Posljedica njegovoga djelovanja na staničnu membranu jest sinergističko poticanje ekspresije Hsp60, Hsp70 i Hsp90. Do povećane ekspresije molekularnih šaperona dolazi uslijed povećanja aktivnosti HSF1 putem njegove hiperfosforilacije i posljedičnog pojačanog vezanja na DNA regiju odgovornu za ekspresiju molekulskih šaperona (Penke i sur., 2018). Citoprotektivni efekti bimoklomola dokazani su u nekoliko eksperimentalnih uvjeta koji uključuju mišiji model ishemije i cijeljenje rane kod štakora koji je model za dijabetes. Pretpostavlja se da je taj citoprotektivni efekt rezultat koordinirane ekspresije svih značajnijih

molekularnih šaperona. Do sada je potencijalni terapijski učinak bimoklomola najviše proučavan kod dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti čija se patologija temelji na neuravnoteženoj ekspresiji Hsp. U budućnosti se očekuje istraživanje učinka bimoklomola i kod drugih bolesti sa sličnom podlogom u koje spadaju i NDD-a (Penke i sur., 2018).

Arimoklomol je drugi lijek iz skupine derivata hidroksimične kiseline koji jednako kao i bimoklomol interagira s membranskim lipidima, te putem te interakcije potiče vezanje HSF1 na DNA njegovom hiperfosforilacijom. Proučavano je njegovo djelovanje na mišijem modelu spinalne i bulbarne mišićne atrofije, naslijedne neurodegenerativne bolesti čiji se simptomi počnu pojavljivati u odrasloj dobi, a koju uzrokuje ekspanzija poliQ ponavljanja u prvom eksonu gena za androgeni receptor. Dokazano je da arimoklomol na tom modelu znatno povećava mišićnu snagu i kontraktilne karakteristike stražnjih udova miša, spašava motorne jedinice od oštećenja, potiče preživljenje motornih neurona i povećava ekspresije VGFR-a koji je pokazao neurotrofnu aktivnost (Penke i sur., 2018). Na mišijem modelu ALS-a, neizlječivog NDD-a kojeg karakterizira progresivna degeneracija motornih neurona koja dovodi do smrti organizma, arimoklomol je uspio očuvati neuromuskularnu funkciju, odgoditi početak bolesti i produljiti životni vijek (Penke i sur., 2018). Faza II kliničkih ispitivanja djelovanja arimoklomola kod pacijenata s ALS-om kod kojih je prisutna mutacija u SOD1 nedavno je završena i on se pokazao kao siguran i tolerabilan lijek (Penke i sur., 2018).

Spoj NG-091 proučavan je na modelu HD-a kod vrste *C. elegans* i pokazao je redukciju broja poliQ agregata i ublažavanje mišićne paralize uzrokovane tim toksičnim agregatima (Penke i sur., 2018).

BGP-15 za vrijeme toplinskog stresa modulira nanodomene plazmatske membrane, poznate još i kao lipidne splavi, što onda pokreće specifične signalne kaskade u stanici usmjerene na poticanje toplinskog odgovora posredovanog HSF1 (Penke i sur., 2018). Za BGP-15 specifičan je mehanizam djelovanja koji nije izravno vezan za povećanje ekspresije molekularnih šaperona, a mogao bi biti iskoristiv kod NDD-a. Jedan od pretpostavljenih puteva kojima proteinski agregati kod NDD-a oštećuju mitohondrije jest poticanje proizvodnje ROS-a (Penke i sur., 2018). Primjećeno je da se BGP-15 nakuplja u mitohondrijima, te ih tako štiti od depolarizacije membrane uzrokovane ROS-om i smanjuje nastavak proizvodnje ROS-a unutar mitohondrija koji je potaknut ROS-om iz citoplazmatskog dijela stanice. Također je dokazano da BGP-15 štiti mozak od stanične smrti neurona, te reducira infiltraciju upalnih stanica i gliozu (Penke i sur., 2018).

Derivati hidroksimične kiseline naizgled djeluju na veliki broj međusobno više ili manje povezanih meta, ali je moguće da to zapravo predstavlja njihovu prednost. Kod većeg broja

bolesti primjećeno je da parcijalna indukcija ili inhibicija više meta ima veći učinka na bolest nego djelovanje na isključivo jednu metu. Do sada primjećeni efekti koje derivati hidroksimične kiseline imaju na stanicu upućuju na to da njihovo svojstvo ko-indukcije molekularnih šaperona potječe od kombiniranog djelovanja lijeka na plazmatsku membranu i unutarstanične odjeljke (Penke i sur., 2018).

Na staničnoj membrani nalazi se niz različitih receptora na koje se vežu mnogobrojni ligandi, te na taj način pokreću ili zaustavljaju signalizacijske puteve u stanici. Iz te činjenice je vidljivo da stanična membrana ima ključnu ulogu u regulaciji stanične homeostaze, odgovoru stanice na vanjske agense i odluci o preživljenju ili smrti stanice (Cooper i sur., 2010). Uzevši to u obzir, pretpostavlja se da napredak na polju istraživanja membramske lipidne terapije vodi prema učinkovitijoj kontroli simptoma i usporavanju progresije za sada neizlječivih NDD-a (Penke i sur., 2018).

5. ZAKLJUČAK

Temeljem proučavanja problematike, a prema u radu navedenoj literaturi mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- U skupinu neurodegenerativnih bolesti (NDD-a) spadaju Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, Huntingtonova bolest, amiotrofična lateralna skleroza, frontotemporalna demencija i prionske bolesti koje skupno nazivamo proteinopatije jer im je glavna histopatološka oznaka prisutnost proteinskih agregata - amiloida.
- Amiloidi u stanici uzrokuju različite defekte u normalnom metabolizmu i proliferaciji stanice koji obuhvaćaju transkripcijske smetnje, mitohondrijsku disfunkciju i defekte u sustavu za kontrolu kvalitete proteina.
- Proteotoksične inkluzije svakom pojedinom staničnom organelu nanose za njega specifična oštećenja koja su različito zastupljena, ali se pojavljuju u istom obliku kod različitih NDD-a.
- Svaka NDD pokazuje svoj stereotipni put širenja agregata iz ishodišta prema drugim dijelovima mozga pa se postavlja pitanje sličnosti između amiloidnih i prionskih agregata.
- Hsp-ovi su proteini koji se pojačano eksprimiraju u stanjima okolišnog i metaboličkog stresa i štite stanične proteine od oštećenja mehanizmom koji obuhvaća njihovu tradicionalnu ulogu molekulskih šaperona.
- Ekspresija Hsp-a je u fiziološkim i u stresnim uvjetima regulirana putem HSF-a.
- Nekonvencionalne uloge Hsp-a jesu: sposobnost regulacije apoptoze, sudjelovanje u prezentaciji stranih antigena na površini stanice te uloga u ekstracelularnoj signalizaciji u stanju upale.
- Jedna od terapijskih opcija koja djeluje preko Hsp-a je inhibitor Hsp90 od kojih se Pochoxime C do sada pokazao kao najefikasniji i najsigurniji.
- Sintetski α-kristalini djeluju na upalu u središnjem živčanom sustavu tako što ublažavaju gliozu koja se pojavljuje kod većine NDD-a.
- Membranska lipidna terapija oslanja se na interakciju molekule lijeka s nanodomenama stanične membrane i promjenu njenih fizikalnih svojstava koje onda utječu na intracelularnu signalizaciju potičući ekspresiju Hsp.

6. LITERATURA

Amyotrophic lateral sclerosis, 2011., http://www.ghr.nim.nih.gov, pristupljeno 10.4.2019.

Blum ES, Schwendeman AR, Shaham S. PoliQ disease: misfiring of a developmental cell death program?. *Trends Cell Biol*, 2013, 4, 168-174.

Brini M, Cali T, Ottolini D, Carafoli E. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 15, 2787-2841.

Chung CG, Lee H, Lee SB. Mechanisms of protein toxicity in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci,* 2018, 75, 3159-3180.

Cooper GM, Hausman RE. Stanica: Molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 281-282., 345-346.

Dattilo S, Mancuso C, Koverech G, Di Mauro P, Ontario ML, Petralia CC, Petralia A, Maiolino L, Serra A, Calabrese EJ, Calabrese V. Heat shock proteins and hormesis in the diagnosis and treatment of neurodegenerative diseases. *Immunity and Ageing*, 2015, 12, 20. doi: 10.1186/s 12979-015-0046-8.

Dulle JE, Fort PE. Crystallins and neuroinflammation: the glial side of the story. *Biochim Byophys Acta*, 2016, 1860, 278-286.

Imbimbo BP, Lombard J, Pomara N. Patophysiology of Alzheimer s Disease. *Elsevier Saunders*, 2005, 15, 727-753.

Martin Vabulas R, Raychaudhuri S, Hayer-Hartl M, Hartl U. Protein Folding in the Cytoplasm and the Heat Shock Response. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2, a004390. doi:10.1101/cshperspect.a004390.

Penke B, Bogar F, Crul T, Santha M, Toth ME, Vigh L. Heat Shock Proteins and Autophagy Pathways in Neuroprotection: from Molecular Bases to Pharmacological Interventions. *Int J Mol Sci*, 2018, 19. pii: E325. doi: 10.3390/ijms19010325

Postmitotic cells mechanisms of ageing, 2012., http://www.agingchart.org, pristupljeno 6.4.2019.

Peters R. Ageing and the brain. *Postgrad Med J*, 2006, 82, 84-88.

Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, Simons K. Alzheimer s disease β-amyloid peptides are released in association with exosomes. *PNAS*, 2006, 30, 11172-11177.

Rewar S. A systematic review on Parkinson s disease, *IJRPB*, 2015, 3 (2), 2320-3471.

Smith HL, Li W, Cheetham ME. Molecular chaperones and neuronal proteostasis. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 40, 142-152.

Van Noort JM. Stress proteins in CNS inflamation. *J Pathol*, 2007, 214, 267-275.

Wang B, Liu Y, Huang L, Chen J, Li JJ, Wang R, Kim E, Justicia C, Sakata K, Chen H, Planas A, Ostrom RS, Li W, Yang G, McDonald M, Chen R, Heck D, Liao FF. A CNS-permeable Hsp90 inhibitor rescues synaptic dysfunction and memory loss in APP-overexpressing Alzheimer´s mouse model via an HSF1-mediated mechanism. *Mol Psychiatry*, 2017, 22 (7), 990-1001.

Whitley David, Goldberg SP, Jordan WD. Heath shock proteins: A review of the molecular chaperones. *J Vasc Surg*, 1999, 29, 748-751.

Zrinski Topić R, Mitrović Z Barišić N, Sertić J. Molekularna dijagnostika nasljednih ataksija. *Biochemia Medica*, 2006., S186-S186.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1.Sažetak

Sve stanice živoga organizma nastoje održati regularan promet proteina u stanici i njihovu ispravnu konformaciju što se zajedničkim imenom naziva proteostaza. Neuroni su, zbog svoje post-mitotičke prirode i intenzivnog metabolizma, posebno podložni poremećajima proteostaze koje uzrokuju stresni podražaji. Starenje, zajedno sa nasljedim genetskim mutacijama, dovodi do disfunkcije tih sustava i razvoja neurodegenerativnih bolesti (NDD-a).

NDD su jako česte u današnjoj populaciji zbog sve duljeg životnog vijeka stanovništva. One sa sobom nose teške kognitivne i motoričke disfunkcije koje pacijentu značajno umanjuju kvalitetu života. Terapijska strategija koja za sada najviše obećava je povećanje koncentracije molekulskih šaperona koje bi spriječilo nastanak toksičnih proteinskih agregata i umanjilo štetan utjecaj onih koji su već nastali.

Prilikom izrade ovoga diplomskoga rada korišteni su znanstveni radovi dostupni u bazama podataka PubMed, Nature i ScienceDirect, te knjiga Cooper GM i Hausman RE, Stanica: Molekularni pristup.

Svim NDD-ovima zajednička je pojava toksičnih proteinskih inkluzija koje su rezultat smanjene funkcionalnosti sustava za održavanje proteostaze i zbog toga se skupno nazivaju proteinopatije. Neovisno o tome koji mutirani protein je prisutan u neuronu, mehanizmi proteotoksičnosti vrlo su slični kod svih proteinopatija. U jezgri dolazi do sekvestracije genetskih i epigenetskih faktora, u citoplazmi toksične inkluzije dovode do disfunkcije brojnih sustava za održavanje proteostaze, dok u mitohondrijima dolazi do oksidativnih oštećenja. Proteini toplinskoga stresa (Hsp) čine iznimno bitnu komponentu svih sustava za održavanje proteostaze u stanici. Nedavna otkrića upućuju na činjenicu da Hsp, osim te temeljne uloge, imaju još i cijeli niz drugih uloga od kojih su neke sudjelovanje u apoptotičkoj kaskadi, upali i imunosnim procesima u živčanom sustavu. Najnovije terapijske strategije obuhvaćaju inhibiciju Hsp90, modulaciju upale u središnjem živčanom sustavu putem α-kristalina i membransku lipidnu terapiju.

7.2. Summary

All living cells are trying to maintain proper protein circulation inside the cell and to keep all proteins in their correct conformation. These processes are collectively named proteostasis. Neurons are, due to their post-mitotic nature and intense metabolism, extremely susceptible to proteostasis disturbances which are caused by stress stimulies. Ageing, combined with hereditary genetic mutations, leads to system disfunctions which causes neurodegenedrative disease (NDD) development.

Nowdays, NDDs are extremely common due to prolonged life expectancy. They tend to cause cognitive and motoric disfunctions that reduce patients life quality significantly. Therapeutic strategy that has shown the best results till now is increasing molecular shaperones concentration which is supposed to stop mutant proteins aggregation and reduce toxic potential of those that are already present.

This thesis is based on scientific articles which can be found in data bases PubMed, Nature and ScienceDirect. The book Cooper GM and Hausman RE, The Cell: a molecular approach, was also used as a source of information.

Toxic protein inclusions, which result from decreased protein quality control systems effeciacy, can be found in all types of NDDs that are collectively named proteinopaties. Proteotoxic mechanisms are very similar in all NDDs and they do not depend on mutant protein type. In cell nucleus, mutant proteins sequestrate genetic and epigenetic factors. In citoplasm, they lead to protein quality control systems disfinctions whereas in mitochondria, they cause oxidative damage. Heath shock proteins (Hsp) play very significant rolle in all types of protein quality control systems. The latest researches show that Hsps, except their usual rolle in protein quality control, take part in variety of other processes such as apoptotic cascades, inflamation and imunologic reactions in central nervous system. Recently d iscovered therapeutic strategies include Hsp90 inhibition, modulation of α-cristallins and membrane lipid therapy.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ULOGA PROTEINA TOPLINSKOG STRESA U NASTANKU, RAZVOJU I TERAPIJI NEURODEGENERATIVNIH BOLESTI

Iva Žurić

SAŽETAK

Sve stanice živoga organizma nastoje održati regularan promet proteina u stanici i njihovu ispravnu komformaciju što se zajedničkim imenom naziva proteostaza. Neuroni su, zbog svoje post-mitotičke prirode i intenzivnog metabolizma, posebno podložni poremećajima proteostaze koje uzrokuju stresni podražaji. Starenje, zajedno sa nasljednim genetskim mutacijama, dovodi do disfunkcije tih sustava i razvoja neurodegenerativnih bolesti (NDD-a).

NDD su jako česte u današnjoj populaciji zbog sve duljeg životnog vijeka stanovništva. One sa sobom nose teške kognitivne i motoričke disfunkcije koje pacijentu značajno umanjuju kvalitetu života. Terapijska strategija koja za sada najviše obećava je povećanje koncentracije molekulskih šaperona koje bi spriječilo nastanak toksičnih proteinskih agregata i umanjilo štetan utjecaj onih koji su već nastali.

Prilikom izrade ovog diplomskog rada korišteni su znanstveni radovi dostupni u bazama podataka PubMed, Nature i ScienceDirect, te knjiga Cooper GM i Hausman RE, Stanica: Molekularni pristup.

Svim NDD-ovima zajednička je pojava toksičnih proteinskih inkluzija koje su rezultat smanjene funkcionalnosti sustava za održavanje proteostaze i zbog toga se skupno nazivaju proteinopatije. Neovisno o tome koji mutirani protein je prisutan u neuronu, mehanizmi proteotoksičnosti vrlo su slični kod svih proteinopatija. U jezgri dolazi do sekvestracije genetskih i epigenetskih faktora, u citoplazmi toksične inkluzije dovode do disfunkcije brojnih sustava za održavanje proteostaze, dok u mitohondrijima dolazi do oksidativnih oštećenja. Proteini toplinskog stresa (Hsp) čine iznimno bitnu komponentu svih sustava za održavanje proteostaze u stanici. Nedavna otkrića upućuju na činjenicu da Hsp, osim te temeljne uloge, imaju još i cijeli niz drugih uloga od kojih su neke sudjelovanje u apoptotičkim kaskadama, upali i imunosnim procesima u živčanom sustavu. Najnovije terapijske strategije obuhvaćaju inhibiciju Hsp90, modulaciju upale u središnjem živčanom sustavu putem α-kristalina i membransku lipidnu terapiju.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 50 stranica, 10 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 19 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: neurodegenerativne bolesti, proteinski agregati, molekulski šaperoni, proteotoksičnost

Mentor: **Dr. sc. Karmela Barišić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Karmela Barišić**,*redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Donatella Verbanac, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of medicinal biochemistry and haematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

THE ROLE OF HEATH SHOCK PROTEINS IN ONSET, PROGRESSION AND THERAPY OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

Iva Žurić

SUMMARY

All living cells are trying to maintain proper protein circulation inside the cell and to keep all proteins in their correct conformation. These processes are collectively named proteostasis. Neurons are, due to their post-mitotic nature and intense metabolism, extremely susceptible to proteostasis disturbances which are caused by stress stimulies. Ageing, combined with hereditary genetic mutations, leads to system disfunctions which causes neurodegenerative disease (NDD) development.

Nowdays, NDDs are extremely common due to prolonged life expectancy. They tend to cause cognitive and motoric disfunctions that reduce patients life quality significantly. Therapeutic strategy that has shown the best results till now is increasing molecular chaperones concentration which is supposed to stop mutant proteins aggregation and reduce toxic potential of those that are already present.

This thesis is based on scientific articles that can be found in data bases PubMed, Nature and ScienceDirect. The book Copper GM and Hausman RE, The Cell: a molecular approach, was also used as a source of information.

Toxic protein inclusions, which result from decreased protein quality control systems efficiacy, can be found in all types of NDDs that are collectively named proteinopaties. Proteotoxic mechanisms are very similar in all NDDs and they do not depend on mutant protein type. In cell nucleus, mutant proteins sequestrate genetic and epigenetic factors. In cytoplasm, they lead to protein quality control system disfunctions whereas in mitochondria they cause oxidative damage. The latest research show that Hsps, except their usual rolle in protein quality control, take part in variety of other processes such as apoptotic cascades, inflamation and imunologic reactions in central nervous system. Recently discovered therapeutic strategies include Hsp90 inhibition, modulation of α-cristallins and memnbrane lipid therapy.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 50 pages, 10 figures, 1 table and 19 references. Original is in Croatian language.

Keywords: neurodegenerative disease, protein aggregates, molecular chaperones, proteotoxicity

Mentor: **Karmela Barišić**, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Karmela Barišić**, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Donatella Verbanac, **Ph.D.** *Associate Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Ortner Hadžiabdić, **Ph.D.** *Assistant Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2019