

Received: 2016.03.07
Accepted: 2017.03.10
Published: 2017.05.04

Dysfunkcje lizosomów a choroby neurodegeneracyjne

Lysosomal dysfunction in neurodegenerative diseases

Klaudia Tomala¹, Bożena Gabryel²

¹Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

²Zakład Farmakologii Katedry Farmakologii, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Streszczenie

Dane literaturowe z ostatnich lat jednoznacznie wskazują na udział lizosomów w programowanej śmierci komórki. Dysfunkcje lizosomów upośledzają fuzję autofagosomów z lizosomami, co prowadzi do wakuolizacji cytoplazmy. Obecność wakuoli autofagalnych obciążonych uszkodzonymi organellami i nieprawidłowymi białkami jest cechą charakterystyczną wielu chorób neurodegeneracyjnych. Agregacja niezdegradowanego materiału zaburza homeostazę komórki powodując śmierć neuronu w wyniku apoptozy i/lub nekrozy. Ponadto indukowany kalpainami lub spowodowany mutacjami rozpad błony lizosomu uwalnia kathepsyny, które indukują szlak śmierci komórki. W artykule przedstawiono mechanizm śmierci komórki nerwowej, łączący zaburzenie szlaku autofagально-lizosomalnego z dysfunkcjami lizosomów, zwany lizosomalnym szlakiem śmierci neuronu.

Słowa kluczowe:

lizosomy • autofagia • apoptoza • choroby neurodegeneracyjne

Summary

Recent data advocate for the implication of lysosomes in the development of programmed cell death. Lysosomal dysfunction decreased the efficiency of autophagosome/lysosome fusion that leads to vacuolation of cells. Autophagic vacuoles containing damaged organelles and altered proteins are hallmarks in most neurodegenerative disorders. These aggregates consequently disrupt cellular homeostasis causing neuronal cell death due apoptosis or necrosis. Moreover calpain mediated or mutation induced lysosomal rupture result in release of lysosomal cathepsins into the cytoplasm and inducing neuronal cell death. In this review we emphasize the pathophysiological mechanism connecting disrupting autophagy – lysosomal pathway and lysosomal dysfunction in neuronal cell death called lysosomal cell death.

Keywords:

lysosomes • autophagy • apoptosis • necrosis • neurodegenerative disorders

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1236998>

Word count:

8784

Tables:

–

Figures:

5

References:

110

Adres autorki: dr hab. n. med. Bożena Gabryel, Zakład Farmakologii Katedry Farmakologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, ul. Medyków 18, 40-752 Katowice, e-mail: bgabryel@interia.pl

Wykaz skrótów: **A β** – beta-amyloid; **AIF** – czynnik indukcji apoptozy; **ALP** – autofagolizosomalny szlak śmierci komórki; **ALs** – autofagolizosomy; **APs** – autofagosomy; **ASN** – alfa-synukleina; **AVs** – pęcherzyki autofagalne; **BMP** – fosforan bis-monoacyloglicerolu; **[Ca²⁺]_i** – wewnątrzkomórkowe jony wapnia; **CAPN** – kalpaina; **CIRC** – indukowany przez wapń wypływ wapnia; **CMA** – autofagia zależna od białek opiekuńczych; **HNE** – 4-hydroksynonenal; **Hsc70** – konstytutywne białko szoku cieplnego; **IMs** – błony wewnątrzlizosomalne; **LAMP** – białko związane z błoną lizosomu; **LCD** – lizosomalna śmierć komórki; **LMP** – permeabilizacja błony lizosomu; **MCO** – oksydacja katalizowana jonami metali; **MDA** – dialdehyd malonowy; **NSCs** – neuronalne komórki macierzyste; **NBD** – N-końcowa domena wiążąca ATP; **NDs** – choroby neurodegeneracyjne; **NFTs** – spletki neurofibrylarne; **NMDAR** – receptor kwasu N-metylo-D-asparaginowego; **PHFs** – podwójne helikalne filamenty; **PS** – presenilina; **PSEN** – gen kodujący presenilinę; **PQC** – system kontroli jakości białek; **RCS** – reaktywne pochodne karbonylowe; **RONS** – reaktywne formy azotu i tlenu; **ROS** – reaktywne formy tlenu; **SBD** – C-końcowa domena wiążąca substraty; **UPRs** – nieprawidłowo sfałdowane białka; **UPS** – szlak ubikwityna-proteasom; **VGCC/VOCC** – bramkowane/otwierane napięciem kanały wapniowe; **XIAP** – inhibitor białek apoptotycznych.

WPROWADZENIE

Choroby neurodegeneracyjne (neurodegenerative diseases, NDs) charakteryzują się wybiórczym zwyrodnieniem szczególnie wrażliwych grup neuronów [8,57]. Wzrost częstotliwości występowania NDs jest skorelowany z wydłużaniem się długości życia [60]. Zmiany zachodzące w starzejących się neuronach są istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju NDs [71]. W ich przebiegu zaobserwowano w neuronach nasilenie zmian związanych ze starzeniem, tj.: stres oksydacyjny, zaburzenie homeostazy jonowej, deficyty energetyczne, uszkodzenie mitochondriów, nadmierną aktywację receptorów glutaminianergicznym oraz osłabienie mechanizmów proteolitycznych [15,43]. Cechą starzejących się neuronów, szczególnie nasiloną w NDs, jest nagromadzenie się nieprawidłowo sfałdowanych białek swoistych dla danej choroby [71]. Zaburzenia struktury przestrzennej białek sprzyjają ich wewnątrzkomórkowej akumulacji w postaci złożeń, oligomerów i agregatów. Za usuwanie uszkodzonych białek są odpowiedzialne komórkowe systemy degradacji, których aktywność znacznie spada z wiekiem [68].

Ze wszystkich komórek organizmu, neurony są najbardziej wrażliwe na zmiany związane z procesem starzenia [57]. Komórki neuronalne mają bardzo intensywny metabolizm tlenowy związany z dużym zapotrzebowaniem energetycznym i znaczną liczbą mitochondriów [15]. Ponadto, w porównaniu do astrocytów, wykazują małą aktywność enzymów antyoksydacyjnych (tj. dysmutaza ponadtenkowa, peroksydaza glutationowa, katalaza), a bezpośrednie sąsiedztwo mikrogleju naraża je na szkodliwy wpływ dużych ilości anionorodnika ponadtlenkowego. Neurony zawierają też znaczne ilości jonów metali uczestniczących w reakcjach generujących wolne rodniki oraz dużą ilość nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonie komórkowej ulegających peroksyda-

cji [8]. W przeciwieństwie do komórek mitotycznych, neurony nie mogą zredukować poziomu uszkodzeń podczas podziałów lub zastąpić uszkodzoną komórkę nową [16,30,88]. Wyjątkiem są neuronalne komórki macierzyste (neural stem cells, NSCs), które wykazują zdolność do nieograniczonych podziałów mitotycznych, co jest istotą procesu neurogenezy. Postnatalna neurogeneza ogranicza się do tzw. regionów neurogennych, tj. strefa podkomorowa komórki bocznej i zakręt zębaty hipokampa [80]. Wprawdzie wykazano, że w warunkach patologicznych (ischemia czy stan zapalny), proces neurogenezy jest indukowany również w strefach nieneurogennych, np. region CA1 hipokampa. W warunkach fizjologicznych komórki macierzyste tego regionu różnicują się wyłącznie do komórek glijowych, natomiast w stanach chorobowych – także do neuronów [110].

Prawidłowe funkcjonowanie neuronów wymaga konstytutywnej aktywności systemu kontroli jakości białek (protein quality control, PQC), angażującego białka opiekuńcze oraz proteazy mitochondrialne, retikulum endoplazmatycznego (ER) i cytosolowe w proces fałdowania białek [68]. Dodatkowe systemy odpowiedzi na nieprawidłowo sfałdowane białka (unfolded protein responses, UPRs) umiejscowione w mitochondriach, ER i cytosolu aktywują mechanizmy antyoksydacyjne umożliwiające prawidłowy przebieg procesu fałdowania białek. Genetyczne defekty mechanizmów fałdowania, jak i obserwowane w starzejących się komórkach obniżenie wydajności tych systemów, powoduje wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe gromadzenie się patologicznych białek, upośledzając pracę mitochondriów i zaburzając funkcję neuronów. To natomiast indukuje drugą linię obrony PQC, czyli degradację białek i uszkodzonych organelli [32]. Komórka ma kilka szlaków proteolitycznych, tj.: szlak lizosomalny zwany autofagosomalno-lizosomalnym (autophagy-lysosomal pathways, ALP), szlak proteasomalny znany jako system ubikwityna-

proteasom (ubiquitin-proteasome system, UPS) oraz wapniowo zależną proteolizę z udziałem kalpain. Pojedyncze białka o nieprawidłowej konformacji są usuwane w wyniku UPS lub autofagii zależnej od białek opiekuńczych (chaperone-mediated autophagy, CMA). Natomiast za pośrednictwem ALP możliwe jest pozbycie się agregatów białkowych w procesie makroautofagii (nazywanej dalej autofagią). Zaburzenie ALP jest ostateczną przyczyną odkładania się niezdegradowanych dysfunkcyjnych białek, tworzących główne podłoże NDs [16].

Lizosomy stanowią podstawowy element ALP wchodzącego w skład aparatu wakuolarnego komórki, nazywanego również układem endosomalno-autofagosomalno-lizosomalnym, gdyż tworzą go również wcześnie i późne endosomy [93]. Błona lipidowa lizosomu i zakotwiczone w niej białka mają istotne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania ALP. Fuzja lizosomu z autofagosomami lub endosomami wymaga udziału białek związanych z błoną lipidową lizosomu (lysosome-associated membrane protein, LAMP). Wprawdzie dokładny mechanizm działania LAMP nadal pozostaje nieznanym, skutki niedoborów tych białek jednoznacznie wskazują na ich krytyczną rolę w prawidłowym przebiegu autofagii. Deficyt LAMP powoduje gromadzenie się autofagosomów zawierających niezdegradowany materiał [81]. Białka LAMP biorą także udział w CMA, pełniąc funkcje receptorowe substratu związanego z białkiem opiekuńczym i uczestnicząc w transporcie rozplecionego białka do wnętrza lizosomu [87]. Niektóre z białek błony lizosomu funkcjonują jako receptory o dużej swoistości względem związków niskocząsteczkowych, tj. aminokwasy, cukrowce, nukleozydy, jony czy witaminy [81]. Integralne glikoproteiny błonowe, z których większość jest silnie glikozylowana, zabezpieczają błonę i inne kompartmenty komórkowe przed aktywnością hydrolityczną enzymów lizosomalnych. Białka błonowe uczestniczą w usuwaniu ostatecznych metabolitów do cytoplazmy, gdzie mogą zostać ponownie wykorzystane [34]. Bardzo ważną funkcją błony lizosomalnej jest wytworzenie i utrzymanie wewnątrz lizosomu środowiska optymalnego dla aktywności enzymów hydrolitycznych, co jest możliwe dzięki działaniu wielocząsteczkowego kompleksu o właściwościach pompy protonowej. Wakuolarna H^+ -ATPaza utrzymuje niskie pH przez stałą, zależny od ATP, transport jonów wodorowych do wnętrza lizosomu [86,103]. Aktywność enzymów lizosomalnych (proteaz, nukleaz, glikozydaz, fosfataz i lipaz) jest niezbędna w procesie degradacji dostarczanych do lizosomów makrocząsteczek, tj. białka, kwasy nukleinowe, cukry i lipidy [5].

KATEPSYNY

Katepsyny są najważniejszą klasą proteaz biorących udział w katabolizmie makrocząsteczek dostarczanych do lizosomu w wyniku autofagii lub endocytowanych z przestrzeni pozakomórkowej [72]. Proteazy te są zaangażowane także w nekrotyczną i apoptotyczną śmierć komórki. W czasie nekrozy w wyniku rozpadu błony

lizosomu katepsyny wraz z innymi hydrolazami wyciekają do cytoplazmy, gdzie nieswoiście degradują zawartość komórki [26]. Wykazano także proapoptotyczne właściwości katepsyn jako czynników aktywujących kaspazy lub destabilizujących błonę mitochondrialną [38]. Zaobserwowano bowiem, że w warunkach stresu oksydacyjnego aktywna, rozpuszczalna katepsyna D przemieszcza się do cytosolu i aktywuje katepsynę B trawiącą kaspazę-11 i -1. Obecnie wiadomo, że w wyniku przerwania ciągłości błony lizosomalnej (lysosomal membrane permeabilization, LMP) dochodzi do uwolnienia do cytosolu nie tylko aspartylowej katepsyny D, ale także kilku proteaz cysteinowych (katepsyny B, L, H i K), które biorą udział w lizosomalnej śmierci komórki (lysosomal cell death, LCD) [3,38]. Oprócz kaspaz substratami dla katepsyn są również białka apoptotyczne oraz regulator apoptozy XIAP, w związku z czym indukcja apoptozy może mieć charakter bezpośredni lub pośredni [26]. Pośrednia aktywacja kaspaz przez katepsyny cysteinowe polega na degradacji białek antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1) i/lub proteolitycznej aktywacji czynników apoptogennych, tj. Bid [3]. Katepsyna B tnie białko Bid usuwając N-końcowy fragment, który pełni funkcję inhibitora Bid. Uwolniony C-końcowy fragment białka – tBid (truncated Bid) wiąże się z białkiem Bax, z którym razem przemieszcza się do błony mitochondrialnej [3]. Białko Bax uwalnia cytochrom c tworząc pory w błonie mitochondrium [26]. Uwolniony do cytosolu cytochrom c zmienia konformację Apaf-1, eksponując N-końcową domenę rekrutującą kaspazy (CARD). Przyłączenie prokaspazy 9 (Apaf-3) do CARD formuje apoptosom. Autokatalitycznie aktywowana kaspaza 9 aktywuje następnie kaspazy efektorowe: 3, 6 i 7 indukuje apoptozę [75]. Natomiast szlak katepsyna D–Bax–mitochondrium może kierować komórkę na drogę apoptozy niezależną od kaspaz. W wyniku bezpośredniego oddziaływania katepsyny D z Bax dochodzi do uwolnienia czynnika indukującego apoptozę (apoptosis inducing factor, AIF) oraz endonukleazy G (Endo G) [72]. AIF opuszcza błonę mitochondrium już jako rozpuszczalne białko i razem z Endo G przemieszcza się do jądra, gdzie przeprowadza fragmentację DNA. Pełniąc funkcje DNAzy Endo G katalizuje podwójne pęknięcia nici DNA, które są najpoważniejszymi uszkodzeniami w strukturze DNA i powodem powstawania aberracji chromosomowych lub sygnałem apoptozy [75].

KALPAINY

Kalpainy (calcium-activated neutral proteases, CAPNs) są cytoplazmatycznymi enzymami należącymi do grupy cysteinowych endopeptydaz, których aktywność jest zależna od wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} [91]. Obecne w mózgu kalpaina 1 (CAPN1) i kalpaina 2 (CAPN2) są heterodimerami zbudowanymi z dwóch podjednostek: katalitycznej kodowanej przez geny *capn1* i *capn2* oraz regulatorowej, będącej produktem genu *cpns1*, połączonych za pomocą domeny penta-EF hand (5EF). Podjednostka regulatorowa nazywana kalpainą 4 jest małą proteazą (28 kDa) odpowiadającą za pra-

widlową konformację dużej podjednostki katalitycznej (80 kDA) i pełni funkcję białka opiekuńczego [89]. CAPN1 jest oznaczana jako μ -kalpaina, gdyż do aktywacji wymaga mikromolarnych stężeń jonów wapnia. Natomiast CAPN2, zwana m-kalpainą, jest aktywowana przez milimolarnie stężenie Ca^{2+} . Wzrost Ca^{2+} prowadzi do ograniczonej proteolizy enzymu, której skutkiem jest powstanie cząsteczki o znacznie większym powinowactwie do jonów Ca^{2+} w porównaniu do postaci natywnej. Aktywne kalpainy przeprowadzają zależną od wapnia częściową proteolizę białek, modyfikując w ten sposób ich aktywność i funkcje [97]. Substratami kalpain są m.in. receptory czynników wzrostu, białka związane z mikrotubulami i białka cytoszkieletu. W warunkach patologicznych kalpainy indukują apoptozę bezpośrednio w wyniku ograniczonej proteolizy białek proapoptycznych (Bax, prokaspaza-3) lub pośrednio, uwalniając lizosomalne katepsyny [4].

Hsp70.1

Rodzina białek szoku cieplnego Hsp70 jest grupą konserwatywnych ewolucyjnie białek opiekuńczych odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy komórkowej, ochronę komórki przed czynnikami stresogennymi oraz PQC [108]. Hsp70 zapobiegają odkładaniu się nieprawidłowo zwiniętych białek przez ich rozpoznawanie oraz naprawę i/lub kierowanie nieodwracalnie uszkodzonych białek do lizosomu w celu utylizacji [70]. Wszystkie Hsp70 są zbudowane z dwóch domen: N-końcowej wiążącej ATP (nucleotide-binding domain, NBD) i C-końcowej wiążącej substrat (substrate-binding domain, SBD), której aktywność jest regulowana allosterycznie przez przyłączenie ligandu do NBD i hydrolizę ATP [76]. Hsp70 wykazują duże powinowactwo do substratu, gdy NBD jest związane ADP. Natomiast kompleks NBD-ATP zmniejsza zdolność wiązania białek do SBD [14,20]. Wiązanie i odłączanie nieprawidłowego białka w centrum aktywnym Hsp70 wymaga nakładów energii. W razie braku ATP białko zostaje uwięzione w wyniku zmian konformacyjnych Hsp70 [42]. Obecność domeny ATP-azowej regulującej funkcje białek opiekuńczych jest niezbędna podczas przyłączania nieprawidłowo sfałdowanego białka w miejscu aktywnym i odcięcia ekspozowanych przez nie odcinków złożonych z hydrofobowych aminokwasów [100].

Większość przedstawicieli Hsp70 to wewnątrzkomórkowe, głównie cytoplazmatyczne, białka konstytutywne (constitutive Hsp70, Hsc70) wykazujące stałą ekspresję, która jest krytyczna dla prawidłowego funkcjonowania komórki [90]. Natomiast najważniejszym przedstawicielem podrodziny ludzkich białek Hsp70 umiejscowionym pozakomórkowo jest Hsp70.1, wykazujące niski poziom ekspresji w warunkach fizjologicznych. W przeciwieństwie do Hsc70 białko Hsp70.1 nie jest wymagane do prawidłowego funkcjonowania komórki, a jego deficyt nie jest letalny. Pod wpływem czynników stresowych zostaje aktywowany i przemieszcza się do błony lizosomu zapobiegając jej rozpa-

dowi [100,103]. Hsp70.1 jest zatem stabilizatorem błony lizosomalnej, którego głównym zadaniem jest zapobieganie śmierci komórki [82,94]. Stabilizujący wpływ Hsp70.1 na strukturę błony lizosomu polega na indukcji wytwarzania ceramidu [100]. Wzrost stężenia ceramidu wewnątrz błony lizosomalnej zapobiega jej destabilizacji i ułatwia fuzję lizosomu z wewnątrzkomórkowymi wakuolami [102].

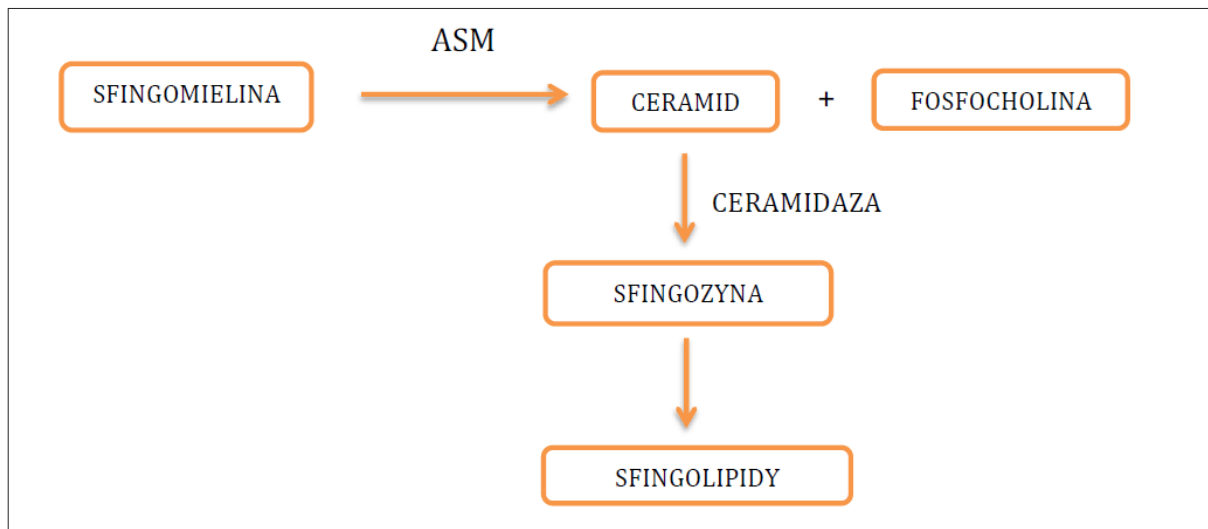
Unikatową cechą lizosomów jest obecność błon wewnątrzlizosomalnych (intralysosomal membranes, IMs), których struktura fosfolipidowa różni się znacznie od struktury błon komórkowych i błony lizosomu [86]. Charakterystycznym fosfolipidem IMs jest ujemnie naładowany bis(monoacyloglicerol)fosforan (BMP) [36]. Swoista konformacja nadaje BMP charakter anionowy i czyni niewrażliwym na lizosomalną hydrolizę. Oprócz funkcji strukturalnych, BMP uczestniczy w formowaniu pęcherzyków transportowych i jest kofaktorem enzymu, tj. kwaśnej sfingomielinazy (acid sphingomyelinase, ASM). ASM jest lizosomalną glikoproteiną zaangażowaną w metabolizm lipidowych stabilizatorów błon. Aktywowana ASM katalizuje hydrolizę sfingomieliny do ceramidu (ryc. 1) [70]. W warunkach niekorzystnych Hsp70.1 wnika za pośrednictwem endocytozy do komórki, przemieszcza się do wnętrza lizosomu i stabilizuje IMs przez interakcję z BMP [44]. Interakcja Hsp70.1-BMP sprzyja wiązaniu ASM do BMP i umożliwia syntezę ceramidu [110].

Hsp70.1 jest również negatywnym regulatorem mitochondrialnej ścieżki apoptozy przez blokowanie czynników proapoptycznych [49]. Hsp70.1 zapobiega uwolnieniu cytochromu c wiążąc Bax, a to uniemożliwia jego translokację do błony mitochondrialnej [3,84]. Hsp70.1 hamuje także niezależny od kaspaz szlak apoptozy AIF. Przez wiązanie AIF białko HIF70.1 zapobiega przemieszczaniu się AIF do jądra i kondensacji chromaty [100].

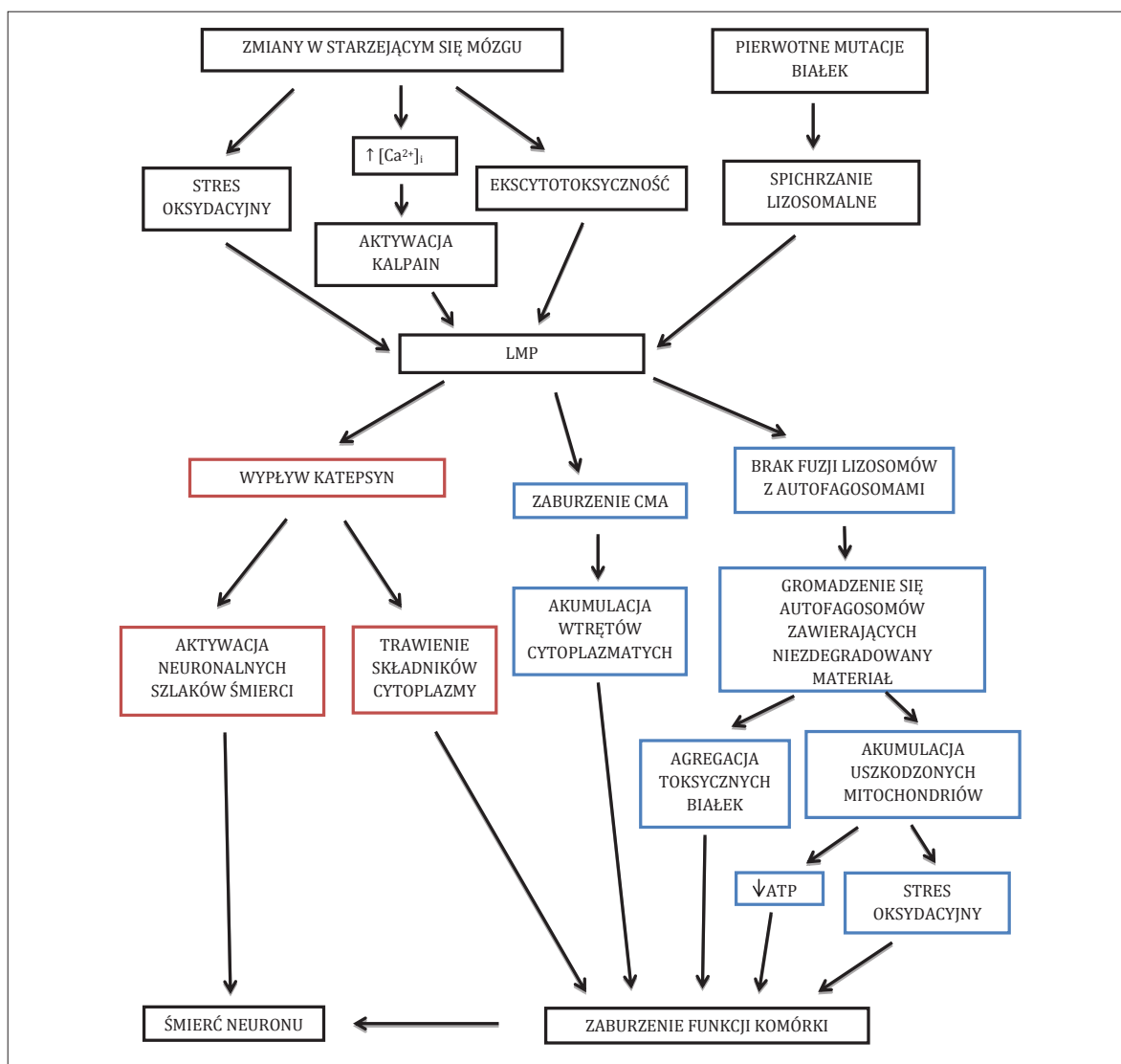
OKSYDACYJNE USZKODZENIA BŁONY LIZOSOMALNEJ

Aż 90% reaktywnych form tlenu i azotu (RONS) jest generowane w łańcuchu oddechowym. Innym źródłem wolnych rodników, zwłaszcza rodnika hydroksylowego ($\cdot OH$) są lizosomy. Trawione w procesie autofagii cytochromy oraz metaloproteinazy uwalniają duże ilości wolnego żelaza [100]. Kwaśne środowisko i obecność związków o potencjale redukującym, np. cysteiny, sprzyjają redukcji Fe(III) do Fe(II). Powstały w mitochondrium nadtlonek wodoru (H_2O_2) dyfunduje do wnętrza lizosomu, gdzie bierze udział w katalizowanej przez jony żelazawe reakcji Fentona, której produktem jest wysoce reaktywny rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) [47].

Stres oksydacyjny indukuje uszkodzenie błony lizosomu przez peroksydację lipidów błonowych [3]. Celem ataku reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species, ROS) są fosfolipidy bogate w wielonienasycone kwasy tłuszczowe (n-6-PUFA) [79]. Uszkodzenia oksydacyjne



Ryc. 1. Katalizowana przez ASM hydroliza sfingomieliny



Ryc. 2. Mechanizmy indukujące lizosomalną śmierć neuronów w chorobach neurodegeneracyjnych

lipidów powodują samorzutne przemieszczanie się fosfolipidów między warstwami błony lizosomu (zjawisko flip-flop), wzrost przepuszczalności błony dla jonów Ca^{2+} i K^+ , uszkodzenia białek błonowych (kanałów jonowych, receptorów, enzymów) oraz destabilizację błony lizosomalnej [100]. Produktami peroksydacji lipidów są reaktywne pochodne karbonylowe (reactive carbonyl species, RCS), tj.: akroleina, dialdehyd malonowy (MDA) oraz hydroksynonenal (HNE) [19]. HNE i akroleina wiążą się z rozwojem ekscytotoksyczności przez uszkodzenie białek ważnych w procesach neurotransmisji [55]. RCS modyfikują oksydacyjnie transportery glukozy, transportery glutaminianu oraz pompę sodowo-potasową, redukując tym samym ich aktywność [7,10] (ryc. 2).

EKSCYTOTOKSYCZNOŚĆ I ZABURZENIE HOMEOSTAZY WAPNIOWEJ

Powszechnie uważa się, że podłożem neurodegeneracji jest ekscytotoksyczność zaburzająca homeostazę wapnia i wywołująca patologiczną aktywację kalpain [4,12]. Jony Ca^{2+} uczestniczą w przekaźnictwie nerwowym zarówno w synapsach elektrycznych, jak i chemicznych [6]. Zaburzenie homeostazy wapnia wpływa na zmianę pobudliwości neuronu, upośledzając przekaźnictwo synaptyczne. W przezbłonowym transporcie jonów wapnia uczestniczą bramkowane napięciem kanały wapniowe (voltage-gated/operated calcium channels, VGCC/VOCC) i receptory jonotropowe, z których największą przepuszczalnością dla Ca^{2+} charakteryzują się receptory NMDA (NMDAR) [39,83]. Patologiczny dokomórkowy prąd wapniowy jest uznawany za czynnik rozwoju wielu neurodegeneracji związanych z powolną ekscytotoksycznością [83].

Zgodnie z koncepcją powolnej ekscytotoksyczności, neurotoksyczność glutaminianu nie wynika ze wzrostu jego stężenia w szczelinie synaptycznej, lecz z braku wychwytu zwrotnego glutaminianu oraz nadwrażliwości receptorów NMDA. Powolna ekscytotoksyczność jest spowodowana wewnątrzkomórkowym niedoborem energetycznym lub modyfikacją receptorów glutaminianu przez patologiczne postacie białek występujących w NDs. Zaburzenie metabolizmu energetycznego komórki jest wynikiem uszkodzenia mitochondriów przez inhibitory glikolizy i inhibitory fosforylacji oksydacyjnej oraz czynniki indukujące stres oksydacyjny [29,66]. ATP jest niezbędny do funkcjonowania pomp protonowych uczestniczących w utrzymaniu potencjału błonowego związanego z prawidłowym bilansem jonowym po obu stronach błony. Niedobory ATP hamują działanie pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ -ATP-azy), które zwiększają przepuszczalność błony dla jonów Ca^{2+} i Na^+ i depolaryzują błonę [24]. Zmiana polaryzacji błony generuje sygnał elektryczny przetwarzany przez VOCC na sygnał wapniowy i zwalnia blok magnezowy w NMDAR wywołując gwałtowny napływ Ca^{2+} . Receptory NMDA funkcjonują jednocześnie jako kanały jonowe i przetwarzają sygnał chemiczny, jakim jest przyłączenie ligandu w sygnał wapniowy. Przestrzeń zewnątrzkomórkowa nie jest jedynym źródłem jonów

Ca^{2+} w komórce. Pobudzenie receptorów metabotropowych sprzężonych z białkiem G mobilizuje wewnątrzkomórkowe zasoby jonów wapnia. Za pośrednictwem wtórnego przekaźnika - trifosforanu inozytolu (IP_3) - są aktywowane receptory IP_3R w ER i dochodzi do uwalniania Ca^{2+} do cytosolu. Napływ zewnątrzkomórkowych Ca^{2+} indukuje wtórne uwalnianie Ca^{2+} z ER za pośrednictwem kanałów rianodynowych (RyR). Zjawisko to nazywane „indukowanym przez wapń wypływem wapnia” (calcium-induced calcium release, CARD) ma na celu wzmocnienie sygnału wapniowego [83]. Aktywacja wapniowo zależnych enzymów zaangażowanych w metabolizm fosfolipidów, sfingolipidów i cholesterolu zmienia skład lipidowy błony, wpływając na pobudliwość neuronów i rozwój ekscytotoksyczności [66]. Oprócz zaburzeń metabolicznych na wzrost pobudliwości neuronów mają wpływ modyfikacje NMDAR przez patologiczne białka [25]. W przebiegu AD nadmierna pobudliwość neuronów jest spowodowana wiązaniem się zewnątrzkomórkowych oligomerów $A\beta$ do NMDAR [2]. Natomiast hiperfosforylowane białko tau wpływa na wzrost stężenia kinazy tyrozynowej Fyn w błonie postsynaptycznej. Kinaza Fyn fosforyluje NMDAR zwiększając jego aktywność [37].

PROTEOLITYCZNE USZKODZENIE BŁON LIZOSOMALNYCH

Za uszkodzenie błony lizosomalnej odpowiadają proteazy cysteinowe - kalpainsy i kaspazy. Utrzymujące się wysokie wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia ($[Ca^{2+}]_i$) prowadzi do masowej aktywacji wapniowo zależnych białek i inicjuje kaskadę mechanizmów doprowadzających do LMP i śmierci neuronu [28]. Nadmierna aktywacja kalpain jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za LMP [105]. Hiperaktywację kalpain nasilają deficyty endogennego inhibitora kalpain - kalpastatyny, degradowanej przez kalpainsy [28]. Łagodna, jednak utrzymująca się latami, aktywacja kalpain towarzyszy postępującej degradacji neuronów związanej z powolną ekscytotoksycznością [66].

Kaspazy indukują LMP przez aktywację i translokację do błony lizosomu pewnych białek cytosolowych, tj. proapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2. Aktywowana na szlaku receptorowym kaspaza 8 skraca białko Bid, które następnie aktywuje proapoptotyczne białko Bax. Zaobserwowano, że kaspaza 8 aktywuje kaspazę 9, która wpływa na destabilizację błony lizosomu, jednak mechanizm tego procesu pozostaje nieznany. Zdolność do uszkodzenia błony lizosomalnej wykazuje także kaspaza 2. Udowodniono, że LMP indukowany kaspazą 2 zachodzi niezależnie od innych czynników, tj. białka Bcl-2, $[Ca^{2+}]_i$ czy ROS. Substratem kaspaz jest również kalpastatyna, której hydroliza aktywuje kalpainsy i wywołuje LMP [28,105].

MUTACJE BIAŁEK LIZOSOMALNYCH

Mutacje w genach kodujących białka lizosomalne zaburzają funkcje lizosomów i powodują deficyt lub niedobór aktywności białek, tj.: enzymów lizosomalnych,

aktywatorów hydrolaz, białek biorących udział w transporcie enzymów do lizosomu, białek integralnych błony (LAMP-1, LAMP-2, NPC1) czy białkowych transporterów błonowych. Niedobory białek lizosomalnych uważa się za przyczynę rozwoju licznych chorób związanych z zaburzonym trawieniem komórkowym. Mutacje w genach kodujących białka lizosomalne zaburzają degradację makrocząsteczek, których akumulacja jest przyczyną rozwoju lizosomalnych chorób spichzeniowych (lysosomal storage disorders, LSDs). Natomiast mutacje w genach kodujących nieenzymatyczne białka błonowe poważnie wpływają na prawidłowe funkcjonowanie lizosomów [81]. Na przykład mutacje w genach kodujących białka biorące udział w transporcie cholesterolu, tj. NPC1, prowadzą do gromadzenia się sfingolipidów i cholesterolu wewnątrz lizosomu i upośledzają homeostazę cholesterolu w komórce. Najnowsze badania wskazują na związek mutacji genów lizosomalnych z patogenezą NDs wieku podeszłego [21,73].

HIPOTEZA „KALPAINOWO – HNE – HSP70.1 – KATEPSYNOWA”

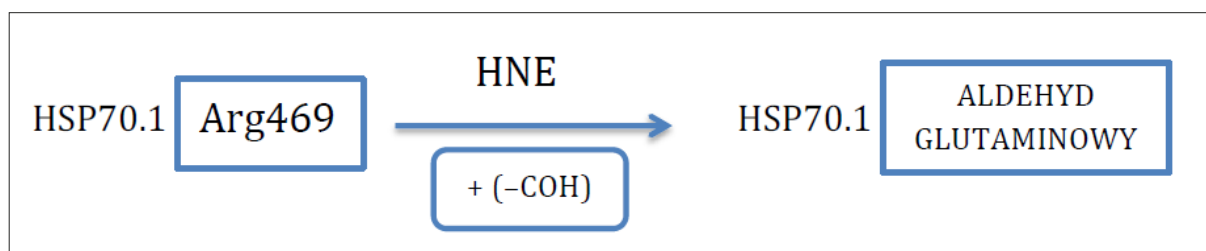
Związana z wiekiem redukcja mózgowego przepływu krwi zaburza w neuronach metabolizm energetyczny i homeostazę jonów wapnia. Wzrost stężenia $[Ca^{2+}]_i$ aktywuje kalpainy, które przemieszczają się do błony lizosomu wykorzystując do tego białko LAMP-2 [102]. Przez przyłączenie się do fosfolipidów błonowych kalpainy zmieniają konformację. Poddomeny IIa i IIb układają się bliżej siebie tworząc funkcjonalne centrum katalityczne kalpain [103]. Wraz z wiekiem wzrasta też poziom stresu oksydacyjnego w komórce. Bogate w wielonienasycone kwasy tłuszczowe fosfolipidy błonowe są szczególnie podatne na uszkodzenia wolnorodnikowe. ROS powodują oksydację lipidów błony lizosomalnej i tworzą RCS. Produktem peroksydacji n-6 PUFA, takich jak kwas linoleinowy i kwas arachidonowy jest silnie neurotoksyczny HNE [100]. HNE bierze udział w karbonylacji wielu głównych białek lizosomalnych. Karbonylacja Hsp70.1 przez HNE jest obecnie uważana za jeden z głównych czynników rozwoju NDs. HNE modyfikuje Hsp70.1 w pozycji Arg469, powodując tworzenie się aldehydu glutaminowego z reszty argininy [65,103] (ryc. 3). Zarówno Hsp70.1 jak i HNE przemieszczają się do błony lizosomu dzięki LAMP-2 [102]. Ukarbonylowana postać Hsp70.1 jest dużo bardziej podatna na proteolityczne działanie kalpain niż niezmodyfikowane oksydacyjnie białko. W wyniku karbonylacji dochodzi bowiem do rozplecenia struk-

tur aminokwasowych i ekspozycji wrażliwych na proteolizę miejsc, które prawidłowo są schowane we wnętrzu struktury białka [82]. Proteoliza Hsp70.1 wiąże się z brakiem interakcji Hsp70.1-BMP oraz BMP-ASM i zaburzeniem katabolizmu fosfolipidów [102]. Brak aktywności ASM uniemożliwia bowiem hydrolizę sfingomieliny do ceramidu, czego skutkiem jest wewnątrzkomórkowa akumulacja sfingomieliny i cholesterolu. Zatrzymanie wytwarzania ceramidów destabilizuje błonę lizosomalną i inne błony komórkowe [100]. Ostatecznie dochodzi do wypływu katepsyn do cytosolu i śmierci neuronu w wyniku nekrozy lub apoptozy [102] (ryc. 4).

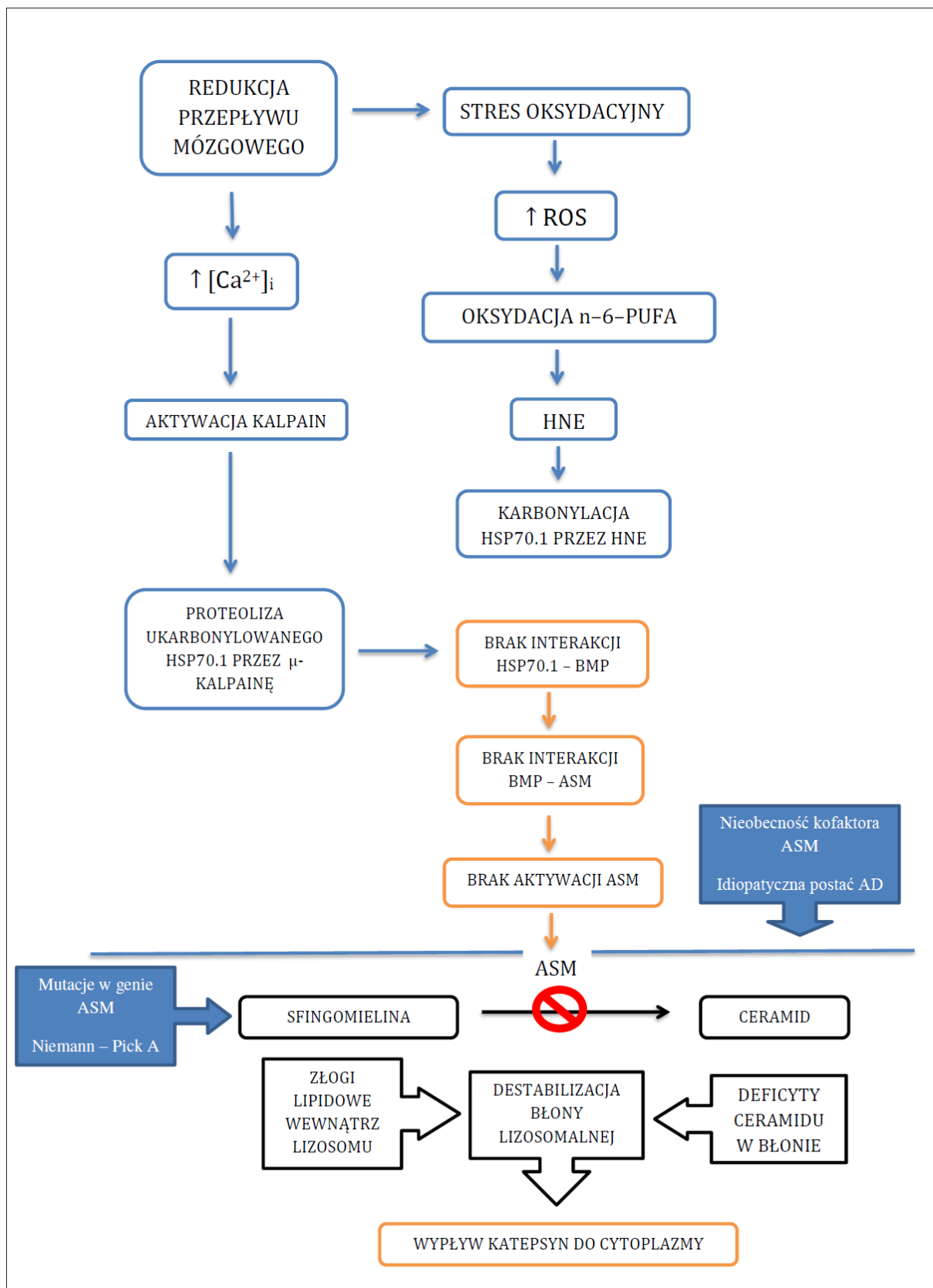
LIZOSOMALNA ŚMIERĆ KOMÓRKI

Lizosomalna śmierć komórki (lysosomal cell death, LCD) jest mechanizmem śmierci indukowanym przez LMP związanym z wypływem katepsyn do cytosolu [1]. Jak opisano wyżej, w wyniku destabilizacji błony lizosomalnej dochodzi do uwolnienia katepsyn, które biorą udział w śmierci komórki zarówno za pośrednictwem nekrozy, jak i apoptozy [9,93]. Brunk i wsp. [11] wykazali, że rodzaj śmierci komórki zależy od stopnia uszkodzenia błony lizosomu i jej przepuszczalności dla katepsyn. Rozległe uszkodzenie błony powoduje gwałtowny wypływ katepsyn i protonów do cytoplazmy, czego skutkiem jest zakwaszenie cytoplazmy i nekroza [11]. Natomiast delikatny, ograniczony wypływ katepsyn spowodowany LMP aktywuje apoptozę [11,26,38].

Obecnie wiadomo, że apoptoza i nekroza są indukowane przez te same czynniki, występujące w różnym natężeniu [77,103]. Do indukcji nekrozy dochodzi, gdy w wyniku hipoksji lub ekscytotoksyczności gwałtownie spada wytwarzanie ATP, co sprawia, że komórka nie może skorzystać z mechanizmów śmierci wymagających nakładów energii, tj. zależnej od kaspaz apoptozy czy autofagii [3]. Natomiast w przewlekłych neurodegeneracjach śmierć neuronu przebiega znacznie łagodniej, wykazując cechy apoptozy. Wyniki wielu eksperymentów jednoznacznie wskazują na udział lizosomalnych katepsyn w inicjacji i przebiegu apoptozy [33]. Uwalniane do cytosolu katepsyny indukują apoptozę aktywując kaspazy lub destabilizując błonę mitochondrialną [103]. W związku z niepodważalnymi dowodami na udział katepsyn w apoptozie wprowadzono określenia „lizosomalny szlak apoptozy” i „lizosomalno-mitochondrialna śmierć komórki”. Termin „lizosomalny szlak apoptozy” wprowadzono dla



Ryc. 3. Karbonylacja Hsp70.1 przez HNE. HNE modyfikuje Hsp70.1 w pozycji Arg469, prowadząc do utworzenia aldehydu glutaminowego z reszty argininy



Ryc. 4. Kaskada kalpainowo – HNE – hsp70.1 – katepsynowa

podkreślenia znaczenia destabilizacji błony lizosomalnej indukowanej czynnikami uszkadzającymi w inicjacji apoptozy przez uwolnienie proteaz do cytosolu [38]. Natomiast teoria lizosomalno-mitochondrialnej śmierci komórki zakłada współpracę obu organelli w procesie śmierci starzejącego się neuronu [3]. Uwalniane do cytosolu katepsyny indukują apoptozę i nasilają wydzielanie H_2O_2 w mitochondrium. Następnie H_2O_2 dyfunduje do wnętrza lizosomu biorąc udział w katalizowanej jonami żelaza reakcji Fentona [9]. Generowane w lizosomie ROS powodują dalsze uszkodzenia błony lizosomu i nasilają indukowaną katepsynami apoptozę [38,46].

AUTOFAGIA I ZABURZENIA ALP

Autofagia jest zwykle strategią obronną komórki uruchamianą w odpowiedzi na deprywację odżywczą i czynniki apoptogenne. Przez degradację wielkocząsteczkowych składników cytoplazmy, tj. białek o długim okresie półtrwania i organelli komórkowych autofagia dostarcza komórce substancji odżywczych umożliwiających przetrwanie w niekorzystnych warunkach [63].

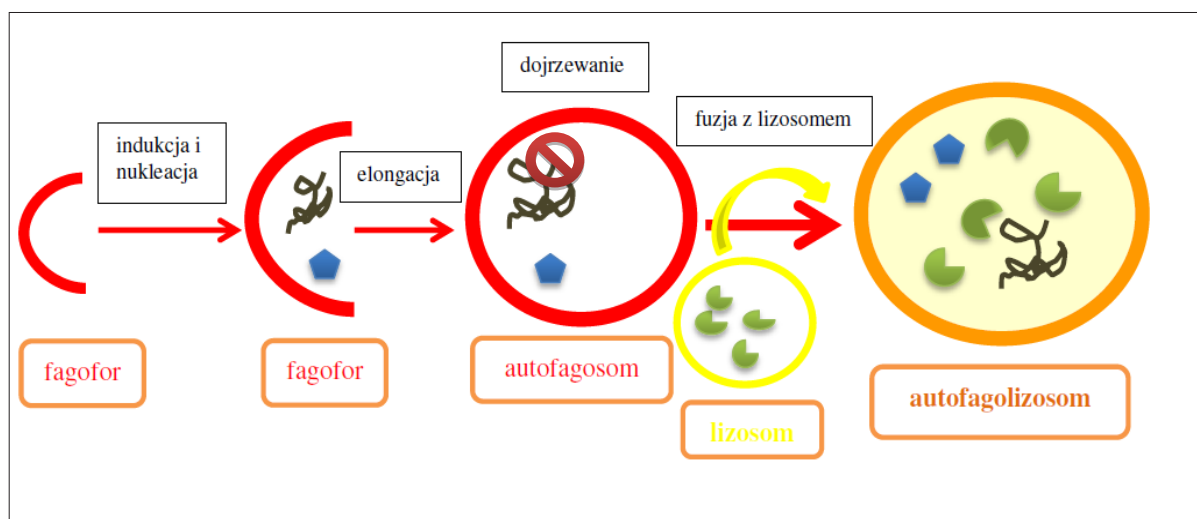
Charakterystyczną zmianą w morfologii neuronów obserwowaną w NDs jest obecność licznych wakuoli autofagalnych (AV) obciążonych białkami zmutowanymi lub zmodyfikowanymi oksydacyjnie, oligomerami i agregatami białkowymi oraz uszkodzonymi organellami [52]. To wskazuje na wzmożone wytwarzanie autofagosomów (AP) przy jednoczesnym obniżeniu skuteczności autofagii [69]. Zwykle szybka aktywacja autofagii jest odpowiedzią na obecność toksycznych białek i ma na celu ochronę komórki przed śmiercią [68]. Jednak w wyniku LMP zaburza się dojrzewanie autofagolizosomów (AL), co jest przyczyną upośledzenia końcowych etapów autofagii [54] (ryc. 5). Brak białka błonowego LAMP-1 wymaganego do fuzji AP z lizosomem, uniemożliwia utworzenie AL [96]. Ponadto Tian i wsp. [92] wykazali, że regulatorem fuzji jest kanał VGCC uczestni-

czący w połączeniu pęcherzyka synaptycznego z błoną presynaptyczną. Okazuje się, że sygnał wapniowy regulujący neurotransmisję jest również odpowiedzialny za procesy autofagii i endocytozy, a mechanizmy te są do siebie zbliżone. Defekty funkcjonowania podjednostek VGCC powodują poważne dysfunkcje układu nerwowego zarówno w przypadku nieprawidłowości w impulsacji nerwowej, jak i ALP. Oznacza to, że w błonie lizosomu występuje swoisty VGCC wymagany do fuzji lizosomów z pęcherzykami układu wakuolarnego, a mutacja jego podjednostek (głównie podjednostki CAC) jest przyczyną nieprawidłowego dojrzewania AL [92]. Znaczenie jonów wapnia w powstawaniu AL potwierdzili również Coen i wsp. [17], którzy badając wpływ mutacji w genie *PSEN* na zakłócenie procesu autofagii w patogenezie PD wykazali związek między nieprawidłową preseniliną a zaburzeniem homeostazy wapniowej.

Poza obciążeniami AP w wielu NDs zaobserwowano gromadzenie się niezdegradowanego materiału również wewnątrz AL, czego dowodem jest obecność hydrolaz w tych organellach. Odkładanie się nierozłożonego substratu wewnątrz dojrziałych AL jest wskaźnikiem upośledzonej autofagii [68]. W tym przypadku zaburzenie procesu degradacji jest spowodowane zmniejszeniem aktywności katalitycznej lizosomów w wyniku utraty kwasowości wnętrza lizosomu oraz obniżenia lub braku aktywności hydrolaz [69,99]. Obecność pęcherzyków zawierających niezdegradowany materiał może więc być skutkiem zaburzenia zarówno dojrzewania AL, jak również trawienia ich zawartości [54,56,69]. Zakłócenie procesu autofagii na którymkolwiek etapie jej przebiegu aktywuje lizosomalną śmierć neuronu [63,99].

AUTOFAGIA ZALEŻNA OD BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH

Autofagia zależna od białek opiekuńczych (CMA) jest głównym mechanizmem systemu kontroli jakości białek [98]. W wyniku CMA pojedyncze białka cytosolowe



Ryc. 5. Etapy biosyntezy autofagolizosomu, z zaznaczeniem etapu, którego zaburzenie prowadzi do zakłócenia procesu autofagii obserwowanego w NDs

zawierające niewłaściwą konformację są rozpoznawane przez białka opiekuńcze, które kierują je do lizosomalnej degradacji [13,18]. CMA wymaga obecności swoistego receptora na błonie lizosomalnej, białka LAMP-2a, do którego jest przyłączany substrat przeznaczony do utylizacji [41,61]. Proces CMA jest możliwy dzięki obecności Hsc70. Białka Hsc70 są stale obecne w komórce w postaci dwóch izoform: cytosolowej (cyt-Hsc70), która rozpoznaje nieprawidłowo sfałdowane białka i lizosomalnej (lys-Hsc70) uczestniczącej w translokacji substratu do wnętrza lizosomu. Izofirma cyt-Hsc70 wiąże białka, które zawierają w sekwencji aminokwasowej charakterystyczny pentapeptyd – KWERQ [98]. Ten unikalny motyw jest zbudowany z pięciu aminokwasów: lizyny, fenyloalaniny, glutaminianu, argininy i glutaminy (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) i rozpoznawany przez białka szoku cieplnego, co sprawia, że CMA jest procesem niezwykle selektywnym [45,67,74]. Utworzony kompleks białko substratowe-Hsc70 kieruje się w stronę błony lizosomu i łączy z receptorem LAMP-2a [41]. Następnie dochodzi do rozplecenia substratu, który przemieszcza się do wnętrza lizosomu z udziałem lys-Hsc70 [81].

W odróżnieniu od pozostałych typów autofagii szlak CMA jest obecny jedynie w komórkach ssaków [22]. Z wiekiem aktywność CMA maleje i ma to związek z akumulacją nieprawidłowo sfałdowanych i zmodyfikowanych oksydacyjnie białek. Patologiczne białka są odkładane w postaci wrętów cytoplazmatycznych obserwowanych w NDs wieku podeszłego [56]. Zaburzenie szlaku CMA jest uważane za podłoże proteinopatii, tj.: choroby Parkinsona (PD), Alzheimer (AD) i Huntingtona (HD) [67]. Obecność motywu KWERQ w patologicznych białkach ostatecznie potwierdza związek CMA z patomechanizmem neurodegeneracji [22].

ROLA LIZOSOMÓW W PATOGENEZIE NDs

Choroba Alzheimer

Choroba Alzheimer (AD) jest najczęściej występującą chorobą neurodegeneracyjną i stanowi aż 60% chorób otępiennych. Cechą charakterystyczną mózgow AD jest obecność płytek starczych (SP), których głównym składnikiem są złogi β -amyloidu ($A\beta$) oraz splątków neurofibrylarnych (NFT) zbudowanych z podwójnych helikalnych filamentów (PHFs) nadmiernie ufosforylowanego białka tau indukujących proces neurodegeneracji na długo przed wystąpieniem pierwszych objawów choroby [107]. Szczególnie wrażliwe na degradację neuronów w AD są region CA1 hipokampa i II warstwa kory śródmózgowej [102]. Dowodem na związek lizosomów z AD jest to, iż płytki starcze zawierają dużo aktywnych lizosomalnych hydrolaz. To pozwala przypuszczać, że struktury te powstały wskutek LMP. Duże zainteresowanie badaczy wzbudzają katepsyny aspartylowe D i E ze względu na ich aktywność podobną do sekretaz γ i β , a co za tym idzie ich sugerowany związek z powstawaniem $A\beta$ [35,107]. W prawidłowych warunkach szlak endosomalno-lizosomalny jest uważany za miejsce roz-

padu białka prekursora β -amyloidu (APP) do mniejszych peptydów zawierających sekwencje $A\beta$, które następnie są degradowane przez katepsyny. Jednak w przypadku zaburzeń funkcjonowania lizosomów i inhibicji aktywności katepsyn powstają amyloidogenne fragmenty, które mogą ulec przekształceniu do $A\beta$ [107]. Wzrost stężenia rozpuszczalnego $A\beta$, uważanego za potencjalne źródło płytek amyloidowych, prowadzi do powstawania ROS powodujących rozpad lizosomu i śmierci neuronu [40].

Niedawne badania wykazały udział szlaku ALP w potranslacyjnych modyfikacjach białka tau, należącego do rodziny białek związanych z mikrotubulami (MAP). Zaburzenia ALP powodują nadmierną fosforylację białka tau i odkładanie się wewnątrz lizosomów jego nierozpuszczalnych agregatów w postaci PHFs, co zaburza prawidłowe funkcjonowanie komórki [64].

Yamashima i wsp. [101] wykazali, że czynniki ryzyka chorób naczyniowych mózgu zwiększają także prawdopodobieństwo wystąpienia AD. W badaniach *post mortem* stwierdzono, że co trzeci pacjent z AD przebył zawał mózgu. Ryzyko rozwoju AD jest też trzykrotnie wyższe u pacjentów z udarem mózgu w wywiadzie niż w grupie kontrolnej [101]. Według Sahara i Yamashima [82] postępująca degeneracja neuronów w AD to *continuum* łagodnych zmian naczyniowych, podczas gdy krótkotrwałe silne niedokrwienie prowadzi do śmierci komórek w krótkim przedziale czasowym. Zaobserwowano, że w AD patologiczne zmiany neuronalne (tj. NFT, SP) czy stan zapalny przeważnie są spowodowane trwającą od lat aktywacją kalpain w wyniku tzw. „niemego niedokrwienia” [102]. Nadmierną aktywacją kalpain zaobserwowano we wczesnej fazie AD w odpowiedzi na ekscytotoksyczność, akumulację $A\beta$ i wzrost $[Ca^{2+}]_i$. Neuronory chorych z AD wykazują siedmiokrotnie większą aktywność μ -kalpainy w porównaniu do osób zdrowych [99]. Ponadto w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z AD wykryto podwyższone stężenie HNE, a badania immunohistochemiczne tkanki mózgowej pochodzącej od chorych z AD wykazały obecność białek karbonylowanych przez HNE [102]. Katalizowana przez μ -kalpainę proteoliza ukarbonylowanej postaci Hsp70.1 destabilizuje błonę lizosomu przez zahamowanie syntezy ceramidu katalizowanej przez ASM. Deficyty aktywności ASM powodują wewnątrzlizosomalne odkładanie się sfingomieliiny, co zaburza endosomalno-lizosomalny szlak transportu cholesterolu [101].

Zaburzenie autofagii jest uważane za główną przyczynę rozwoju AD, czego potwierdzeniem jest obecność autofagosomów i/lub AL obładowanych niezdegradowanym materiałem [51]. W neuronach AD z użyciem mikroskopu świetlnego zaobserwowano wakuolizację cytoplazmy zwaną degradacją ziarnisto-wodniczkową [102]. Neuronalna ekspresja $A\beta_{1-42}$ indukuje gwałtowną biosyntezę autofagosomów i jednocześnie obniża wydajność autofagii. $A\beta_{1-42}$ zaburza bowiem degradację zawartości autofagosomów redukując aktywność katalityczną lizo-

somów lub upośledzając fuzję autofagosomów z lizosomami [54].

Dziedziczna autosomalnie dominująco rodzinna postać AD jest spowodowana mutacjami w genach *PSEN1*, *PSEN2* i *APP* [59]. Mutacja w genie *PSEN1* kodującym presenilinę 1 - białko odpowiedzialne za glikozylację i transport podjednostki V0a1 lizosomalnej v-ATPazy - wyraźnie upośledza funkcje lizosomu [50]. V-ATPaza pełni główną rolę w dojrzewaniu lizosomów, pośrednicząc w fuzji autofagosomu z lizosomem. Zmutowana presenilina 1 jest przyczyną braku funkcjonalnej v-ATPazy w błonie lizosomu, czego skutkiem jest wzrost lizosomalnego pH, zaburzenie makroautofagii i gromadzenie się AV [101]. Jednak według niektórych autorów mutacje w genie *PSEN1* nie mają wpływu na proces autofagii, lecz aktywują biogenezę lizosomów. W mysich neuronach pozbawionych *PSEN1* zaobserwowano bowiem włączanie się sieci regulacji genetycznej lizosomów (CLEAR). Aktywowane geny wzmacniały biosyntezę lizosomów, mimo niskiej ekspresji głównego czynnika transkrypcyjnego TFEB, który indukuje biosyntezę lizosomów przyłączając się do miejsc docelowych CLEAR. Obserwowany alternatywny, niezależny od TFEB, mechanizm indukcji biosyntezy lizosomów wskazuje na ważną rolę preseniliny w regulacji biosyntezy lizosomów [108].

Choroba Parkinsona

Choroba Parkinsona (PD) jest najczęściej występującym zaburzeniem ruchowym i drugą co do częstości chorobą neurodegeneracyjną. Charakterystycznymi dla PD objawami są: drżenie spoczynkowe, sztywność mięśniowa, hipokineza oraz zaburzenia chodu i postawy. Objawy są spowodowane degeneracją neuronów dopaminergicznych istoty czarnej i neuronów monoaminergicznych w pniu mózgu [108]. Na występowanie PD mają wpływ różne czynniki, w tym genetyczne, jednak za główny czynnik ryzyka uważa się wiek. Początek PD zwykle obserwuje się po 65 roku życia, a częstość występowania w tej populacji wynosi 2-3% [85].

Badania *post mortem* mózgów chorych na PD umożliwiły zaobserwowanie w nich charakterystycznej zmiany neurodegeneracyjnej, tj.: znaczną redukcję liczby neuronów istoty czarnej, obecność wtędotów cytoplazmatycznych zwanych ciałami Lewy'ego (LB) oraz neurytów Lewy'ego. [96]. Głównym składnikiem LB zarówno w idiopatycznej, jak i w rodzinnej postaci PD jest zmutowana lub zmodyfikowana potranslacyjnie α -synukleina (ASN) [21]. Zdolność ASN do tworzenia agregatów jest uważana za główny patomechanizm PD, jednak sposób w jaki ASN degeneruje neurony dopaminergiczne pozostaje niewyjaśniony. Oprócz ASN, w LB zidentyfikowane zostały markery lizosomalne i autofagosomalne: LC3 (białko związane z mikrotubulami), LAMP1, LAMP2a, katepsyna D, VPS35, glukocerebrozydaza (GBA) i lizosomalna ATP-aza (ATP13A2) [8]. Ponadto w LB występują także uszkodzone mitochondria oraz składowe układu endosomalno-lizosomalnego. Na tej podstawie wysunięto

hipotezę, że LB powstają przy uszkodzonych lizosomach z niezdegradowanych autofagosomów, pochłaniając je zwiększając swoje rozmiary, tym samym poważnie uszkodzając sąsiadujące organelle i komórki powodując neurodegenerację [21]. Dodatkowych dowodów na udział lizosomów w rozwoju PD dostarczają badania *post mortem* mózgów pacjentów z PD, które wykazały w neuronach zmniejszenie liczby lizosomów, obniżenie ekspresji białek lizosomalnych (katepsyna D, LAMP-1, LAMP-2a, Hsc70) oraz akumulację niezdegradowanych AP. Podobne zmiany neuropatologiczne zaobserwowano także na modelach zwierzęcych PD zarówno genetycznych, jak i po podaniu toksyny mitochondrialnej 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyny (MPTP) [21,96].

Lizosomy są miejscem degradacji ASN, gdzie dociera w wyniku CMA lub endocytozy [85]. Jednak zmutowana lub potranslacyjnie zmodyfikowana ASN blokuje proces CMA zapobiegając swojej proteolizie, jednocześnie uniemożliwiając degradację pozostałych substratów [8]. Toksyczna ASN zaburza transport elektronów w I kompleksie mitochondrialnym generującym duże ilości ROS, które indukują LMP. Uwalniane do cytoplazmy katepsyny aktywują apoptozę neuronów [96]. Ponadto uszkodzone lizosomy upośledzają proces autofagii indukowany w odpowiedzi na wzrost stężenia patologicznej ASN. Obecność licznych AP jest skutkiem zaburzenia dojrzewania autofagolizosomów [85]. Wolnorodnikowe uszkodzenie lizosomów uruchamia LCD i proces neurodegeneracji niezależnie od ASN, jako naturalne następstwo starzenia się tkanki nerwowej [8]. Wykazano, że wolnorodnikowe uszkodzenia błony lizosomalnej w neuronach dopaminergicznych są identyczne jak w komórkach hipokampa. Destabilizacja błony lizosomu jest wynikiem karbonylacji Hsp70.1 nawet w tym samym regionie co w AD czyli Arg469 [65].

Rolę lizosomów w patogenezie PD potwierdza to, że chorzy na niektóre postaci rodzinnej choroby Parkinsona posiadają mutacje w genach kodujących białka lizosomalne. Dotychczas zbadano dwa geny, które mają istotny udział w rozwoju mniej typowych postaci parkinsonizmu. Pierwsza mutacja dotyczy genu kodującego GBA - enzymu rozkładającego glukozyloceramid. Niedobory aktywności tego białka są podłożem także innego schorzenia, należącej do LSDs - choroby Gauchera (GD). Jednak GD jest dziedziczona w sposób autosomalny recesywny, natomiast w parkinsonizmie związanym z mutacją w genie GBA jest dziedziczenie autosomalne dominujące. Oznacza to, że parkinsonizm rozwija się jedynie u heterozygot (GD natomiast u homozygot) względem zmutowanego GBA. Posiadanie jednego zmutowanego allelu GBA jest istotnym czynnikiem ryzyka PD i ośpienia z ciałami Lewy'ego [21]. Mutacje w genie GBA mają wpływ na proces akumulacji ASN, gdyż zaburzają funkcję lizosomów. Ponadto GBA został zidentyfikowany jako składnik LB. Badania przeprowadzone przez Mazzulli i wsp. [58] na mysich neuronach korowych i ludzkich neuronach otrzymanych z indukowanych plu-

ripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) wykazały, że interakcje GBA-ASN mają charakter dodatniego sprzężenia zwrotnego. Nierozłożony glukozyloceramid odkłada się wewnątrz lizosomów, powodując ich uszkodzenie i utratę funkcji proteolitycznych. W związku z tym dochodzi do nagromadzenia ASN, która obniża poziom aktywnego GBA przez upośledzenie jego transportu z ER/AG do lizosomów, zwiększając akumulację ASN [58].

Drugą mutacją dotyczącą białek lizosomalnych związaną z patogenezą PD jest mutacja w genie ATP13A2 dziedziczona w sposób autosomalny recesywny [85]. Mutacja ATP13A2 jest charakterystyczna dla postaci parkinsonizmu podatnego na leczenie lewodopą znanego jako zespół Kufor-Rakeb (KRS). Gen ATP13A2 koduje lizosomalną ATP-azę, pełniącą bardzo ważne funkcje w utrzymaniu integralności lizosomu i zapewnieniu w jego wnętrzu kwaśnego środowiska optymalnego do aktywności hydrolaz. Ponadto działa neuroprotekcynie przeciwko różnym stresorom, tj.: dysfunkcjom I kompleksu mitochondrialnego czy stresowi oksydacyjnemu [104]. Badania przeprowadzone na fibroblastach pobranych od pacjentów z KRS oraz na liniach komórkowych z wyłączonym ATP13A2 wykazały występowanie dysfunkcji lizosomów charakteryzujących się destabilizacją ich błony, spadkiem kwasowości wnętrza lizosomu, obniżeniem aktywności hydrolaz i osłabieniem ALP wywołującym akumulację niezdegradowanych AP. Badane komórki wykazywały też znaczną ekspresję ASN, która wzmacniała procesy śmierci neuronów [21].

Badania mechanistyczne przeprowadzone przez Vila i wsp. [96] na myszach traktowanych MPTP nie pozostawiają wątpliwości, że śmierć neuronów dopaminergicznych części zbitej istoty czarnej w PD jest poprzedzona dysfunkcją lizosomów, która jest przyczyną zaburzenia procesu autofagii. W celu weryfikacji słuszności hipotezy badacze przeprowadzili test sprawdzający, reaktywując ALP przez podanie rapamycyny. Skutkiem był wyraźny wzrost liczny funkcjonalnych lizosomów, obniżenie stopnia akumulacji AP i osłabienie procesów neurodegeneracyjnych [69,96].

Lizosomalne choroby spichrzeniowe

Lizosomalne choroby spichrzeniowe (LSDs) należą do wrodzonych zaburzeń metabolizmu, dziedziczonych autosomalnie recesywnie (z wyjątkiem choroby Danona, Fabry'ego i mukopolisacharydozy II, których dziedziczenie jest sprzężone z chromosomem X). LSDs są heterogenną grupą około 60 chorób, których wspólną cechą jest gromadzenie niezdegradowanych substancji wewnątrz lizosomów, natomiast zróżnicowaną pod względem zmutowanego genu kodującego, spichrzonej substancji oraz swoistości tkankowej [73]. Rodzaj spichrzanego materiału jest głównym kryterium diagnostycznym LSDs. Na tej podstawie wyróżniono następujące grupy chorób LSDs: mukopolisacharydozy związane z zaburzoną hydrolizą glikozozaminoglikanów (GAGs), oligosachary-

dozy, u podłoża których leżą niedobory enzymów rozkładających grupy cukrowe w łańcuchach bocznych glikoprotein, mukolipidozy spowodowane mnogimi niedoborami enzymów lizosomalnych oraz sfingolipidozy spowodowane zaburzeniem metabolizmu sfingolipidów [78]. Sfingolipidy w układzie nerwowym pełnią szczególne funkcje tworząc budulec zarówno istoty białej (galaktocerebrozyd, sulfatydy i sfingomielina są głównymi składnikami osłonki mielinowej), jak i szarej (neuryty są bogatym źródłem gangliozydów). Wewnątrzlizosomalna akumulacja niezdegradowanych lipidów w komórkach nerwowych tworzy podłoże neurodegradacji prowadzącej do poważnych zaburzeń neurologicznych i śmierci w młodym wieku. Większość LSDs jest spowodowana niedoborem aktywności enzymatycznej kwaśnych hydrolaz [53]. Pozostałe natomiast są związane z mutacjami białek błony lizosomalnej:

- białek enzymatycznych, tj. H⁺-ATPaza lub
- nieenzymatycznych białek integralnych błony odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie lizosomów.

Zróżnicowanie pod względem czynnika etiopatologicznego LSDs występuje nawet w obrębie poszczególnych grup tych schorzeń [78].

Przykładem sfingolipidozy jest choroba Niemann-Picka typu A (NPA) spowodowana odkładaniem się sfingomieliny i cholesterolu w komórkach nerwowych i makrofagach [100]. Podłożem choroby jest mutacja w genie SMPD1 kodującym ASM [44]. Wewnątrz lizosomów spichrzenie lipidów stanowiących główny składnik błony komórkowej i osłonki mielinowej powoduje poważne uszkodzenia dużych komórek mających rozgałęzione drzewko dendrytyczne i rozległą błonę komórkową. Z tego względu najbardziej podatne na degradację są komórki Purkiniego [99].

Choroba Niemann-Picka typu C (NPC), w odróżnieniu od NPA, jest spowodowana zaburzeniem wewnątrzkomórkowego transportu endogenego cholesterolu [64]. Podłożem NPC są mutacje w genach kodujących białka NPC1 i NPC2 biorące udział w transporcie cholesterolu [64,107]. Gen NPC1 koduje błonowy transporter cholesterolu, a produktem genu NPC2 jest rozpuszczalne lizosomalne białko wiążące cholesterol [23,73]. Większość przypadków NPC jest związana z deficytem NPC1. Dotychczas zdiagnozowano prawie 20 przypadków mutacji NPC2. Niezależnie od umiejscowienia mutacji obraz kliniczny jest taki sam, co świadczy o tym, że produkty obu genów są niezbędne do prawidłowego metabolizmu lipidów. Białko NPC1 uczestniczy w procesie fuzji autofagosomów z lizosomami, natomiast NPC2 bierze udział w odwrotnym do fuzji procesie zwanym fragmentacją prowadzącym do resyntezy lizosomów. Odzyskiwane z endolizosomów lizosomy łączą się z kolejnymi autofagosomami w celu degradacji ich zawartości [31]. Mutacje genu NPC1 uniemożliwiają degradację zgromadzonego materiału, a mutacje genu NPC2 upośledzają

resyntezę nowych lizosomów [23,73]. W transporcie cholesterolu uczestniczą oba białka NPC. NPC2 umiejscowiony w świetle endosomu wiąże wolny cholesterol (FC) i transportuje go do transbłonowego NPC1, który kieruje FC do miejsc docelowych [48]. Mutacja jednego z genów zaburza transport cholesterolu, czego następstwem jest odkładanie się niezestryfikowanego cholesterolu wewnątrz lizosomów i endosomów [95]. W systemie endosomalno-lizosomalnym gromadzą się także inne lipidy, tj.: BMP, sfingomielina, glikosfingolipidy i sfingozyna. Gromadzący się wewnątrz lizosomów i późnych endosomów cholesterol zaburza transport białek między tymi przedziałami, co również wpływa na dysregulację procesów komórkowych [107]. Ponadto spichrzający się wewnątrz lizosomu materiał ma negatywny wpływ na aktywność proteolityczną lizosomów, a jednocześnie indukuje proces autofagii. Paradoksalnie aktywacja proprzeżyciowego szlaku jest główną przyczyną szybkiego rozwoju NPC. Syntetyzowane AP odkładają się wewnątrz neuronów wraz z dojrzałymi AL, co świadczy o zaburzeniu ostatniego etapu autofagii z powodu redukcji aktywności hydrolitycznej lizosomów [27]. Zaburzenia autofagii są procesem wtórnym do pierwotnych mutacji w genie NPC [73].

Mutacje genów NPC1 i NPC2 biorą także udział w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych związanych z procesami starzenia, tj. PD, zwyrodnieniem płatów czołowych i skroniowych oraz postępującym porażeniem nadjądrowym [106]. Neurony osób chorych na NPC wykazują zmiany typowe dla AD, tj.: NFT, dysfunkcje systemu lizosomalnego oraz endosomy obciążone APP i A β . W obu patologiach, śmierć neuronów jest związana z zaburzeniem endosomalno-lizosomalnego szlaku transportu cholesterolu [62].

Obecnie uważa się, że śmierć neuronów w LSDs nie jest bezpośrednią przyczyną deficytów aktywności białek lizosomalnych, lecz skutkiem zaburzenia procesu autofagii w wyniku spichrzania lizosomalnego [78]. Gromadzące się wewnątrz lizosomów, niezdegradowane lipidy zaburzą funkcję lizosomów, co uniemożliwia fuzję tych organelli z autofagosomami. Upośledzenie dojrzewania AL zaburza degradację patologicznych białek i uszkodzonych mitochondriów, a to prowadzi do wewnątrzkomórkowej akumulacji niezdegradowanego materiału i śmierci neuronów [53]. Obserwowana w LSDs wakuolizacja cytoplazmy i obecność toksycznych agregatów białkowych wskazuje na duże podobieństwo tych chorób do postępujących neurodegeneracji wieku podeszłego. Ze względu na to, że zaburzenia autofagii stanowią wspólny element patomechanizmu przewlekłych neurodegeneracji i LSDs, mimo wielu różnic, zostały zaliczone do chorób spowodowanych zaburzeniem autofagii (autophagic disorders) [78].

PODSUMOWANIE

Liczne dane literaturowe wskazują na udział lizosomów w procesach neurodegeneracyjnych zarówno tych związanych z procesami starzenia się OUN, jak i tych o podłożu genetycznym. Dysfunkcje lizosomów prowadzą do wakuolizacji neuronów obserwowanej w licznych NDs, a uwalniane z lizosomów katepsyny indukują szlak śmierci komórki zwany lizosomalną śmiercią komórki, która jest główną przyczyną gwałtownej utraty neuronów w regionach charakterystycznych dla danej choroby. Uważa się, że poznanie mechanizmów zapobiegających uszkodzeniu lizosomów umożliwi opracowanie skutecznych metod terapeutycznych w leczeniu pacjentów z chorobami neurodegeneracyjnymi.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Aits S., Jäättelä M.: Lysosomal cell death at a glance. *J. Cell Sci.*, 2013; 126: 1905-1912
- [2] Alberdi E., Sánchez-Gómez M.V., Cavaliere F., Pérez-Samartín A., Zugaza J.L., Trullas R., Domercq M., Matute C.: Amyloid beta oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium*, 2010; 47: 264-272
- [3] Appelqvist H.: Lysosomal membrane stability and cathepsins in cell death. Linköping University Medical Dissertations No. 1325, 2012
- [4] Araújo I.M., Carreira B.P., Carvalho C.M., Carvalho A.P.: Calpains and delayed calcium deregulation in excitotoxicity. *Neurochem. Res.*, 2010; 35: 1966-1969
- [5] Benes P., Vetvicka V., Fusek M.: Cathepsin D – many functions of one aspartic protease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2008; 68: 12-28
- [6] Bezprozvanny I.B.: Calcium signaling and neurodegeneration. *Acta Naturae*, 2010, 2, 72-82
- [7] Bezprozvanny I., Mattson M.P.: Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.*, 2008; 31: 454-463
- [8] Bourdenx M., Bezdard E., Dehay B.: Lysosomes and α -synuclein form a dangerous duet leading to neuronal cell death. *Front Neuroanat.*, 2014; 8: 83
- [9] Boya P., Kroemer G.: Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*, 2008; 27: 6434-6451
- [10] Bradley M.A., Xiong-Fister S., Markesbery W.R., Lovell M.A.: Elevated 4-hydroxyhexenal in Alzheimer's disease (AD) progression. *Neurobiol. Aging*, 2012; 33: 1034-1044
- [11] Brunk U.T., Svensson I.: Oxidative stress, growth factor starvation and Fas activation may all cause apoptosis through lysosomal leak. *Redox Rep.*, 1999; 4: 3-11
- [12] Camins A., Verdaguer E., Folch J., Pallàs M.: Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Rev.*, 2006; 12: 135-148
- [13] Cheung Z.H., Ip N.Y.: Autophagy deregulation in neurodegenerative diseases - recent advances and future perspectives. *J. Neurochem.*, 2011; 118: 317-325
- [14] Chiappori F., Merelli I., Colombo G., Milanese L., Morra G.: Mo-

- lecular mechanism of allosteric communication in Hsp70 revealed by molecular dynamics simulations. *PLoS Comput. Biol.*, 2012; 8: e1002844
- [15] Chwastek J., Jantas D., Lasoń W.: Znaczenie kinazy ATM w procesach neurodegeneracyjnych. *Post. Biochemii*, 2014; 60: 313-322
- [16] Ciehanover A., Kwon Y.T.: Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp. Mol. Med.*, 2015; 47: e147
- [17] Coen K., Flannagan R.S., Baron S., Carraro-Lacroix L.R., Wang D., Vermeire W., Michiels C., Munck S., Baert V., Sugita S., Wuytack F., Hiesinger P.R., Grinstein S., Annaert W.: Lysosomal calcium homeostasis defects, not proton pump defects, cause endo-lysosomal dysfunction in PSEN-deficient cells. *J. Cell Biol.*, 2012; 198: 23-35
- [18] Cuervo A.M., Wong E.: Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.*, 2014; 24: 92-104
- [19] Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R.: Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta*, 2003; 329: 23-38
- [20] da Silva K.P., Borges J.C.: The molecular chaperone Hsp70 family members function by a bidirectional heterotropic allosteric mechanism. *Protein Pept. Lett.*, 2011; 18: 132-142
- [21] Dehay B., Bové J., Rodríguez-Muela N., Perier C., Recasens A., Boya P., Vila M.: Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J. Neurosci.*, 2010; 30: 12535-12544
- [22] Dereń-Wagemann I., Kielbiński M., Kuliczowski K.: Autofagia – proces o dwóch obliczach. *Acta Haematol. Polonica*, 2013; 44: 383-391
- [23] Dixit S.S., Jadot M., Sohar I., Sleat D.E., Stock A.M., Lobel P.: Loss of Niemann-Pick C1 or C2 protein results in similar biochemical changes suggesting that these proteins function in a common lysosomal pathway. *PLoS One*, 2011; 6: e23677
- [24] Doborek Ł, Thor P.: Glutamate NMDA receptors in pathophysiology and pharmacotherapy of selected nervous system diseases. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 338-346
- [25] Dong X.X., Wang Y., Qin Z.H.: Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2009; 30: 379-387
- [26] Droga-Mazovec G., Bojic L., Petelin A., Ivanova S., Romih R., Repnik U., Salvesen G.S., Stoka V., Turk V., Turk B.: Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 19140-19150
- [27] Elrick M.J., Lieberman A.P.: Autophagic dysfunction in a lysosomal storage disorder due to impaired proteolysis. *Autophagy*, 2013; 9: 234-235
- [28] Ferreira A., Bigio E.H.: Calpain-mediated tau cleavage: a mechanism leading to neurodegeneration shared by multiple tauopathies. *Mol. Med.*, 2011; 17: 676-685
- [29] Foran E., Trotti D.: Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid. Redox Signal.*, 2009; 11: 1587-1602
- [30] García-Arencibia M., Hochfeld W.E., Toh P.P., Rubinsztein D.C.: Autophagy, a guardian against neurodegeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2010; 21: 691-698
- [31] Goldman S.D., Krise J.P.: Niemann-Pick C1 functions independently of Niemann-Pick C2 in the initial stage of retrograde transport of membrane-impermeable lysosomal cargo. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 4983-4994
- [32] Gregersen N., Bross P.: Protein misfolding and cellular stress: an overview. *Methods Mol. Biol.*, 2010; 648: 3-23
- [33] Guicciardi M.E., Leist M., Gores G.J.: Lysosomes in cell death. *Oncogene*, 2004; 23: 2881-2890
- [34] Hamer I., Van Beersel G., Arnould T., Jadot M.: Lipids and lysosomes. *Curr. Drug Metab.*, 2012; 13: 1371-1387
- [35] Hook V., Funkelstein L., Wegrzyn J., Bark S., Kindy M., Hook G.: Cysteine cathepsins in the secretory vesicle produce active peptides: cathepsin L generates peptide neurotransmitters and cathepsin B produces beta-amyloid of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1824: 89-104
- [36] Hullin-Matsuda F., Luquain-Costaz C., Bouvier J., Delton-Vandenbroucke I.: Bis(monoacylglycero)phosphate, a peculiar phospholipid to control the fate of cholesterol: Implications in pathology. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 2009; 81: 313-324
- [37] Ittner L.M., Ke Y.D., Delerue F., Bi M., Gladbach A., van Eersel J., Wölfing H., Chieng B.C., Christie M.J., Napier I.A., Eckert A., Staufenbiel M., Hardeman E., Gotz J.: Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 2010; 142: 387-397
- [38] Johansson A.C., Appelqvist H., Nilsson C., Kågedal K., Roberg K., Ollinger K.: Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis*, 2010; 15: 527-540
- [39] Kalia L.V., Kalia S.K., Salter M.W.: NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lancet Neurol.*, 2008; 7: 742-755
- [40] Karpińska A., Gromadzka G.: Stres oksydacyjny i naturalne mechanizmy antyoksydacyjne – znaczenie w procesie neurodegeneracji. Od mechanizmów molekularnych do strategii terapeutycznych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 43-53
- [41] Kaushik S., Cuervo A.M.: Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.*, 2012; 22: 407-417
- [42] Kazula A., Kazula E.: Stymulacja aktywności białek szoku cieplnego jako nowy kierunek terapii. *Farm. Pol.*, 2009; 65: 697-706
- [43] Kim K., Lee S.G., Kegelmann T.P., Su Z.Z., Das S.K., Dash R., Dasgupta S., Barral P.M., Hedvat M., Diaz P., Reed J.C., Stebbins J.L., Pellecchia M., Sarkar D., Fisher P.B.: Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics. *J. Cell. Physiol.*, 2011; 226: 2484-2493
- [44] Kirkegaard T., Roth A.G., Petersen N.H., Mahalka A.K., Olsen O.D., Moilanen I., Zylicz A., Knudsen J., Sandhoff K., Arenz C., Kinnunen P.K., Nylandsted J., Jäättelä M.: Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. *Nature*, 2010; 463: 549-553
- [45] Kon M., Cuervo A.M.: Chaperone-mediated autophagy in health and disease. *FEBS Lett.*, 2010; 584: 1399-1404
- [46] Kroemer G., Jäättelä M.: Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer*, 2005; 5: 886-897
- [47] Kurz T., Terman A., Gustafsson B., Brunk U.T.: Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochem. Cell Biol.*, 2008; 129: 389-406
- [48] Kwon H.J., Abi-Mosleh L., Wang M.L., Deisenhofer J., Goldstein J.L., Brown M.S., Infante R.E.: Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell*, 2009; 137: 1213-1224
- [49] Lanneau D., Brunet M., Frisan E., Solary E., Fontenay M, Garrido C.: Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J. Cell Mol. Med.*, 2008; 12: 743-761
- [50] Lee J.H., Yu W.H., Kumar A., Lee S., Mohan P.S., Peterhoff C.M., Wolfe D.M., Martinez-Vicente M., Massey A.C., Sovak G., Uchiyama Y., Westaway D., Cuervo A.M., Nixon R.A.: Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*, 2010; 141: 1146-1158
- [51] Levine B., Kroemer G.: Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 2008; 132: 27-42
- [52] Liang C.C., Wang C., Peng X., Gan B., Guan J.L.: Neural speci-

- fic deletion of FIP200 leads to cerebellar degeneration caused by increased neuronal death and axon degeneration. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 3499-3509
- [53] Lieberman A.P., Puertollano R., Raben N., Slaugenhaupt S., Walkley S.U., Ballabio A.: Autophagy in lysosomal storage disorders. *Autophagy*, 2012; 8: 719-730
- [54] Ling D., Salvaterra P.M.: A central role for autophagy in Alzheimer-type neurodegeneration. *Autophagy*, 2009; 5: 738-740
- [55] Lovell M.A., Bradley M.A., Fister S.X.: 4-Hydroxyhexenal (HHE) impairs glutamate transport in astrocyte cultures. *J. Alzheimers Dis.*, 2012; 32: 139-146
- [56] Massey A.C., Follenzi A., Kiffin R., Zhang C., Cuervo A.M.: Early cellular changes after blockage of chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*, 2008; 4: 442-456
- [57] Mattson M.P., Magnus T.: Ageing and neuronal vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2006; 7: 278-294
- [58] Mazzulli J.R., Xu Y.H., Sun Y., Knight A.L., Mclean P.J., Caldwell G.A., Sidransky E., Grabowski G.A., Krainc D.: Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell.*, 2011; 146: 37-52
- [59] McBrayer M., Nixon R.A.: Lysosome and calcium dysregulation in Alzheimer's disease: partners in crime. *Biochem. Soc. Trans.*, 2013; 41: 1495-1502
- [60] Melo A., Monteiro L., Lima R.M., Oliveira D.M., Cerqueira M.D., El-Bachá R.S.: Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2011; 2011: 467180
- [61] Mizushima N., Levine B., Cuervo A.M., Klionsky D.J.: Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008; 451: 1069-1075
- [62] Nixon R.A.: Niemann-Pick Type C disease and Alzheimer's disease: the APP-endosome connection fattens up. *Am. J. Pathol.*, 2004; 164: 757-761
- [63] Nixon R.A.: The role of autophagy and neurodegenerative disease. *Nat. Med.*, 2013; 19: 983-997
- [64] Nixon R.A., Yang D.S., Lee J.H.: Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy*, 2008; 4: 590-599
- [65] Oikawa S., Yamada T., Minohata T., Kobayashi H., Furukawa A., Tada-Oikawa S., Hiraku Y., Murata M., Kikuchi M., Yamashita T.: Proteomic identification of carbonylated proteins in the monkey hippocampus after ischemia-reperfusion. *Free Radic. Biol. Med.*, 2009; 46: 1472-1477
- [66] Ong W.Y., Tanaka K., Dawe G.S., Ittner L.M., Farooqui A.A.: Slow excitotoxicity in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 2013; 35: 643-668
- [67] Orenstein S.J., Cuervo A.M.: Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2010; 21: 719-726
- [68] Osellame L.D., Duchen M.R.: Quality control gone wrong: mitochondria, lysosomal storage disorders and neurodegeneration. *Br. J. Pharmacol.*, 2014; 171: 1958-1972
- [69] Pan T., Kondo S., Le W., Jankovic J.: The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain*, 2008; 131: 1969-1978
- [70] Petersen N.H., Kirkegaard T.: HSP70 and lysosomal storage disorders: novel therapeutic opportunities. *Biochem. Soc. Trans.*, 2010; 38: 1479-1483
- [71] Piechota M., Sunderland P.: Starzenie neuronów. *Post. Biochemii*, 2014; 60: 177-186
- [72] Pivtoraiko V.N., Stone S.L., Roth K.A., Shacka J.J.: Oxidative stress and autophagy in the regulation of lysosome-dependent neuron death. *Antioxid. Redox Signal.*, 2009; 11: 481-496
- [73] Platt F.M., Boland B., van der Spoel A.C.: The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J. Cell Biol.*, 2012; 199: 723-734
- [74] Polewska J.: Autofagia – mechanizm molekularny, apoptoza i nowotwory. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2012; 66: 921-936
- [75] Pujal J., Ginet V., Clarke P.G.: Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: a challenge for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.*, 2013; 105: 24-48
- [76] Qi R., Sarbeng E.B., Liu Q., Le K.Q., Xu X., Xu H., Yang J., Wong J.L., Vorvis C., Hendrickson W.A., Zhou L., Liu Q.: Allosteric opening of the polypeptide-binding site when an Hsp70 binds ATP. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2013; 20: 900-907
- [77] Qin A.P., Zhang H.L., Qin Z.H.: Mechanisms of lysosomal proteases participating in cerebral ischemia-induced neuronal death. *Neurosci. Bull.*, 2008; 24: 117-123
- [78] Raben N., Shea L., Hill V., Plotz P.: Monitoring autophagy in lysosomal storage disorders. *Methods Enzymol.*, 2009; 453: 417-449
- [79] Reed T.T.: Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 2011; 51: 1302-1319
- [80] Respondek M., Buszman E.: Regulation of neurogenesis: factors affecting of new neurons formation in adult mammals brain. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 1451-1461
- [81] Saftig P., Schröder B., Blanz J.: Lysosomal membrane proteins: life between acid and neutral conditions. *Biochem. Soc. Trans.*, 2010; 38: 1420-1423
- [82] Sahara S., Yamashita T.: Calpain-mediated Hsp70.1 cleavage in hippocampal CA1 neuronal death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010; 393: 806-811
- [83] Salińska E., Danysz W., Lazarewicz J.W.: The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia Neuropathol.*, 2005; 43: 322-339
- [84] Schmitt E., Gehrman M., Brunet M., Multhoff G., Garrido C.: Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J. Leukoc. Biol.*, 2007; 81: 15-27
- [85] Schneider L., Zhang J.: Lysosomal function in macromolecular homeostasis and bioenergetics in Parkinson's disease. *Mol. Neurodegener.*, 2010; 5: 14
- [86] Schulze H., Kolter T., Sandhoff K.: Principles of lysosomal membrane degradation: cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009; 1793: 674-683
- [87] Schwake M., Schröder B., Saftig P.: Lysosomal membrane proteins and their central role in physiology. *Traffic.*, 2013; 14: 739-748
- [88] Son J.H., Shim J.H., Kim K.H., Ha J.Y., Han J.Y.: Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp. Mol. Med.*, 2012; 44: 89-98
- [89] Sorimachi H., Hata S., Ono Y.: Impact of genetic insights into calpain biology. *J. Biochem.*, 2011; 150: 23-37
- [90] Stricher F., Macri C., Ruff M., Muller S.: HSPA8/HSC70 chaperone protein: Structure, function, and chemical targeting. *Autophagy*, 2013; 9: 1937-1954
- [91] Suzuki K., Hata S., Kawabata Y., Sorimachi H.: Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*, 2004; 53: S12-S18
- [92] Tian X., Gala U., Zhang Y., Shang W., Nagarkar Jaiswal S., di Ronza A., Jaiswal M., Yamamoto S., Sandoval H., Duraine L., Sardiello M., Sillitoe R.V., Venkatachalam K., Fan H. i wsp.: A voltage-gated calcium channel regulates lysosomal fusion with endosomes and autophagosomes and is required for neuronal homeostasis. *PLoS Biol.*, 2015; 13: e1002103
- [93] Turk B., Turk V.: Lysosomes as "suicide bags" in cell death: myth or reality? *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 21783-21787

- [94] Turturici G., Sconzo G., Geraci F.: Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases. *Biochem. Res. Int.*, 2011; 2011: 618127
- [95] Vance J.E., Peake K.B.: Function of the Niemann-Pick type C proteins and their bypass by cyclodextrin. *Curr. Opin. Lipidol.*, 2011; 22: 204-209
- [96] Vila M., Bové J., Dehay B., Rodríguez-Muela N., Boya P.: Lysosomal membrane permeabilization in Parkinson disease. *Autophagy*, 2011; 7: 98-100
- [97] Vosler P.S., Brennan C.S., Chen J.: Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.*, 2008; 38: 78-100
- [98] Wang G., Mao Z.: Chaperone-mediated autophagy: roles in neurodegeneration. *Transl. Neurodegener.*, 2014; 3: 20
- [99] Wolfe D.M., Lee J.H., Kumar A., Lee S., Orenstein S.J., Nixon R.A.: Autophagy failure in Alzheimer's disease and the role of defective lysosomal acidification. *Eur. J. Neurosci.*, 2013; 37: 1949-1961
- [100] Yamashita T.: Hsp70.1 and related lysosomal factors for necrotic neuronal death. *J. Neurochem.*, 2012; 120: 477-494
- [101] Yamashita T.: Reconsider Alzheimer's disease by the 'calpain-cathepsin hypothesis' - a perspective review. *Prog. Neurobiol.*, 2013; 105: 1-23
- [102] Yamashita T., Mathivanan A., Dazortsava M.Y., Sakai S., Kurimoto S., Zhu H., Funaki N., Liang H., Hüllin-Matsuda F., Kobayashi T., Akatsu H., Takahashi H., Minabe Y.: Calpain-mediated Hsp70.1 cleavage in monkey CA1 after ischemia induces similar 'lysosomal vesiculosis' to Alzheimer neurons. *J. Alzheimers Dis. Parkinsonism*, 2014; 4: 139
- [103] Yamashita T., Oikawa S.: The role of lysosomal rupture in neuronal death. *Prog. Neurobiol.*, 2009; 89: 343-358
- [104] Yang X., Xu Y.: Mutations in the ATP13A2 gene and Parkinsonism: a preliminary review. *Biomed. Res. Int.*, 2014; 2014: 371256
- [105] Yildiz-Unal A., Korulu S., Karabay A.: Neuroprotective strategies against calpain-mediated neurodegeneration. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, 2015; 11: 297-310
- [106] Zech M., Nübling G., Castrop F., Jochim A., Schulte E.C., Mollenhauer B., Lichtner P., Peters A., Gieger C., Marquardt T., Vanier M.T., Latour P., Klünemann H., Trenkwalder C., Diehl-Schmid J. i wsp.: Niemann-Pick C disease gene mutations and age-related neurodegenerative disorders. *PLoS One*, 2013; 8: e82879
- [107] Zhang L., Sheng R., Qin Z.: The lysosome and neurodegenerative diseases. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2009; 41: 437-445
- [108] Zhang P., Leu J.J., Murphy M.E., George D.L., Marmorstein R.: Crystal structure of the stress-inducible human heat shock protein 70 substrate-binding domain in complex with peptide substrate. *PLoS One*, 2014; 9: e103518
- [109] Zhao C., Deng W., Gage F.H.: Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 2008; 132: 645-660
- [110] Zhu H., Yoshimoto T., Yamashita T.: Heat shock protein 70.1 (Hsp70.1) affects neuronal cell fate by regulating lysosomal acid sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.*, 2014; 289: 27432-27443

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.