



Udział nieprawidłowej proteolizy wewnątrzkomórkowej w patogenezie otępienia w przebiegu choroby Alzheimera

The role of abnormal intracellular proteolysis in Alzheimer's dementia pathogenesis

TADEUSZ PIETRAS, PIOTR WIERZBIŃSKI

Z: 1. Pracowni Gerontologii Kliniki Pneumonologii i Alergologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

STRESZCZENIE. *Cel* – przedstawiono teorię cięcia proteolitycznego białka prekursorowego beta-amyloidu, jedną z lepiej udokumentowanych teorii powstawania otępienia w przebiegu choroby Alzheimera. *Poglądy* – Istnieją przynajmniej dwa szlaki degradacji proteolitycznej tego białka – amyloidogenny i nieamyloidogenny. Amyloid beta odpowiedzialny za tworzenie płytek starczych powstaje na drodze cięcia białka prekursorowego beta-amyloidu przez beta-sekretazę i gamma-sekretazę – endosomalno-lizosomalne proteazy apartyłowe. Składnikiem kompleksu enzymatycznego gamma sekretazy są białka preseniliny. Mutacje w genach kodujących preseniliny i białko prekursorowe beta-amyloidu są odpowiedzialne za dziedziczne postaci choroby Alzheimera. Inhibitory sekretaz budzą zainteresowanie farmakologii otępień. *Wnioski* – Teoria kaskady proteolitycznej jest dobrze udokumentowana, jednak patologia choroby Alzheimera wydaje się o wiele bardziej skomplikowana.

SUMMARY. *Aim* – the paper presents one of well-documented theories of the origin of dementia in Alzheimer's disease, concerning amyloid-beta precursor protein cleavage. *Review* – There at least two pathways of this protein proteolytic degradation, i.e. either amyloidogenic, generating amyloid beta, or non-amyloidogenic, generating soluble proteins. Amyloid beta, which is a major component of senile plaques in the brain of patients with Alzheimer's disease, is generated via the amyloidogenic pathway from amyloid-beta precursor protein through its sequential proteolytic cleavage catalyzed by beta- and gamma-secretases. Beta-secretase and gamma-secretase were identified as membrane-tethered aspartyl proteases. The presenilins are required for the proteolytic cleavage catalyzed by gamma-secretase. Mutations in the genes encoding for presenilins and amyloid-beta precursor protein are the cause of early-onset familial Alzheimer's disease. For these reasons secretases are considered an important therapeutic target in Alzheimer's disease. *Conclusion* – The proteolytic cascade hypothesis is well documented, but it may relate only to a small part of pathways leading to the pathology of brain injury with subsequent dementia in Alzheimer's disease.

Słowa kluczowe: otępienie / sekretazy / preseniliny / amyloid beta

Key words: dementia / secretases / presenilins / amyloid beta

Otępienie stanowi zespół pojawiający się w przebiegu różnych chorób neurodegeneracyjnych. Charakteryzuje się ono upośledzeniem funkcji poznawczych, a zwłaszcza pogorszeniem pamięci [Klasyfikacja 1997]. Procesy neuropatologiczne prowadzące do

zaniku mózgowia nie są dobrze poznane. Wiele rodzajów otępień związane jest z odkładaniem się patologicznych złogów białek o strukturze beta-amyloidu w obrębie mózgowia [Liberski 2001]. Wśród nich są: otępienie w przebiegu choroby Alzheimera,

otępienie w chorobie Picka, otępienie w chorobie Creutzfeldta-Jakoba, otępienie w chorobie Huntingtona, otępienie w chorobie Parkinsona oraz nieposiadające osobnego numeru w ICD-10 otępienie z ciałkami Lewy'ego [Klasyfikacja 1997]. Niektóre otępienia, jak np. otępienie naczyniowe, czy w chorobie wywołanej przez ludzki wirus nabytego upośledzenia odporności oraz niektóre przypadki otępień czołowo-skroniowych (zbliżonych klinicznie do otępienia w chorobie Picka) przebiegają bez odkładania się złogów białkowych. Sytuację komplikuje fakt współwystępowania różnych rodzajów złogów u tego samego chorego, towarzyszenie złogom ognisk niedokrwiennych i występowania podobnych złogów u ludzi zdrowych w podeszłym wieku. Nie istnieją również ściśle korelacje pomiędzy obrazem neuropatologicznym a wykrywanymi przy pomocy testów deficytami neuropsychologicznymi. Deficyty zależą raczej od uszkodzenia konkretnych ośrodków w mózgowiu i rozległości procesu niż od biochemii zmian neuropatologicznych. Stąd, na podstawie klinicznego obrazu otępienia nie można wnioskować o procesach neuropatologicznych toczących się w ośrodkowym układzie nerwowym.

Celem artykułu jest przybliżenie wiedzy na temat uwarunkowań odkładania się złogów beta-amyloidu w przebiegu choroby Alzheimer. Odkładanie się złogów amyloidu jest dobrze udokumentowanym i jednym z najstarszych mikroparadygmatów wyjaśniających powstawanie zmian neuropatologicznych w przebiegu otępienia w chorobie Alzheimer. Obecnie mikroparadygmat ten został znacznie rozbudowany i związany z sekretazową kaskadą proteolitycznego cięcia białek prekursorowych amyloidu z wytworzeniem złogów jako produktem końcowym. Celowo pominięto w artykule inne mechanizmy rozwoju choroby skupiając się na najnowszej wiedzy o kaskadzie degradacji proteolitycznej białek amyloidogennych. Betaamyloidoza w przebiegu choroby Alzheimer jest stosunkowo dobrze poznana i może stanowić model rozwoju innych amy-

loidoz mózgu, np. synukleinopatii. Odkładanie się złogów beta-amyloidu jest też nadal najlepiej udokumentowaną teorią uszkodzenia mózgowia i rozwoju deficytów funkcji poznawczych w przebiegu choroby Alzheimer. Wiedza ta nie jest pełna i w chwili obecnej jest daleka od systematyzacji. Nie wiadomo nawet, czy odkładanie się złogów beta-amyloidu jest odpowiedzialne za rozwój otępienia, czy też stanowi epifenomen innych zjawisk patobiochemicznych toczących się o.u.n. równoległe w stosunku do degradacji białek amyloidogennych.

NIEPRAWIDŁOWE CIĘCIE PROTEOLITYCZNE BIAŁKA PREKURSOROWEGO AMYLOIDU BETA JAKO PRZYCZYNA POWSTAWANIA ZŁOGÓW W PRZEBIEGU CHOROBY ALZHEIMERA

Beta-amyloid, którego złogi stanowią prawdopodobnie istotę choroby Alzheimer, powstaje poprzez zaburzone cięcie proteolityczne białka prekursorowego amyloidu beta (*amyloid beta precursor protein* – A β PP) [Liberski 2001]. Białko A β PP jest glikoproteina o masie cząsteczkowej 100–140 kDa kodowaną przez gen zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 21 złożony z 16–18 eksonów [Strosznajder i wsp. 2001, Van Nostrand i wsp. 2002]. W wyniku różnych dróg składania mRNA (*splicing*) w procesie transkrypcji powstaje co najmniej 10 białek A β PP o różnej długości, od 365 do 770 aminokwasów [Van Nostrand i wsp. 2002]. Najczęściej występującymi formami białka są A β PP695, A β PP751 i A β PP770, przy czym A β PP695 stanowi aż 80% wszystkich transkryptów w o.u.n. [Tanaka i wsp. 1989]. A β PP nie jest jedynym białkiem z tej rodziny u człowieka [Scheinfeld i wsp. 2002]. Białko APLP1 i białko APLP2 posiadają podobną strukturę molekularną do A β PP [Scheinfeld i wsp. 2002]. Wszystkie trzy białka odgrywają ważną rolę w procesie synaptogenezy i wzrostu

aksonu, oba też są substratem dla γ -sekreazy [Scheinfeld i wsp. 2002]. Oba białka ALP nie posiadają jednak sekwencji analogicznej z beta-amyloidem [Wasco i wsp. 1993]. Gen dla ludzkiego białka APLP1 zlokalizowany jest na chromosomie 19q13.1, dla APLP2 w chromosomie 11q23-q25 [Scheinfeld i wsp. 2002]. A β PP jest białkiem transbłonowym przypominającym budową receptor błonowy. Odcinek N-końcowy zewnątrzkomórkowy jest długi, domena transbłonowa i C-końcowy odcinek wewnątrzkomórkowy są stosunkowo krótkie [Van Nostrand i wsp. 1994]. Zewnątrzkomórkowa część A β PP posiada dwie domeny wiążące siarczan heparanu, pomiędzy którymi umiejscowiona jest wstawka inhibitora proteaz serynowych typu Kunitza [Van Nostrand i wsp. 1994] i wstawka podobna do receptora tymocytów [Richards i wsp. 1995]. Nie jest znana fizjologiczna rola tych domen w cząsteczce A β PP. W obrębie wewnątrzkomórkowego C-końca znajduje się domena wiążąca białko tau i klatrynę – białko odpowiedzialne za endocytozę białka A β PP [Van Nostrand i wsp. 1994]. W tym obszarze znajdują się również domeny będące substratami dla kinaz białkowych serynowych [Walter i wsp. 1997].

Peptyd białka amyloidu (*amyloid β – A β*) powstaje na drodze nieprawidłowego cięcia proteolitycznego białka A β PP [Mills i wsp. 1999]. Peptyd A β zawiera zazwyczaj 39–43 aminokwasy (masa 4,2 kDa), z których pierwsze 28 aminokwasów jest częścią domeny N-końcowej zewnątrzkomórkowej – fragmentu przybłonowego cząsteczki A β PP, dalsze 11–14 aminokwasów tkwi wewnątrz błony biologicznej [Mills i wsp. 1999]. Peptyd A β posiada zdolność do nukleacji i jest podstawowym składnikiem blaszek amyloidowych typowych dla choroby Alzheimera [Mills i wsp. 1999].

Enzymy odpowiedzialne za degradację proteolityczną białka nazwano sekretazami. Stanowią one w chwili obecnej główny przedmiot badań nad patogenезą choroby Alzheimera. Istnieją przynajmniej dwa szlaki cięcia proteolitycznego: szlak nieamyloidogenny (sekrecyjny) i szlak amyloidogenny

(endosomalno-lizosomalny) odpowiedzialny za powstawanie złogów [Mills i wsp. 1999]. Na szlaku nieamyloidogennym A β PP pod wpływem α -sekreazy rozpada się do rozpuszczalnego peptydu sA β PP α (*soluble A β PP*) i mniejszego o masie 8–14 kDa. Pozostaje on zakotwiczony w błonie i może być poddany przemianom na drodze endosomalno-lizosomalnej. Peptyd ten pod wpływem γ -sekreazy odszczepia mały peptyd 17–42 (17–42 aminokwas peptydu A β), tzw. peptyd p3 [Mills i wsp. 1999]. Enzym α -sekreaza dokonuje cięcia proteolitycznego pomiędzy 16 lizyną a 17 leucyną (odliczając od pierwszego aminokwasu białka A β , 687 a 688 aminokwasem A β PP) w obrębie lokalnej domeny o budowie przestrzennej alfa-helisy [Nunan i wsp. 2002]. Sekretaza ta jest prawdopodobnie jedną z metaloproteinaz dezintegryny (oznaczoną symbolem ADAM9) obecnych na powierzchni neuronu [Hotoda i wsp. 2002, Nunan i wsp. 2002]. Szlak amyloidogenny zachodzi w obrębie endosomów i lizosomów. Białko A β PP zostaje najpierw wchłonięte z błony komórkowej przy pomocy pęcherzyków opłaszczonych białkiem klatryną łączącej się z fragmentem C-końcowym A β PP. Klatryna transportuje A β PP do endosomów i lizosomów. Następnie pod wpływem β -sekreazy powstaje s β PP β i zakotwiczony w błonie peptyd o masie 11–12 kDa, z którego z kolei pod wpływem γ -sekreazy powstaje właściwy A β 1-42 lub A β 1-40 agregujący w złogi białkowe. β -sekreaza rozcina łańcuch A β PP między Met671 a Asp672 [Komano i wsp. 2002]. Zespół kierowany przez Vassara i wsp. [1999] udowodnił, że β -sekreaza jest transbłonową aspartylową proteazą. Kodowana jest ona przez gen leżący na chromosomie 21q22.3, a jego produkt, czyli β -sekreaza, oznaczany jest symbolem BACE1 [Solans i wsp. 2000]. U człowieka BACE1 wykazuje ekspresję w retikulum endoplazmatycznym, aparacie Gogiego, endosomach i lizosomach [Yan i wsp. 2001]. Białko BACE1 (*ASP-2 – aspartic protease 2* lub *memampsyna 1*) posiada transmembranową domenę blisko C-końca cząsteczki niezbędną do aktywności

katalitycznej enzymu [Yan i wsp. 2001, Sidera i wsp. 2002]. Znalaziono również białko BACE2 (*ASP-1 – aspartic protease 1* lub *memampsyna 2*) o podobnej strukturze do BACE1 i aktywności β -sekretaźowej [Sidera i wsp. 2002]. Aktywność β -sekretazy regulowana jest przez fosforylację białka enzymu przez kinazę kazeinową I w 498 serynie i defosforylację katalizowaną przez fosfatazę białkową [Yan i wsp. 2001]. BACE1 i BACE2 wykazują dużą swoistość wobec pochodnych A β PP, albowiem blisko spokrewnione z β -sekretazą katepsyny D i E nie posiadają aktywności β -sekretaźowej [Yan i wsp. 2001]. Myszy *knock-out* pozbawione genu kodującego β -sekretazę rozwijają się normalnie, co sugeruje, że enzym ten może być zastępowany przez inne proteazy i nie jest on niezbędny do życia [Cai i wsp. 2001]. Nie znalaziono innych substratów fizjologicznych dla β -sekretazy, niż A β PP [Cai i wsp. 2001]. Inhibitory β -sekretazy budzą zrozumiałe zainteresowanie jako leki stosowane w zwalczaniu postępu otępienia w przebiegu choroby Alzheimera [Parkin i wsp. 2002, Wolfe i wsp. 2002]. Szczególną nadzieję budzą pochodne kwasu hydroksamowego, które hamują oprócz β -sekretazy enzym konwertujący angiotensynę, konwertazę receptora CD23 o małym powinowactwie do immunoglobulin klasy IgE i konwertazę TNF-alfa [Parkin i wsp. 2002]. Również analog oligopeptydowy jest silnym i swoistym inhibitorem tego enzymu [Hong i wsp. 2002]. W oparciu o te substancje trwają poszukiwania związków mogących stać się lekami stosowanymi w otępieniu. Nadzieję budzą poszukiwane w laboratoriach swoiste i mało toksyczne inhibitory β -sekretazy, których dotychczas nie zsyntetyzowano [Parkin i wsp. 2002, Wolfe i wsp. 2002]. Oczekiwane jest poznanie precyzyjnej regulacji aktywności β -sekretazy. Ostatnio odkryto, że aktywność β -sekretazy regulowana jest przez dołączanie do reszt lizynowych małych białek podobnych do ubikwityny [Li i wsp. 2003].

Enzym γ -sekretaza (kolejny na szlaku zarówno na drodze amyloidogennej jak i nie-

amyloidogennej) jest prawdopodobnie złożony m.in. z obu presenilin (PS1 albo PS2), białka nikastryny i być może samego białka A β (C-koniec i N-koniec białka A β jest niezbędny do aktywności sekretaźowej wobec prekursora). Enzym γ -sekretaza posiada również aktywność proteazy aspartyłowej, a centrum aktywne znajduje się w obrębie białka preseniliny [Esler i wsp. 2002]. Gen dla PS1 mieści się w chromosomie 14, dla PS2 w 1 [Liberski 2001]. Gen PS1 składa się z 13 eksonów i 10 intronów, białko posiada masę 43 kDa [Alzheimer Research Forum 2003]. Masa PS2 wynosi 53–55 kDa [Liberski 2001]. Zarówno PS1 jak i PS2 posiadają podobną strukturę topologiczną – zawierają 8 domen transbłonowych, a te połączone są pętlami wystającymi na zewnątrz błony i do wnętrza komórki [Liberski 2001]. Preseniliny wykazują homologię do białka sel-12 z nicienia *Caenorhabditis elegans* i są stare ewolucyjnie [Luo i wsp. 2003]. Preseniliny wykazują powinowactwo do różnych białek w tym do kalseniliny (neuralne białko wiążące wapń) i kadhedryny [Liberski 2001]. Nikastryna, inny składnik γ -sekretazy, kodowana jest w chromosomie 1q23 [Dermaut i wsp. 2002]. Polimorfizm genu kodującego to białko jest nowo odkrytym czynnikiem ryzyka rozwoju otępienia. Substratem dla γ -sekretazy jest również bardzo ważne białko produkt genu Notch [Berezowska i wsp. 2001, Rochette i wsp. 2002, Luo i wsp. 2003]. Białko produkt genu Notch posiada podobną strukturę do receptora czynnika wzrostu naskórka (EGF – *epidermal growth factor*) i po proteolizie katalizowanej przez γ -sekretazę bierze udział w transkrypcji genów zaangażowanych w morfogenezę poprzez aktywację kinaz, w tym kinazy białkowej C i kinazy tyrozynowej [Liberski 2001]. Mutacja w genie Notch3 odpowiedzialna jest za zespół CADASIL (*arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*), czyli arteriopatii naczyń mózgowych z towarzyszącą leukoencefalopatią i naczyniowym otępieniem podkorowym [Kalino i wsp. 2002]. Enzym γ -sekretaza bierze również udział w proteolitycznej modyfikacji białka nekty-

ny 1α i receptorów błonowych dla czynników wzrostu o aktywności kinaz tyrozynowych [Kim i wsp. 2002]. Nekytyna 1α należy do nadrodziny immunoglobulin i pełni ważną rolę w formowaniu się synaps [Kim i wsp. 2002]. Sekretaza ta pełni również ważną rolę w metabolizmie innych białek nadrodziny immunoglobulinowej w o.u.n. – białek odpowiedzialnych za powstawanie złączy międzykomórkowych [Kim i wsp. 2002]. Dlatego potencjalne inhibitory γ -sekretazy nie budzą nadziei w leczeniu choroby Alzheimera z powodu ich ważnej funkcji metabolicznej nie związanej z degradacją proteolityczną białek prekursorowych amyloidu, mimo że niektóre niedawno zsyntetyzowane pochodne benzodiazepiny okazały się wysoce swoistymi inhibitorami omawianego enzymu [Kalimo i wsp. 2002, Churcher i wsp. 2003]. Ostatnio udowodniono, że miejsce katalityczne w obrębie białka γ -sekretazy dla wszystkich substratów białkowy jest to samo [Kimberly i wsp. 2003].

Podsumowując, stosunkowo dużo wiadomo na temat dwóch szlaków degradacji białka A β PP – amyloidogenego i nieamyloidogenego [Liberski 2001]. Niestety nadal niewiadomą pozostaje przyczyna, dla której u pewnych osób degradacja A β PP nie doprowadza do odkładania się złożeń, a u innych nieprawidłowa proteoliza doprowadza do zmian neuropatologicznych, upośledzenia funkcji poznawczych i otępienia. Nieznana jest również przyczyna wzrostu aktywności szlaku amyloidogenego z wiekiem. Wyjaśnienie tych przyczyn stanowić będzie ważny krok w zrozumieniu patogenety tej choroby.

UDZIAŁ MUTACJI W GENACH BIAŁKA PREKURSOROWEGO BETA-AMYLOIDU I W GENACH PRESENILIN W INDUKOWANIU PROTEOLITYCZNEGO SZLAKU AMYLOIDOGENNEGO

Czynniki genetyczne odgrywają ważną rolę w patogenezie otępienia przed 65 rokiem życia [Wehr 1999]. Poznanie i molekularne

rozpracowanie konkretnych mutacji w poszczególnych genach może wyjaśnić dlaczego u jednych osób białko A β PP degradowane jest proteolitycznie na drodze nieamyloidogennej, a u innych doprowadza do nukleacji złożeń i procesów neurodegeneracyjnych. Około 5% przypadków otępienia w chorobie Alzheimera zdarza się u ludzi poniżej 65 roku życia (*EOAD – early onset Alzheimer disease*) (F00.0) [Wehr 1999]. Przypadki te najczęściej związane są z mutacjami w białkach szlaku degradacji proteolitycznej białka A β PP. Otępienie o późnym początku (*LOAD – late onset Alzheimer disease*) (F00.1) obejmuje 95% przypadków, najczęściej jest sporadyczne i związane najwyżej z pewnymi genetycznymi czynnikami ryzyka, wśród których najważniejsze to polimorfizm apolipoproteiny E i mutacje w mitochondrialnym DNA [Wehr 1999, Pietras i wsp. 2001]. Szczególną uwagę należy zwrócić na te dwa ostatnie czynniki ryzyka, albowiem dotyczą one prawdopodobnie większości chorych, co ma określone znaczenie epidemiologiczne, kliniczne i społeczne.

Mutacje w genie kodującym białko A β PP są jedną z przyczyn skierowania metabolizmu tego białka na tor amyloidogeny [Liberski 2001, Strosznajder i wsp. 2001]. Odkryto kilkanaście mutacji występujących rodzinnie, których dokładną charakterystykę w piśmiennictwie polskim podał Liberski [2001]. Wszystkie opisane mutacje amyloidogenne znaleziono pomiędzy kodonem 665 a 723. Zmiana właściwości cząsteczki białka A β PP zmienia, być może, jego powinowactwo do β -sekretazy i kieruje degradacją proteolityczną w kierunku amyloidogenym. Wszystkie opisane mutacje dotyczą zaledwie kilkunastu aminokwasów w pobliżu miejsca cięcia proteolitycznego β -sekretazy [Liberski 2001]. Pierwszą zidentyfikowaną mutacją była mutacja w kodonie 770 związana z holenderską wrodzoną amyloidozą z krwotokami mózgowymi. Wyraża się ona zmianą kwasu glutaminowego na glutaminę [Levy i wsp. 1990]. Poznane dotychczas mutacje w genie białka A β PP wg Alzheimer Research Forum [2003] opisano w następujących kodonach genu

białka A β PP: kodonie 665 (Asn prawidłowe zmienione na Asp w białku patologicznym), 670/671 (Lys/Met na Asn/Leu), 673 (Thr na Ala), 692 (Ala na Gly), 693 (Glu na Gly i Glu na Gln), 713 (Ala na Val i Ala na Thr), 714 (Thr na Ile), 715 (Val na Met), 716 (Ile na Val), 717 (Val na Ile, Val na Gly i Val na Leu) i 723 (Leu na Pro). Ciekawostką stanowi fakt, że jedna z mutacji w kodonie 713 predysponuje prawdopodobnie do wystąpienia schizofrenii [Jones i wsp. 1992]. Szczególnie ważne znaczenie posiadają mutacje w genach dla presenilin PS1 i PS2 [Alzheimer Research Forum 2003]. Mutacje te zmieniają aktywność γ -sekretazy i przez to wpływają na szlak amyloidogeny. Szczegóły tych zmian nie są dobrze poznane. Wiadomo jednak, że większość tych mutacji związana jest paradoksalnie z obniżeniem aktywności γ -sekretazy, co przesuwą równowagę w kierunku szlaku amyloidogenego kosztem aktywności α -sekretazy [Kaether i wsp. 2002]. Opisano kilkadziesiąt mutacji w genie PS1 i sześć w genie PS2 [Alzheimer Research Forum 2003]. Mutacje w genie PS2 wiążą się z wcześniejszym zachorowaniem [Alzheimer Research Forum 2003]. Jedną z opisanych mutacji w genie PS1 pochodzi z terenu Polski od młodego chorego, u którego stwierdzono mutację w 117 aminokwasie (Pro zastąpiła Leu) [Wisniewski i wsp. 1998]. Opisane powyżej mutacje odpowiadają za 30–50% przypadków wczesnej postaci otępienia w przebiegu choroby Alzheimerera i w sumie za ok. 5% wszystkich przypadków choroby. W zespole Downa z trisomią 21 chromosomu otępienie próbowano wytłumaczyć zwiększeniem ekspresji dwóch białek kodowanych przez ten chromosom: A β PP i BACE1, przy czym aktywność β -sekretazy wydaje się ważniejsza [Schupf i wsp. 2002]. W zespole Downa nie znaleziono bowiem nadekspresji produktu genu kodującego A β PP [Schupf i wsp. 2002]. Być może właśnie BACE1 i zmniejszona regulacja genetyczna sprzyjają uaktywnieniu szlaku proteolizy amyloidogennej, a nie potrójna kopia genu kodującego A β PP [Schupf i wsp. 2002].

ROLA CZYNNIKÓW ROZWOJU OTEPIENIA W AMYLOIDOGENEZIE

Znacznie trudniej wytłumaczyć, dlaczego starzenie się, nosicielstwo genu apolipoproteiny ϵ 4 i mutacje w mitochondrialnym DNA sprzyjają ujawnieniu się szlaku proteolizy amyloidogennej białka A β PP. Wiadomo, że u znacznej części chorych na otępienie w chorobie Alzheimerera wykrywano mutacje w mitochondrialnym DNA, o czym na łamach *Postępów* pisał Pietras i wsp. [2002]. Uszkodzone mitochondria wytwarzają zwiększoną ilość reaktywnych postaci tlenu (ROS – *reactive oxygen species*), w tym nadtlenku wodoru i anionorodnika ponadtlenkowego [de la Monte i wsp. 2000, Pietras i wsp. 2002]. Uszkodzenie białek łańcucha transportu elektronów zmniejsza potencjał elektryczny w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej i aktywuje megakanaly mitochondrialne przez które do cytoplazmy wyciekają cytochrom C i czynnik AIF (AIF – *apoptosis inducing factor*) [Grądzka 2000, de la Monte i wsp. 2000]. AIF i cytochrom C indukują apoptozę poprzez aktywację proteolitycznej kaskady kaspaz [Grądzka 2000]. Rodzi się pytanie, jak powiązać uszkodzenie metabolizmu mitochondriów z kaskadą amyloidogeną cięcia proteolitycznego przez sekretazy. Cottrell i wsp. [2002] zauważyli, że neurony z mutacjami w mitochondrialnym DNA nie znajdują się w sąsiedztwie złogów amyloidowych. Autorzy postulują, że mutacje w mitochondrialnym DNA są niezależnym od amyloidogenezy mechanizmem patogenetycznym otępienia. Iloczyn obu zjawisk, czyli odkładanie się białka A β i deficyt mitochondrialny, zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia otępienia [Cottrell i wsp. 2002]. Należy pamiętać, że w zdrowym starzejącym się mózgu stwierdza się zarówno złogi A β , jak i mutacje w mitochondrialnym DNA, choć w mniejszej ilości niż u chorych [Cottrell i wsp. 2002]. Samo otępienie nie wynika bowiem ani z uszkodzenia mitochondriów, ani z odkładanie się złogów amyloidu, lecz z ich łącznego cytotoksycznego działania uszkadzającego funkcjonowanie mózgu (co

nie jest tematem artykułu). Pogląd ten jest skrajny, bowiem udowodniono, że kaspaza 3 aktywowana przez uszkodzone mitochondria sprzyja wytrącaniu się złogów białka A β [Khan i wsp. 2000]. Stone i wsp. [2002] udowodnił, że w uszkodzonych obszarach mózgu kaspaza 3 tnie białko A β PP z wytworzeniem złogów A β niezależnie od drogi sekretazowej. Odkrycie to częściowo tłumaczy, dlaczego mutacje w mitochondrialnym DNA i urazy mózgu sprzyjają wystąpieniu otępienia w chorobie Alzheimerera [Stone i wsp. 2002]. Podobne obserwacje poczyniono również w innych laboratoriach [Dumanchin-Njock i wsp. 2001]. Kaspazy aktywowane przez czynniki mitochondrialne tną białka pokrewne A β PP – APLP1 i APLP2 na wysoce cytotoksyczne oligopeptydy sprzyjające powstawaniu struktury beta białek amyloidogennych [Galvan i wsp. 2002]. ROS (wytwarzane przez mitochondria) i błonowe produkty peroksydacji lipidów (w tym 4-hydroksynonenal) powstałe w wyniku reakcji ROS z lipidami indukują aktywność β -sekretazy [Tamagno i wsp. 2002]. Być może w tym miejscu następuje patogenetyczne połączenie pomiędzy patologią mitochondrialną a metabolizmem amyloidu. Sytuację komplikuje fakt, że białko A β indukuje apoptozę drogą aktywacji kaspaz, zwłaszcza kaspazy 3 i 8 [Xu i wsp. 2001]. Wytwarza ono również reaktywne postacie tlenu na drodze skomplikowanych mechanizmów [Markesbery 1999, Markesbery i wsp. 1999]. Białko amyloidu tworzy m.in. kompleksy z miedzią i żelazem katalizując reakcję Fentona, w przebiegu której powstaje silnie toksyczny rodnik hydroksylowy [Kowalik-Jankowska i wsp. 2002, Tabner i wsp. 2002]. A β zaburza transport elektronów i hamuje aktywność dysmutazy ponadtlenkowej enzymu zmiatającego ROS [Qin i wsp. 2002]. Podsumowując, należy podkreślić, że uszkodzenie mitochondriów z następczym wytwarzaniem ROS wpływa na odkładanie się złogów A β , a ono zaburza z kolei funkcje mitochondriów i indukuje wytwarzanie ROS [Markesbery 1999]. Wzajemne interakcje pomiędzy ROS wytwarzanymi przez mitochondria i złogami białka A β są bar-

dzo ważnym, skomplikowanym i stosunkowo mało poznanym elementem uszkodzenia komórek nerwowych w chorobie Alzheimerera.

W populacji ludzkiej występują trzy allele apolipoproteiny (długości 299 aminokwasów) E (Apo E): ϵ 2 (15%), ϵ 3 (75%) i ϵ 4 (10%), kodowane na 19 chromosomie o masie 34 kDa [Anttila i wsp. 2002]. Stwierdzono, że u osób ze sporadyczną i rodzinną postacią choroby Alzheimerera częstość występowania Apo E – ϵ 4 jest 2–3-krotnie większa [Anttila i wsp. 2002, Blacker i wsp. 2003]. Dziedzicznie Apo E – ϵ 4 stanowi czynnik ryzyka również w synukleiniopatiach, otępieniu czołowo-skroniowym i pasażowalnych betaamyloidozach o.u.n. [Blacker i wsp. 2003]. U ok. 30–50% chorych z otępieniem nie stwierdza się jednak obecności Apo E – ϵ 4, dlatego niektórzy kwestionują znaczenie tej apolipoproteiny w patogenezie choroby [Blacker i wsp. 2003]. Białko Apo – ϵ 4 uważane jest za tzw. patologiczny chaperon, tj. białko biorące udział w nabieraniu przez A β struktury beta – pofałdowanej kartki i w autokatalitycznym wytrącaniu się i organizacji złogów [Carter i wsp. 2001]. Apo – ϵ 4, w przeciwieństwie do Apo E – ϵ 2 i ϵ 3 nie hamuje agregacji białka A β z ufosforylowanym białkiem tau [Morishima-Kawashima i wsp. 2002]. Tworzenie kompleksów białka tau z amyloidem uważane jest za jeden z ważniejszych mechanizmów cytotoksyczności A β , choć niektórzy nawet sądzą, że patologia białka tau jest pierwotna wobec aktywacji amyloidogenezy [Morishima-Kawashima i wsp. 2002].

ZAKOŃCZENIE

Postęp wiedzy z zakresu patologicznej proteolizy białka A β PP stwarza nowe możliwości terapeutyczne otępienia w przebiegu choroby Alzheimerera. Nadal jednak nie wiadomo, czy jest to zjawisko najważniejsze w patologii tej choroby, czy wtórne w stosunku do innych procesów patobiochemicznych. Przebieg tej proteolizy trudno jest bowiem powiązać z innymi czynnikami epidemiologicznymi

choroby Alzheimer'a i zmianami molekularnymi stwierdzanymi w mózgach osób zmarłych. W najbliższym czasie można się będzie spodziewać syntezy leków interferujących z omówioną proteolizą. Kontrolowane badania kliniczne zweryfikują zasadność mikroparadygmatu kaskady proteolitycznej i jego wartość wyjaśniającą rozwój tej ciężkiej choroby, z którą starzejące się społeczeństwo będzie stykać się coraz częściej.

PIŚMIENNICTWO

1. Alzheimer Research Forum: www.alzforum.org, aktualizacja styczeń 2003.
2. Anttila T, Helkala EL, Kivipelto M, Hallikainen M, Alhainen K, Heinonen H, Mannerman A, Tuomilehto J, Soinen H, Nissinen A. Mid-life income, occupation, APOE status, and dementia: a population-based study. *Neurology* 2002; 59: 887–93.
3. Behr D, Wrigley JD, Owens AP, Shearman MS. Generation of C-terminally truncated amyloid-beta peptides is dependent on gamma-secretase activity. *J Neurochem* 2002; 82: 563–75.
4. Berezovska O, Jack C, Deng A, Gastineau N, Rebeck GW, Hyman BT. Notch1 and amyloid precursor protein are competitive substrates for presenilin1-dependent gamma-secretase cleavage. *J Biol Chem* 2001; 276: 30018–23.
5. Blacker D, Bertram L, Saunders AJ, Moscarillo TJ, Albert MS, Wiener H, Perry RT, Collins JS, Harrell LE, Go RC, Mahoney A, Beaty T, Fallin MD, Avramopoulos D, Chase GA, Folstein MF, McInnis MG, Bassett SS, Doherty KJ, Pugh EW, Tanzi RE. Results of a high-resolution genome screen of 437 Alzheimer's disease families. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 23–32.
6. Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC. BACE1 is the major beta-secretase for generation of A-beta peptides by neurons. *Nat Neurosci* 2001; 4: 233–4.
7. Carter DB, Dunn E, McKinley DD, Stratman NC, Boyle TP, Kuiper SL, Oostveen JA, Weaver RJ, Boller JA, Gurney ME. Human apolipoprotein E4 accelerates beta-amyloid deposition in APPsw transgenic mouse brain. *Ann Neurol* 2001; 50: 468–75.
8. Churcher I, Ashton K, Butcher JW, Clarke EE, Harrison T, Lewis HD, Owens AP, Teall MR, Williams S, Wrigley JD. A new series of potent benzodiazepine gamma-secretase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2003; 13: 179–83.
9. Cottrell DA, Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG, Turnbull DM. The role of cytochrome c oxidase deficient hippocampal neurones in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2002; 28: 390–6.
10. Dermaut B, Theuns J, Sleegers K, Hasegawa H, Van den Broeck M, Vennekens K, Corsmit E, St George-Hyslop P, Cruts M, van Duijn CM, Van Broeckhoven C. The gene encoding nicastrin, a major gamma-secretase component, modifies risk for familial early-onset Alzheimer disease in a Dutch population-based sample. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1568–74.
11. Dumanchin-Njock C, Alves da Costa CA, Mercken L, Pradier L, Checler F. The caspase-derived C-terminal fragment of beta-APP induces caspase – independent toxicity and triggers selective increase of A-beta42 in mammalian cells. *J Neurochem* 2001; 78: 1153–61.
12. Esler WP, Kimberly WT, Ostaszewski BL, Ye W, Diehl TS, Selkoe DJ, Wolfe MS. Activity-dependent isolation of the presenilin – gamma-secretase complex reveals nicastrin and a gamma substrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2720–5.
13. Galvan V, Chen S, Lu D, Logvinova A, Goldsmith P, Koo EH, Bredesen DE. Caspase cleavage of members of the amyloid precursor family of proteins. *J Neurochem* 2002; 82: 283–94.
14. Grądzka I. Apoptoza: decyzja należy do mitochondriów. *Post Bioch* 2000; 46: 2–16.
15. Hong L, Turner RT 3rd, Koelsch G, Shin D, Ghosh AK, Tang J. Crystal structure of memapsin 2 (beta-secretase) in complex with an inhibitor OM00-3. *Biochemistry* 2002; 41: 10963–7.
16. Hotoda N, Koike H, Sasagawa N, Ishiura S. A secreted form of human ADAM9 has an alpha-secretase activity for APP. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 800–5.
17. Jones CT, Morris S, Yates CM, Moffoot A, Sharpe C, Brock DJ, St Clair D. Mutation in codon 713 of the beta amyloid precursor protein gene presenting with schizophrenia. *Nat Genet* 1992; 1: 306–9.
18. Kaether C, Lammich S, Edbauer D, Ertl M, Rietdorf J, Capell A, Steiner H, Haass C. Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. *J Cell Biol* 2002; 158: 551–61.

19. Kalimo H, Ruchoux MM, Viitanen M, Kalaria RN. CADASIL: a common form of hereditary arteriopathy causing brain infarcts and dementia. *Brain Pathol* 2002; 12: 371–84.
20. Khan SM, Cassarino DS, Abramova NN, Keeney PM, Borland MK, Trimmer PA, Krebs CT, Bennett JC, Parks JK, Swerdlow RH, Parker WD Jr, Bennett JP Jr. Alzheimer's disease cybrids replicate beta-amyloid abnormalities through cell death pathways. *Ann Neurol* 2000; 48: 148–55.
21. Kim DY, Ingano LA, Kovacs DM. Nectin-1-alpha, an Immunoglobulin-like receptor involved in the formation of synapses, is a substrate for presenilin/gamma - secretase-like cleavage. *J Biol Chem* 2002; 277: 49976–81.
22. Kimberly WT, Esler WP, Ye W, Ostaszewski BL, Gao J, Diehl T, Selkoe DJ, Wolfe MS. Notch and the amyloid precursor protein are cleaved by similar gamma-secretase(s). *Biochemistry* 2003; 42: 137–44.
23. Klasyfikacja zaburzeń psychicznych i zaburzeń zachowania w ICD-10. Opisy kliniczne i wskazówki diagnostyczne. Kraków-Warszawa: Uniw Wyd Med "Vesalius", IPIŃ; 1997.
24. Komano H, Shiraishi H, Kawamura Y, Sai X, Suzuki R, Serneels L, Kawaichi M, Kitamura T, Yanagisawa K. A new functional screening system for identification of regulators for the generation of amyloid beta-protein. *J Biol Chem* 2002; 277: 39627–33.
25. Kowalik-Jankowska T, Ruta-Dolejsz M, Wiśniewska K, Lankiewicz L, Kozłowski H. Possible involvement of copper(II) in Alzheimer disease. *Environ Health Perspect* 2002; 110 (supl 5): 869–70.
26. Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 1990; 248: 1124–6.
27. Li Y, Wang H, Wang S, Quon D, Liu Y-W, Cordell B. Positive and negative regulation of APP amyloidogenesis by sumoylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 259–264.
28. Liberski PP. Biologia molekularna chorób neurozwyrodnieniowych człowieka (choroba Alzheimer'a i peptyd Aβ, choroba Parkinsona i α-synukleinopatie oraz dziedziczne angiopatie amyloidowe). W: Genetyka molekularna chorób układu nerwowego. XVIII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Mogilany 2001. *Liszki: Wydawnictwo Platan*; 2001: 63–84.
29. Luo WJ, Wang H, Li H, Kim BS, Shah S, Lee HJ, Thinakaran G, Kim TW, Yu G, Xu H. PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem* 2003; in press (epub ahead of print).
30. Markesbery WR. The role of oxidative stress in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1999; 56: 1449–52.
31. Markesbery WR, Carney JM. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 1999; 9: 133–46.
32. Mills J, Reiner PB. Regulation of amyloid precursor protein cleavage. *J Neurochem* 1999; 72: 443–60.
33. de la Monte SM, Luong T, Neely TR, Robinson D, Wands JR. Mitochondrial DNA damage as a mechanism of cell loss in Alzheimer's disease. *Lab Invest* 2000; 80: 1323–35.
34. Morishima-Kawashima M, Ihara Y. Alzheimer's disease: beta-amyloid protein and tau. *J Neurosci Res* 2002; 70: 392–401.
35. Nunan J, Small DH. Proteolytic processing of the amyloid-beta protein precursor of Alzheimer's disease. *Essays Biochem* 2002; 38: 37–49.
36. Parkin ET, Trew A, Christie G, Faller A, Mayer R, Turner AJ, Hooper NM. Structure-activity relationship of hydroxamate-based inhibitors on the secretases that cleave the amyloid precursor protein, angiotensin converting enzyme, CD23, and pro-tumor necrosis factor-alpha. *Biochemistry* 2002; 41: 4972–81.
37. Pietras T, Witusik A, Górski P. Mutacje w mitochondrialnym DNA jako czynnik ryzyka rozwoju otępienia – nowy paradygmat. *Post Psychiatr Neurol* 2002; 11: 259–69.
38. Qin L, Liu Y, Cooper C, Liu B, Wilson B, Hong JS. Microglia enhance beta-amyloid peptide-induced toxicity in cortical and mesencephalic neurons by producing reactive oxygen species. *J Neurochem* 2002; 83: 973–83.
39. Richards SJ, Hodgman C, Sharpe M. Reported sequence homology between Alzheimer amyloid 770 and the MRC OX-2 antigen does not predict function. *Brain Res Bull* 1995; 38: 305–6.
40. Rochette MJ, Murphy MP. Gamma-secretase: substrates and inhibitors. *Mol Neurobiol* 2002; 26: 81–95.
41. Scheinfeld MH, Ghersi E, Laky K, Fowlkes BJ, D'Adamio L. Processing of beta-amyloid precursor-like protein-1 and -2 by gamma-secretase

- regulates transcription. *J Biol Chem* 2002; 277: 44195–201.
42. Schupf N, Sergievsky GH. Genetic and host factors for dementia in Down's syndrome. *Br J Psychiatry* 2002; 180: 405–10.
 43. Sidera C, Liu C, Austen BM. Pro-domain removal in ASP-2 and the cleavage of the amyloid precursor are influenced by pH. *BMC Biochem* 2002; 3: 25 (epub ahead of print).
 44. Solans A, Estivill X, de La Luna S. A new aspartyl protease on 21q22.3, BACE2, is highly similar to Alzheimer's amyloid precursor protein beta-secretase. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 89: 177–84.
 45. Stone JR, Okonkwo DO, Singleton RH, Mutlu LK, Helm GA, Powlislock JT. Caspase-3-mediated cleavage of amyloid precursor protein and formation of amyloid beta peptide in traumatic axonal injury. *J Neurotrauma* 2002; 19: 601–14.
 46. Strosznajder JB, Łafowski MM. Peptydy amyloidu beta w mózgu starczym i w patogenezie choroby Alzheimer'a. W: Strosznajder JB, Mossakowski MJ. *Mózg a starzenie się*. Warszawa: Upowszechnienie Nauki – Oświata „UN-O”; 2001: 106–29.
 47. Tabner BJ, Turnbull S, El-Agnaf OM, Allsop D. Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from A (beta) and alpha-synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 1076–83.
 48. Tamagno E, Bardini P, Obbili A, Vitali A, Borghi R, Zaccheo D, Pronzato MA, Danni O, Smith MA, Perry G, Tabaton M. Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons. *Neurobiol Dis* 2002; 10: 279–88.
 49. Tanaka S, Shiojiri S, Takahashi Y, Kitaguchi N, Ito H, Kameyama M, Kimura J, Nakamura S, Ueda K. Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; 165: 1406–14.
 50. Van Nostrand WE, Schmaier AH, Neiditch BR, Siegel RS, Raschke WC, Sisodia SS, Wagner SL. Expression, purification, and characterization of the Kunitz – type proteinase inhibitor domain of the amyloid beta-protein precursor-like protein-2. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1209: 165–70.
 51. Van Nostrand WE, Melchor JP, Keane DM, Saporito-Irwin SM, Romanov G, Davis J, Xu F. Localization of a fibrillar amyloid beta-protein binding domain on its precursor. *J Biol Chem* 2002; 277: 36392–8.
 52. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999; 286: 735–41.
 53. Walter J, Capell A, Hung AY, Langen H, Schnolzer M, Thinakaran G, Sisodia SS, Selkoe DJ, Haass C. Ectodomain phosphorylation of beta-amyloid precursor protein at two distinct cellular locations. *J Biol Chem* 1997; 272: 1896–903.
 54. Wasco W, Gurubhagavatula S, Paradis MD, Romano DM, Sisodia SS, Hyman BT, Neve RL, Tanzi RE. Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet* 1993; 5: 95–100.
 55. Wehr H. Genetyka choroby Alzheimer'a. *Post Psychiatr Neurol* 1999; 8: 403–9.
 56. Wisniewski T, Dowjat WK, Buxbaum JD, Khorkova O, Efthimiopoulos S, Kulczycki J, Łojkowska W, Wegiel J, Wisniewski HM, Frangione B. A novel Polish presenilin-1 mutation (P117L) is associated with familial Alzheimer's disease and leads to death as early as the age of 28 years. *Neuroreport* 1998; 9: 217–21.
 57. Wolfe MS, Esler WP, Das C. Continuing strategies for inhibiting Alzheimer's gamma-secretase. *J Mol Neurosci* 2002; 19: 83–7.
 58. Xu J, Chen S, Ku G, Ahmed SH, Xu J, Chen H, Hsu CY. Amyloid beta peptide – induced cerebral endothelial cell death involves mitochondrial dysfunction and caspase activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 702–10.
 59. Yan R, Han P, Miao H, Greengard P, Xu H. The transmembrane domain of the Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to beta-amyloid precursor protein (APP) substrate. *J Biol Chem* 2001; 276: 36788–96.