

# Patološke značajke u mozgu miševa nositelja bolesti Niemann-Pick tipa C

---

Zovko, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:538752>

Rights / Prava: [In copyright](#)/Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Ana Zovko

Patološke značajke u mozgu miševa nositelja bolesti  
Niemann-Pick tipa C

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za istraživanje neurodegenerativnih bolesti Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom mentorice doc. dr. sc. Silve Katušić Hećimović i neposredne voditeljice mag. exp. bio. Lee Vidatić te suvoditeljice doc. dr. sc. Sofije Ane Blažević. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar eksperimentalne biologije.

## **Zahvale:**

Zahvaljujem se svojoj mentorici dr. sc. Silvi Katušić Hećimović koja me primila u Laboratorij za istraživanje neurodegenerativnih bolesti i pružila mi priliku za rad u motivirajućem i profesionalnom timu mladih istraživača. Hvala na strpljivom vodstvu, svemu što ste me naučili te na svojoj pomoći i potpori koju ste mi u svakoj prilici srdačno i ljubazno ukazali.

Zahvaljujem se neposrednoj voditeljici, doktorandici mag. biol. exp. Lei Vidatić na svom uloženom trudu i vremenu pri pomoći oko izrade diplomskog rada. Cijenim sve što ste učinili za mene i što ste mi pokazali da nema te prepreke koja se ne može prijeći s upornim i posvećenim radom. Hvala što ste mi omogućili da kroz dinamičnu atmosferu steknem brojna nova iskustva i praktična znanja koja će mi biti od iznimne važnosti u budućoj karijeri i kojih ću se uvijek rado sjećati.

Posebice se zahvaljujem suvoditeljici doc. dr. sc. Sofiji Ani Blažević koja je kroz ugodnu i pozitivnu suradnju pomogla u realizaciji diplomskog rada. Hvala na brojnim savjetima i potpori koju ste mi pružili.

Hvala mojim roditeljima, braći i njihovim obiteljima koji su na bezbroj načina iskazali bezuvjetnu ljubav, podršku, razumijevanje i pomoć kroz izazovni put životnih uspona i padova.

Hvala mojim dragim bliskim prijateljima, od dalekog Mostara do studentskog doma na Lašćini u Zagrebu. Bez vas bi sve radosti bile upola manje, a sve tuge još toliko veće. Hvala na svim predivnim trenucima i što ste uvijek tu za mene.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Patološke značajke u mozgu miševa nositelja bolesti Niemann-Pick tipa C

Ana Zovko

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Bolest Niemann-Pick tip C (NPC) rijetka je nasljedna recesivna bolest nakupljanja kolesterola i drugih lipida uslijed disfunkcije proteina NPC1 ili NPC2 koja najčešće pogađa populaciju dječje dobi te za koju još uvijek ne postoji adekvatna terapija. Bolest je uzrokovana mutacijama u *NPC1* ili *NPC2* genu. Nositelji bolesti koji imaju mutaciju na jednom alelu gena *NPC1*, do nedavno su se smatrali zdravima. Klinička istraživanja na nositeljima bolesti i na heterozigotnim miševima ukazala su na potencijalne patološke karakteristike NPC bolesti. Cilj ovoga diplomskog rada bio je karakterizirati molekularne procese u mozgovima 100 tjedana starih heterozigotnih NPC1 miševa. Metodom imunohistokemije analiziran je status neuroinflamacije pomoću markera CD68 za mikroglije i GFAP za astrocite. Hiperfosforilacija tau proteina analizirana je metodom Western Blot pomoću antitijela za ukupnu količinu tau proteina i za fosforilirane oblike tau: PHF1, AT8, RZ3 i CP13. U kori velikog mozga i malom mozgu uočena je aktivacija astrocita i mikroglija. Hiperfosforilacija proteina tau zamijećena je uglavnom kod heterozigotnih NPC1 mužjaka, premda se pojavljuje i kod miševa divljeg tipa. Ovaj rad pokazao je da 100-tjedana stari heterozigotni NPC1 miševi pokazuju određene patološke procese karakteristične za bolest NPC, ukazujući na pojavu neuroinflamacije kao začetka neuropatoloških procesa. Istraživanja na mlađim NPC1 heterozigotima neophodna su kako bi se odredila najranija dob pojave neuroinflamacije te istražili potencijali okidači.

51 stranica, 33 slike, 4 tablice, 44 literaturna navoda, hrvatski jezik

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: NPC1, kasni endosomi/lizosomi, neuroinflamacija, tau hiperfosforilacija

Voditeljica: doc. dr. sc. Silva Katušić Hećimović

Suvoditeljica: doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Ocjenjivači:

Rad prihvaćen:

# BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

Pathological features in the brains of mouse carriers of Niemann-Pick type C disease

Ana Zovko

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Niemann-Pick type C (NPC) is a rare hereditary recessive disease characterized by accumulation of cholesterol and other lipids due to NPC1 or NPC2 dysfunction, which mostly affects the population of young children and with no adequate therapy. NPC is caused by mutations in *NPC1* or *NPC2* gene. Until recently disease carriers with mutation on a single NPC1 allele were considered healthy. Research on NPC1 carriers and heterozygous mice indicated the potential pathological processes caused by NPC1 single allele mutation. The aim of this thesis was to molecularly characterize pathological processes in the brains of 100-week-old heterozygous NPC1 mice. Immunohistochemistry was used to analyze neuroinflammation status using a microglial marker CD68 and an astrocytic marker GFAP. Tau protein hyperphosphorylation was analyzed by Western Blotting using antibodies against „total tau“ and phosphorylated tau: PHF1, AT8, RZ3 and CP13. Activation of microglia and astrocytes was observed in the cortex and cerebellum. Tau hyperphosphorylation was mostly detected in NPC1 heterozygous males, yet it appeared within the wild type group as well. This work showed that NPC1 heterozygote mouse brains display certain pathological features of NPC disease, with neuroinflammation as a potential initiator of the pathological processes of the disease. Still, research on younger NPC1 heterozygote mice is necessary to determine the earliest age of neuroinflammation and its potential triggers.

(51 pages, 33 figures, 4 tables, 44 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: NPC1, late endosomes/lysosomes, neuroinflammation, hyperphosphorylation of tau

Supervisor: doc. dr. sc. Silva Katušić Hećimović

Cosupervisor: doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Reviewers:

Thesis accepted:

## Sadržaj

1.	UVOD .....	1
1.1.	Opće karakteristike bolesti Niemann-Pick tipa C .....	1
1.2.	Struktura i funkcija proteina NPC1 i NPC2 .....	2
1.3.	Neuropatološke karakteristike bolesti Niemann-Pick tipa C.....	3
1.3.1.	Poremećaj metabolizma lipida u mozgu u bolesti Niemann-Pick tipa C .....	3
1.3.2.	Neuroinflamacija u bolesti Niemann-Pick tipa C.....	7
1.3.3.	Prisutnost $\beta$ -amiloidnih plakova u bolesti Niemann-Pick tipa C.....	8
1.3.4.	Hiperfosforilacija proteina tau u bolesti Niemann-Pick tipa C .....	9
1.4.	Patološke karakteristike heterozigota za gen NPC1 – nositelja bolesti Niemann-Pick tipa C 10	
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	12
3.	MATERIJALI I METODE.....	13
3.1.	Uzgoj miševa i izolacija uzoraka tkiva.....	13
3.2.	Imunohistokemijska analiza tkiva mišjeg mozga.....	13
3.3.	Homogenizacija tkiva mišjih mozgova .....	14
3.4.	Mjerenje koncentracije proteina u uzorcima homogenata mišjih mozgova .....	15
3.5.	Western blot analiza .....	16
3.6.	Kvantifikacija rezultata dobivenih metodom Western blot.....	20
4.	REZULTATI.....	21
4.1.	Potvrda genotipa analiziranih mozgova 100-tjedana starih heterozigotnih NPC1 miševa i miševa divljeg tipa.....	21
4.2.	Analiza neurodegeneracije u malom mozgu i u kori velikog mozga .....	22
4.3.	Analiza disfunkcije endolizosomalnog puta u moždanim regijama kore velikog mozga, hipokampusa i u malom mozgu.....	26
4.4.	Analiza neuroinflamacije u moždanim regijama kore velikog mozga, hipokampusa i u malom mozgu .....	34
4.5.	Analiza hiperfosforilacije proteina tau u moždanim regijama kore velikog mozga i u malom mozgu.....	41
5.	RASPRAVA.....	50
6.	ZAKLJUČCI .....	52
7.	LITERATURA .....	53
8.	ŽIVOTOPIS .....	59

## Popis kratica

ABC – adenzin-trifosfat-vezujući kazetni prijenosnik, prema engl. *ATP-binding cassette*

ApoE – apolipoprotein E

APP – amiloidni prekursori protein, prema engl. *amyloid precursor protein*

A $\beta$  –  $\beta$ -amiloidni plakovi, prema engl. *amyloid- $\beta$  plaques*

BACE1 – enzim  $\beta$ -sekretaza, prema engl.  *$\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*

BBB – krvno moždana barijera, prema engl. *blood brain barrier*

CA1 – polje 1 Amonovog roga hipokampusa, prema lat. *Cornu ammonis 1*

CA3 – polje 3 Amonovog roga hipokampusa, prema lat. *Cornu ammonis 3*

CD68 – diferencijacijski antigen 68, prema engl. *cluster of differentiation 68*

CTF $\beta$  – C-terminalni odsječak  $\beta$ , prema engl. *C-terminal fragment  $\beta$*

EEA1 – antitijelo za antigen na ranim endosomima, prema engl. *early endosomal antigen 1*

GFAP – kiseli glijalni fibrilarni protein, prema engl. *glial fibrillary acidic protein*

HDL – lipoprotein visoke gustoće, prema engl. *high density lipoprotein*

het – heterozigot

LAMP1 – antitijelo za lizosomalne membranske proteine, prema engl. *lysosome associated membrane protein 1*

LRP/LDL – lipoproteinski receptori, prema engl. *low density lipoprotein receptor-related protein*

MAPK/ERK – stanični signalni put, mitogen aktivirane i vanstaničnim signalom regulirane proteinske kinaze, prema engl. *Mitogen-activated protein kinases/Extracellular-signal regulated kinases*

NFT – neurofibrilarni snopići, prema engl. *neurofibrillary tangles*

NPC – Niemann-Pick tip C, prema engl. *Niemann-Pick type C*

PHF – upareni helikalni filament, prema engl. *paired helical filaments*

p-tau – fosforilirani protein tau, prema engl. *phosphorylated-tau*

wt – divlji tip, prema engl. *wild type*





## 1. UVOD

### 1.1. Opće karakteristike bolesti Niemann-Pick tipa C

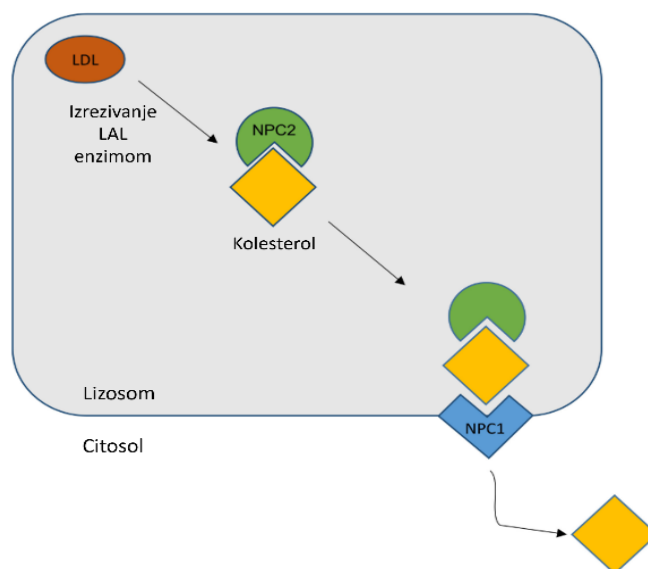
Bolest Niemann-Pick su prvi puta opisali liječnici Albert Niemann i Ludwig Pick 1920. godine kao heterogenu grupu rijetkih autosomalnih recesivnih lizosomnih poremećaja nakupljanja lipida. Prema današnjoj podjeli definirane su dvije skupine bolesti. Prvu skupinu karakterizira deficijencija kisele sfingomijelaze uslijed mutacije gena sfingomijelin fosfodiesteraze 1 (*SMPD1*, prema engl. *sphingomyelin phosphodiesterase 1*) te njoj pripadaju tipovi A i B. Drugoj skupini pripada tip C koji nastaje poremećajem metabolizma lipida zbog mutacije u genima *NPC1* ili *NPC2* te se očituje kao neurovisceralna bolest s progresivnom neurodegeneracijom (Yu *i sur.*, 2005; Vanier, 2010). Niemann-Pick tip C (NPC) je najučestaliji tip bolesti, čija se pojavnost u svijetu procjenjuje na 1:100 000 do 1:150 000 (Tang *i sur.*, 2010). U 95% slučajeva bolest NPC uzrokovana je mutacijom u genu *NPC1*, dok je u preostalih 5% slučajeva uzrokovana mutacijom u genu *NPC2*. U oba slučaja, disfunkcija istoimenih proteina dovodi do niza poremećaja u unutarstaničnom transportu lipida te dolazi do razvoja brojnih neuropatoloških i kliničkih simptoma (Bräuer *i sur.*, 2019). Bolest NPC1 može se razviti u neonatalnoj, infantilnoj, juvenilnoj ili adolescentnoj dobi te odrasloj dobi, prema čemu su definirana 4 razvojna fenotipa bolesti. Glavna obilježja neonatalnog i juvenilnog kliničkog fenotipa su progresivna disfunkcija jetre i hepatosplenomegalija te progresivni razvoj niza neuroloških poremećaja. Prosječni životni vijek neonatalnog kliničkog fenotipa je 6 mjeseci, odnosno 5 godina kod infantilnog kliničkog fenotipa (Vanier, 2010). Juvenilni, odnosno adolescentni klinički fenotip je najčešći te se pojavljuje u 60-70% svih slučajeva bolesti NPC. Simptomi se ispoljavaju između treće i pete godine života u obliku ataksije, intelektualnog oštećenja, demencije, raznih oblika epilepsije, disfagije i dizartrije, spastičnosti te paralize supranuklearnog pogleda. Većina pacijenata ovog fenotipa umire u adolescentnoj dobi, a rijetko dosežu starosnu dob od 30 i više godina (Tang, Li i Liu, 2010). Pacijenti odraslog kliničkog fenotipa bolesti NPC ispoljavaju relativno ublažene neurološke simptome u odnosu na adolescentni fenotip, a očituju se progresivnom demencijom, poremećajima kretanja i ekstrapiramidalnim sindromom (Imrie *i ostali*, 2002; Tang, Li i Liu, 2010). Glavne neuropatološke karakteristike koje su u podlozi razvoja opisanih neuroloških simptoma su propadanje Purkinje neurona u malom mozgu, neuroinflamacija, hiperfosforilacija tau proteina (tauopatija), formiranje neurofibrilarnih snopića te abnormalan strukturni i funkcionalni izražaj dendrita i aksona (Yu, Ko, *i sur.*, 2005). Bolest NPC dijeli određene neuropatološke karakteristike s drugim neurodegenerativnim bolestima, posebice s Alzeihemerovom bolesti, zbog čega je važan model za proučavanje neurodegenerativnih procesa. U tom kontekstu, brojna se istraživanja provode na mišjem NPC modelu s homozigotnom *NPC1* spontanom mutacijom koja sprječava stvaranje NPC1 proteina te stoga ovi NPC1-miševi izražavaju biokemijski fenotip sličan NPC pacijentima (BALB/c NPC1 soj miševa). Međutim, nedavna istraživanja su ukazala da i nositelji bolesti, tj. heterozigotne mutacije (pogađaju samo jedan alel) u genu *NPC1* također predstavljaju faktor rizika za kasni razvoj neuropatoloških

procesa, kao npr. tauopatije, te otvaraju pristup novom aspektu istraživanja neuropatologije bolesti. Unatoč znatnim naporima znanstvene zajednice cijeloga svijeta, biološka podloga bolesti NPC još uvijek je nedovoljno razjašnjena. Bolest se još i danas tretira simptomatski, bez adekvatnog liječenja uzroka bolesti, tj. bez primjene terapije zasnovane na molekularnom mehanizmu bolesti (Schneider *i sur.*, 2019).

## 1.2. Struktura i funkcija proteina NPC1 i NPC2

Protein NPC1 sačinjen je od 1278 aminokiselinskih ostataka, kojeg kodira gen *NPC1* od 47 kb. Zabilježeno je više od 200 mutacija kod pacijenata s bolešću NPC, uključujući „missense“ mutacije, insercije, delecije i duplikacije (Tang, Li i Liu, 2010). Protein NPC1 građen je od 13 transmembranskih domena, 3 velike petlje koje prodiru u lumen kasnih endosoma, N-terminalne petlje lumena koja sadrži visoko konzerviranu NPC1 domenu, nekoliko manjih citoplazmatskih petlji te C-terminalni citoplazmatski rep (Davies, Chen i Ioannou, 2000). Primarno se nalazi u kasnim endosomima koji su Rab7- i Rab9-pozitivni, sekundarno u lizosomima i trans-Golgi mreži. Regulaciju metabolizma i održavanja homeostaze lipida vrši preko domene osjetljive na sterol (SSD, prema engl. *sterol-sensing domain*) koju čini 6 transmembranskih regija, zbog čega mu se pripisuje uloga senzora endocitiranog kolesterola (Neufeld *i sur.*, 1999; Tang, Li i Liu, 2010). Protein NPC1 u najvećoj mjeri se nalazi u tijelu neurona u kasnim endosomima i lizosomima, u distalnim aksonima neurona, ali i u reciklirajućim endosomima presinaptičkih živčanih završetaka, pri čemu djeluje na put recikliranja sinaptičkih vezikula (Karten *i sur.*, 2006).

NPC2 je toplivi lizosomalni glikoprotein koji zajedno s proteinom NPC1 regulira transport unutarstaničnih lipida preko svoje kolesterol-vezujuće domene (Slika 1). Prenosi lipidne molekule po izlasku iz endosomalnih/lizosomalnih vezikula do fosfolipidnih vezikula (Tang *i sur.*, 2010). Disfunkcija bilo kojeg od ta dva proteina uzrokuje nakupljanje neesterificiranog kolesterola i drugih lipida u kasnim endosomima/lizosomima i patološke promjene u neuronima i glija stanicama (Zhang i Liu, 2015).



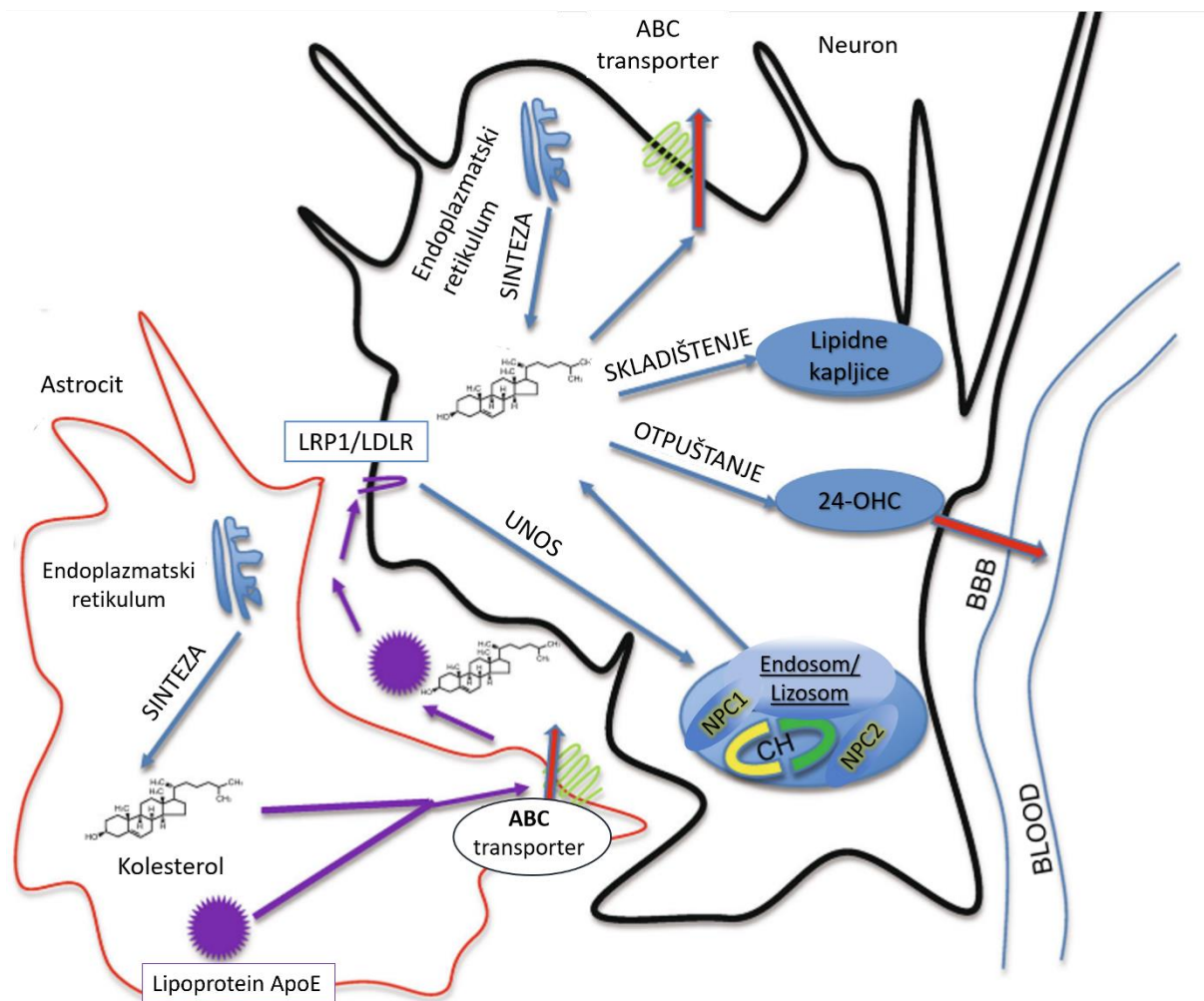
Slika 1. Mehanizam transporta slobodnog neesterificiranog kolesterola iz kasnih endosoma i lizosoma posredovan proteinima NPC1/NPC2. Lizosomalna kisela lipaza (LAL, prema engl *lysosomal acid lipase*) cijepa molekule lipida. NPC2 veže neesterificiranu molekulu kolesterola i prenosi je do NPC1. NPC1 posreduje prijenos kolesterola iz lizosoma u citosol. Preuzeto i prilagođeno iz Bräuer i sur., 2019.

### 1.3. Neuropatološke karakteristike bolesti Niemann-Pick tipa C

#### 1.3.1. Poremećaj metabolizma lipida u mozgu u bolesti Niemann-Pick tipa C

Homeostaza kolesterola neophodna je za funkcionalni integritet stanice budući da sve stanice u tijelu, uključujući neurone središnjeg živčanog sustava (SŽS), aktivno metaboliziraju lipide dinamičnim i visoko reguliranim procesima sinteze i distribucije (Bräuer *i sur.*, 2019). Bolesti povezane s poremećenim metabolizmom lipida karakterizirane su strukturalnim i funkcionalnim poremećajima SŽS-a, kao što su Huntingtonova, Alzheimerova, Parkinsonova bolest i bolest NPC. Lipidi koji se nalaze u mozgu su glicerofosfolipidi, sfingolipidi (sfingozin, sfingomijelin), glikosfingolipidi (gangliozi) i kolesterol – sterolni spoj, uglavnom u neesterificiranom obliku, čiji udio u mozgu iznosi 20% od ukupnog kolesterola u tijelu (Zhang i Liu, 2015). Kolesterol se u najvećem postotku (70-80%) nalazi u mijelinskim ovojnicama koju formiraju oligodendrociti oko aksona. Preostali udio nalazi se u plazma membrani astrocita i neurona gdje ima važnu ulogu u održavanju morfologije i sinaptičke provodljivosti. Ključan je u fiziologiji neuralnog razvoja i održavanja funkcija u odrasloj dobi (Aqul *i sur.*, 2011). Mozak nema direktan pristup kolesterolu koji se nalaze u lipoproteinima plazme krvi već ga neuroni i glija stanice sintetiziraju *de novo*. Tijekom ranog razvoja oligodendrociti stvaraju mijelin te je sinteza kolesterola u mozgu pojačana, dok u odraslom mozgu, metabolizam kolesterola je održavan uz male

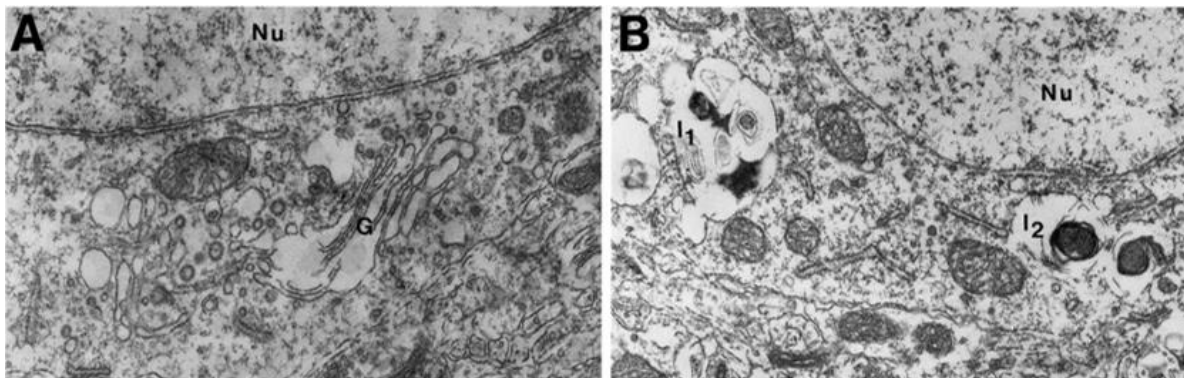
promjene i minimalne gubitke (poluživot kolesterola u odraslom mozgu je između 6 mjeseci i 5 godina) (Bjoandrkhem *i sur.*, 2006). Odrasli neuroni imaju znatno manju stopu sinteze kolesterola *de novo* u odnosu na glija stanice te time i manju sposobnost kompenzacije u stanju deficita. Stoga, odrasli se neuroni oslanjaju na glija stanice za opskrbu kolesterolom i drugim lipidima (Reid *i sur.*, 2003). Astrociti u najvećoj mjeri sintetiziraju neesterificirani kolesterol i molekulu apolipoproteina E (ApoE) koja ima ulogu nosača molekule kolesterola. ATP (adenozin trifosfat, prema engl. *adenosine triphosphate*)-vezujući kazetni prijenosnik (ABC, prema engl. *ATP-binding cassette*) na membrani astrocita katalizira prijenos lipida na slobodne apolipoproteine. Nastali ApoE-kolesterol kompleks tako dopijeva u vanstaničnu intersticijalnu tekućinu te se mehanizmom endocitoze posredovane lipoproteinskim receptorima LRP/LDL (prema engl. *low density lipoprotein receptor-related protein*) dostavlja neuronima (i drugim glija stanicama) (Repa *i sur.*, 2007). U stanici neurona se u endolizosomalnom putu posredstvom proteina NPC1/NPC2 hidrolizira u oblik slobodnog neesterificiranog kolesterola. U normalnim stanicama, taj se kolesterol prenosi do trans-Golgi mreže, plazmatske membrane i endoplazmatske mrežice (ER, prema engl. *endoplasmatic reticulum*) (Tang, Li i Liu, 2010). Redistribucija kolesterola u različite podstanične odjeljke posredovana je vezikularnim prijenosom ili proteinskim nosačima. Višak kolesterola može se metabolizirati na sljedeće načine: a) može se esterificirati pomoću enzima kolesterol aciltransferaze 1 (ACAT1/SOAT1) i pohraniti u lipidnim tjelešcima unutar stanice, b) može se otpustiti iz stanice u ApoE vezanom obliku preko ABC prijenosnika (jače su eksprimirani u neuronima nego u glija stanicama), c) može se izlučiti iz stanice u obliku oksisterola koji mogu proći kroz lipofilnu krvno-moždanu barijeru (BBB, prema engl. *blood brain barrier*) (Zhang i Liu, 2015). U bolesti NPC, slobodni neesterificirani kolesterol se zadržava i nakuplja u kasnim endosomima/lizosomima što rezultira smanjenjem koncentracije slobodnog kolesterola u ER-u. Posljedično, dolazi do povećanja sinteze i smanjenja esterifikacije kolesterola (Malnar *i sur.*, 2014). Ekspresija enzima 24-hidroksilaze koji katalizira hidroksilaciju kolesterola u 24-hidroksikolesterol (oksisterol) ograničena je na pojedine vrste neurona u mozgu, npr. Purkinje neurone maloga mozga, što upućuje na to da su izrazito osjetljivi na višak slobodnog kolesterola (Ko *i sur.*, 2005). S druge strane, 24-hidroksilaza znatno je slabije eksprimirana u glija stanicama. Iz toga se zaključuje da se velike metaboličke promjene kolesterola događaju u neuronima, a ne u glija stanicama (Yu, Gong, *i sur.*, 2005). Nakupine lipida uočene su i u mikroglija stanicama/makrofagima, astrocitima i oligodendrocitima, regijama kore velikog mozga, malog mozga i hipokampusa (Zervas *i sur.*, 2001). Iako u mozgu kod NPC bolesti ostaju normalne količine ukupnog kolesterola, akumulacijom kolesterola u tijelima neurona i glija smanjuje se dostupnost kolesterola u distalnim aksonima (Tang *i sur.*, 2010).



Slika 2. Sinteza i transport kolesterola unutar i između neurona i astrocita. Odrasli neuroni se primarno oslanjaju na astroците za opskrbu kolesterolom. Kolesterol (CH, prema engl. *cholesterol*) se u ApoE vezanom obliku unosi endocitozom u stanicu neurona preko LRP1/LDL (prema engl. *low density lipoprotein receptor-related protein*) receptora. Zatim ga NPC1 i NPC2 u kasnim endosomima i lizosomima prevode slobodnog izvan ovih organela. Nakupljanje viška slobodnog kolesterola sprječava se unutarstaničnom esterifikacijom i pohranom u lipidne kapljice, ili otpuštanjem kao ApoE-vezanog kompleksa preko ABC (prema engl. *ATP-binding cassette* prijenosnika), ili pretvorbom u oksisterole (npr. 24-OH) koji mogu prijeći BBB (prema engl. *blood brain barrier*). Preuzeto i prilagođeno iz Zhang i Liu, 2015.

Istraživanja su pokazala da se u patogenezi bolesti NPC sfinгоzin nakuplja u lizosomima prije kolesterola, uzrokujući poremećaj u otpuštanju kalcija i promjenu njegove koncentracije u lizosomima (Tang i sur., 2010; Fiorenza i sur., 2018). Time biva poremećeno spajanje endosoma s lizosomima posredovano kalcijem te je onemogućen daljnji transport lipida (Tang i sur., 2010). Stoga, autori Tang i sur. (2010) zaključuju da primarni defekt čini izostanak vezanja i metaboliziranja glikosfingolipida, koji

uzrokuje sekundarno nakupljanje kolesterola, drugih lipida i membranskih proteina. Osobito visoku koncentraciju glikosfingolipida, kolesterola, zajedno sa specifičnim membranskim proteinima sadrže lipidne splavi – visoko organizirane submembranske domene koje se zbog značajne uloge u staničnoj signalizaciji smatraju signalnim platformama stanice (Sezgin *i sur.*, 2017). Smatra se da glikosfingolipidi iz lipidnih splavi podliježu degradaciji u endolizosomalnom putu te da se recikliraju preko Golgi tijela. U NPC1 neuronima, visoke razine nakupljenog kolesterola blokiraju endosomalni/lizosomalni transport glikosfingolipida do Golgi tijela, što dovodi do njihovog nakupljanja (Pagano *i sur.*, 2000). Kolesterol i sfingolipidi imaju visok afinitet jedan prema drugome te nakupljanje bilo koje od te dvije molekule u kasnim endosomima/lizosomima može uzrokovati nakupljanje druge. Povećane razine ukupnog staničnog slobodnog kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima dovode do smanjene razine kolesterola i sfingolipida u lipidnim splavima, uzrokujući tako poremećaj u staničnoj signalizaciji (Michikawa, 2006).



Slika 3. Prikaz lipidnih nakupina u citoplazmi neurona snimljenih elektronskim mikroskopom u miševa starih 4 tjedna. (A) U NPC1<sup>+/+</sup> divljeg tipa (wt) miša vidljiva je uredna stanična struktura bez lipidnih nakupina. (B) U NPC1<sup>-/-</sup> miša formirana su inkluzijska tijela (I<sub>1</sub> i I<sub>2</sub>) koje vjerojatno čine lizosomi s nakupljenim lipidnim sadržajem i mijelinom. Preuzeto iz German *i sur.*, 2002. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11823057/>

Ključne korake u metabolizmu sterola reguliraju stanični oksisterolni transkripcijski faktori – jetreni X receptor (LXR, prema eng. liver X receptor) i retinoidni X receptor (RXR, prema engl. retinoid X receptro) (Repa *i sur.*, 2007). Podtipovi LRX transkripcijskog faktora, LRX $\alpha$  i LRX $\beta$  utječu na povećanje metabolički aktivnog kolesterola u citosolu brojnih stanica u tijelu, uključujući i u mozgu, na način da povećavaju transkripciju gena koji kodiraju ABC-A1 i ABC-G1 podtipove prenosnika ApoE-kolesterol kompleksa preko plazmatske membrane. Također, reguliraju transkripciju i samih apolipoproteina D i E (Whitney *i sur.*, 2002).

### 1.3.2. Neuroinflamacija u bolesti Niemann-Pick tipa C

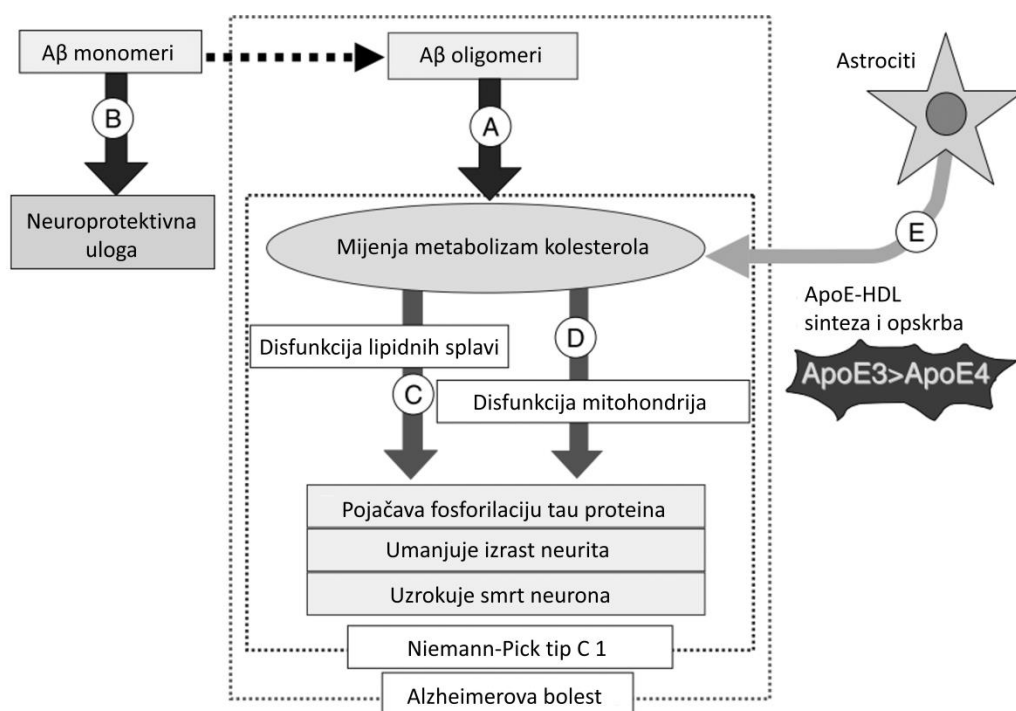
Dnevna izmjena sterola u odraslim neuronima ogleda se u količini izlučenog 24-hidroksikolesterola (oksissterol) u venski odvod iz mozga i u cerebrospinalnu tekućinu (CSF, prema engl. *cerebrospinal fluid*). S druge strane, izmjena sterola u glija stanicama se ogleda u stopi izlučivanja kolesterola (Repa *i sur.*, 2007). Kod mutacijske inaktivacije proteina NPC1, astrociti izlučuju kompleks ApoE-kolesterol u normalnim količinama, ali pri ulasku u stanicu endocitozom posredovanom receptorima, dolazi do nagomilavanja u kasnim endosomima/lizosomima neurona i/ili glija stanica. Ova pojava praćena je aktivacijom mikroglia, što podrazumijeva klasične morfološke promjene u tipu ameboidnog oblika, stvaranje neurotoksina i neurotrofičnih proupalnih molekula te migraciju na mjesto „ozljede“ (El Kho-ury *i sur.*, 2007; Pressey *i sur.*, 2012; Cologna *i sur.*, 2014). Utvrđena je prisutnost brojnih upalnih faktora u malom mozgu i frontalnom korteksu u mišjem i ljudskom mozgu NPC bolesti, kao što su kiseli glijalni fibrilarni protein (GFAP, prema engl. *glial fibrillary acidic protein*), CD14 (prema engl. *cluster of differentiation 14*), CD11C, faktor tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$  prema engl. *tumor necrosis factor- $\alpha$* ) (u kori velikog mozga kod ljudi), interleukin IL-1 $\beta$  (u mišjem modelu bolesti), IL-5, receptori nalik „toll-u“ (TLR4, prema engl. *toll-like receptor*), CD68 te komponente komplemента (Repa *i sur.*, 2007; Cologna *i sur.*, 2014). Učestali upalni markeri neuroinflamacije koji su povišeni kod brojnih drugih bolesti, npr. IL-6, IL-8 i MCP1, u bolesti NPC su unutar referentnih vrijednosti, što ukazuje na specifičnost same bolesti. Uz to, smanjene su razine protuupalnih faktora IL-4 i IL-10 koje inače luče aktivirane stanice mikroglia u svrhu neuroprotektivnog djelovanja (Henry *i sur.*, 2009). Komponente komplemента C1q, C2, C3, C4b i njihovi receptori C3ar1 i C5r1 pridonose upalnom procesu u patologiji nekoliko neurodegenerativnih bolesti (npr. Alzhimerovoj bolesti). Međutim, istraživanje s potpunom delecijom gena za komplement nije rezultiralo smanjenjem neuroinflamacije, što komplement eliminira iz potencijalnih uzročnih faktora neurodegeneracije (Lopez, Klein i Scott, 2012). Ovakav agresivni proupalni odgovor snažno pojačava stanje neuroinflamacije te ubrzava neurodegeneraciju, što ukazuje na to da bi smanjenje metaboličkog defekta u stanicama mikroglia moglo dovesti do smanjenja progresije bolesti i poboljšanja kliničkih simptoma. U bolesti NPC, opisano patološko stanje najprije započinje u Purkinje neuronima malog mozga. Istraživanja na miševima pokazala su da primjena LXR agonista povećava izlučivanje, odnosno gubitak ukupnog kolesterola iz mozga, smanjujući njegovu raspoloživost neuronima i glija stanicama. To rezultira vraćanjem stanica mikroglia u neaktivni oblik, smanjenjem lučenja upalnih faktora, usporavanjem neurodegeneracije te duljeg preživljavanja i poboljšana neuroloških funkcija (Repa *i ostali*, 2007). U mišjem modelu bolesti NPC, gubitak funkcije amiloidnog prekursornog proteina (APP) uzrokuje skraćenje životnog vijeka, poremećaj u metabolizmu kolesterola, tauopatiju i progresivnu neuroinflamaciju (Nunes *i sur.*, 2011. ). Aktiviranje imunološkog odgovora uzrokuje pojačanu ekspresiju proupalnih citokina i kemokina u neuronima, među kojima značajan neurotoksični učinak ima aktivacija proupalnih čimbenika interfe-



rona gama (IFN- $\gamma$ ) i interferona alfa (IFN- $\alpha$ ), uzrokujući aktivaciju mikroglia, antivirusni odgovor, aktivaciju i kemotaksiju T-limfocita (Shin *i sur.*, 2019).

### 1.3.3. Prisutnost $\beta$ -amiloidnih plakova u bolesti Niemann-Pick tipa C

U bolesti NPC1 u ljudi javlja se poremećaj staničnog metabolizma amiloidnog prekursornog proteina (APP, prema engl. *amyloid precursor protein*) koji dovodi do nastanka i nakupljanja  $\beta$ -amiloidnih plakova (A $\beta$ , prema engl. *amyloid- $\beta$  plaque*) (Malnar *i sur.*, 2014). U mišjim modelima bolesti NPC ova promjena nije zabilježena jer u miševa zbog njihove rane smrti ne dolazi prirodno do starenja pa tako ni do vidljivog nakupljanja peptida A $\beta$  u plakovima (Malnar *i sur.*, 2014). U mozgovima NPC pacijenata je zamijećen difuzni oblik A $\beta$  plakova (Saito *i sur.*, 2002), ali samo u pacijenata koju su imali E4 izoformu ApoE. Nadalje, PET snimanjem mozga koristeći fluorescentnu probu za A $\beta$  pokazano je da starije osobe NPC pacijenti s kognitivnim poremećajem sadrže A $\beta$  plakove u frontalnom korteksu (Malnar *i sur.*, 2014). Stoga se čini da bolest NPC posjeduje poremećaj u metabolizmu proteina APP sličan onom u Alzheimerovoj bolesti. Protein APP i njegovi produkti imaju važnu ulogu održavanja homeostaze i neuroprotektivnog učinka u mozgu. Podržavaju procese sinaptogeneze, sinaptičke plastičnosti, neurogeneze, reguliraju oksidativni i oksisterolni metabolički stresa te mehanizme obrane od patogenih infekcija (virusnih, bakterijskih i gljivičnih) (Carrano i Das, 2015; Shin *i sur.*, 2019). APP je transmembranski protein kolokaliziran unutar mikrodomene lipidnih splavi zajedno sa svojim proteolitičkim enzimima. Sadrži kratku C-terminalnu citoplazmatsku domenu i veliku N-terminalnu ektodomena. Proteolitičko cijepanje APP-a, koje započinje i ovisi o endocitozi posredovanoj klatrinskim vezikulama te nastanak peptida A $\beta$  odvijaju se u prijelazu molekule APP u endosome (Perez *i sur.*, 1996; Kosicek *i sur.*, 2010). Nakupine A $\beta$  stvaraju se u amiloidogeničnom putu, nizom cijepanja APP-a  $\beta$ -sekretazom (BACE1, prema engl.  *$\beta$ -amyloid cleaving enzyme 1*) pri čemu nastaje C-terminalni odsječak  $\beta$  (CTF $\beta$ , prema engl. *C-terminal fragment  $\beta$* ). Dalje, CTF $\beta$  se cijepa  $\gamma$ -sekretaznim kompleksom sa presenilinom 1 (PS1) ili PS2 u aktivnom mjestu, te nastaju netopive molekule A $\beta$ 40 ili A $\beta$ 42 (Malnar *i sur.*, 2014). Nastali produkti CTF $\beta$  i oligomerni A $\beta$ 40 i A $\beta$ 42 skloni su agregaciji i akumulaciji unutar neurona, čime pogoduju stvaranju neurotoksičnog stanja kao podloge za razvoj neurodegeneracije. U alternativnom, neamiloidogeničnom putu, APP se cijepa  $\alpha$ -sekretazom, pri čemu ne nastaje A $\beta$  peptid. U bolesti NPC kod povećanog nakupljanja kolesterola u plazma membrani neurona dolazi do smanjenje fluidnosti membrane i pojačane endocitoze APP-a (Malnar *i sur.*, 2014). Posljedično, APP u većoj mjeri biva dostupan enzimu BACE1 i njegovom amiloidogeničnom procesiranju, što se smatra primarnim uzrokom stvaranja oligomernih peptida A $\beta$ , umjesto pojačane aktivnosti samoga enzima BACE1 (Marquer *i sur.*, 2011; Malnar *i sur.*, 2014).



Slika 4. Hipotetska shema koja prikazuje ulogu kolesterola u amiloidnoj kaskadi koja promiče patogenezu Alzheimerove bolesti i bolesti Niemann-Pick tip C. Preuzeto i prilagođeno iz Michiwaka, 2006. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16866907/>

Michiwaka (2006) je u svom radu objasnio neurotoksičnost A $\beta$  preko koncepta njegove oligomerizacije kao ključnog koraka u oštećenju funkcije neurona. Predlaže da oligomeri A $\beta$  (za razliku od monomera A $\beta$  koji imaju snažan neuroprotektivni učinak) uzrokuju otpuštanje kolesterola i fosfolipida koji zatim stvaraju A $\beta$ -lipidni kompleks. Nastali A $\beta$ -lipidni kompleks, iako ima gustoću sličnu molekuli lipoproteina visoke gustoće (HDL, prema engl. *high density lipoprotein*) koju neuroni unose endocitozom preko ApoE kompleksa, se ne reciklira natrag u stanicu neurona, što u konačnici narušava sintezu kolesterola i smanjuje njegovu razinu u stanici (Abad-Rodriguez *i sur.*, 2004).

#### 1.3.4. Hiperfosforilacija proteina tau u bolesti Niemann-Pick tipa C

Stvaranje neurofibrilarnih snopića (NFT, prema engl. *neurofibrillary tangles*) jedna je od glavnih patoloških karakteristika bolesti NPC. NFT su građeni od uparenih helikalnih filamenata (PHF, prema engl. *paired helical filaments*) koje formiraju hiperfosforilirani mikrotubularni proteini tau (p-tau) na pozicijama Ser-199, Ser-202, Ser-212 i Thr-214. Smatra se da je povećana fosforilacija proteina tau posljedica pojačane aktivnosti MAPK/ERK1/2 signalnog puta inducirane narušenim strukturnim i funkcionalnim integritetom lipidnih splavi uslijed povišenih razina ukupnog staničnog slobodnog kolesterola (Michikawa, 2006). Iako su Purkinje neuroni maloga mozga najjače pogođeni bolešću NPC, u njima nisu pronađene NFT strukture. Iako u NPC miševa starenjem prirodno ne dolazi do nastanka

NFT-a, utvrđena je prisutnost hiperfosforiliranih tau i drugih citoskeletnih proteina (npr. MAP2) u malom mozgu (Bu *i sur.*, 2002). Poremećaji metabolizma kolesterola utječu na pojavu tauopatije neovisno o nakupljanju peptida A $\beta$ , premda je postojanje tau nužno za A $\beta$ -induciranu toksičnost (Malnar *i sur.*, 2014). U istraživanju kojeg su proveli Nunes *i sur.* (2019) pokazano je da gubitak APP-a u NPC1<sup>-/-</sup> miševima dovodi do povećane hiperfosforilacije proteina tau na pozicijama Ser199/Ser202 (detektiran antitijelom AT8) i Ser396/Ser404 (detektiran antitijelom PHF1) i smanjenje ukupne stanične razine proteina tau u kori velikog mozga i u malom mozgu (Nunes *i sur.*, 2011). Istraživanje provedeno na NPC1/tau *knock out* miševima potvrdilo je da tauopatija doprinosi pogoršanju NPC1 fenotipa, međutim mehanizam ove pojave još uvijek nije razjašnjen. Kao što je prethodno opisano, u NPC1-null stanicama dolazi do pokretanja bazalne autofagije u svrhu preživljavanja stanice. Gubitkom mikrotubularnog aparata uslijed smanjenja razine proteina tau, stanica gubi sposobnost autofagije, što pogoduje daljnjem „opstanku“ i razvoju patološkog stanja (Malnar *i sur.*, 2014).

#### 1.4. Patološke karakteristike heterozigota za gen NPC1 – nositelja bolesti Niemann-Pick tipa C

Prethodno se smatralo da jedino homozigoti za bolest NPC razvijaju neurološke simptome, s obzirom da se NPC nasljeđuje kao autosomalni recesivni poremećaj. Istraživanje koje su proveli Yu *i sur.* (2005) bilo je prvi dokaz postojanja patoloških karakteristika kod starijih miševa koji su heterozigoti za gen *NPC1* (NPC1<sup>+/-</sup>). Niz patoloških karakteristika bolesti NPC koje se inače pojavljuju u ranom razvoju, kod heterozigotnih NPC1<sup>+/-</sup> miševa razvijaju se starenjem. U mozgovima heterozigota starih 104-106 tjedana dokazana je disfunkcija mitohondrija (Yu *i sur.*, 2005). Analizom NPC1<sup>+/-</sup> mišjih mozгова starih 104-106 tjedana dokazana je pojava tauopatije, odnosno hiperfosforiliranog proteina tau uz povećanu aktivnost tau kinaza MAPK/ERK1/2, značajno nakupljanje kolesterola u neuronima te smanjenje razine kolesterola u frakcijama lipidnih splavi. Uz to, uočeno je propadanje Purkinje neurona u malom mozgu. Autori rada predlažu da bi razlog abnormalnog nakupljanja lipida izraženog tek kod ostarjelih NPC1 heterozigota bio taj što jedan funkcionalni alel uspijeva „nadoknaditi“ normalan rad staničnog metabolizma lipida, pri čemu tek sa starošću dolazi do njihove značajne akumulacije praćene ostalim neuropatološkim promjenama. Smatra se da smanjena stanična razina ATP-a uslijed mitohondrijske disfunkcije i abnormalna fosforilacija tau proteina sinergistički doprinose neurodegeneraciji u NPC1<sup>+/-</sup> mišjim mozgovima (Yu *i sur.*, 2005). Danas postoji sve veći broj dokaza koji potvrđuju neuropatološke karakteristike kod članova obitelji oboljelih koji su nosioci bolesti NPC. Pojedincima s mutacijom na jednom NPC1 alelu često bivaju dijagnosticirane bolesti iz spektra parkinsonizma, primjerice Parkinsonova bolest (PD, prema engl. *Parkinson's disease*) ili atipični oblik PD-a (npr. kortikobazalna degeneracija, progresivna supranuklearna plazija) (Schneider *i sur.*, 2019). U kliničkoj slici nositelja NPC bolesti zabilježena su kognitivna oštećenja, oblici psihijatrijskih poteško-

ća te ne-motorički simptomi kao što su oštećenje vida, ortostatska hipotenzija, konstipacija, urinarne infekcije, impotencija i poremećaji spavanja (Kluenemann *i sur.*, 2013; Benussi *i sur.*, 2019). Kao i kod homozigota za bolest NPC, splenomegalija je kod heterozigota konzistentan simptom (Harzer *i sur.*, 2014). Elektrofiziološkim markerima detektirane su brojne abnormalnosti neuronskih krugova u prefrontalnoj, parietalnoj i i somatosenzornoj regiji, kao što su oštećenje plastičnosti u vidu dugotrajne potencijacije (LTP, prema engl. *long-term potentiation*), intrakortikalne neuronske olakšice (prema engl. *neural facilitation*) te kratke aferentne inhibicije (Benussi *i sur.*, 2017).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada je analizirati patološke karakteristike bolesti NPC u mozgovima 100-tjedana starih heterozigota mišjeg modela bolesti NPC soja BALB/cNctr-Npc1m1N/J. Pretpostavljamo da nositelji bolesti NPC sa starenjem pokazuju određene patološke karakteristike bolesti NPC, npr. tauopatiju, aktivaciju mikroglia i astrocita, disfunkciju lizosoma i/ili odumiranje Purkinje neurona. Rezultati ovog istraživanja bi mogli ukazati da nositelji NPC bolesti, kao i nositelji drugih recesivnih lizosomalnih bolesti nakupljanja lipida, nisu zdravi te da sa starenjem mogu pokazati određene patološke karakteristike bolesti. Zaključno, ova istraživanja bi mogla doprinijeti boljem razumijevanju bolesti NPC kao i skrbi za oboljele obitelji.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Uzgoj miševa i izolacija uzoraka tkiva

Ovo istraživanje provedeno je na heterozigotnim  $NPCI^{+/-}$  miševima (označeni kraticom het u ostatku rada) soja BALB/cNctr-Npc1<sup>m1N</sup>/J (003092, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, SAD). Uzgajani su u Pogonu za laboratorijske životinje na Institutu Ruđer Bošković u skladu s EU direktivom 2010/63/EU za provođenje pokusa na životinjama. Miševi su uzgajani u ciklusima 12 sati dan/12 sati noć uz dostupnost vode i standardne mišje prehrane (Mucedola, Italija) *ad libitum*. Ženke i mužjaci miševa  $NPCI^{+/-}$  su pareni za dobivanje heterozigotnih  $NPCI^{+/-}$  (NPC1-het) i  $NPCI^{+/-}$  miševa divljeg tipa (wt, prema engl. *wild type*). Nakon odvajanja mladih miševa od majke u dobi od četiri tjedna, neposredna voditeljica Vidatić je napravila genotipizaciju miševa PCR metodom na uzorcima DNA izoliranih iz vrha repa prema protokolu proizvođača (<http://jaxmice.jax.org/strain/003092.html>). Miševi NPC1-het i wt uzgajani su do starosti od 100 tjedana. Žrtvovanje, odnosno uzorkovanje životinja provedeno je u skladu s propisima o postupanju s laboratorijskim životinjama. Životinje su usmrćene cervikalnom dislokacijom. Pri izolaciji mozga, desne hemisfere su fiksirane u 4% paraformaldehidu tijekom 24 h pa isprane u rastućem gradijentu saharoze (15% i 30% po 24 h). Hemisfere su zatim uronjene u medij za smrzavanje (Shandon M-1 Embedding Matrix, Thermo Scientific, SAD) te krioprezervirane uranjanjem kalupa u izopentan ohlađen na suhom ledu. Neuroanatomskom disekcijom moždanih regija na lijevim hemisferama izolirana je kora velikog mozga, hipokampus i mali mozak. Tkiva iz obje hemisfere su po disekciji smrznuta u tekućem dušiku i pohranjena na -80°C. Analizirala sam uzorke od po 6 jedinki svakog spola i genotipa miševa starih 100 tjedana. Za kontrolu sam analizirala uzorke ženke  $NPCI^{-/-}$  miša i wt ženke starosne dobi od 9 tjedana.

#### 3.2. Imunohistokemijska analiza tkiva mišjeg mozga

Za histološku analizu koristila sam sagitalne kriorezove debljine 15 µm desne hemisfere NPC1-het i wt miševa koje je neposredna voditeljica Vidatić pripremila na Leica CM 3050S kriotomu. Rezovi su bili pohranjeni na -20°C prije analize. Prereze mišjih mozgova najprije sam stavila u laminar na sušenje tijekom 1 sata. Svo daljnje postupanje s prerezima odvija se u vlažnoj komorici na sobnoj temperaturi. Prereze sam permeabilizirala u otopini Tris pufera koja sadrži 0,5% Triton X-100 (TBS-T, prema engl. *Tris bufferes saline – Triton*) tijekom 30 min (sastav Tris pufer otopine te svih ostalih dalje navedenih otopina kroz metode prikazan je u Tablici 4). U međuvremenu sam priredila 5%-tno razrjeđenje kozjeg seruma (Sigma-Aldrich, SAD) u TBS-T puferu koje ću koristiti kao otopinu za blokiranje i otopinu za razrjeđenje primarnog i sekundarnog protutijela. Pred kraj inkubacije pripremila sam primarna protutijela razrjeđivanjem u otopini za blokiranje u omjerima koji su u skladu

s preporukama proizvođača (Tablica 1). Inkubacija s primarnim antitijelima odvijala se preko noći (16 h). Sljedeći dan, prereze sam prvo isprala TBS-T puferom 3 puta po 10 min. Pred kraj zadnjeg ispiranja pripremila sam sekundarna antitijela u otopini za blokiranje u omjeru 1:200. Prereze sam inkubirala s fluorescentno obilježenim sekundarnim antitijelima (Alexa Fluor 488, 594 ili 647, ThermoFisher Scientific, SAD) tijekom 3 sata, zatim isprala TBS-T puferom 3 puta po 10 min. Nakon toga sam ih inkubirala s Hoechst bojom za obilježavanje nukleinskih kiselina (ThermoFisher Scientific, SAD) 20 min, koje sam neposredno prije pripremila u HBSS puferu (Gibco) u razrjeđenju 1:2500. Prereze sam potom isprala TBS-T puferom 3 puta po 10 min, a zatim s Mili-Q H<sub>2</sub>O 2 puta. Nakon toga sam ih stavila na sušenje u laminaru tijekom 1 sata, pazeći pritom da su zaklonjeni od izvora svjetlosti. Po završetku, prereze sam fiksirala u mediju za uklapanje (Fluoromount, Sigma-Aldrich, SAD) te pohranila na +4°C do analize. Slike je prikupila zaposlenica Zavod za molekularnu biologiju na Laser Scanning Spectral Confocal Microscope Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems; Zavod za molekularnu biologiju, IRB).

Tablica 1. Popis protutijela korištenih u imunohistokemijskoj analizi

	biološko podrijetlo	razrjeđenja	Klon, proizvođač
anti-calbindin	miš	1:500	D-28k, Swant, Švicarska
anti-EEA1	kunić	1:100	C45B10, Cell Signaling, SAD
anti-LAMP1	štakor	1:200	1D4B, Santa Cruz, SAD
anti-GFAP	miš	1:500	GA5, Cell Signaling, SAD
anti-CD68	štakor	1:500	FA-11, Bio-Rad, SAD

### 3.3. Homogenizacija tkiva mišjih mozгова

U svrhu analize proteina metodom Western blot, homogenizirala sam tkiva kore velikog mozga i malog mozga u otopini 0.25%-tnog DEA pufera za dobivanje frakcije topljivih proteina i 1%-tnog Triton pufera za dobivanje frakcije netopivih membranskih proteina, prema metodi Kuhn *i sur.* (2012). Prije početka samog postupka homogenizacije, pripremila sam otopine inhibitora fosfataza (*Phosphatase inhibitor cocktail - PhosSTOP*, Roche, SAD) i inhibitora proteaza (*Protease inhibitor cocktail – cOmplete*, Roche, SAD) prema uputama proizvođača. Tkiva moždanih regija koja su po disekciji pohranjena na -80°C, izvagala sam. Prvi korak homogenizacije provodi se u puferu za homogenizaciju kojeg čini otopina 0,25% DEA pufera i koktel proteinskih i fosfatarnih inhibitora. Prema očitanim vrijednostima mase, napravila sam izračun za volumen pufera za homogenizaciju po formuli:

$$(m_{tkiva}[g] * 10) + (m_{tkiva} * 10)_n = V_{pufer\ za\ homogenizaciju}[\mu L]$$

$$V_{inhibitori\ proteaza}[\mu L] = V_{pufer\ za\ homogenizaciju}/25$$

$$V_{inhibitori\ fosfataza}[\mu L] = V_{pufer\ za\ homogenizaciju}/10$$

$$V_{0,25\% DEA\ ili\ 1\% Triton}[\mu L] = V_{pufer\ za\ homogenizaciju} - (V_{inhibitor\ proteaza} - V_{inhibitor\ fosfataza})$$

Cijeli postupak homogenizacije provodi se na ledu. Zamrznuto tkivo homogenizirala sam u otopini DEA pufera za homogenizaciju ( $V_{otop.DEA}[\mu L] = m_{tkiva}[mg] * 10$ ) pomoću staklenog homogenizatora i tučka (Dounce homogenizator) s 30 potisaka. Centrifugirani su u ultracentrifugi (Beckman Coulter Optima XL-100K Ultracentrifuge Class S, rotor 50.4 Ti) na 10 000 g na +4°C, 30 min. U međuvremenu sam pripremila otopinu 1% Triton pufera za homogenizaciju s inhibitorima. Nakon centrifugiranja, pažljivo sam skupila supernatant koji sadrži frakciju topljivih proteina u nove tubice te ih pohranila na -80°C do daljnjeg korištenja. Kako bih dobila membransku frakciju proteina, talog sam homogenizirala u Triton puferu za homogenizaciju po istom postupku koji je prethodno opisan za homogenizaciju u otopini DEA pufera. Dobivene lizate sam propustila kroz 1 ml špricu i 23 G iglu s 10 potisaka do postizanja uniformnog lizata. Zatim su se inkubirali na ledu 30 min i ultracentrifugirali. Dobivene lizate Triton frakcije također sam prebacila u nove tubice i pohranila na -80°C.

### 3.4. Mjerenje koncentracije proteina u uzorcima homogenata mišjih mozгова

U homogenatima DEA i Triton frakcije kore velikog mozga izmjerila sam koncentraciju proteina pomoću komercijalnog kompleta za analizu proteina *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific, SAD). Prvo sam napravila proteinski standard prema serijskom razrjeđenju goveđeg albuminskog seruma (BSA, prema engl. *bovine albumin serum*) (ThermoFisher Scientific, SAD). Za određivanje koncentracije proteina DEA frakcije, standard BSA početne koncentracije od 2 mg/μL BSA serijski sam razrijedila u 0,25% DEA puferu na koncentracije od 1 mg/μL, 0,5 mg/μL, 0,25 mg/μL, 0,125 mg/μL BSA, a kao krajnja točka mjerenja bio je sam DEA pufer. Uzorke lizata sam razrijedila 5 puta. Serijska razrjeđenja BSA i razrjeđenja uzoraka lizata napravila sam u duplikatima na ploču s 96 jažica (prema engl. 96 well-plate; TPP, Švicarska). Pripremila sam BCA reagens prema uputama proizvođača u količini dostatnoj za 6 uzoraka BSA standarda i 14 uzoraka homogenata (6 jedinki NPC1-het, 6 jedinki wt i 2 jedinke kontrolne skupine - po jednom mjerenju analizirala sam uzorke jedne frakcije, DEA ili Triton, jedne regije mozga, jednog spola). Nakon što sam dodala BCA razrijeđenim uzorcima, ploču s jažicama sam stavila inkubirati zaklonjenu od svjetlosti na sobnoj temperaturi tijekom 30 min. Prije mjerenja absorbancije uzoraka, iglicom sam pažljivo otklonila mjehuriće u jažicama koji bi pri mjerenju mogli uzrokovati netočno očitavanje vrijednosti. Absorbanciju (A) na uzorcima sam



mjerila na spektrofotometru (Multiskan EX, Thermo Fischer Scientific, SAD) na valnoj duljini od 570 nm. Vrijednosti mjerenja očitane su i prikazane pomoću Multiskan EX Thermo Scientific™ Ascent™ softvera. Dobivene podatke obradila sam u programu Microsoft Excel. S obzirom da sam sva mjerenja radila u duplikatima, prvo sam odredila srednju vrijednost za svaki uzorak BSA standarda i lizata. Srednja vrijednost apsorbancije 0,25%-tnog DEA pufera iz BSA standarda koncentracije 0 mg/μl predstavlja tzv. prazni (prema engl. *blank*) uzorak. Sve druge dobivene srednje vrijednosti sam umanjila za iznos „blank“ vrijednosti pufera te na taj način eliminirala prisutnost pufera u dobivenim mjerenjima koncentracije proteina tkiva. Iz apsorbancije uzoraka BSA standarda, izračunala sam jednadžbu krivulje  $y=ax+b$ , pri čemu oznake označuju:  $y$  – apsorbanciju antitijela,  $a$  – nagib krivulje,  $b$  – odsječak na osi  $y$ ,  $x$  – koncentraciju proteina.  $A_{\text{proteina tkiva lizata}}$  sam pomnožila s jednadžbom krivulje te dobila vrijednosti koncentracije proteina ( $c_{\text{proteina}}$ ). Dobivene vrijednosti koncentracije proteina pomnožila sam s 5 jer je originalni lizat uzorka prije mjerenja apsorbancije razrijeđen 5 puta u 0,25% DEA.

$$A_{\text{srednja vrijednost}} - A_{0 \mu\text{g/ml BSA}} = \frac{A_{\text{proteina tkiva}} - b}{a} = c_{\text{proteina}} * 5 = c_{\text{proteina 5x razr.}}$$

Zatim sam odredila volumene lizata svakog uzorka koji će sadržavati međusobno jednaku količinu proteina.  $c_{\text{proteina 5x razr.}}$  sam podijelila s najmanjom vrijednosti koncentracije proteina iz skupine ispitivanih uzoraka  $c_{\text{proteina 5x razr. (min)}}$ . S dobivenim omjerima sam podijelila broj 25 ( $X$ ; u formuli predstavlja maksimalni volumen jačice u gelu za SDS-page elektroforezu koju ću koristiti za analizu proteina tkiva mozga) te dobila volumen lizata s ujednačenom količinom proteina ( $V_{\text{lizata}}$ ). Zatim, pomnožila sam  $V_{\text{lizata}}$  s  $c_{\text{proteina 5x razr.}}$  kako bih dobila vrijednosti mase proteina u određenom volumenu. Dogovorno je određeno da izračuni volumena lizata budu prilagođeni na vrijednost od 15 μg po uzorku. Sukladno tomu, naknadno sam podesila  $X$  vrijednost na osnovu koje ću dobiti volumene s 15 μg proteina, koja će ujedno predstavljati najveći volumen onog uzorka s najmanjom koncentracijom proteina.

$$\frac{c_{\text{proteina 5x razr.}}}{c_{\text{proteina 5x razr. (min)}}} = c_{\text{omjer}}; \frac{X}{c_{\text{omjer}}} = V_{\text{lizata}}; V_{\text{lizata}} * c_{\text{proteina 5x razr.}} = m_{\text{proteina}}$$

Za određivanje koncentracije membranskih proteina iz Triton frakcije, primijenila sam identičan postupak opisan za određivanje koncentracije proteina iz DEA frakcije.

### 3.5. Western blot analiza

Proteine od interesa u uzorcima homogenata kore velikog mozga i malog mozga analizirala sam metodom SDS-PAGE/Western blot, pri čemu sam koristila sljedeća antitijela: calbindin (marker Purkinje neurona, Swant Inc.), total tau (marker ukupnog proteina tau, Dako), AT8, (Pierce, Thermo Scientific)

te PHF1, CP13 i RZ31 (dobiveni ljubaznošću prof. P. Daviesa, NY, SAD) markeri hiperfosforiliranog proteina tau, i markera aktiviranih astrocita (GFAP, Cell Signaling) i mikroglije (CD68, Bio-Rad) (Tablica 2). Prvi korak bio je izlivanje poliakrilamidnog gela za SDS-PAGE elektroforezu. Pripremila i izlila razdvajajući gel koji sadrži dH<sub>2</sub>O, 30% akrilamid (AA), 1,5 M Tris (pH 8,8), 10% amonij persulfat (APS) i TEMED. Proteine Triton frakcije analizirala sam na 8%-tnim i 10%-tnim gelovima, a proteine DEA frakcije na 12%-tnim. Udjeli pojedinih komponenti u ovisnosti o koncentraciji gela prikazani su u Tablici. Preko razdvajajućeg gela sam neposredno nakon izlivanja izlila sloj izopropanola te je gel ostavljen da polimerizira u trajanju između 30 i 40 min. U međuvremenu sam pripremila sabijajući gel u volumenu od 6 mL koji sadrži 2,13 mL dH<sub>2</sub>O, 0,5 mL 30% APS, 0,38 mL 1,0 M Tris (pH 6,8), 0,3 mL 10% APS i 0,003 mL TEMED. Nakon što je prvi gel polimerizirao, otklonila sam izopropanol s razdvajajućeg gela i izlila sabijajući gel te umetnula češljic prema kojemu će se, nakon polimerizacije sabijajućeg gela, formirati jažice za nanošenje uzoraka. Tijekom polimerizacije sabijajućeg gela u trajanju od 30 min, započela sam pripremu sam uzorke za nanošenje.

Tablica 2. Sastav razdvajajućih poliakrilamidnih gelova različitih koncentracija u volumenu od 10 mL po gelu

	8%-tni gel [mL]	10%-tni gel [mL]	12%-tni gel [mL]
dH <sub>2</sub> O	4,7	4,1	3,4
30% AA	2,7	3,3	4,0
1.5 M Tris (pH 8,8)	2,5	2,5	2,5
10% APS	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,006	0,004	0,004

Uzorke koji su bili pohranjeni na -80°C odmrznula sam na ledu. U međuvremenu sam stavila odmrznuti pufer za nanošenje uzoraka (SB, prema engl. sample buffer, koncentriran 6x) na termoblok na 70°C. Sljedeće opisane korake pripreme uzoraka radila sam na ledu. Po odmrzavanju sam u prethodno obilježene tubice izdvojila alikvote lizata od 50mL, s tim da sam svaki uzorak neposredno prije pitetiranja vorteksirala. U alikvote sam dodala po 10 µL pufera za nanošenje te ih vorteksirala. Inkubirala sam ih na termobloku 10 min kako bi se proteini denaturirali, ponovno ih vorteksirala te stavila centrifugirati 1 min na maksimalnoj brzini (Eppendorf Centrifuge 5424, Njemačka). Zatim sam ih nanijela na gel redosljedom od 2 jedinice iz skupine divljeg tipa pa 2 jedinice iz heterozigotne skupine, najzajednice, zajedno s COZY proteinskim markerom (*Cozy™ Prestained Protein Ladder*, highQu GmbH, Njemačka). Sustav za elektroforezu sklopila sam prema uputama proizvođača (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad, SAD). Medij u kojem se odvija elektroforeza je pufer za elektroforezu (RB, prema engl. running buffer). Elektroforezu sam pokrenula na 90 V prvih 30 min dok se uzorci ne poravnaju kroz sabijajući gel, a zatim sam jakost struje povećala na 150 V. Elektroforezu je tekla dok se proteini od interesa dovoljno razdvojili za optimalnu detekciju. U međuvremenu sam pripremi-

la elemente za slaganje sustava „sendviča“ u procesu transfera natapanjem u transfer puferu (TB, prema engl. transfer buffer). Po završetku, gel s proteinima sam stavila u posudu s transfer puferom. Za transfer proteina s gela korištena je PVDF (polivinildien difluorid) membrana (0,2  $\mu\text{m}$ , Roche, Švicarska) koju sam aktivirala u metanolu (Kemika, Hrvatska) tijekom 1 min. Zatim sam na polovicu kazete s katodom redom posložila: spužvicu, filter papir, gel, PVDF membranu, filter papir i spužvicu (spužvice i filter papiri prethodno sam namočila u puferu za transfer). Kazetu sam zatvorila, te stavila u kadicu u koju sam ulila transfer pufer. Transfer je tekao pri 100 mA tijekom 16 sati na  $+4^{\circ}\text{C}$ . Nakon transfera, membranu sam bojala *Amido black* bojom (*Amido black 10B*, Merck, Njemačka) u svrhu detekcije odnosno vizualizacije ukupnih proteina na membrani. U svim naredno opisanim koracima bojanja, membrana se inkubirala na tresilici na sobnoj temperaturi. Membranu sam stavila u 1xPBS tijekom 10 min, zatim u *Amido black* na 2 min. Isprala sam ju u otopini za odbojavanje 2 puta po 30 min. Membranu sam blago posušila te ju na bijeloj podlozi uslikala mobilnim uređajem. Isprala sam ju u  $\text{dH}_2\text{O}$  4 puta po 2 min, a zatim u TBS-T puferu tijekom 20 min. Zatim sam ju stavila inkubirati u pufer za blokiranje I-Block™ (Invitrogen, SAD) na tresilici (UltraRocker Rocking Platform, BioRad, SAD) tijekom 1 sata na sobnoj temperaturi. Pred kraj inkubacije, razrijedila sam primarno antitijelo u 10 mL pufera za blokiranje (Tablica 3). Inkubacija s primarnim antitijelima trajala je preko noći na tresilici na  $+4^{\circ}\text{C}$ . Sljedeći dan sam isprala membranu 3 puta po 10 min u TBS-T puferu za ispiranje membrana (prema engl. Tris buffered saline – Tween). Zatim, priredila sam sekundarno antitijelo u puferu za blokiranje. Razrjeđenja za sva sekundarna antitijela korištena u ovom eksperimentu su prema uputama proizvođača 1:5000. Membrana se inkubirala u sekundarnom antitijelu 1 sat na sobnoj temperaturi na tresilici, a potom sam ju isprala 3 puta po 10 min u TBS-T puferu. Po završetku sam pripremila reagens za detekciju iz komercijalnog kita *SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača u volumenu od 1 mL po membrani. Signal je vizualiziran u uređaju Uvitec *Alliance Q9 Mini* (UVITEC Cambridge, UK). Nakon vizualizacije signala, membranu sam isprala u TBS-T puferu 5 min te ju pohranila na  $+4^{\circ}\text{C}$ .

Tablica 3. Popis primarnih i sekundarnih protutijela korištenih u Western blot analizi

	biološko pod- rijetlo	razrjeđenje	Klon, proizvođač
anti-NPC1	kunić	1:2000	EPR5209, Abcam, UK
anti-calbindin	miš	1:1000	D-28k, Swant, Švicarska
anti- $\beta$ III tubulin	kunić	1:2000	AB18207, Abcam, UK
anti-total tau	kunić	1:5000	A0024, DAKO Agilent, SAD
anti-AT8	miš	1:1000	Pierce Thermo Scientific, SAD
anti-CP13	miš	1:100	<i>Dobiveno ljubaznošću dr. Petera Daviesa (Albert Einstein College of Medicine, SAD)</i>
anti-PHF1	miš	1:500	
anti-RZ3	miš	1:100	
anti-GFAP	miš	1:100	GA5, Cell Signaling, SAD
Anti-IgG kunića+HRP	Koza	1:5000	Bio-Rad, SAD
Anti-IgG miša+HRP	Koza	1:5000	Bio-Rad, SAD
Anti-IgG štakora+HRP	koza	1:5000	Sigma-Aldrich, SAD

Tablica 4. Popis radnih otopina

Metoda imunohistokemije	
pufer za permeabilizaciju	TBS 10x (500mM, pH 8): 60,75g Trizma base + 70,25NaCl u 1L dH <sub>2</sub> O; 1L 1xTBS 1X+5ml Triton X-100
Homogenizacija tkiva	
0,25% DEA pufer	0,25% DEA (#471216), 100 mM NaCl (stock: 5 M NaCl)
1% Triton pufer	1% Triton X-100, 150 mM NaCl (stock: 5 M), 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 (stock: 1 M Tris-HCl pH 7,4), 2 mM EDTA (0,5 M EDTA, pH 8,0)
Western blot metoda	
pufer za nanošenje uzoraka	6 mL glicerola; 1,2g SDS-a, 0,31g DDT-a, 1,25mL 0,5 M Tris (pH 6,8), 5mg bojila bromfenol plavo, dH <sub>2</sub> O do volumena 10mL *nereducirajući pufer za nanošenje uzoraka priprema se na isti način, ali bez dodavanja DTT-a i bromfenol plavog
pufer za elektroforezu	Tris baza (3 g/L), glicin (14,4 g/L) i SDS (1 g/L) u dH <sub>2</sub> O
pufer za transfer	200 mL/L metanol, 14,4 g/L glicin i 3,03 g/L tris baza u dH <sub>2</sub> O
fosfatni pufer	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
otopina za odbojavanje	450mL MetOH, 70mL CH <sub>3</sub> COOH, reH <sub>2</sub> O do 1L
pufer za ispiranje membrana	2,4 g Tris baze, 8,8 g NaCl, 1mL Tween 20, dH <sub>2</sub> O do volumena 1 L (pH 7,6)
pufer za blokiranje	0,6 g I-Blocka u 300mL 1xPBS-a, uz dodatak 300uL Tween 20 nakon hlađenja

### 3.6. Kvantifikacija rezultata dobivenih metodom Western blot

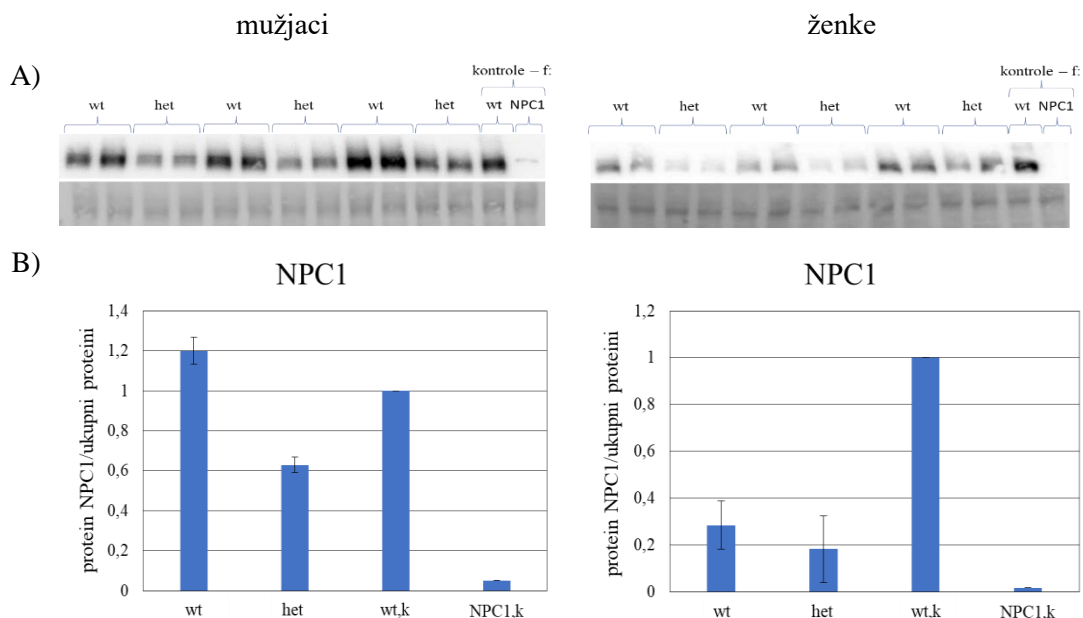
Intenzitet imunoreaktivnosti svakog proteina kvantificiran je u odnosu na ukupnu količinu proteina koja je vizualizirana *Amido black* bojanjem. Kvantifikaciju sam napravila pomoću ImageJ programa (National Institutes of Health, SAD). U program sam uvezla sliku membrane koja je uslikana na Uvitec uređaju na kojoj se vide bendovi analiziranog proteina. Bend svakog uzorka posebno sam označila. Intenzitet signala izražen je u obliku brojčanih vrijednosti koje sam izvezla u program Microsoft Excel. Istim postupkom sam analizirala signal ukupne količine proteina sa slike membrane obojane *Amido black*, koji odgovara veličini analiziranog proteina. U Excel tablici sam podijelila stupac analiziranog proteina sa stupcem ukupne količine proteina. Stupac s dobivenim omjerom sam podijelila s vrijednosti kontrole divljeg tipa (wt,k) iz tog stupca te dobila vrijednosti koje predstavljaju kvantifikaciju signala prema kontrolnoj skupini koji je normaliziran signalom ukupne količine proteina. Omjer za kontrolnu skupinu miša (wt,k) starog 9 tjedana postavljen je na 1, a ostali omjeri izračunati su u odnosu na njega. Izračunala sam srednje vrijednosti za NPC1-het i wt skupinu te njihove standardne devijacije. Usporedbu razine proteina između tih dvaju skupina napravila sam t-testom (two-tailed, unpaired). Promjene su se smatrale značajnim pri  $p$  vrijednostima  $<0,05$  (\*  $<0,05$ ; \*\*  $<0,005$ ). Naposljetku, grafički sam prikazala razine proteina NPC1-het i wt skupine te kontrolnih skupina wt,k i *NPC1*  $\nearrow$  u obliku stupaca.

## 4. REZULTATI

Rezultati Western blot analize sadrže 3 komponente: sliku membrane analiziranog proteina, slika istog dijela membrane obojene *Amido black* bojom na kojoj je vidljiva ukupna količina proteina, te grafički prikaz kvantifikacije rezultata kao omjera jačine signala analiziranog proteina i ukupne razine proteina između wt, het i kontrolnih skupina wt (wt,k) i *NPC1*<sup>-/-</sup> (NPC1,k). Rezultati imunohistokemijskog bojanja sagitalnih prereza mišjih mozгова prikazani su na način da su slike obojenja određenim protutijelom preklapljene sa slikom dobivenom bojanjem istih prereza bojom Hoechst (plavo obojenje jezgara). Hoechst sam koristila za dobivanje topološke slike histološkog prereza, odnosno kao potvrdu da prikaz obojenja protutijelima pripada određenoj regiji mozga.

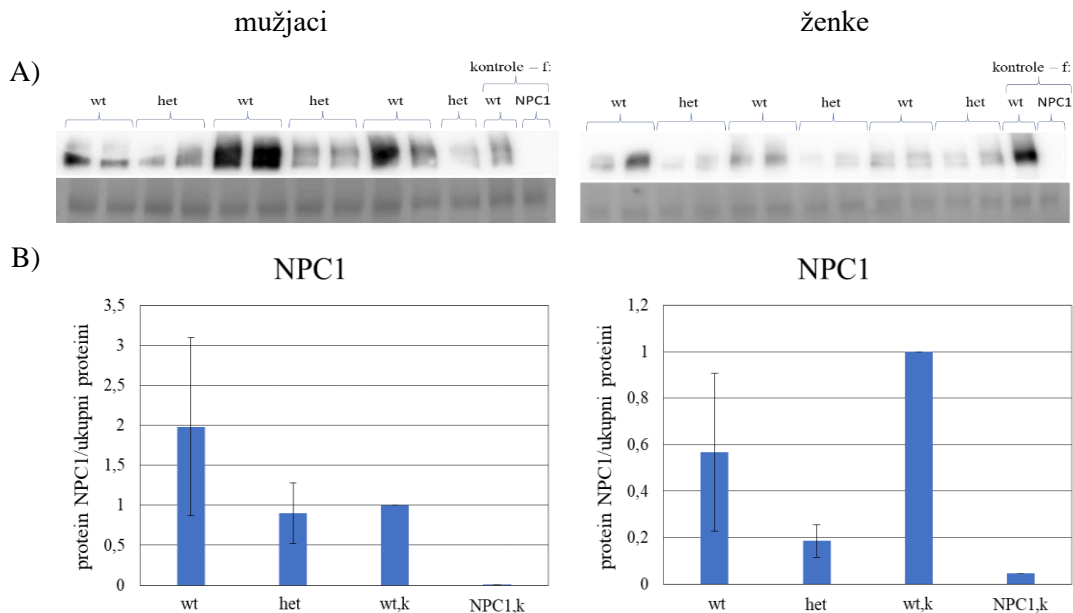
### 4.1. Potvrda genotipa analiziranih mozgov 100-tjedana starih heterozigotnih NPC1 miševa i miševa divljeg tipa

Prvotno sam analizirala homogenate tkiva kore velikog mozga i malog mozga Western blot metodom na anti-NPC1 protutijelo, čime je potvrđen genotip divljeg tipa miševa (wt) i heterozigotnih (het) NPC1 miševa. Proteinske vrpce koje se nalaze pri veličini od oko 180 kDa, kod wt skupine su vidljivo jače u odnosu na het skupinu, dok je kod *NPC1*<sup>-/-</sup> miševa ovaj signal izostao (Slike 5 i 6).



Slika 5. Potvrda genotipa analiziranih mišjih kora velikog mozga. A) Western blot analiza tkiva kore velikog mozga s anti-NPC1 protutijelom u uzorcima 100-tjedana starih wt (n=6) i het (n=6) miševa te kontrolne skupine 9-tjedana starih wt i *NPC1*<sup>-/-</sup> ženki (f) miševa. Svaka jažica predstavlja uzorak jedne životinje. Gornji dio blota predstavlja signal dobiven anti-NPC1 protutijelom. Donji dio blota

predstavlja dio membrane obojane *Amido black* bojom radi prikaza ukupne količine proteina. B) Kvantifikacija dobivenih signala prikazanih kao omjer signala proteina NPC1 i ukupne količine proteina. Vrijednosti pogreške izražene su preko standardne devijacije (SD).



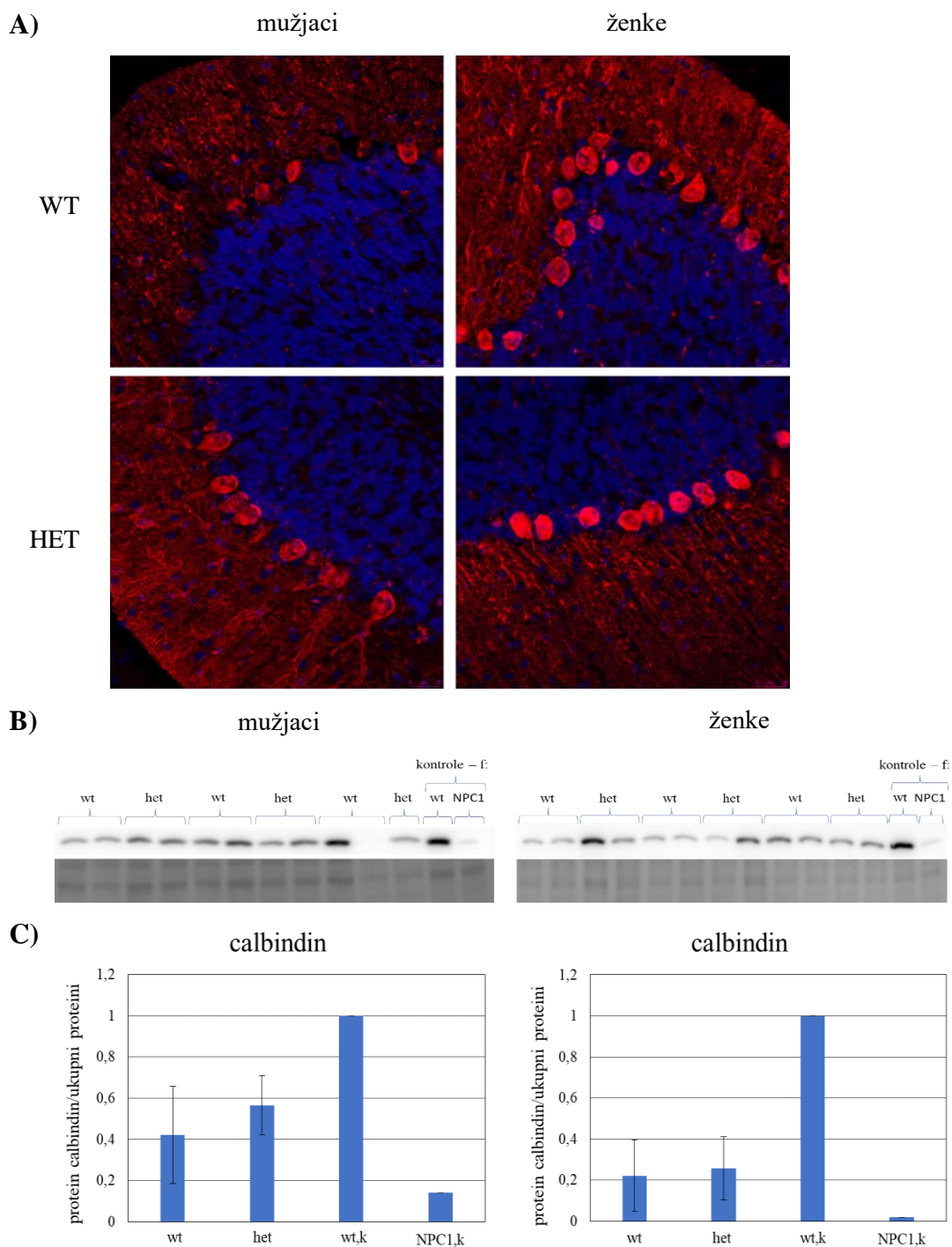
Slika 6. Potvrda genotipa analiziranih mišjih malih mozgova. A) Western blot analiza tkiva malog mozga s anti-NPC1 protutijelom u uzorcima 100-tjedana starih wt (n=6) i het (n=5 mužjaka, n=6 ženki) miševa te kontrolne skupine 9-tjedana starih wt i *NPC1*<sup>-/-</sup> ženki (f) miševa. Svaka jažica predstavlja uzorak jedne životinje. Gornji dio blota predstavlja signal dobiven anti-NPC1 protutijelom. Donji dio blota predstavlja dio membrane obojane *Amido black* bojom radi prikaza ukupne količine proteina. B) Kvantifikacija dobivenih signala prikazanih kao omjer signala proteina NPC1 i ukupne količine proteina. Vrijednosti pogreške izražene su preko standardne devijacije (SD).

#### 4.2. Analiza neurodegeneracije u malom mozgu i u kori velikog mozga

Kao marker neurodegeneracije Purkinje neurona u malom mozgu korišten je calbindin. Na sagitalnim prerezima tkiva malog mozga 100-tjedana starih miševa metodom imunohistokemije pokazano je da nema značajne morfološke razlike u imunoreaktivnosti na tijelu (crvene okrugle strukture) i dendritičkom stablu (crveno obojanje guste nitaste strukture koji izlaze iz tijela neurona i protežu se iznad njih) Purkinje neurona između wt i het skupine, kao ni između mužjaka i ženki različitih skupina (Slika 7 A). Ovaj rezultat u skladu je s rezultatom dobivenim Western blot analizom homogenata tkiva malog mozga koristeći anti-calbindin antitijelo. Razlika u jačini signala pojedinih vrpca između wt i het skupine nije statistički značajna, a pri tom očitavamo i visoku standardnu devijaciju (Slika 7 B).

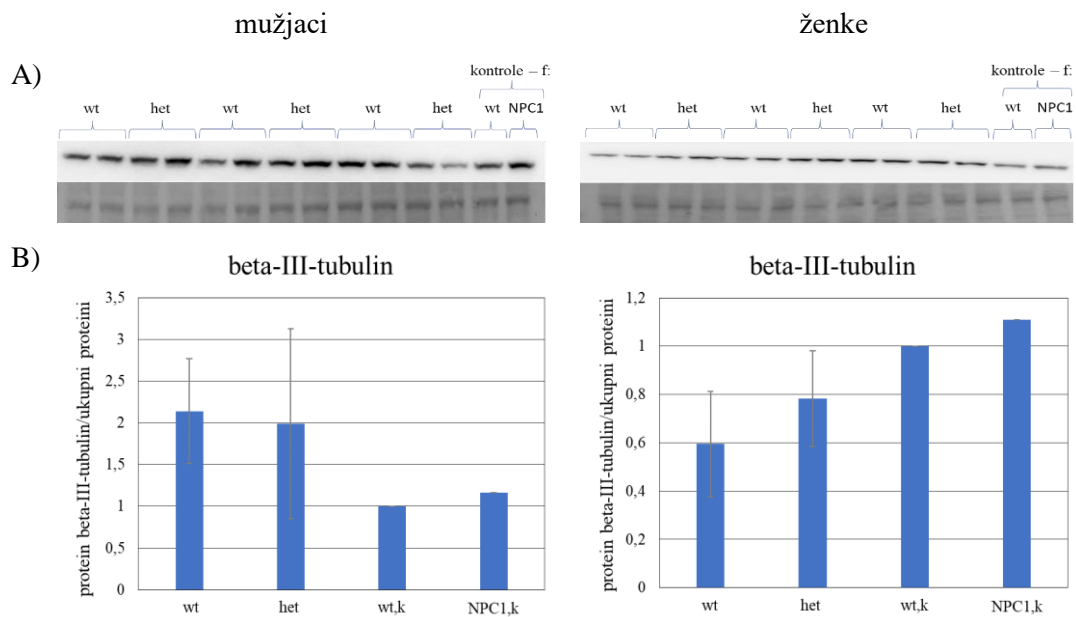
Anti-beta-III-tubulin antitijelo korišteno je kao marker neurona u analiziranim uzorcima, s obzirom na to da je beta-III-tubulin dio mikrotubularne strukture aksona i dendrita, gotovo specifičan za stanice neurona. Detektira se pri veličini 55 kDa. Rezultati dobiveni na uzorcima kore velikog mozga ne pokazuju dosljednu razliku u količini proteina beta-III-tubulina između 100-tjedana stare wt i het skupine miševa, u mužjaka i u ženki (Slika 8). Također, na analiziranim uzorcima malog mozga dobivena je jednolika količina proteina beta-III-tubulina između 100-tjedana starih wt i het miševa oba spola, s tim da je kod ženki signal u kontrolnim skupinama jače izražen u odnosu na ispitivane wt i het skupine (Slika 9).



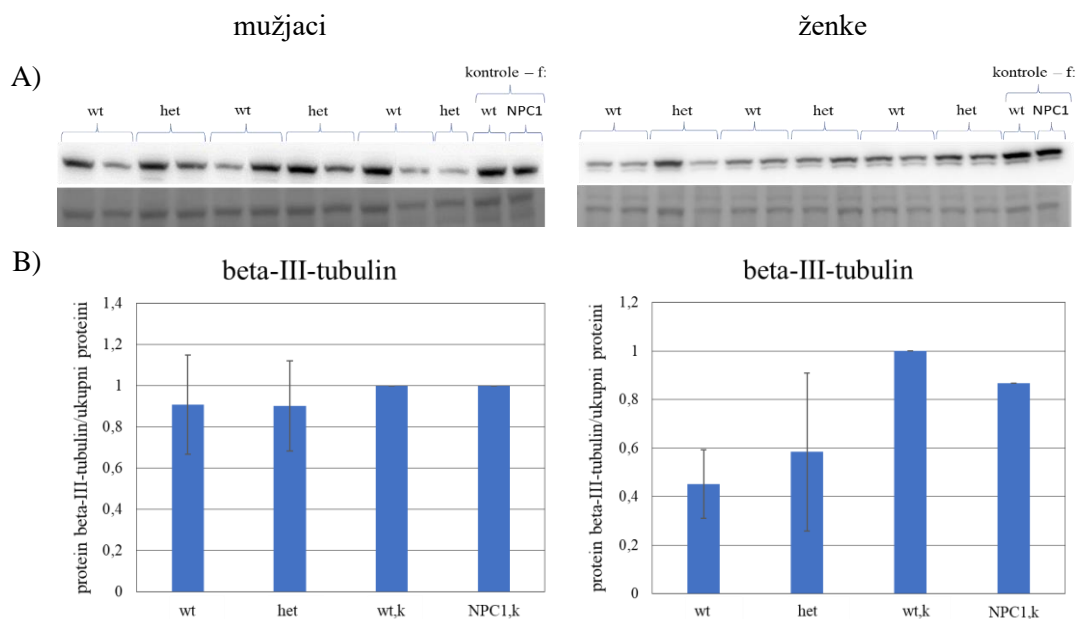


Slika 7. Analiza neurodegeneracije Purkinje neurona u tkivu malog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. **A)** Imunohistokemijsko bojanje prereza tkiva malog mozga anti-calbindin protutijelom (crveno) i Hoechst bojom (plavo). **B)** Western blot analiza tkiva malog mozga s anti-calbindin protutijelom u uzorcima 100-tjedana starih wt (n=6) i het (n=5 mužjaka, n=6 ženki) miševa te kontrolne skupine 9-tjedana starih wt i *NPC1*<sup>-/-</sup> ženki (f) miševa. Gornji dio blota predstavlja signal dobiven anti-calbindin protutijelom. Donji dio blota predstavlja dio membrane obojane *Amido black* bojom radi prikaza ukupne količine proteina. **C)** Rezultati u vidu grafa prikazuju kvantifikaciju

dobivenih signala prikazanih kao omjer signala proteina calbindina i ukupne količine proteina. Vrijednosti pogreške izražene su preko standardne devijacije (SD).



Slika 8. Analiza neurodegeneracije u tkivu kore velikog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Western blot analiza tkiva kore velikog mozga s anti-beta-III-tubulin protutijelom u uzorcima 100-tjedana starih wt (n=6) i het (n=6) miševa te kontrolne skupine 9-tjedana starih wt i *NPC1*<sup>-/-</sup> ženki (f) miševa. Gornji dio blota predstavlja signal dobiven anti-beta-III-tubulin protutijelom. Donji dio blota predstavlja dio membrane obojane *Amido black* bojom radi prikaza ukupne količine proteina. B) Kvantifikacija dobivenih signala prikazanih kao omjer signala proteina beta-III-tubulin i ukupne količine proteina. Vrijednosti pogreške izražene su preko standardne devijacije (SD).

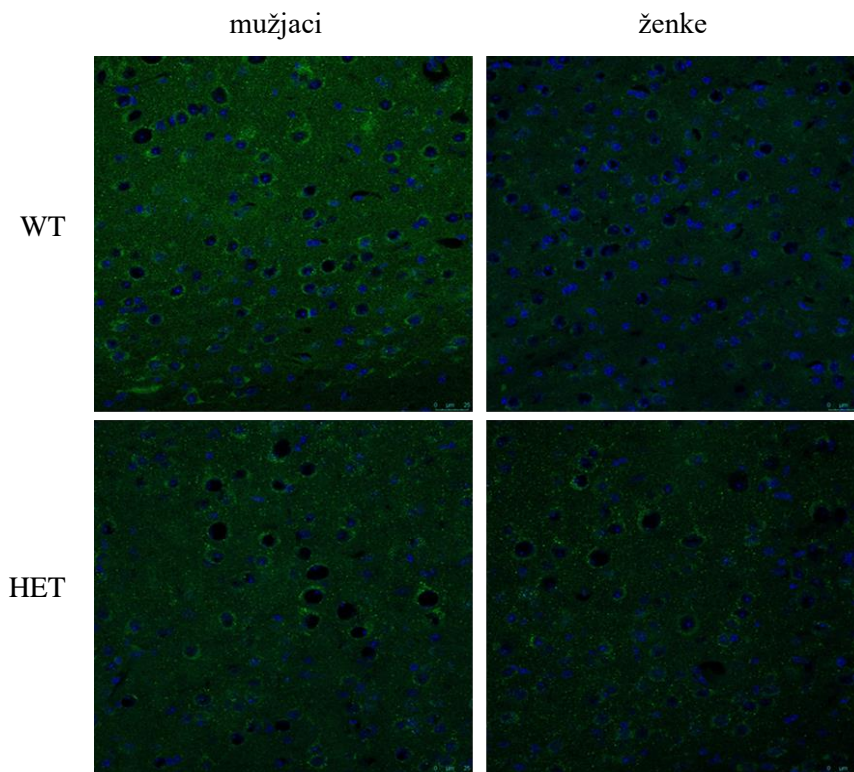


Slika 9. Analiza neurodegeneracije u tkivu malog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Western blot analiza tkiva malog mozga s anti-beta-III-tubulin protutijelom u uzorcima 100-tjedana starih wt (n=6) i het (n=5 mužjaka, n=6 ženki) miševa te kontrolne skupine 9-tjedana starih wt i NPC1  $\neg$  ženki (f) miševa. Gornji dio blota predstavlja signal dobiven anti-beta-III-tubulin protutijelom. Donji dio blota predstavlja dio membrane obojane *Amido black* bojom radi prikaza ukupne količine proteina. B) Kvantifikacija dobivenih signala prikazanih kao omjer signala proteina beta-III-tubulin i ukupne količine proteina. Vrijednosti pogreške izražene su preko standardne devijacije (SD).

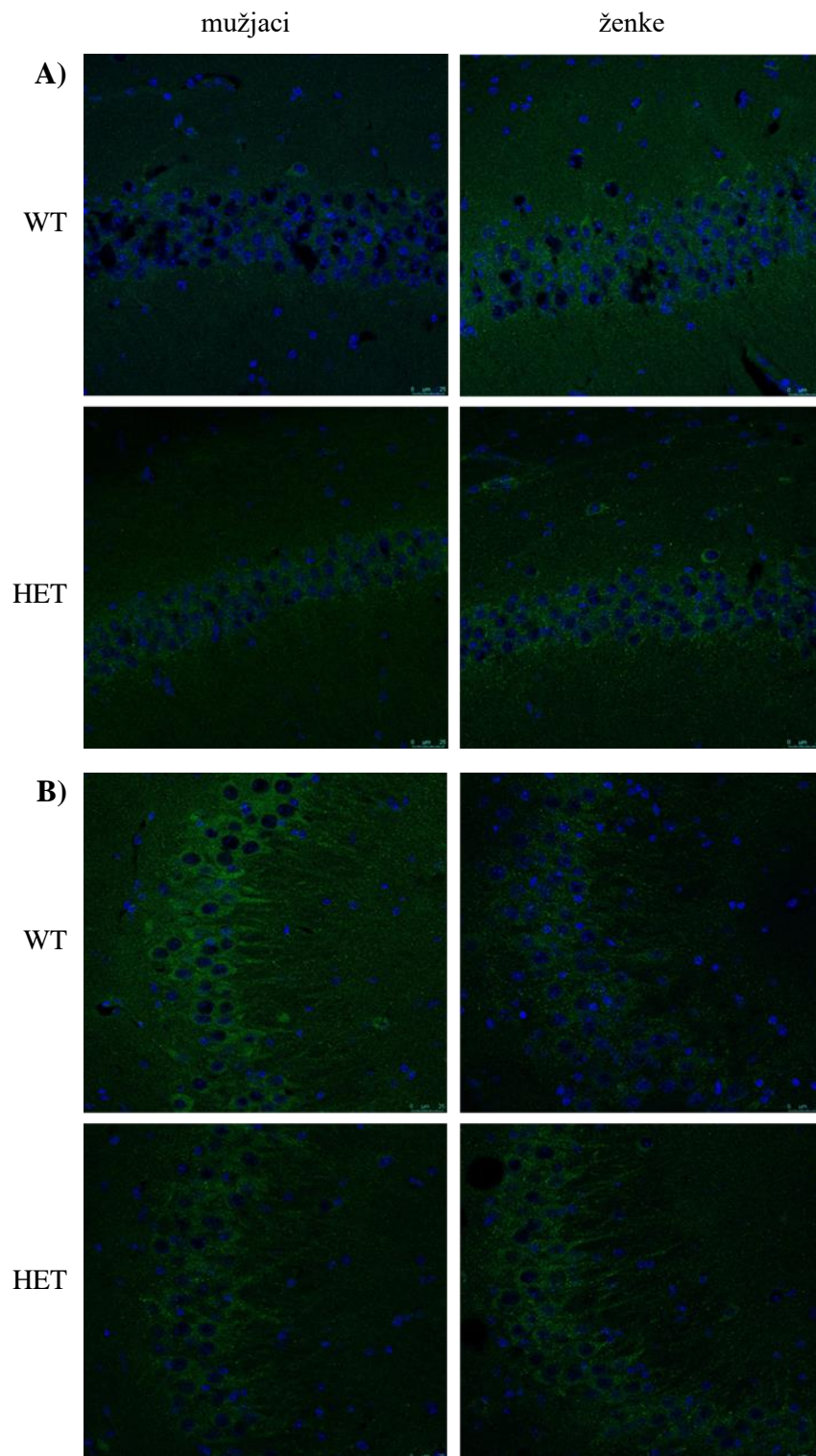
#### 4.3. Analiza disfunkcije endolizosomalnog puta u moždanim regijama kore velikog mozga, hipokampusa i u malom mozgu

Imunohistokemijskim bojanjem sagitalnih prereza 100-tjedana starih mišjih mozгова dobili smo uvid u stanje ranih endosoma i lizosoma u mozgovima het NPC1 miševa u odnosu na wt miševe iste dobi. Marker anti-EEA1 („*Early Endosome Antigen 1*“) korišten je za praćenje promjena na ranim endosomima, a LAMP1 („*Lysosome Associated Protein 1*“) za detekciju lizosoma. Prikazane su regije kore velikog mozga (Slika 10), CA1 i CA3 regije hipokampusa (Slika 11 A i 10 B) i regija malog mozga (Slika 12). Na obojenjima ovih moždanih regija s anti-EEA1 protutijelom nije vidljiva razlika između wt i het skupina, kao ni između spolova. Rezultat obojenja anti-LAMP1 protutijelom nije dosljedan kroz prethodno spomenute regije mozga wt i het NPC1 miševa. U regiji kore velikog mozga opažena je razlika između wt i het skupine kod oba spola u vidu pojačanog obojenja koje okružuje tijela neurona (Slika 13). Na temelju rezultata dobivenih bojanjem prereza tkiva CA1 i CA3 regija hipokampusa nije moguće utvrditi jasnu razliku u intenzitetu imunoreaktivnosti na anti-LAMP1 protutijelo između wt i het skupina zbog značajne heterogenosti (Slika 14). Uočene razlike koje idu u

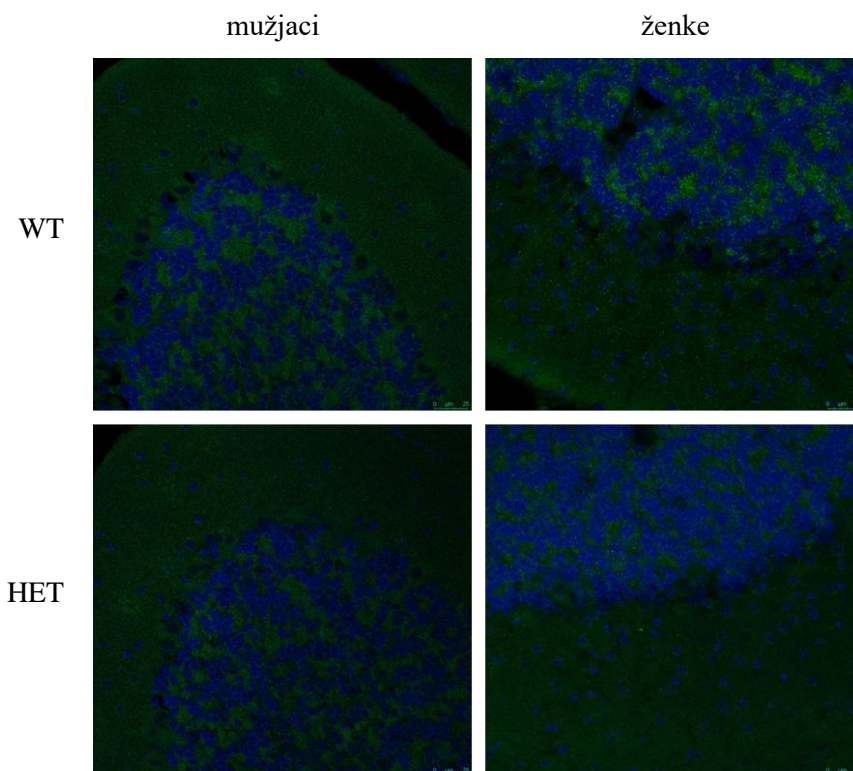
prilog pojačanoj lizosomalnoj disfunkciji u hipokampusu, primjerice kod ženki u CA1 i CA3 regiji, nisu potvrđene kod većeg broja životinja (Slika 14 A i 13 B). S druge strane, kod nekih skupina je primijećena pojačana imunoreaktivnost kod wt skupine, primjerice kod mužjaka u CA1 regiji (Slika 14 A). Stoga, zbog nedosljednih razlika između wt i het NPC1 miševa oba spola, nije moguće potvrditi disfunkciju endolizosomalnog puta u CA1 i CA3 regijama hipokampusa. U regijama prednjeg i stražnjeg režnja malog mozga također nije uočena razlika u imunoreaktivnosti na anti-LAMP1 antitijelo kod Purkinje neurona između wt i het NPC1 skupina (Slika 15 A i 14 B).



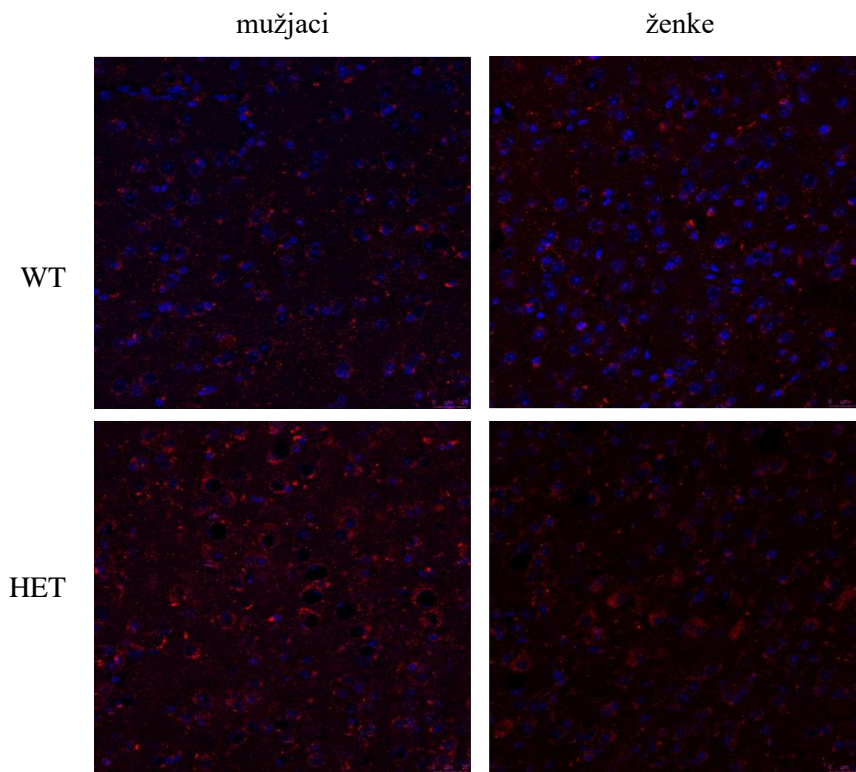
Slika 10. Prikaz disfunkcije endolizosomalnog puta neurona u tkivu kore velikog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. Imunohistokemijsko bojanje prereza tkiva malog mozga anti-EEA1 protutijelom (zeleno) i Hoechst bojom (plavo).



Slika 11. Prikaz disfunkcije endolizosomalnog puta neurona u tkivu hipokampusa 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Imunohistokemijsko bojanje prereza tkiva CA1 regije hipokampusa anti-EEA1 protutijelom (zeleno) i Hoechst bojom (plavo). B) Imunohistokemijsko bojanje prereza tkiva CA3 regije hipokampusa anti-EEA1 protutijelom.

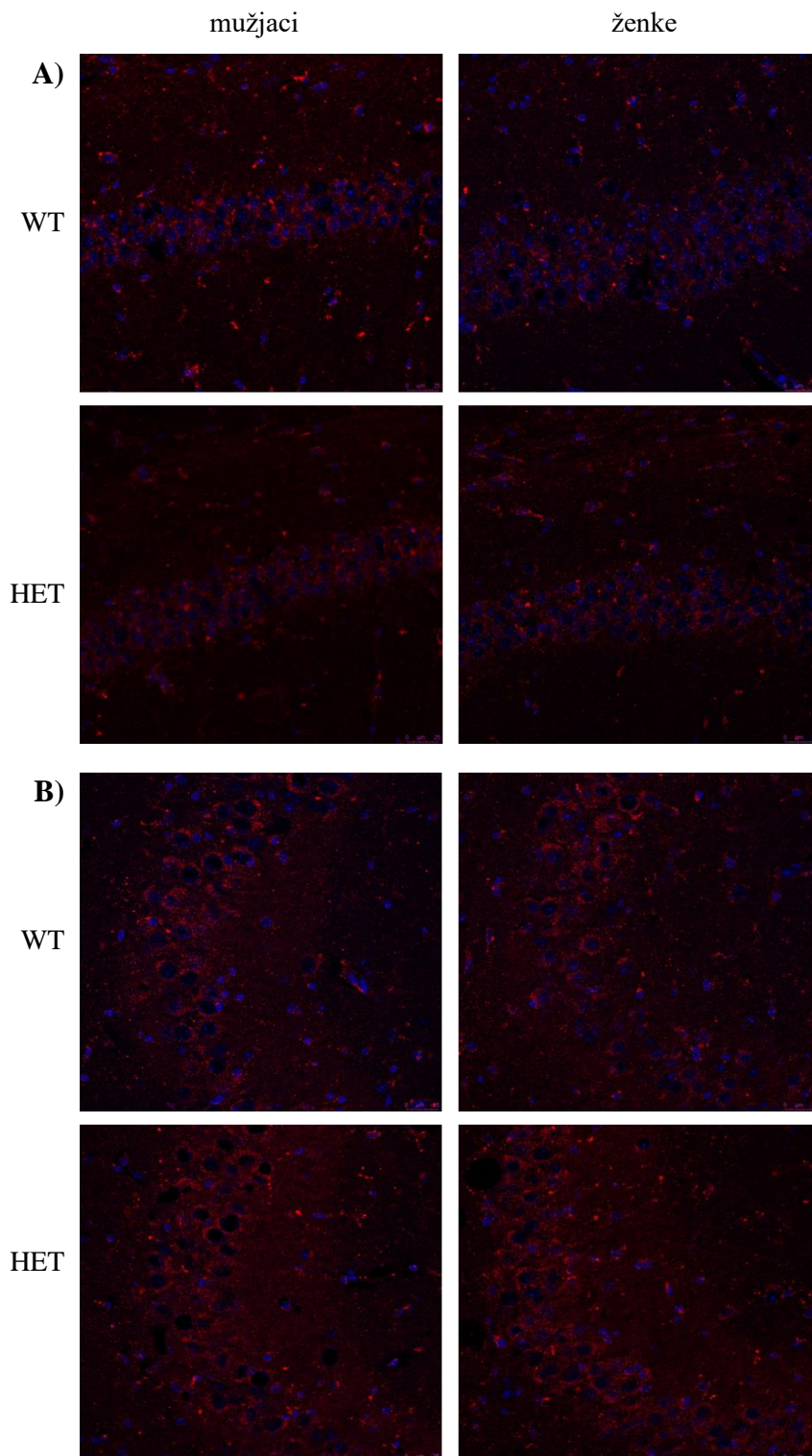


Slika 12. Prikaz disfunkcije endolizosomalnog puta neurona u tkivu maloga mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. Imunohistokemijsko bojanje prereza tkiva maloga mozga anti-EEA1 protutijelom (zeleno) i Hoechst bojom (plavo).

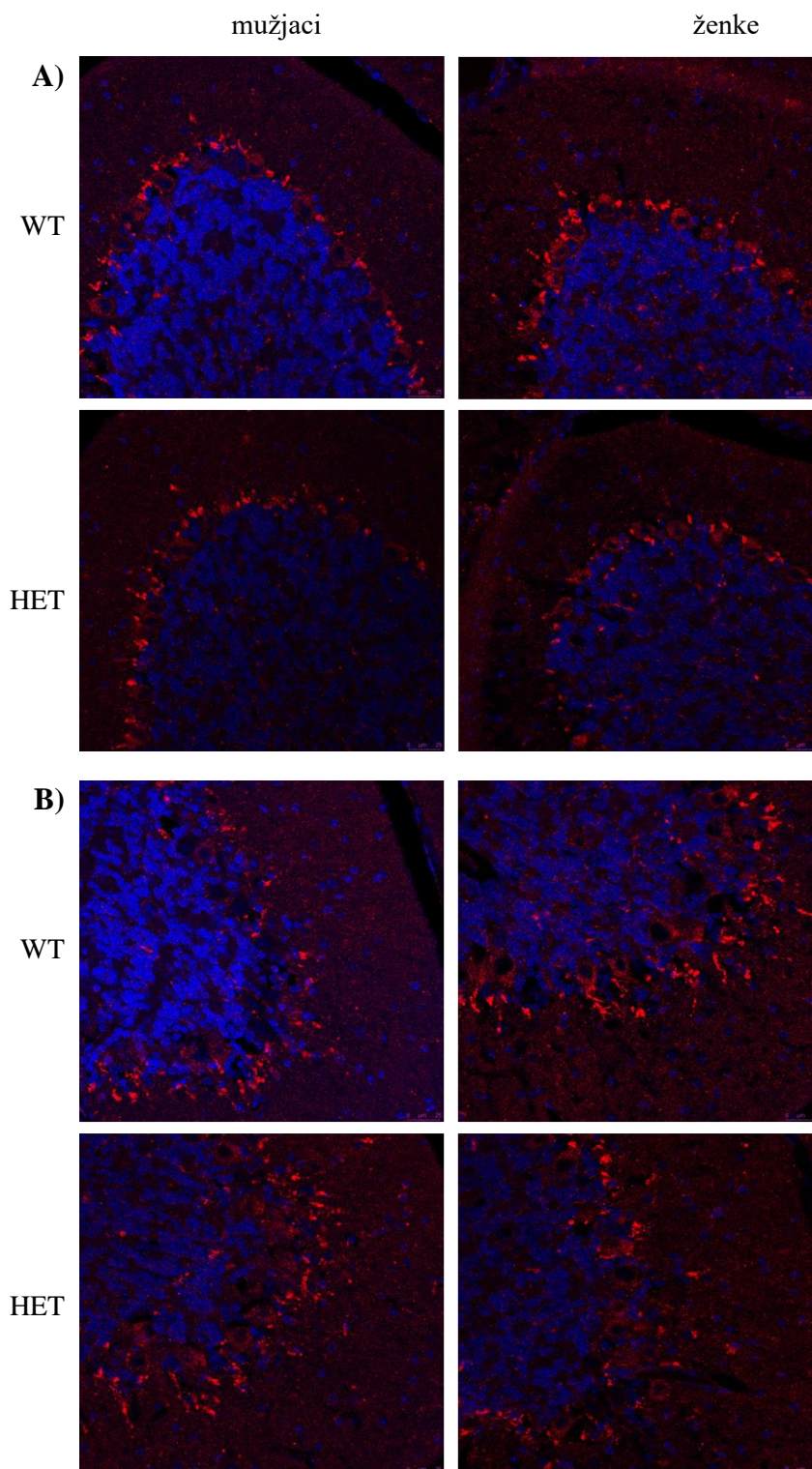


Slika 13. Prikaz disfunkcije endolizosomalnog puta neurona u tkivu kore velikog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. Imunohistokemijsko bojanje prereza tkiva malog mozga anti-LAMP1 protutijelom (crveno) i Hoechst bojom (plavo).





Slika 14. Prikaz disfunkcije endolizosomalnog puta neurona u tkivu hipokampusa 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Imunohistokemijsko bojanje prereza tkiva CA1 regije hipokampusa anti-LAMP1 protutijelom (crveno) i Hoechst bojom (plavo). B) Imunohistokemijsko bojanje prereza tkiva CA3 regije hipokampusa anti-LAMP1 protutijelom.

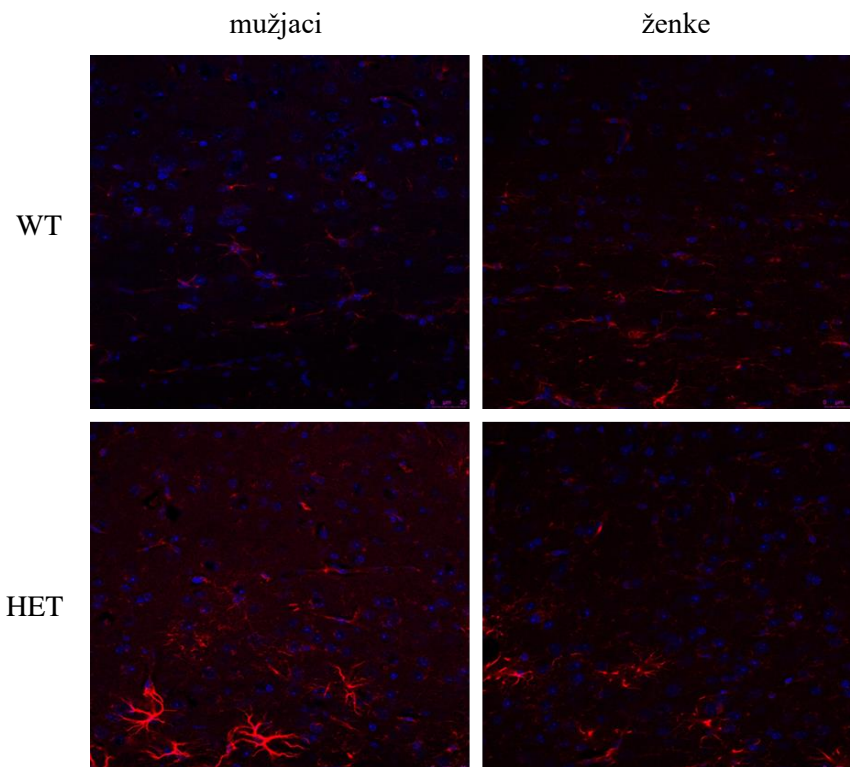


Slika 15. Prikaz disfunkcije endolizosomalnog puta neurona u tkivu maloga mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Imunohistokemijsko bojanje prereza tkiva regije prednjeg režnja maloga mozga anti-LAMP1 protutijelom (crveno) i Hoechst bojom (plavo). B) Imunohistokemijsko bojanje prereza tkiva regije stražnjeg režnja CA3 maloga mozga anti-LAMP1 protutijelom.

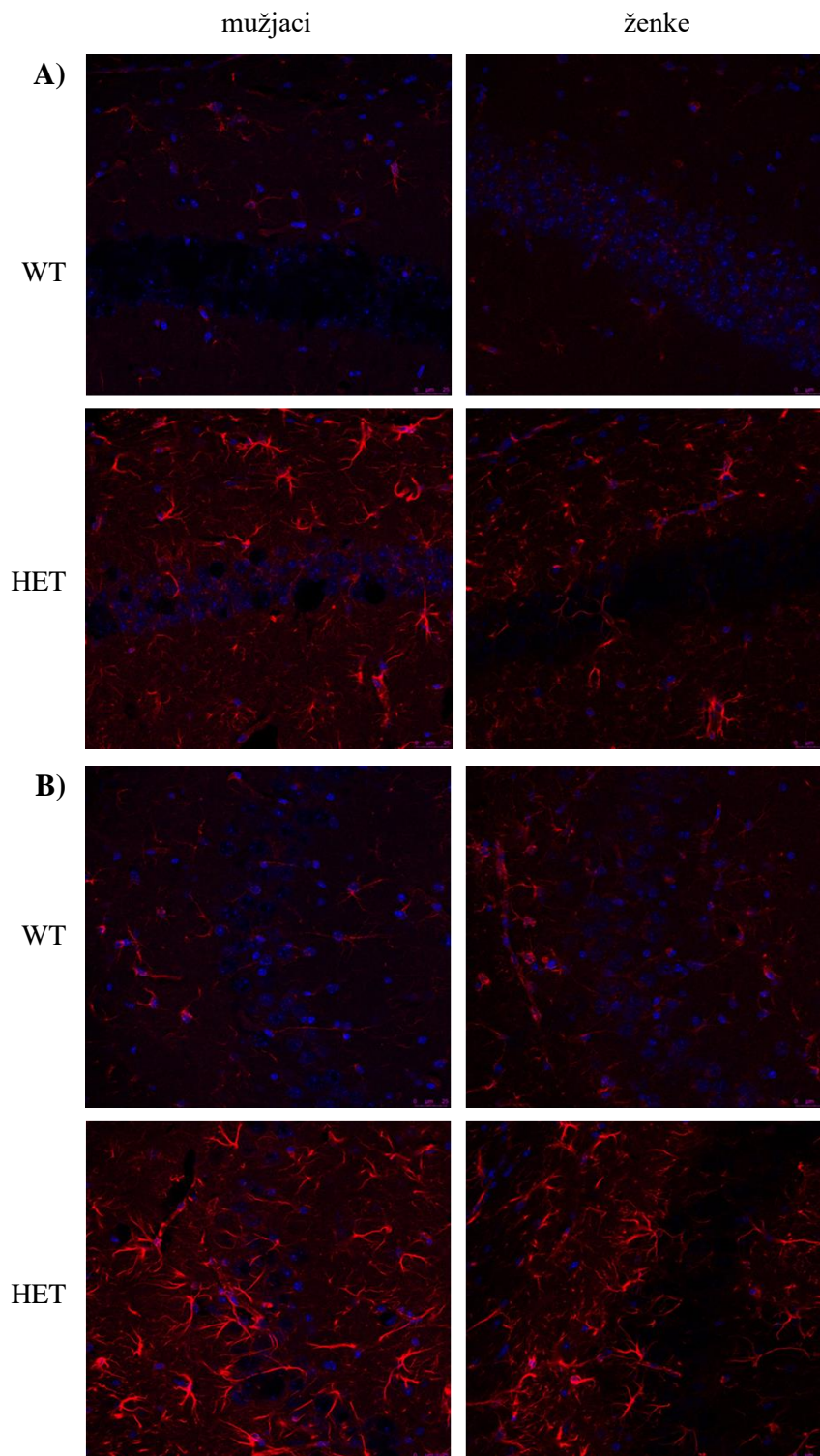
#### 4.4. Analiza neuroinflamacije u moždanim regijama kore velikog mozga, hipokampusa i u malom mozgu

Metodom imunohistokemije i Western blot sam pomoću markera za astrocite i mikroglije pratila stanje neuroinflamacije u 100-tjedana starim mozgovima het NPC1 miševa u odnosu na wt miševe iste dobi. Marker aktivacije astrocita je GFAP („*Glial Fibrillary Acidic Protein*“ – kiseli glijalni fibrilarni protein). CD68 („*Cluster of Differentiation 68*“ – stanični diferencijacijski antigen 68) je marker za aktivirane mikroglije.

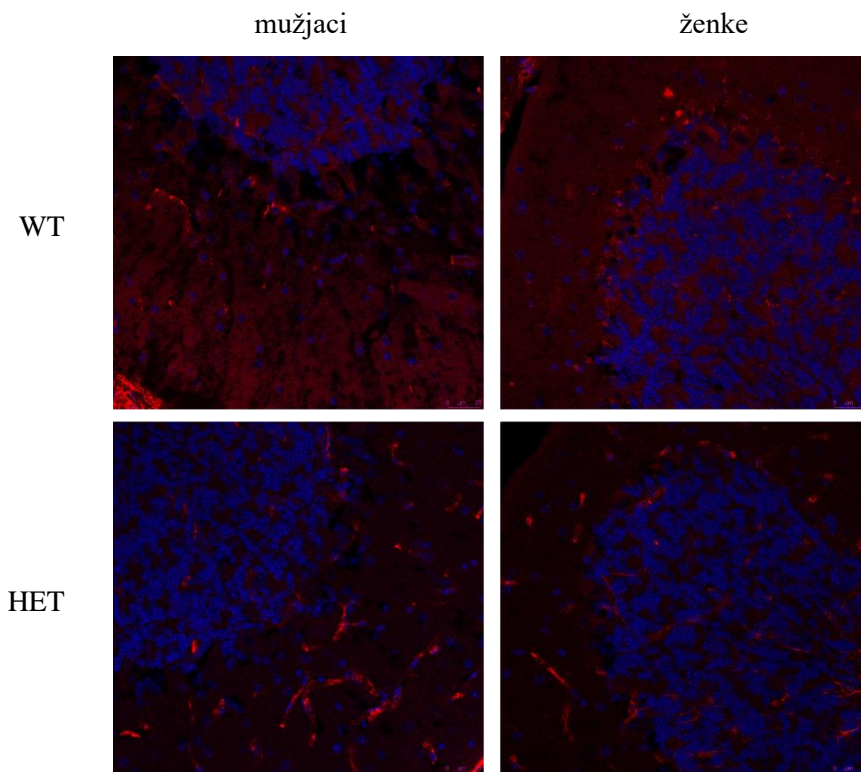
Rezultat obojenja s anti-GFAP protutijelom pokazuje jasno vidljivu razliku između 100-tjedana starih wt i het miševa za sve tri analizirane moždane regije (kore velikog mozga, hipokampusa i malog mozga). Kod het skupine mužjaka i ženki vidljiva su jača obojenja astrocita u odnosu na wt skupinu. Takva je razlika prisutna u kori velikog mozga (Slika 16) i hipokampusu (Slika 17), a posebno je izražena u CA3 regiji hipokampusa (Slika 17 A). U malom mozgu 100-tjedana starih het miševa nije vidljivo obojenje astrocita kao u prethodno navedenim regijama u odnosu na wt miševe iste dobi (Slika 18).



Slika 16. Prikaz neuroinflamacije astrocita u tkivu kore velikog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. Imunohistokemijsko bojanje prereza tkiva kore velikog mozga anti-GFAP protutijelom (crveno) i Hoechst bojom (plavo).

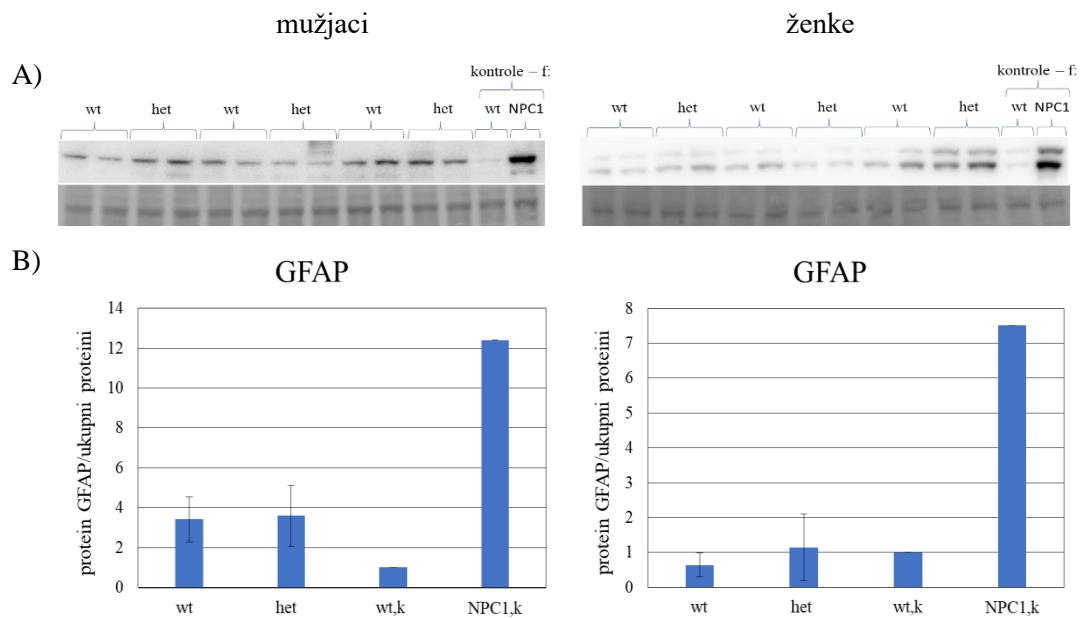


Slika 17. Prikaz neuroinflamacije astrocita u tkivu hipokampusa 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Imunohistokemijsko bojanje prereza tkiva CA1 regije hipokampusa anti-GFAP protutijelom (crveno) i Hoechst bojom (plavo). B) Imunohistokemijsko bojanje prereza tkiva CA3 regije hipokampusa anti-GFAP protutijelom.

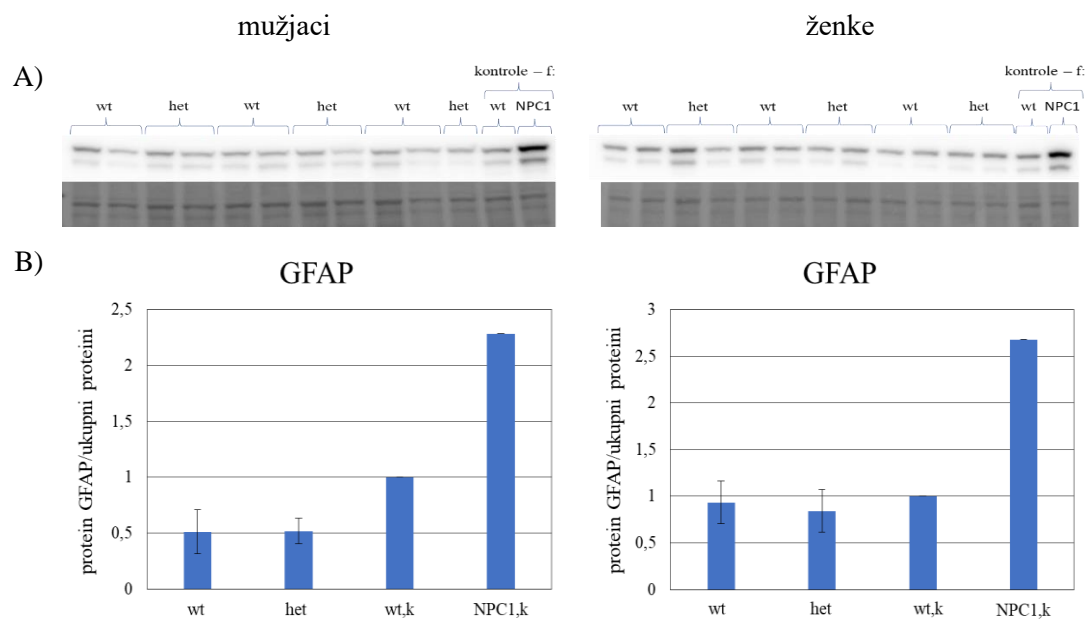


Slika 18. Prikaz neuroinflamacije astrocita u tkivu maloga mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. Imunohistokemijsko bojanje prereza tkiva maloga mozga anti-GFAP protutijelom (crveno) i Hoechst bojom (plavo).

Western blot metodom napravljena je analiza GFAP proteina. Signal ovog proteina pojavljuje se pri veličini 50kDa, razdvojen u 2 vrpce, odnosno 2 fragmenta proteina. U kori velikog mozga nije utvrđena razlika u razini GFAP markera astrocita između 100-tjedana stare wt i het skupine mužjaka (Slika 19). Iako se u uzorcima ženki pojavljuje pojačan signal kod het u odnosu na wt skupinu, zbog visokog raspona standardne devijacije ova razlika nije značajna (Slika 19). U uzorcima malog mozga je pokazano da nema razlike u količini GFAP proteina između 100-tjedana stare wt i het skupine (Slika 20). U obje moždane regije vidljiva je izrazito povećana količina GFAP proteina u NPC1<sup>-/-</sup> u odnosu na wt kontrolnu 9-tjedana staru skupinu miševa.

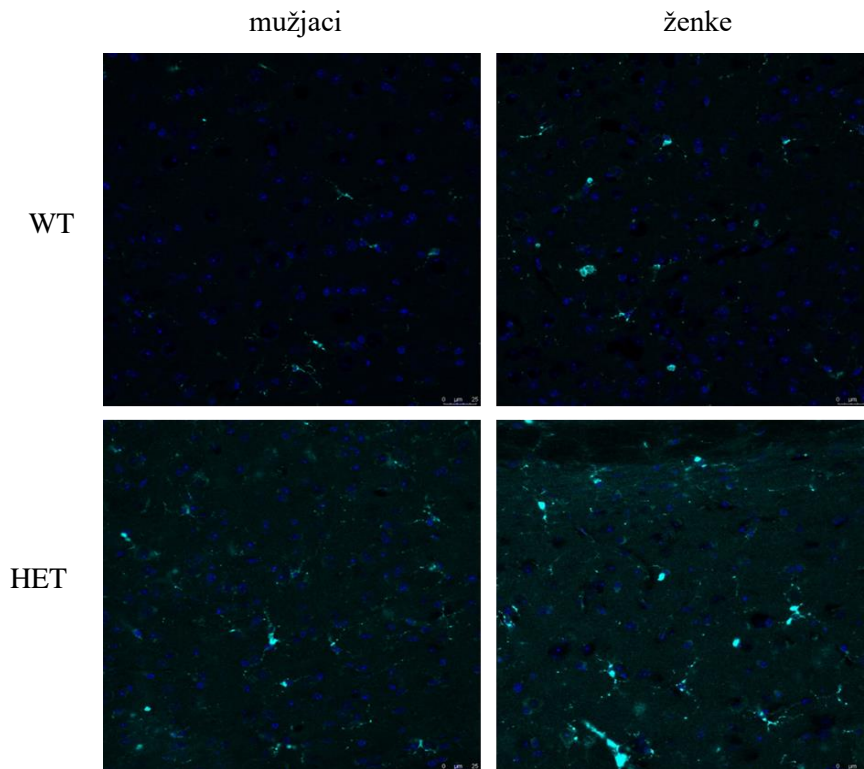


Slika 19. Prikaz neuroinflamacije u tkivu kore velikog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Western blot analiza tkiva kore velikog mozga s anti-GFAP protutijelom u uzorcima 100-tjedana starih wt (n=6) i het (n=6) miševa te kontrolne skupine 9-tjedana starih wt i NPC1 / ženki (f) miševa. Gornji dio blota predstavlja signal dobiven anti-GFAP protutijelom. Donji dio blota predstavlja dio membrane obojane *Amido black* bojom radi prikaza ukupne količine proteina. B) Kvantifikacija dobivenih signala prikazanih kao omjer signala proteina GFAP i ukupne količine proteina. Vrijednosti pogreške izražene su preko standardne devijacije (SD).



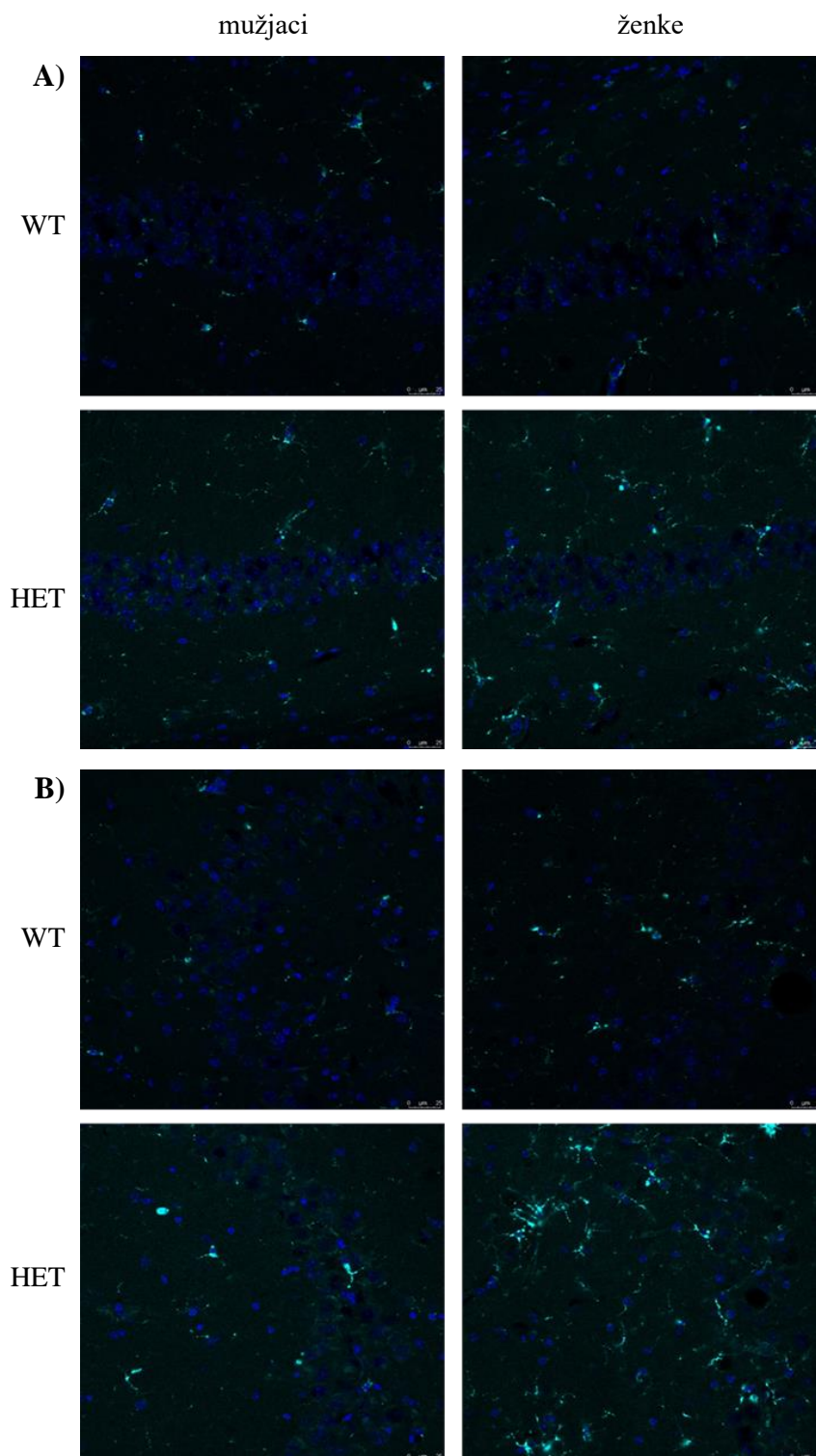
Slika 20. Prikaz neuroinflamacije u tkivu malog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Western blot analiza tkiva malog mozga s anti-GFAP protutijelom u uzorcima 100-tjedana starih wt (n=6) i het (n=5 mužjaka, n=6 ženki) miševa te kontrolne skupine 9-tjedana starih wt i *NPC1*<sup>-/-</sup> ženki (f) miševa. Gornji dio blota predstavlja signal dobiven anti-GFAP protutijelom. Donji dio blota predstavlja dio membrane obojane *Amido black* bojom radi prikaza ukupne količine proteina. B) Kvantifikacija dobivenih signala prikazanih kao omjer signala proteina GFAP i ukupne količine proteina. Vrijednosti pogreške izražene su preko standardne devijacije (SD).

Rezultat obojenja anti-CD68 protutijelom pokazuje jasno vidljivu razliku između 100-tjedana starih wt i het miševa, kod mužjaka i ženki, u kori velikog mozga (Slika 21), CA1 i CA3 regiji hipokampusa (Slika 22) te u malom mozgu (Slika 23). Razlika se očituje u broju obojanih aktiviranih mikroglija.

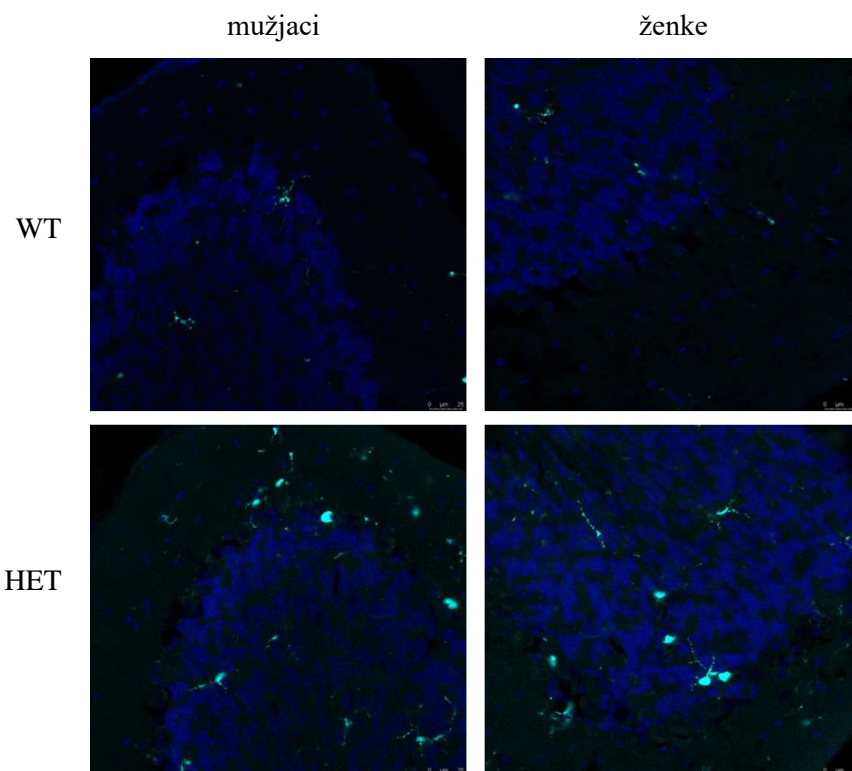


Slika 21. Prikaz neuroinflamacije mikroglija u tkivu kore velikog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. Imunohistokemijsko bojanje prereza tkiva kore velikog mozga anti-CD68 protutijelom (cijan) i Hoechst bojom (plavo).





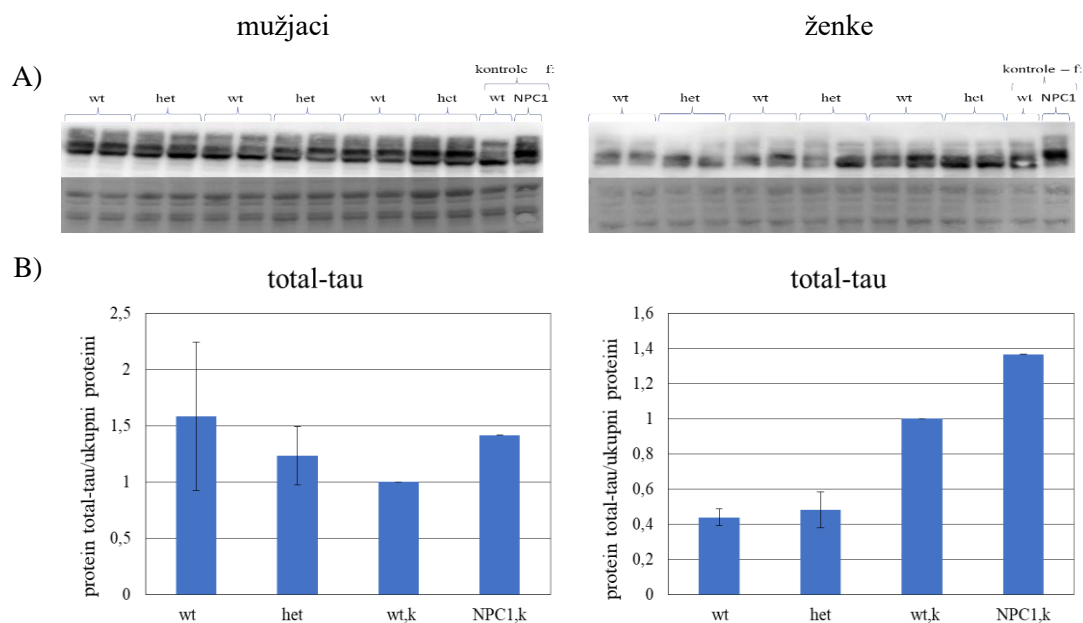
Slika 22. Prikaz neuroinflamacije mikroglija u tkivu hipokampusa 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Imunohistokemijsko bojanje prereza tkiva CA1 regije hipokampusa anti-CD68 protutijelom (cijan) i Hoechst bojom (plavo). B) Imunohistokemijsko bojanje prereza tkiva CA3 regije hipokampusa anti-CD68 protutijelom.



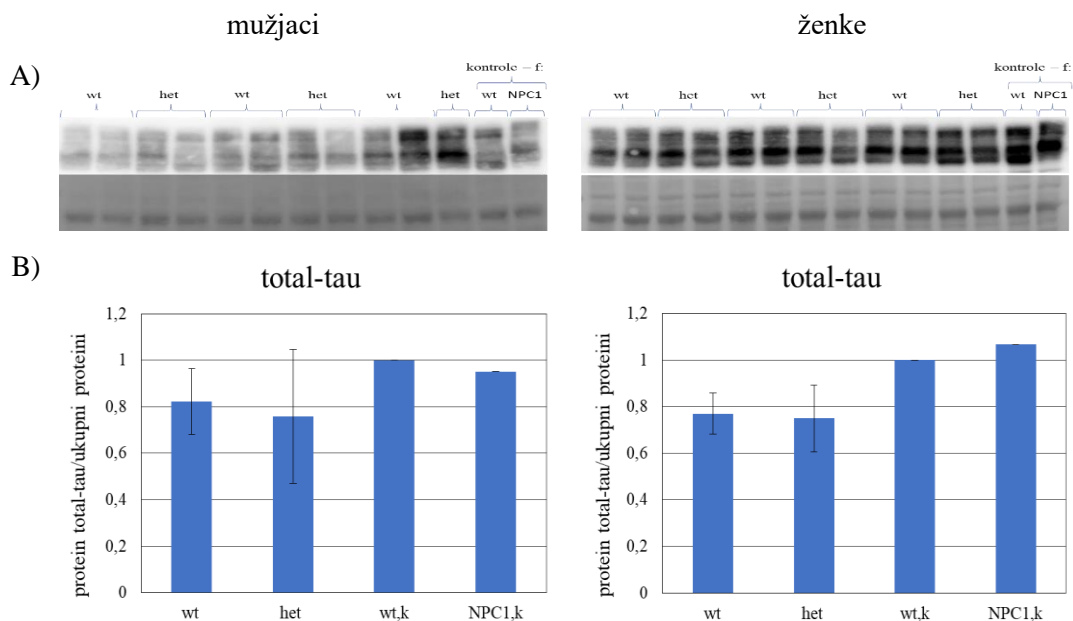
Slika 23. Prikaz neuroinflamacije mikroglija u tkivu maloga mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. Imunohistokemijsko bojanje prereza tkiva maloga mozga anti-CD68 protutijelom (cijan) i Hoechst bojom (plavo).

#### 4.5. Analiza hiperfosforilacije proteina tau u moždanim regijama kore velikog mozga i u malom mozgu

Metodom Western blot napravljena je analiza fosforilacijskog statusa proteina tau u mišjem tkivu kore velikog mozga i u malom mozgu. Ukupni proteini tau („*total tau*“) pojavljuju se pri veličini između 40 i 60 kDa. U kori velikog mozga vidljiv je pojačan signal u kontrolnoj NPC1 skupini u odnosu na wt kontrolu kod oba spola (Slika 24). Signal ukupnog proteina tau het skupine mužjaka povećan je u odnosu na 100-tjedana staru wt. Međutim, zbog visoke standardne devijacije, ova razlika nije značajna. Kod ženki nije uočena razlika u razini ukupnih tau proteina između 100-tjedana stare wt i het skupine. U tkivu maloga mozga nije uočena značajna razlika u fosforilaciji ukupnog tau proteina između kontrolnih wt i NPC1 skupina. Također, nije opažena razlika u jačini signala ukupnog tau proteina između wt i het skupina kod mužjaka i ženki (Slika 25).



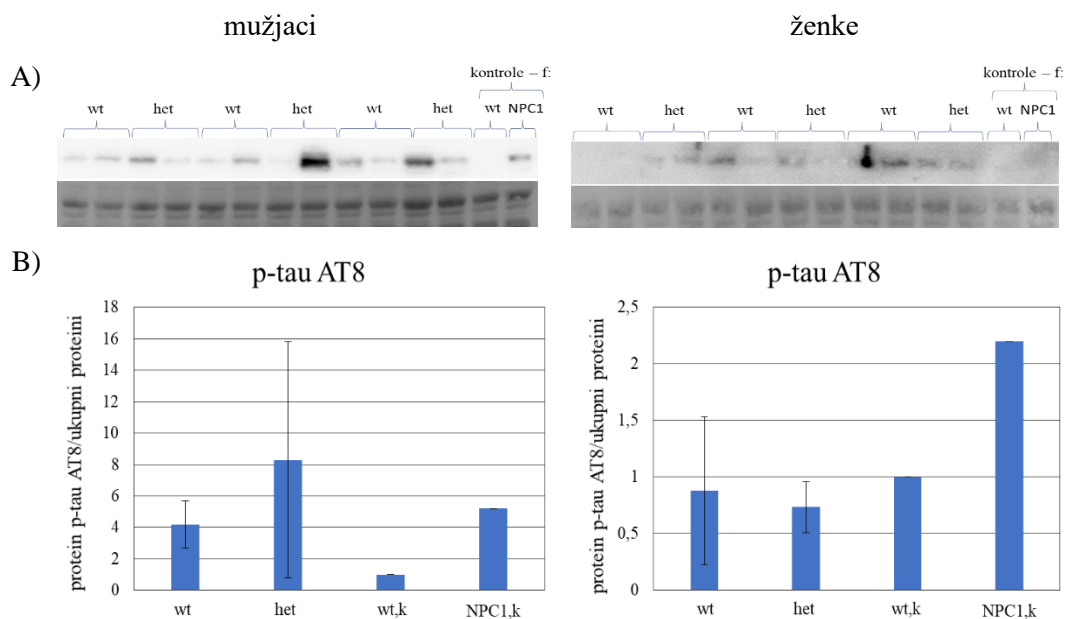
Slika 24. Analiza hiperfosforilacije proteina tau u tkivu kore velikog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Western blot analiza tkiva kore velikog mozga s anti-total tau protutijelom u uzorcima 100-tjedana starih wt (n=6) i het (n=6) miševa te kontrolne skupine 9-tjedana starih wt i NPC1  $\gamma$  ženki (f) miševa. Gornji dio blota predstavlja signal dobiven anti-total-tau protutijelom. Donji dio blota predstavlja dio membrane obojane *Amido black* bojom radi prikaza ukupne količine proteina. B) Kvantifikacija dobivenih signala prikazanih kao omjer signala ukupnog proteina tau i ukupne količine proteina. Vrijednosti pogreške izražene su preko standardne devijacije (SD).



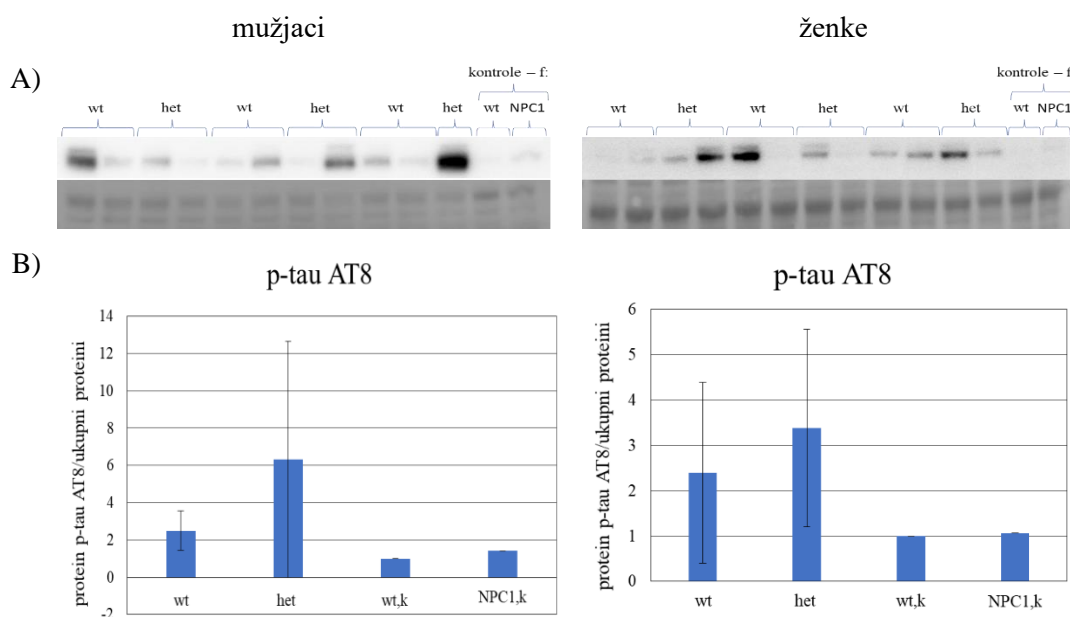
Slika 25. Analiza hiperfosforilacije proteina tau u tkivu malog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Western blot analiza tkiva malog mozga s anti-total-tau protutijelom u uzorcima 100-tjedana starih wt (n=6) i het (n=5 mužjaka, n=6 ženki) miševa te kontrolne skupine 9-tjedana starih wt

i *NPC1* / ženki (f) miševa. Gornji dio blota predstavlja signal dobiven anti-total-tau protutijelom. Donji dio blota predstavlja dio membrane obojane *Amido black* bojom radi prikaza ukupne količine proteina. B) Kvantifikacija dobivenih signala prikazanih kao omjer signala ukupnog proteina tau i ukupne količine proteina. Vrijednosti pogreške izražene su preko standardne devijacije (SD).

Nadalje, prikazani su rezultati analize fosforilacije specifičnih mjesta na tau proteinu koristeći različita anti-p-tau protutijela. P-tau proteini detektiraju se pri veličini 50 kDa. Analiza fosforilacijskih mjesta Ser202/Thr205 tau proteina pomoću protutijela AT8 u tkivu kore velikog mozga (Slika 26) pokazala je pojačanu razinu fosforilacije u kontrolnim *NPC1* skupinama u odnosu na kontrolne wt skupine kod oba spola (slika 26 B). Kod het skupine mužjaka signal je izraženiji u odnosu na wt skupinu, međutim, zbog izražene standardne devijacije ova razlika nije značajna. Jačina fosforilacijskog signala kod ženki znatno je slabije izražena u odnosu na mužjake (slika 26A). Kod ženki nije uočena razlika u signalu dobivenom na AT8 protutijelo između 100-tjedana starih wt i het uzoraka. Suprotno tomu, u tkivu malog mozga (Slika 27) kod oba spola nije vidljiva značajna razlika između kontrolnih wt i *NPC1* skupina, pri čemu je njihova razina fosforilacije značajno niža u odnosu na ispitivane wt i het skupine. Kod oba spola vidljiv je pojačan signal u het skupini u odnosu na wt skupinu, s tim da je ta razlika nešto izraženija kod mužjaka. U rezultatima dobivenima na obje spomenute regije mozga očitavamo sveukupno visoku standardnu devijaciju te uočene razlike između 100-tjedana starih wt i het mozgova nisu značajne.



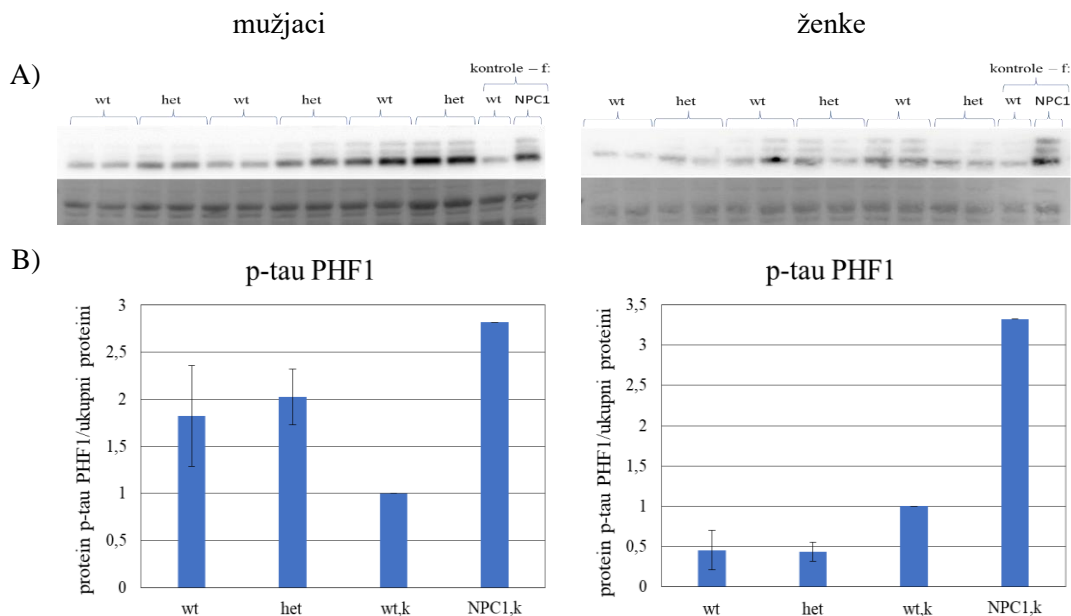
Slika 26. Analiza hiperfosforilacije proteina tau u tkivu kore velikog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Western blot analiza tkiva kore velikog mozga s anti-AT8 protutijelom u uzorcima 100-tjedana starih wt (n=6) i het (n=6) miševa te kontrolne skupine 9-tjedana starih wt i *NPC1*<sup>-/-</sup> ženki (f) miševa. Gornji dio blota predstavlja signal dobiven anti-AT8 protutijelom. Donji dio blota predstavlja dio membrane obojane *Amido black* bojom radi prikaza ukupne količine proteina. B) Kvantifikacija dobivenih signala prikazanih kao omjer signala proteina p-tau AT8 i ukupne količine proteina. Vrijednosti pogreške izražene su preko standardne devijacije (SD).



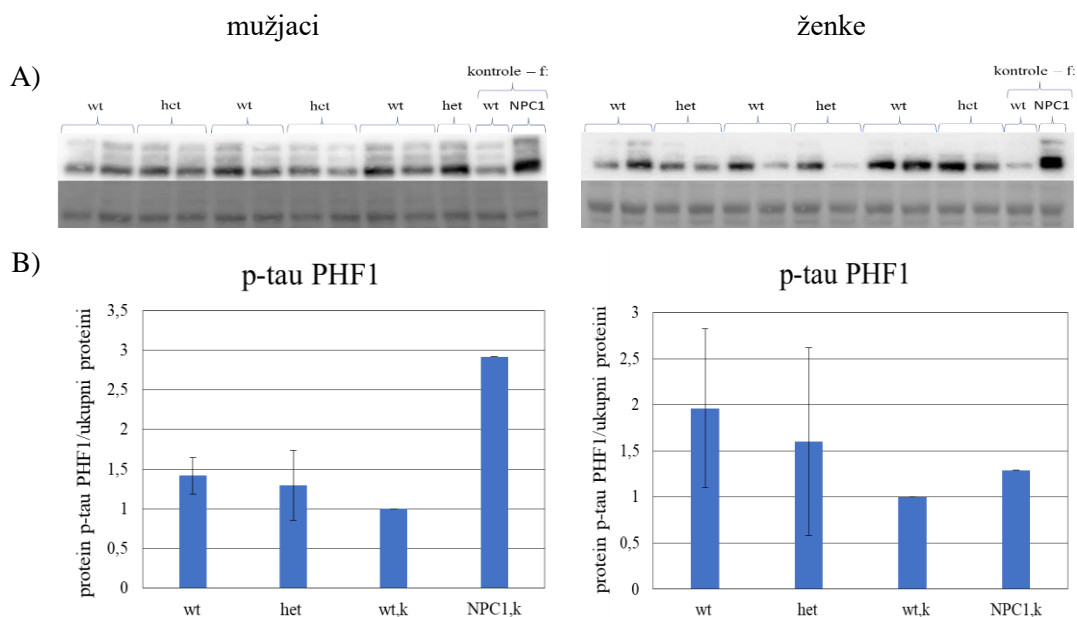
Slika 27. Analiza hiperfosforilacije proteina tau u tkivu malog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Western blot analiza tkiva malog mozga s anti-AT8 protutijelom u uzorcima 100-tjedana starih wt (n=6) i het (n=5 mužjaka, n=6 ženki) miševa te kontrolne skupine 9-tjedana starih wt i *NPC1*<sup>-/-</sup>

7 ženki (f) miševa. Gornji dio blota predstavlja signal dobiven anti-AT8 protutijelom. Donji dio blota predstavlja dio membrane obojane *Amido black* bojom radi prikaza ukupne količine proteina. B) Kvantifikacija dobivenih signala prikazanih kao omjer signala proteina p-tau AT8 i ukupne količine proteina. Vrijednosti pogreške izražene su preko standardne devijacije (SD).

Analiza tkiva kore velikog mozga na fosforilacijska mjesta Ser396/Ser404 p-tau proteina koristeći protutijelo PHF1 (Slika 28) pokazala je da nema značajne razlike između 100-tjedana stare wt i het skupine u oba spola. Također, kod oba spola vidljiv je pojačan signal kontrolne NPC1 skupine u odnosu na kontrolnu wt skupinu. Gotovo isti trend prate rezultati dobiveni u tkivu malog mozga (Slika 29), s tim da je kod ženki signal kontrolne NPC1 skupine neznatno povećan u odnosu na kontrolnu wt skupinu.

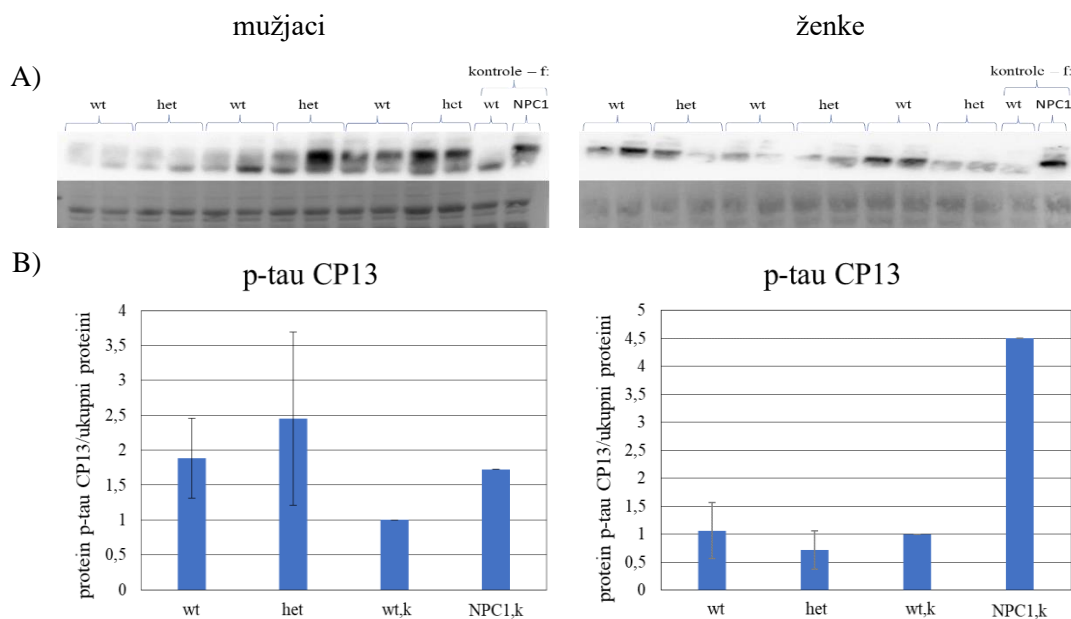


Slika 28. Analiza hiperfosforilacije proteina tau u tkivu kore velikog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Western blot analiza tkiva kore velikog mozga s anti-PHF1 protutijelom u uzorcima 100-tjedana starih wt (n=6) i het (n=6) miševa te kontrolne skupine 9-tjedana starih wt i NPC1 7 ženki (f) miševa. Gornji dio blota predstavlja signal dobiven anti-PHF1 protutijelom. Donji dio blota predstavlja dio membrane obojane *Amido black* bojom radi prikaza ukupne količine proteina. B) Kvantifikacija dobivenih signala prikazanih kao omjer signala proteina p-tau PHF1 i ukupne količine proteina. Vrijednosti pogreške izražene su preko standardne devijacije (SD).

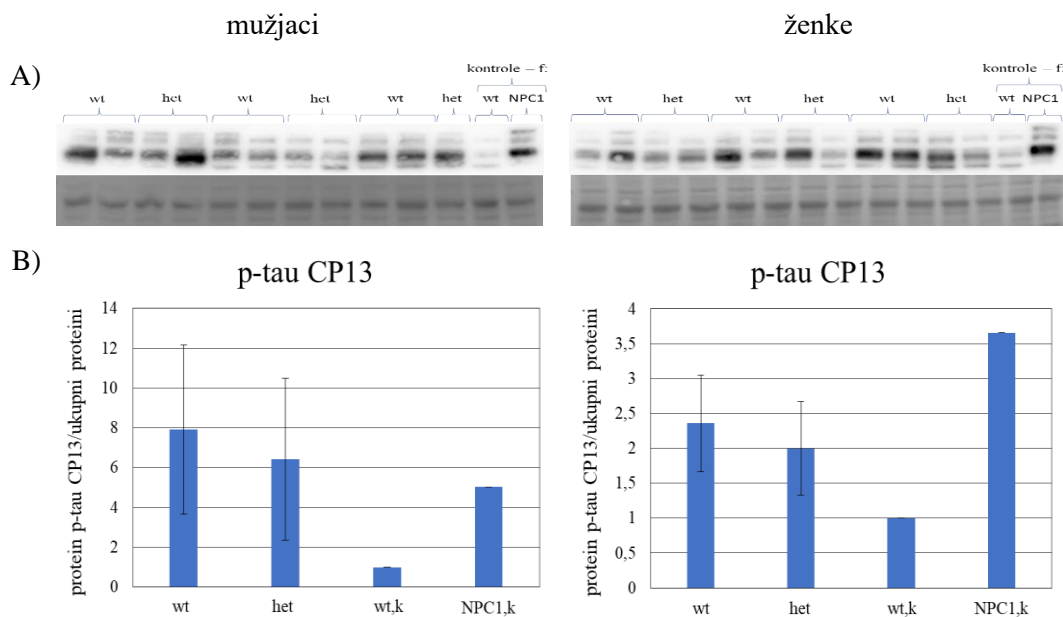


Slika 29. Analiza hiperfosforilacije proteina tau u tkivu malog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Western blot analiza tkiva malog mozga s anti-PHF1 protutijelom u uzorcima 100-tjedana starih wt (n=6) i het (n=5 mužjaka, n=6 ženki) miševa te kontrolne skupine 9-tjedana starih wt i *NPC1*<sup>-/-</sup> ženki (f) miševa. Gornji dio blota predstavlja signal dobiven anti-PHF1 protutijelom. Donji dio blota predstavlja dio membrane obojane *Amido black* bojom radi prikaza ukupne količine proteina. B) Kvantifikacija dobivenih signala prikazanih kao omjer signala proteina p-tau PHF1 i ukupne količine proteina. Vrijednosti pogreške izražene su preko standardne devijacije (SD).

Analiza fosforilacijskog mjesta Ser202 koristeći P-tau protutijelo CP13 detektirala je signale između 50 i 80 kDa, pri čemu su vidljiva 4 benda. Fragmenti određene veličine nemaju podjednako intenzivan signal u svim skupinama. U kori velikog mozga (Slika 30), kontrolna NPC1 skupina pokazuje izraženiji signal na p-tau CP13 antitijelo u odnosu na wt kontrolnu skupinu kod oba spola. Kod mužjaka je sveukupni signal jače izražen u het skupini u odnosu na ispitivanu wt skupinu, no zbog velike heterogenosti dobivenih rezultata, razlika nije statistički značajna. Kod ženki nije uočena značajna razlika u razini fosforilacije između wt i het skupine. U malom mozgu (Slika 31) pokazano je da hiperfosforilacija na p-tau CP13 na poziciji Ser202 nije pojačana u het skupinama u odnosu na wt kod oba spola (Slika 31). Sukladno rezultatima dobivenim na uzorcima kore velikog mozga, kontrolna NPC1 skupina ima jači signal u odnosu na kontrolnu wt skupinu kod oba spola.



Slika 30. Analiza hiperfosforilacije proteina tau u tkivu kore velikog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Western blot analiza tkiva kore velikog mozga s anti-CP13 protutijelom u uzorcima 100-tjedana starih wt (n=6) i het (n=6) miševa te kontrolne skupine 9-tjedana starih wt i NPC1<sup>-/-</sup> ženki (f) miševa. Gornji dio blota predstavlja signal dobiven anti-CP13 protutijelom. Donji dio blota predstavlja dio membrane obojane *Amido black* bojom radi prikaza ukupne količine proteina. B) Kvantifikacija dobivenih signala prikazanih kao omjer signala proteina p-tau CP13 i ukupne količine proteina. Vrijednosti pogreške izražene su preko standardne devijacije (SD).

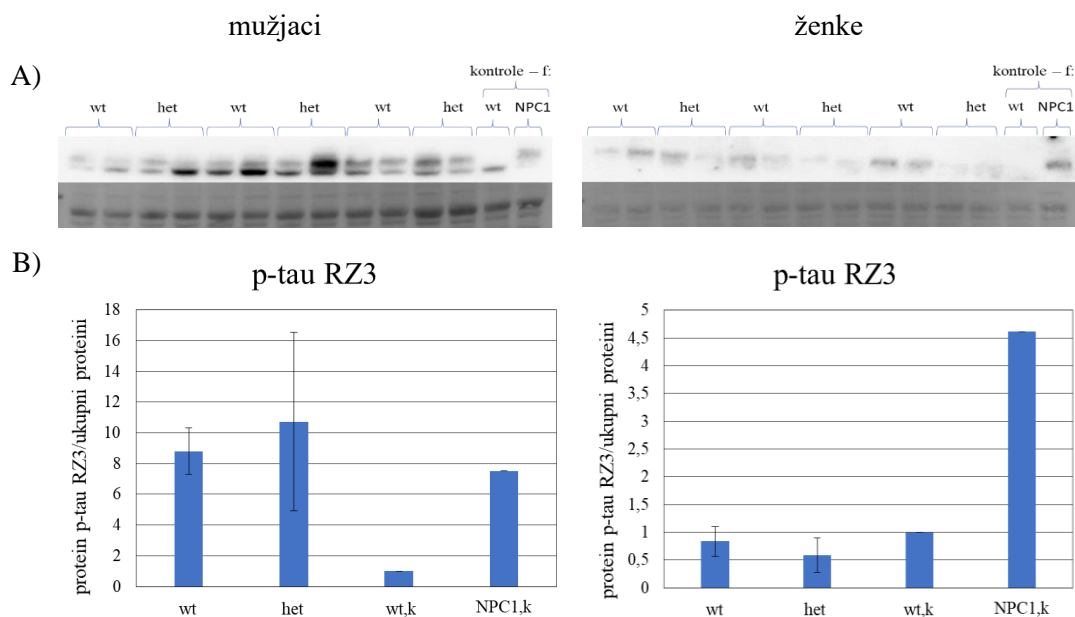


Slika 31. Analiza hiperfosforilacije proteina tau u tkivu malog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Western blot analiza tkiva malog mozga s anti-CP13 protutijelom u uzorcima 100-tjedana starih wt (n=6) i het (n=5 mužjaka, n=6 ženki) miševa te kontrolne skupine 9-tjedana starih wt i NPC1<sup>-/-</sup>



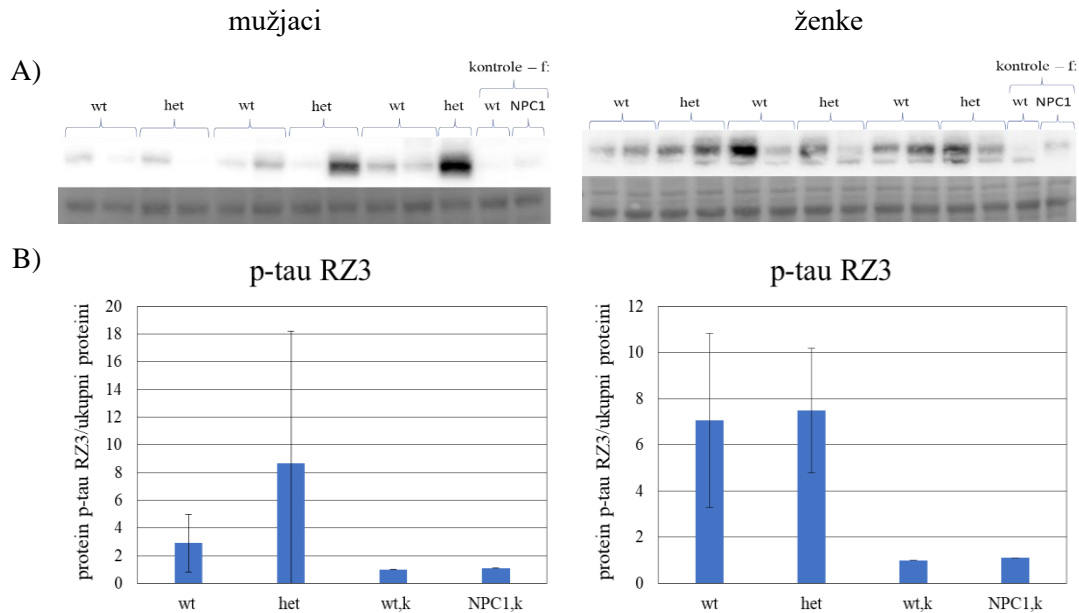
♀ ženki (f) miševa. Gornji dio blota predstavlja signal dobiven anti-CP13 protutijelom. Donji dio blota predstavlja dio membrane obojane *Amido black* bojom radi prikaza ukupne količine proteina. B) Kvantifikacija dobivenih signala prikazanih kao omjer signala proteina p-tau CP13 i ukupne količine proteina. Vrijednosti pogreške izražene su preko standardne devijacije (SD).

Analiza fosforilacijskog mjesta Thr231 proteina tau koristeći protutijelo RZ3 u kori velikog mozga (Slika 32) pokazala je pojačanu fosforilaciju u kontrolnoj skupini NPC1 u odnosu na kontrolnu wt skupinu kod oba spola. Kod het skupine mužjaka vidljiv je pojačan signal u odnosu na wt skupinu. S obzirom na visok raspon standardne devijacije, uočena razlika nije statistički značajna (Slika 31 B). Kod ženki nema razlike u jačini signala na RZ3 protutijelo između ispitivanih wt i het skupina. U tkivu malog mozga (Slika 33) kod mužjaka, kontrolne skupine međusobno pokazuju gotovo jednaku razinu fosforilacije na RZ3 antitijelo, koja je znatno niža od ispitivanih wt i het skupina. Heterozigotna skupina pokazuje jači signal u odnosu na wt, no razlika nije statistički značajna zbog velike heterogenosti u rezultatima ispitivanih skupina. U kontrolnoj NPC1 skupini kod ženki fosforilacijski signal znatno je pojačan u odnosu na kontrolnu wt skupinu, dok između ispitivane wt i het skupine nije vidljiva razlika.



Slika 32. Analiza hiperfosforilacije proteina tau u tkivu kore velikog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Western blot analiza tkiva kore velikog mozga s anti-RZ3 protutijelom u uzorcima 100-tjedana starih wt (n=6) i het (n=6) miševa te kontrolne skupine 9-tjedana starih wt i *NPC1* ♀ ženki (f) miševa. Gornji dio blota predstavlja signal dobiven anti-RZ3 protutijelom. Donji dio blota predstavlja dio membrane obojane *Amido black* bojom radi prikaza ukupne količine proteina. B)

Kvantifikacija dobivenih signala prikazanih kao omjer signala proteina p-tau RZ3 i ukupne količine proteina. Vrijednosti pogreške izražene su preko standardne devijacije (SD).



Slika 33. Analiza hiperfosforilacije proteina tau u tkivu malog mozga 100-tjedana starih wt i het NPC1 miševa. A) Western blot analiza tkiva malog mozga s anti-RZ3 protutijelom u uzorcima 100-tjedana starih wt (n=6) i het (n=5 mužjaka, n=6 ženki) miševa te kontrolne skupine 9-tjedana starih wt i *NPC1* / ženki (f) miševa. Gornji dio blota predstavlja signal dobiven anti-RZ3 protutijelom. Donji dio blota predstavlja dio membrane obojane *Amido black* bojom radi prikaza ukupne količine proteina. B) Kvantifikacija dobivenih signala prikazanih kao omjer signala proteina p-tau RZ3 i ukupne količine proteina. Vrijednosti pogreške izražene su preko standardne devijacije (SD).

## 5. RASPRAVA

Transmembranski protein NPC1 u kasnim endosomima i lizosomima ima središnju ulogu u regulaciji metabolizma lipida u stanicama mozga, a njegova je disfunkcija molekularna osnova za razvoj neuropatološkog stanja, tj. neurodegenerativne bolesti NPC (Schneider *i sur.*, 2019). Istraživanja na heterozigotnim NPC1 miševima praćena brojnim nedavnim kliničkim dokazima ukazala su da nositelji ove bolesti mogu razviti određene patološke karakteristike bolesti sa starenjem (Harzer *i sur.*, 2014; Benussi *i sur.*, 2019; Schneider *i sur.*, 2019). Stoga, u ovom smo radu analizirali mozgove heterozigotnih NPC1 miševa velike starosti (100-tjedana) kako bismo dobili uvid u potencijalno neuropatološko stanje koje se razvija s „odgodom“ s obzirom na prisutnost jednog funkcionalnog alela gena *NPC1*. Osim toga, detektirane najranije patološke promjene u NPC1 heterozigota bi mogle ukazati na procese koji su „najosjetljiviji“ na disfunkciju NPC1 proteina. Prvo i do sada jedino istraživanje koje je utvrdilo postojanje patoloških karakteristika kod heterozigotnih NPC1 miševa objavili su Yu *i sur.* 2005. godine te osvijetlili novi aspekt u pristupu i proučavanju ove rijetke bolesti.

Progresivna neurodegeneracija u malom mozgu primarno je obilježje NPC bolesti. U ovom radu, analizom tkiva maloga mozga nije pokazana neurodegeneracija Purkinje neurona, što nije u suglasnosti s rezultatom istraživanja prvog i jedinog rada koji je detektirao neurodegeneraciju Purkinje neurona (Yu *i sur.*, 2005), gdje je isto metodom imunohistokemije dokazan smanjen broj Purkinje neurona na prerezu maloga mozga NPC1-heterozigotnih miševa starosti 104-tjedna. Također, markeri kasnih endosoma i lizosoma nisu jasno potvrdili disfunkciju endolizosomalnog puta u stanicama neurona heterozigotnih NPC1 miševa, posebice u regiji maloga mozga. Budući da dobiveni rezultati prikazuju prilično nedosljedno, odnosno heterogeno stanje ove glavne patološke karakteristike bolesti NPC1, dodatna analiza ukupnog sadržaja lipida iz moždanih tkiva bi jasnije ukazala na status eventualnog poremećaja metabolizma lipida u NPC1 heterozigota. S druge strane, jasno je uočena pojava neuroinflamacije u kori velikog mozga (Slike 16 i 21), hipokampusu (Slike 17 i 22) i malom mozgu (Slike 18 i 23) NPC1 heterozigotnih miševa u odnosu na miševe iste starosti divljeg tipa u vidu aktiviranih stanica mikroglije i astrocita, što je detektirano pojačanim signalom CD68 i GFAP proteina. Ujedno, ovo je prvo istraživanje koje je utvrdilo postojanje neuroinflamacije u mišjih nositelja bolesti NPC1. Prethodna istraživanja bolesti NPC1 pokazala su da nakupljanje kolesterola u kasnim endosomima/lizosomima signalizira aktivaciju mikroglija stanica koje luče neurotoksine i brojne neurotrofične proupalne molekule (Pressey *i sur.*, 2012; Cologna *i sur.*, 2014). Iako u ovom radu nije utvrđena pojačana disfunkcija endolizosomalnog puta kod heterozigotnih NPC1 jedinki u odnosu na divlji tip, možemo pretpostaviti da je slabija stopa nakupljanja lipida i disfunkcija njihovog metabolizma dostatan okidač za pokretanje mehanizama neuroinflamacije.

U dosadašnjim istraživanjima bolesti NPC1 napravljena je analiza fosforilacije tau proteina koristeći različita antitijela koja vežu specifična fosforilacijska mjesta. Nunes *i sur.* su u istraživanju iz 2005.

pokazali da je u malom mozgu NPC1<sup>-/-</sup> miševa, ukupna količina fosforiliranog proteina tau i antitijela Tau-1 (Ser202/Thr205) smanjena, a povećana za epitope antitijela AT8 (Ser202/Ser205) i PHF1 (Ser396/404), u odnosu na miševе divljeg tipa, dok ova razlika nije potvrđena u kori velikog mozga. S druge strane, ovaj rad pokazao je da nema razlike u količini ukupnog proteina tau između heterozigotnih NPC1<sup>+/-</sup> miševa i onih divljeg tipa, u kori velikog mozga ni u malom mozgu. Istraživanje koje su proveli Yu i sur. iz 2005., pokazalo je pojačanu razinu fosforilacije kod heterozigotnih NPC1 miševa na epitopima AT8 i AT100 (Ser212/Thr214) antitijela, dok razlika u fosforilaciji između heterozigota i jedinki divljeg tipa nije utvrđena pri analizi s AT-180 (Thr231), AT-270 (Thr181) i PHF1 antitijelom. U ovom radu, analiza fosforilacije proteina tau s različitim antitijelima – PHF1, CP13 (Ser202), AT8 i RZ3 (Thr231), nije dala jasan dokaz o prisutnosti tauopatije u heterozigotnih NPC1 miševa. U rezultatima smo primijetili razliku u razini fosforilacije proteina tau u odnosu i na spol i na fosforilacijsko mjesto, uz trend pojačane fosforilacije kod heterozigotne skupine NPC1 miševa, unatoč smanjenom statističkom značaju uslijed velike heterogenosti ispitivanih životinja. Stoga, cilj budućih istraživanja je analizirati populaciju mlađih miševa te odrediti u kojoj starosnoj dobi dolazi do pojačane fosforilacije proteina tau kod heterozigotnih NPC1 miševa u odnosu na miševе divljeg tip. S obzirom da se povećana aktivnost MAP-kinaze smatra molekularnom osnovom hiperfosforilacije proteina tau (Michikawa, 2006), paralelna analiza aktivnosti spomenutog enzima dala bi potpuniji dokaz o potencijalnom statusu tauopatije u nositelja NPC bolesti.

Sveukupno, rezultati ovoga rada zajedno s dosadašnjim istraživanjima ukazuju da mutacija na jednom alelu gena *NPC1* uzrokuje djelomičnu pojavu neuropatoloških karakteristika bolesti NPC (Yu i sur., 2005). Jedan zdravi alel gena *NPC1* nije u mogućnosti u potpunosti nadoknaditi funkciju mutiranog alela te posljedice mutacije se „nakupljaju“ znatno sporije i nastupaju sa starenjem. Ovomu u prilog idu dokazi iz istraživanja koje su proveli Sawamura i sur. (2001) i Henderson i sur. (2000) da u kulturi stanica NPC1<sup>+/-</sup>, kao i kod mladih NPC1<sup>+/-</sup> miševa ne dolazi do pojave abnormalnog metabolizma kolesterola. Također, valjda istaknuti da molekularni mehanizam samoga proteina NPC1 još uvijek nije razjašnjen u cijelosti, što dodatno otežava otkrivanje molekularne osnove bolesti prema kojoj bi se mogla uspostaviti adekvatna terapija. Premda ne možemo utvrditi točan uzrok nastanka neuroinflamacije kao glavne patološke karakteristike heterozigota bolesti NPC1, zaključujemo da proupalno stanje astrocita i makroglija podržava poremećenu regulaciju staničnih procesa u neuronima i postavlja faktor rizika za razvoj kompleksnije neuropatološke slike. Stoga, buduća istraživanja mogla bi se usmjeriti na neuroinflamaciju kao okidač kaskadnog mehanizam u razvoju patologije ove bolesti.

## 6. ZAKLJUČCI

- Ovaj rad potvrdio je da u nositelja NPC1 bolesti dolazi do nastanka određene patologije, odnosno da nisu zdravi. U mozgovima 100-tjedana starih heterozigota mišjeg modela bolesti NPC1 prisutna je neuroinflamacija u vidu aktiviranih astrocita i mikroglia. Ovaj dokaz ukazuje da bi neuroinflamacija mogla biti najraniji patološki događaj i tzv. „okidač“ za pokretanje kaskade ostalih neuropatoloških karakteristika bolesti NPC.
- Hiperfosforilacija proteina tau, odnosno tauopatija nije značajno povećana kod heterozigotne skupine NPC1 miševa, premda određeni stupanj prevalencije kod heterozigotnih mužjaka upućuje na to da hiperfosforilacija proteina tau nastupa u ranijoj životnoj dobi u odnosu na divlji tip miševa.
- Neophodna su buduća istraživanja na populaciji mlađih heterozigota mišjeg modela bolesti NPC1 kako bi se odredila najranija dob kada se javlja pojačana hiperfosforilacija proteina tau i u kojoj nastupa proces neuroinflamacije te kako bi se utvrdili molekularni okidači ovih procesa.

## 7. LITERATURA

- Abad-Rodriguez J, Ledesma MCraessaerts K, Perga S, Medina M, Delacourte A, Dingwall C, De Strooper B, Dotti C (2004) „Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation“, *Journal of Cell Biology*, 167(5), str. 953–960. doi: 10.1083/jcb.200404149.
- Aqul, A., Liu, B., Ramirez, C. M., Pieper, A. A., Estill, S. J., Burns, D. K., Liu, B., Repa, J. J., Turley, S. D., Dietschy, J. M. (2011) „Unesterified cholesterol accumulation in late endosomes/lysosomes causes neurodegeneration and is prevented by driving cholesterol export from this compartment“, *Journal of Neuroscience*, 31(25), str. 9404–9413. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1317-11.2011.
- Benussi, A., Cotelli, M. S., Cosseddu M., Bertasi, V., Turla M., Salsano E., Dardis A., Padovani A., Borroni, B (2017) „Preliminary results on long-term potentiation-like cortical plasticity and cholinergic dysfunction after miglustat treatment in niemann-pick disease type C“, u *JIMD Reports*. Springer, str. 19–27. doi: 10.1007/8904\_2016\_33.
- Benussi, A., Cotelli M. S., Cantoni, V., Bertasi, V., Turla, M., Dardis, A., Biasizzo, J., Manenti, R., Cotelli, M., Padovani, A., Borroni, B (2019) „Clinical and neurophysiological characteristics of heterozygous NPC1 carriers“, *JIMD Reports*, 49(1), str. 80–88. doi: 10.1002/jmd2.12059.
- Bjoandrkhem, I., Haverin, M., Leoni, V., Meaney, S., Diczfalusy, U (2006) „Oxysterols and Alzheimer’s disease“, *Acta Neurologica Scandinavica. Acta Neurol Scand Suppl*, str. 43–49. doi: 10.1111/j.1600-0404.2006.00684.x.
- Bräuer, A. U., Kuhla, A., Holzmann, C., Wree, A., Witt, M. (2019) „Current challenges in understanding the cellular and molecular mechanisms in niemann-pick disease type C1“, *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms20184392.
- Bu, B., Klunemann, K., Suzuki, K., Li, J., Bird, T., Jin, J. W., Vincent, I. (2002) „Niemann-Pick disease type C yields possible clue for why cerebellar neurons do not form neurofibrillary tangles“, *Neurobiology of Disease*, 11(2), str. 285–297. doi: 10.1006/nbdi.2002.0551.
- Carrano, A. i Das, P. (2015) „Altered innate immune and glial cell responses to inflammatory stimuli in amyloid precursor protein knockout mice“, *PLoS ONE*, 10(10). doi: 10.1371/journal.pone.0140210.
- Colell, A., Garcia-Ruiz, C., Lluís, M. J., Coll, O., Mari, M., Fernández\_Checa, J C. *i ostali* (2003) „Cholesterol Impairs the Adenine Nucleotide Translocator-mediated Mitochondrial

Permeability Transition through Altered Membrane Fluidity“, *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), str. 33928–33935. doi: 10.1074/jbc.M210943200.

- Cologna, M. S., Cluzeau, C. V. M., Yanjanin, N. M., Blank, P. B., Dail, M. K., Siebel, S., Toth, C. L., Wassif, C. A., Lieberman, A. P., Porter, F. D. (2014) „Human and mouse neuroinflammation markers in Niemann-Pick disease, type C1“, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37(1), str. 83–92. doi: 10.1007/s10545-013-9610-6.
- Davies, J. P., Chen, F. W. i Ioannou, Y. A. (2000) „Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein“, *Science*, 290(5500), str. 2295–2298. doi: 10.1126/science.290.5500.2295.
- Fiorenza, M. T., Moro, E. i Erickson, R. P. (2018) „The pathogenesis of lysosomal storage disorders: Beyond the engorgement of lysosomes to abnormal development and neuroinflammation“, *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, str. R119–R129. doi: 10.1093/hmg/ddy155.
- Harzer, K., Beck-Wödl, S. i Bauer, P. (2014) „Niemann-pick disease type C: New aspects in a long published family – Partial manifestations in heterozygotes“, u *JIMD Reports*. Springer, str. 25–29. doi: 10.1007/8904\_2013\_240.
- Henry, C., Huang, Y., Wynne, A., Godbout, A. M., Jonathan, P. (2009) „Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1 $\beta$  and anti-inflammatory IL-10 cytokines“, *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(3), str. 309–317. doi: 10.1016/j.bbi.2008.09.002.
- Huang, Z., Hou, QQ., Cheung, N. S., Li, Q. T. (2006) „Neuronal cell death caused by inhibition of intracellular cholesterol trafficking is caspase dependent and associated with activation of the mitochondrial apoptosis pathway“, *Journal of Neurochemistry*, 97(1), str. 280–291. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03733.x.
- Imrie, J., Vijayaraghaven, S., Whitehouse, C., Harris, S., Heptinstall, L., Church, H., Cooper, A., Besley, G. T.N., Wraith, J. E. (2002) „Niemann-Pick disease type C in adults“, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 25(6), str. 491–500. doi: 10.1023/A:1021259403196.
- Karten, B., Campenot, R. B., Vance, D. E., Vance, J. E. (2006) „The Niemann-Pick C1 protein in recycling endosomes of presynaptic nerve terminals“, *Journal of Lipid Research*, 47(3), str. 504–514. doi: 10.1194/jlr.M500482-JLR200.
- Kuhn, P. H., Koroniak, K., Hognl, S., Colombo, A., Zeitschel, U., Willem, M., Volbracht, C.,

Schepers, U., Imhof, A., Hoffmeister, A., Haass, C., Roßner, S., Bräse, S., Lichtenthaler, S. F. (2012) „Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons“, *EMBO Journal*, 31(14), str. 3157–3168. doi: 10.1038/emboj.2012.173.

- El Khoury, J. *i ostali* (2007) „Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease“, *Nature Medicine*, 13(4), str. 432–438. doi: 10.1038/nm1555.
- Klunemann, H. H., Nutt, J. G., Davis, M. Y., Bird, T. D. (2013) „Parkinsonism syndrome in heterozygotes for Niemann-Pick C1“, *Journal of the Neurological Sciences*, 335(1–2), str. 219–220. doi: 10.1016/j.jns.2013.08.033.
- Ko, D. C., Milenkovic, Lj., Beier, S. M., Manuel, H., Buchanan, J., Scott, M. P. (2005) „Cell-autonomous death of cerebellar purkinje neurons with autophagy in niemann-pick type C disease“, *PLoS Genetics*, 1(1), str. 0081–0095. doi: 10.1371/journal.pgen.0010007.
- Kosicek, M., Malnar, M., Goate, A., Hecimovic, S. (2010) „Cholesterol accumulation in Niemann Pick type C (NPC) model cells causes a shift in APP localization to lipid rafts“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(3), str. 404–409. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.007.
- Li, H., Repa, J. J., Valasek, M. A., Beltroy, E. P., Turley, S. D., German, D. C., Dietschy, M. J. (2005) „Molecular, anatomical, and biochemical events associated with neurodegeneration in mice with Niemann-Pick type C disease“, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 64(4), str. 323–333. doi: 10.1093/jnen/64.4.323.
- Lopez, M. E., Klein, A. D. i Scott, M. P. (2012) „Complement is dispensable for neurodegeneration in Niemann-Pick disease type C“, *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), str. 1–8. doi: 10.1186/1742-2094-9-216.
- Malnar, M., Hecimovic, S., Mattsson, N., Zetterberg, H. (2014) „Bidirectional links between Alzheimer’s disease and Niemann-Pick type C disease“, *Neurobiology of Disease*, 72(Part A), str. 37–47. doi: 10.1016/j.nbd.2014.05.033.
- Marquer, C., Devauges, V., Cossec, J. C., Liot, G., Lécart, S., Saudou, F., Duyckaerts, C., Lévêque-Fort, S., Potier, M. C. (2011) „Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis“, *FASEB Journal*, 25(4), str. 1295–1305. doi: 10.1096/fj.10-168633.
- Michikawa, M. (2006) „Role of cholesterol in amyloid cascade: Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation and mitochondrial function“, *Acta Neurologica*



*Scandinavica*, str. 21–26. doi: 10.1111/j.1600-0404.2006.00681.x.

- Neufeld, E. B., Wastney, M., Patel, S., Suresh, S., Cooney, A. M., Dwyer, N. K., Roff, C. F., Ohno, K., Morris, J. A., Carstea, E. D., Incardona, J. P., Strauss III, J. F., Vanier, M. T., Patterson, M. C., Brady, R. O., Pentchev, P. G., Blanchette-Mackie, E. J. (1999) „The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo“, *Journal of Biological Chemistry*, 274(14), str. 9627–9635. doi: 10.1074/jbc.274.14.9627.
- Nunes, A., Pressey, S. N. R., Cooper, J. D., Soriano, S. (2011) „Loss of amyloid precursor protein in a mouse model of Niemann-Pick type C disease exacerbates its phenotype and disrupts tau homeostasis“, *Neurobiology of Disease*, 42(3), str. 349–359. doi: 10.1016/j.nbd.2011.01.028.
- Pagano, R. E., Puri, V., Dominguez, M., Marks, D. L. (2000) „Membrane traffic in sphingolipid storage diseases“, *Traffic*, 1(11), str. 807–815. doi: 10.1034/j.1600-0854.2000.011101.x.
- Perez, R. G., Squazzo, S. L. i Koo, E. H. (1996) „Enhanced release of amyloid  $\beta$ -protein from codon 670/671 ‚Swedish‘ mutant  $\beta$ -amyloid precursor protein occurs in both secretory and endocytic pathways“, *Journal of Biological Chemistry*, 271(15), str. 9100–9107. doi: 10.1074/jbc.271.15.9100.
- Pressey, S. N. R., Smith, A. D., Wong, A. M. S., Platt, F. M., Cooper, J. D. (2012) „Early glial activation, synaptic changes and axonal pathology in the thalamocortical system of Niemann-Pick type C1 mice“, *Neurobiology of Disease*, 45(3). doi: 10.1016/j.nbd.2011.12.027.
- Reid, P. C., Sugii, S. i Chang, T. Y. (2003) „Trafficking defects in endogenously synthesized cholesterol in fibroblasts, macrophages, hepatocytes, and glial cells from Niemann-Pick type C1 mice“, *Journal of Lipid Research*, 44(5), str. 1010–1019. doi: 10.1194/jlr.M300009-JLR200.
- Repa, J. J., Li, H., Frank-Cannon, T. C., Valasek, M. A., Turley, S. D., Tansey, M. G., Dietschy, J. M. (2007) „Liver X receptor activation enhances cholesterol loss from the brain, decreases neuroinflammation, and increases survival of the NPC1 mouse“, *Journal of Neuroscience*, 27(52), str. 14470–14480. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4823-07.2007.
- Schneider, S. A., Tahirovic, S., Hardy, J., Strupp, M., Bremova-Ertl, T. (2019) „Do heterozygous mutations of Niemann–Pick type C predispose to late-onset neurodegeneration: a review of the literature“, *Journal of Neurology*, (0123456789). doi: 10.1007/s00415-019-

09621-5.

- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., Eggeling, C. (2017) „The mystery of membrane organization: Composition, regulation and roles of lipid rafts“, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(6), str. 361–374. doi: 10.1038/nrm.2017.16.
- Shin, S. D., Shin, A., Mayagoitia, K., Siebold, L., Rubini, M., Wilson, C. G., Bellinger, D. L., Soriano, S. (2019) „Loss of amyloid precursor protein exacerbates early inflammation in Niemann-Pick disease type C“, *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), str. 1–15. doi: 10.1186/s12974-019-1663-5.
- Tang, Y., Li, H. i Liu, J. P. (2010) „Niemann-pick disease type C: From molecule to clinic“, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 37(1), str. 132–140. doi: 10.1111/j.1440-1681.2009.05235.x.
- Vanier, M. T. (2010) „Niemann-Pick disease type C“, *Orphanet Journal of Rare Diseases. Clin Genet.* doi: 10.1034/j.1399-0004.2003.00147.x.
- Walkley, S. U. i Suzuki, K. (2004) „Consequences of NPC1 and NPC2 loss of function in mammalian neurons“, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, str. 48–62. doi: 10.1016/j.bbalip.2004.08.011.
- Whitney, K. D., Watson, M. A., Collins, J. L., Benson, W. G., Stone, T. M., Numerick, M. J., Tippin, T. K., Wilson, J. G., Winegar, D. A., Kliever, S. A. (2002) „Regulation of cholesterol homeostasis by the liver X receptors in the central nervous system“, *Molecular Endocrinology*, 16(6), str. 1378–1385. doi: 10.1210/mend.16.6.0835.
- Yu, W., Gong, J. S., Ko, M., Garver, W. S., Yanagisawa, K., Michikawa, M. (2005) „Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick type C1 mouse brains affects mitochondrial function“, *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), str. 11731–11739. doi: 10.1074/jbc.M412898200.
- Yu, W., Ko, M., Yanagisawa, K., Michikawa, M. (2005) „Neurodegeneration in Heterozygous Niemann-Pick Type C1 (NPC1) Mouse“, *Journal of Biological Chemistry*, 280(29), str. 27296–27302. doi: 10.1074/jbc.m503922200.
- Zervas, M., Dobrenis, K. i Walkley, S. U. (2001) „Neurons in Niemann-Pick disease type C accumulate gangliosides as well as unesterified cholesterol and undergo dendritic and axonal alterations“, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60(1), str. 49–64. doi: 10.1093/jnen/60.1.49.

- Zhang, J. i Liu, Q. (2015) „Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain“, *Protein and Cell*, 6(4), str. 254–264. doi: 10.1007/s13238-014-0131-3.

## 8. ŽIVOTOPIS

Ana Zovko rođena je u Mostaru 3.2.1996. Nakon završene opće gimnazije u Mostaru, 2014. godine upisuje preddiplomski studij Biologije na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku te stječe prvostupničko zvanje. Po završetku upisuje studij Eksperimentalne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta na Sveučilištu u Zagrebu. U zimskom semestru akademske godine 2019/20 asistirala je kao demonstrator na kolegiju Laboratorijske životinje u biološkim istraživanjima. U sklopu laboratorijske stručne prakse sudjelovala je u istraživačkom projektu u Laboratoriju za molekularnu Neurobiologiju i Neurokemiju na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga u Zagrebu koje je rezultiralo koautorstvom : Puljko B, Stojanović M, Ilić K, Maček Hrvat N, Zovko A, Damjanović V, Mlinac Jerković K and Kalanj Bogнар S; *Redistribution of gangliosides accompanies thermally induced Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity alternation and submembrane localisation in mouse brain*; Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes 1863 (2021), 1; 183475 (IF: 3.411; Q2). Provedeno istraživanje prezentirano je u vidu kongresnog sažetaka: Mario Stojanović, Ana Zovko, Borna Puljko, Katarina Ilić, Kristina Mlinac Jerković, Svjetlana Kalanj Bogнар; *The effect of membrane integrity disruption by freeze-thaw cycles on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity and submembrane localisation*; Congress summary at Advances in Biomedical Research III; Split, Croatia. U srpnju 2020. godine započinje izradu diplomskog rada u Laboratoriju za neurodegenerativne bolesti Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Tijekom studiranja na Biološkom odsjeku u Osijeku aktivno je sudjelovala u radu studentske udruge ZOA kao član odbora te znanstveno popularnim manifestacijama kao što je Tjedan mozga s prezentacijama Agorafobija 2017 i Netrpeljivost i mozak 2018. Na diplomskom studiju sudjeluje u aktivnostima udruge BIUS na Biološkom odsjeku te Studentske sekcije za neuroznanost Medicinskog fakulteta u Zagrebu.