



Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Ana-Emina Živko

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

**KRIVO SMATANJE PROTEINA I  
PARKINSONOVA BOLEST**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Zagreb, 2019.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

1. srpnja 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2019.

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Potpis:



## Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Proteini.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. <i>Pravilno smatanje proteina.....</i>	<i>2</i>
<b>2.2. Krivo smatanje proteina.....</b>	<b>4</b>
2.2.1. <i>Mehanizmi sprječavanja agregiranja krivo smotanih proteina .....</i>	<i>5</i>
2.2.2. <i>Razgradnja krivo smotanih proteina.....</i>	<i>8</i>
2.2.3. <i>Agregiranje.....</i>	<i>10</i>
<b>2.3. Parkinsonova bolest .....</b>	<b>12</b>
2.3.1. <i>Protein <math>\alpha</math>-sinuklein.....</i>	<i>15</i>
2.3.2. <i>Predloženi mehanizmi toksičnosti <math>\alpha</math>-sinuklein oligomera.....</i>	<i>17</i>
2.3.3. <i>Supstancija nigra i dopaminergički neuroni .....</i>	<i>19</i>
2.3.4. <i>Posljedice gubitka dopamina, acetilkolina i noradrenalina .....</i>	<i>20</i>
<b>2.4. Terapija.....</b>	<b>23</b>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XXV</b>



## § Sažetak

U stanicama živih bića, obrtaj proteina neophodan je za pravilno funkcioniranje i rad stanice. Prilikom sinteze proteina i zauzimanja trodimenzionalne nativne strukture, može doći do krivog smatanja proteina i stvaranja toksičnih agregata. Uzroci krivog smatanja proteina su mnogobrojni, no najčešće su povezani s oksidativnim stresom u stanici te pogreškama prilikom prepisivanja DNA u glasničku RNA i prevođenja tripleta nukleotida u aminokiseline. Krivo smotani proteini moraju se iznova smotati u nativnu konformaciju ili se uklanjaju iz stanice potpunom razgradnjom. Ukoliko se krivo smotani proteini ne uklone, započinje agregiranje pri čemu nastaju toksične vrste. Parkinsonova bolest razvija se kao posljedica krivog smatanja proteina  $\alpha$ -sinukleina i stanične smrti dopaminergičkih neurona. Oligomeri nastali agregiranjem krivo smotanih proteina  $\alpha$ -sinukleina nastaju unutar ili izvan stanice te pogađaju centralni živčani sustav, no točan mehanizam djelovanja toksičnih tvari još uvijek nije poznat. Smrt dopaminergičkih neurona uzrokuje oštećenja u nigro-strijatalnom putu u mozgu i oboljela osoba postepeno gubi motoričke sposobnosti što se očituje kao jedan od glavnih vidljivih simptoma Parkinsonove bolesti.

## § 1. UVOD

Pravilno smatanje proteina, transport te uklanjanje krivo smotanih proteina koji mogu agregirati i postati toksični, kontrolirano je pomoću sistema za kontrolu kvalitete proteina prisutnih u organizmu. Unatoč postojanju takvih sistema, mnogo proteina se ipak ne uspjeva smotati u svoju nativnu strukturu što rezultira gubitkom funkcije proteina i porastom koncentracije netopljivih proteina koji mogu asociirati. Asociranjem krivo smotanih proteina dolazi do stvaranja amiloidnih fibrila, unutar ili izvan stanica, koji utječu na centralni živčani sustav što povlači brojne posljedice na organizam, uključujući i brojne bolesti živčanog sustava. Parkinsonova bolest primjer je takve neurodegenerativne bolesti od koje danas boluje deset milijuna ljudi u svijetu, a prvi je put opisana 1817. godine od strane Jamesa Parkinsona. Prepoznatljivi simptomi Parkinsonove bolesti jesu otežane motoričke sposobnosti te demencija i depresija do kojih dolazi zbog odumiranja dopaminergičkih neurona i nastanka agregata u mozgu, takozvanih Lewy-jevih tjelešca.<sup>1</sup>

Svrha rada jest povezati krivo smatanje proteina s razvojem Parkinsonove bolesti; približiti i pojasniti prirodne procese u našem tijelu koji pokušavaju spriječiti nastanak agregata štetnih za stanice mozga. Potrebno je pojasniti i koji protein krivim smatanjem doprinosi razvoju Parkinsonove bolesti te što dovodi do narušavanja motoričkih sposobnosti i promjene ponašanja.



## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

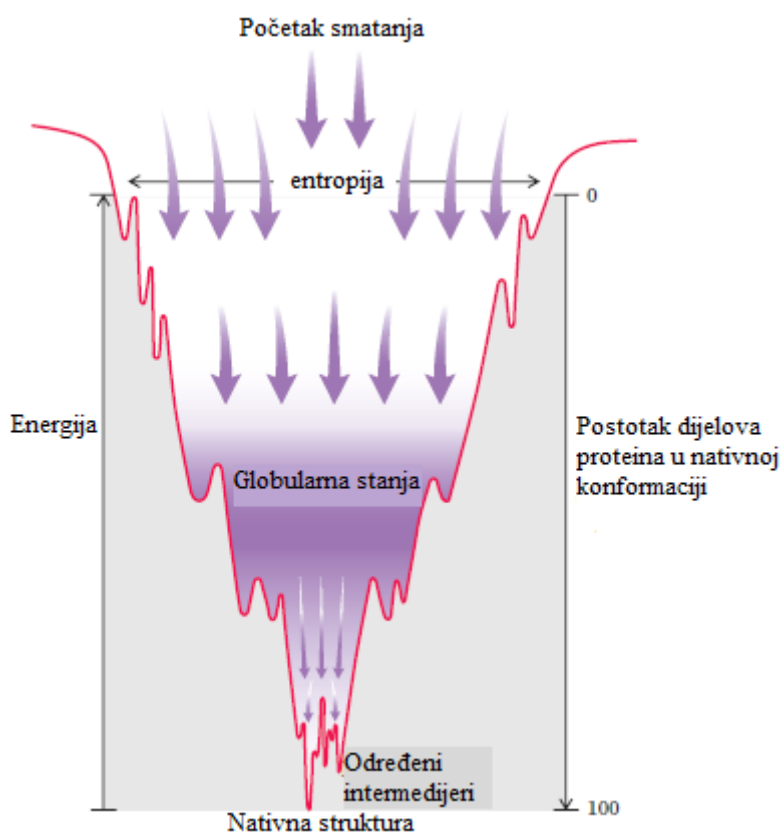
### 2.1. Proteini

Proteini su linearni polimeri aminokiselina i osnovni su biološki spojevi koji grade ljudsko tijelo. Unos esencijalnih aminokiselina prehranom, neophodan je za sintezu proteina na ribosomima uz neesencijalne aminokiseline koje se mogu sintetizirati u organizmu. Sinteza proteina odvija se u dva koraka: transkripcijom i translacijom. Transkripcija je proces koji se događa u jezgri eukariotske stanice, a podrazumijeva prepisivanje genetske upute iz DNA u glasničku RNA. Molekula glasničke RNA prenosi genetsku informaciju iz jezgre u citoplazmu gdje se nalaze ribosomi na kojima se odvija translacija. Translacija je prevođenje redoslijeda nukleotida glasničke RNA u redoslijed aminokiselina koje se pomoću transportne RNA prenose do ribosoma i međusobno povezuju peptidnim vezama u peptid. Točan kovalentni slijed aminokiselina naziva se primarna struktura proteina i ona određuje strukturu i funkciju samog proteina. Sekundarna struktura proteina odnosi se na prostorni raspored aminokiselina koje se u aminokiselinskom slijedu nalaze u blizini (lokalni dijelovi polipeptidnog lanca) pri čemu tvore stabilne periodičke elemente. Dva osnovna elementa sekundarne strukture jesu  $\alpha$ -zavojnica i  $\beta$ -ploče. Tercijarna struktura proteina opisuje cjelokupni trodimenzionalni raspored svih atoma u proteinu, koji je nastao smatanjem jednog polipeptidnog lanca, dok kvaterna struktura opisuje prostorni raspored više polipeptidnih lanaca koji zajedno čine oligomerni protein.<sup>2,3</sup>

#### 2.1.1. Pravilno smatanje proteina

Smatanje proteina odvija se hijerarhijski kako bi se postigla točna trodimenzionalna konformacija. Prvi korak jest smatanje elemenata sekundarnih struktura pri čemu nastaje lokalna struktura. Zatim dolazi do stvaranja kompaktnih smotanih strukturnih jedinica, domena, koje se na kraju povezuju u protein. Kada bi smatanje proteina bilo nasumično, prema Levinthalovom paradoksu, trebalo bi  $10^{77}$  godina da protein koji sadrži 100 aminokiselina postigne svoju nativnu konformaciju.<sup>4</sup> Dakle, pokazalo se da bi smatanje trajalo predugo i zaključuje se da protein neće postići svaku moguću konformaciju kako bi došao do

nativne, već se njegovo smatanje može termodinamički opisati lijevkom slobodne energije (slika 1). Pretpostavka je da smatanje proteina kreće od potpuno razmotanog oblika proteina koji posjeduje veliku vrijednost energije, ali je entropijski povoljan. Smatanjem proteina stvaraju se konformacijske promjene te se broj mogućih konformacija smanjuje što se predstavlja sužavanjem lijevka. Glavni cilj ovog procesa je postignut kada je moguća samo jedna konformacija koja se smatra nativnom. Smatanje proteina u nativnu konformaciju često je nespontano zbog čega im je potrebna pomoć molekulskih šaperona. Molekulski šaperoni su proteini koji se vežu na nesmotani protein te pomažu u pravilnom smatanju koristeći energiju oslobođenu hidrolizom ATP-a. Osim što šaperoni imaju veliku ulogu tijekom pravilnog smatanja novosintetiziranih proteina, njihova važnost opaža se i tijekom sprječavanja agregiranja krivo smotanih proteina jer imaju mogućnost razmotavanja krivo smotanih proteina te zatim potiču njihovo pravilno smatanje.

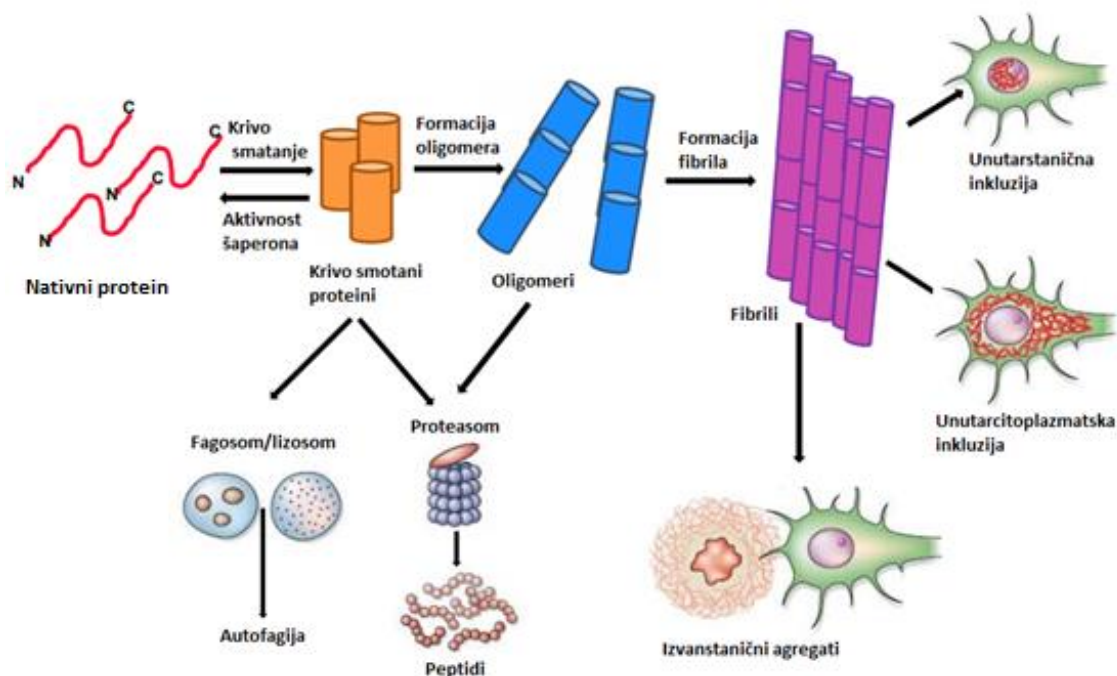


Slika 1. Lijevak slobodne energije koji termodinamički opisuje proces smatanja proteina u nativnu strukturu (ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 3)

## 2.2. Krivo smatanje proteina

Proteini su biološke strukture koje imaju široko područje djelovanja i velik broj funkcija u ljudskom tijelu zbog čega je vrlo važno da imaju pravilnu trodimenzionalnu strukturu kako bi ih mogli obavljati. Budući da je tercijarna struktura proteina često određena primarnom, promjene u kovalentnom slijedu aminokiselina u polipeptidnom lancu značajno utječu na pravilno smatanje proteina. Razlozi zbog kojih dolazi do pogrešnog smatanja proteina su mnogobrojni. Javljaju se mutacije kodirajućih dijelova DNA prilikom replikacije radi pogrešnog sparivanja komplementarnih baza, insercija i delecija, a pogrešno sparivanje baza može i tijekom transkripcije dovesti do krivo sintetiziranih RNA. DNA je glavna nositeljica nasljednih informacija što znači da su sve mutacije DNA trajne zato što se uvijek prenose na stanice kćeri, dok su mutacije RNA samo trenutne jer se neposredno nakon obavljanja svoje uloge, RNA razgrađuje. Mutacije mijenjaju primarnu strukturu proteina zbog čega protein potencijalno ne može postići nativnu konformaciju i gubi svoju funkciju pogrešnim smatanjem. Pod uvjetom da su procesi replikacije i transkripcije obavljeni točno, pogreška može nastati u procesu translacije, konkretno prilikom vezanja određene aminokiseline na pripadajuću tRNA (aminoaciliranje tRNA). Korak aminoaciliranja tRNA ima ključan utjecaj na točnost sinteze proteina zbog toga što nema kasnije provjere aminoacilirane tRNA, a postoji mogućnost da se na tRNA veže kriva aminokiselina zbog toga što su strukturne razlike između pojedinih aminokiselina vrlo male. Ne ispravi li se navedena pogreška pomoću enzima koji posjeduju dodatnu domenu za popravak, rezultat je krivo smotani protein bez odgovarajuće funkcije. Oksidativni stres, promjene uvjeta u stanicama kao što su povišena temperatura ili pH vrijednost te starenje, također, mogu utjecati na proces smatanja odnosno mogu pospješiti pogrešno smatanje proteina.<sup>3</sup> Pogrešno smotani proteini mogu biti potpuno degradirani u lizosomu ili u proteasomu ako su označeni pomoću privjeska ubikvitina koji obilježava proteine za uništavanje. Ovisno o okolini i uvjetima u kojoj se krivo smotani protein nalazi, može doći i do aktivacije mehanizama koji će spriječiti njihovo agregiranje, no postoji i mogućnost da će proteini ostati krivo smotani te asociirati i stvarati nakupine s  $\beta$ -nabranim pločama koje se nazivaju fibrili (slika 2).<sup>5</sup> Formiranje fibrila može postati pogubno po stanicu pri čemu nastupa stanična smrt. Kod Parkinsonove bolesti radi se o programiranoj staničnoj smrti, odnosno apoptozi koja se događa zbog prisutnosti toksičnih vrsta čiji je

mehanizam djelovanja nepoznat, no apoptoza je dokazana proučavanjem stanica mozga *post mortem*.<sup>21</sup>



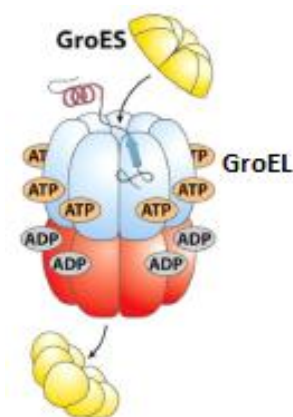
Slika 2. Putevi krivo smotanog proteina – vraćanje u nativnu konformaciju pomoću šaperona, agregiranje te razgradnja do peptida (ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 5)

### 2.2.1. Mehanizmi sprječavanja agregiranja krivo smotanih proteina

Nefunkcionalni krivo smotani proteini agregiranjem mogu postati vrlo štetni za stanicu u kojoj se nalaze zbog čega postoji niz mehanizama kojima se pokušava osigurati pravilno smatanje i funkcija proteina. Najvažniji mehanizam jest mehanizam pravilnog smatanja potpomognut šaperonima. Iako većina šaperona posjeduje mogućnost obavljanja više funkcija, može ih se podijeliti u tri skupine – foldaze, holdaze i unfoldaze. Foldaze imaju glavnu ulogu u smatanju proteina pri čemu troše energiju oslobođenu hidrolizom ATP-a. Holdaze se reverzibilno vežu na krivo smotani protein čime sprječavaju agregiranje i dodatno olakšavaju pravilno smatanje pomoću foldaza, dok unfoldaze mogu u potpunosti odmotati protein kako bi se mogao ponovno pravilno smotati ili pak degradirati.<sup>6, 22</sup> Molekulski šaperoni sprječavaju agregaciju nesmotanih i krivo smotanih proteina na način da s njima

intereagiraju i time olakšavaju pravilno smatanje ili pak ih translociraju u okolinu gdje se smatanje može nesmetano odvijati. Dva najviše proučavana oblika šaperona u živim bićima jesu šaperonini te proteinska obitelj Hsp70 u koju spadaju šaperoni molekulske mase od 70kD. Hsp70 proteini nalaze se u mitohondrijima, endoplazmatskom retikulumu i citosolu stanica te im je za pravilno funkcioniranje potreban ATP te košaperoni Hsp40 koji potiču hidrolizu ATP-a. Hidroliza i vezanje ATP-a na Hsp70, reguliraju interakcije s nesmotanim supstratima koji prolaze kroz ciklički proces. Kompleks Hsp70-ATP ima vrlo mali afinitet prema vezanju nesmotanog ili djelomično smotanog proteina zbog čega ciklički proces započinje vezanjem takvog proteina na Hsp40. Slijedi vezanje kompleksa Hsp40-protein na Hsp70-ATP pri čemu Hsp40 potiče hidrolizu ATP-a u ADP te se jedan fosfat otpušta u otopinu. Afinitet kompleksa Hsp70-ADP prema nesmotanom proteinu značajno poraste i čvrsto veže nesmotani protein koji koristi energiju oslobođenu hidrolizom ATP-a za pravilno smatanje u nativnu konformaciju. Otpuštanjem ADP-a i ponovnim vezanjem ATP-a na Hsp70, afinitet kompleksa Hsp70-ATP se smanjuje i protein disocira s površine kompleksa.<sup>2,3</sup>

Ukoliko se protein samo djelomično uspije smotati u procesu potpomognutom šaperonom Hsp70, on prolazi kroz još jedan proces u kojem glavnu ulogu imaju šaperonini. Usporedno sa šaperonima koji imaju utjecaj na nekovalentno vezanje nesmotanog proteina, no ne sudjeluju direktno u smatanju proteina, šaperonini aktivno sudjeluju u smatanju proteina što znači da podjedinice šaperonina prolaze kroz konformacijske promjene stvarajući šupljinu u kojoj je nesmotani protein izoliran te stvara interakcije s unutrašnjom površinom šaperonina što može ubrzati pravilno smatanje. Mehanizam smatanja pomoću šaperonina uključuje dvije jedinice: GroEL i GroES (slika 3). Proces smatanja započinje vezanjem nesmotanog proteina na GroEL jedinicu te vezanjem sedam molekula ATP-a na svaku od podjedinica GroEL-a. Hidroliza ATP-a i otpuštanje donje GroES podjedinice spregnuto je s konformacijskom promjenom GroEL-a. U sljedećem koraku opet dolazi do vezanja 7 molekula ATP-a te gornje GroES jedinice nakon čega slijedi hidroliza pri čemu se protein smata u pravilnu konformaciju i na kraju otpušta.<sup>2,3</sup>



Slika 3. Molekula šaperonina koja posjeduje GroEL te GroES podjedinicu (ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 2)

Mehanizmi olakšanog smatanja različitih proteina zahtjevaju i enzime čija je uloga ubrzanje reakcija. Prvi takav enzim jest disulfide-izomeraza koji katalizira izomerizaciju disulfidnih veza sve dok se ne stvore veze koje pripadaju nativnoj konformaciji pri čemu se eliminiraju sve konformacije u kojima dolazi do pogrešno povezanih dijelova strukture disulfidnim vezama. Peptid prolil-*cis-trans*-izomeraza je enzim koji katalizira interkonverziju *cis* i *trans* izomera peptidne veze zbog toga što stvaranje *cis*-peptidne veze usporava smatanje proteina.<sup>3</sup>

Postoji mogućnost da unatoč djelovanju šaperona i šaperonina, protein ostane krivo smotan. U tom slučaju dolazi do aktivacije određenog procesa, ovisno o uvjetima i okolini u kojoj se krivo smotani proteini nalaze, kojim se pokušava osigurati pravilna funkcija proteina nužna za rad stanice.

Nakupljanjem krivo smotanih proteina u lumenu endoplazmatskog retikuluma, dolazi do narušavanja homeostaze i pravilnog funkcioniranja endoplazmatskog retikuluma što je poznatije pod nazivom stres endoplazmatskog retikuluma. Proces odgovora na krivo smotane proteine jest stanični odgovor na pojačanu količinu krivo smotanih proteina, odnosno na stres endoplazmatskog retikuluma, čiji je glavni cilj očuvati ravnotežu nužnu za preživljavanje stanice. Odgovor na krivo smotane proteine uključuje pojačanu ekspresiju šaperona u endoplazmatskom retikulumu te privremeno utišavanje biosinteze proteina, to jest inhibiciju translacije proteina. Također, dolazi do povećanja volumena endoplazmatskog retikuluma poticanjem sinteze membranskih lipida te stvaranja interakcija između endoplazmatskog retikuluma i organela, posebice mitohondrija, što dovodi do bolje regulacije proteostaze i

usmjeravanja krivo smotanih proteina u kataboličke puteve. Proces odgovora na krivo smotane proteine podrazumijeva i razgradnju takvih proteina autofagijom ili ubikvitin-proteasom mehanizmom. Ukoliko je koncentracija krivo smotanih proteina prevelika te je proces odgovora na krivo smotane protein neučinkovit, senzori stresa endoplazmatskog retikuluma signaliziraju staničnu smrt.<sup>7, 8, 9</sup>

Proces odgovora na toplinski šok još je jedan stanični odgovor na stresne uvjete u stanici u kojima dolazi do razmatanja proteina. Transkripcijski faktor toplinskog šoka veže se u stresnim uvjetima za promotore gena za protein Hsp<sup>1</sup> čime potiče njihovu ekspresiju. Protein Hsp70 ima glavnu ulogu u mehanizmu odgovora na toplinski šok zbog toga što je naizraženiji u stanicama koje su podvrgnute toplinskom šoku, što je dokazano injektiranjem anti-Hsp70 antitijela koje je rezultiralo smanjenjem tolerancije stanice na povišenje temperature.<sup>10, 22</sup>

### 2.2.2. Razgradnja krivo smotanih proteina

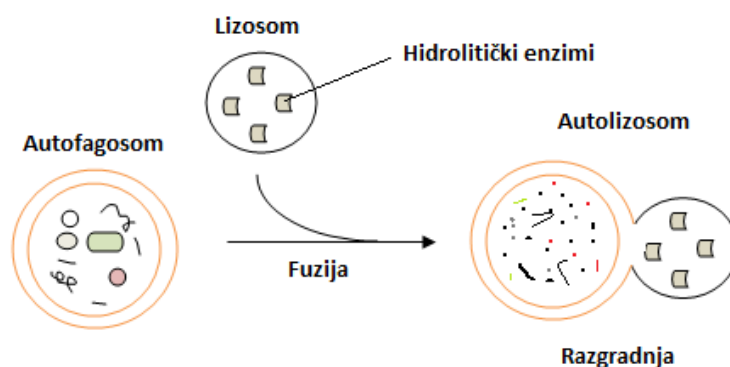
Broj funkcionalnih nosintetiziranih proteina je malen što je posljedica pogrešno zauzete prostorne strukture. Budući da su oštećeni i krivo smotani proteini vrlo štetni za rad stanice, moraju se ukloniti. Potpuna degradacija krivo smotanih proteina može se odvijati ili u lizosomu ili pak se razgrađuju ubikvitin-proteasom mehanizmom.

Lizosom je organel koji posjeduje niz hidrolitičkih enzima pomoću kojih uspjeva razgraditi krivo smotane citosolne proteine i ostale organele na način da fuzionira s autofagosomom, vezikulom s dvostrukom membranom koja sadrži stanični materijal određen za razgradnju. Autofagosom nastaje iz fagofore, dvostruke membrane koja se procesom elongacije izdužuje i zatvara, a pritom izolira stanične organele i proteine koje je potrebno razgraditi. Fuziju lizosoma i autofagosoma omogućuju *SNARE*<sup>2</sup> proteini pri čemu nastaje autolizosom u kojem se odvija sama razgradnja proteina (slika 4).<sup>11</sup>

---

<sup>1</sup> engl. *Heat Shock Proteins*

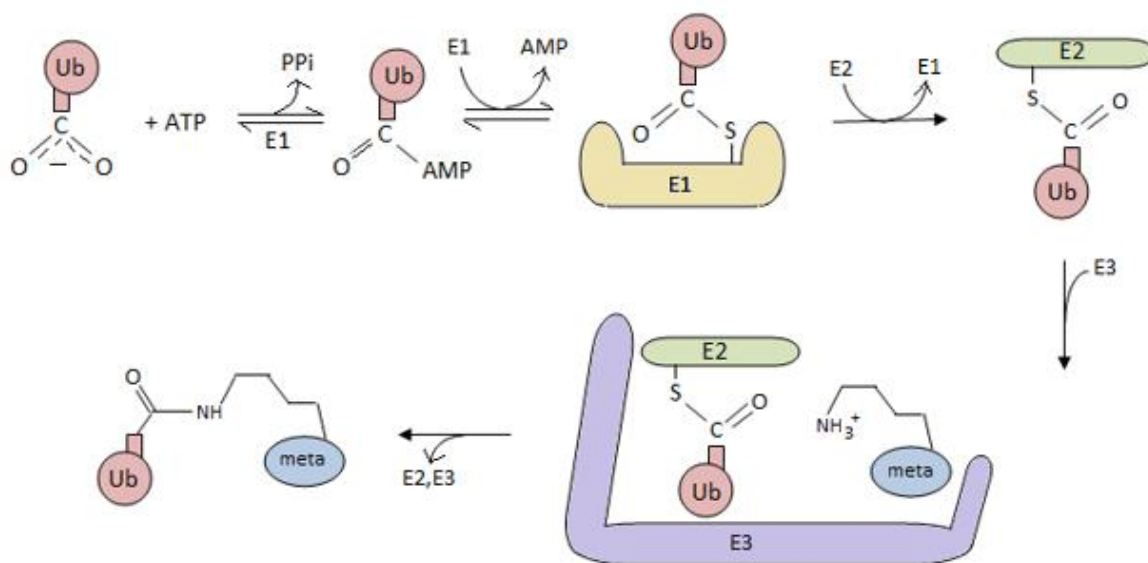
<sup>2</sup> engl. *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*



Slika 4. Shema nastanka autolizosoma u kojem se odvija razgradnja krivo smotanih proteina i ostalih staničnih organela

Drugi način razgradnje krivo smotanih proteina jest pomoću ubikvitin-proteasom mehanizma. Ubikvitin je privjesak, mali protein od 76 aminokiselina, koji se preko glicinskog ostatka na C-kraju kovalentno veže na bočni ogranak aminokiseline lizin izopeptidnom vezom i na taj način obilježava protein za razgradnju. Za stvaranje izopeptidnih veza potrebna je energija koja potječe od hidrolize ATP-a, a za samo vezanje ubikvitina potrebna su tri enzima koji ubrzavaju taj proces smanjenjem energije aktivacije. Prvi korak jest vezanje C-terminalne karboksilatne skupine ubikvitina sa sulfhidrilnom skupinom enzima za aktivaciju ubikvitina (E1). Reakcija je potpomognuta vezanjem molekule ATP-a za C-terminalnu karboksilatnu skupinu pri čemu se otpušta pirofosfat. Aktivirani ubikvitin se zatim prenosi na sulfhidrilnu skupinu ubikvitin-konjugirajućeg enzima (E2) te slijedi zadnji korak u kojem ubikvitin-protein-ligaza (E3) katalizira prijenos ubikvitina s E2 na bočni ogranak određene aminokiseline krivo smotanog proteina (slika 5). Dolazi li do vezanja više ubikvitinskih molekula zaredom, povećava se djelotvornost za usmjeravanje krivo smotanog proteina u katabolički put. Sama razgradnja proteina obilježenog ubikvitinom odvija se u proteasomu 26S, strukturi koja se sastoji od dvije regulatorne jedinice 19S i katalitičke srži 20S. Podjedinica 19S specifično se veže na poliubikvitinske lance osiguravajući razgradnju samo obilježenih proteina. Hidroliza molekule ATP-a potpomaže razmatanje proteinskih supstrata i njihov ulazak u katalitičku srž gdje se supstrati razgrađuju na peptide, bez otpuštanja međuprodukata reakcije.<sup>11</sup>





Slika 5. Shema obilježavanja ciljanog krivo smotanog proteina ubikvitinom pomoću enzima E1, E2 i E3

### 2.2.3. Agregiranje

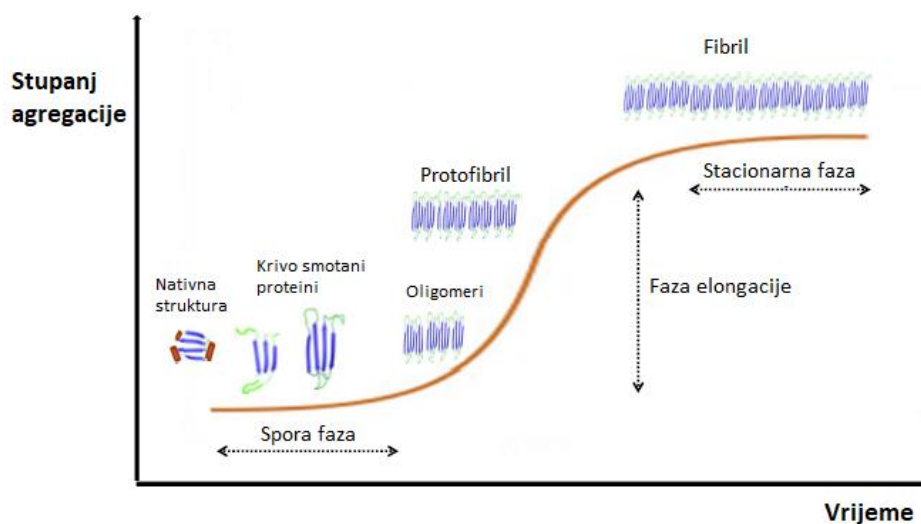
Unatoč organiziranom sistemu kontrole kvalitete proteina koji se nalaze u stanicama, velik broj proteina ne uspeva se smotati u nativnu konformaciju što rezultira agregiranjem. Agregiranje krivo smotanih proteina javlja se kada hidrofobni dijelovi proteina, koji se inače nalaze u samoj srži nativne konformacije, postaju izloženi te stvaraju hidrofobne interakcije s dijelovima ili cijelim regijama drugog krivo smotanog proteina. Stvaraju se veliki filamenti netopljivi u vodenom mediju koji sadrže i karakteristične križne  $\beta$ -nabrane strukture u kojima se  $\beta$ -ploče pružaju okomito na os nakupine te se stabilizacija postiže međumolekulskim interakcijama između okosnica  $\beta$ -ploča koje predstavljaju najpovoljniji oblik agregata jer mogu sadržavati gotovo neograničen broj polipeptidnih lanaca. Filamenti se povezuju u amiloidne fibrile kao oblik agregata koji se najčešće pojavljuje kod neurodegenerativnih bolesti, koji se nakupljaju u jezgri ili citoplazmi pogođene stanice ili se pak nalaze u izvanstaničnom prostoru. Osim amiloidnih fibrila, krivo smotani proteini mogu stvarati i amorfne agregate te manje oligomere (slika 6). Dok amiloidni fibrili imaju linearnu strukturu koja sadrži križne  $\beta$ -nabrane strukture te imaju visoki stupanj uređenosti, amorfni agregati sadrže više tipova struktura te nemaju uređene intermolekulske interakcije. Agregiranje krivo smotanih proteina uzrokuje mnoge bolesti zato što dolazi do stvaranja toksičnih produkata čiji

mehanizmi djelovanja još nisu poznati, no uzrokuju oštećenja stanica koja vode do njihovog odumiranja. Glavni faktori koji doprinose agregiranju jesu visoka hidrofobnost i komplementarnost naboja proteinskih ostataka te sklonost stvaranju  $\beta$ -ploča.<sup>5</sup>



Slika 6. Oblici agregata nastalih nakupljanjem krivo smotanih proteina (ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 2)

Agregiranje krivo smotanih proteina odvija se u tri faze. Prva faza podrazumijeva početak agregiranja krivo smotanih proteina karakteriziran stvaranjem agregacijske jezgre koja nastaje iz male količine krivo smotanih oligomernih struktura. Oligomeri su topljive, manje nakupine krivo smotanih proteina najčešće veličine od dimera do 24-mera. To je ujedno i najsporiji korak u čitavom procesu agregacije pa određuje i samu brzinu agregiranja. Jednom kada nastane agregacijska jezgra, daljnji rast agregata jest eksponencijalan jer dolazi do asocijacije monomera i oligomera s već nastalom agregacijskom jezgrom u protofibrile. Protofibrili su strukture koje sadrže tanke niti filamenata te imaju visoki udio križnih  $\beta$ -nabranih struktura. Protofibrili jesu prekursori za nastanak fibrila, nerazgranatih struktura koje su također, bogate  $\beta$ -pločama i mogu se nalaziti unutar ili izvan stanice (slika 7). Prisutnost ovakvih netopljivih agregata povezana je s razvojem bolesti pri čemu se, prema istraživanjima, protofibrili smatraju najviše toksičnima za stanicu, no još uvijek nije u potpunosti razjašnjen mehanizam kojim te strukture ostvaraju toksičan učinak.<sup>5</sup>



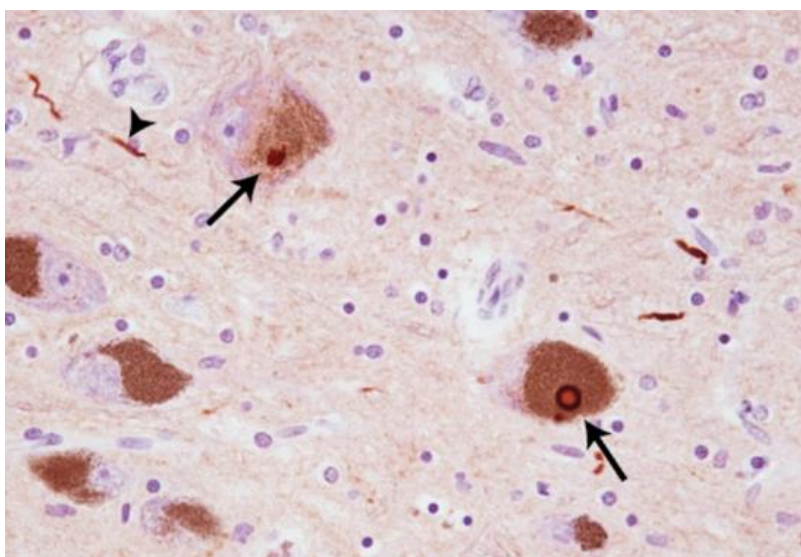
Slika 7. Postepeno stvaranje agregata krivo smotanih proteina kroz tri faze: sporu fazu, fazu elongacije te stacionarnu fazu (ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 5)

### 2.3. Parkinsonova bolest

Sve neurodegenerativne bolesti imaju zajedničku poveznicu, a ta je da se razvijaju zbog pogrešnog smatanja proteina i njihovog agregiranja budući da se prethodno nisu uspjeli razgraditi ili vratiti u nativnu strukturu. Također, sve neurodegenerativne bolesti oštećuju centralni živčani sustav zbog odumiranja neurona. Najpoznatije istražene neurodegenerativne bolesti jesu Alzheimerova, Huntigtonova, Parkinsonova bolest, amiotrofična lateralna skleroza te transmitivna spongiformna encefalopatija od kojih svaka ima ključni protein koji se krivo smata u određenom dijelu mozga gdje se potom stvaraju unutarstanični ili izvanstanični agregati koji uzorukuju gubitak neurološke funkcije i smrt stanica popraćene brojnim simptomima po oboljelu osobu.

Parkinsonova bolest druga je najzastupljenija neurodegenerativna bolest u svijetu. Razvija se kao posljedica stanične smrti dopaminergičkih neurona koji su glavni izvor dopamina u centralnom živčanom sustavu sisavaca te agregiranja krivo smotanih proteina  $\alpha$ -sinukleina stvarajući tako Lewy-jeva tjelešca. Dopaminergički neuroni nalaze se u dijelu mozga bogatim dopaminom i visokim udjelom željeza koji se naziva supstancija nigra. Glavne funkcije dopaminergičkih neurona uključuju samokontrolu pokreta te široki raspon karakteristika ponašanja osobe kao što su raspoloženje, ovisnost i stres. Smrt dopaminergičkih neurona i

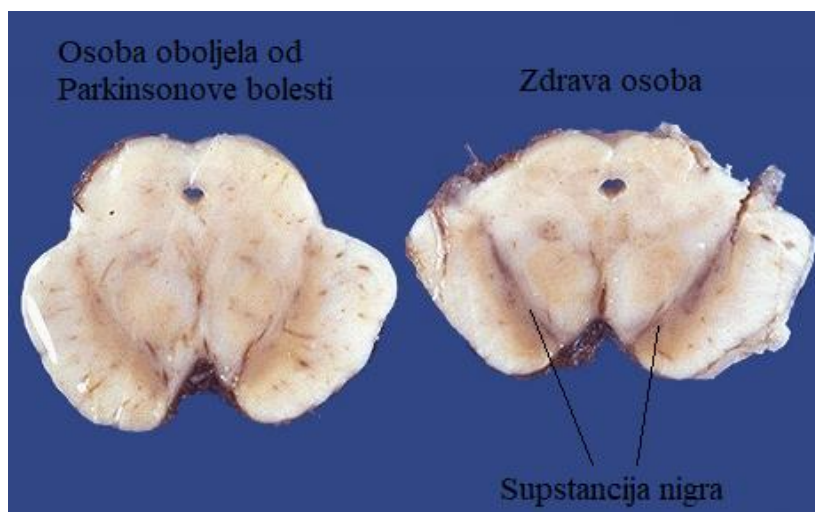
gubitak navedenih funkcija uzrokuje različite simptome Parkinsonove bolesti poput nekontroliranog podrhtavanja tijela (tremor), otežano izvođenje motoričkih sposobnosti, rigidnost, nestabilnost i depresija. Osim smrti dopaminergičkih neurona, nastanak Lewy-jevih tjelešca unutar ili izvan živčanih stanica mozga, važan je pokazatelj da se razvija Parkinsonova bolest. Lewy-jeva tjelešca jesu agregati koji nastaju zbog krivog smatanja proteina  $\alpha$ -sinukleina što je specifično upravo za ovu neurodegenerativnu bolest koja se razvija kao posljedica toksičnog učinka agregata.<sup>7</sup> Dijagnoza se postavlja neuroslikovnim prikazom, uporabom radioaktivnih liganada u medicinskim tehnikama *SPEC*<sup>3</sup> i *PET*<sup>4</sup>, dok se histološkopatološkom analizom *post mortem* potvrđuje gubitak neurona supstancije nigre zbog čega se gubi originalno crna boja i supstancija nigra postaje svjetlija zbog manje pigmentacije (slika 9) te se u gotovo svim regijama centralnog živčanog sustava mogu vidjeti Lewy-jeva tjelešca (slika 8).<sup>1</sup>



Slika 8. Lewy-jeva tjelešca i Lewy-jevi neuriti (prikazani strelicama) (ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 12)

<sup>3</sup> engl. *Single-photon emission computed tomography*

<sup>4</sup> engl. *Positron emission tomography*

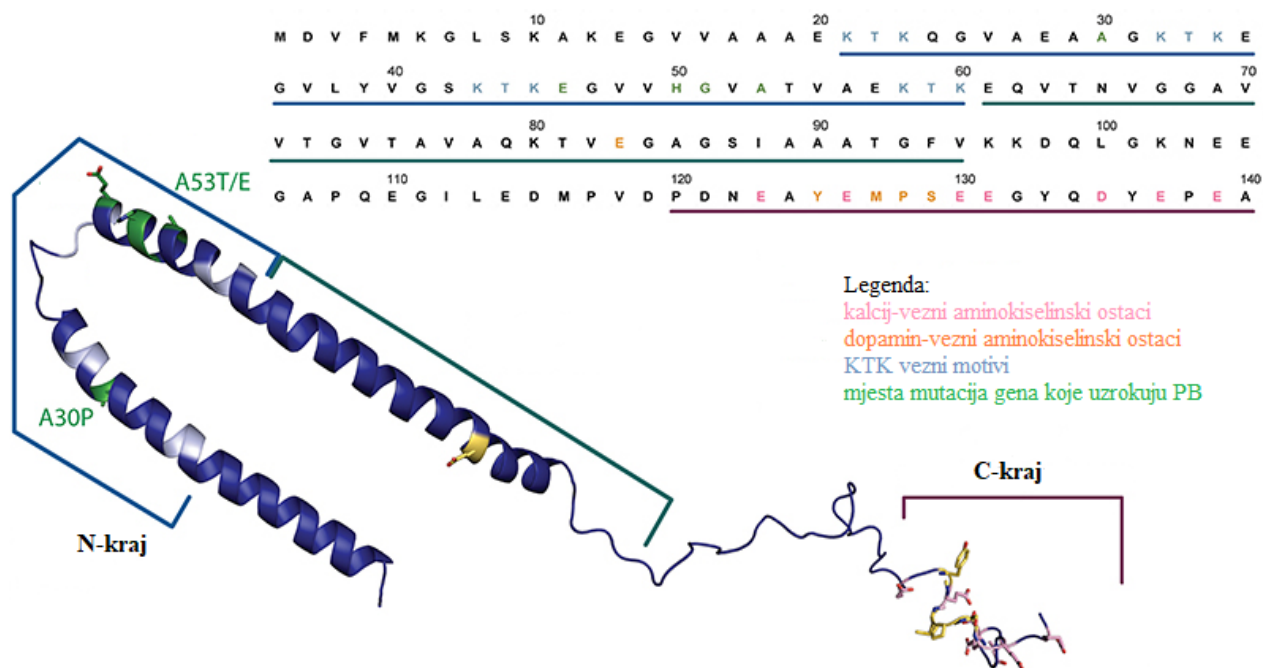


Slika 9. Prikaz supstancije nigre kod zdrave osobe (desno) te kod osobe oboljele od Parkinsonove bolesti (lijevo) gdje se uočava manja pigmentacija (ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 13)

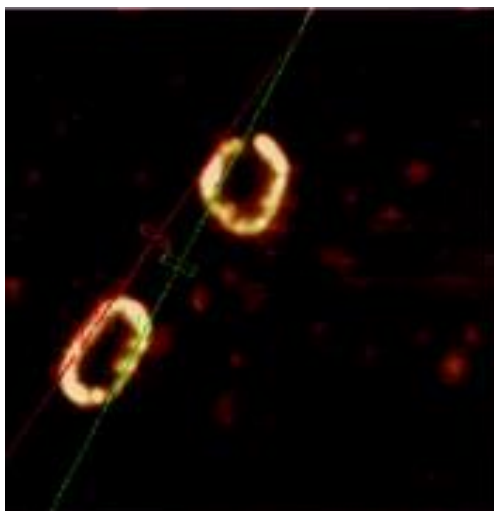
Parkinsonova bolest može se okarakterizirati kao primarna ili sekundarna Parkinsonova bolest. Postoje dva oblika primarne Parkinsonove bolesti: sporadični (s kasnim početkom simptoma) te porodični (s ranim početkom simptoma). Porodična Parkinsonova bolest razvija se zbog mutacije gena (*SNCA*) za protein  $\alpha$ -sinuklein koji se može duplicirati ili triplicirati te protein iz topljivog oblika prelazi u netopljiv oblik koji se nakuplja i stvara Lewy-jeva tjelešca. Istražuje se i mutacija gena nazvanog Parkin, gena za E3-ubikvitin-ligazu, koja dovodi do razvoja drugačijeg oblika Parkinsonove bolesti. Narušavaju se motoričke sposobnosti zbog gubitka neurona, ali se ne javlja demencija jer ne dolazi do krivog smatanja  $\alpha$ -sinukleina te se ne stvaraju Lewy-jeva tjelešca (još nije poznato zašto je tome tako). Sekundarna Parkinsonova bolest ne razvija se kao posljedica krivog smatanja proteina, već može biti izazvana korištenjem lijekova poput rezerpina koji blokira receptore za dopamin te toksinima koji oštećuju dopaminergičke neurone.<sup>1</sup>

### 2.3.1. Protein $\alpha$ -sinuklein

Glavna uloga proteina  $\alpha$ -sinukleina koji se sastoji od 140 aminokiselina (slika 10) jest regulacija otpuštanja neurotransmitera u sinaptičku pukotinu zbog čega njegovo krivo smatanje značajno utječe na rad centralnog živčanog sustava. Unatoč tome što je točan mehanizam kojim krivo smatanje proteina uzrokuje toksičan učinak i razvoj bolesti nepoznat, istraživanja su pokazala da je krivo smatanje proteina  $\alpha$ -sinukleina glavni pokretač razvoja Parkinsonove bolesti jer dolazi do disfunkcije sinapse i smrti neurona. Poznate su dvije mutacije gena za  $\alpha$ -sinuklein protein koje uzrokuje njegovo pogrešno smatanje, A30P i A53T. Agregiranjem krivo smotanih proteina  $\alpha$ -sinukleina stvaraju se  $\alpha$ -sinuklein oligomeri, strukture ključne za induciranje toksičnog efekta. Oligomeri imaju strukturu cilindra, no mutacije istog gena na različitim pozicijama uzrokuju i različite oblike oligomera pa tako oligomeri nastali zbog mutacije A30P imaju prstenaste strukture nalik porama, dok su kod oligomera nastalih mutacijom A53T, te strukture u obliku prstena i elipsa (slika 11). Neka istraživanja pokazuju da oligomeri manje molekulske mase induciraju toksičan efekt, no nemaju preferenciju za stvaranje nakupina, dok oligomeri mnogo veće molekulske mase imaju suprotne karakteristike, odnosno nisu toksični, no stvaraju nakupine krivo smotanih proteina. Prisutnošću  $\alpha$ -sinuklein oligomera u degenerativnim regijama u mozgu oboljele osobe te njihovim formiranjem u brojim pokusima *in vitro*, dokazano je da su  $\alpha$ -sinuklein oligomeri toksični. Zasigurno uzrokuju staničnu smrt, no mehanizam djeovanja toksina nije potvrđen pa se pretpostavlja da je stanična smrt posljedica narušavanja fizioloških uvjeta u stanici i elektrokemijskog gradijenta, sprječava se razgradnja krivo smotanih proteina te se oštećuju organeli poput mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma što je uzrok gubitka njihovih funkcija.<sup>12,14</sup>



Slika 10. Aminokiselinski slijed i struktura proteina  $\alpha$ -sinukleina koja sadrži zeleno označene dijelove podložne mutaciji koja rezultira razvojem Parkinsonove bolesti (ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 23)



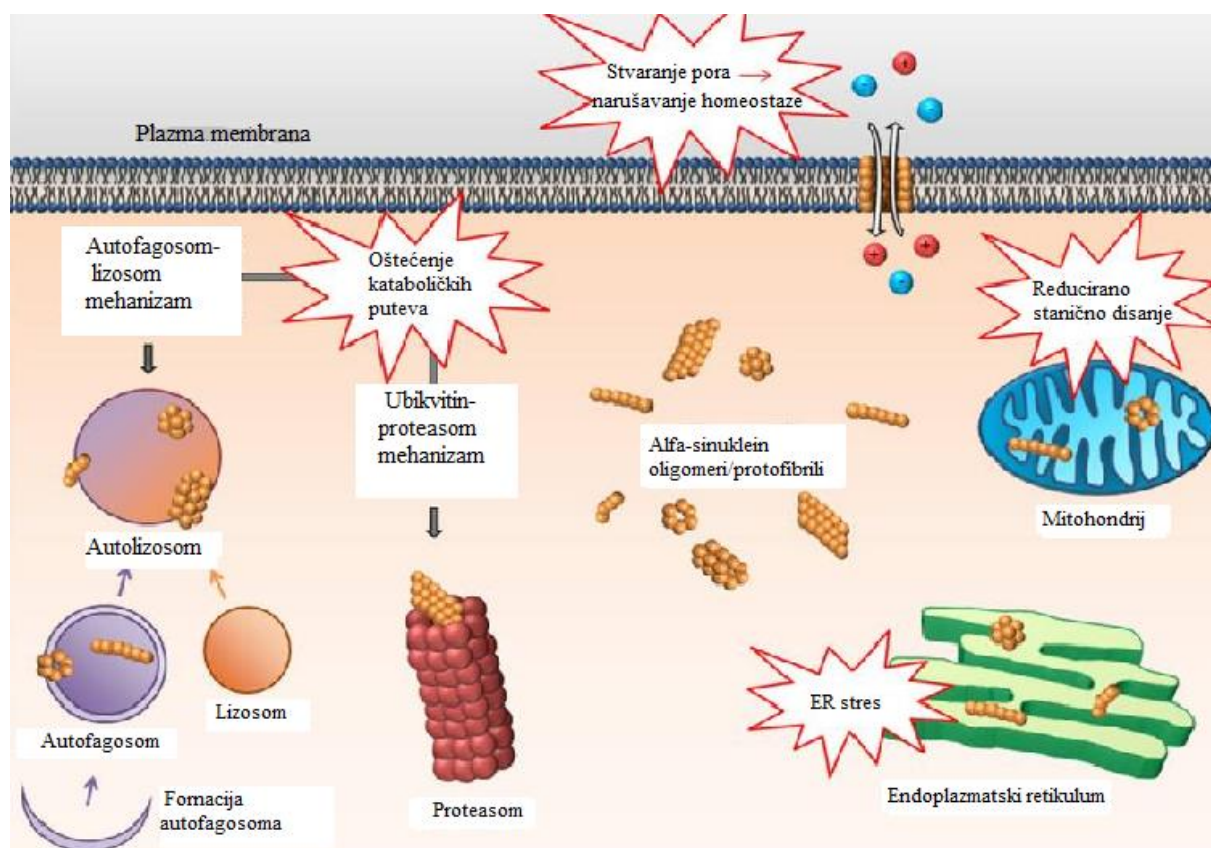
Slika 11. Uzorak  $\alpha$ -sinuklein oligomera (mutacija A53T) površine  $400\text{nm}^2$ . Prikazana je prstenasta struktura na vrhu i struktura u obliku elipse na dnu (ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 24)

### ***2.3.2. Predloženi mehanizmi toksičnosti $\alpha$ -sinuklein oligomera***

Nastanak  $\alpha$ -sinuklein oligomera može biti unutarstanični ili izvanstanični pa u skladu s time, brojna istraživanja su se provodila ne bi li se saznalo na koji način su pogođeni različiti organi unutar i izvan stanice prilikom djelovanja toksičnih  $\alpha$ -sinuklein oligomera.

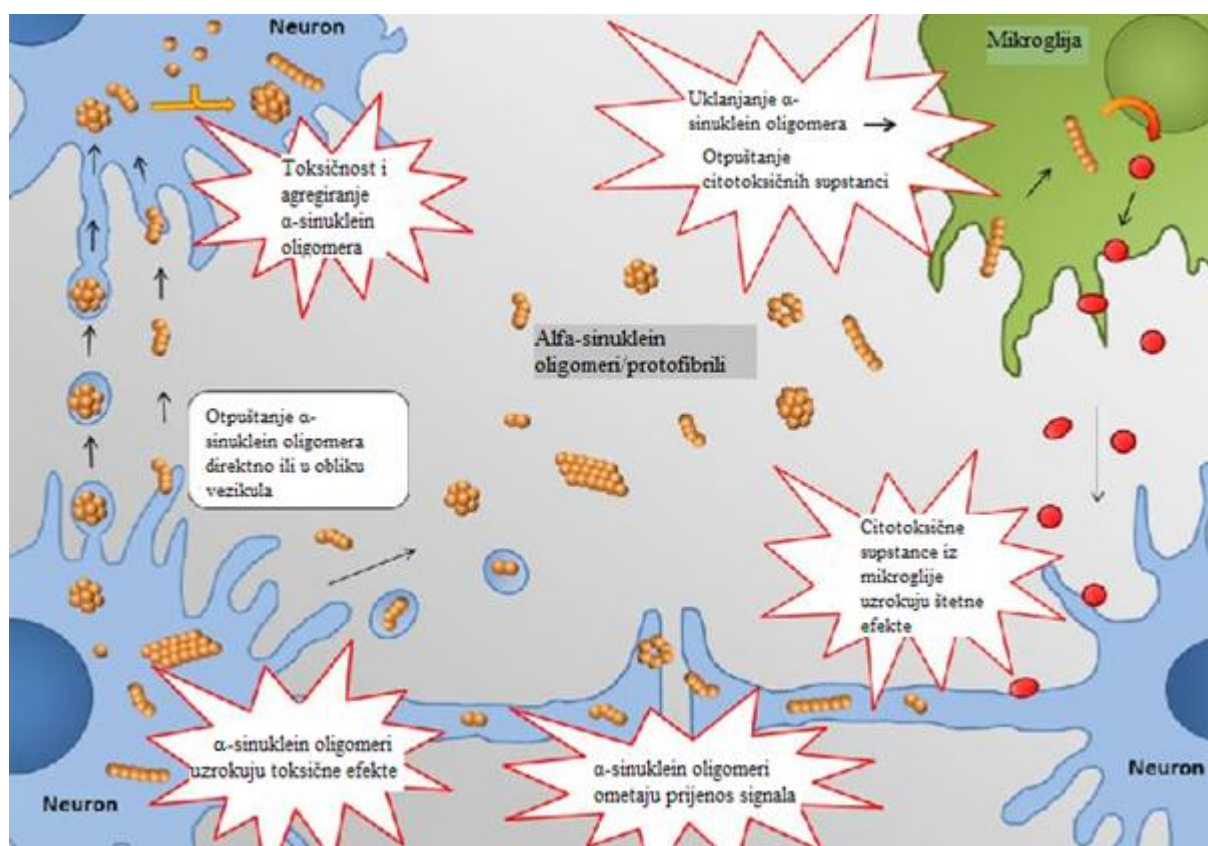
Unutar stanice,  $\alpha$ -sinuklein oligomeri mogu djelovati poput različitih toksina pa između ostalog, mogu narušiti homeostazu stanice stvarajući pore u membrani pri čemu dolazi do propuštanja iona iz izvanstaničnog prostora. Budući da je lipidni dvosloj kod zdrave osobe nepropusan za nabijene ione i molekule, stvaranjem pora i prolaskom iona kroz membranu dolazi do narušavanja elektrokemijskog gradijenta što je letalno za stanicu. Toksičnosti  $\alpha$ -sinuklein oligomera pripisuje se i oštećenje struktura zaslužnih za razgradnju krivo smotanih proteina, primjerice oštećenje struktura u ubikvitin-proteasom mehanizmu. Istraživanja su pokazala da  $\alpha$ -sinuklein oligomeri utječu i na važne organele poput mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma. Pretjerana ekspresija mutiranih gena A30P i A53T zaslužnih za nastajanje  $\alpha$ -sinuklein oligomera koji se mogu nalaziti u mitohondriju stanice, smanjuju mitohondrijski transmembranski potencijal te kompromitiraju stanično disanje. Dolazi i do krivog smatanja protein-kinaze-I koja ima visoki obrtaj kod zdravih osoba, no kod osoba s Parkinsonovom bolešću nakuplja se na vanjskoj membrani oštećenog mitohondrija. Time se sprječava pojačano djelovanje E3-ubikvitin-ligaze koja veže ubikvitinske lance na krivo smotane mitohondrijske proteine i oslobađaju se kisikove reaktivne vrste.<sup>19</sup> Prisutnost agregiranih krivo smotanih proteina uzrokuje također, stres endoplazmatskog retikuluma što naposljetku dovodi do neurodegeneracije (slika 12).<sup>12</sup>





Slika 12. Unutarstanične mete pogođene  $\alpha$ -sinuklein oligomerima (ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 12)

Izvan stanice  $\alpha$ -sinuklein oligomeri mogu djelovati kao slobodni proteinski agregati ili postoje u obliku različitih izvanstaničnih vezikula čiji je toksični učinak, kao i kod unutarstaničnih oligomera, usmjeren prema neuronima (slika 13). Neuronima zahtjevaju zdravu sinapsu zbog važne biološke funkcije koju posjeduju – prijenos živčanog signala. Poznato je da protein  $\alpha$ -sinuklein ima ulogu u regulaciji *SNARE* kompleksa na sinapsi potrebnih za fuziju sinaptičkih vezikula s membranom. Vežanjem  $\alpha$ -sinuklein oligomera na sinaptobrevin, komponentu *SNARE* kompleksa, sprječava se formiranje *SNARE* kompleksa i smanjuje se otpuštanje neurotransmitera što onemogućuje prijenos živčanog signala.<sup>14</sup> Starenje je još jedan potencijalan uzrok toksičnosti i nakupljanja velikog broja  $\alpha$ -sinukleina. Pokazano je da starenje ima utjecaj na fagocitozu odnosno na mikrogliju koja se nalazi u centralnom živčanom sustavu i ima funkciju makrofaga. Mikroglija je tip stanica zadužen za uklanjanje staničnih fragmenata i mrtvih neurona iz živčanog tkiva, a starenje utječe na postupan gubitak funkcije mikroglije čime se smanjuje uklanjanje toksičnih  $\alpha$ -sinukleina fagocitozom.<sup>12</sup>

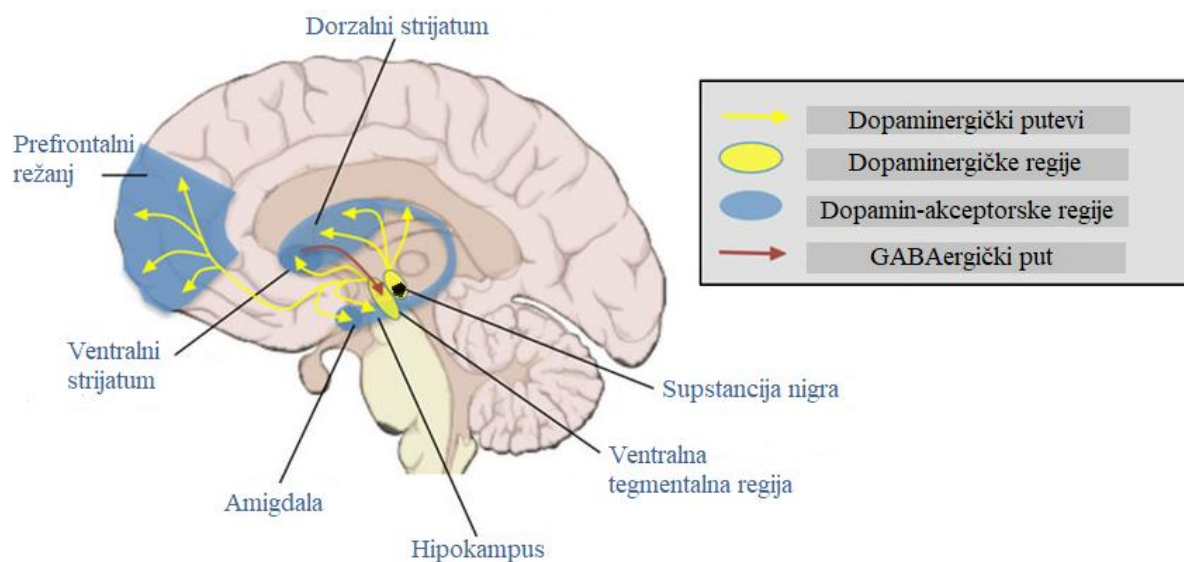


Slika 13. Izvanstanične mete pogođene  $\alpha$ -sinuklein oligomerima (ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 12)

### 2.3.3. Supstancija nigra i dopaminergički neuroni

Dopaminergički neuroni smješteni u supstanciji nigri čija je lokacija u srednjem mozgu, glavnu ulogu imaju u regulaciji motoričkih sposobnosti i nastanku dopamina te su nužni za mentalno i fizičko zdravlje osobe. Dopamin je jedan od najbolje istraženih neurotransmitera te se identifikacija i lokalizacija dopamina u mozgu može vizualizirati obradom s fluorescentnim monoaminima. Dopaminergički neuroni heterogeni su po sastavu što znači da se sastoje od nekoliko vrsta stanica. Sustav dopaminergičkih neurona podijeljen je u nekoliko puteva od kojih je nigro-strijatalni put najrelevantniji za Parkinsonovu bolest (slika 14). Nigro-strijatalni put započinje u *pars compacta* dijelu supstancije nigre i proteže se do dorzalnog strijatuma, a njegova uloga je kontrola voljnih pokreta. Gomilanje umrlih dopaminergičkih neurona u putevima centralnog živčanog sustava, rezultira različitim oštećenjima, no sami mehanizmi

zbog kojih dolazi do smrti neurona još nisu poznati. Metabolički put dopaminergičkih neurona uključuje visoki udio oksidativnih vrsta zbog čega se pretpostavlja da bi oksidativni stres mogao uzrokovati njihovu smrt. Oksidacija dopamina može se dogoditi spontano ili biti katalizirana enzimatskom reakcijom u kojoj sudjeluje monoamin-oksidaza pri čemu nastaje niz toksičnih spojeva uključujući vodikov peroksid, kisikove radikale, semikinone i kinone. U Parkinsonovoj bolesti gubitak neurona odvija se u osjetljivom području nigro-strijatalnog puta što rezultira smanjenjem dopamina u strijatumu, dijelu mozga odgovornim za motoričke simptome. Lezije koje se javljaju izvan nigro-strijatalnog puta, a uključuju noradrenergički, mezolimbčki, mezikorteksalni i kolinergički put, uzrokuju kognitivna i psihološka oštećenja poput demencije.<sup>15</sup>



Slika 14. Prikaz lokacije supstancije nigre te dopaminergičkih puteva važnih za mentalno i fizičko zdravlje osobe (ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 16)

#### 2.3.4. Posljedice gubitka dopamina, acetilkolina i noradrenalina

Prvi primjećeni simptomi Parkinsonove bolesti jesu tremor koji predstavlja nekontrolirane oscilirajuće pokrete, rigidnost i nestabilnost, no javljaju se i drugi pozadinski simptomi koji se često mogu najranije razviti, ali ih je teže prepoznati. To su demencija, anksioznost,

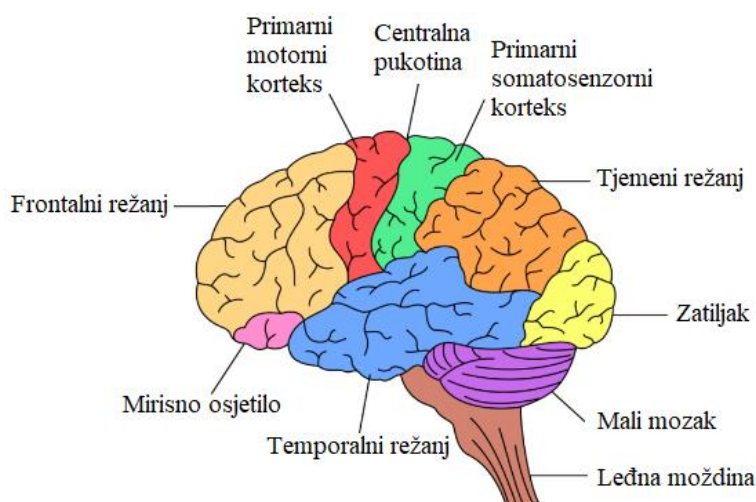
insomnija, depresija, halucinacije te slabljenje vizualno-prostornih vještina. Patološki se Parkinsonova bolest karakterizira odumiranjem neurona supstancije nigre i prisutnošću nakupina, Lewy-jevih tjelešca koje najviše pogađaju domene kognitivnih sposobnosti. Lewy-jeva tjelešca sastoje se od fibrila proteina  $\alpha$ -sinukleina. Različita istraživanja pokazala su da Lewy-jeva tjelešca nisu ta koja stvaraju toksičan efekt, već su to zapravo  $\alpha$ -sinuklein oligomeri, prekursori za nastanak Lewy-jevih tjelešca, koje je puno teže detektirati histološkom analizom. Lewy-jeva tjelešca se tako smatraju zaštitnim oblikom zbog toga što toksične oligomere drže na okupu.<sup>14</sup>

Demencija kod Parkinsonove bolesti spada u skupinu demencija uzrokovanih nakupljanjem Lewy-jevih tjelešaca. Demencija je naziv za skupinu simptoma, prvenstveno gubitak pamćenja, a potom i oštećenja kognitivnih sposobnosti poput planiranja, abstraktnog razmišljanja, rješavanja problema te izvršavanja zadataka. Progresijom bolesti, demencija pogađa čak 90% osoba oboljelih od Parkinsonove bolesti. Sastav pogođenih stanica je heterogen pa osim Lewy-jevih tjelešca, u sastavu stanice mogu se pronaći i senilne ploče te neurofibrilarne inkluzije što uvelike otežava otkriće točnog mehanizma na kojem se temelji razvoj demencije Parkinsonove bolesti te pronalazak efikasne terapije.<sup>17</sup>

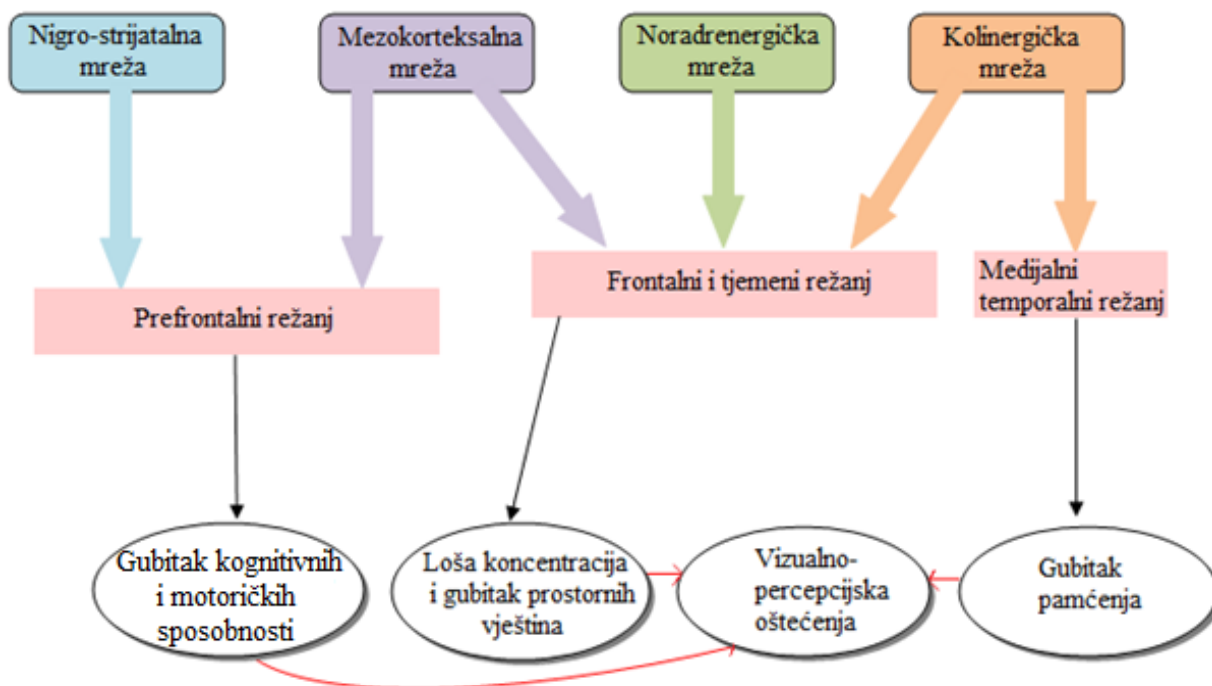
Prefrontalni režanj ima ključnu ulogu u razvoju kognitivnih sposobnosti te je ovisan o dopaminu. Budući da razvojem Parkinsonove bolesti odumiru dopaminergički neuroni te je koncentracija dopamina manja, dolazi i do postepenog gubitka kognitivnih sposobnosti jer prefrontalni režanj ne dobiva dovoljno dopamina preko dopaminergičkog puta, za izvršavanje svojih funkcija. Mezikorteksalni i mezolimbčki putevi započinju u ventralno tegmentalnoj regiji te imaju glavnu funkciju u kontroli emocionalnog ponašanja osobe. Pretpostavlja se, na temelju istraživanja, da u ranijim stadijima bolesti, mezikorteksalna živčana mreža može djelomično zamijeniti ulogu oštećenog prefrontalnog režnja, sve dok i ona ne postane previše oštećena i gubi funkciju.<sup>17</sup>

Gubitak dopamina u dopaminergičkim putevima svakako objašnjava niz simptoma koji se javljaju tijekom razvoja Parkinsonove bolesti, no istraživanja su pokazala da oštećenja zahvaćaju i druge neurotransmitere poput acetilkolina i noradrenalina koji također, utječu na psihičko zdravlje osobe. Oslobođanje noradrenalina u prefrontalnom režnju olakšava obavljanje kognitivnih radnji zbog čega oštećenjem dolazi do gubitka te funkcije, osoba gubi osjećaj odgovornosti i mogućnost obavljanja zadataka. Gubitak acetilkolina uzrokuje poteškoće u prijenosu signala između površinskih dijelova mozga te se narušava sprega

oscilacija induciranih otpuštanjem acetilkolina između medijalnog temporalnog režnja i korteksa, nužna za pohranjivanje podataka kod čovjeka. Oštećenja medijalnog temporalnog režnja (slika 15) odgovornog za pohranu i pronalaženje podataka, uzrokuju jedan od najčešćih simptoma Parkinsonove bolesti – gubitak pamćenja. Oštećenja noradrenergičkog i kolinergičkog puta uzrokuju još i simptome poput otežane orijentacije i snalaženje u prostoru te loše koncentracije. Klinička istraživanja pokazala su da se kod osoba oboljelih od Parkinsonove bolesti mogu javiti i vizualne halucinacije za koje se pretpostavlja da nastaju zbog oslabljene kontrole pogrešaka u percepciji i vizualnom korteksu, nastale kao nuspojava oštećenja živčanih mreža u glavnim režnjevima mozga (slika 16).<sup>17</sup>



Slika 15. Glavni dijelovi mozga koji se postepeno oštećuju progresijom Parkinsonove bolesti (ilustracija preuzeta i prilagođena prema ref. 18)



Slika 16. Shematski prikaz posljedica oštećenja određenih živčanih mreža i režnjeva mozga kod osobe oboljele od Parkinsonove bolesti

## 2.4. Terapija

Efikasni sustav kontrole smatanja proteina mora biti povezan sa sustavom za razgradnju krivo smotanih proteina kako bi se ostvarila zaštita neurona od toksičnih oligomera i prevencija od agregiranja. Trenutne poznate terapije samo ublažavaju simptome jer još uvijek nije poznata terapija koja bi u potpunosti izliječila Parkinsonovu bolest. Različita istraživanja provode se proučavanjem neurona na koje utječu mutacije povezane s Parkinsonovom bolesti, najčešće na životinjskim modelima ili proučavanjem mozгова oboljelih i zdravih osoba *post mortem*.<sup>19</sup>

Krivo smatanje proteina uzrokuje brojne posljedice po oboljelu osobu, no neprestano se razvijaju nove metode liječenja. Trenutno se proučava terapija temeljena na lijeku nazvanom rapamicin i analogima rapamicina koji se prvenstveno koriste u liječenju tumora. Svrha uzimanja rapamicina je inhibiranje sinteze proteina i staničnog ciklusa zbog čega ima anti-tumorsku aktivnost, no novija istraživanja su pokazala da rapamicin također, inducira autofagiju. Upravo to svojstvo rapamicina može se iskoristiti u liječenju Parkinsonove bolesti zato što poticanjem autofagije dolazi do reduciranja neurotoksičnosti jer se sprječava

agregiranje krivo smotanih proteina i potiče se njihova razgradnja. Takvo djelovanje rapamicina dokazano je krivim smatanjem proteina Prp90-231 koji vrlo brzo agregira i uzrokuje staničnu smrt, no uz prisutnost rapamicina neuroni su uspjeli preživjeti. Potencijalni induktori autofagije najčešće imaju primarnu primjenu u liječenju drugih bolesti, no pokazuju i sekundarno svojstvo zaštite živčanih stanica, smanjuju koncentraciju toksina i utjecaj stresa. Primjerice litijev karbonat koristi se u liječenju bipolarnog poremećaja, a metformin je lijek za dijabetes tipa II.<sup>19</sup> Većina provjerenih lijekova ipak je usmjerena na ublažavanje već nastalih simptoma, najčešće motoričkih. Trenutno se, od niza proučavanih lijekova, kao najefikasniji prepisuje levodop koji nije nabijen i može prelaziti kroz membranu. Služi kao prirodni prekursor za metabolizam dopamina i usporava nastajanje oštećenja motoričkih sposobnosti. Ukoliko terapija levodopom ne može kontrolirati motoričke komplikacije, koristi se i takozvana terapija potpomognuta uređajem. Temelji se na kontinuiranim infuzijama koje sadrže apamorfín, levodop i karbidop gel te dubokim stimulacijama mozga. Postoji još mnogo različitih pristupa i metoda liječenja, no nažalost niti jedna nije dovoljno efikasna ili pak prihvaćena na tržištu. Općenite metode liječenja ne mogu se primjeniti kod svih pacijenata zbog čega je važan individualan pristup svakoj oboljeloj osobi. Također, lijekovi čine samo dio potpune terapije. Osobama oboljelima od Parkinsonove bolesti potrebno je omogućiti fizičku aktivnost, rehabilitaciju, ali najvažnije je da imaju konstantnu podršku obitelji i ljudi kojima su okruženi.<sup>15, 19, 20</sup>

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. I. Damjanov, S. Seiwerth, S. Jukić, M. Nola, *Patologija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2018, str. 828-829.
2. D.L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Chemistry, Sixth Edition*, W.H. Freeman and Company, New York, 2013, str. 96-150.
3. D.L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Chemistry, Fourth Edition*, W.H. Freeman and Company, New York, 2005, str. 116-190.
4. R. Zwanzig, A. Szabo, B. Bagchi, (1992) Levinthal's paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:20-22.
5. V. Kumar, N. Sami, T. Kashav, A. Islam, F. Ahmad, M.I. Hassan (2016) Protein aggregation and neurodegenerative diseases: From theory to therapy. *Eur. J. of Med. Chem.* **124**:1105-1120.
6. N. Gregersen, P. Bross, S. Vang, J.H. Christensen (2006) Protein Misfolding and Human Disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **7**:103-124.
7. J. Gandhi, A.C. Antonelli, A. Afridi, S. Vatsia, G. Joshi, V. Romanov, I.V.J. Murray, S. A. Khan (2018) Protein misfolding and aggregation in neurodegenerative diseases: a review of pathogeneses, novel detection strategies and potential therapeutics. *Rev. Neurosci.* **30(4)**:339-358.
8. A. Muneer, R.M. Shamsher Khan (2019) Endoplasmic Reticulum Stress: Implications for Neuropsychiatric Disorders. *Chonnam Med J.* **55(1)**: 8–19.
9. M. Wang, R.J. Kaufman (2016) Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature.* **529(7586)**:326-335.
10. H.R. Wong (2005) Endogenous Cytoprotective Mechanisms. *NeuroImmune Biology.* **5**:49-65
11. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 651-655.
12. M. Ingelsson (2016) Alpha-Synuclein Oligomers-Neurotoxic Molecules in Parkinson's Disease and Other Lewy Body Disorders. *Front Neurosci.* **10**:408.
13. <https://webpath.med.utah.edu/CNSHTML/CNS102.html> (datum pristupa 12. svibnja 2019.)



14. N. Bengoa-Vergniory, R. Wade-Martins, R.F. Roberts, J. Alegre-Abarrategui (2017) Alpha-synuclein oligomers: a new hope. *Acta Neuropathol.* **134(6)**:819-838.
15. S.J. Chinta, J.K. Andersen (2004) Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol.* **37(5)**:942-946.
16. [https://www.researchgate.net/figure/Dopaminergic-pathways-in-the-brain\\_fig3\\_284786249](https://www.researchgate.net/figure/Dopaminergic-pathways-in-the-brain_fig3_284786249) (datum pristupa 15. svibnja 2019.)
17. J. Gratwicke, M. Jahanshahi, T. Foltynie (2015) Parkinson's disease dementia: a neural networks perspective. *Brain.* **138(Pt 6)**:1454-1476.
18. <https://braincheck.com/blog/what-executive-function> (datum pristupa 22. svibnja 2019.)
19. S. Thellung, M. Nizzari, F. Barbieri, T. Florio (2019) Autophagy Activator Drugs: A New Opportunity in Neuroprotection from Misfolded Protein Toxicity. *Int J Mol Sci.* **20(4).pii**: E901.
20. E. Dietrichs, P. Odin (2017) Algorithms for the treatment of motor problems in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* **136(5)**:378-385.
21. N. Lev, E. Melamed, D. Offen (2003) Apoptosis and Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **27(2)**:245-250.
22. K. Bodulić, *Uloga šaperona u razvoju i liječenju Alzheimerove bolesti*, Seminarski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018, str. 16.
23. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2018.00161/full> (datum pristupa 31. kolovoza 2019.)
24. <https://www.pnas.org/content/97/2/571> (datum pristupa 30. kolovoza 2019.)