

**Praca pogładowa****Review**

ANNA SZNEJDER-PACHOLEK<sup>1</sup>, ILONA JONIEC-MACIEJAK<sup>1</sup>, ADRIANA WAWER<sup>1</sup>,  
ANDRZEJ CZŁONKOWSKI<sup>1</sup>, DAGMARA MIROWSKA-GUZEL<sup>1,2</sup>

## **$\alpha$ -synukleina – nowe spojrzenie na znane białko. Możliwości wykorzystania w diagnostyce i terapii choroby Parkinsona**

*$\alpha$ -synuclein – a new approach to well-known protein and its possible use in the diagnostics and therapy of Parkinson's disease*

<sup>1</sup> Katedra Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup> II Klinika Neurologiczna, Instytut Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

**STRESZCZENIE**

Przyczyny neurodegeneracji w chorobie Parkinsona nadal nie są w pełni poznane. Od wielu lat wiadomo, że  $\alpha$ -synukleina (ASN) jest białkiem, które łącznie z innymi białkami tworzy nieprawidłowe agregaty w postaci cytoplazmatycznych wtrętów tzw. ciał Lewy'ego – patologicznych tworów występujących w chorobie Parkinsona (ChP). Ostatnie doniesienia dotyczące  $\alpha$ -synukleiny rzuciły nowe światło na rolę tego białka w patogenezie ChP. Zweryfikowano pogląd dotyczący fizjologicznej postaci ASN, pojawiły się również doniesienia sugerujące prionowe właściwości ASN. Ukazały się prace dotyczące zastosowania oznaczeń stężenia ufosforylowanej i nieufosforylowanej frakcji ASN jako markera ChP. Prowadzone są również badania nad szczepionką przeciwko  $\alpha$ - i  $\beta$ -synukleinie w ChP. Owe badania i odkrycia stwarzają nowe perspektywy zarówno dla diagnostyki, jak i terapii ChP.

**ABSTRACT**

The research into possible causes of neurodegeneration in Parkinson's disease is still far from being conclusive. However, it has already been confirmed that  $\alpha$ -synuclein protein (ASN), together with other proteins, is the principal component of the Lewy pathology. The latest  $\alpha$ -synuclein research has revealed a new role of this protein in the pathogenesis of Parkinson's disease (PD), related to the new physiological form of  $\alpha$ -synuclein. The phosphorylated ASN can be detected in the blood plasma as it shows more promise for a future diagnostic marker for PD. Moreover, it has been signaled that ASN may be a prion-like protein. Finally, a new vaccine against the  $\alpha$ - and  $\beta$ -synuclein is considered. All these discoveries open new, revolutionary prospects for PD diagnostics and therapy.

**Słowa kluczowe:** choroba Parkinsona,  $\alpha$ -synukleina, białka prionowe, monomery/tetramery  $\alpha$ -synukleiny

**Key words:** Parkinson's disease,  $\alpha$ -synuclein, prion-like protein, monomer/tetramer of  $\alpha$ -synuclein

Etiopatogeneza choroby Parkinsona (ChP) nie jest do końca znana. Wiadomo, że do uszkodzenia neuronów dopaminergicznego szlaku nigrostriatalnego może przyczynić się wiele czynników, wśród których wyróżnia się: stres oksydacyjny, procesy apoptotyczne, dysfunkcje mitochondriów, dysfunkcje proteosomów, reakcję zapalną. W mózgach osób z ChP stwierdza się obecność cytoplazmatycznych inkluzji tzw. ciał Lewy'ego. Ciała Lewy'ego są to białkowe agregaty

utworzone głównie z synukleiny, ubikwityny i białek neurofilamentów. Zaburzenia funkcji i metabolizmu  $\alpha$ -synukleiny (ASN) obserwuje się w ChP oraz w innych chorobach neurodegeneracyjnych, które nazwano wspólnie synukleinopatiami. Oprócz ChP należy tu otepienie z ciałami Lewy'ego oraz zanik wieloukładowy. Natomiast uszkodzenia genu kodującego ASN powoduje jedną z postaci rodzinnej ChP (Zhou i wsp. 2002; Spillantini i wsp. 2000).

Sądzone, że toksyczne właściwości ASN wykazują głównie oligomeryczne formy tego białka agregujące w coraz większe złogi i tworzące ciała Lewy'ego (Bodles i wsp. 2001). Pojawiały się również doniesienia o możliwym udziale zarówno formy zagregowanej, jak i monomerycznej w patologii chorób neurodegeneracyjnych (Hashimoto i Masliah i wsp. 1999; Mandal i wsp. 2006). Jednakże monomery ASN do tej pory traktowano jako naturalną i fizjologiczną postać tego białka. Utrata fizjologicznej funkcji ASN, wzrost jej stężenia, oligomeryzacja i agregacja prowadzi do zaburzenia homeostazy układu dopaminergicznego. (Ding i wsp. 2002; Junn i wsp. 2003). Z kolei postępująca agregacja białka ASN najprawdopodobniej stanowi mechanizm chroniący komórkę przed szkodliwym działaniem oligomerów i prowadzi do powstania ciał Lewy'ego oraz mechanicznego uszkodzenia komórki (Jellinger, 2002).

### **$\alpha$ -synukleina**

$\alpha$ -synukleina to białko fibrylarne o masie 14 kDa. Występuje w zakończeniach presynaptycznych włókien nerwowych oraz w błonach jądrowych neuronów OUN. Obecność tego białka stwierdza się również we krwi, osoczu i płynie mózgowo-rdzeniowym. Funkcje fizjologiczne ASN są ciągle przedmiotem badań. Zauważono, że ASN wykazuje zdolność do wiązania się z wieloma innymi cząsteczkami oraz w warunkach fizjologicznych jest zaangażowana w procesy związane z metabolizmem dopaminy (DA). Odpowiada za regulację biosyntezy DA, wpływając na aktywność hydroksylazy tyrozynowej (TH), co gwarantuje utrzymanie stężenia DA na odpowiednim poziomie (Perez i wsp. 2002). ASN ma także wpływ na magazynowanie i uwalnianie DA z pęcherzyków synaptycznych (Davidson i wsp. 1998). Bierze też udział w wychwycie zwrotnym DA za pośrednictwem transportera dopaminy (DAT) (Sidhu i wsp. 2004). ASN reguluje stężenie DA w zakończeniach synaptycznych i pośrednio chroni komórki przed uwalnianiem wysoce reaktywnych wolnych rodników tlenowych (Cabin i wsp. 2002). Przypuszcza się, że może również pełnić funkcję białka opiekuńczego (chaperonu) (Kim i wsp. 2000). Wykazano zdolność ASN do interakcji z innymi białkami, między innymi z parkiną (Shimura i wsp. 2001).

W ChP dochodzi do degeneracji neuronów dopaminergicznych (DA-ergicznych) szlaku nigrostriatalnego, co skutkuje spadkiem stężenia DA. Katecholamina ta syntetyzowana jest podczas wieloetapowej reakcji. W jednym z etapów kluczową rolę odgrywa TH, enzym, który przekształca tyrozinę w L-DOPA (*L-3,4-dihydroksyfenyloalaninę*). Brak

możliwości hamującego wpływu ASN na TH może spowodować wzrost syntezy DA. Zwiększone wydzielanie neuroprzekaźnika oraz brak jego wychwyty do pęcherzyków synaptycznych (ASN uczestniczy w transporcie DA do pęcherzyków synaptycznych) generuje powstawanie wolnych rodników tlenowych (*reactive oxygen species* – ROS), co może być przyczyną dysfunkcji mitochondriów, prowadzić do uszkodzeń białek, lipidów oraz DNA, a w konsekwencji prowadzi do śmierci neuronów DA-ergicznych. Agregacja ASN skutkuje zaburzeniem jej funkcji regulatorowej (Perez i wsp. 2004).

Nierozpuszczalne, zagregowane złogi ASN (utworzone z ufosforylowanej i nieufosforylowanej ASN) są głównym składnikiem ciał Lewy'ego (Trojanowski i wsp. 1998). Początkowo białko to zostało zidentyfikowane u pacjentów z chorobą Alzheimera (Ueda i wsp. 1993). Obecność hydrofobowego fragmentu w budowie ASN sprzyja tworzeniu przez to białko struktury  $\beta$ -kardki, która inicjuje proces agregacji i powstawania rozpuszczalnych oligomerów (Ding i wsp. 2002). Oligomery ASN posiadają tendencję do dalszej agregacji i tworzenia nierozpuszczalnych złogów odkładanych w postaci ciał Lewy'ego (Bodles i wsp. 2001). Przez wiele lat sądzono, że fizjologiczną postacią ASN jest postać monomeru o masie ok. 14 kDa. Dopiero w 2011 roku Bartels i wsp. (Bartels i wsp. 2011), stosując zmodyfikowaną metodę analizy białek polegającą na wyeliminowaniu silnych warunków denaturujących wykazali, że monomery nie są dominującą formą ASN. Naukowcy izolowali białko z neuronalnych i nieneuronalnych linii komórkowych tkanki mózgowej oraz z erytrocytów. Wykazali, że endogenną, naturalnie występującą postacią ASN w zdecydowanej większości jest forma tetrameryczna o masie około 58 kDa. Wyizolowana, natywna forma ASN posiadała  $\alpha$ -heliakalną strukturę bez dodatku lipidów, ale o dużo większej zdolności do tworzenia wiązań z lipidami niż rekombinowane białko ASN stosowane dotychczas w wielu badaniach. Dodatkowo stwierdzili, że ASN w takiej postaci jest niezwykle oporna na agregację. Podobne obserwacje poczynili Wang i wsp. z Uniwersytetu Medycznego w Indianie w USA (Wang i wsp. 2011). Odkrycie to rzuciło nowe światło na budowę, funkcję i udział ASN w ChP. Można przypuszczać, że powstawanie toksycznych oligomerów poprzedza rozpad tetramerów ASN do formy monomerycznej. Pojawiło się zatem pytanie, jakie czynniki odpowiadają za rozpad stabilnych tetramerów.

W warunkach *in vitro* monomery rekombinowanego białka ASN z łatwością agregują do włókien amyloidu. Natywne białko w postaci tetrameru tylko w nieznacznym stopniu bądź wcale nie agregu-

je (Wang i wsp. 2011). Bartel i wsp. zasugerowali, że destabilizacja helikalnej struktury tetrameru ASN prowadzi do rozpuszczania lub niepoprawnego zwijania się i agregowania tego białka w ChP oraz innych synukleinopatiach. Autorzy podkreślają, że należy zwrócić uwagę na mechanizmy i związki odpowiedzialne za stabilizację tetrameru ASN, gdyż mogą mieć one potencjalnie protekcyjne działanie w patogenezie ChP (Bartels i wsp. 2011).

Obok zwolenników poglądu o tetramerycznej budowie ASN pojawiają się również głosy przeciwnie, jakoby forma monomeryczna ASN była dominująca. Jacqueline Burre i wsp. z Uniwersytetu Medycznego Stanforda w Kalifornii po przeprowadzeniu swoich badań stwierdzili obecność tetramerów ASN, ale równocześnie podkreślają, że to forma monomeryczna występuje w zdecydowanie większym stężeniu (Burre i wsp. 2013). Również Fauvet i wsp. wskazują na monomer jako dominującą w organizmie formę ASN (Fauvet i wsp. 2012).

Pomimo ożywionej dyskusji wokół dominującej formy ASN wszystkie zespoły badawcze są zgodne co to tego, że za stabilność czy też destabilizację i agregację ASN odpowiadają nieznanne jeszcze czynniki i to one powinny być celem kolejnych badań.

### ASN biomarkerem ChP?

ASN obecna jest w płynach ustrojowych człowieka, w tym również w osoczu krwi. W 2006 r. Anderson i wsp. zaobserwowali, że równie ważnym składnikiem ciał Lewy'ego, prócz zagregowanej ASN jest jej ufosforylowana forma (Anderson i wsp. 2006). W 2011 r. Foulds i wsp. (Foulds i wsp. 2011) zaproponowali, aby wziąć pod uwagę ASN jako potencjalny biomarker ChP. Autorzy przebadali próbki krwi (osocza) pochodzące od 32 pacjentów ze stwierdzoną ChP (grupa 32 osób będących pod kontrolą lekarza przez okres 2–3 lat; badania kontrolne co 4 miesiące) oraz 30 osób zdrowych (grupa kontrolna). Oznaczano stosunek form oligomerycznych ASN do całkowitej ilości ASN ufosforylowanej (Ser-129) i nieufosforylowanej. Stwierdzono istotny statystycznie wyższy poziom formy ufosforylowanej (Ser-129) u osób chorych w porównaniu do osób zdrowych. Analizowano wyniki uzyskane z surowicy, osocza i płynu mózgowo-rdzeniowego (CSF) pacjentów. Rezultaty badania okazały się obiecujące, szczególnie w kontekście oceny i wyboru markera pozwalającego zdiagnozować zwiększone ryzyko zachorowania na ChP bądź pozwalającego ocenić postęp choroby. Autorzy podkreślają, że otrzymane wyniki muszą zostać potwierdzone na większej grupie badanych. Obecnie rozpoczyna się kolejna faza badań. Włączonych jest 200

pacjentów. Badania prowadzone są na Uniwersytecie Lancaster w Wielkiej Brytanii. Podsumowując – opracowywany test pozwoli na wykrycie ChP przed wystąpieniem symptomów choroby (Foulds i wsp. 2011).

Istotne różnice pomiędzy pacjentami z ChP a osobami zdrowymi, biorąc pod uwagę pomiary stężenia ASN w CSF i osoczu, uzyskał w 2011 r. zespół Min Jeong i wsp. (2011). Autorzy przebadali 52 osoby (23 osoby z ChP, nieprzyjmujące jeszcze żadnych leków oraz 29 osób zdrowych). Na podstawie pomiarów poziomu całkowitej oraz oligomerycznej formy ASN w CSF zaobserwowano istotnie wyższe stężenie ASN w formie oligomerycznej w CSF u pacjentów z ChP w porównaniu do grupy kontrolnej. W osoczu nie stwierdzono istotnych różnic. Autorzy podkreślają, że wyniki tych badań stanowią kolejny krok w kierunku potwierdzenia patologicznej funkcji oligomerycznej formy ASN w ChP oraz sugerują, że pomiar stężenia tej formy białka w CSF może być wiarygodnym markerem choroby (Min Jeong i wsp. 2011).

Również badania prowadzone przez zespół Wang i wsp. (2013) wydają się obiecujące. Badacze zaobserwowali odkładanie białka ASN we włóknach współczulnych adrenergicznych i cholinergicznym skóry, ale nie we włóknach czuciowych u pacjentów z ChP. Wykazano, że zwiększone odkładanie ASN powiązane jest z bardziej zaawansowaną postacią ChP oraz zwiększonymi dysfunkcjami u chorych. Autorzy sugerują, że pomiar gromadzącej się ASN we włóknach autonomicznych nerwów skóry może być bardzo obiecującym markrem ChP (Wang i wsp. 2013).

Najnowsze badania zespołu Hilton i wsp. (2013) także skupiają się na poszukiwaniu skutecznego biomarkera ChP. W swojej pracy Hilton i wsp. porównywali próbki uzyskane podczas biopsji jelita od pacjentów z przedkliniczną fazą ChP oraz od osób zdrowych. Zaobserwowano akumulację ASN w zwojach nerwowych śródściennych przewodu pokarmowego. Przebadano próbki pochodzące od pacjentów do 8 lat przed wystąpieniem klinicznych objawów ChP. Wszyscy pacjenci z dodatnimi wynikami biopsji wykazywali wczesne symptomy choroby. W próbkach uzyskanych od osób z grupy kontrolnej nie stwierdzono akumulacji ASN. Wyniki badania wskazują, że pomiar stężenia ASN w ścianach przewodu pokarmowego mógłby być użyteczny w diagnostyce ChP. Informacje dotyczące wykorzystania ASN jako potencjalnego biomarkera ChP zawarte są również w pracach Cheshire i wsp. (2013) oraz Schapira (2013).

Kolejnym, równie interesującym, doniesieniem w kontekście diagnozowania ChP z wykorzystaniem ASN są badania kliniczne prowadzone

na Uniwersytecie Autonomia de San Luis Potosí w Meksyku (ClinicalTrials.gov, identyfikator: NCT 01380899) oceniające przydatność ASN jako markera wczesnego rozpoznania ChP. Autorzy zaznaczają, że brak jest markera pozwalającego jednoznacznie różnicować chorych z wczesnymi objawami choroby Parkinsona i chorych z chorobami zwyrodnieniowymi z parkinsonizmem i innymi objawami (tzw. zespoły parkinsonizm plus, PPS). Autorzy podają, że będą badać ilość całkowitej zagregowanej ASN w komórkach skóry pobranych w biopsji. W poprzednich badaniach zespół ten wykazał, że zagregowane białko magazynuje się w autonomicznym obwodowym układzie nerwowym, w neuronach układu pokarmowego, kory nadnerczy oraz skóry. Badania mają być prowadzone na grupie 23 pacjentów z ChP w wieku 50–95 lat. Próbkę zostaną pobrane z okolic pleców oraz karku. Metodą immunohistochemiczną będą oceniane różnice w ilości złożeń ASN – w próbach skóry pochodzących od pacjentów chorych na ChP w porównaniu do osób z PPS.

Wszystkie z przytoczonych powyżej prac wskazują na możliwość wykorzystania ASN jako wiarygodnego biomarkera ChP.

### Szczepionka

W kontekście ostatnich doniesień dotyczących ASN wydaje się być istotne również przytoczenie informacji dotyczącej opracowywania nowej szczepionki. Jest to szczepionka skierowana przeciwko  $\alpha$ - i  $\beta$ -synukleinie. Badania (I fazy) prowadzone są w klinice Confraternitat Privatlinik Josefstadt w Wiedniu na docelowej grupie 32 pacjentów z wykorzystaniem preparatu (AFFITOPE® PD01A) (ClinicalTrials.gov, identyfikator badania NCT01568099).

Firma Affris, będąca producentem, zapewnia o bezpieczeństwie i dużej skuteczności szczepionki. W badaniu przewidywane jest wykonanie 4 podskórnych iniekcji dla dwóch różnych stężeń AFFITOPE® PD01A. I faza badań ma trwać 12 miesięcy. Badania zostały rozpoczęte w 2012 roku, jak na razie nie ma doniesień na temat wstępnych wyników. Wiadomo jedynie, że badania prowadzone są na grupie kobiet i mężczyzn w wieku 45–65 lat, u których stwierdzono wczesne objawy ChP na podstawie dotychczas opracowanych i znanych testów diagnostycznych. Autorzy wykluczyli z badania osoby, u których stwierdzono mutacje w genie kodującym ASN. Prowadzący badania będą określać bezpieczeństwo preparatu na podstawie analizy markerów immunologicznych, określając miano przeciwciał skierowanych przeciwko  $\alpha$ - i  $\beta$ -synukleinie oraz testów klinicznych (MDS-UPDRS III – określających

zmianę objawów motorycznych, MDS-UPDRS Ia, II, PDQ39 – określających zmianę objawów niemotorycznych ChP). Będą również oceniać zmianę markerów biologicznych i radiologicznych, nie podając jednak na razie więcej szczegółów.

### Właściwości prionowe ASN

Ostatnie doniesienia wskazują, że ASN zachowuje się jak białko prionowe. Szereg publikacji z ostatnich kilku lat (Olanow i wsp. 2009; Angot i wsp. 2010; Dunning i wsp. 2012; Freundt i wsp. 2012; Dunning i wsp. 2013; Olanow i wsp. 2013) wykazało podobieństwo ASN do znanego już białka prionowego PrP<sup>C</sup> (*cellular prion protein*). Funkcje białka PrP<sup>C</sup> nie są jeszcze znane. Posiada ono głównie  $\alpha$ -helikalną strukturę i znajduje się na powierzchni błon komórkowych. W momencie zmiany konformacji białko to zazwyczaj przyjmuje strukturę  $\beta$ -kardki, która tworzy coraz to większe skupiska, a te z kolei zlewając się tworzą blaszki amyloidowe. PrP<sup>C</sup> jest głównym składnikiem zakaźnych prionów i może prowadzić do wystąpienia objawów choroby prionowej u ludzi i zwierząt. Zauważono niemal identyczny schemat zachodzenia zmian w przypadku ASN. Podkreśla się, że w komórkach ASN przyjmuje konformację  $\alpha$ -helisy, jednak w pewnych warunkach białko to zmienia konformację, przyjmując postać przypominającą  $\beta$ -kardkę (struktura ta polimeryzuje, tworząc toksyczne oligomery oraz płytki amyloidowe). Wyniki autopsji osób z zaawansowaną ChP, którym dziesięć lat wcześniej przeszczepiono płodowe komórki śródmózgowia, wykazały, że w przeszczepionych komórkach rozwinął się typowy obraz zmian patologicznych oraz stwierdzono obecność ciał Lewy'ego. To sugeruje, że niepoprawnie sfałdowana ASN, wykazująca strukturę  $\beta$ -kardki, migruje z komórek „chorych” do „zdrowych”. Wyniki badań doświadczalnych potwierdzają, że ASN może „atakować” prawidłowe komórki oraz że niepoprawnie sfałdowane białko ASN staje się swego rodzaju szablonem do powielania i zmiany konformacji przez białko „zdrowej” komórki. Prowadzi to do powstania większych agregatów ASN, a w konsekwencji do dysfunkcji neuronów i neurodegeneracji. Potwierdzają to również najnowsze wyniki badań (Olanow i wsp. 2013) sugerujące, że pojedyncze podanie niepoprawnie sfałdowanej ASN może powodować zmiany patologiczne w postaci ciał Lewy'ego w komórkach. Podanie ASN izolowanej od starych osobników myszy transgenicznych, wykazujących nadmierną ekspresję tego białka, powoduje przyspieszenie procesu chorobowego u osobników młodych. Podsumowując, dotychczasowe wyniki wskazują, że ASN wykazuje



podobieństwo do białek prionowych. Olanow i wsp. sugerują, że takie właściwości ASN odgrywają decydującą rolę w rozwoju ChP i powinny być brane pod uwagę w przypadku poszukiwania nowych terapii neuroprotektoryjnych.

### Zmiany w funkcjonowaniu układu immunologicznego u osób z ChP

U osób z ChP dochodzi do powstawania zmian w czynności układu immunologicznego. Zaobserwowano, że zmiany te mogą prowadzić między innymi do procesów autoimmunizacyjnych. Rowe i wsp. (1998) stwierdzili obecność przeciwciał klasy IgG, reagujących z chinoproteinami, które wraz z innymi cząsteczkami stanowią populację białek powstających między innymi w procesie utleniania DA. Podczas tego procesu dochodzi do zmian w strukturze białek znajdujących się w neuronach. Indukuje to syntezę przeciwciał skierowanych przeciwko tym białkom. Przeciwciała znajdują się w surowicy pacjentów zarówno nieleczonych, jak i leczonych lewodopą.

Dla większości procesów degeneracyjnych typową reakcją jest pobudzenie komórek glejowych oraz rozwój lokalnej reakcji zapalnej w miejscu uszkodzenia tkanki nerwowej. Zmiany degeneracyjne zachodzące w obrębie układu nigrostriatalnego w ChP prowadzą do wytworzenia swoistej odpowiedzi immunologicznej, czego dowodem jest obecność w obszarze prążkowie i istoty czarnej aktywowanych limfocytów CD4+ oraz CD8+. W prawidłowo funkcjonującym układzie nerwowym ekspresja antygenów zgodności tkankowej (MHC) jest bardzo niska, natomiast w momencie pojawienia się czynników patologicznych nasila się. Do wzrostu ekspresji MHC, a także cząstek kostymulujących i adhezyjnych dochodzi przede wszystkim w aktywowanych komórkach mikrogleju. Ekspresja tych cząsteczek pozwala na wiązanie i prezentację antygenów limfocytom T (Imamura i wsp. 2003). Uważa się, że komórki glejowe są potencjalnymi inicjatorami nacieku oraz specyficznej aktywacji limfocytów.

Wyniki wieloletnich badań prowadzonych w Katedrze Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (a także w innych ośrodkach badawczych) bazujących na zwierzęcym modelu choroby Parkinsona (indukowanym neurotoksyną MPTP) wskazują na toczący się proces zapalny w obrębie degenerujących neuronów szlaku nigrostriatalnego (Kohutnicka i wsp. 1998; Kurkowska-Jastrzębska i wsp. 1999; Przedborski i wsp. 2001; Ciesielska i wsp. 2003; Wichmann i wsp. 2003; Ohashi i wsp. 2006). Obecnie w Katedrze trwają prace nad nowym modelem choroby Parkinsona, opierającym się na podwyższo-

nym stężeniu ASN w obrębie struktur układu nigrostriatalnego. Celem tych prac jest określenie wpływu podwyższonego stężenia monomerów rekombinowanego, ludzkiego białka ASN na stopień pobudzenia komórek gleju (mikrogleju i astrocytów) oraz zainicjowania i rozwoju procesu neurodegeneracji neuronów dopaminergicznych w obrębie układu nigrostriatalnego. Wstępne wyniki potwierdzają toksyczny wpływ monomerów ASN na komórki dopaminergiczne. Pod wpływem zwiększonego stężenia monomerów ASN stwierdza się również zainicjowanie reakcji zapalnej, co przejawia się zwiększonym naciekiem limfocytów CD4+, CD8+ CD3+ w obrębie badanych struktur, jak również pobudzeniem komórek mikro- i astrogleju. Podobnych zmian nie zaobserwowano w grupie kontrolnej (stereotaktyczna iniekcja NaCl do wybranych obszarów śródmózgowia). Uzyskane dotychczas wyniki wskazują, że forma monomeryczna ASN jest odpowiedzialna za inicjowanie kaskady procesów prowadzących do rozwoju reakcji zapalnej i zainicjowania procesu degeneracji.

Zhang i wsp. w badaniach prowadzonych na hodowlach szczurzych i mysich komórek gleju śródmózgowia wykazali, że dodanie do hodowli komórkowej ludzkiej ASN prowadziło do aktywacji komórek mikrogleju. Aktywowany mikroglej nasilał degenerację komórek dopaminergicznych indukowaną przez ASN. W wyniku fagocytozy ASN przez mikroglej dochodziło do aktywacji NADPH-oksydazy i wzmożonej produkcji wolnych rodników tlenowych działających toksycznie na komórki dopaminergiczne (Zhang W. i Zhang J. 2005). Podobne wnioski na podstawie wyników swoich badań przedstawiły też inne zespoły badawcze (Béraud i wsp. 2013; Chang i wsp. 2013; Codolo i wsp. 2013).

W kontekście ostatnich doniesień dotyczących ASN można przypuszczać, że białko to jest czynnikiem inicjującym kaskadę procesów prowadzących do zmian neurodegeneracyjnych w ChP. Prawdopodobnie rozpad stabilnej formy tetramerycznej ASN do postaci monomerów jest czynnikiem, który wyzwala te procesy.

Ostatnie doniesienia dotyczące nowych strategii badawczych nacełowanych na poszukiwanie wiarygodnego i pewnego biomarkera ChP oraz na wykorzystanie ASN jako szczepionki wytyczają nowe perspektywy w diagnostyce i terapii ChP. Wymaga to z pewnością jeszcze licznych badań w tym zakresie.

## PIŚMIENNICTWO

- Anderson JP, Walker DE, Goldstein JM, de Laat R, Banducci K, Caccavello RJ i wsp. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J Biol Chem* 2006; 281: 29739–29752.
- Angot E, Steiner JA, Hansen C, Jia-Yi Li, Brundin P. Are synucleinopathies prion-like disorders? *Lancet Neurol* 2010; 9: 1128–1138.
- Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ.  $\alpha$ -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* 2011; 477: 107–111.
- Béraud D, Hathaway HA, Trecki J, Chasovskikh S, Johnson DA, Johnson JA, Federoff HJ, Shimoji M, Mhyre TR, Maguire-Zeiss KA. Microglial activation and antioxidant responses induced by the Parkinson's disease protein  $\alpha$ -synuclein. *J Neuroimmune Pharmacol* 2013; 8: 94–117.
- Bodles AM, Guthrie DJ, Greer B, Irvine GB. Identification of the region of non-Abeta component (NAC) of Alzheimer's disease amyloid responsible for its aggregation and toxicity. *J Neurochem* 2001; 78: 384–395.
- Burre J, Vivona S, Diao J, Sharma M, Brugner AT, Sudhof TC. Properties of native brain  $\alpha$ -synuclein. *Brief Communications Arising do Nature* 2013; 498: E4–E6.
- Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, Orrison B, Chen A, Ellis CE, Paylor R, Lu B, Nussbaum RL. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alphasynuclein. *J Neurosci* 2002; 22: 8797–8807.
- Chang C, Lang H, Geng N, Wang J, Li N, Wang X. Exosomes of BV-2 cells induced by alpha-synuclein: important mediator of neurodegeneration in PD. *Neurosci Lett* 2013; 548: 190–195.
- Cheshire WP, Pfeiffer RF. Is  $\alpha$ -synuclein rising to the surface as a diagnostic biomarker for Parkinson disease? *Neurol* 2013; 81: 1568–1569.
- Ciesielska A, Joniec I, Przybyłkowski A, Gromadzka G, Kurkowska-Jastrzębska I, Członkowska A, Członkowski A. Dynamics of expression of the mRNA for cytokines and inducible nitric synthase in a murine model of the Parkinson's disease *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2003; 63 (2): 117–126.
- Codolo G, Plotegher N, Pozzobon T, Brucale M, Tessari I, Bubacco L, de Bernard M. Triggering of inflammasome by aggregated  $\alpha$ -synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies. *Public Library of Science* 2013; 8: e55375.
- clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01568099 [data cytowania 23.09.2013].
- clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01380899 [data cytowania 20.09.2013].
- 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.
- Ding TT, Lee SJ, Rochet JC, Lansbury PT Jr. Annular alpha-synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes. *Biochemistry* 2002; 41: 10209–10217.
- Dunning CJR, Reyes JR, Steiner JA, Brundin P. Can Parkinson's disease pathology be propagated from one neuron to another? *Prog Neurobiol* 2012; 97: 205–219.
- Dunning CJR, George S, Brundin P. What's to like about the prion-like hypothesis for the spreading of aggregated  $\alpha$ -synuclein in Parkinson disease? *Prion* 2013; 7: 92–97.
- Fauvet B, Mbefo MK.  $\alpha$ -synuclein in Central Nervous System and from Erythrocytes, Mammalian Cells, and *Escherichia coli* Exists Predominantly as Disordered Monomer. *J Biol Chem* 2012; 287: 15345–15364.
- Foulds PG, Mitchell JD, Parker A, Turner R, Green G, Diggle P, Hasegawa M, Taylor M, Mann D, Allsop D. Phosphorylated  $\alpha$ -synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 2011; 25: 4127–4137.
- Freundt EC, Maynard N, Clancy EK, Roy S, Bousset L, Sourigues Y, Covert M, Melki R, Kirkegaard K, Brahic M. Neuron-to-Neuron Transmission of  $\alpha$ -Synuclein Fibrils Through Axonal Transport. *Ann Neurol* 2012; 72: 517–524.
- Hashimoto M, Masliah E. Alpha-synuclein in Lewy body disease and Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 1999; 9: 707–720.
- Hilton D, Stephens M, Kirk L, Edwards P, Potter R, Zajicek J, Broughton E, Hagan H, Carroll C. Accumulation of  $\alpha$ -synuclein in the bowel of patients in the pre-clinical phase of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2013, Nov 17. [Epub ahead of print]
- Imamura K, Hishikawa N, Sawada M, Nagatsu T, Yoshida M, Hashizume Y. Distribution of major histocompatibility class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* 2003; 106: 518–526.
- Jellinger KA. Recent developments in the pathology of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 2002; 62: 347–376.
- Junn E, Ronchetti RD, Quezado MM, Kim SY, Mouradian MM. Tissue transglutaminase-induced aggregation of alpha-synuclein: Implications for Lewy body formation in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 2047–2052.
- Kim TD, Paik SR, Yang CH, Kim J. Structural changes in  $\alpha$ -synuclein affect its chaperone-like activity in vitro. *Protein Sci* 2000; 9: 2489–2496.
- Kohutnicka M, Lewandowska E, Kurkowska-Jastrzębska I, Członkowska A, Członkowska A. Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Immunopharmacology* 1998; 39: 167–180.
- Kurkowska-Jastrzębska I, Wrońska A, Kohutnicka M, Członkowski A, Członkowska A. The inflammatory reaction following 1-methyl-4phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp Neurol* 1999; 156: 50–61.
- Mandal PK, Pettegrew JW, Masliah E, Hamilton RL, Mandal R. Interaction between A $\beta$  peptide and  $\alpha$ -synuclein: molecular mechanisms in overlapping pathology of Alzheimer's and Parkinson's in dementia with Lewy body disease. *Neurochem Res* 2006; 31: 1153–1162.
- Min Jeong P, Sang-Myung C, Hye-Ran B, Sang-Ho K, Joe Woo K. Elevated levels of  $\alpha$ -synuclein oligomer in the cerebrospinal fluid of drug-naïve patients with Parkinson's disease. *J Clin Neurol* 2011; 7: 215–222.
- Ohashi S, Mori A, Kurihara N, Mitsumoto Y, Nakai M. Age-related severity of dopaminergic neurodegeneration to MPTP neurotoxicity causes motor dysfunction in C57BL/6 mice. *Neurosci Lett* 2006; 401: 183–187.
- Olanow CW, Brundin P. Parkinson's disease and alpha synuclein: is Parkinson's disease a prion-like disorder? *Mov Disord* 2013; 28: 31–40.
- Olanow CW, Prusiner SB. Is Parkinson's disease a prion disorder? *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 12571–12572.
- Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmund MJ. A role for  $\alpha$ -synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci* 2002; 22: 3090–3099.
- Perez RG, Hastings TG. Could a loss of  $\alpha$ -synuclein function put dopaminergic neurons at risk? *J Neurochem* 2004; 89: 1318–1324.
- Przedborski S, Vila M. MPTP: a review of its mechanisms of neurotoxicity. *Clin Neurosci Res* 2001; 1: 407–418.
- Rowe DR, Le W, Smith RG, Appel SH. Antibodies from patients with Parkinson's disease react with protein modified by dopamine oxidation. *J Neurosci Res* 1998; 53: 551–558.
- Schapira AHV. Recent developments in biomarkers in Parkinson. *Curr Opin Neurol* 2013, 26:395–400.

39. Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ. Ubiquitination of a new form of  $\alpha$ -synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 2001; 293: 263–269.
40. Sidhu A, Wersinger C, Vernier P. Alpha-synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *FEBS Lett* 2004; 565: 1–5.
41. Spillantini MG, Goedert M. The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 920: 16–27.
42. Trojanowski JQ, Lee VM. Aggregation of neurofilament and alpha-synuclein proteins in Lewy bodies: implications for the pathogenesis of Parkinson disease and Lewy body dementia. *Arch Neurol* 1998; 55: 151–152.
43. Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 11282–11286.
44. Wichmann T, DeLong MR. Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 991: 199–213.
45. Wang W, Perovic I, Chittuluru J. A soluble  $\alpha$ -synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 17797–17802.
46. Wang N, Gibbons CH, Lafo J, Freeman R.  $\alpha$ -Synuclein in cutaneous autonomic nerves. *Neurol* 2013; 81: 1604–1610
47. Zhang W, Zhang J. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J* 2005; 19: 533–542.
48. Zhou W, Schaack J, Zawada WM, Freed CR. Overexpression of human alpha-synuclein causes dopamine neuron death in primary human mesencephalic culture. *Brain Res* 2002; 926: 42–50.

---

*Adres do korespondencji:*

*Dr Ilona Joniec-Maciejak*

*Katedra Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej*

*Warszawski Uniwersytet Medyczny*

*Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa*

*tel.: +48 22 55 20 101*

*e-mail: ilona.joniec@wum.edu.pl*

---