

TESTINĖS MEDICINOS STUDIJOS

Alzheimerio liga: molekulinis mechanizmas, naujos hipotezės, gydymo perspektyvos

Milda Plečkaitytė

Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos laboratorija

Raktažodžiai: Alzheimerio liga, baltymo susilankstymas, amiloidas, fibrilės, oligomerai.

Santrauka. Pastaraisiais metais ypač susidomėta ligomis, susijusiomis su netaisyklingu baltymų susilankstymu ir jų agregacija. Literatūroje pateikiama naujausia informacija apie molekulinę ir ląstelinę šių ligų patogenezę. Be to, poreikis kuo išsamesnės informacijos apie šių ligų mechanizmus kilo dėl didėjančio sergamumo Alzheimerio liga bei kitomis senatvinėmis ligomis, būdingomis ekonomiškai išsivysčiusioms šalims. Daugiau kaip 20 metų daugelis sisteminių ligų, įskaitant neurologines Alzheimerio ir Parkinsono ligas, siejamos su anomalijų fibrilinių baltymų susikaupimu. Šios fibrilės, vadinamos amiloidu, laikomos patogeninėmis molekulėmis, sukeliančiomis ląstelių degeneraciją. Vyraujančios Alzheimerio ligos teorijos pagrindas yra plokštelių, sudarytų iš baltymo Aβ fibrilių, susiformavimas. Pasirodė, jog fibrilės nėra vienintelis toksinas, atsirandantis baltymų susijungimo procese. Šiandien žinoma, jog egzistuoja ikifibriliniai dariniai – tirpūs oligomerai ir protofibrilės, kurie yra neurologiškai aktyvūs. Šių darinių vaidmens įvertinimas Alzheimerio ligos patogenezei davė impulsą amiloido kaskados hipotezės korekcijai. Kol kas nėra veiksmingų Alzheimerio ligos gydymo priemonių. Tačiau naujas požiūris į ligos mechanizmą ir imunoterapiinių priemonių, tokių kaip monokloniniai antikūnai ir vakcinų sukūrimas, teikia vilčių, jog situacija gerės.

Įvadas

Alzheimerio liga pasaulyje labiausiai paplitusi senatvinės demencijos forma. Manoma, kad apie 10 proc. vyresnių nei 65 metų žmonių vargina ši liga, o pasaulyje priskaičiuojama 25 mln. ligos atvejų (1).

Alzheimerio liga pradžioje pasireiškia atminties sutrikimais; blokuojamas gebėjimas formuoti „naują“ atmintį ir atkurti „senąją“ (1, 2). Prieš šimtmetį Alois Alzheimer, psichiatras iš Bavarijos, gydydamas pirmąją Alzheimerio liga sergančią 40 metų pacientę, Augustę D., paprašė parašyti jos vardą. Ji negalėjo to padaryti ir liūdnai tepasakė: „Aš praradau save“ (1, 2). Liga aštrėja, su amžiumi komplikuojasi ir pacientai dažnai pasiekia vegetacinę būklę. Ligos progresavimas pagreitina ir gyvenimo pabaigą, be to, Alzheimerio liga ir jos komplikacijos yra ketvirtoje vietoje tarp mirties priežasčių (1). Augustę D. atvejis, atsižvelgiant į tai, jog ji susirgo jauno amžiaus, greičiausiai buvo šeiminis (genetinis) atvejis. Sporadiniais Alzheimerio ligos atvejais pacientų gyvenimo trukmė įvairi ir turi tendenciją ilgėti. JAV Prezidentas R. Reiganas po Alzheimerio ligos diagnozavimo dar gyveno 20 metų (1).

Anomalios struktūros baltymų susiformavimas

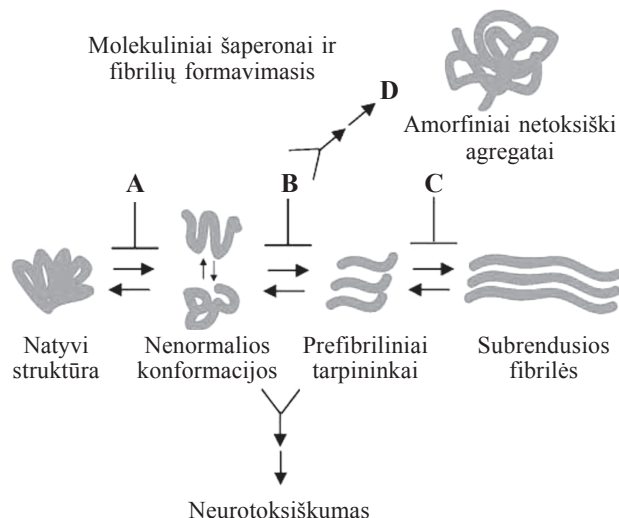
Anomalios baltymų struktūros susiformavimas yra

pastovi grėsmė ląstelės funkcijoms ir gyvybingumui. Ląstelėje susiformavusios baltymų struktūros nėra stabilios, nes, pakilus temperatūrai (nuo 37°C iki 42°C), esant laisvųjų radikalų, tam tikrų cheminių medžiagų (pvz., sunkiųjų metalų, vartojant kai kuriuos antibiotikus), vyksta spontaniškas baltymų denatūracija arba cheminė baltymų modifikacija (oksidacija, izomerizacija, glikozilinimas). Anomalios struktūros polipeptidų gali atsirasti dėl genetinių mutacijų, todėl baltymas negali susilankstyti (angl. *fold*) į jam būdingą erdvinę struktūrą arba negali asocijuotis su kitais baltymo subvienetais arba kofaktoriais (3, 4).

Nestruktūrintų baltymų sancaupų, agregatų poveikis ląstelės funkcijai itin žalingas, todėl ląstelėse yra baltymų struktūrą „tvarkančių“ mechanizmų, atsakingų už tinkamą polipeptidinių grandinių sintezę, taisyklingą baltymo sulankstymą ir pernešimą į atitinkamą ląstelės vietą. Jei dėl vieno ar kitų priežasčių baltymas praranda savo natūrią struktūrą (angl. *native structure* – prigimtine, *in vivo* sintetinamo funkciškai aktyvaus baltymo erdvinę struktūrą), ląstelės panaudoja mechanizmus, užkertančius kelią nestruktūrintų baltymų agregacijai, sulankstant baltymus iš naujo arba suskaldant anomalios struktūros baltymus iki aminorūgščių. Vienas iš apsaugos mechanizmų yra baltymai, vadinami molekuliniiais šaperonais (angl.

chaperone – jaunos mergaitės palydovas), kurių normaliomis sąlygomis aptinkama ląstelėje didelėmis koncentracijomis ir kurie užtikrina tinkamą baltymų susilankstymą, ir naujai susintetintų polipeptidų ląstelinę lokalizaciją (4, 5). Streso metu (temperatūros pokytis, laisvieji radikalai ir kt.) ląstelėje indukuojama padidėjusi molekulinį šaperonų, dar vadinamų terminio šoko baltymais Hsps (angl. *heat stress (shock) proteins*) sintezė. Šių baltymų indukcija didina ląstelės gyvybingumą aukštesiose temperatūrose arba esant kitoms kenksmingoms sąlygoms. Antrasis apsaugos mechanizmas yra netaisyklingai susilankčiusių, nestruktūrintų baltymų degradacija iki aminorūgščių, ubiquitino-proteosomos keliu (UPS). Paprastai šių apsaugos mechanizmų pakanka ląstelei apsaugoti nuo agreguotų baltymų sankaupų (4, 5). Tačiau, organizmui senstant arba esant kitoms patologinėms sąlygoms (mutacijoms), baltymų kokybės kontrolės mechanizmai (šaperonai ir UPS) neveikia arba veikia netinkamai, ir ląstelėje arba už jos ribų kaupiasi anomalių konformacijos baltymai (1 pav.).

Daugelio sisteminių ligų atveju anomalių konformacijos baltymai kaupiasi ląstelėje kaip netirpios sankaupos ir, atrodo, atlieka pagrindinį vaidmenį ligos patogenezėje (2, 4–6). Yra daug paveldėtų ligų, pradedant cistine fibroze ir baigiant daugeliu hemoglobopatijų bei talasemija, kai dėl mutacijos baltymas negali tinkamai susilankstyti. Pavyzdžiui,



1 pav. Molekulinį šaperonų vaidmuo anomalių struktūros baltymų susidarymui

(Muchovski P. J. Protein misfolding, amyloid formation, and neurodegeneration: a critical role for molecular chaperone. *Neuron* 2002;35:9-12). Šaperonai gali sustabdyti amiloido formavimąsi, dalyvaudami A, B arba C keliuose. Taip pat šaperonai gali palengvinti toksiškų tarpininkų vartimą netirpiaisiais amorfiniais agregatais (D kelias).

susiformuoja netirpios baltymo globino sankaupos, iškreipiančios eritrocitų formą (4, 7). Nenormalios struktūros baltymų sankaupos ląstelės viduje ar už jos ribų yra būdingos daugeliui neurologinių ligų, įskaitant Alzheimerio, Parkinsono, Huntigtono, Jacob-Creutzfeld. Manoma, jog šios skirtingų baltymų sankaupos turi bendrą susidarymo mechanizmą ir sukelia panašų šeiminingo atsaką, nes netirpiose baltymų sankaupose aptinkama UPS komponentų, taip pat šaperonų (4, 6).

Aβ peptido kilmė

Alzheimerio liga yra neurodegeneracinės kilmės susirgimas, jai būdingi uždegiminiai procesai smegenyse, hipokampo susitraukimas, smegenų skilvelių padidėjimas, specifinės neuronų populiacijos degeneracija (1, 2). Alzheimerio liga siejama su dviejų rūšių netirpių baltymų sankaupų susidarymu: a) ekstraląsteliniai amiloido beta peptido (Aβ) polimerai, sudarantys plokšteles (angl. *plaques*); b) intraneuroninės hiperfosforilinto *tau* baltymo polimero sankaupos, sudarančios raizginius (angl. *tangles*). Plokštelių ir raizginių buvimas paciento, kurio sutrikusi atminties funkcija, smegenyse yra pagrindas Alzheimerio ligos diagnozei patvirtinti (1, 2).

Pagrindinį amiloido fibrilių, sudarančių plokšteles, komponentą 1984 m. nustatė G. G. Glenner ir C. W. Wong (8). Tai apie 4 kDa peptidas, dabar vadinamas Aβ (Abeta, amiloidas beta). Aβ gaunamas proteolitiškai skaldant didelį APP baltymą (angl. *amyloid precursor protein*), kuris vadinamas Aβ pirmtaku. Aptinkamos trys pagrindinės baltymo APP izoformos (sudarytos iš 695, 751 ir 770 aminorūgščių), atsirandančios po alternatyvaus RNR brendimo (angl. *RNA splicing* – RNR modifikacija po transkripcijos (RNR sintezės), kurios metu pašalinamos nekoduojančios DNR sekos (intronai), o koduojančios sekos (egzonai) sujungiamos tarpusavyje). Baltymo APP izoformos po transliacijos dar ir modifikuojamos – fosforilinamos (prikabinama fosfato PO_4 grupė), N- ir O-glikozilinamos (prijungiami oligosacharidai), sulfoninamos (prikabinama sulfogrupė SO_3H). Baltymo APP izoformos, turinčios 751 ir 770 aminorūgščių, sintetina daugelyje neneuroninių kūno ląstelių, taip pat aptinkamos ir neuronuose. Neuronai didesniais kiekiais sintetina 695 aminorūgščių baltymo APP izoformą, kurios kitose ląstelėse yra nedaug (2, 9).

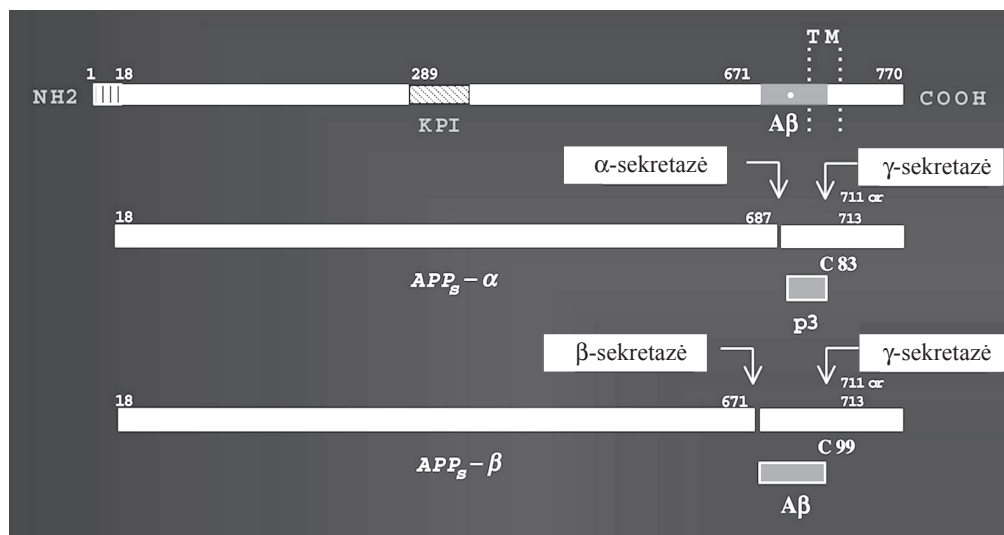
APP yra transmembraninis baltymas (angl. *transmembrane protein* – baltymas visiškai arba iš dalies prasiskverbiantis (angl. *span*) į membraną), kuris, signalinei sekai padedant, iš branduolio pernešamas į

endoplazminį tinklą ir sekrecijos metu yra modifikuojamas glikozilinant (prisijungia oligosacharidai). Glikozilinto APP gyvavimo pusperiodis yra 45–60 min. (2, 10). APP sekrecijos kelyje gali būti skaldomas proteazių (angl. *protease* – fermentas, skaldantis baltymus), atpalaiduojant sekretuojamus skaldymo produktus į vezikules arba už ląstelės ribų (2 pav.). Protezės α -sekretazės taikiny yra 12 aminorūgščių nutolęs nuo APP transmembraninio domeno N-galo (2 pav.). Šio skėlimo rezultatas – didelis APP fragmentas (α -APPs) atpalaiduojamas už ląstelės ribų ir membranoje lieka 83 aminorūgščių C-galinis APP fragmentas (C83). Kai kurios APP molekulės neskaldomos α -sekretazės, bet skaldomos β -sekretazės, kurios taikiny yra 16 aminorūgščių nutolęs nuo α -sekretazės skėlimo taikinio ir atpalaiduojamas šiek tiek mažesnis fragmentas (β -APP), o membranoje užlaikomas 99 aminorūgščių (C99) fragmentas (2 pav.). APP taip pat gali būti skaldomas γ -sekretazės. Jei APP bus skaldomas α -sekretazės ir γ -sekretazės, tai bus generuojamas p3 fragmentas, jei skaldomas β -sekretazės ir γ -sekretazės, tai bus gaunamas A β fragmentas. γ -sekretazė turi du alternatyvius skėlimo taikinius (2 pav.), todėl A β fragmentas kaip ir p3 gali būti 40 (A β 40) arba 42 (A β 42) aminorūgščių ilgio (2, 11).

Alzheimerio ligos genetiniai veiksniai

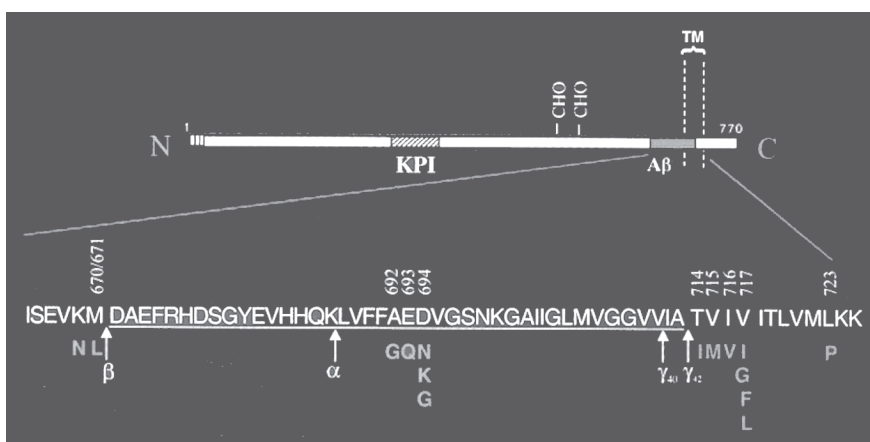
Žinoma, jog Alzheimerio liga yra ir šeimninė, paveldima autosominiu dominantiniu būdu. Paveldimos Alzheimerio ligos formos sudaro nuo 5 iki 10 proc. visų ligos atvejų (2). Daugelis tyrėjų mano, kad dauguma Alzheimerio ligos atvejų yra genetiškai determinuoti. Gana sudėtinga pasakyti, kaip dažnai genetiniai veiksniai yra Alzheimerio ligos priežastis, nes liga diagnozuojama vyresnio amžiaus žmonėms. Tačiau, remiantis fenotipine analize, aišku, kad dvi Alzheimerio ligos formos – šeimninė ir sporadinė yra fenotipiškai panašios ir dažnai net neatskiriamos. Histologiškai atskirti ankstyvosios nuo vėlyvosios Alzheimerio ligos fenotipą yra sudėtinga. Šeimninės (autosominės dominantinės) Alzheimerio ligos klinika yra labai panaši ar tokia pati kaip sporadinių atvejų. Šis fenotipinis panašumas rodo, kad autosominių dominantinių formų mechanizmai, sukelti APP ir presenilino genų mutacijų, yra tiesiogiai susiję su sporadine, nešeimine Alzheimerio ligos patogenezė (1, 2).

Pirmoji genetinė Alzheimerio ligos priežastis yra taškinės mutacijos APP gene. Nustačius šių mutacijų vietą ir įrodžius jų fenotipinį–genotipinį santykį, pavyko plačiau pažvelgti į Alzheimerio ligos mechanizmus (2). Mutacijos yra išsidėsčiusios arba prieš



2 pav. APP baltymas ir jo pagrindiniai metabolitai

(Sekoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001;81:741-66)
Viršutinėje diagramoje pavaizduota ilgiausia žinoma 770 aminorūgščių APP forma, atsiradusi po alternatyvaus RNR brendimo. Išryškintos atitinkamos baltymo sritys su aminorūgščių pozicijomis. 17 aminorūgščių signalinis peptidas yra baltymo NH₂ gale (pažymėta vertikaliomis linijomis, 1–18 aminorūgštys). Du alternatyviai brandinami egzonai, koduojantys 56 ir 19 aminorūgščių polipeptidinius fragmentus, įterpti ties 289 aminorūgštimi. Pirmasis egzonas koduoja Kunitz tipo (KPI) serininės proteazės inhibitoriaus domeną. TM pažymėtas vienintelis transmembraninis domenas, esantis tarp 700–723 aminorūgščių. A β fragmentas turi 28 aminorūgšties liekanas, esančias už membranos, ir pirmąsias 12–14 transmembraninio domeno aminorūgščių. Vidurinėje ir apatinėje diagramose rodyklės rodo proteazių (sekretazių) skėlimo taikinius.



3 pav. β-APP mutacijos siejamos su Alzheimerio liga

(Sekoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001;81:741-66)

Baltymo APP seka, turinti Aβ ir transmembraninę sritį, išreikšta vienraidžiu aminorūgščių kodu, parodyta paveikslo apačioje. Aβ aminorūgštys yra pabrauktos. Raidės sekos apačioje žymi žinomas taškinės mutacijas, nustatytas esant šeiminiam Alzheimerio ligos atvejams. TM žymi transmembraninį domeną.

β-sekretazės, po α-sekretazės arba iškart po γ-sekretazės skėlimo taikinių (3 pav.). Jokių kitų mutacijų APP gene, kurios turėtų įtakos Alzheimerio ligai, neaptikta. Todėl galima manyti, kad šios taškinės mutacijos paveikia APP proteolitinį skaldymą trimis sekretazėmis (12). Taigi, devynios APP geno mutacijos, siejamos su šeimine Alzheimerio liga, sukelia padidėjusią Aβ gamybą. Dviejų aminorūgščių mutacija prieš β-sekretazės skėlimo taikinį sukelia padidėjusį skaldymą šia sekretaze, tad pasigamina daugiau Aβ40 ir Aβ42 (10, 11). Penkios mutacijos už γ-sekretazės skėlimo taikinio didina tik Aβ42 formos produkciją (10).

1995 m. nustatytos mutacijos presenilino 1, PSEN1, (angl. *presenilin*) geno, esančio 14 chromosomoje, ir presenilino 2, PSEN2, esančio 1 chromosomoje (13). Šios taškinės mutacijos siejamos su šeimine Alzheimerio liga – tokiose šeimose liga pasireiškėdavo 30–50 gyvenimo metais. PSEN1 gene aptiktos 160 taškininių mutacijų (daugiau kaip 258 šeimos) ir 10 mutacijų (15 šeimų) PSEN2 gene, kurios siejamos su ankstyvąja Alzheimerio liga (14, 15).

Presenilinais (PS) yra transmembraniniai baltymai: PSEN1 genas koduoja 467 aminorūgščių baltymą, o PSEN2 genas – 448 aminorūgščių baltymą. Abu baltymai sintetinami smegenyse bei daugelyje žmogaus kūno ląstelių (15). Nustatyta, jog PS1 ir PS2 yra γ-sekretazės subvienetai. γ-sekretazės/presenilino kompleksas skelia baltymą APP transmembraninio domeno srityje ir susidaro visas spektras įvairaus ilgio Aβ peptidų (vyraujantis ilgis ≥Aβ42 ir ≤Aβ40) (15, 16). Manoma, jog mutacijos PS selektyviai padidina ypač amiloidogeniško Aβ42 peptido kiekį, kuris ir

aptinkamas sergančiųjų Alzheimerio liga smegenyse. Koku būdu PS mutacijos lemia padidėjusį Aβ42 kiekį, neaišku. Greičiausiai, γ-sekretazė, sąveikaudama su mutuotu presenilinu, APP baltymą skelia tokioje vietoje, jog susidaro didelis Aβ42 kiekis (15).

Aβ oligomerai – naujieji neurotoksinai

Remiantis genetiniais ir biocheminiais duomenimis bei panaudojus gyvūnų modelius, galima teigti, jog amiloido beta peptidas (Aβ) yra Alzheimerio ligos kertinis akmuo. Priklausomai nuo to, kurioje vietoje γ-sekretazė skelia APP, generuojamos trys pagrindinės Aβ formos, turinčios 38, 40 ir 42 aminorūgštis (16). Ypač svarbu tai, kokia Aβ forma susidarys, nes Aβ42 forma labiau linkusi oligomerizuotis ir sudaryti fibriles nei gausiau sintetinamas Aβ40 peptidas.

Baltymo Aβ susidarymas yra normalus fiziologinis procesas: šis baltymas aptinkamas sveikų žmonių smegenyse ir stuburo smegenų skystyje (17). Vadinasi, pats baltymo Aβ buvimas nesukelia neurodegeneracijos. Neuronų pažeidimas atsiranda, kai įvyksta tvarkinga Aβ molekulių asociacija: tyrimai parodė, kad amiloido plokštelėse, kurios būdingos Alzheimerio ligai, dalis Aβ yra asociavusios į netirpias 6–10 nm diametro fibriles (18). Sintetinis Aβ *in vitro* taip pat gali formuoti amiloido fibriles panašias į tas, kurios aptinkamas žmogaus smegenyse (19).

1992 m. sukurta J. A. Hardy ir G. A. Higgins amiloido kaskados hipotezė (20) paremta tuo, jog netirpios amiloido Aβ fibrilės yra pirminis molekulinis Alzheimerio ligos patogenas. Tačiau buvo ignoruojamas faktas, jog yra silpnas ryšys tarp amiloidinių plokštelėlių kiekio ir demencijos sunkumo (21, 22). Vėlesni

tyrimai parodė, kad yra aiškus ryšys tarp tirpaus Aβ kiekio ir sinapsių pažaidų laipsnio bei pažinimo funkcijų sutrikimų. Tirpi Aβ forma suprantama kaip bet kokia tirpi vandeniniame buferiniame tirpale Aβ forma, kuri išlieka tirpale po ultracentrifugavimo (17). Tirpių Aβ formų reikšmę atskleidė J. C. Dodart ir kolegų (23) eksperimentai su transgeninėmis pelėmis. Transgeninei pelei, turinčiai žmogaus APP geną, buvo leidžiami monokloniniai antikūnai prieš Aβ peptidą. Tokios pelės buvo naudojamos kaip modelinė sistema ankstyvajai Alzheimerio ligai tyrinėti: nuo amžiaus priklausomas atminties praradimas siejamas su amiloidinių plokštelių atsiradimu, pastarasis taip pat priklauso nuo amžiaus. Remiantis J. C. Dodart tyrimų duomenimis, padarytos kelios svarbios išvados, kurios nesiderina su pirmine amiloido kaskados hipoteze. Pirma, vakcinuotų gyvūnų atmintis buvo grįžtama mažiausiai 24 val. laikotarpiu. Grįžtamumo negali būti, jeigu atmintis prarandama dėl nervų ląstelių žūties. Antra, terapinis antikūnų prieš Aβ poveikis buvo akivaizdus, nors amiloido plokštelės sunaikintos nebuvo (1, 23). Vadinasi, amiloido fibrilės nėra vienintelis patogeninis agentas. Atminties grįžtamumas buvo nepriklausomai patvirtintas ir L. A. Kotilinek su kolegomis (24), naudojant skirtingas peles ir skirtingus antikūnus prieš Aβ.

Imunologiniai eksperimentai taip pat masių spektroskopija parodė, kad biochemiškai nustatomi tirpaus Aβ kiekiai, įskaitant tirpius oligomeres, aiškiau koreliuoja su pažinimo funkcijų sutrikimu nei vadinaujamųjų plokštelių skaičiaus nustatymas (25). Nustatyta, kad sergančiųjų Alzheimerio liga smegenyse yra net 70 kartų daugiau tirpių oligomerų nei sveikų žmonių (26). Šis oligomerų kiekio padidėjimas aptinkamas frontalinėje smegenų žievės dalyje, bet ne smegenelėse, o tai tik patvirtina oligomerų poveikį atminčiai ir suvokimui (1).

Mokslinėje literatūroje paskelbta daug duomenų apie įvairias sintetinio Aβ formas (*in vitro* susidarančias): protofibrilės (PF), tirpūs globuliniai oligomerai, pavadinti ADDL (angl. *amyloid β-derived diffusible ligands*), fibrilės (27). Dvi tyrėjų grupės (28, 29) aptiko tarpinę formą – protofibrilės (PF). PF turi linijinę formą, jų ilgis būna iki 400 nm, o molekulinė masė siekia iki milijono daltonų. Kinetiniai eksperimentai parodė, jog protofibrilės yra visaverčių fibrilių pirmtakas. Pasirodė, kad PF nėra vien tik struktūrinis fibrilių tarpininkas – PF yra neurologiškai aktyvios. Į ADDL panašūs oligomerai buvo aptikti sergančiųjų Alzheimerio liga smegenyse ir tokių oligomerų formų buvimas atitinka atminties praradimo laipsnį sergant Alzheimerio liga (26). Manoma, jog ne tik ADDL ir

PF yra neurologiškai aktyvūs, nustatyta, jog natūralūs, sekretuojami audinių kultūrose, Aβ dimerai bei trimrai sukelia sinapsių degeneraciją (30–33).

Deja, oligomerų ir fibrilių susiformavimo mechanizmai *in vitro* ir *in vivo* lieka neaiškūs. Kol kas yra daug neatsakytų klausimų (1). Keletas jų: kodėl oligomerų formavimasis yra priklausomas nuo žmogaus amžiaus? Ar molekuliniai šaperonai dalyvauja oligomerų formavimosi procese? Ar molekuliniai šaperonai tampa mažiau aktyvūs sergant Alzheimerio liga?

Naujos AL gydymo strategijos

Genetiniai, biocheminiai, pataloginiai ir farmakologiniai tyrimai padėjo išaiškinti oligomerų įtaką Alzheimerio ligos pasireiškimui. Vienas iš gydymo taikinių yra oligomerinės Aβ formos. Nauja gydymo strategija pagrįsta imunoterapija, t. y. arba taikoma vakcinacija Aβ peptidu, arba vartojami monokloniniai antikūnai prieš Aβ (27, 34, 35). Po sėkmingų eksperimentų su pelių vakcina buvo pradėti tokių vakcinų klinikiniai tyrimai su žmonėmis, sergančiais Alzheimerio liga. Deja, tyrimai buvo nutraukti, nes pasitaikė smegenų uždegimų atvejų (6 proc. pacientų), kai kurie jų pasibaigė mirtimi (27, 36). Nepaisant problemų, vakcinos klinikiniai tyrimai parodė, kad individų, kuriems pasireiškė stiprus imuninis atsakas, Alzheimerio ligos progresavimas buvo sustabdytas bent 12 mėnesių (37). Įrodyta, jog antikūnai prieš Aβ *in vitro* inhibuoja Aβ fibrilių susidarymą ir suardo egzistuojančias fibriles (38, 39). Taip pat nustatyta, jog antikūnai neutralizuoja oligomeres, neprišijungdami prie Aβ monomerų arba fibrilių (40). Vienas iš antikūnų bapineuzumabas (sukurtas dviejų farmacinių kompanijų „Eli Lilly“ ir „Wyeth“) yra humanizuotas monokloninis antikūnas, su kuriuo dar atliekami klinikiniai tyrimai (41).

APP baltymo metabolizmas bei šio baltymo fragmento Aβ agregacija taip pat yra tyrimų objektas. Aβ atsiranda veikiant γ-sekretazei ir β-sekretazei, todėl ieškoma šių sekretazių inhibitorių. Kai kurie cheminiai junginiai inhibuoja γ-sekretazės aktyvumą, o vienas iš jų – LY-450139 (semagacestat) yra III klinikinių tyrimų fazėje (41). Tačiau γ-sekretazė dalyvauja daugelio kūno ląstelių diferenciacijos procesuose (embrioninių, žarnyno epitelio, blužnies, T ląstelių), todėl jos aktyvumo užblokavimas *in vivo* turėtų ilgalaikių neigiamų pasekmių (16, 42). α-sekretazės aktyvumo stimulatorius EHT-0202 yra II klinikinių tyrimų fazėje (41). Efektyvių β-sekretazės inhibitorių kol kas neaptikta.

Tarenflurbilas yra selektyvi Aβ42 susidarymą

mažinanti medžiaga, be to, tai yra pirmasis naujosios kartos vaistas, skirtas švelnioms Alzheimerio ligos formoms gydyti. Tarenflurbilas keičia γ -sekretazės skėlimo vietą, todėl susidaro trumpesnis, ne toks toksiškas A β fragmentas. Ši medžiaga skirtingai nei kiti γ -sekretazės inhibitoriai nesąveikauja su kitais γ -sekretazės substratais (43, 44).

Nesteroidiniai priešuždegiminiai vaistai (NPUV) taip pat gali turėti įtakos A β susidarymui bei uždegiminiams procesams. Įrodyta, jog NPUV netiesiogiai

veikia oligomerų formavimąsi, nes jie pakeičia γ -sekretazės skėlimo vietą APP molekulėje, todėl pasigamina mažesnis, neagreguojantis A β 38 fragmentas (27, 44).

Statinų, vitamino E, estrogenų, memantino poveikis minimalus (41, 43). Deja, kol kas nėra veiksmingų ligos eigą veikiančių vaistų (43, 44). Taigi, Alzheimerio ligos taikinių kartu su diagnostikos priemonėmis, t. y. genetinėmis, biožymenų, neurovizualinėmis paieška tebėra svarbi tyrinėjimų sritis.

Alzheimer's disease: a molecular mechanism, new hypotheses, and therapeutic strategies

Milda Plečkaitytė

Laboratory of Immunology and Cell Biology, Institute of Biotechnology, Lithuania

Key words: Alzheimer's disease; protein folding; amyloid protein; fibrils; oligomers.

Summary. Human diseases involving protein misfolding and aggregation have received increasing attention in recent years. Alzheimer's disease and other diseases associated with aging are sweeping the developed countries whose populations are rapidly aging. Recent progress has improved our knowledge about molecular and cellular pathogenesis of these diseases. For more than 20 years, multiple diseases such as Alzheimer's and Parkinson's diseases have been associated with accumulation of abnormal protein fibrils. These self-assembling fibrils, referred as "amyloid," have been considered the pathogenic molecules that cause cellular degeneration. Accumulation of fibrillar A β in plaques underlies the theory for Alzheimer's disease. Recent experiments have provided evidence that fibrils are not the only neurotoxins. Soluble oligomers and protofibrils play a crucial role in causing cellular dysfunction and death. These oligomers, the missing links in the original amyloid cascade hypothesis, have been incorporated into an updated amyloid cascade. Despite new information gained, there is no disease-modifying treatment. New insights into disease mechanisms and new therapeutic strategies give hope for change.

Literatūra

1. Klein WL. Cytotoxic intermediates in the fibrillation pathway: A β oligomers in Alzheimer's disease as a case study. In: Uvertsky VN, Fink AL, editors. Protein misfolding, aggregation, and conformational diseases. Part A: Protein aggregation and conformational diseases. New York: Springer; 2006. p. 61-75.
2. Sekoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001;81:741-66.
3. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16:574-81.
4. Sherman MY, Goldberg AL. Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 2001;29:15-32.
5. Macario AJ, Conway de Macario E. Sick chaperones, cellular stress, and disease. *N Engl J Med* 2005;353:1489-501.
6. Muchowski PJ. Protein misfolding, amyloid formation, and neurodegeneration: a critical role for molecular chaperone. *Neuron* 2002;35:9-12.
7. Amrani M, Allen NJ, O'Shea J, Corbett J, Dunn MJ, Tadjkarimi S, et al. Role of catalase and heat shock protein on recovery of cardiac endothelial and mechanical function after ischemia. *Cardioscience* 1993;4:193-8.
8. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;120:885-90.
9. Henriques AG, Vieira SI, Rebelo S, Domingues SC, da Cruz e Silva EF, da Cruz e Silva OA. Isoform specific amyloid-beta protein precursor metabolism. *J Alzheimers Dis* 2007;11:85-95.
10. da Cruz e Silva EF, da Cruz e Silva OA. Protein phosphorylation and APP metabolism. *Neurochem Res* 2003;28:1553-61.
11. Walsh DM, Minogue AM, Sala Frigerio C, Fadeeva JV, Wasco W, Selkoe DJ. The APP family of proteins: similarities and differences. *Biochem Soc Trans* 2007;35:416-20.
12. Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, et al. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor

- protein gene. *Nature* 1991;353:844-6.
13. Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 1995;376:775-8.
 14. Hardy J. The Alzheimer family of diseases: many etiologies, one pathogenesis? *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2095-7.
 15. Vetrivel KS, Zhang YW, Xu H, Thinakaran G. Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener* 2006;1:4.
 16. Wakabayashi T, De Strooper B. Presenilins: members of the γ -secretase quartets, but part-time soloists too. *Physiology* 2009;23:194-204.
 17. Walsh DM, Selkoe DJ. A β oligomers – a decade of discovery. *J Neurochem* 2007;101:1172-2284.
 18. Busciglio J, Lorenzo A, Yankner B. Methodological variables in the assessment of beta-amyloid neurotoxicity. *Neurobiol Aging* 1992;13:609-12.
 19. Kirschner DA, Inouye H, Duffy LK, Sinclair A, Lind M, Selkoe DJ. Synthetic peptide homologous to beta protein from Alzheimer disease forms amyloid-like fibrils *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84(19):6953-7.
 20. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992;256:184-5.
 21. Katzman R, Terry R, DeTeresa R, Brown T, Davies P, Fuld P, et al. Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol* 1988;23:138-44.
 22. Terry RD. Neuropathological changes in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 1994;101:383-90.
 23. Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C, et al. Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* 2002;5:452-7.
 24. Kotilinek LA, Basckai B, Westerman M, Kawarabayashi T, Younkin L, Hyman BT, et al. Reversible memory loss in mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2002;22:6331-5.
 25. Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, et al. Correlation between elevated levels of amyloid β -peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 2000;283:1571-7.
 26. Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, et al. Alzheimer's disease-affected brain; presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10417-22.
 27. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:101-12.
 28. Harper JD, Wong SS, Lieber CM, Lansbury PT Jr. Observation of metastable A β amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem Biol* 1997;4:119-25.
 29. Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Condrom MM, Teplow DB. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem* 1997;272:22364-72.
 30. Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, et al. A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006;440(7082):352-7.
 31. Coleman P, Federoff H, Kurlan R. A focus on the synapse for neuroprotection in Alzheimer disease and other dementias. *Neurology* 2004;63:1155-62.
 32. Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez S, Gong Y, Viola KL, et al. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci* 2004;24:10191-200.
 33. Lambert MP, Velasco PT, Chang L, Viola KL, Fernandez S, Lacor PN, et al. Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of A β . *J Neurochem* 2007;100:23-35.
 34. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, et al. Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999;400:173-7.
 35. Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, et al. Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature Med* 2000;6:916-919.
 36. Ferrer I, Boada RM, Sanchez Guerra ML, Rey MJ, Costa-Jussa F. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 2004;14:11-20.
 37. Hock C, Konietzko U, Streffer JR, Tracy J, Signorell A, Muller-Tillmanns B, et al. Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* 2003;38:547-54.
 38. Solomon B, Koppel R, Hana E, Katzav T. Monoclonal antibodies inhibit *in vitro* fibrillar aggregation of the Alzheimer β -amyloid peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:452-5.
 39. McLaurin J, Cecal R, Kierstead ME, Tian X, Phinney AL, Manea M, et al. Therapeutically effective antibodies against amyloid- β peptide target amyloid- β residues 4–10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nature Med* 2002;8:1263-9.
 40. Chromy BA, Nowak RJ, Lambert MP, Viola KL, Chang L, Velasco PT, et al. Self-assembly of A β (1-42) into globular neurotoxins. *Biochemistry* 2003;42:12749-60.
 41. Frisardi V, Solfrizzi V, Imbimbo BP, Capurso C, D'Introno A, Colacicco AM, et al. Towards disease-modifying treatment of Alzheimer's disease: drugs targeting beta-amyloid. *Curr Alzheimer Res* 2009;7:40-55.
 42. Imbimbo BP. Therapeutic potential of gamma-secretase inhibitors and modulators. *Curr Top Med Chem* 2008;8:54-61.
 43. Hüll M, Berger M, Heneka M. Disease-modifying therapies in Alzheimer's disease: how far have we come? *Drugs* 2006;66:2075-93.
 44. Christensen DD. Alzheimer's disease: progress in the development of anti-amyloid disease-modifying therapies. *CNS Spectr* 2007;12:113-23.

Straipsnis gautas 2008 07 15, priimtas 2010 01 04
Received 15 July 2008, accepted 4 January 2010