

GRZEGORZ TERLECKI

The Role of Lipids in the Pathogenesis of Amyloidoses and in the Cell Destruction Mechanisms

Rola lipidów w patogenezie amyloidoz i w mechanizmach destrukcji komórki

Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej AM we Wrocławiu

Streszczenie

Choroba Alzheimera, Parkinsona i wiele innych to amyloidozy, związane z zaburzeniami spowodowanymi tworzeniem złogów w różnych tkankach przez swoiste białka, które u zdrowych osób nie wykazują takiej tendencji. Bezpośrednią przyczyną tych zaburzeń jest zmiana typowej dla tych białek konformacji na inną, sprzyjającą tworzeniu się z ich cząsteczek polimerycznych struktur, zwanych amyloidem. Za prawdopodobną przyczynę takiego zachowania się białek amyloidogennych uważa się ich wzajemne oddziaływanie z lipidami błon komórkowych, a szczególnie z fosfolipidami kwaśnymi. W niniejszej pracy, na przykładzie peptydu A β i białka α -synukleiny, budulca amyloidu, odpowiednio w chorobie Alzheimera i Parkinsona, przedstawiono mechanizm interakcji tych peptydów/białek z błoną lipidową. Opisano także powiązanie tej interakcji z budową oddziałującego peptydu i czynnikami utleniającymi, co ma kluczowe znaczenie dla polimeryzacji peptydu/białka. Innym, niepatologicznym skutkiem zmian konformacyjnych białka z udziałem lipidu/lipidów jest powstawanie aktywnych antynowotworowo konformerów takich białek, jak α -laktoalbumina czy histon H1. Są one zdolne do rozpoznawania komórek nowotworowych i niszczenia ich przez indukowanie apoptozy. W myśl najnowszej koncepcji genezy amyloidoz i innych procesów, u podstaw których leżą zmiany konformacyjne białek, kluczowym elementem jest błona komórkowa, a szczególnie fosfolipidy kwaśne wchodzące w skład jej dwuwarstwy lipidowej. Dzięki swoim właściwościom fizykochemicznym generują one przy powierzchni błony strefę o silnie obniżonym pH, która powoduje zmianę konformacji białek wchodzących w interakcję z błoną (Adv Clin Exp Med 2006, 15, 3, 513–520).

Słowa kluczowe: choroby konformacyjne, amyloidozy, lipidy, fosfolipidy kwaśne, ludzka α -laktoalbumina HAMLET zdolna do uśmiercania komórek nowotworowych.

Abstract

Alzheimer's disease, Parkinson's disease and many other disorders have been shown to be amyloidoses. They are dysfunctions caused by deposits of proteins, appearing in different tissues and formed by proteins which in the healthy organism do not have such a tendency. Changes in the conformation of the proteins lead to the conversion of the typical for them conformation into the other one causing the polymerization of the proteins into amyloid structures. The presented review shows that the amyloidogenic behaviour of proteins is generated probably by their interaction with cell membrane lipids and particularly with acidic phospholipids. Using A β -peptide and the protein α -synuclein as representatives of amyloid forming elements in Alzheimer's disease and Parkinson's disease respectively, the mechanism of the interaction of the peptide/protein with lipid membrane was shown. Relations between the interaction, the peptide structure and oxidizing agents were also presented in the light of evidences indicating the key role of the interaction in the peptide/protein molecules polymerization. The other, not pathological effect of protein conformation changes with lipid/lipids participation is the conversion of α -lactalbumin and histone H1 into conformers with antitumor activity, able to induce apoptosis in tumor cells. The principal idea of the newest conception of amyloidogenesis and other processes basically connected with changes of proteins conformation is that the cell membrane acidic phospholipids can provide the low-pH environment on the membrane, generating the conversion of the interacting protein conformation (Adv Clin Exp Med 2006, 15, 3, 513–520).

Key words: conformational diseases, amyloidoses, lipids, acidic phospholipids, human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells HAMLET.

Biologiczna funkcja każdego białka jest uwarunkowana jego strukturą przestrzenną, zdeteminowaną przez sekwencję aminokwasową łańcucha polipeptydowego oraz przez wiązania chemiczne i wiele innych czynników, w tym wzajemne oddziaływanie białka z cząsteczkami innych substancji. Niewłaściwie uformowany przestrzennie łańcuch polipeptydowy uniemożliwia wypełnianie przypisanej cząsteczce funkcji biologicznej lub nawet prowadzi do nadania jej właściwości patologicznych. Następstwem pojawienia się takich cząsteczek w tkance mogą więc być zmiany patologiczne, prowadzące do śmierci jej komórek. Choroby spowodowane zmianami w konformacji białek nazywa się amyloidozami. W chorobach tych nieszkodliwe, rozpuszczalne białka ulegają transformacji, tj. zmianie przestrzennego uformowania ich łańcuchów polipeptydowych w nową strukturę konformacyjną bez jakichkolwiek zmian w sekwencji aminokwasów. Sprawia to, że białka te bardzo łatwo agregują, przybierając postać nierozpuszczalnych, fibrylarnych struktur, które odkładają się najczęściej w przestrzeniach międzykomórkowych różnych organów w postaci złogów [1]. Odkładaniu się tych złogów towarzyszą zaburzenia w działaniu organów, w których występują, dlatego uznano, że istnieje ścisły związek między pojawianiem się złogów a zaburzeniem funkcji organów. Złogi białkowe nazwano amyloidem i uznano za przyczynę pojawiających się wraz z nimi zaburzeń [2]. Obecnie jest znanych około 20 białek tworzących fibrylarnie złogi charakterystyczne dla ludzkich amyloidoz [1]. Charakterystyczną cechą złogów amyloidowych jest to, że bez względu na to, jakie białko je tworzy, jednostką strukturalną są fibryle. Mają one postać nanorurek wypełnionych wodą, a podstawowym, dominującym elementem ich struktury jest β -karta [3]. Zjawiska patologiczne, u podstaw których leży powstawanie złogów fibrylarnych towarzyszą chorobie Alzheimer, Parkinsona, Creutzfelda-Jacoba, Huntingtona, cukrzycy typu II, starczej amyloidzie ogólnoustrojowej i wielu innym. Znane są także zjawiska, w których zmiany konformacyjne już uformowanego i aktywnego biologicznie białka prowadzą do nadania mu nowej funkcji – niepatologicznej, a wręcz przeciwnie, służącej usuwaniu np. stransformowanych nowotworowo komórek. Ma to miejsce w przypadku przekonformowanej, ludzkiej α -laktoalbuminy HAMLET (*human α -lactalbumin made lethal to tumor cells*) zdolnej w nowej postaci konformacyjnej do uśmiercania komórek nowotworowych.

Rola lipidów w procesach inicjujących amyloidozę

Choroba Alzheimer należy do grupy chorób neurodegeneracyjnych dorosłych osób. W przypadku tego zaburzenia duża liczba dowodów wskazuje na 39–43 aminokwasowy β -amyloidowy peptyd A β , będący głównym składnikiem zewnątrzkomórkowych płytek amyloidowych w mózgach pacjentów. Szczególnie oligomeryczne i protofibrilarnie struktury A β są uważane za główną przyczynę neuropatologicznych problemów u pacjentów z tą chorobą [1, 4]. U zdrowych osób wytwarzanie peptydów A β z białka prekursorowego (APP – *amyloid precursor protein*) zachodzi bez oddziaływania toksycznego. Obserwacja ta rodzi pytanie, jakie zmiany zachodzą w produkcji peptydów A β i ich błonowym środowisku, że powodują one przekształcenie się tych peptydów w czynnik toksyczny odpowiedzialny (lub współodpowiedzialny) za chorobę Alzheimer. Wiadomo, że u zdrowych osób część peptydów A β jest uwalniana i stale usuwana w postaci monomerów do roztworu, podczas gdy inna frakcja tych peptydów pozostaje w formie związanej z błoną, dzięki czemu jest chroniona przez otaczające lipidy przed agregacją.

Wiele badań wskazuje, że lipidy błon neuronalnych wywierają inicjujący i wzmacniający wpływ na przemianę A β w toksyczne oligomery [5–7]. Biorąc pod uwagę fakt, że obserwuje się wiele zmian w składzie lipidowym błon komórek mózgu osób z rozpoznaną chorobą Alzheimer [8, 9], interakcja między A β a błonami komórkowymi może być kluczowym etapem inicjującym rozwój choroby. Możliwy mechanizm toksycznego działania peptydu A β może polegać na zaburzeniu fizjologicznych właściwości błon [5, 7] i uruchomieniu przez mechanizmy błonowe apoptozy w neuronach oraz peroksydacji lipidów błonowych i/lub tworzeniu kanałów przepuszczających jony wapnia [6]. Szczególną rolę przypisuje się fosfolipidom anionowym (kwaśnym), tj. takim, których ładunek wypadkowy jest ujemny (fosfatydyloseryna, fosfatydyloinozytol, fosfatydyloglicerol, kwas fosfatydowy), a także innym składnikom błon, takim jak gangliozydy lub cholesterol, oraz strukturom nazywanym błonowymi tratwami lipidowymi [5, 10, 11]. Obecnie nie wiadomo, jaka jest natura wzajemnych relacji między peptydami A β a błonami. Nie jest znany również mechanizm kontrolujący los cząsteczek A β związanych z lipidami, który powoduje, że albo są one chronione przez otoczenie lipidowe, albo gromadzone w postaci toksycznych fibryl o strukturze β -karki i/lub kanałów jonowych. Według Bokvist et al. [12]

transbłonowa lokalizacja amfipatycznego peptydu A β (1-40), dzięki lipidom otaczającym monomery A β , może zabezpieczyć go przed agregacją w toksyczne protofibrille. Uwolnienie jednakże peptydu A β (1-40) jako rozpuszczalnego monomeru, przyspiesza jego łączenie się w toksyczne agregaty, powstające w wyniku kontaktu ze swoistą (prawdopodobnie zmienioną patologicznie) powierzchnią błony. Badania dowiodły także, że fosfolipidy kwaśne mogą umożliwiać zakotwiczenie się A β (1-40) w błonie przez transbłonowe ułożenie jego C-końca. Jest to możliwe dzięki natywnej, helikalnej strukturze peptydu. Z drugiej strony te same składniki lipidowe indukują przyspieszoną agregację peptydów A β w wyniku bezpośredniej interakcji z powierzchnią błony [12]. W obu przypadkach hydrofobowe i elektrostatyczne oddziaływania odgrywają ważne role w funkcjonalnej organizacji tych dwóch różnych typów kompleksów peptydów A β z błoną, co ma miejsce w chorobie Alzheimera. Wydaje się, że powstawanie agregatów peptydu A β może być indukowane przez wysoki, amyloidogenny potencjał hydrofobowej, C-końcowej domeny peptydu. Jej właściwości są odpowiedzialne za przejście z nietoksycznej, rozpuszczalnej struktury peptydowej o formie globularnej do nierozpuszczalnej, polimerycznej formy fibrylarniej o strukturze β . Hydrofobowość C-końca powinna uniemożliwiać jego wniknięcie w błonę z powodu sił odpychających pojawiających się w hydrofilowym obszarze przybłonowym. Wyniki wielu badań jednak wskazują, że peptyd A β może wnikać w dwuwarstwą lipidową błony pod wpływem wielu czynników, np.: pH, jonów metali, składu chemicznego błony, stanu konformacyjnego itp. W świetle badań wydaje się, że istnieją dwa, zupełnie różne typy połączeń A β z błoną: jeden transmembranowy (wniknięcie w błonę), a drugi powierzchniowy, które uczestniczą w procesach uwalniania peptydu A β z błony albo jego ponownym w niej zakotwiczeniu. Dla obu typów połączeń bardzo są istotne oddziaływania hydrofobowe i elektrostatyczne, ale mają różny udział w tworzeniu wymienionych wyżej typów kompleksów lipid (błonowy)–peptyd. Jeśli więc podczas formowania (fałdowania) swojej struktury monomer A β opuści natywną macierz błonową i nie nastąpi jego ponowne, głębokie zakotwiczenie w błonie, to na powierzchni błony neuronu może dojść do powstania jego toksycznych agregatów. Drugą możliwością jest to, że peptydy A β mogą wnikać lub pozostać w błonach i formować kanały jonowe, tworząc podjednostki ich struktury.

W przypadku choroby Parkinsona zaobserwowano wiele analogii z powyżej opisanymi procesami. Białkiem tworzącym fibrylarne wtręty (ciała

Lewy'ego), które pojawiają się w cytoplazmie degenerujących, dopanergicznym neuronów substancji czarnej mózgu [13], jest α -synukleina. Jest to białko o nieznannej funkcji, intensywnie syntezowane w neuronach [14]. Podobnie jak w przypadku wyżej opisanego peptydu A β , fibrylacja α -synukleiny polega na tworzeniu najpierw mniejszych struktur oligomerycznych, zwanych protofibrilami, z których później powstają bardziej od nich stabilne fibrille [15]. Uważa się, że jedna z tych form jest/może być odpowiedzialna za śmierć neuronów w chorobie Parkinsona [16]. Badania prowadzone w celu wyjaśnienia tej hipotezy wykazały [17], że monomeryczna α -synukleina wiąże się jedynie z liposomami zbudowanymi z syntetycznych fosfolipidów kwaśnych (fosfatydyloglicerolu lub fosfatydyloglicerolu i fosfatydylocholine). Takie połączenia nie powstają z liposomami zbudowanymi wyłącznie z fosfolipidów neutralnych (np. z fosfatydylocholine). Podobne właściwości wykazuje protofibrilarna α -synukleina. W takich samych warunkach doświadczenia, ale z użyciem liposomów zbudowanych ze składników naturalnych, tj. z fosfolipidów kwaśnych wyizolowanych z mózgów zwierzęcych (różnią się one od form syntetycznych posiadaniem innych łańcuchów lipidowych w cząsteczkach) obserwowano, że protofibrilarna forma α -synukleiny łączy się z nimi znacznie wydajniej niż forma monomeryczna [18]. Ogólnie stwierdzono, że protofibrilarna forma α -synukleiny wiąże się z dużym powinowactwem tylko do fosfolipidów kwaśnych (np. fosfatydyloglicerolu). Wiązanie to było wyraźnie silniejsze (większa ilość związanego białka) niż w przypadku formy monomerycznej i fibrylarniej, a jego skutkiem było „rozszerzenie” błony pęcherzyków. Takiego skutku nie powodowało oddziaływanie z pęcherzykami zarówno formy fibrylarniej synukleiny, jak i jej formy monomerycznej [18]. Co więcej, oddziaływanie z pęcherzykami synukleiny o prawidłowej budowie nie różniło się istotnie od oddziaływania jej form zmutowanych, dlatego sugeruje się, że różnica między mózgiem chorego na „parkinsonizm” a mózgiem zdrowego człowieka nie wynika z faktu, że w tym pierwszym występuje synukleina o zmienionej strukturze pierwszorzędowej, ponieważ zdecydowana większość jej cząsteczek ma niezmienioną strukturę. Za główną różnicę natomiast należy uznać odmienną strukturę czwartorzędowej cząsteczek synukleiny w mózgu chorego, która wyraża się innym zachowaniem jej protofibrilarnych form w badaniach *in vitro*, o czym świadczą wyniki wielu prac [16, 18, 19]. Protofibrilarna forma synukleiny ma strukturę typu β -kartki (typową dla amyloidu) i taką też utrzymuje po związaniu z błoną. Za podstawę mechanizmu toksycznego działania protofibrilarnych form synukleiny przyjmuje się

„dziurawienie” dwuwarstwy lipidowej błony komórkowej. Skutkiem tego procesu może być degeneracja i śmierć neuronów. W badaniach *in vitro* wykazano, że punktowe mutacje genu kodującego α -synukleinę sprzyjają procesom oligomeryzacji, ponieważ białka synukleiny oznaczone jako A53T i A30P, powstałe na skutek ekspresji zmutowanego genu, mają zwiększoną zdolność formowania protofibrilli [20]. Poza innymi czynnikami, to właśnie mutacje synukleiny sprzyjają tworzeniu protofibrilli i powstawaniu zmian degeneracyjnych neuronów, ponieważ – jak się uważa – zmieniają one selektywność oddziaływania tego białka tak, że preferuje ono interakcję z tymi błonami komórkowymi, które zawierają fosfolipidy kwaśne. Zmiana przepuszczalności błony, spowodowana tym oddziaływaniem, może prowadzić do niekontrolowanego przepływu wapnia do cytosolu, depolaryzacji błony mitochondrialnej lub wzrostu ilości dopaminy, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki [21]. Mechanizm toksycznego działania proponowany dla α -synukleiny można z powodzeniem przypisać także innym białkom tworzącym struktury amyloidowe. A więc nie ich formy fibrylarne, jak proponowano, ale formy oligomeryczne (tj. protofibrylarne) – zdolne do interakcji z fosfolipidami kwaśnymi błon – należałoby uznać za kluczowy czynnik odpowiedzialny za destrukcję błon [22, 23].

Szczegółowe badania wykazały, że autooligomeryzację α -synukleiny można indukować, stosując błony zawierające nie tylko fosfolipidy kwaśne, ale także fosfatydyloetanolaminę, a nawet kwas arachidonowy. Ogólnie wykazano, że oligomeryzacja α -synukleiny jest zależna od obecności powierzchni błonowych tworzonych przez dwuwarstwę lipidową i jest procesem specyficznym w stosunku do C- i N-końcowych domen tego białka [24]. Proces autooligomeryzacji rozpoczyna się przy N końcu α -synukleiny, natomiast proces interakcji z lipidami, prowadzący dalej do autoasocjacji, wymaga obecności kwaśnego, C-końcowego odcinka tego białka. W obecności czynników utleniających, takich jak Cu^{+2} i H_2O_2 fosfatydyloinozylol wraz z innymi kwaśnymi lipidami błony wzmacnia katalizowaną przez jony metalu, oksydacyjną autooligomeryzację α -synukleiny. Bezpośrednio za ten proces jest odpowiedzialne wiązanie krzyżowe powstające między tyrozynami cząsteczek α -synukleiny. Jego powstawanie jest bardziej czułe na zmiany stężenia jonów miedzi niż H_2O_2 . Fosfatydyloinozylol ułatwia właściwe umiejscowienie jonów miedzi w białku; powoduje więc, że α -synukleina jest bardziej autointeraktywna dzięki wpływowi, jaki wywiera na nią powierzchnia dwuwarstwy tworzonej przez ten fosfolipid. Wzmacnia on także oksydacyjną autooligomeryzację α -synukleiny katalizowaną przez

jony metalu, np. Cu^{+2} [24]. Obserwacje te mogą prowadzić do wniosku, że współdziałanie lipidów i α -synukleiny oraz stresu oksydacyjnego, indukowanego obecnością jonów metali, może być rozpatrywane jako jeden z wielu czynników prowadzących do powstania ciał Lewy’ego i w konsekwencji do neurodegeneracji.

Cytotoksyczne konformery białkowe – rola lipidów

Monomeryczna α -laktoalbumina jest głównym składnikiem białkowym serwatki ludzkiego mleka [25]. Jest to małe białko (14 kD), które łącząc się z β -galaktozylotransferazą zmienia jej swoistość akceptorową z N-acetyloglukozoaminy na glukozę, co powoduje, że enzym ten jest zdolny do syntezy laktozy w mleku. α -laktoalbumina jest metaloproteiną z dużym powinowactwem do jonów wapnia oraz innych dwuwartościowych kationów. Jony wapnia są głównym czynnikiem wymaganym do właściwego sfałdowania α -laktoalbuminy i utrzymania stabilności właściwej struktury. W niskim pH α -laktoalbumina przyjmuje nowy, stosunkowo stabilny, wariant konformacyjny określany jako konformer [26]. Forma ta, potocznie nazywana również „stopioną globulą”, ma strukturę drugorzędową identyczną z formą natywną tego białka. Różnią się one strukturą trzeciorzędową, która w konformerze jest mniej zwarta, przez co jej promień Stoksa jest większy. W podobną formę α -laktoalbumina przechodzi w podwyższonej temperaturze oraz jeśli dojdzie do redukcji mostków dwusiarczkowych w jej cząsteczce, a także przy braku jonów wapnia (w neutralnym pH). Pozbawiona jonów wapnia, zmieniona konformacyjnie apoforma α -laktoalbuminy ma wyeksponowane miejsce wiązania specyficznych kwasów tłuszczowych.. Najczęściej przyłącza się kwas oleinowy (C 18:1,9 cis), który stabilizuje nową konformację białka [27]. Powstały na skutek tego procesu białkowo-lipidowy kompleks wykazuje zupełnie nową aktywność biologiczną. Wykazano, że indukuje on śmierć komórek nowotworowych, wywołując apoptozę, a oszczędza komórki prawidłowo zróżnicowane, [28, 29]. Nadano mu nazwę HAMLET (*human α -lactalbumin made lethal to tumor cells*). Po związaniu się z powierzchnią komórki nowotworowej HAMLET jest internalizowany i z cytosolu przenika do jądra, gdzie niszczy strukturę chromatyny i powoduje fragmentację DNA. Wywoływana apoptoza jest niezależna od p53, a także od bcl-2. Uważa się, że skutek działania HAMLET może mieć swój udział w ochronie niemowląt karmionych piersią przed powstawaniem nowotworów wieku dziecięcego. W świetle

wyników badań dotyczących sposobów jego działania HAMLET może być szansą w terapii antynowotworowej. Są wymagane jednak dalsze badania, szczególnie kliniczne.

Badania ostatnich lat nad funkcją i właściwościami histonu H1 wskazują, że jest on zdolny do podobnego jak HAMLET działania. Generalnie funkcje histonów, w tym H1, są związane z chromatyną jądrową, jej strukturą i funkcją. H1 pełni funkcję łącznika w nukleosomie i jest niezbędny do silnego upakowania chromatyny w jądrze komórkowym komórek eukariotycznych. Obecność histonów stwierdzono także poza jądrem komórki, a nawet poza komórkami i ma to miejsce nie tylko w warunkach patologicznych. Wyniki badań wskazują, że histony mają właściwości hormonopodobne oraz antybakteryjne. Szczególnie interesująca wydaje się jednak zdolność histonu H1 do wiązania się ze strukturami dwuwarstwy lipidowej zawierającymi fosfolipidy kwaśne [30]. Udowodniono, że histon H1, DNA i liposomy zawierające fosfolipidy kwaśne tworzą wspólne kompleksy oraz że powinowactwo tego histonu do lipidów mających ładunek ujemny jest większe niż cytochromu c.

Z powodu swojego dodatniego ładunku histon H1 łatwo łączy się z liposomami zawierającymi fosfolipidy kwaśne, takie jak fosfatydyloseryna. Badania ostatnich lat [31] wykazały, że jeśli wolny histon H1 w środowisku wodnym ma strukturę przypadkowego kłębka, to po związaniu z liposomami zawierającymi fosfatydyloserynę zmienia konformację na skutek wzrostu zawartości w jego częściach struktur α -helisy i β -kartki odpowiednio do 7 i 24%. Histon H1 szybko łączy się z zawierającą fosfatydyloserynę błoną olbrzymich pęcherzyków (*giant liposomes*) (będących modelami błony komórkowej) i przechodząc przez nią dostaje się do środka. Proces ten bezwzględnie zależy od obecności w błonie pęcherzyka ujemnie naładowanej fosfatydyloseryny. Porównanie mechanizmu i skutku oddziaływania histonu H1 ze ścianą olbrzymich pęcherzyków (sztuczny układ modelowy) oraz z błoną komórkową limfocytów T (układ naturalny) wykazało, że są one takie same. Oprócz zmian w błonie komórkowej powstających w wyniku przechodzenia przez nią, histon H1 powoduje także fragmentację jądra komórek, co sugeruje, że jest czynnikiem wywołującym apoptozę [31]. Udział w procesie apoptozy udowodniono także dla histonu H1.2.

Rola lipidów błonowych w wywoływaniu zmian konformacyjnych białek wzajemnie oddziałujących z błoną

Wyniki badań ostatnich lat wykazują, że istnieją różne rozpuszczalne oligomery amyloidowe, mające wspólne dla nich wszystkich struktury, niezależnie od tego, gdzie są zlokalizowane (czy w pozakomórkowych czy też w wewnątrzkomórkowych przedziałach) [4]. Charakter tych struktur sprawia, że reagują one, bez względu na swoje pochodzenie, z tym samym rodzajem przeciwciał, co hamuje ich toksyczność [4]. Wskazuje to również na możliwość istnienia takiego samego, jednakowego dla różnych oligomerów, mechanizmu toksycznego działania, a wyklucza istnienie swoistych mechanizmów toksycznego oddziaływania charakterystycznych tylko dla danego typu oligomeru. Określa ponadto tę część komórki, która potencjalnie stwarza najlepsze warunki do patologicznych zmian powodowanych przez interakcję z oligomerami, jako strukturę, do której oligomery mają dostęp zarówno od strony zewnętrznej komórki, jak i od strony jej wnętrza. Cechy takiej struktury ma jedynie błona komórkowa [4, 32].

Z drugiej strony wykazano już doświadczalnie *in vitro*, że czynnikiem sprzyjającym zmianom konformacyjnym białka jest niskie pH. Wykazano to dla peptydów amyloidu powstającego w chorobie Alzheimera [33], dla transtyretyny [34] – białka budującego fibryle amyloidu w starczej amyloidozie narządowej, a także dla α -laktoalbuminy [26], a nawet dla insuliny [35]. Dotychczas sądzono, że niskie pH w warunkach fizjologicznych poza sokiem żołądkowym może jeszcze występować jedynie w lizosomach i endosomach. Obecnie, na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań, trudno powiedzieć, czy i jakie to ma znaczenie dla zmiany konformacji białek i ich fibrylizacji w chorobach spichrzeniowych. Nowe spojrzenie na ten problem przedstawiła praca P. Kinnunena i jego zespołu [36], w której bardzo trafnie i umiejętnie połączono wyżej przedstawione fakty i wykazano, że błony (sztuczne) zawierające fosfolipid – fosfatydyloserynę, mający w fizjologicznych warunkach ładunek ujemny, indukują szybkie powstawanie fibryl amyloidowych z takich białek, określanych jako cytoplazmatyczne, jak: lizozym, insulina, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, mioglobina, transtyretyna, cytochrom c, histon H1 i α -laktoalbumina, które, jak wykazano w badaniach, nie różniły się od fibrylli amyloidowych znajdowanych w cho-

rych tkankach [36]. Otrzymane wyniki wskazują, że fosfatydyloseryna, a także inne kwaśne fosfolipidy, mogą tworzyć w warunkach fizjologicznych na powierzchni błon komórkowych środowisko o niskim pH, sprzyjające *in vivo* powstawaniu fibryl białkowych. Obserwacja ta pokazuje, że błony zawierające fosfatydyloserynę indukują powstawanie włókien amyloidowych z bardzo wielu różnych, rozpuszczalnych białek, niezależnie od tego, czy są umiejscowione w przedziałach wewnątrzkomórkowych, czy też zewnątrzkomórkowo. Sugeruje ponadto, że takie zachowanie białek wynika z ich zdolności do oddziaływania z błonami zawierającymi fosfolipidy kwaśne. Co ciekawe, białka te zwykle wykazują działanie cytotoksyczne albo biorą udział w indukowaniu apoptozy [36]. Wyniki badań *in vitro* i *in vivo* pokazują, że do inicjacji zmian konformacyjnych białka amyloidogenne jest potrzebne obniżenie pH, tj. zakwaszenie jego środowiska, co następuje w obrębie lizosomów lub endosomów. Wyniki pracy P. Kinnunena i jego zespołu [36] wskazują, że wystarczy zdolność takiego białka do interakcji z ujemnie naładowaną powierzchnią błony, która generuje kwaśne środowisko w strefie przypowierzchniowej, aby w chwili, gdy do takiego oddziaływania dojdzie, nastąpiła inicjacja procesu tworzenia fibryl amyloidowych. Sugerują ponadto, że elektrostatyczne oddziaływanie między kationowymi (o ładunku dodatnim) obszarami cząsteczek białka a ujemnie naładowanymi (kwaśnymi) lipidami błon, może być zaangażowane w tworzenie amyloidu *in vivo*, co sugerowano dla peptydu A β , α -synukleiny i prionów.

W świetle obecnego stanu wiedzy można za ryzykować uogólnienie, że rola obdarzonych ładunkiem ujemnym powierzchni w wywoływaniu zmian konformacyjnych w białkach amyloidogennych jest uniwersalna [37]. Celem terapeutycznym w leczeniu amyloidoz może być osłabienie interakcji białka amyloidogenne z fosfolipidami błonowymi. Takie właśnie działanie wykazano dla takryny, związku stosowanego jako lek pomocny w chorobie Alzheimera. Wiąże się on silnie z błonami zawierającymi fosfolipidy kwaśne i w ten sposób utrudnia oddziaływanie peptydu A β z błoną, co w konsekwencji hamuje jego agregowanie i powstawanie fibryl. Ponieważ złoży amyloidu izolowane z tkanek pacjentów cierpiących na różne choroby spichrzeniowe wykazują dużą zawartość lipidów, można uznać za prawdopodobne, że fosfatydyloseryna jest fizjologicznym ligandem dla dodatnio naładowanych miejsc wiążących w cząsteczkach białek. Za przykład może służyć transtyretyna, białko budujące amyloid w tkankach serca i innych, odpowiedzialne za starczą amyloidozę narządową [12, 38, 39].

Udowodnienie, że opisane procesy zachodzą nie tylko *in vitro*, ale mogą także zachodzić *in vivo* wskazuje, że inicjowany przez błonową fosfatydyloserynę proces agregacji białka i powstawania fibryl może być związany z wieloma patologicznymi i fizjologicznymi procesami, takimi jak: tworzenie białek fibrylarnych, cytotoksyczność tych białek, a także indukcja apoptozy. Oczywiście czynnikami niezbędnymi do zaistnienia takiego procesu są: obecność potencjalnie toksycznego białka i zmieniony skład błony lipidowej lub zmieniona w niej dystrybucja lipidów tak, aby fosfatydyloseryna występująca fizjologicznie od strony cytozolu znalazła się także po stronie przeciwnej i to w wystarczających ilościach, procesy tworzenia złogów amyloidowych bowiem zachodzą najczęściej na zewnątrz komórki [1]. Obecnie uważa się, że fosfatydyloseryna jest ekspozowana na zewnętrznej stronie błony komórkowej komórek apoptotycznych, a także komórek nowotworowych i komórek nabłonka naczyniowego w guzach nowotworowych [40]. Wykazano, że może ona tworzyć mikrodomeny na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej komórek nowotworowych. Fosfolipid ten występuje również na powierzchni neuronów, gdzie jest prawdopodobnie zaangażowany w procesy przewodnictwa nerwowego. Istnieją przesłanki, że inicjacja tworzenia fibryl białkowych nie jest ograniczona jedynie do takich fosfolipidów, jak fosfatydyloseryna lub fosfatydyloglicerol, ale że proces ten może być indukowany także przez inne fosfolipidy obdarzone ładunkiem ujemnym, występujące również w błonach wewnątrzkomórkowych, a zatem potencjalnie umożliwiających oddziaływanie elektrostatyczne z białkami skłonnymi do agregacji wywoływanej powierzchnią błony.

Podsumowując, należy podkreślić, że koncepcja przybłonowej strefy obniżonego pH, działającej jako generator zmian konformacji białek wchodzących w oddziaływanie z błoną w obszarze tej strefy, daje możliwość, zdaniem Kinnunena et al. [36], ulokowania na wspólnej płaszczyźnie trzech obszarów badań dotychczas traktowanych jako różne, a mianowicie: nad mechanizmami zapoczątkowującymi proces tworzenia amyloidu, nad cytotoksycznością białkowych agregatów amyloidowych i nad mechanizmami działania białek cytotoksycznych. Jeśli się to powiedzie i doprowadzi do stworzenia jednej, spójnej teorii o silnych podstawach fizykochemicznych, to dziedziny zajmujące się biologią i patologią komórki zyskają niezwykle cenne narzędzie badawcze.

Wyniki badań z ostatnich kilkadziesiąt lat, prowadzonych nad rozwiązaniem różnych problemów z dziedziny patologii komórki i tkanek, wykazały, że błona komórkowa jest strukturą kluczową dla inicjacji i przebiegu wielu procesów pato-

logicznych. O ile znaczenie składników białkowych błon w tych procesach zostało bardzo szybko zauważone i docenione (co zaowocowało ogromną wiedzą na ten temat), o tyle rola składników lipidowych pozostała prawie niezauważona, chyba z powodu braku odpowiednich metod i technik badawczych. Wraz z ich pojawieniem się i gwałtownym rozwojem, dzięki szerokiemu zastosowaniu informatyki, sytuacja się zmieniła. Szczególnie ostatnie lata przyniosły wiele interesujących doniesień na temat udziału lipidów błonowych i błonowych struktur lipidowych w różnych procesach komórkowych. Wykazały one, że wzajemne oddziaływanie peptydów i białek z lipi-

dami i lipidowymi strukturami błonowymi komórki jest równie istotne, jak oddziaływanie białko-białko i musi być gruntownie poznane, jeśli chcemy zrozumieć procesy zachodzące w komórce, szczególnie procesy patologiczne. W pracy przedstawiono wyniki tylko tych badań, które przekroczyły już poziom podstawowy i dzięki temu dają się opisać językiem mniej hermetycznym niż ten, stosowany w dziedzinach, w których powstały (biochemia, biofizyka, fizyka, chemia). Tematyka, której został poświęcony ten artykuł, budzi coraz większe zainteresowanie w świecie nauk podstawowych. Należy mieć nadzieję, że będzie ona także interesująca dla dyscyplin medycznych.

Piśmiennictwo

- [1] **Rochet JC, Lansbury PT Jr:** Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr Opin Struct Biol* 2000, 10, 60–68.
- [2] **Selkoe DJ:** Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci* 2000, 924, 17–25.
- [3] **Perutz MF, Finch JT, Berriman J, Lesk A:** Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99, 5591–5595.
- [4] **Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG:** Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 2003, 300, 486–489.
- [5] **McLaurin J, Yang D, Yip CM, Fraser PE:** Review: modulating factors in amyloid-beta fibril formation. *J Struct Biol* 2000, 130, 259–270.
- [6] **Lin H, Bhatia R, Lal R:** Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J* 2001, 15, 2433–2444. Erratum in: *FASEB J* 2002, 16, 759.
- [7] **Yip CM, McLaurin J:** Amyloid-beta peptide assembly: a critical step in fibrillogenesis and membrane disruption. *Biophys J* 2001, 80, 1359–1371.
- [8] **Kracun I, Kalanj S, Talan-Hranilovic J, Cosovic C:** Cortical distribution of gangliosides in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 1992, 20, 433–438.
- [9] **Pettegrew JW, Panchalingam K, Hamilton RL, McClure RJ:** Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2001, 26, 771–782.
- [10] **Kakio A, Nishimoto S, Yanagisawa K, Kozutsumi Y, Matsuzaki K:** Interactions of amyloid beta-protein with various gangliosides in raft-like membranes: importance of GM1 ganglioside-bound form as an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *Biochemistry* 2002, 41, 7385–7390.
- [11] **Gibson Wood W, Eckert GP, Igbavboa U, Muller WE:** Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2003, 1610, 281–290.
- [12] **Bokvist M, Lindstrom F, Watts A, Grobner G:** Two types of Alzheimer's beta-amyloid (1–40) peptide membrane interactions: aggregation preventing transmembrane anchoring versus accelerated surface fibril formation. *J Mol Biol* 2004, 335, 1039–1049.
- [13] **Forno LS:** Neuropathology of Parkinson's disease. *Neuropathol Exp Neurol* 1996, 55, 259–272.
- [14] **Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH:** Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 1988, 8, 2804–2815.
- [15] **Conway KA, Harper JD, Lansbury PT Jr:** Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* 2000, 39, 2552–2563.
- [16] **Goldberg MS, Lansbury PT Jr:** Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat Cell Biol* 2000, 2, E115–119.
- [17] **Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM:** Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem* 1998, 273, 9443–9449.
- [18] **Volles MJ, Lee SJ, Rochet JC, Shtilerman MD, Ding TT, Kessler JC, Lansbury PT Jr:** Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry* 2001, 40, 7812–7819.
- [19] **Rochet JC, Conway KA, Lansbury PT Jr:** Inhibition of fibrillization and accumulation of prefibrillar oligomers in mixtures of human and mouse alpha-synuclein. *Biochemistry* 2000, 39, 10619–10626.
- [20] **Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT Jr:** Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97, 571–576.
- [21] **Ziv I, Offen D, Barzilai A, Haviv R, Stein R, Zilkha-Falb R, Shirvan A, Melamed E:** Modulation of control mechanisms of dopamine-induced apoptosis – a future approach to the treatment of Parkinson's disease? *J Neural Transm Suppl* 1997, 49, 195–202.

- [22] Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL: Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95, 6448–6453.
- [23] Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, Teplow DB, Selkoe DJ: Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci* 1999, 19, 8876–8884.
- [24] Lee EN, Lee SY, Lee D, Kim J, Paik SR: Lipid interaction of alpha-synuclein during the metal-catalyzed oxidation in the presence of Cu²⁺ and H₂O₂. *J Neurochem* 2003, 84, 1128–1142.
- [25] Heine WE, Klein PD, Reeds PJ: The importance of alpha-lactalbumin in infant nutrition. *LC, Schulman J Nutr* 1991, 121, 277–283.
- [26] Wu LC, Schulman BA, Peng ZY, Kim PS: Disulfide determinants of calcium-induced packing in alpha-lactalbumin. *Biochemistry* 1996, 35, 859–863.
- [27] Svensson M, Mossberg AK, Pettersson J, Linse S, Svanborg C: Lipids as cofactors in protein folding: stereospecific lipid-protein interactions are required to form HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells). *Protein Sci* 2003, 12, 2805–2814.
- [28] Hakansson A, Zhivotovsky B, Orrenius S, Sabharwal H, Svanborg C: Apoptosis induced by a human milk protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 15, 8064–8068.
- [29] Svanborg C, Agerstam H, Aronson A, Bjerkvig R, Durringer C, Fischer W, Gustafsson L, Hallgren O, Leijonhuvud I, Linse S, Mossberg AK, Nilsson H, Pettersson J, Svensson M: HAMLET kills tumor cells by an apoptosis-like mechanism-cellular, molecular, and therapeutic aspects. *Adv Cancer Res* 2003, 88, 1–29.
- [30] Koiv A, Palvimo J, Kinnunen PK: Evidence for ternary complex formation by histone H1, DNA, and liposomes. *Biochemistry* 1995, 34, 8018–8027.
- [31] Zhao H, Bose S, Tuominen EK, Kinnunen PK: Interactions of histone H1 with phospholipids and comparison of its binding to giant liposomes and human leukemic T cells. *Biochemistry* 2004, 43, 10192–10202.
- [32] Sawamura N, Morishima-Kawashima M, Waki H, Kobayashi K, Kuramochi T, Frosch MP, Ding K, Ito M, Kim TW, Tanzi RE, Oyama F, Tabira T, Ando S, Ihara Y: Mutant presenilin 2 transgenic mice. A large increase in the levels of Abeta 42 is presumably associated with the low density membrane domain that contains decreased levels of glycerophospholipids and sphingomyelin. *J Biol Chem* 2000, 275, 27901–27908.
- [33] McLaurin J, Franklin T, Chakrabartty A, Fraser PE: Phosphatidylinositol and inositol involvement in Alzheimer amyloid-beta fibril growth and arrest. *J Mol Biol* 1998, 278, 183–194.
- [34] Colon W, Kelly JW: Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry* 1992, 15, 31(36), 8654–8660.
- [35] Whittingham JL, Scott DJ, Chance K, Wilson A, Finch J, Brange J, Guy Dodson G: Insulin at pH 2: structural analysis of the conditions promoting insulin fibre formation. *Mol Biol* 2002, 31, 479–490.
- [36] Zhao H, Tuominen EK, Kinnunen PK: Formation of amyloid fibers triggered by phosphatidylserine-containing membranes. *Biochemistry* 2004, 43, 10302–10307.
- [37] Zhu M, Souillac PO, Ionescu-Zanetti C, Carter SA, Fink AL: Surface-catalyzed amyloid fibril formation. *J Biol Chem* 2002, 277, 50914–50922.
- [38] Kim IC, Shirahama T, Cohen AS: The lipid content of amyloid fibrils purified by a variety of methods. *Am J Pathol* 1967, 50, 869–886.
- [39] Chakrabartty A: Progress in transthyretin fibrillogenesis research strengthens the amyloid hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98, 14757–14759.
- [40] Utsugi T, Schroit AJ, Connor J, Bucana CD, Fidler IJ: Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res* 1991, 51, 3062–3066.

Adres do korespondencji:

Grzegorz Terlecki
 Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej AM
 ul. Chalubińskiego 10
 50-368 Wrocław
 tel.: + 48 071 784 13 79
 e-mail: terlecki@bioch.am.wroc.pl

Conflict of interest: None declared.

Praca wpłynęła do Redakcji: 11.08.2005 r.
 Po recenzji: 3.01.2006 r.
 Zaakceptowano do druku: 3.01.2006 r.

Received: 11.08.2005
 Revised: 3.01.2006
 Accepted: 3.01.2006