

Received: 2012.11.07
Accepted: 2013.05.29
Published: 2013.11.04

Znaczenie zewnątrzkomórkowej α -synukleiny w molekularnych mechanizmach śmierci komórek*

The role of extracellular α -synuclein in molecular mechanisms of cell death

Anna Kaźmierczak, Agata Adamczyk, Joanna Benigna-Strosznajder

Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału; Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, Polska Akademia Nauk w Warszawie

Streszczenie

Niedawne badania wykazały, że zwiększone uwalnianie, oligomeryzacja i toksyczność α -synukleiny (ASN) leży u podstaw wielu chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Parkinsona, czy Alzheimerera oraz innych, ogólnie określanymi mianem synukleinopatii. Udowodniono, że w patologiach tych dochodzi do nadmiernego uwalniania ASN do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co może mieć istotny udział w rozprzestrzenianiu się i w rozwoju nowych ognisk chorobowych w mózgu. Sekrecja ASN następuje pod wpływem działania czynników toksycznych oraz w wyniku neurodegeneracji. Zewnątrzkomórkowa ASN działa toksycznie zarówno na komórki nerwowe jak i glejowe, a mechanizm jej działania zależy od stężenia tego białka w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Egzogenna ASN powoduje m.in. aktywację receptorów błonowych, zwiększony napływ jonów wapnia do wnętrza komórki, pobudza syntezę cytokin prozapalnych oraz tlenku azotu, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji apoptozy. Powyższe dane dają nowe spojrzenie na udział ASN w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, a tym samym mogą przysłużyć się w opracowaniu skuteczniejszej ich terapii.

Słowa kluczowe: α -synukleina • stres oksydacyjny • tlenek azotu • neurodegeneracja • choroba Parkinsona • choroba Alzheimerera

Summary

Recently published data demonstrated that increased release, oligomerization and toxicity of α -synuclein (ASN) is a key molecular process in pathophysiology of neurodegenerative diseases classified as synucleinopathies (e.g. Parkinson disease or Alzheimer's disease). It was proved that the excessive release of ASN into the extracellular space, driven by environmental factors as well as neurodegeneration, may have a significant role in the spread of the neurodegeneration process within the brain. Extracellular ASN was shown to be toxic both to neurons and glial cells and the mechanism of its action depends on the concentration of this protein in the extracellular space. Exogenous ASN leads to the activation of plasma membrane receptors, causes increased calcium influx, and stimulates the synthesis of proinflammatory cytokines and nitric oxide, which in turn leads to activation of programmed cell death. These data provide new insights into the involvement of ASN in the neurodegenerative diseases, and thus can serve effectively for the development of their new therapy.

Key words: α -synuclein • oxidative stress • nitric oxide • neurodegeneration • Parkinson's disease • Alzheimer's disease

*Praca przeglądowa powstała na podstawie rozprawy doktorskiej dr Anny Kaźmierczak.

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1074666>

Word count: 3541

Tables: –

Figures: 2

References: 119

Adres autorki: dr Anna Kaźmierczak, Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa; e-mail: aniakazmierczak@gmail.com

WSTĘP

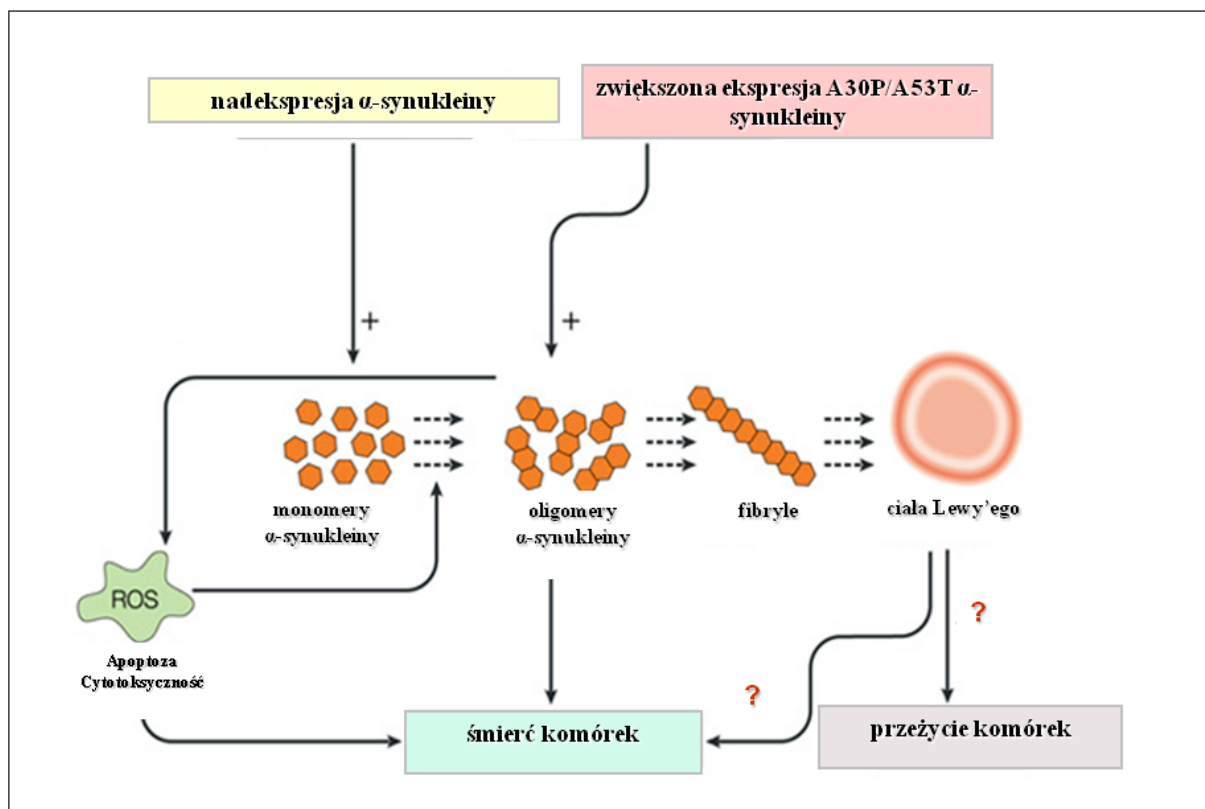
Choroby neurodegeneracyjne są grupą zaburzeń o charakterze progresywnym, w których dochodzi do zmian w strukturze i funkcjonowaniu neuronów, co w większości przypadków prowadzi do ich śmierci, zwłaszcza w późnych stadiach choroby. Choć choroby neurodegeneracyjne są tradycyjnie określane jako odrębne kliniczno-patologiczne jednostki chorobowe, to mogą one mieć wspólne podłoże, którym jest oligomeryzacja/agregacja określonych białek. Wieloletnie badania prowadzone w wiodących ośrodkach badawczych na świecie wskazują, że oligomeryzacja/agregacja białek nieprawidłowo połańdowanych lub uszkodzonych może być wspólnym patomechanizmem wielu chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Alzheimera, Parkinsona, chorób prionowych, proteinopatii związanych z obecnością białka TDP-43 oraz innych neurodegeneracji. Spośród białek „chętnie” ulegających oligomeryzacji/agregacji na szczególną uwagę zasługuje α -synukleina (ASN). Wykazano, że ASN jest jednym z głównych składników cytoplazmatycznych wtrętów w mózgu zwanych ciałami Lewy’ego, będącymi markerem choroby Parkinsona (ChP) [97]. Obecnie wiadomo, że ASN jest również składnikiem nierozpuszczalnych złogów białkowych w wielu innych chorobach neurodegeneracyjnych: w otępieniu z ciałami Lewy’ego [92], chorobie Alzheimera (ChA) [31], zespole Downa [83], dziecięcej dystrofii neuroaksonalnej [36], zwyrodnieniu ośrodkowego układu nerwowego typu I z odkładaniem się żelaza w mózgu [74], czy podostрым stwardniającym zapaleniu mózgu [32] oraz w innych chorobach neurodegeneracyjnych określanym mianem synukleinopatii. Odkrycie zależności między występowaniem dziedzicznej postaci ChP, a mutacjami A30P, A53T oraz E46K w genie kodującym ASN [52,81,110] zainicjowało liczne badania nad znaczeniem tego białka w patogenezie ChP i innych synukleinopatiach. Jednak mimo intensywnych badań prowadzonych w czołowych ośrodkach badawczych na świecie, mechanizmy toksyczności tego białka pozostają nadal nie w pełni wyjaśnione. Najnowsze i nieliczne jeszcze badania ostatnich kilku lat wskazują na istotne znaczenie zewnątrzkomórkowej ASN w procesie cytotoxyczności.

ZNACZENIE A-SYNUKLEINY W PATOLOGII CHORÓB NEURODEGENERACYJNYCH

Istotny wpływ na badania nad znaczeniem ASN w chorobach neurodegeneracyjnych miało odkrycie Polymero-

pouloosa i wsp., którzy udowodnili, że mutacja punktowa (G209A) w genie *SNCA*, powodująca substytucję alaniny przez treoninę w pozycji 53 ASN (A53T), wywołuje rodzinną postać ChP dziedziczną w sposób autosomalny dominujący [81]. Chociaż mutację tę wykryto u niewielu chorych, to jej pojawieniu się towarzyszyło zawsze występowanie objawów charakterystycznych dla ChP i to u ludzi bardzo młodych [81]. Wkrótce po tym odkryciu potwierdzono obecność ASN w ciałach Lewy’ego wyizolowanych *post mortem* z mózgow chorych na idiopatyczną ChP [93]. Początkowo bardzo sceptycznie odnoszono się do hipotezy, że ASN może być czynnikiem patogennym wpływającym na powstawanie i rozwój ChP. Za argument miały służyć badania, w których wykazano, że u ludzi z idiopatyczną ChP brak mutacji w genie *SNCA* [12,13]. Co więcej, u gryzoni w warunkach fizjologicznych wykryto ekspresję białka ASN z tyrozyną w pozycji 53 [66]. Ponadto sugerowano, że obecność ASN w ciałach Lewy’ego może po prostu wynikać z jej występowania w dużej ilości w cytoplazmie neuronów. Sugestie te zostały obalone, kiedy udowodniono, że ASN jest głównym składnikiem budującym ciała Lewy’ego, zarówno w dziedzicznej jak i idiopatycznej ChP [8,67,93,101], co wskazuje, że powstawanie tych inkluzji jest ściśle związane z agregacją ASN. Po roku wykryto kolejną mutację punktową w genie *SNCA*, związaną z występowaniem dziedzicznej ChP, w której dochodzi do zamiany alaniny na prolinę w pozycji 30 (A30P) [52]. W ostatnich latach opisano trzecią mutację w genie *SNCA* występującą u chorych z otępieniem z ciałami Lewy’ego, w której dochodzi do substytucji glutaminianu przez lizynę w pozycji 46 (E46K) [110].

Dane ostatnich lat wskazują, że również podwojenie i potrojenie genu *SNCA* odpowiada za rozwój rodzinnej postaci ChP [14,40,84,88]. Potrojenie *SNCA* skutkuje występowaniem zwiększonej ilości mRNA oraz białka ASN [69]. Pacjenci, u których wykryto te genetyczne nieprawidłowości, wykazywali dużo wcześniejsze objawy kliniczne charakterystyczne dla ChP, włączając również zaburzenia poznawcze [26]. Ponadto u tych osób zauważono szybszy rozwój choroby niż u chorych z postacią idiopatyczną. Badania *post mortem* wykazały duże skupiska ciał Lewy’ego, głównie w istocie czarnej i jądrze sinawym, z którymi związany był proces degeneracji i obumierania neuronów [26,72]. Co więcej, osoby które posiadały trzy kopie genu *SNCA* zamiast dwóch wykazywały objawy ChP identycz-



Ryc. 1. Wpływ neurotoksyn oraz nadekspresji i mutacji ASN na proces jej oligomeryzacji i agregacji. Nadekspresja zmutowanej α -synukleiny (A30P lub A53T) prowadzi do oligomeryzacji tego białka. Zwiększona ekspresja natywnej postaci białka powoduje wzrost stężenia monomerów, które następnie ulegają oligomeryzacji i fazylizacji. Oligomery aktywują powstawanie reaktywnych form tlenu (RFT) i aktywację kaskady cytotoksycznej. Z kolei RFT indukują oligomeryzację/fazylizację α -synukleiny. Protofibryle zwiększają wytwarzanie RFT, generując w ten sposób „toksyczne koło”

ne z chorymi na idiopatyczną postać tej choroby [14,40]. Osoby ze zwiększoną liczbą kopii genu *SNCA* dostarczają niepodważalnego dowodu, że zaburzenia ASN są istotną przyczyną powstawania i rozwoju tej choroby. U pacjentów z podwójną kopią genu pierwsze objawy pojawiały się około 50 roku życia, natomiast osoby z potrójnym genem zaczynały chorować już po 30 roku życia [14]. Ponadto zwiększona liczba genów dla ASN skutkuje znacznie krótszym czasem przeżycia od wystąpienia pierwszych symptomów oraz obecnością silniejszych objawów patologicznych [41].

Znaczącym czynnikiem ryzyka wystąpienia ChP okazał się polimorfizm regionu promotorowego (Rep1) genu *SNCA* [27,65,107]. Wykazano, że zwiększona długość Rep1 jest związana z wcześniejszym występowaniem objawów ChP [44] i skutkuje zwiększeniem ilości mRNA ASN [15]. Pojedyncze badania wskazują także na znaczenie polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNPs), zwłaszcza w rejonie 3' genu ASN, jako istotnego czynnika ryzyka rozwoju ChP [70,71].

Wszystkie te odkrycia dostarczają mocnych dowodów na istotną rolę ASN w patogenezie ChP i innych synukleinopatiach.

Neurotoksyczne działanie ASN jest związane z przyjmowaniem przez nią nieprawidłowej konformacji,

co w konsekwencji prowadzi do jej oligomeryzacji, fazylizacji i agregacji. Uważa się, że za powstawanie toksycznych postaci tego białka odpowiada jego centralny odcinek, peptyd NAC. Zmiana struktury NAC w postać b-harmonijki jest początkowym etapem agregacji, w którym powstają rozpuszczalne oligomery ASN – protofibryle [21], które wchodzi w interakcje z błonami pęcherzyków synaptycznych, powodując powstawanie porów i uwalnianie neuroprzebieżników do cytoplazmy [53].

Badania ostatnich lat wskazują, że właśnie formy oligomeryczne są odpowiedzialne za toksyczność ASN, a nie dojrzałe agregaty, jak sądzono przez wiele lat [76,77,82,105].

Postępująca agregacja może być swoistym mechanizmem obronnym przed szkodliwym działaniem oligomerów (ryc. 1).

W wyniku wzrostu ekspresji natywnej postaci ASN dochodzi do wzrostu stężenia jej monomerów, które następnie ulegają oligomeryzacji i fazylizacji. Zwiększona ekspresja zmutowanej ASN (A30P lub A53T) bezpośrednio prowadzi do oligomeryzacji tego białka, oligomery natomiast aktywują powstawanie reaktywnych form tlenu (RFT), które z kolei indukują oligomeryzację/fazylicację ASN tworząc tzw. „toksyczne koło”. Znacze-

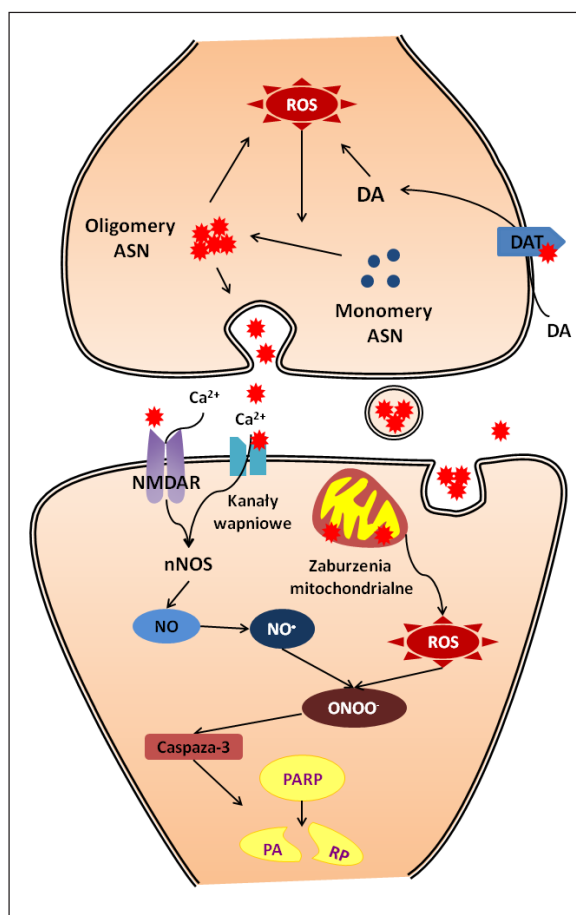
nie agregatów, które tworzą ciała Lewy'ego, pozostaje zatem niewyjaśnione, proces agregacji może stanowić mechanizm obronny przed działaniem toksycznych oligomerów, ale też agregaty białkowe mogą powodować mechaniczne uszkodzenia komórki.

ZEWNĄTRZKOMÓRKOWA A-SYNUKLEINA I MECHANIZMY JEJ SEKREKCJI DO PRZESTRZENI ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ

Badania mające na celu opracowanie odpowiedniego biochemicznego wskaźnika ChP doprowadziły do wykrycia ASN w płynie mózgowo-rdzeniowym zarówno ludzi zdrowych, jak i dotkniętych ChP [10]. Dalsze badania, wykorzystujące zarówno technikę Western blot, jak i immunoprecypitację, umożliwiły ilościowe oznaczenie białka ASN na poziomie nanomolarnym w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) oraz osoczu [24]. Wyniki powyższych eksperymentów nie wykazały znaczącej różnicy w poziomie zewnątrzkomórkowej ASN między osobami zdrowymi a chorymi z ChP. Opracowanie i użycie metody ELISA, która pozwoliła na dokładniejsze oznaczenia stężenia ASN u osób z ChP i zanikiem wieloukładowym wykazały znaczący wzrost stężenia tego białka w porównaniu z ludźmi zdrowymi [56]. Ponadto El-Agnaf i wsp. stwierdzili znaczący wzrost poziomu rozpuszczalnych oligomerów ASN w osoczu i PMR w przypadku chorych z ChP [25]. Badania Tokuda i wsp. wykazały natomiast istotny spadek poziomu ASN w płynie mózgowo-rdzeniowym osób z ChP [96]. Rozbieżność dotychczasowych wyników sprawia, że na obecnym etapie nie można rozpatrywać poziomu zewnątrzkomórkowej ASN jako istotnego wskaźnika ChP. Jednak badania te jednoznacznie wykazały obecność ASN w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co sugeruje udział tej puli ASN w procesie neurodegeneracji i daje nowe spojrzenie na etiologię i rozwój synukleinopatii.

Trwają intensywne badania mające prowadzić do odkrycia i opisanie mechanizmu uwalniania ASN do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Sekrecja tego białka nie zależy prawdopodobnie od jego poziomu wewnątrzkomórkowego, co wykazały badania z użyciem linii komórkowych transfekowanych ASN [24,54,95]. Uwalnianie ASN nie jest również wywołane rozpadem obumierających komórek, gdyż jednocześnie nie zauważono w płynie zewnątrzkomórkowym obecności innych małych białek cytosolowych [54]. Badania własne wykazały, że ASN jest uwalniana z zakończeń synaptycznych pod wpływem stresu oksydacyjnego wywołanego nitroprusydkiem sodu, nadtlaniem wodoru, czy jonami żelaza II [2]. Uwalnianie ASN z komórek jest zahamowane w niskiej temperaturze, co pozwala przypuszczać, że to proces egzocytozy pęcherzykowej może być głównym mechanizmem jej sekrecji [54]. Skoro ASN prawidłowo występuje przede wszystkim w cytoplazmie, musi istnieć mechanizm translokacji tego białka do pęcherzyków wydzielniczych. Niewielką ilość ASN wyizolowano z wnętrza pęcherzyków uzyskanych z homogenatu mózgu szczura, neuronów z hodowli pierwotnej, czy ludzkich komórek neuroblastoma [54]. Wiadomo, że ASN ma zdolność wiązania się do fosfolipidów błonowych, a interakcja ta jest niezwykle dynamiczna

w żywej komórce [29, 48]. Jest więc bardzo prawdopodobne, że w procesie izolacji pęcherzyków związana z nimi ASN zostaje odłączona. Pozwala to przypuszczać, że białko ASN wyizolowane z pęcherzyków w znaczącym stopniu stanowi pulę wewnątrzpęcherzykową. Przypuszczenia te dodatkowo potwierdzają badania w mikroskopie elektronowym, w których dodatkowo udowodniono, że pęcherzyki zawierające ASN wykazują morfologię i właściwości zbliżone do pęcherzyków wydzielniczych [54]. ASN nie ma sekwencji sygnalizacyjnej białka wydzielniczego, która umożliwia kierowanie peptydów do wnętrza siateczki śródplazmatycznej (ER) [54]. Sugeruje to, że mechanizm sekrecji ASN nie zależy od konwencjonalnej drogi ER - aparat Golgiego - pęcherzyki wydzielnicze (ryc. 2).



Ryc. 2. Mechanizmy uwalniania ASN do przestrzeni zewnątrzkomórkowej oraz jej wpływ na zaburzenie funkcji synaps. Oligomery ASN mogą być wydzielane do przestrzeni pozakomórkowej za pośrednictwem pęcherzyków egzocytarnych. ASN uwalniana do przestrzeni pozakomórkowej zaburza aktywność transportera dopaminy (DAT) i funkcję receptora glutaminergicznego NMDA oraz homeostazę jonów wapnia, co zwiększa wytwarzanie NO. Ponadto bezpośrednio po translokacji do komórek biorcy, ASN może wywoływać zaburzenia funkcji mitochondriów i zwiększone uwalnianie wolnych rodników. Jednoczesne wytwarzanie NO i RFT może prowadzić do powstawania nadtlenuozotynu (ONOO⁻), który powoduje zmiany oksydacyjne makromolekuł. Zaburzenia mitochondriów spowodowane ASN prowadzą do aktywacji kaspazy 3, która z kolei degradowuje poli (ADP-ryboze) (PARP)-enzym, który wpływa na procesy naprawy DNA oraz apoptozy. Wszystkie te zdarzenia wywołane działaniem uwolnionej ASN prowadzą do selektywnej śmierci neuronów

W ostatnich latach wykazano, że wiele białek cytosolowych, podobnie jak ASN, jest wydzielanych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej w wyniku nieznanego dokładnie mechanizmu. Należą do nich cytokiny, czynniki wzrostu, białka szoku cieplnego, składniki cytoszkieletu [28,75]. Droga wydzielania tych peptydów nie jest do końca poznana, sugeruje się, że mechanizm ich uwalniania jest bardzo złożony, ale z pewnością obejmuje wydzielanie pęcherzykowe [75]. Istnieje przypuszczenie, że proces egzocytozy pęcherzykowej jest jednym ze sposobów na pozbycie się z wnętrza komórki białek uszkodzonych [54]. Wykazano, że zagregowane postaci ASN mogą być uwalniane z komórki w sposób zależny od egzocytozy, a sekrecja monomerycznej i zagregowanej ASN zwiększa się w wyniku działania czynników prowadzących do uszkodzenia i akumulacji białek [54]. Możliwe jest również, że za zewnątrzkomórkowe uwalnianie ASN mogą być odpowiedzialne inne mechanizmy, np. modyfikacje potranslacyjne tego białka. Podatność na agregację pęcherzykowej ASN może być spowodowana nie tylko zaburzeniem konformacji tego białka, ale również swoistym mikrośrodowiskiem panującym wewnątrz pęcherzyków. Wysokie stężenie jonów wapnia [61], niskie pH [38] oraz obecność glikozaminoglikanów, takich jak heparyna [17] mogą przyspieszać proces agregacji ASN.

Zewnątrzkomórkowa ASN jest usuwana z przestrzeni zewnątrzkomórkowej pod wpływem dwóch mechanizmów. Pierwszy z nich polega na proteolitycznej degradacji tego białka przez zewnątrzkomórkowe enzymy. ASN uwolniona z komórek jest cięta przez metaloproteazy występujące w macierzy zewnątrzkomórkowej [95]. Prowadzi to do powstawania krótkich peptydów, które indukują agregację i zwiększają toksyczność ASN. Drugim sposobem na usunięcie zewnątrzkomórkowej puli ASN jest jej wychwyt zwrotny. W badaniach przeprowadzonych *in vitro* udowodniono, że ASN jest pobierana zarówno przez neurony, jak i komórki mikrogleju [5,94,111]. Mechanizm tego zjawiska nie jest do końca sprecyzowany. Podczas gdy jedne badania sugerują, że wychwyt ASN zachodzi pod wpływem endocytozy zależnej od białka Rab5A [94], inne wskazują na internalizację nieendocytarną [5]. Lee i wsp. uważają, że wychwyt zwrotny zewnątrzkomórkowej ASN zależy od stopnia agregacji tego białka [55]. Oligomery i agregaty są pobierane w następstwie endocytozy, a formy monomeryczne mogą swobodnie dyfundować do komórki przez błonę komórkową.

MECHANIZMY TOKSYCZNOŚCI EGZOGENNEJ A-SYNUKLEINY

Zarówno zewnątrzkomórkowa ASN, jak i jej centralny hydrofobowy fragment NAC, wykazują działanie cytotoksyczne w badaniach *in vitro* [6,9,22,87,94]. Mechanizm działania tych peptydów nie został w pełni wyjaśniony. Stwierdzono, że egzogenna ASN hamuje aktywność transportera dopaminy [3], zaburza homeostazę wapniową oraz moduluje aktywność syntazy tlenku azotu (NOS) [1,3]. Badania przeprowadzone na syntetycznych błonach fosfolipidowych wykazały, że oligomery zewnątrzkomórkowej ASN układają się w kształt walca [99], a po połącze-

niu z błoną, tworzą struktury podobne do porów, które mogą być przepuszczalne dla jonów i mniejszych cząsteczek [45,100] (ryc. 2).

Udział egzogennej ASN w aktywacji kanałów wapniowych

Wyniki badań własnych oraz dane wskazujące na obecność ASN w przestrzeni zewnątrzkomórkowej i jej znaczenie w procesie neurodegeneracji wpłynęły na podjęcie badań mających na celu wyjaśnienie udziału zewnątrzkomórkowej ASN w formie monomeryczno-oligomerycznej w funkcji zakończeń synaptycznych. Obumieranie neuronów może się rozpocząć od degeneracji synaps w procesie zwanym „synaptozą”. Jednym z czynników zaangażowanych w proces neurodegeneracji jest zaburzenie homeostazy wapniowej [43,89,106]. Nieprawidłowa gospodarka wapniowa związana jest z dysfunkcją mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej, uszkodzeniem układów buforujących, ekscytotoksycznością glutaminianu oraz nieprawidłowym działaniem kanałów wapniowych. A β , który podobnie jak ASN należy do rodziny białek amyloidogennych, stymuluje napływ wapnia do wnętrza komórek przez kanały wapniowe zależne od potencjału (voltage-operated calcium channels - VOCC) [37,62,85,98]. Badania Adamczyk i Strosznajder wykazały, że ASN oraz jej centralny fragment, peptyd NAC, stymulują napływ wapnia [⁴⁵Ca²⁺ do synaptoneurosomów [4]. Natomiast β -synukleina (BSN) niezawierająca w swojej strukturze fragmentu NAC nie powoduje zmian w napływie [⁴⁵Ca²⁺, co wskazuje, że jest to swoiste jedynie dla ASN. Użycie swoistych blokerów kanałów wapniowych zależnych od potencjału typu N wskazuje, że w głównej mierze dochodzi do aktywacji napływu [⁴⁵Ca²⁺ przez kanał N [4]. Podobny efekt stymulujący wykazywały również peptydy A β , jednak rozbieżne są dane dotyczące typu kanału modulowanego przez ten peptyd. Istnieją dane wskazujące na aktywację kanałów VOCC zarówno typu L, jak i N przez A β [37,62,98]. Sugeruje się udział reaktywnych form tlenu oraz azotu w modulacji VOCC [98]. Badania Adamczyk i Strosznajder wykluczyły jednak udział NO oraz innych wolnych rodników w aktywacji VOCC wywołanej działaniem ASN [4]. Sugeruje się natomiast bezpośrednią interakcję ASN z białkiem kanału i jego modyfikację. Podobnie jak ASN, peptyd NAC również aktywuje napływ wapnia przez VOCC, co w połączeniu z danymi literaturowymi wskazuje, że interakcja białko-białko między domeną NAC synukleiny, a białkiem kanału może mieć istotne znaczenie w modulacji VOCC typu N.

Znaczenie ASN w modulacji NOS i procesów zależnych od uwalniania NO

Zwiększony napływ Ca²⁺ i aktywacja licznych enzymów może być czynnikiem inicjującym proces neurodegeneracji. Konsekwencją napływu Ca²⁺ jest m.in. aktywacja NOS. Wzrost syntezy NO prowadzi do oksydacji makrocząsteczek, nitrozytacji licznych białek i uszkodzenia mitochondriów oraz DNA. Procesy te pośredniczą w neurotoksycz-

ności peptydów Ab [47], w patomechanizmie ChP [11,103] oraz w innych chorobach neurodegeneracyjnych [7,63,104].

Badania prowadzone na skrawkach z mózgu wykazują, że zewnątrzkomórkowa ASN oraz jej fragment, peptyd NAC, stymulują zależną od receptora NMDA aktywność neuronalnej izoformy NOS [1]. Produktem reakcji katalizowanej przez NOS jest tlenek azotu (NO) wolny rodnik charakteryzujący się małą reaktywnością. Jednak jednocześnie wytwarzanie NO i anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-) w warunkach stresu oksydacyjnego prowadzi do wytworzenia nadtlenoazotynu (ONOO⁻) [51]. Badania *post mortem* mózgow osób z chorobami neurodegeneracyjnymi wykazują obecność nitrowanych białek, których powstawanie jest wynikiem działania ONOO⁻ [34]. Nasze badania wskazują, że zarówno ASN, jak i jej centralny fragment zwiększają stres oksydacyjny, co może prowadzić do powstawania ONOO⁻ [3]. Nadtlenoazotyn oraz inne reaktywne formy azotu modyfikują działanie wielu białek poprzez ich nitrację lub S-nitrozylację [16,35,73]. Ponadto udokumentowano, że zarówno NO, jak i ONOO⁻ mogą hamować aktywność poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego, zaburzając równowagę energetyczną komórki [23]. Hipotezę tę potwierdzają badania, w których egzogenna ASN powoduje zależne od NO zaburzenie funkcji mitochondriów i śmierć komórek zależną od aktywacji kaspazy 3 [46]. Wyniki te korespondują z pracą Seo i wsp., w której zasugerowano, że zewnątrzkomórkowa ASN powoduje zwiększenie ekspresji białka Bax, obniżenie poziomu Bcl-xL, zmiany w mitochondriach oraz uwolnienie cytochromu c. Konsekwencją tych zdarzeń jest uruchomienie kaskady kaspaz, co prowadzi do obumierania komórek [87]. Skoro zewnątrzkomórkowa ASN jest zdolna do przechodzenia do wnętrza komórki w nieograniczony sposób [55], to jest możliwe, że białko to działa również poprzez bezpośrednią interakcję z organellami. Dane literaturowe wskazują, że ASN może wchodzić w bezpośrednią interakcję z mitochondriami, a efekt ten wydaje się zależny od stężenia tego białka [78]. Inne badania wykazują, że zarówno rekombinowana [21], jak i zmutowana ASN może się łączyć z błonami organelli komórkowych [90], a interakcja ta wydaje się istotnym elementem toksyczności tego białka [99]. Mitochondria to również główne miejsce neurotoksycznego działania ASN w komórce [79]. Co więcej, wykazano, że ASN może być do mitochondriów transportowana [18,59]. Udowodniono, że N-końcowy 32-aminokwasowy fragment ASN zawiera sygnał lokalizacji mitochondrialnej, co umożliwia jej przedostawanie się do tych organelli, ponadto ASN zaimportowana do mitochondriów umiejscawia się w pobliżu wewnętrznej błony mitochondrialnej [20]. Interesujące dane *in vitro* [20,59] oraz badania *post mortem* na mózгах chorych na PD [20] wskazują, że postępująca akumulacja ASN w mitochondriach zaburza funkcjonowanie kompleksu I łańcucha oddechowego oraz powoduje podwyższenie stresu oksydacyjnego w całej komórce, również wewnątrz mitochondriów.

Niedawne badania wykazały, że działanie wolnych rodników, w tym NO, może prowadzić do akumulacji ASN wewnątrz jąder komórkowych [30,91]. Może to stanowić istotną przyczynę neurodegeneracji zarówno neuronów jak i oligodendrocytów, co wykazują badania *post mortem* mózgow cho-

rych na zanik wieloukładowy [58]. Wykazano, że w wyniku działania stresu oksydacyjnego dochodzi do translokacji C-końcowego, 10 kDa fragmentu ASN do jądra komórek dopaminergicznych [108]. Mechanizm przemieszczenia C-końca oraz całego białka ASN nie został jeszcze dokładnie zbadany. Wiadomo, że stres oksydacyjny powoduje zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, przez co może dochodzić do aktywacji kalpajny I i cięcia ASN [21]. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że stres oksydacyjny może również prowadzić do translokacji ASN w wyniku przerwania ciągłości błony jądrowej [86]. Ponadto po dootrzewnowym podaniu myszom herbicydu parakwatu zaobserwowano istotne zwiększenie immunoreaktywności ASN zarówno w cytosolu, jak i jądrach neuronów istoty czarnej [33]. Wykazano, że w jądrze komórkowym ASN może tworzyć swoiste kompleksy z histonami, co zwiększa jej oligomeryzację do nierozpuszczalnych fibrylii [33]. Jądrowa lokalizacja ASN jest zwiększona w przypadku mutacji A30P oraz A53T i skutkuje neurotoksycznością, przez zahamowanie acetylacji histonów [50]. Przedstawiono, że ASN umiejscowiona w jądrze ma właściwości czynnika transkrypcyjnego i powoduje obniżenie ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2 oraz zwiększenie poziomu mRNA dla kinazy syntazy glikogenu-3b (GSK-3b) [109].

Działanie ASN nie dotyczy wyłącznie komórek neuronalnych. Inny potencjalny mechanizm toksyczności zewnątrzkomórkowej ASN, a zwłaszcza jej form oligomerycznych, zakłada aktywację gleju i wywołanie odpowiedzi zapalnej. Zewnątrzkomórkowa ASN aktywuje *in vitro* komórki mikrogleju, które w odpowiedzi uwalniają wolne rodniki (ONOO⁻) oraz eikozanoidy, w tym prostaglandynę E2 [111]. Udokumentowano również, że zewnątrzkomórkowa ASN zwiększa obumieranie komórek dopaminergicznych w hodowli mieszanej neuronów/mikroglej, a pozostaje bez wpływu na przeżywalność samych neuronów [111]. Badania te wskazują, że oddziaływanie ASN z mikroglejem uaktywnia te komórki, co skutkuje neurotoksycznością. Inne badania wykazały, że ASN stymuluje uwalnianie czynników prozapalnych, takich jak ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) oraz interleukina 6 z ludzkich astrocytów i ludzkich nowotworowych komórek astrocytoma (U-373MG) [49].

Podsumowując, dotychczasowe badania wskazują, że ASN oraz jej fragment NAC stymulują aktywność nNOS poprzez mechanizm zależny od pobudzenia receptora NMDA. Syntetyzowany w nadmiarze NO w wyniku reakcji z O_2^- i utworzenia wysoce reaktywnego ONOO⁻ doprowadza do oksydacji białek, lipidów oraz DNA, a w konsekwencji do cytotoksyczności.

MECHANIZMY TOKSYCZNOŚCI ASN W KOMÓRKACH DOPAMINERGICZNYCH I JEJ ZNACZENIE W UWALNIANIU I DZIAŁANIU PEPTYDÓW AB

Badania prowadzone na linii komórek dopaminergicznych PC12 wykazały, że ASN w sposób zależny od stężenia oraz stopnia agregacji aktywuje zależną od kaspaz programowaną śmierć komórek dopaminergicznych PC12 [46]. Pula ASN uwalniana do przestrzeni zewnątrzkomórkowej prowadzi za

pośrednictwem NO do zaburzenia funkcji mitochondriów oraz aktywacji kaspaz, a w konsekwencji do śmierci komórek. Badania własne wykluczają udział ASN w śmierci komórek dopaminergicznych na szlaku zależnym od aktywacji polimerazy (poli-ADP)rybozy (PARP) i uwalniania czynnika indukującego apoptozę (AIF).

Uszkodzenie komórek następuje wyłącznie pod wpływem działania ASN monomeryczno-oligomerycznej. ASN w postaci dojrzałych agregatów nie prowadzi do cytotoksyczności. Prawdopodobnie jest to wynikiem natychmiastowej degradacji zagregowanej ASN w lizosomach. Chociaż mechanizm transportu zewnątrzkomórkowej ASN do wnętrza komórki nie jest wyjaśniony, to sugeruje się, że zewnątrzkomórkowe agregaty ASN transportowane są do wnętrza komórki w procesie endocytozy i natychmiast degradowane w lizosomach, natomiast ASN w postaci rozpuszczalnej swobodnie „dyfunduje” przez błonę białkowo-lipidową i tylko w niewielkim stopniu ulega degradacji, nagromadzona wewnątrz komórki może inicjować i propagować proces degeneracji [55,57].

Badania własne wykazały, że egzogenna ASN może wpływać na toksyczność innych białek amyloidogennych, takich jak Ab. Zmiany konformacyjne obu białek i ich toksyczność może leżeć u podstaw nieodwracalnych zmian, czemu trzeba koniecznie przeciwdziałać na możliwie najwcześniejszym etapie rozwoju choroby. Poznanie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw działania białek „toksycznych” i interakcji między nimi ma fundamentalne znaczenie nie tylko poznawcze, ale powinno się przyczynić do opracowania i udoskonalenia strategii terapeutycznej. Publikowane w ostatnich latach doniesienia wielu grup badawczych wskazują, że u ponad 60% przypadków chorych z idiopatyczną chorobą Alzheimera wykrywa się ciała Lewy’ego w różnych częściach mózgu [42,68], ponadto u pacjentów tych zaobserwowano szybszy rozwój objawów pozapiramidowych [60]. W dodatku ostatnie badania wskazują na obecność ASN w zdegenerowanych aksonach otaczających blaszki starcze w korze mózgowej u osób z ChA przy jednoczesnym braku typowych ciał Lewy’ego. Liczba danych wskazujących, że A β może być zaangażowany w procesy oligomeryzacji, akumulacji oraz toksyczności ASN rośnie [39,64]. Badania przeprowadzone *post mortem* sugerują, że istnienie patologii alzheimerowskiej potęguje objawy chorób związanych z obecnością ciał Lewy’ego

[102]. Ponadto wykazano, że zwiększona liczba ciał Lewy’ego i zdegenerowanych neurytów w korze mózgowej ściśle koreluje z obecnością złożeń A β [80]. Analiza biochemiczna mózgow pacjentów z ChA oraz demencją z ciałami Lewy’ego również wskazuje na związek między Ab i akumulacją ASN [19]. Wyniki uzyskane na linii komórek PC12 transfekowanych APP wskazują, że zewnątrzkomórkowa ASN zwiększa uwalnianie i toksyczność peptydów Ab, wywołując za pośrednictwem NO nieodwracalne zaburzenia funkcji mitochondriów i apoptozę komórek zależną od kaspaz [46]. To dodatkowo wskazuje, jak istotne może być znaczenie interakcji ASN i Ab w patologii ChA.

PODSUMOWANIE

Uwalnianie ASN do przestrzeni zewnątrzkomórkowej może się okazać głównym mechanizmem odpowiedzialnym za rozprzestrzenianie się i rozwój patologicznych zmian w mózgu. Uwalnianie ASN do przestrzeni zewnątrzkomórkowej zachodzi zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych. Egzogenna ASN może się przedostawać do różnych typów komórek i wpływać toksycznie w sposób zależny od jej stopnia agregacji, pod wpływem wielu mechanizmów. Pionierskie jeszcze badania wskazują, że ASN jest uwalniania z zakończeń synaptycznych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej pod wpływem stresu oksydacyjnego/nitrozacyjnego. Uwolniona ASN aktywuje NOS, a w wyniku nadmiernej syntezy NO, ASN wywołuje dysfunkcję układu dopaminergicznego. Zewnątrzkomórkowa pula ASN wywołuje obumieranie komórek na szlaku zależnym od pobudzenia receptora glutaminianergicznego NMDA i uwalniania NO. Syntetyzowany w nadmiarze NO uszkadza funkcję mitochondriów, aktywuje kaspazę 3, a w konsekwencji prowadzi do degradacji polimerazy poli(ADP-rybozy) i śmierci komórek. Inhibitory NOS, kaspazy 3 oraz kanałów mitochondrialnych chronią neurony dopaminergiczne przed obumieraniem wywołanym ASN. Na szczególną uwagę zasługuje oddziaływanie ASN na toksyczność peptydów amyloidu beta. Egzogenna ASN zwiększa uwalnianie oraz toksyczność Ab wywołując, za pośrednictwem NO, nieodwracalne zmiany w funkcji mitochondriów i śmierci komórek. Badania te wskazują na istotną rolę ASN w patomechanizmie choroby Alzheimera. Tym samym daje to nowe spojrzenie na mechanizm(y) współdziałania ASN i peptydów Ab oraz sugeruje wspólne bądź analogiczne mechanizmy cytotoksyczności obu peptydów, ASN i Ab.

PIŚMIENICTWO

- [1] Adamczyk A., Czapski G.A., Kaźmierczak A., Strosznajder J.B.: Effect of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists on α -synuclein-evoked neuronal nitric oxide synthase activation in the rat brain. *Pharmacol. Rep.*, 2009; 61: 1078-1085
- [2] Adamczyk A., Kacprzak M., Kaźmierczak A.: Alpha-synuclein decreases arachidonic acid incorporation into rat striatal synaptoneuroosomes. *Folia Neuropathol.*, 2007; 45: 230-235
- [3] Adamczyk A., Kaźmierczak A., Strosznajder J.B.: α -synuclein and its neurotoxic fragment inhibit dopamine uptake into rat striatal synaptosomes. Relationship to nitric oxide. *Neurochem. Int.*, 2006; 49: 407-412
- [4] Adamczyk A., Strosznajder J.B.: Alpha-synuclein potentiates Ca $^{2+}$ influx through voltage-dependent Ca $^{2+}$ channels. *Neuroreport*, 2006; 17: 1883-1886
- [5] Ahn K.J., Paik S.R., Chung K.C., Kim J.: Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of α -synuclein. *J. Neurochem.*, 2006; 97: 265-279
- [6] Albani D., Peverelli E., Rametta R., Batelli S., Veschini L., Negro A., Forloni G.: Protective effect of TAT-delivered α -synuclein: relevance of the C-terminal domain and involvement of HSP70. *FASEB J.*, 2004; 18: 1713-1715

- [7] Ali A.K., Banks W.A., Kumar V.B., Shah G.N., Lynch J.L., Farr S.A., Fleegal-DeMotta M.A., Morley J.E.: Nitric oxide activity and isoenzyme expression in the senescence-accelerated mouse p8 model of Alzheimer's disease: effects of anti-amyloid antibody and antisense treatments. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 2009; 64: 1025-1030
- [8] Baba M., Nakajo S., Tu P.H., Tomita T., Nakaya K., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Iwatsubo T.: Aggregation of α -synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol.*, 1998; 152: 879-884
- [9] Bodles A.M., Guthrie D.J., Harriott P., Campbell P., Irvine G.B.: Toxicity of non-A β component of Alzheimer's disease amyloid, and N-terminal fragments thereof, correlates to formation of β -sheet structure and fibrils. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 2186-2194
- [10] Borghi R., Marchese R., Negro A., Marinelli L., Forloni G., Zaccheo D., Abbruzzese G., Tabaton M.: Full length α -synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neurosci. Lett.*, 2000; 287: 65-67
- [11] Chalimoniuk M., Lukacova N., Marsala J., Langfort J.: Alterations of the expression and activity of midbrain nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice. *Neuroscience*, 2006, 141, 1033-1046
- [12] Chan P., Jiang X., Forno L.S., Di Monte D.A., Tanner C.M., Langston J.W.: Absence of mutations in the coding region of the alpha-synuclein gene in pathologically proven Parkinson's disease. *Neurology*, 1998; 50: 1136-1137
- [13] Chan P., Tanner C.M., Jiang X., Langston J.W.: Failure to find the alpha-synuclein gene missense mutation (G209A) in 100 patients with younger onset Parkinson's disease. *Neurology*, 1998; 50: 513-514
- [14] Chartier-Harlin M.C., Kachergus J., Roumier C., Mouroux V., Douay X., Lincoln S., Leveque C., Larvor L., Andrieux J., Hulihan M., Waucquier N., Defebvre L., Amouyel P., Farrer M., Destée A.: α -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*, 2004; 364: 1167-1169
- [15] Chiba-Falek O., Touchman J.W., Nussbaum R.L.: Functional analysis of intra-allelic variation at NACP-Rep1 in the alpha-synuclein gene. *Hum. Genet.*, 2003; 113: 426-431
- [16] Cho D.H., Nakamura T., Fang J., Cieplak P., Godzik A., Gu Z., Lipton S.A.: S-nitrosylation of Drp1 mediates β -amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science*, 2009; 324: 102-105
- [17] Cohlberg J.A., Li J., Uversky V.N., Fink A.L.: Heparin and other glycosaminoglycans stimulate the formation of amyloid fibrils from α -synuclein in vitro. *Biochemistry*, 2002; 41: 1502-1511
- [18] Cole N.B., Dieuiliis D., Leo P., Mitchell D.C., Nussbaum R.L.: Mitochondrial translocation of α -synuclein is promoted by intracellular acidification. *Exp. Cell. Res.*, 2008; 314: 2076-2089
- [19] Deramecourt V., Bombois S., Maurage C.A., Ghestem A., Drobecq H., Vanmechelen E., Lebert F., Pasquier F., Delacourte A.: Biochemical staging of synucleinopathy and amyloid deposition in dementia with Lewy bodies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2006; 65: 278-288
- [20] Devi L., Raghavendran V., Prabhu B.M., Avadhani N.G., Anandatheerthavarada H.K.: Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 9089-9100
- [21] Ding T.T., Lee S.J., Rochet J.C., Lansbury P.T. Jr: Annular α -synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes. *Biochemistry*, 2002; 41: 10209-10217
- [22] Du H.N., Tang L., Luo X.Y., Li H.T., Hu J., Zhou J.W., Hu H.Y.: A peptide motif consisting of glycine, alanine, and valine is required for the fibrillization and cytotoxicity of human α -synuclein. *Biochemistry*, 2003; 42: 8870-8878
- [23] Ebadi M., Sharma S.K.: Peroxynitrite and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Antioxid. Redox. Signal.*, 2003; 5: 319-335
- [24] El-Agnaf O.M., Salem S.A., Paleologou K.E., Cooper L.J., Fullwood N.J., Gibson M.J., Curran M.D., Court J.A., Mann D.M., Ikeda S., Cookson M.R., Hardy J., Allsop D.: α -synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J.*, 2003; 17: 1945-1947
- [25] El-Agnaf O.M., Salem S.A., Paleologou K.E., Curran M.D., Gibson M.J., Court J.A., Schlossmacher M.G., Allsop D.: Detection of oligomeric forms of α -synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J.*, 2006; 20: 419-425
- [26] Farrer M., Kachergus J., Forno L., Lincoln S., Wang D.S., Hulihan M., Maraganore D., Gwinn-Hardy K., Wszolek Z., Dickson D., Langston J.W.: Comparison of kindreds with parkinsonism and α -synuclein genomic duplications. *Ann. Neurol.*, 2004; 55: 174-179
- [27] Farrer M., Maraganore D.M., Lockhart P., Singleton A., Lesnick T.G., de Andrade M., West A., de Silva R., Hardy J., Hernandez D.: α -synuclein gene haplotypes are associated with Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.*, 2001; 10: 1847-1851
- [28] Février B., Raposo G.: Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2004; 16: 415-421
- [29] Fortin D.L., Nemani V.M., Voglmaier S.M., Anthony M.D., Ryan T.A., Edwards R.H.: Neural activity controls the synaptic accumulation of α -synuclein. *J. Neurosci.*, 2005; 25: 10913-10921
- [30] Gentile A., Amadoro G., Corsetti V., Ciotti M.T., Serafino A., Calissano P.: Spontaneous aggregation and altered intracellular distribution of endogenous α -synuclein during neuronal apoptosis. *J. Alzheimers. Dis.*, 2008; 13: 151-160
- [31] Giasson B.I., Duda J.E., Murray I.V.: Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective α -synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*, 2000; 290: 985-989
- [32] Gibb W.R., Scaravilli F., Michund J.: Lewy bodies and subacute sclerosing panencephalitis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1990; 53: 710-711
- [33] Goers J., Manning-Bog A.B., McCormack A.L., Millett I.S., Doniach S., Di Monte D.A., Uversky V.N., Fink A.L.: Nuclear localization of α -synuclein and its interaction with histones. *Biochemistry*, 2003; 42: 8465-8471
- [34] Good P.F., Hsu A., Werner P., Perl D.P., Olanow C.W.: Protein nitration in Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1998; 57: 338-342
- [35] Gu Z., Kaul M., Yan B., Kridel S.J., Cui J., Strongin A., Smith J.W., Liddington R.C., Lipton S.A.: S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science*, 2002; 297: 1186-1190
- [36] Hayashi S., Akasaki Y., Morimura Y.: An autopsy case of late infantile and juvenile neuroaxonal dystrophy with diffuse Lewy bodies and neurofibrillary tangles. *Clin. Neuropathol.*, 1992; 11: 1-5
- [37] Ho R., Ortiz D., Shea T.B.: Amyloid- β promotes calcium influx and neurodegeneration via stimulation of L voltage-sensitive calcium channels rather than NMDA channels in cultured neurons. *J. Alzheimers Dis.*, 2001; 3: 479-483
- [38] Hoyer W., Antony T., Cherny D., Heim G., Jovin T.M., Subramaniam V.: Dependence of α -synuclein aggregate morphology on solution conditions. *J. Mol. Biol.*, 2002; 322: 383-393
- [39] Hunya A., Földi I., Szegedi V., Soós K., Zarándi M., Szabó A., Zádori D., Penke B., Datki Z.L.: Differences between normal and alpha-synuclein overexpressing SH-SY5Y neuroblastoma cells after Abeta(1-42) and NAC treatment. *Brain. Res. Bull.*, 2008; 75: 648-654
- [40] Ibáñez P., Bonnet A.M., Débarges B., Lohmann E., Tison F., Polak P., Agid Y., Dürr A., Brice A.: Causal relation between alpha-sy-

nuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet*, 2004; 364: 1169-1171

- [41] Ikeuchi T., Kakita A., Shiga A., Kasuga K., Kaneko H., Tan C.F., Idezuka J., Wakabayashi K., Onodera O., Iwatsubo T., Nishizawa M., Takahashi H., Ishikawa A.: Patients homozygous and heterozygous for SNCA duplication in a family with parkinsonism and dementia. *Arch. Neurol.*, 2008; 65: 514-519
- [42] Jellinger K.A.: Lewy body-related α -synucleinopathy in the aged human brain. *J. Neural. Transm.*, 2004; 111: 1219-1235
- [43] Kawahara M., Negishi-Kato M., Sadakane Y.: Calcium dyshomeostasis and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid protein. *Expert. Rev. Neurother.*, 2009; 9: 681-693
- [44] Kay D.M., Factor S.A., Samii A., Higgins D.S., Griffith A., Roberts J.W., Leis B.C., Nutt J.G., Montimurro J.S., Keefe R.G., Atkins A.J., Yearout D., Zabetian C.P., Payami H.: Genetic association between α -synuclein and idiopathic Parkinson's disease. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.*, 2008; 147B: 1222-1230
- [45] Kaye R., Sokolov Y., Edmonds B., McIntire T.M., Milton S.C., Hall J.E., Glabe C.G.: Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 46363-46366
- [46] Kaźmierczak A., Strosznajder J.B., Adamczyk A.: α -synuclein enhances secretion and toxicity of amyloid beta peptides in PC12 cells. *Neurochem. Int.*, 2008; 53: 263-269
- [47] Keil U., Bonert A., Marques C.A., Scherping I., Weyermann J., Strosznajder J.B., Müller-Spahn F., Haass C., Czech C., Pradier L., Müller W.E., Eckert A.: Amyloid β -induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 50310-50320
- [48] Kim Y.S., Laurine E., Woods W., Lee S.J.: A novel mechanism of interaction between alpha-synuclein and biological membranes. *J. Mol. Biol.*, 2006; 360: 386-397
- [49] Klegeris A., Giasson B.I., Zhang H., Maguire J., Pelech S., McGeer P.L.: Alpha-synuclein and its disease-causing mutants induce ICAM-1 and IL-6 in human astrocytes and astrocytoma cells. *FASEB J.*, 2006; 20: 2000-2008
- [50] Kontopoulos E., Parvin J.D., Feany M.B.: α -synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Hum. Mol. Genet.*, 2006; 15: 3012-3023
- [51] Koppenol W.H., Moreno J.J., Pryor W.A., Ischiropoulos H., Beckman J.S.: Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol.*, 1992; 5: 834-842
- [52] Krüger R., Kuhn W., Müller T., Woitalla D., Graeber M., Kösel S., Przuntek H., Epplen J.T., Schöls L., Riess O.: Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.*, 1998; 18: 106-108
- [53] Lashuel H.A., Petre B.M., Wall J., Simon M., Nowak R.J., Walz T., Lansbury P.T.Jr.: α -synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J. Mol. Biol.*, 2002; 322: 1089-1102
- [54] Lee H.J., Patel S., Lee S.J.: Intravesicular localization and exocytosis of α -synuclein and its aggregates. *J. Neurosci.*, 2005; 25: 6016-6024
- [55] Lee H.J., Suk J.E., Bae E.J., Lee J.H., Paik S.R., Lee S.J.: Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular α -synuclein. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 2008; 40: 1835-1849
- [56] Lee P.H., Lee G., Park H.J., Bang O.Y., Joo I.S., Huh K.: The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J. Neural. Transm.*, 2006; 113: 1435-1439
- [57] Lee S.J.: Origins and effects of extracellular α -synuclein: implications in Parkinson's disease. *J. Mol. Neurosci.*, 2008; 34: 17-22
- [58] Lin W.L., DeLucia M.W., Dickson D.W.: α -synuclein immunoreactivity in neuronal nuclear inclusions and neurites in multiple system atrophy. *Neurosci. Lett.*, 2004; 354: 99-102
- [59] Liu G., Zhang C., Yin J., Li X., Cheng F., Li Y., Yang H., Uéda K., Chan P., Yu S.: α -synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neurosci. Lett.*, 2009; 454: 187-192
- [60] Lopez O.L., Wisniewski S., Hamilton R.L., Becker J.T., Kaufer D.I., DeKosky S.T.: Predictors of progression in patients with AD and Lewy bodies. *Neurology*, 2000; 54: 1774-1779
- [61] Lowe R., Pountney D.L., Jensen P.H., Gai W.P., Voelcker N.H.: Calcium(II) selectively induces α -synuclein annular oligomers via interaction with the C-terminal domain. *Protein Sci.*, 2004; 13: 3245-3252
- [62] MacManus A., Ramsden M., Murray M., Henderson Z., Pearson H.A., Campbell V.A.: Enhancement of [45]Ca²⁺ influx and voltage-dependent Ca²⁺ channel activity by β -amyloid-(1-40) in rat cortical synaptosomes and cultured cortical neurons. Modulation by the proinflammatory cytokine interleukin-1 β . *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 4713-4718
- [63] Malinski T.: Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 2007; 11: 207-218
- [64] Masliah E., Rockenstein E., Veinbergs I., Sagara Y., Malloiry M., Hashimoto M., Mucke L.: β -Amyloid peptides enhance α -synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 1998: 12245-12250
- [65] Mellick G.D., Maraganore D.M., Silburn P.A.: Australian data and meta-analysis lend support for alpha-synuclein (NACP-Rep1) as a risk factor for Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, 2005; 375:112-116
- [66] Mezey E., Dehejia A., Harta G., Papp M.I., Polymeropoulos M.H., Brownstein M.J.: Alpha synuclein in neurodegenerative disorders: murderer or accomplice? *Nat. Med.*, 1998; 4: 755-757
- [67] Mezey E., Dehejia A.M., Harta G., Tresser N., Suchy S.F., Nussbaum R.L., Brownstein M.J., Polymeropoulos M.H.: Alpha synuclein is present in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease. *Mol. Psychiatry*, 1998; 3: 493-499
- [68] Mikolaenko I., Pletnikova O., Kawas C.H., O'Brien R., Resnick S.M., Crain B., Troncoso J.C.: Alpha-synuclein lesions in normal aging, Parkinson disease, and Alzheimer disease: evidence from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2005; 64: 156-162
- [69] Miller D.W., Hague S.M., Clarimon J., Baptista M., Gwinn-Hardy K., Cookson M.R., Singleton A.: α -synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology*, 2004; 62: 1835-1838
- [70] Mizuta I., Satake W., Nakabayashi Y., Ito C., Suzuki S., Momose Y., Nagai Y., Oka A., Inoko H., Fukae J., Saito Y., Sawabe M., Murayama S., Yamamoto M., Hattori N., Murata M., Toda T.: Multiple candidate gene analysis identifies α -synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.*, 2006; 15: 1151-1158
- [71] Mueller J.C., Fuchs J., Hofer A., Zimprich A., Lichtner P., Illig T., Berg D., Wüllner U., Meitinger T., Gasser T.: Multiple regions of α -synuclein are associated with Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 2005; 57: 535-341
- [72] Muentert M.D., Forno L.S., Hornykiewicz O., Kish S.J., Maraganore D.M., Caselli R.J., Okazaki H., Howard F.M. Jr, Snow B.J., Calne D.B.: Hereditary form of parkinsonism - dementia. *Ann. Neurol.*, 1998; 3: 768-781
- [73] Nakamura T., Lipton S.A.: Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Apoptosis*, 2009; 14: 455-468
- [74] Neumann M., Adler S., Schluter O., Kremmer E., Benecke R., Kretschmar H.A.: Alpha-synuclein accumulation in a case of neurodegeneration with brain iron accumulation type I (NBIA-1, for-

merly Hallervorden-Spatz syndrome) with widespread cortical and brainstem-type Lewy bodies. *Acta Neuropathol.*, 2000; 100: 568-574

[75] Nickel W.: The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur. J. Biochem.*, 2003; 270: 2109-2119

[76] Outeiro T.F., Putcha P., Tetzlaff J.E., Spoelgen R., Koker M., Carvalho F., Hyman B.T., McLean P.J.: Formation of toxic oligomeric α -synuclein species in living cells. *PLoS One*, 2008; 3: e1867

[77] Paleologou K.E., Kragh C.L., Mann D.M., Salem S.A., Al-Shami R., Allsop D., Hassan A.H., Jensen P.H., El-Agnaf O.M.: Detection of elevated levels of soluble α -synuclein oligomers in post-mortem brain extracts from patients with dementia with Lewy bodies. *Brain*, 2009; 132: 1093-1101

[78] Parihar M.S., Parihar A., Fujita M., Hashimoto M., Ghafourifar P.: Alpha-synuclein overexpression and aggregation exacerbates impairment of mitochondrial functions by augmenting oxidative stress in human neuroblastoma cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 2009; 41: 2015-2024

[79] Perier C., Bové J., Wu D.C., Dehay B., Choi D.K., Jackson-Lewis V., Rathke-Hartlieb S., Bouillet P., Strasser A., Schulz J.B., Przedborski S., Vila M.: Two molecular pathways initiate mitochondria-dependent dopaminergic neurodegeneration in experimental Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 8161-8166

[80] Pletnikova O., West N., Lee M.K., Rudow G.L., Skolasky R.L., Dawson T.M., Marsh L., Troncoso J.C.: A β deposition is associated with enhanced cortical α -synuclein lesions in Lewy body diseases. *Neurobiol. Aging*, 2005; 26: 1183-1192

[81] Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W.G., Lazzarini A.M., Duvoisin R.C., Di Iorio G., Golbe L.I., Nussbaum R.L.: Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 1997; 276: 2045-2047

[82] Pountney D.L., Voelcker N.H., Gai W.P.: Annular alpha-synuclein oligomers are potentially toxic agents in alpha-synucleinopathy. *Hypothesis Neurotox. Res.*, 2005; 7: 59-67

[83] Raghavan R., Khin-Nu C., Brown A.: Detection of Lewy bodies in trisomy 21 (Down's syndrome). *Can. J. Neurol. Sci.*, 1993; 20: 48-51

[84] Ross O.A., Braithwaite A.T., Skipper L.M., Kachergus J., Hulihan M.M., Middleton F.A., Nishioka K., Fuchs J., Gasser T., Maraganore D.M., Adler C.H., Larvor L., Chartier-Harlin M.C., Nilsson C., Langston J.W., Gwinn K., Hattori N., Farrer M.J.: Genomic investigation of α -synuclein multiplication and parkinsonism. *Ann. Neurol.*, 2008; 63: 743-750

[85] Samochocki M., Lalowski M., Strosznajder J.B.: Amyloid β 25-35 peptide enhances Ca²⁺ influx into cerebrocortical synaptoneurosome exclusively through L-type channel. *Neurobiol. Aging*, 1998; 19: S48

[86] Sangchot P., Sharma S., Chetsawang B., Porter J., Govitrapong P., Ebadi M.: Deferoxamine attenuates iron-induced oxidative stress and prevents mitochondrial aggregation and α -synuclein translocation in SK-N-SH cells in culture. *Dev. Neurosci.*, 2002; 24: 143-153

[87] Seo J.H., Rah J.C., Choi S.H., Shin J.K., Min K., Kim H.S., Park C.H., Kim S., Kim E.M., Lee S.H., Lee S., Suh S.W., Suh Y.H.: Alpha-synuclein regulates neuronal survival via Bcl-2 family expression and PI3/Akt kinase pathway. *FASEB J.*, 2002; 16: 1826-1828

[88] Singleton A.B., Farrer M., Johnson J., Singleton A., Hague S., Kachergus J., Hulihan M., Peuralinna T., Dutra A., Nussbaum R., Lincoln S., Crawley A., Hanson M., Maraganore D., Adler C. et al.: α -synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, 2003; 302: 841

[89] Small D.H., Gasperini R., Vincent A.J., Hung A.C., Foa L.: The role of A β -induced calcium dysregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 2009; 16: 225-233

[90] Smith W.W., Jiang H., Pei Z., Tanaka Y., Morita H., Sawa A., Dawson V.L., Dawson T.M., Ross C.A.: Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Hum. Mol. Genet.*, 2005; 14: 3801-3811

[91] Specht C.G., Tigaret C.M., Rast G.F., Thalhammer A., Rudhard Y., Schoepfer R.: Subcellular localisation of recombinant α - and γ -synuclein. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2005; 28: 326-334

[92] Spillantini M.G., Crowther R.A., Jakes R.: α -synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 6469-6473

[93] Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M.: α -synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 1997; 388: 839-840

[94] Sung J.Y., Kim J., Paik S.R., Park J.H., Ahn Y.S., Chung K.C.: Induction of neuronal cell death by Rab5A-dependent endocytosis of α -synuclein. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 27441-27448

[95] Sung J.Y., Park S.M., Lee C.H., Um J.W., Lee H.J., Kim J., Oh Y.J., Lee S.T., Paik S.R., Chung K.C.: Proteolytic cleavage of extracellular secreted α -synuclein via matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 25216-25224

[96] Tokuda T., Salem S.A., Allsop D., Mizuno T., Nakagawa M., Qureshi M.M., Locascio J.J., Schlossmacher M.G., El-Agnaf O.M.: Decreased α -synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 349: 162-166

[97] Trojanowski J.Q., Lee V.M.: Aggregation of neurofilament and α -synuclein proteins in Lewy bodies: implications for the pathogenesis of Parkinson disease and Lewy body dementia. *Arch. Neurol.*, 1998; 55: 151-152

[98] Ueda K., Shinohara S., Yagami T., Asakura K., Kawasaki K.: Amyloid β protein potentiates Ca²⁺ influx through L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels: a possible involvement of free radicals. *J. Neurochem.*, 1997; 68: 265-271

[99] Volles M.J., Lansbury P.T. Jr: Relationships between the sequence of α -synuclein and its membrane affinity, fibrillization propensity, and yeast toxicity. *J. Mol. Biol.*, 2007; 66: 1510-1522

[100] Volles M.J., Lee S.J., Rochet J.C., Shtilerman M.D., Ding T.T., Kesler J.C., Lansbury P.T. Jr: Vesicle permeabilization by protofibrillar α -synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry*, 2001; 40: 7812-7819

[101] Wakabayashi K., Matsumoto K., Takayama K., Yoshimoto M., Takahashi H.: NACP, a presynaptic protein, immunoreactivity in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, 1997; 239: 45-48

[102] Wakisaka Y., Furuta A., Tanizaki Y., Kiyohara Y., Iida M., Iwaki T.: Age associated prevalence and risk factors of Lewy body pathology in a general population: the Hisayama study. *Acta Neuropathol.*, 2003; 106: 374-382

[103] Watanabe Y., Kato H., Araki T.: Protective action of neuronal nitric oxide synthase inhibitor in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Metab. Brain Dis.*, 2008; 23: 51-69

[104] Westermann B.: Nitric oxide links mitochondrial fission to Alzheimer's disease. *Sci. Signal.*, 2009; 2: pe29

[105] Winner B., Jappelli R., Maji S.K., Desplats P.A., Boyer L., Aigner S., Hetzer C., Loher T., Vilar M., Campioni S., Tzitzilonis C., Soragni A., Jessberger S., Mira H., Consiglio A., Pham E., Masliah E., Gage F.H., Riek R.: In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 4194-4199

[106] Wojda U., Salinska E., Kuźnicki J.: Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life*, 2008; 60: 575-590

[107] Xia Y., Rohan de Silva H.A., Rosi B.L., Yamaoka L.H., Rimmler J.B., Pericak-Vance M.A., Roses A.D., Chen X., Masliah E., DeTeresa R., Iwai A., Sundsmo M., Thomas R.G., Hofstetter C.R., Gregory E., Hansen L.A., Katzman R., Thal L.J., Saitoh T.: Genetic studies in Al-

zheimer's disease with an NACP/alpha-synuclein polymorphism. *Ann. Neurol.*, 1996; 40: 207-215

[108] Xu S., Zhou M., Yu S., Cai Y., Zhang A., Ueda K., Chan P.: Oxidative stress induces nuclear translocation of C-terminus of α -synuclein in dopaminergic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 342: 330-335

[109] Yuan Y., Jin J., Yang B., Zhang W., Hu J., Zhang Y., Chen N.H.: Overexpressed alpha-synuclein regulated the nuclear factor-kappaB signal pathway. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2008; 28: 21-33

[110] Zarranz J.J., Alegre J., Gómez-Esteban J.C., Lezcano E., Ros R., Ampuero I., Vidal L., Hoenicka J., Rodriguez O., Atarés B., Llorens V., Gomez Tortosa E., del Ser T., Muñoz D.G., de Yebenes J.G.: The new mutation, E46K, of α -synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.*, 2004; 55: 164-173

[111] Zhang W., Wang T., Pei Z., Miller D.S., Wu X., Block M.L., Wilson B., Zhang W., Zhou Y., Hong J.S., Zhang J.: Aggregated α -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J.*, 2005; 19: 533-542

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.