

Received: 2015.09.09
Accepted: 2016.07.10
Published: 2016.07.07

Choroba Alzheimer'a a produkty degradacji białka APP. Formowanie i różnorodność form fibrylujących peptydów – wybrane aspekty*

Alzheimer's disease against peptides products of enzymatic cleavage of APP protein. Forming and variety of fibrillating peptides – some aspects

Małgorzata Marszałek

Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Peptydowe produkty degradacji białka APP (Amyloid Precursor Protein, APP), to najważniejsze białka w patofizjologii choroby Alzheimer'a (Alzheimer's disease, AD). Choć dobrze już poznane, jednak nadal budzą zainteresowanie i są przedmiotem intensywnych i wszechstronnych badań. Podobnie samo białko APP, a zwłaszcza jego funkcje, nadal pozostają enigmatyczne, co oddaje jego druga nazwa „the All Purpose Protein”, tj. białko do wszystkich celów. W pracy przedstawiono problematykę peptydowych produktów trawienia białka APP, formowanych na szlaku amyloidogennym i antyamyloidogennym (nieamyloidogennym), tj. – jak dotąd – rozpoznawane peptydy, w tym typu A β , a także produkty nowych, alternatywnych wobec klasycznych szlaków trawiennych APP: peptydy N-APP, N-terminalne, krótkie, tzw. okaleczone, ułomne (truncated) fragmenty A β ', czy produkty szlaku niezależnego od γ -sekreazy, gdzie trawienie odbywa się wyłącznie dzięki kombinowanemu współdziałaniu α - i β -sekreazy, a także produkty trawienia z zaangażowaniem kaspaz. Wszystkie wymienione peptydy są obecne w CSF, ISF w surowicy krwi i w moczu chorych na AD, co ma ogromne znaczenie diagnostyczne. Produkty trawienia domeny A β_T (A β total), tj. sekwencji aminokwasowej całkowitego fibrylującego fragmentu białka APP, a zwłaszcza nowo odkrywane liczne, amyloidogenne postaci, ze względu na biologię i naturę fizykochemiczną, są w centrum podstawowych badań eksperymentalnych. Peptydy te są także przedmiotem badań diagnostycznych, gdyż budzą nadzieję na stworzenie lepszych metod ich detekcji, a być może i metod terapeutycznych AD.

Słowa kluczowe:

choroba Alzheimer'a • białko prekursorowe amyloidu • APP • peptyd A β • proces fibrylacji • amyloid

Summary

Various and different peptides products resulting from enzymatic protein cleavage of Amyloid Precursor Proteins (APP) are the main agents in the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD). Although relatively well-known, they still arouse interest leading to further intense and wide-ranging research. Their biology and physico-chemical properties still are challenging for basic, experimental research and are matter of scientific debate. The APP itself and its functions are still somewhat enigmatic and therefore it is also called the All Purpose Protein. Apart from well known amyloidogenic and antiamyloidogenic (non-amyloidogenic) enzymatic cleavage pathways of APP protein this paper deals with issues connected with other, alternative pathways that seem to be interesting and important as well.

*Praca finansowana przez Fundację Alzheimerowską we Wrocławiu.

They lead to other than A β forms of peptide products such as: N-APP, N-terminally cleavage products of APP (N-terminally truncated) A β ', γ -secretase-independent pathway products that involve concerted cleavages of APP by α - and β -secretase or products that emerge after caspase activity. Presence of all these peptides in CSF, ISF, blood serum and urine of the AD patients is crucial for successful diagnosis, giving rise to hope of their better detection and potentially better treatment of AD. Therefore, newly discovered products of the A β T domain cleavage (A β total i.e. full fibrillating domain of APP), A β type products and other peptides because of their biology and physico-chemical properties are very intriguing and deserve further experimental research. On the other hand after better recognition and better understanding their biology they might be enormously useful in the future for diagnosis and therapy for example Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease • Amyloid Precursor Protein • APP • A β peptide • fibrillation process • amyloid

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1209210>

Word count: 4797
Tables: –
Figures: –
References: 57

Adres autorki: dr Małgorzata Marszałek Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 143, Łódź; e-mail: mtmarsz@wp.pl

Wykaz skrótów: **A β** – peptydy typu A-beta, **A β _T** – sekwencja aminokwasowa całkowitego fibrylującego fragmentu białka APP (A β total), **A β 42** – 42-aminokwasowy peptyd typu A-beta, **A β 40** – 40-aminokwasowy peptyd typu A-beta, **ACTF** – pozamembranowy peptyd APP, **AD** – choroba Alzheimera, **ADAM** – metaloproteiny cynkowe, **ADDLs** – oligomery peptydu A β , **AICD** – cytoplazmatyczny, wewnątrzkomórkowy odcinek białka APP, **APLP1 i APLP2** – białka podobne do białka APP, **APPL i APL-1** – homologi białka APP, **APP** – białko prekursorowe amyloidu, **sAPP α** i **sAPP β** – rozpuszczalne N-końcowe produkty trawienia białka APP, **CSF** – płyn mózgowo-rdzeniowy, **CTFs** – C-końcowe fragmenty białka APP, **C83** – 83-aminokwasowy peptyd α CTF, **C99** – 99-aminokwasowy peptyd α CTF, **ISF** – płyn śródmiąższowy, **NAPP** – N-końcowe produkty trawienia białka APP, **NEP** – neprylizyna, **NTFs** – N-końcowe fragmenty APP, **PS** – preseniliny

WSTĘP

W patofizjologii choroby Alzheimera podstawowe wydaje się białko prekursorowe amyloidu APP. Coraz więcej wiadomo o jego metabolizmie w komórce i roli fizjologicznej w organizmie. Choć jest wykrywane w bardzo małym, bo zaledwie pikomolarnym stężeniu, to jednak jest obecne we wszystkich komórkach i wiadomo, że pełni ważne, ale nierozpoznane jeszcze funkcje fizjologiczne w organizmie [9,10].

Nie poznano jeszcze biologii i fizykochemii licznych i różnorodnych produktów degradacji tego białka. Wiele wiadomo o peptydach, a także na temat stosunkowo dobrze rozpoznanych i uznanych za klasyczne szlaków biodegradacji białka APP z zaangażowaniem enzymów zwanych sekretazami. Szlaki biodegradacji, choć poznane, to jednak ciągle, jak się okazuje, są nie w pełni rozpoznane. Odkrywane są nowe, alternatywne drogi trawienia APP, które są nie mniej ważne od dróg klasycznych. Także produkty degradacji białka APP przez sekretazy są przedmiotem intensywnych i wszechstronnych badań, zwłaszcza, że liczne, nowo odkrywane, jak np. N-końcowe, krótsze fragmenty peptydu A β 1-42, tj. A β 2-42 czy A β 3-42 także są formowane i podobnie jak białko

prekursorowe APP też pełnią ważne, ale nierozpoznane funkcje fizjologiczne w organizmie. Pochodzenie tych peptydów nie jest dokładnie wyjaśnione, ale wiadomo, że neurony, komórki mikrogleju czy astrocyty cechuje indywidualne spektrum formowanych peptydów, co wskazuje na rolę także innych niż neurony, komórek, w rozwoju choroby AD [23,37].

Powstające peptydy występują w organizmie w różnej postaci fizykochemicznej, w zależności od warunków środowiskowych w jakich znajdzie się uwalniany z prekursora krótszy peptyd. W warunkach fizjologicznych, jako rozpuszczone w płynach ciała monomery np. płynie mózgowo-rdzeniowym (Cerebrospinal Fluid, CSF), płynie śródmiąższowym (Interstitial Fluid, ISF), surowicy czy ostatecznie w moczu, mogą funkcjonować jako cząsteczki aktywne i pełnić ważne funkcje w organizmie [24,39]. W patologicznie zmienionych warunkach środowiskowych komórki (pH, obecność i stężenia różnych jonów, temperatura) peptydy, ze względu na budowę aminokwasową, mogą formować wielkocząsteczkowe struktury o charakterze agregatów, z których, wysoce uporządkowane i dobrze zorganizowane, zwane fibrylami, także się umiejscawiają w różnych miejscach mózgu, w tym w obrębie mózgowych naczyń krwiono-

śnych. To one przede wszystkim są ważnym czynnikiem towarzyszącym różnym schorzeniom, a zwłaszcza chorobom neurodegeneracyjnym [10,28].

Bogactwo nowych, odkrywanych peptydowych produktów trawienia białka APP, w tym innych form niż rozpoznawane jak dotąd peptydy w grupie peptydów typu A β , sprawia, że coraz częściej pojawia się pytanie o konieczność zrewidowania obecnego modelu rozwoju choroby AD, a zwłaszcza roli istotnych dla jej rozwoju różnych peptydów ujawnianych w CSF, ISF czy w surowicy chorych. W pracy podjęto próbę przedstawienia tego tematu.

BIĄŁKO PREKURSOROWE AMYLOIDU I FUNKCJE APP

Postacią prekursorową peptydów typu A β jest białko APP – transmembranowa proteina o masie 120 kDa o nierozpoznanej jeszcze dokładnie funkcji. Białko należy do nadrodziny wysoce konserwatywnych ewolucyjnie białek APP, na którą składają się, oprócz białka APP, także białka podobne do APP (APP-like proteins, APLP), którymi u człowieka są białka APLP1 i APLP2, a u myszy Aplp. Homologi białka APP u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) i u hermafrodytycznego nicienia (*Caenorhabditis elegans*) noszą skrótowo odpowiednio: APPL (Apl) i APL-1 (apl-1). Są to transmembranowe proteiny typu I o stosunkowo dużej, konserwatywnej domenie zewnątrzkomórkowej i krótkim odcinku cytoplazmatycznym. Mają podobny, wspólny plan budowy [18,20,36,50].

Białko APP występuje w kilku izoformach, formowanych w wyniku różnego składania 18 eksonów (splicingu), z których jest zbudowany stosunkowo krótki gen APP, u człowieka zlokalizowany na chromosomie 21 (21q21.2) i liczący 240 kpar zasad. Izofomy te różnią się liczbą aminokwasów budujących APP i budową cząsteczki białka [6,19,48,49].

Trzy najczęściej występujące izofomy białka APP to: APP₇₇₀, APP₇₅₁ i najliczniejsza w neuronach, postać APP₆₉₅. Pozostałe dwie wymienione postaci białka APP także występują w mózgu, ale w innych, poza neuronami, komórkach, np. w komórkach mikrogleju oraz w astrocytach i w mniejszej ilości niż APP₆₉₅. W neuronach APP obecne jest niemal we wszystkich strukturach komórki, łącznie z jądrem komórkowym [35]. W komórkach mózgu (cortex) mRNA tych trzech postaci występuje odpowiednio w proporcjach: 1: 10: 20 [36]. Dwie pierwsze izofomy ulegają ekspresji także we wszystkich innych komórkach organizmu, choć głównie w komórkach serca, śledziony, nerek czy mięśni szkieletowych [6]. Białko APP₇₇₀ budową przypomina białko APLP2, a białko APP₆₉₅ jest podobne do białka APLP1 [7,17,36,53]. Mniej powszechną izoformą APP jest L-APP i APP₆₃₉, które nie mają odpowiednio sekwencji eksonu 15 czy sekwencji eksonów 2, 7 i 8. Białko L-APP jest obecne w leukocytach i komórkach mikrogleju, a APP₆₃₉ w komórkach płodowych, a u dorosłych wyłącznie w komórkach wątroby

[5]. Inne rozpoznane izofomy, tj. APP₇₅₂, APP₇₃₃, APP₇₁₄, APP₆₉₆, APP₆₇₇ nie występują tak często [17].

N-końcowy fragment APP (N-terminal fragment of APP, NTF) to domena wysoce konserwatywna. Tworzy około 88% neuronalnej izofomy APP₆₉₅ i jest skierowana do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a C-końcowy fragment (C-terminal fragment, CTF) tkwi w cytosolu komórki [5,6,14,15]. Podobne umiejscowienie w komórce mają inne, dłuższe izofomy APP, które różnią się od formy najkrótszej budową cząsteczki białka. Na cząsteczkę izofomy dłuższej APP, tj. APP₇₇₀ i APP₇₇₁ składa się kilka domen. Od N-końca APP, są to w kolejności: stosunkowo duża ektodomena, w obrębie której znajduje się – jako region między 95 a 110 aminokwasem – globularna, obdarzona wysoce dodatnim ładunkiem i bogata w reszty cysteiny, domena E1, która odpowiada m.in. za wiązanie egzogennej heparyny do APP, jako czynnika indukującego proces formowania i usuwania czynników amyloidotwórczych. Ta część białka APP, wiążąc fibulinę-1 macierzy zewnątrzkomórkowej, hamuje udział rozpuszczalnej postaci APP w procesie proliferacji i wzrostu neuronalnych komórek macierzystych [6]. Następny odcinek to 56-aminokwasowa tzw. domena Kunitza (Kunitz protease inhibitor, KPI), której obecność powoduje zahamowanie funkcji proteaz serynowych, takich jak trypsyna czy chymotrypsyna. Kolejna kwaśna, helikalna domena E2 warunkuje dimeryzację APP, wiązanie heparyny, a także wiązanie jonów metalu. W jej obrębie są ulokowane aminokwasy istotne w procesie fibrylacji. Po niej jest domena tworząca część transmembranową, która odpowiada za homodimeryzację i za wiązanie cholesterolu do APP (TMD). Białko APP wykazuje zdolność do samoasocjacji i do formowania bardziej złożonych oligomerów [4]. Ostatnia część to stosunkowo krótka, wysoce konserwatywna C-końcowa wewnątrzkomórkowa, cytoplazmatyczna domena, z licznymi miejscami podlegającymi fosforylacji i zawierająca także swoistą sekwencję YENPTY, która odpowiada za ukierunkowanie przemieszczania i transport APP w komórce (trafficking), a także proces endocytozy tego białka [5,6,18,26].

W badaniach *in vitro* wykazano, że dłuższe izofomy białka APP, tj. APP₇₅₁ i APP₇₇₀, zawierające domenę Kunitza, są bardziej amyloidogenne niż neuronalna izofoma krótsza APP₆₉₅, niezawierająca tej domeny. Newralgiczne dla procesu fibrylacji aminokwasy, tworzące fibrylujący obszar A β , są ulokowane w obrębie C-końca domeny E2 białka APP, i są kodowane przez eksony 16 i 17 genu APP. Białko APP jest jedynym w nadrodzynie do której należy, zawierające tę fibrylującą sekwencję [5,6,17,18].

Całkowity rozmiar tego fragmentu w cząsteczce białka APP nadal jest przedmiotem badań i w literaturze nie jest bezpośrednio określony, choć wyznaczono jego masę, która wynosi około 4 kDa [50]. W piśmiennictwie ta aminokwasowa sekwencja jest różnie określana, np. jako: A β -amyloid, β -amyloid, A4-amyloid, β A4 amyloid. Niestety, nazwy te nie są jednak konsekwentnie

stosowane przez autorów prac, co wprowadza niepożądane zamieszanie terminologiczne. Zaproponowana w piśmiennictwie nazwa „całkowity A β ” (A β total, A β_T) wydaje się właściwa i jest stosowana w tej pracy dla pełnej wersji peptydu A β , która ulega dalszym etapom trawienia komórkowego [17].

Na podstawie analizy genu APP oszacowano jedynie, że zdolny do fibrylacji fragment może liczyć 50 aminokwasów, choć nie jest to wartość ostateczna, na co wskazują badania produktów trawienia tego fragmentu APP, które mogą być dłuższe i liczyć np. 51 aminokwasów [17,19,38]. Około 2/3 fragmentu A β_T leży od strony N-końca APP poza błoną komórkową, a około 1/3 (np. 12 aminokwasów peptydu A β 1-42) wewnątrz domeny, w obrębie błony komórkowej (części transmembranowej) APP [5].

Nazwa nadana białku APP – prekursor amyloidu komórki – eksponuje udział produktów jego degradacji w procesie amyloidogenezy i podkreśla ich rolę głównie w rozwoju choroby AD, ale nie oddaje ani jego fizjologicznej roli w komórce, ani jego znaczenia w skali organizmu czy to w procesach fizjologicznych, czy patologicznych.

Jako glikoproteina transbłonowa białko to pełni zapewne liczne, ale nierozpoznane funkcje fizjologiczne. Dlatego też akronim APP można postrzegać także jako wyrażenie złożone z pierwszych liter słów: „the All Purpose Protein”, tj. białko do wszystkich celów [35].

Białko zawiera domenę wiążącą metal, np. jony miedzi, a jego aktywność ferooksydacyjna przypomina funkcję, jaką pełni ceruloplazmina w transporcie jonów miedzi. Przypuszcza się, że białko to transportuje także jony żelaza na zewnątrz neuronu. Jeszcze inne koncepcje sugerują funkcje adhezyjne tego białka i rolę APP jako inhibitora proteaz serynowych. Izoformy APP z domeną Kunitza dominują we krwi i, być może, uczestniczą w procesach koagulacji. APP w formie proteoglikanu, z przyłączoną resztą siarczanu hondroityny, jako tzw. appican, jest odnajdywany w komórkach gleju, ale nie w neuronach. Przypisuje się tej cząsteczce także rolę w regulacji wzrostu komórek. Ostatnio, sugeruje się także udział APP w procesach wzrostu, różnicowania w procesach regulujących proliferację komórek progenitorowych mózgu, ale także i w procesach karcynogenezy. Gen APP stanowi tarczę aktywności androgenów i jest istotny w rozwoju nowotworów stercza, jelita czy trzustki [5,36].

PRODUKTY TRAWIENIA BIAŁKA APP

– POCZĄTKI FIBRYLUJĄCYCH PEPTYDÓW

W pełni uformowane białko APP jest transportowane i umiejscowione w błonie komórki, po czym lokalnie następują akty jego trawienia [35]. Drogi degradacji białka APP nie są w pełni poznane, ale wydaje się, że jest ich przynajmniej kilka. Jedną z dróg, stosunkowo dobrze poznana i najistotniejsza dla formowania fibrylujących peptydów A β i dla rozwoju AD, to klasyczny

szlak, w którym białko APP jest trawione przez enzymy nazwane sekretazami. Nazwa odzwierciedla fakt, że produkty aktywności enzymów są usuwane na zewnątrz komórki – podlegają procesowi sekrecji (secrete). Sekretazy trawią nie tylko APP, ale także wiele innych białek w komórce [12,15].

Obecnie wiadomo, że nie jest to jedyna droga metabolizmu APP, gdyż jak stwierdzono, istnieją różniące się od klasycznych, sekretazozależnych (secretase-dependent), inne mechanizmy działania sekretaz, a także alternatywne, niezależne od sekretaz (secretase-independent) szlaki jego degradacji. Ich znaczenie w formowaniu amyloidogennych produktów istotnych z punktu widzenia AD jest prawdopodobnie nieznaczące, choć nie jest jeszcze dokładnie poznane [15,21,37].

KLASYCZNY SZLAK TRAWIENIA APP PRZEZ SEKRETAZY

W wyniku proteolitycznego trawienia białka APP, w obrębie zewnątrzkomórkowej (luminal) N-końcowej domeny, przez sekretazę alfa (α -sekretase) bądź sekretazę-beta (β -sekretase) powstają dwa rozpuszczalne N-końcowe produkty sAPP α i sAPP β , a także dwa C-końcowe fragmenty APP (carboxy-terminal fragment, CTF), związane z błoną komórkową. Sugeruje się, że w warunkach fizjologicznych, peptyd sAPP α pełni funkcje neurotropowe i neuroprotektoryjne, a sAPP β działa proapoptotycznie [25].

Podczas gdy w neuronach dominuje szlak trawienny β -sekretaz, to w komórkach nieneuronalnych przeważa aktywność α -sekretaz [13]. Ważne w procesie trawienia APP jest miejsce, w którym następuje cięcie cząsteczki białka przez α - i β -sekretazy. Trzecią sekretazą uczestniczącą w trawieniu APP jest gamma sekretaza (γ -sekretase), która stanowi kolejne, po α - czy β -sekretazie, ogniwo na szlaku trawienia APP. Choć jest enzymem działającym w tym samym kompartmentie komórki, to jednak aktywnym odmiennie, zarówno przestrzennie, jak i czasowo, od α - i β -sekretaz [35].

Antyamyloidogeny szlak trawienia APP

Alfa-sekretazy to metaloproteinazy cynkowe należące do rodziny ADAM (disintegrin and metalloproteinase). Jako α -sekretazy funkcjonują liczne enzymy z tej rodziny, np. ADAM9, ADAM10, ADAM17 (określana także jako tumour necrosis factor alpha (TNF- α) converting enzyme TACE) i MDC-9, a także proteaza aspartylowa (aspartyl protease) BACE2 (β -amyloid cleaving enzyme 1, BACE2). Najważniejszy dla neuronalnego trawienia APP wydaje się ADAM10 [25,26,50,57].

Białko APP może zostać przecięte przez α -sekretazę w obrębie sekwencji aminokwasowych pozabłonowego odcinka peptydu A β , tj. między aminokwasem 16, którym jest lizyna, a aminokwasem 17, którym jest leucyna. W procesie trawienia APP przez α -sekretazę, zostaje uwolniony pozamembranowy peptyd APP CTF (α CTF), który

tylko częściowo obejmuje przecięte już sekwencje zdolne do fibrylacji. Zniszczeniu ulegają sekwencje A β wymagane do procesu fibrylacji [26]. Bardziej odpowiednia więc wydaje się nazwa dla tej drogi trawienia: szlak antyamyloidogenny niż szlak nieamyloidogenny, choć w piśmiennictwie częściej spotyka się ten drugi termin [15].

W przypadku izoformy neuronalnej APP₆₉₅ skutkiem trawienia APP przez α -sekretazę jest rozpuszczalny peptyd o długości 594 aminokwasów i masie 68 kDa (sAPP α ₆₉₅) i C-końcowy fragment o długości 101 aminokwasów. Natomiast skutkiem trawienia izoformy APP₇₇₀ przez α -sekretazę w pozycji Lys687 i Leu688 jest 83-aminokwasowy peptyd α CTF, określane skrótem C83 o masie 10 kDa (sAPP α ₇₇₀).

W dalszej kolejności C-końcowy fragment C-83 podlega trawieniu przez heterotetrameryczny kompleks enzymatyczny, który nazwano γ -sekretazą, składający się z czterech integralnych białek membranowych, tj.: peseniliny, nicastyny Aph1 i Pen-2. Do swej aktywności γ -sekretaza wymaga obecności wielu białek: tzw. presenilin (PS), tj. PS1 i PS2, nikastryny, białek wzmacniających preseniliny (presenilin enhancer-2) i białka APH1 (anterior pharynx-defective-1). Jego aktywność jest podobna do aktywności sekretaz. Nikastryna odpowiada za regulację kolejnego białka, zależnej od cynku metalo-proteazy, zwanej neprylizyną (nepriylisin, NEP) [16,34].

Kompleks γ -sekretazy jest aktywny w obrębie hydrofobowego wnętrza błony komórkowej i może ciąć peptydy wielokrotnie, działając w różnych miejscach domeny transmembranowej, oddalonych od siebie o 2-3 aminokwasy. Miejsca te są określone jako ϵ , ζ i γ [8,15]. Powstaje niepatogenny, okaleczony peptyd A β w postaci krótkiego odcinka p3 o masie 3 kDa, umiejscowiony wewnątrz błony komórkowej i cytoplazmatyczny, wewnątrzkomórkowy odcinek białka APP nazwany AICD (APP Intracellular Domain, AICD).

Aktywnością zbliżony do aktywności α -sekretazy jest także enzym określane skrótem BACE2 (β -amyloid cleaving enzyme 2, BACE2), który w 55% jest podobny do α -sekretazy BACE1 (β -amyloid cleaving enzyme 1, BACE1) i w około 25-30% wykazuje homologię aminokwasową z tym enzymem. Choć BACE2 ma aktywność β -sekretazy, to jednak lepiej działa w miejscach cięć przypisanych α -sekretazie niż β -sekretazie. BACE2 może trawić białko APP w środkowej części sekwencji A β _T, bo między aminokwasami 19 a 20, którymi są dwie reszty fenyloalaniny (Phe), całkowicie niszcząc ten obszar. W efekcie jest formowany produkt podobny do p3 określane p3-like. W neuronach mózgu ekspresja BACE2 jest na dużo niższym poziomie niż BACE1. Białko to występuje głównie w komórkach glejowych [2,57].

Amyloidogenny szlak trawienia APP

Beta-sekretaza BACE1 (β -amyloid cleaving enzyme 1, BACE1) to transmembranowa proteaza aspartylowa

typu 1, określane także jako memapsina 2 lub jako Asp2. Aktywność β -sekretazy BACE1 wykazuje także, wspomniany już wcześniej, enzym BACE2, który jest jednak bardziej skuteczny jako α -sekretaza [15,57]. Choć BACE1 ulega ekspresji na najwyższym poziomie w komórkach trzustki, jelita, nerek, prostaty, łożyska czy tchawicy, na średnim w mózgu, a na bardzo niskim w innych tkankach organizmu, to jednak jego aktywność w mózgu jest najwyższa, przy znikomej aktywności w trzustce. Ten szlak trawienny białka APP dominuje w komórkach mózgu. W wyniku aktywności β -sekretazy, przy pierwszej asparaginie 1 (Asp1), w miejscu przed pierwszą pozycją aminokwasową całego, pełnego fragmentu A β , następuje odcięcie od białka APP peptydu C-99 [26,57]. Dlatego w tym fragmencie całkowicie zachowana pozostaje struktura peptydu A β _T. Na pełny odcinek A β _T składa się także odcinany przez α -sekretazy na szlaku antyamyloidogennym, membranowy fragment peptydu A β , tj. krótki peptyd p3 [5,21].

Skutkiem trawienia izoformy APP₇₇₀ przez β -sekretazę w pozycji 671, którą jest metionina i w pozycji 672, którą jest asparagina, jest peptyd C99 o masie 12 kDa, (sAPP β ₇₇₀), obejmujący aminokwasy 672-770 białka APP [1,8,14,17,26].

Szlak trawienny prowadzony przez β -sekretazy, w pełni zachowując strukturę peptydu A β , może na skutek aktywności kolejno działających enzymów doprowadzić do formowania z pełnej, wyjściowej postaci prekursora peptydów A β licznych, krótszych peptydów pochodnych.

Należy podkreślić, że na powstające różnorodne peptydy typu A β , składają się aminokwasy, które ze względu na ich własności fizykochemiczne mogą nadawać peptydowi charakter i cechy peptydu fibrylującego. Potencjalnie drzemiąca w peptydzie skłonność do jego fibrylacji może, ale nie musi się ujawnić w postaci tworzonych fibryli. Zależy to od warunków środowiskowych, w jakich znajdzie się peptyd czy to w *in vitro*, czy *in vivo*, tzn. od stanu patologicznego lub fizjologicznego organizmu.

Należy zatem precyzyjnie określać i różnicować formowane peptydy A β i widzieć je z jednej strony jako formy pełniące różnorodne, ważne funkcje w stanie fizjologicznym, a z drugiej strony, należy widzieć je także jako formy potencjalnie zdolne do fibrylacji. Jednak formy te, w warunkach patologicznych, mogą zostać wprowadzone na szlak amyloidogenny i formować wysoko zorganizowane struktury, tj. fibryle, a ostatecznie plaki amyloidowe. To rozróżnienie form peptydów ma daleko idące implikacje dla zrozumienia ich biologii. Zdarza się bowiem, że obecne w nadmiarze w płynach, np. CSF, fibrylujące peptydy A β są toksyczne dla komórek, ale nie formują jednak plak amyloidowych [12,28]. Z tego względu szlak trawienny z udziałem β -sekretazy został nazwany szlakiem amyloidogennym [15]. Powstające różne formy należą do rodziny peptydów A β , ale precyzyjnie charakteryzuje je długość, czyli liczba odcinanych

z dłuższego peptydu wyjściowego krótszych sekwencji aminokwasowych budujących poszczególne peptydy [26].

To właśnie z peptydu C99, wskutek następującej aktywności kompleksu γ -sekretazy, jest odcinany z kolei peptyd $A\beta_T$ o masie 4 kDa, który pozostaje na zewnątrz komórki. Wskutek kolejnego cięcia przez γ -sekretazy także i w tym przypadku, podobnie jak na szlaku antyamyloidogennym, jest formowany krótki, C-końcowy, cytoplazmatyczny fragment AICD [8,15,26].

Fragment $A\beta$ może być następnie trawiony i przecinany w różny sposób od strony C- bądź N-końca tej cząsteczki. W warunkach fizjologicznych od strony C-końca sekwencji $A\beta_T$ są odcinane przez γ -sekretazę peptydy omiędzy 37 a 43 aminokwasem. Powstają w ten sposób peptydy $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-40}$ i liczne peptydy krótsze, np. $A\beta_{1-37}$. Produktami są też peptydy 38-43-aminokwasowe, a czasami i dłuższe [8].

Wydaje się, że kompleks γ -sekretazy, mając do dyspozycji kilka miejsc swej aktywności, tj. ϵ , ζ i γ , działa wielokrotnie na sekwencje $A\beta_T$. W zależności od miejsc cięć podąża szlakiem prowadzącym do najbardziej amyloidogennego peptydu $A\beta_{1-42}$ (szlak $A\beta_{42}$) bądź szlakiem wiodącym do peptydu $A\beta_{1-40}$ (szlak $A\beta_{40}$). Pierwszy szlak prowadzi do formowania fragmentu $A\beta_{1-42}$, który obejmuje reszty 672-713 białka APP_{770} [52]. Na szlaku tym proponowane miejsca działania enzymu to tzw. cięcia typu epsilon, w pozycjach aminokwasów 51, 48, 45, 42, a następnie 39, 38 i 34. Jako kolejne, inne miejsca cięć proponuje się także pozycje 49, 51 czy 52, po których następują kolejne etapy skracające uwalniane peptydy do długości 42 aminokwasów, czyli peptydu $A\beta_{1-42}$, a nawet uwalniając peptydy krótsze, bo liczące 38, 39 czy 34 aminokwasów [15,38].

Drugi szlak to droga enzymatyczna prowadząca do uwolnienia peptydu $A\beta_{1-40}$, który stanowią reszty pomiędzy 672 a 711 aminokwasem białka APP_{770} . Obszar obejmuje sekwencje aminokwasów rozpoczynającą się w pozycji pierwszej resztą asparaginy, a kończy w pozycji 40 resztą waliny [52,55]. Szlak $A\beta_{40}$ obejmuje trawienie w pozycji najpierw 49, 46 i 43 i 40, a następnie w pozycji 34. Ten szlak trawienny może postępować dalej i cięcie może być dokonywane także między aminokwasem 38 i 37 peptydu $A\beta$ [1,15,38].

Z grupy peptydów $A\beta$ najdłuższa odnaleziona forma liczy 51, a najkrótsza 30 aminokwasów. Odnaleziono także inne peptydy $A\beta$, np. $A\beta_{34-32}$ i $A\beta_{34-31}$ (oznaczane jako $A\beta_{30}$ i $A\beta_{31}$). Także i one są wynikiem działania γ -sekretazy, co wskazuje na inne możliwe drogi trawienia [38].

Natomiast fragmenty odcinane od N-końca sekwencji $A\beta_T$ to N-końcowo modyfikowane, ułomne czy okaleczone (truncated) formy w postaci peptydów $A\beta_{3-42}$, $A\beta_{11-40}$ i $A\beta_{11-42}$. Przypuszczalnie powstają w komór-

kach mikrogleju i w astrocytach w przeciwieństwie do form pełnych, rozpoczynających się w pozycji pierwszej asparaginą, które głównie są formowane w neuronach [8,22,37]. Krótsze fragmenty $A\beta_T$, np. $A\beta_{3-42}$ i $A\beta_{11-42}$, modyfikowane kwasem piroglutaminowym (5-oksoprolina) także wydają się ważne w rozwoju choroby AD [11].

Czynniki warunkujące drogi trawienia APP przez sekretazy

Czynnikiem decydującym o aktywności α - bądź β -sekretaz i szlaku trawiennym jest wzajemna, przestrzenna kolokalizacja białka i enzymu w komórce, a to zależy od dostępności enzymu w przestrzeniach komórki. Istotne są tu mechanizmy regulujące transport APP i enzymów w komórce. W procesie formowania peptydów $A\beta$ rolę odgrywają liczne organelle komórkowe. Wzrost stężenia APP, obniżony proces internalizacji białka sprzyja antyamyloidogennej ścieżce trawienia. Wzrost retencji APP w kwaśnych kompartmentach komórki, takich jak endosomy, sprzyja natomiast amyloidogennej drodze jego trawienia, co prowadzi do formowania peptydów $A\beta$ [18].

ALTERNATYWNE DROGI TRAWIENIA BIAŁKA APP

N-końcowe produkty trawienia APP; peptydy N-APP

W CSF osób zdrowych wykryto sześć nowych, N-końcowych produktów trawienia APP (N-APP), dla których wspólny jest 18 aminokwas, rozpoczynający wszystkie odcinane fragmenty APP. Nie mają 17-aminokwasowej sekwencji sygnałowej. Ich masę wyznaczono na około 12 kDa. Są to peptydy: APP(18-119), APP(18-121), APP(18-122), APP(18-123), APP(18-124) i APP(18-126). Ich obecność w CSF wskazuje na istnienie nowych, nierozpoznanych jak dotąd dróg metabolizmu APP. Ich stężenie w CSF osób chorych na AD jest podniesione w porównaniu ze stężeniem w CSF osób zdrowych. Odpowiedź na pytanie czy staną się markerami diagnostycznymi AD wymaga dalszych badań [41,42].

ALTERNATYWNE SZLAKI TRAWIENIA DOMENY $A\beta_T$

Inne miejsca aktywności β -sekretazy BACE1 – miejsca β'

Wiadomo, że BACE1, oprócz opisanego, klasycznego miejsca swej aktywności w pozycji 671 metionin i 672 asparagina (dla APP_{770}), tj. przed pierwszą pozycją fragmentu $A\beta_T$, może być aktywny także w miejscu określanym jako beta prim (β'). Miejscem tym w APP_{770} są aminokwasy w pozycji 681 metionina i 682 glutamina [37].

Działając w obrębie N-końca peptydu $A\beta_T$ między 10 a 11 aminokwasem, którymi są tyrozyna i glutamina, prowadzi do formowania N-terminalnych, krótkich fragmentów, tzw. okaleczonych czy ułomnych (truncated) fragmentów $A\beta'$. Są to peptydy $A\beta'_{11-40}$ czy $A\beta'_{11-42}$. Ich potencjał fibrylogenny jest znacznie większy niż

fragmentów typowych dla plak amyloidowych, tj. A β 1-42 czy A β 1-40. Analiza mózgow osób chorych na AD, a zwłaszcza na autosomalną, wczesną postać AD, tzw. postać rodzinną (familial Alzheimer's disease, FAD), dokonana *post mortem*, wykazała, że zawierają duże ilości tych krótkich peptydów [26]. Ich rola i znaczenie dla rozwoju AD pozostaje do wyjaśnienia [12,21,26, 37,50]. Sugeruje się, że za formowanie tych licznych i różnorodnych N-końcowych wariantów fragmentu A β odpowiadają także: cyklaza glutaminy, katepsyny, meprina, neprylizyna, zasadowe białko mieliny, plazmina, enzym konwertujący angiotensynę i aminopeptydazy [2,37].

Szlak trawienia A β_T niezależny od γ -sekreazy

Odkryto także nową, nieznaną jak dotąd, niezależną od γ -sekreazy, drogę trawienia APP. W CSF oprócz amyloidogennych form peptydów A β , takich jak A β 1-42 czy A β 1-40, znajdują się także inne, krótsze formy, takie jak: A β 1-14, A β 1- czy A β 1-16, które, jak się wydaje, w procesie agregacji jednak nie uczestniczą. W peptydzie A β 1-40 region między 10 a 14 aminokwasem tego peptydu nie ma sztywnej struktury warunkującej formowanie fibryli i nadającej cząsteczce piętno amyloidogenności, co sprawia, że pozostaje ona jako cząsteczka relatywnie bezstrukturalna. Krótsze sekwencje są zatem pozbawione aminokwasów formujących strukturę typu beta-sheet, czyli niezbędnych do formowania rdzenia amyloidogennego peptydu. Struktura peptydu między 1 a 16 aminokwasem nie może więc nadać peptydowi piętna amyloidogenności i nie stwarza warunków do fibrylacji. Wiadomo, że to reszty między aminokwasami 17 a 20 są niezbędne w procesie fibrylogenezy [43].

Wydaje się, że izoformy dłuższe od A β 1-17 są formowane na szlaku zależnym od aktywności γ -sekreazy, a krótsze peptydów A β , tj. do pozycji 16, np. A β 1-14 czy A β 1-15, na szlaku od γ -sekreazy niezależnym. Ta droga, niezależna od aktywności γ -sekreazy, odbywa się wyłącznie dzięki kombinowanemu współdziałaniu α - i β -sekreazy. Byłby to nowy szlak metabolizmu peptydu A β_T . Okazało się także, że stężenie peptydu A β 1-16 w CSF osób chorych na AD jest podniesione w porównaniu ze stężeniem w CSF u osób zdrowych. Formowanie, zwłaszcza tego peptydu, wymaga dalszych badań, gdyż jak się okazuje, w konsekwencji zastosowania inhibitorów γ -sekreazy, peptyd ten nie jest jednak wykrywany, bo najprawdopodobniej nie jest obecny. Być może jego formowanie, na szlaku niezależnym od γ -sekreazy, następuje jednak w szczególnych, jeszcze nierozpoznanych, warunkach działania γ -sekreazy [43,44,45].

Kaspazy a trawienie APP

Wiadomo, że w degradacji APP oprócz sekreazy mogą uczestniczyć także kaspazy, zwłaszcza kaspaza-3, która trawi cytoplazmatyczny koniec białka APP695 w pozycji 664, gdzie znajduje się asparagina (Asp). Uwalniany zostaje fragment zbudowany z 31 aminokwasów C31. Uwalniane produkty odgrywają rolę w neurotoksyczności peptydów A β [57].

PEPTYDOWE PRODUKTY TRAWIENIA BIAŁKA APP

N-końcowe produkty trawienia APP

W CSF i mózgu ludzkim odnaleziono, odcinane od N-końca białka APP, fragmenty między 23 a 123 aminokwasem o masie około 12 kDa. Fragment ten to domena strukturalnie przypominająca domenę czynnika wzrostu i dlatego jest nazwana domeną przypominającą czynnik wzrostu (growth factor-like domain). Jednocześnie w mózgu myszy zidentyfikowano dłuższy produkt trawienia białka APP o masie około 35 kDa, także odcinany od N-końca, tj. między aminokwasami 1 a 286. Peptyd ten ma zdolność wiązania do receptora śmierci DR6 (death receptor 6, DR6) i przypuszczalnie wzmaga fizjologiczny proces usuwania i przemodelowania aksonów i połączeń synaptycznych w czasie rozwoju mózgu. Badania wykazały, że opisane krótkie fragmenty APP można traktować jako ligandy receptora śmierci DR6. Choć nie zaobserwowano wyraźnych różnic stężeń tych peptydów między osobami zdrowymi a chorymi na AD, to jednak zauważono działanie wskazujące na wzrost stężeń u osób chorych na AD [41].

Peptydowe produkty trawienia domeny A β i ich rola biologiczna

Liczne peptydy A β są krótszymi produktami trawienia pełnego, wyjściowego fragmentu A β_T białka APP. Te różnorodne peptydy A β są uwalniane w różnej ilości przez komórki mózgu, np. przez astrocycy, komórki mikrogleju, endotelialne, mięśni gładkich czy pericyty [26]. Stężenie peptydów A β w mózgu mieści się w zakresie pikomolarnym, choć zależy od rodzaju typu peptydu A β i od miejsca i płynu, w którym występuje [3,51]. Dla prawidłowej pracy mózgu jest istotne stężenie wytwarzanych peptydów A β . Wydaje się, że niskie stężenia zewnątrzkomórkowych peptydów A β są nietoksyczne. Sugeruje się, że dodatkowo wpływają na plastyczność synaptyczną, a także na procesy związane z pamięcią. Aktywność intelektualna i praca mózgu ma wpływ na wytwarzanie peptydów A β . Ich stężenie w mózgu wzrasta wskutek wysiłku intelektualnego i poznawczej pracy mózgu, a także po uszkodzeniach mózgu, w czasie powrotu narządu do sprawności i podejmowania funkcji poznawczych [47].

Do grupy peptydów typu A β należą cząsteczki o różnej długości, tj. różnej liczbie aminokwasów, co jest uzależnione od miejsca cięcia domeny A β_T przez enzymy degradujące. Różny jest też charakter fizykochemiczny uwalnianych peptydów A β [43]. Peptydy A β 1-38, A β 1-40 mają charakter hydrofilowy [26]. Natomiast peptydami wysoce hydrofobowymi są peptydy A β 1-42 czy A β 1-43 [43,46,55]. W warunkach fizjologicznych peptydy A β pozostają w płynach ciała w formie monomerów [12]. Różnorodne, rozpuszczalne peptydy A β stanowią produkt metabolizmu różnych komórek i znajdują się w płynach ciała, np.: w CSF, ISF, surowicy i w moczu [32,33,55]. Wydaje się, że pełnią niepoznane jeszcze liczne funkcje

fizjologiczne, w tym odgrywają rolę w pracy mózgu, dlatego ich obecność w mózgu jest zjawiskiem fizjologicznym.

Z produktów trawienia $A\beta_T$ głównym formowanym peptydem jest peptyd $A\beta 1-40$. W warunkach fizjologicznych jest obecny w CSF, ISF w surowicy, a także w moczu oraz w warunkach *in vitro* w supernatantach kultur komórkowych. Jak wspomniano, peptyd $A\beta 1-40$ obejmuje sekwencję aminokwasów rozpoczynającą się w pozycji pierwszej resztą asparaginą, a kończy w pozycji 40 resztą waliny [55]. Ma mniejszą tendencję do formowania fibryli w porównaniu z peptydem $A\beta 1-42$, który w 42 pozycji jest zakończony alaniną. Przypuszcza się, że właśnie te różnice budowy aminokwasowej kryją w sobie odpowiedź na pytanie dotyczące różnic dzielących te prawie identyczne peptydy, tj. dlaczego choć jeden peptyd jest formowany w większej ilości, to jednak głównie „ten drugi”, dłuższy peptyd $A\beta 1-42$ formuje fibryle i buduje amyloid [21].

Peptyd $A\beta 1-42$ to forma bardziej amyloidogenna niż peptyd $A\beta 1-40$ i kluczowa dla neurotoksyczności, choć nie jedyna. Stanowi około 10% całkowitej puli formowanych peptydów $A\beta$ [8,12,55]. Fragment $A\beta 1-42$ jest peptydem najbardziej hydrofobowym. Reszty hydrofobowe są ulokowane na C-końcu, a N-końiec ma charakter hydrofilowy. Przypomina pod tym względem trzustkowy neurohormon, amylinę, której hydrofobowość, do pewnego stopnia, determinuje jej cechę zdolności do fibrylacji. Peptyd $A\beta 1-42$ ulega też szybciej niż inne fragmenty APP samoasocjacji, prowadząc do powstawania znacznie mniejszych od fibryli oligomerów. W przeciwieństwie do fibryli, oligomery są postacią rozpuszczalną i to one są uznane za toksyczne dla neuronów [27-31].

Peptyd $A\beta 1-42$ jest glikozylowany najpierw w retikulum endoplazmatycznym, a następnie w aparacie Golgiego, gdzie zachodzi także modyfikacja tyrozyny, polegająca na sprzęganiu z resztą kwasu siarkowego (sulfation) siarczanem. Fragment $A\beta 1-42$ w postaci rozpuszczalnej występuje w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a w postaci nierozpuszczalnej we wnętrzu komórki neuronalnej. Wprowadzona na szlak fibrylacji forma natywna tego peptydu, tj. struktura kłęбка, ulega zmianom konformacyjnym typowym dla tego procesu, tj. najpierw pojawiają się struktury α -helikalne, a następnie struktura β -sheet. Fibryle amyloidowe formowane w przebiegu choroby Alzheimera w 75% tworzy peptyd $A\beta$, a w 25%, ściśle z nimi związane glikoproteiny i glikolipidy, nadające fibrylom cechę nierozpuszczalnych w wodzie i opornych na proteolityczne trawienie [54]. Ostateczna, fibrylna postać jest wysoce polimorficzna, co jest uwarunkowane czynnikami środowiska. Polimorfizm odnosi się także do innych peptydów, np. do peptydu $A\beta 1-40$ [30].

Mutacje białka APP w niedalekiej odległości od miejsc aktywności β -sekreazy prowadzą do nadmiernego

wytwarzania obu peptydów $A\beta 1-42$ i $A\beta 1-40$, a w przypadku miejsc aktywności γ -sekreazy wyłącznie peptydu $A\beta 1-42$. Mutacje w obrębie białka APP skutkują powstawaniem peptydów silniej agregujących w warunkach *in vitro* [8]. W węzłach chłonnych odnaleziono także modyfikowane peptydy $A\beta$. Są to pochodne kwasu glutaminowego, który znajduje się w trzeciej pozycji peptydów $A\beta 1-X$ (gdzie X to reszty 38, 40, 41, 43). W wyniku aktywności enzymatycznej powstają peptydy $A\beta$ modyfikowane kwasem piroglutaminowym [40,56].

Inne agregujące postaci fragmentów białka APP

Wykazano, że w roztworach wodnych w warunkach *in vitro*, oprócz klasycznych postaci fibrylnych, fragmenty białka APP mogą występować w postaci tzw. prefibrylnych oligomerów, tj. dimerów, trimerów bądź oligomerów jako globulomery, np. dodekamery o masie około 56 kDa; $A\beta^*56$. Takie, a nawet wyższe oligomery, bo aż do form 24-merów stanowią połączenia monomerycznych form w postaci: trimerów-heksamerów.

Temperatura fizjologiczna promuje jednak tworzenie 12-merów. Oligomery w postaci tzw. ADDL ($A\beta$ -derived diffusible ligands, ADDLs) są uznawane za najbardziej neurotoksyczną postać fibrylującego peptydu. Dimery i/lub trimery $A\beta$ wydają się istotnym elementem rozpoczynającym proces fibrylacji peptydu. Jeszcze inną, również toksyczną postacią są protofibryle $A\beta$. Z niefibrylnych oligomerów $A\beta$ wymienić należy formy kolistę, zamkniętą, tzw. fibrylarną oligomery. Tworzą tzw. pierścieniowe protofibryle (annular protofibrils, APF) o masie ponad 90 kDa [30].

ZAKOŃCZENIE

Alternatywne drogi trawienia APP nie są mniej istotne od dróg klasycznych, a formowane nowo odkrywane produkty degradacji białka APP, podobnie jak samo białko, są przedmiotem wszechstronnych badań. Pełnią ważne, ale jeszcze nierozpoznane funkcje fizjologiczne w organizmie. Intrygujące jest to, że powstające peptydowe produkty degradacji występują w organizmie w różnej postaci fizykochemicznej, w zależności od warunków środowiskowych, w jakich znajdzie się uwalniany z prekursora krótszy peptyd. Takie warunki środowiskowe w organizmie stwarzają płyny ciała, tj. płyn ISF, CSF, a wreszcie surowica krwi. W stanie fizjologicznym peptydy obecne w płynach pełnią ważne funkcje fizjologiczne. Jednak jakakolwiek zmiana parametrów płynów, która odzwierciedla toczący się proces chorobowy, zmienia radykalnie obraz biologii tych peptydów. Funkcjonuje jednak i relacja wzajemności, gdyż fizykochemicznie zmienione peptydy prowadzą do eskalacji zjawisk patologicznych. Nierozwiązany pozostaje problem: co jest przyczyną, a co skutkiem. Należy zatem poszukiwać dalej.

PODZIĘKOWANIA

Koszty publikacji artykułu pokryła Fundacja Alzheimerska we Wrocławiu. Składam wyrazy szczerzej wdzięczności członkom Zarządu Fundacji za okazaną mi pomoc

i wsparcie finansowe oraz serdeczne podziękowania dla Pana Prof. dr hab. Jerzego Leszka (Katedra Psychiatrii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu) i dla Pana Prof. dr Piotra Lewczuka (Universitätsklinikum, Erlangen) za ogromne wsparcie, cenne rady i dyskusje.

PISMIENICTWO

- [1] Barrett P.J., Song Y., Van Horn W.D., Hustedt E.J., Schafer J.M., Hadziselimovic A., Beel A.J., Sanders C.R.: The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science*, 2012; 336: 1168-1171
- [2] Chow V.W., Mattson M.P., Wong P.C., Gleichmann M.: An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med.*, 2010; 12: 1-12
- [3] Cirrito J.R., Holtzman D.M.: Amyloid β and Alzheimer disease therapeutics: the devil may be in the details. *J. Clin. Invest.*, 2003; 112: 321-323
- [4] Cuchillo-Ibañez I., Lopez-Font I., Boix-Amorós A., Brinkmalm G., Blennow K., Molinuevo J.L., Sáez-Valero J.: Heteromers of amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid. *Mol. Neurodegener.*, 2015; 10: 2
- [5] Dawkins E., Gasperini R., Hu Y., Cui H., Vincent A.J., Bolós M., Young K.M., Foa L., Small D.H.: The N-terminal fragment of the β -amyloid precursor protein of Alzheimer's disease (N-APP) binds to phosphoinositide-rich domains on the surface of hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.*, 2014; 92: 1478-1489
- [6] Dawkins E., Small D.H.: Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 2014; 129: 756-769
- [7] DeToma A.S., Salamekh S., Ramamoorthy A., Lim M.H.: Misfolded proteins in Alzheimer's disease and type II diabetes. *Chem. Soc. Rev.*, 2012; 41: 608-621
- [8] Di Fede G., Catania M., Morbin M., Giaccone G., Moro M.L., Ghidoni R., Colombo L., Messa M., Cagnotto A., Romeo M., Stravalaci M., Diomedea L., Gobbi M., Salmona M., Tagliavini F.: Good gene, bad gene: New APP variant may be both. *Prog. Neurobiol.*, 2012; 99: 281-292
- [9] Erickson M.A., Banks W.A.: Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2013; 33: 1500-1513
- [10] Gouras G.K., Olsson T.T., Hansson O.: β -amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 2015; 12: 3-11
- [11] Gouras G.K., Tampellini D., Takahashi R.H., Capetillo-Zarate E.: Intraneuronal β -amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 2010; 119: 523-541
- [12] Gouras G.K., Willén K., Faideau M.: The inside-out amyloid hypothesis and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Neurodegener. Dis.*, 2014; 13: 142-146
- [13] Gouras G.K., Willén K., Tampellini D.: Critical role of intraneuronal A β in Alzheimer's disease: technical challenges in studying intracellular A β . *Life Sci.*, 2012; 91: 1153-1158
- [14] Gralle M., Ferreira S.T.: Structure and functions of the human amyloid precursor protein: The whole is more than the sum of its parts. *Prog. Neurobiol.*, 2007; 82: 11-32
- [15] Haass C., Kaether C., Thinakaran G., Sisodia S.: Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2012; 2: a006270
- [16] Helisalmi S., Hiltunen M., Vepsäläinen S., Iivonen S., Mannermaa A., Lehtovirta M., Koivisto A.M., Alafuzoff I., Soininen H.: Polymorphisms in neprilysin gene affect the risk of Alzheimer's disease in Finnish patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2004; 75: 1746-1748
- [17] Hendriks L., Van Broeckhoven C.: A beta A4 amyloid precursor protein gene and Alzheimer's disease. *Eur. J. Biochem.*, 1996; 237: 6-15
- [18] Jiang S., Li Y., Zhang X., Bu G., Xu H., Zhang Y.W.: Trafficking regulation of proteins in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.*, 2014; 9: 6
- [19] Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.H., Multhaup G., Beyreuther K., Müller-Hill B.: The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 1987; 325: 733-736
- [20] Kitazume S., Yoshihisa A., Yamaki T., Oikawa M., Tachida Y., Ogawa K., Imamaki R., Takeishi Y., Yamamoto N., Taniguchi N.: Soluble amyloid precursor protein 770 is a novel biomarker candidate for acute coronary syndrome. *Proteomics Clin. Appl.*, 2013; 7: 657-663
- [21] Kummer M.P., Heneka M.T.: Truncated and modified amyloid-beta species. *Alzheimers Res. Ther.*, 2014; 6: 28
- [22] Lee M.S., Kao S.C., Lemere C.A., Xia W., Tseng H.C., Zhou Y., Neve R., Ahljianian M.K., Tsai L.H.: APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *J. Cell. Biol.*, 2003; 163: 83-95
- [23] Lewczuk P.: Neurochemiczna diagnostyka chorób otępiennych. W: Choroby otępienne. Teoria i praktyka. red. J. Leszek, Wyd. II, Continuo, Wrocław 2011, 371-385
- [24] Lewczuk P., Mroczko B., Fagan A., Kornhuber J.: Biomarkers of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a current perspective. *Adv. Med. Sci.*, 2015; 60: 76-82
- [25] Lichtenthaler S.F.: α -secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J. Neurochem.*, 2011; 116: 10-21
- [26] Ling Y., Morgan K., Kalsheker N.: Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2003; 35: 1505-1535
- [27] Marszałek M.: Amylina w badaniach eksperymentalnych. Fibrylotwórczy polipeptyd amyloidu trzustkowego. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 14-24
- [28] Marszałek M.: Amylina w badaniach eksperymentalnych. Fibrylacja – cytotoksyczna agregacja polipeptydu trzustki. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 309-319
- [29] Marszałek M.: Amylina w badaniach eksperymentalnych. Fibrylotwórczy polipeptydowy hormon trzustki. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 29-41
- [30] Marszałek M.: Amylina. Nowe mechanizmy regulacyjne fibrylującego hormonu trzustki – wybrane aspekty. *Post. Biol. Kom.*, 2015; 42: 1-23
- [31] Marszałek M.: Cukrzyca typu 2 a choroba Alzheimera – jedna czy dwie choroby? Mechanizmy asocjacji. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 653-671
- [32] Mehta P.D., Pirttilä T., Mehta S.P., Sersen E.A., Aisen P.S., Wisniewski H.M.: Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid β

- proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.*, 2000; 57: 100-105
- [33] Mehta P.D., Pirttila T., Patrick B.A., Barshatzky M., Mehta S.P.: Amyloid β protein 1-40 and 1-42 levels in matched cerebrospinal fluid and plasma from patients with Alzheimer disease. *Neurosci. Lett.*, 2001; 304: 102-106
- [34] Miners J.S., Baig S., Tayler H., Kehoe P.G., Love S.: Neprilysin and insulin-degrading enzyme levels are increased in Alzheimer disease in relation to disease severity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2009; 68: 902-914
- [35] Muresan V., Ladescu Muresan Z.: Amyloid- β precursor protein: multiple fragments, numerous transport routes and mechanisms. *Exp. Cell Res.*, 2015; 334: 45-53
- [36] Nalivaeva N.N., Turner A.J.: The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett.*, 2013; 587: 2046-2054
- [37] Oberstein T.J., Spitzer P., Klafki H.W., Linning P., Neff F., Knölker H.J., Lewczuk P., Wiltfang J., Kornhuber J., Maler J.M.: Astrocytes and microglia but not neurons preferentially generate N-terminally truncated A β peptides. *Neurobiol. Dis.*, 2015; 73: 24-35
- [38] Olsson F., Schmidt S., Althoff V., Munter L.M., Jin S., Rosqvist S., Lendahl U., Multhaup G., Lundkvist J.: Characterization of intermediate steps in amyloid beta (A β) production under near-native conditions. *J. Biol. Chem.*, 2014; 289: 1540-1550
- [39] Pannee J., Törnqvist U., Westerlund A., Ingelsson M., Lannfelt L., Brinkmalm G., Persson R., Gobom J., Svensson J., Johansson P., Zetterberg H., Blennow K., Portelius E.: The amyloid- β degradation pattern in plasma – a possible tool for clinical trials in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, 2014; 573: 7-12
- [40] Pappolla M., Sambamurti K., Vidal R., Pacheco-Quinto J., Poeggeler B., Matsubara E.: Evidence for lymphatic A β clearance in Alzheimer's transgenic mice. *Neurobiol. Dis.*, 2014; 71: 215-219
- [41] Portelius E., Brinkmalm G., Tran A., Andreasson U., Zetterberg H., Westman-Brinkmalm A., Blennow K., Ohrfelt A.: Identification of novel N-terminal fragments of amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid. *Exp. Neurol.*, 2010; 223: 351-358
- [42] Portelius E., Brinkmalm G., Tran A.J., Zetterberg H., Westman-Brinkmalm A., Blennow K.: Identification of novel APP/A β isoforms in human cerebrospinal fluid. *Neurodegener. Dis.*, 2009; 6: 87-94
- [43] Portelius E., Price E., Brinkmalm G., Stiteler M., Olsson M., Persson R., Westman-Brinkmalm A., Zetterberg H., Simon A.J., Blennow K.: A novel pathway for amyloid precursor protein processing. *Neurobiol. Aging*, 2011; 32: 1090-1098
- [44] Portelius E., Westman-Brinkmalm A., Zetterberg H., Blennow K.: Determination of β -amyloid peptide signatures in cerebrospinal fluid using immunoprecipitation-mass spectrometry. *J. Proteome Res.*, 2006; 5: 1010-1016
- [45] Portelius E., Zetterberg H., Andreasson U., Brinkmalm G., Andreason N., Wallin A., Westman-Brinkmalm A., Blennow K.: An Alzheimer's disease-specific β -amyloid fragment signature in cerebrospinal fluid. *Neurosci. Lett.*, 2006; 409: 215-219
- [46] Takeda S., Sato N., Rakugi H., Morishita R.: Plasma β -amyloid as potential biomarker of Alzheimer disease: possibility of diagnostic tool for Alzheimer disease. *Mol. Biosyst.*, 2010; 6: 1760-1766
- [47] Tampellini D., Gouras G.K.: Synapses, synaptic activity and intraneuronal A β in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.*, 2010; 21: 2
- [48] Tanzi R.E., Gusella J.F., Watkins P.C., Bruns G.A., St George-Hyslop P., Van Keuren M.L., Patterson D., Pagan S., Kurnit D.M., Neve R.L.: Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*, 1987; 235: 880-884
- [49] Tanzi R.E., Moir R.D., Wagner S.L.: Clearance of Alzheimer's A β peptide: the many roads to perdition. *Neuron*, 2004; 43: 605-608
- [50] Thinakaran G., Koo E.H.: Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 29615-29619
- [51] Trinchese F., Liu S., Ninan I., Puzzo D., Jacob J.P., Arancio O.: Cell cultures from animal models of Alzheimer's disease as a tool for faster screening and testing of drug efficacy. *J. Mol. Neurosci.*, 2004; 24:15-21
- [52] Turner P.R., O'Connor K., Tate W.P., Abraham W.C.: Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol.*, 2003; 70: 1-32
- [53] Vergara L., Abid K., Soto C.: Protein misfolding, a common mechanism in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, Springer Science and Business Media, LLC; 2008; 285-304
- [54] Watson D., Castano E., Kokjohn T.A., Kuo Y.M., Lyubchenko Y., Pinsky D., Connolly E.S.Jr., Esh C., Luehrs D.C., Stine W.B., Rowse L.M., Emmerling M.R., Roher A.E.: Physicochemical characteristics of soluble oligomeric A β and their pathologic role in Alzheimer's disease. *Neurol. Res.*, 2005; 27: 869-881
- [55] Wiltfang J., Esselmann H., Bibl M., Smirnov A., Otto M., Paul S., Schmidt B., Klafki H.W., Maler M., Dyrks T., Bienert M., Beyersmann M., Ruther E., Kornhuber J.: Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated A β peptides 1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in Alzheimer's disease and in patients with chronic neuroinflammation. *J. Neurochem.*, 2002; 81: 481-496
- [56] Wittnam J.L., Portelius E., Zetterberg H., Gustavsson M.K., Schilling S., Koch B., Demuth H.U., Blennow K., Wirths O., Bayer T.A.: Pyroglutamate amyloid β (A β) aggravates behavioral deficits in transgenic amyloid mouse model for Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 8154-8162
- [57] Zhang Y.W., Thompson R., Zhang H., Xu H.: APP processing in Alzheimer's disease. *Mol. Brain*, 2011; 4: 3

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.