

Otkrivanje ranih neuropatoloških promjena u miševa prenositelja bolesti Niemann-Pick tipa C

Martinović, Lovro

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:217:715744>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lovro Martinović

**Otkrivanje ranih neuropatoloških
promjena u miševa prenositelja bolesti
Niemann-Pick tipa C**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za istraživanje neurodegenerativnih bolesti Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Silve Katušić Hećimović i neposredne voditeljice Lee Vidatić, mag. biol. exp. te komentorstvom dr. sc. Julije Erhardt, v. pred.. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

Zahvale

Najprije bih se htio zahvaliti svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Silvi Katušić Hećimović koja me primila u Laboratorij za istraživanje neurodegenerativnih bolesti Instituta Ruđer Bošković te svojim znanjem i iskustvom vodila kroz kroz ovu konačnu studentsku pustolovinu.

Veliko hvala i Lei Vidatić, mag. biol. exp. koja je bila više od neposrednog voditelja moga diplomskog rada. Lea je provela najviše vremena sa mnom u ovoj pustolovini, naučila me novim vještinama, bila strpljiva i susretljiva.

Studij ne bih mogao završiti bez podrške svoje obitelji, poglavito roditelja koji su mi omogućili sve kako bi se ovaj dan mogao ostvariti! Također, bez svih svojih prijatelja koji su bili najveća podrška zadnjih 5 godina! Veliko vam hvala!

Za moju baku Nedu

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Otkrivanje ranih neuropatoloških promjena u miševa prenositelja bolesti Niemann-Pick tipa C

Lovro Martinović

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Bolest Niemann-Pick tipa C (NPC) je monogenska, autosomno recesivna, smrtonosna neurodegenerativna bolest, uzrokovana mutacijama u genima *NPC1* ili *NPC2* koji kodiraju za transportere kolesterola iz kasnih endosoma/lizosoma. Smatralo se da su prenositelji bolesti NPC, koji imaju mutaciju u jednom alelu gena *NPC1/2*, potpuno zdravi, dok se nisu primijetile određene neuropsihijatrijske promjene u starijoj dobi. Također, istraživanja na mišjem modelu *NPC1* heterozigota (*NPC1-het*) ukazuju na pojavu neurodegeneracije i neuroinflamacije u starijoj dobi. Cilj diplomskog rada bio je utvrditi najranije neuropatološke promjene u prenositelja bolesti NPC, tj. u kori velikog mozga, hipokampusu i malom mozgu 20 i 40 tjedana starih miševa *NPC1-het* u odnosu na miševe divljeg tipa (WT) iste starosti. Rezultati imunohistokemijske analize hipokampusu pokazuju pojavu aktivacije astrocita (biljeg GFAP) u miševa *NPC1-het* starih 20 tjedana. Otkriveno je i povećano bojanje lizosoma (biljeg Lamp1) te nakupljanje kolesterola (bojanje filipinom) u miševa *NPC1-het* starih 20 i 40 tjedana u svim analiziranim moždanim regijama u odnosu na uzorke WT. Dobiveni rezultati ukazuju da bi prenositelji bolesti NPC mogli pokazivati ključne neuropatološke karakteristike bolesti NPC, uključujući nakupljanje kolesterola, disfunkciju lizosoma i neuroinflamaciju. Daljnja istraživanja su neophodna kako bi se dodatno razjasnile uočene promjene na mišjem kao i na humanom modelu prenositelja bolesti NPC.

Ključne riječi: kolesterol, *NPC1*, lizosom, neurodegeneracija, neuroinflamacija, rijetke bolesti (49 stranica, 21 slika, 2 tablice, 49 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Silva Katušić Hećimović

Komentor: dr. sc. Julija Erhardt, v. pred.

Ocjenitelji: dr. sc. Julija Erhardt, v. pred.

izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Rad prihvaćen: 9. veljače 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Detection of the early neuropathological changes in mice Niemann-Pick type C disease carriers

Lovro Martinović

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Niemann-Pick type C disease (NPC) is a monogenic, autosomal recessive, fatal neurodegenerative disorder, caused by mutations in the *NPC1* or *NPC2* genes that code for cholesterol transport proteins from late endosomes/lysosomes. Carriers of NPC disease, who have a mutation in only one allele of the *NPC1/2* genes, were considered healthy, until certain neuropsychiatric changes were recently observed in their old age. Moreover, studies of the aged brains of NPC1 heterozygous mice (NPC1-het) indicated neurodegeneration and neuroinflammation. The aim of this thesis was to investigate the earliest neuropathological changes in carriers of the NPC disease, i.e. in the cerebral cortices, hippocampi and cerebella of 20 and 40-weeks-old NPC1-het mice compared to wild-type (WT) mice of the same age. Immunohistochemical analysis of the hippocampi identified activation of astrocytes (marker GFAP) in 20-weeks-old NPC1-het mice. Increased lysosomal staining (Lamp1 marker) and cholesterol accumulation (filipin staining) were also detected in all analyzed brain regions of 20 and 40-weeks-old NPC1-het mice vs. WT samples. The obtained results indicate that carriers of NPC disease may exert key neuropathological features of NPC disease, including cholesterol accumulation, lysosomal dysfunction and neuroinflammation. Further studies are necessary to elucidate the observed changes in the mouse model as well as the human model of the NPC disease carriers.

Keywords: cholesterol, NPC1, lysosome, neurodegeneration, neuroinflammation, rare diseases

(49 pages, 21 figures, 2 tables, 49 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Prof. Silva Katušić Hećimović, PhD

Co-mentor: Sen. Lec. Julija Erhardt, PhD

Reviewers: Sen. Lec. Julija Erhardt, PhD

Assoc. Prof. Petra Peharec Štefanić, PhD

Assoc. Prof. Maja Matulić, PhD

Thesis accepted: 9th February 2023

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Karakteristike bolesti Niemann-Pick tipa C	1
1.1.1. Kliničke karakteristike	1
1.1.2. Molekularno genetičke karakteristike	3
1.1.3. Neuropatološke karakteristike	5
1.1.3.1. Poremećaj metabolizma lipida u mozgu oboljelih od bolesti NPC	5
1.1.3.2. Neurodegeneracija	7
1.1.3.2.1. Neuropatološke sličnosti s Alzheimerovom bolesti	7
1.1.3.2.2. Neuropatološke različitosti s Alzheimerovom bolesti	8
1.1.3.3. Neuroinflamacija	8
1.2. Karakteristike prenositelja bolesti Niemann-Pick tipa C	9
1.2.1. Klinička slika prenositelja	10
1.2.2. Neuropatološke karakteristike prenositelja u mišjem modelu bolesti Niemann-Pick tipa C	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Uzgoj miševa i uzorkovanje mozgova	13
3.2. Imunohistokemijska analiza kriorezova mišjih mozgova	13
4. REZULTATI	16
4.1. Analiza neurodegeneracije u kori velikog mozga, regijama hipokampusa i u malom mozgu ...	16
4.2. Analiza neuroinflamacije u kori velikog mozga, regijama hipokampusa i u malom mozgu	22
4.3. Analiza disfunkcije endolizosomskog puta u kori velikog mozga, regijama hipokampusa i u malom mozgu	30
5. RASPRAVA	39
6. ZAKLJUČCI	43
7. LITERATURA	44
8. ŽIVOTOPIS	49

POPIS KRATICA

AB	Alzheimerova bolest
ApoE	apolipoprotein E
Aβ	amiloid- β peptid
BBB	krvno moždana barijera, prema engl. <i>blood brain barrier</i>
CA1	polje 1 Amonovog roga hipokampusa, prema lat. <i>Cornu ammonis 1</i>
CA3	polje 3 Amonovog roga hipokampusa, prema lat. <i>Cornu ammonis 3</i>
CD68	diferencijacijski antigen 68, prema engl. <i>cluster of differentiation 68</i>
ER	endoplazmatski retikul
GFAP	kiseli glijalni fibrilarni protein, prema engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i>
KE/LIZ	kasni endosom/lizosom
LAL	lizosomska kisela lipaza, prema engl. <i>lysosomal acid lipase</i>
LAMP1	protutijelo za lizosomske membranske proteine, prema engl. <i>lysosome associated membrane protein 1</i>
LDLR/LRP1	lipoproteinski receptori prema, engl. <i>low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
MPR46	manoza-6-fosfatni receptor
NeuN	protutijelo za bojenje jezgara zrelih neurona, prema engl. <i>Neuronal nuclei</i>
NPC	Niemann-Pick tipa C
NPC1-het	heterozigoti za gen <i>NPC1</i>
SŽS	Središnji živčani sustav
WT	divlji tip, prema engl. <i>wild type</i>
WO	tjedni starosti, prema engl. <i>weeks old</i>

1. UVOD

1.1. Karakteristike bolesti Niemann-Pick tipa C

Bolest Niemann-Pick tipa C (NPC) pripada lizosomskim bolestima nakupljanja; radi se o rijetkim metaboličkim poremećajima koji su posljedica naslijeđenih defekata u endosomskom/lizosomskom sustavu i često dovode do teške kliničke slike i prerane smrti. Endosomski/lizosomski sustav vitalni je unutarstanični centar za razgradnju većine staničnih komponenti i recikliranje koji igra ključnu ulogu u unutarstaničnoj signalizaciji i regulaciji homeostaze. Disfunkcija ovog sustava dovodi do složene kaskade bolesti od kojih je najprepoznatljivije obilježje unutarstanična akumulacija nemetaboliziranih produkata (Davidson i Walkley, 2010). Bolest NPC utječe na različite organske sustave, a primarno na središnji živčani sustav (SŽS) s vrlo niskom stopom incidencije gdje zahvaća 1 osobu na 120.000 živorođene djece (Carstea i sur. 1997; Burton i sur. 2021). Prvi su o bolesti NPC govorili Albert Niemann i Ludwig Pick, još u kasnim 1920-im godinama, kada su je klasificirali kao heterogenu skupinu autosomno recesivnih lizosomskih poremećaja skladištenja lipida. U drugoj polovici 20. stoljeća, Allen D. Crocker klasificira bolest NPC u četiri tipa označena slovima A, B, C i D (Crocker 1961). O tipovima bolesti NPC počelo se govoriti kada su primjećene velike varijabilnosti kliničke slike bolesnika; varijabilnost u starosnoj dobi pojavljivanja bolesti te razini skladištenja sfingomijelina u tkivima. Značajna deficijencija aktivnosti sfingomijelinaze (enzima koji katalizira hidrolizu sfingomijelina) otkrivena je u tkivima pacijenata oboljelih od bolesti Niemann-Pick tipa A i B (Brady i sur. 1966), ali ne i kod tipova C i D što je dalo naslutiti da se tipovi bolesti mogu podijeliti u dvije glavne skupine; tipovi A i B pripadaju prvoj skupini koju karakterizira deficijencija kisele sfingomijelinaze uslijed mutacije gena *SMPD1*, tip C (koji je i tema ovog diplomskog rada) pripada drugoj skupini koju karakterizira poremećen transport endocitoziranog kolesterola uslijed mutacija u genima *NPC1* ili *NPC2*, a tip D kao poseban entitet više nije opravdan (Vanier, 2010).

1.1.1. Kliničke karakteristike

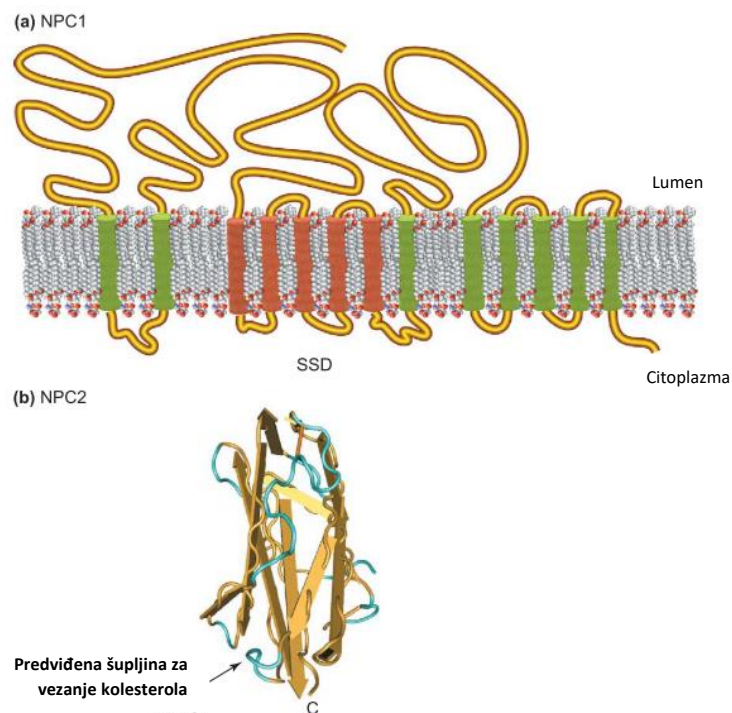
Već je spomenuto da je bolest NPC iznimno heterogena pa je i klinička slika, kao i progresija bolesti kod pacijenata, varijabilna. Bolest se može javiti u bilo kojem periodu života (od perinatalnog pa sve do starije dobi), a životni vijek pacijenata varira od nekoliko dana do 60 godina života. Većina pacijenata umire u periodu između 10. i 25. godine života (Vanier, 2010; Spiegel i sur. 2009). Nekad se smatralo da je progresija bolesti NPC, ali i drugih lizosomskih bolesti, u korelaciji s dobi u kojoj se bolest pojavila; kod pacijenata s ranijom pojavom simptoma, progresija kliničke slike bila bi izraženija te bi dovela do ranije smrti u odnosu na pacijente s kasnijom pojavom simptoma (Davidson i Walkley, 2010). Međutim, skupina znanstvenika koje je osmislila ljestvicu kliničke ozbiljnosti za analizu progresije bolesti NPC kod pacijenata utvrdila je postojanje linearne kliničke progresije nezvezano za dob u kojoj se pojavljuju simptomi bolesti (Yanjanin i sur. 2010). Kao glavni klinički znakovi bolesti NPC navode

se vertikalna kljenut pogleda i ataksija, iako navedeno ne mora biti strogo specifično (Davidson i Walkley, 2010). Za bolest NPC važno je istaknuti da viscelarna zahvaćenost (jetre, slezene i ponekad pluća) i neurološke ili psihijatrijske manifestacije nastaju u različito vrijeme te slijede potpuno neovisne tijekom. Osim male skupine pacijenata koji umru pri rođenju ili u prvih 6 mjeseci života od zatajenja jetre ili dišnog sustava te u iznimnim odraslim slučajevima, svi pacijenti u konačnici razviju progresivnu i smrtonosnu neurološku bolest, tj. neurodegeneraciju (Vanier 2010). Sustav klasifikacije bolesti dijeli NPC u 4 skupine na temelju početka neuroloških simptoma: rani infantilni, kasni infantilni, juvenilni te adolescentni/odrasli oblik. U perinatalnoj dobi, bolest NPC se smatra relativno čestim uzrokom bolesti jetre. Kod pacijenata se primjećuju fetalni hidrops i fetalni ascites (Spiegel i sur. 2009). Također, kod gotovo polovice oboljelih u prvim danima ili tjednima života pojavljuje se dugotrajna neonatalna žutica (ikterus) koja je obično povezana s progresivnom hepatosplenomegalijom. U većini slučajeva žutica spontano nestaje u dobi od 2 do 4 mjeseca, a zadržava se hepatosplenomegalija sve do pojave neuroloških simptoma. Kod 10% pacijenata ikterus se pogorša te dovede do zatajenja jetre u prvih 6 mjeseci života (Vanier 2010). Pacijenti ne pokazuju neurološke simptome tijekom neonatalnog perioda. Infantilni period se dijeli na rani i kasni. U ranom infantilnom periodu hepatosplenomegalija se može tek pojaviti ili, kod ozbiljnih slučajeva, biti prisutna od samoga rođenja. Kašnjenje u razvojnim motoričkim značajkama i središnja hipotonija prvi su neurološki simptomi koji postaju vidljivi u dobi od 1 do 2 godine. Naknadno dolazi do gubitka stečenih motoričkih sposobnosti, a mnoga od ove djece nikad ne nauče hodati. Često je prisutan intencijski tremor, a magnetska rezonanca pokazuje znakove leukodistrofije i cerebralne atrofije. Napadaji su rijetka pojava kod oboljele djece, a preživljenje rijetko dosegne 5 godina. Mnogim se pacijentima bolest NPC otkrije u kasnom infantilnom periodu (od 2. do 6. godine života) tako što se dijagnosticira hepatosplenomegalija ili splenomegalija nakon čega slijedi regularno neuropedijatrijsko praćenje. Kod ozbiljnijih slučajeva karakteristična je i odgoda u govoru, a problemi u hodaњу se javljaju u dobi od 3 do 5 godina i povezani su s ataksijom. Vertikalna kljenut pogleda je također prisutna, ali se rijetko prepoznaje u toj dobi. Još neki od simptoma karakteristični za kasni infantilni period su: oštećenje ili gubitak sluha, katapleksija, motorički problemi koji se pogoršavaju te poremećaj mentalnog razvoja. Veliki broj pacijenata razvije epileptične napadaje koji mogu biti i smrtonosni. Kako ataksija napreduje, dolazi i do pojave disfagije, dizartrije i demencije. Smrt kod većine nastupa između 7. i 12. godine života. Kao i kod prethodnih skupina, prvi simptom bolesti NPC kod pacijenata u juvenilnom periodu (od 6. do 15. godine života) obično je splenomegalija ili u rijetkim slučajevima, hepatosplenomegalija. Pacijenti su od tada pod praćenjem liječnika. U ovome periodu kod oboljele djece se javljaju poteškoće u pisanju i koncentraciji koje često vode prema postavljanju krive dijagnoze (Vanier 2010). Ataksija, koja napreduje različitom progresijom, postaje očita te djeca često padaju i otežano trče. Životni vijek je dosta varijabilan pa neki pacijenti dožive i 30. godinu života (Wraith i sur. 2009). Bolesnici kojima se NPC pojavi u adolescenciji/odrasloj dobi imaju neuropsihijatrijske simptome koji uključuju različite stupnjeve kognitivne disfunkcije te druge psihijatrijske i neurološke simptome (Patterson i sur., 2012). Psihijatrijski simptomi često dominiraju

kliničkom slikom, a može proći dosta vremena prije nego što se neurološki simptomi razviju ili se prepoznaju. Prije postavljanja točne dijagnoze bolesti NPC može proći nekoliko godina i desetljeća tijekom kojih se pacijentima postavljaju pogrešne dijagnoze poput: psihotičnih sindroma, Alzheimerove bolesti i frontotemporalne demencije, Parkinsonove bolesti, Wilsonove bolesti, multiple skleroze, Creutzfeldt-Jakobove bolesti i mnogih drugih (Evans i Hendriksz, 2017).

1.1.2. Molekularno genetičke karakteristike

Bolest Niemann-Pick tipa C je bolest koja slijedi autosomno recesivni obrazac nasljeđivanja. Uzrokovana je mutacijama u jednom od dva gena: *NPC1* (čije su mutacije odgovorne za 95% slučajeva) ili *NPC2* (Evans i Hendriksz, 2017). Mutacije u genima *NPC1* ili *NPC2* rezultiraju gubitkom funkcije istoimenih proteina što dovodi do nakupljanja kolesterola i niza sfingolipida u kasnim endosomima i lizosomima (Evans i Hendriksz, 2017). Gen *NPC1* kodira veliki transmembranski protein koji se pretežno nalazi na membrani kasnih endosoma. Sadrži 13 transmembranskih domena, tri velike hidrofilne petlje i mali citoplazmatski rep (Slika 1). Sve tri hidrofilne petlje nalaze se u lumenu kasnih endosoma. Drugi protein, NPC2, koji se nalazi u lumenu lizosoma je mali topljivi glikoprotein s visokim afinitetom za kolesterol (Ioannou 2005). Ranije se smatralo da NPC1 potencijalno ima ulogu u vezikularnom transportu, točnije u pupanju i fiziji transportnih vezikula (Ko i sur., 2001). Vezikule divljeg tipa s funkcionalnim proteinom NPC1 koji je bio fuzioniran sa zelenim fluorescentnim proteinom (prema engl. *Green fluorescent protein, GFP*) pokazale su vektorsko kretanje *in vivo*, dok su vezikule s mutiranim NPC1 bile gotovo stacionirane. Kretanje vezikula divljeg tipa po stanici vizualizirano je pomoću fluorescencijskog mikroskopa. Pokretljivost vezikula opada do gotovo stacioniranog stanja kada je u stanicama prisutna neaktivna/defektna forma proteina NPC1. To je Ko i suradnike navelo na zaključak da NPC1 ima bitnu ulogu u kretanju vezikula ili, kako navode Zhang i sur., (2001), da nakupljeni kolesterol u vezikulama kojima nedostaje funkcionalni protein NPC1 dovodi do inhibicije spomenutog vektorskog kretanja. Međutim, kasnija istraživanja ukazuju na mogućnost da NPC1 nije direktno uključen u transport kolesterola, nego da djeluje kao lipidna flipaza na membrani kasnih endosoma koja osigurava specifičnu lipidnu asimetriju između vanjskog i unutarnjeg fosfolipidnog sloja membrane što dovodi do povećanja zakrivljenosti membrane, te pomaže formiranju vezikula za transport prema Golgijevom aparatu (Ioannou, 2005).



Slika 1. Struktura proteina NPC1 i NPC2. (a) NPC1 je veliki transmembranski protein koji se pretežno nalazi na membrani kasnih endosoma te sadrži 13 transmembranskih domena, tri velike hidrofilne petlje i mali citoplazmatski rep. Pet od 13 transmembranskih domena (označene crvenom bojom) pokazuju homologiju s domenom koju imaju proteini regulirani sterolom (prema engl. *sterol-sensing domain* – *SSD*). (b) Kristalna struktura proteina NPC2. Radi se o malom topljivom glikoproteinu koji se nalazi u lumenu lizosoma te ima visok afinitet za kolesterol. Preuzeto i prilagođeno prema Ioannou, 2005.

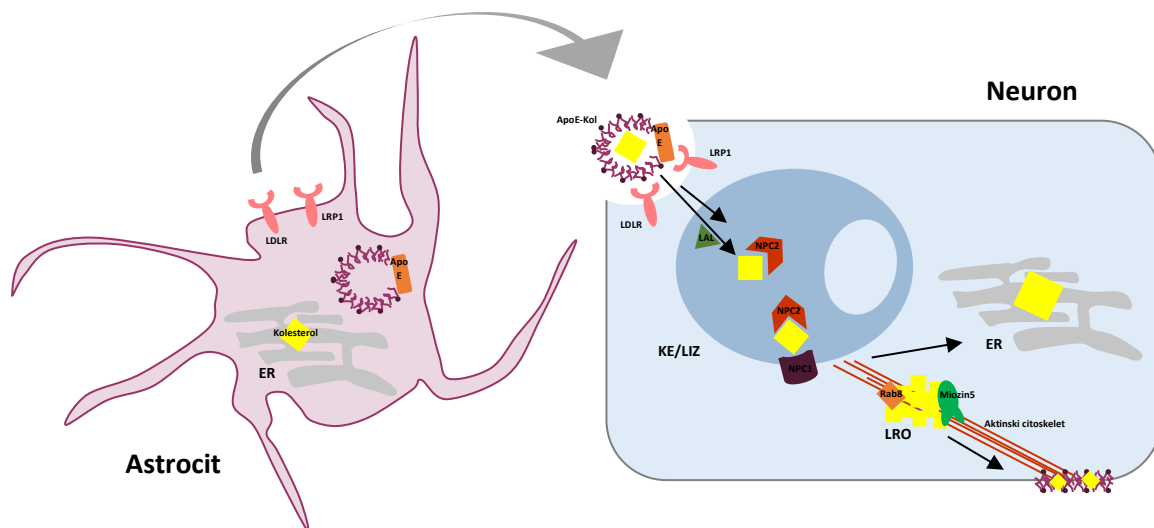
1.1.3. Neuropatološke karakteristike

Budući da precizna uloga lizosomalnog sustava nije ista u svim stanicama zbog različitog metaboličkog potpisa, ukupne patološke karakteristike uglavnom variraju ovisno o bolesti i staničnom tipu. U otprilike dvije trećine lizosomskih bolesti nakupljanja postoji značajna zahvaćenost SŽS, tj. neurodegeneracija i neuroinflamacija (Davidson i Walkley, 2010). Ova činjenica ukazuje na važnost unutarstaničnih organela lizosoma u normalnom funkcioniranju neurona, kao i drugih moždanih stanica (glija i oligodendrocita), koje se za razliku od ostalih tjelesnih stanica postmitotski ne dijele. Stoga disfunkcija lizosoma i posljedično nakupljanje lipida i/ili drugih molekula rezultira specifičnom vulnerabilnosti ovih moždanih stanica te pojavom neurodegeneracije i neuroinflamacije kao ključnih neuropatoloških karakteristika lizosomskih bolesti nakupljanja, uključujući i bolest NPC.

1.1.3.1. Poremećaj metabolizma lipida u mozgu oboljelih od bolesti NPC

Bolest NPC karakterizira nakupljanje slobodnog neesterificiranog kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima, što predstavlja ključan nalaz pri dijagnosticiranju bolesti. Kolesterol je amfipatska molekula koja ima ključnu ulogu u strukturi i funkciji stanice. Njegova planarna i rigidna struktura regulira fluidnost i permeabilnost fosfolipidnog dvosloja. Također, funkcije membranskih proteina modulirane su razinom kolesterola; kolesterol sudjeluje u prijenosu tvari u membrani, transmembranskom signaliziranju te je esencijalna komponenta u biosintezi žučne kiseline, steroidnih hormona i vitamina D (Arenas i sur., 2017; Egawa i sur., 2015; Segatto i sur., 2014). Iako sve stanice sisavaca imaju sposobnost biosinteze kolesterola *de novo*, taj je proces ključan za SŽS jer se zbog postojanja krvno-moždane barijere (BBB – prema engl. *Blood-brain barrier*) sinteza kolesterola odvija neovisno o ostatku organizma. Razlog tomu je što lipoproteinske čestice nisu u mogućnosti proći kroz BBB. Gotovo sav kolesterol u mozgu prisutan je u neesterificiranom obliku te je raspoređen u dvije glavne skupine: većina, oko 70%, dio je mijelinskih ovojnica koje oligodendrociti tvore oko aksona, a preostalih 30% nalazi se unutar membrana astrocita i neurona. Potreba neurona za kolesterolom je vrlo visoka budući da se koristi u formiranju neurita, održavanju i sinaptičkom povezivanju. Zreli neuroni zadovoljavaju svoje potrebe za kolesterolom i uz pomoć astrocita koji mogu lučiti lipoproteine bogate kolesterolom. Ti lipoproteini sadržavaju apolipoprotein E (ApoE) koji je glavni transporter lipida u SŽS-u. Posredstvom receptora LDLR (engl. *low density lipoprotein receptor*) i LRP1 (engl. *low density lipoprotein receptor-related protein 1*) neuroni endocitozom unose kompleks ApoE-kolesterol u stanicu, u ranim endosomima, koji sazrijevaju u kasne endosome/lizosome gdje se ester kolesterola koji sadrži ApoE hidrolizira kiselim lipazom kako bi se stvorio slobodni neesterificirani kolesterol (Slika 2.). Nakon što je sintetiziran u ER-u, kolesterol se distribuira do različitih membrana u stanici. Bilo kakva promjena u molekularnom metabolizmu kolesterola, točnije njegovom izlučivanju iz kasnog endosoma/lizosoma utječe na patofiziologiju mozga (Arenas i sur., 2017). Mutacije gena *NPC1* ili *NPC2* dovode do defektnih proteina

NPC1/NPC2 te do nakupljanja neesterificiranog slobodnog kolesterola i drugih lipida u stanicama. Posljedica toga je pojava progresivnog i fatalnog visceralnog, neurološkog i psihijatrijskog poremećaja, odnosno bolesti Niemann-Pick tipa C.



Slika 2. Shematski prikaz unutarstanične i međustanične homeostaze kolesterola u mozgu. Putevi *de novo* sinteze kolesterola odvijaju se u endoplazmatskom retikulumu neurona i astrocita. Kolesteroli koji se sintetiziraju u astrocitu isporučuju se do neurona sekrecijom apolipoproteina E koji je bogat kolesterolom (ApoE-Kol). Isti se u stanicu unosi endocitozom posredovanom receptorima LDLR i LRP1 i odvodi do kasnog endosoma/lizosoma (KE/LIZ) gdje se hidrolitičkim cijepanjem pomoću lizosomske kiseline lipaze (LAL prema engl. *lysosomal acid lipase*) oslobađa slobodni kolesteroli. Proteini NPC1 i NPC2 sudjeluju u transportu kolesterola od kasnog endosoma/lizosoma prema krajnjoj destinaciji – endoplazmatskom retikulumu ili plazma membrani neurona. Shemu izradio Lovro Martinović (u programu MS Office, Publisher).

1.1.3.2. Neurodegeneracija

Promjene u homeostazi kolesterola povezuju se s poremećajem funkcije mozga i pojavom neurodegeneracije (Arenas i sur. 2017). Identificirano je nekoliko patoloških sličnosti između bolesti NPC i drugih neurodegenerativnih poremećaja, poput Alzheimerove bolesti (AB).

1.1.3.2.1. Neuropatološke sličnosti s Alzheimerovom bolesti

Bolest Niemann-Pick tipa C i Alzheimerova bolest etiološki i neuropatološki su različite bolesti, ali ipak dijele niz sličnosti. Progresivna neurodegeneracija, formiranje neurofibrilarnih niti, disfunkcija kasnih endosoma/lizosoma, nakupljanje kolesterola, hiperfosforilacija proteina tau, poremećeno procesiranje prekursora proteina amiloid- β (APP) te nakupljanje peptida amiloid- β (A β) neke su od značajki koje su zajedničke ovim dvjema bolestima (Arenas i sur., 2017). Također, izoforma $\epsilon 4$ proteina ApoE, koji je glavni transporter kolesterola, potiče povećanu progresiju obiju bolesti (Nixon 2004). U pacijenata oboljelih od bolesti NPC nisu zabilježeni amiloidni plakovi u mozgu, karakteristični za AB, što je vjerojatno posljedica prerane smrti, tj. nedovoljnog vremena neophodnog za njihovu agregaciju i formiranje. Nakupljanje A β u u kasnim endosomima u agregiranom obliku pod snažnim je utjecajem visokih razina kolesterola u stanici (Yamazaki i sur. 2001) što naslućuje da postoji direktna interakcija između poremećenog metabolizma kolesterola i agregacije A β . Studija na staničnim i mišjim modelima bolesti NPC pokazala je da amilodogeno procesiranje APP-a može biti modulirano poremećenim transportom kolesterola koji karakterizira bolest NPC (Malnar i sur. 2010). U stanicama ovarija kineskog hrčka (CHO – od engl. *Chinese Hamster Ovary*) u kojima je deletiran gen *NPC1* (*NPC1*^{-/-}) primjećena je smanjena ekspresija proteina APP na staničnoj površini te njegovo povećano procesiranje beta-sekretaznim putem što rezultira povišenim unutarstaničnim količinama odsječaka C99 i A β (Malnar i sur. 2010). Autori sugeriraju da je ovaj učinak ovisan o povećanoj razini kolesterola, budući da je smanjenje kolesterola povratilo ekspresiju APP-a na površini stanice te smanjilo razine A β i C99 u ovim stanicama na vrijednosti usporedive s onima u kontrolnim stanicama divljeg tipa. Ovi rezultati potvrđuju ulogu kolesterola u metabolizmu APP-a te postojanje korelacije između homeostaze kolesterola, metabolizma APP-a i patogeneze Alzheimerove bolesti. Dodatno, poremećen unutarstanični transport kolesterola u miševima s promijenjenim proteinom NPC1 povezan je s promijenjenim razinama odsječaka C99/ β -CTF (od engl. *β -C-Terminal Fragments*), uslijed promijenjene aktivnosti γ -sekretaze, unutarstanične distribucije presenilina-1 (PS-1) i povećanog stvaranja peptida A β 40 i A β 42 (Burns i sur. 2003). Povećani rani endosomi u Alzheimerovoj bolesti, kao i u bolesti NPC, sadržavaju i izrazito visoke količine lizosomskih hidrolaza (Cataldo i sur. 1997). Razlog ovoj akumulaciji može biti djelomično povećana ekspresija manozna-6-fosfatnog receptora (MPR46) u mozgu tijekom početne faze bolesti. Prekomjerna ekspresija receptora MPR46 značajno povećava produkciju A β 40 i A β 42 u

staničnim linijama. Prema tome, dvije su značajne disfunkcije endosoma u Alzheimerovoj bolesti i u bolesti NPC; povećanje vezikula endosoma i povišene razine hidrolaza.

1.1.3.2.2. Neuropatološke različitosti s Alzheimerovom bolesti

Kada govorimo o neurodegeneraciji, različite regije mozga su različito osjetljive i pokazuju drugačiji stupanj propadanja. Dok je hipokampus najpogođenija regija u Alzheimerovoj bolesti, uglavnom je pošteđena u bolesti NPC. S druge strane, mali mozak koji je najpogođenija regija u bolesti NPC smatra se otpornom na nakupljanje peptida amiloid- β (A β) i neurodegeneraciju u AB. Jedan od glavnih simptoma NPC, ataksija, izravno je povezana s odumiranjem Purkinjeovih stanica maloga mozga (Cariati i sur. 2021). Promjenjen transport kolesterola iz kasnih endosoma/lizosoma mogao bi izravno ili neizravno uzrokovati apoptozu Purkinjeovih stanica u malom mozgu pokrećući aktivaciju mikroglije i astrocita. Istovremeno, dolazi do povećane sinteze ApoE i ApoD koji igraju ulogu u prekomjernom transportu sterola do mjesta gdje se može izlučiti iz SŽS. Neurodegeneracija je progresivna i raširena unutar kortikalne i subkortikalne neuronske populacije. Retrogradni obrazac degeneracije sugeriran je upečatljivom degeneracijom velikih vlaknastih traka (engl. *fiber tracts*) u životinjskim modelima i u ljudi s bolešću NPC (Nixon 2004). Nedavno je predloženo da promjene, odnosno aktivacija mikroglije u bolesti NPC spadaju u primarne patološke značajke koje mogu nastupiti neovisno o neurodegeneraciji (Colombo i sur. 2021). Također, primjećeno je da protein NPC1 igra ključnu ulogu u formiranju i održavanju mijelina u SŽS te da je promjena u intraneuronskom transportu lipida usko povezana sa smanjenim sazrijevanjem oligodendrocita te značajnom hipomijelinizacijom bijele tvari (Cariati i sur. 2021; Yu i Lieberman 2013). Progresivni gubitak neurona u bolesti NPC može biti potaknut i hipoksijom na koju je hipokampus iznimno osjetljiv (Calabresi i sur. 2003). O samoj bolesti NPC još uvijek ne znamo dovoljno, a mehanizme koji leže u pozadini nakupljanja kolesterola i koji uzrokuju neurodegeneraciju potrebno je razjasniti.

1.1.3.3. Neuroinflamacija

Poznato je da se neuroinflamacija javlja u nizu neurodegenerativnih bolesti te da kronična aktivacija stanica mikroglije može biti ključan čimbenik gubitka neurona, tj. neurodegeneracije (Thameem Dheen i sur. 2007). Međutim, još uvijek nije razjašnjeno je li neuroinflamacija posljedica ili uzrok neurodegeneracije ili se ova dva poremećaja (neuroinflamacija i neurodegeneracija) odvijaju paralelno i neovisno jedan od drugog. Stanice mikroglije imunološke su stanice mozga koje nadziru svoje neuronsko okruženje i aktiviraju se kada otkriju patogenu promjenu. Nakon aktivacije migriraju prema mjestu patologije koju su detektirale, proliferiraju i otpuštaju protuupalne citokine te fagocitiraju stanične ostatke (Marín-Teva i sur. 2012). Aktivacija mikroglije uz neuroprotektivno djelovanje može

biti i štetna, odnosno poticati neuronsku disfunkciju i apoptozu kada se imunološka aktivacija nastavi kronično (Walterfang i sur., 2020). Aktivacija mikroglia izražena je u odraslih pacijenata s NPC, a posebno u regijama bijele tvari. Pressey i sur. (2012) ispitivali su aktivaciju mikroglia u bijeloj tvari mozgovog mišjeg modela bolesti NPC, te su pokazali izraženu aktivaciju u žuljevitom tijelu (lat. *corpus callosum*), unutarnjoj kapsuli i moždanom kraku (Pressey i sur. 2012). Također, utvrdili su da se aktivacija mikroglia pojavila ranije u regijama bijele tvari u odnosu na regije sive tvari. Rana aktivacija u bijeloj tvari snažno je povezana s neuropatologijom NPC i smanjenom frakcijskom anizotropijom bijele tvari. Prvi dokazi o postojanju snažne neuroinflamacije u mozgu oboljelih od bolesti NPC otkriveni su na animalnim modelima. Miševi s mutacijom gena *NPC1* i *NPC2* koja je dovela do smanjene proizvodnje proteina NPC, astrociti i mikroglie pokazali su identične morfološke promjene kao i neuroni. Također, broj astrocita i mikroglie je bio povećan u regijama u kojima je gubitak neurona najveći u kasnijoj fazi bolesti, tj. u talamusu i malom mozgu (German i sur. 2002). Mikroglie se u miševa aktiviraju dosta rano, već u 2. tjednu, u 4. se tjednu već primjećuje značajnije oštećenje aksona, a do 10. tjedna potpuno se oštete Purkinjeove stanice u malome mozgu. U pacijenata oboljelih od bolesti NPC, pokazano je značajno povećanje upalnih markera u likvoru u usporedbi s kontrolom, a značajna aktivacija mikroglia primijećena je i u uzorcima *post mortem* malog mozga i tkiva frontalnog korteksa (Cologna i sur. 2014).

1.2. Karakteristike prenositelja bolesti Niemann-Pick tipa C

Zanimljivo je da su se prenositelji bolesti NPC (osobe koje imaju mutaciju u samo jednom alelu gena *NPC1/NPC2*) smatrali zdravima sve dok se nisu primijetile određene neuropsihijatrijske promjene u starijih prenositelja (Schneider i sur. 2019). Do danas se došlo do brojnih dokaza koji sugeriraju da postojanje mutacije u samo jednom alelu gena kod recesivnih poremećaja može biti popraćeno subkliničkim poremećajima sa ili bez popratnog povećanog rizika razvoja bolesti. Heterozigotne mutacije već su se pokazale kao najčešći genetski faktor rizika za razvoj Parkinsonove bolesti (Sidransky i sur. 2009), a u sljedećim poglavljima ovoga rada osvrnut ću se na kliničku sliku osoba koje su prenositelji bolesti NPC te opisati kakve se sve neuropatološke karakteristike pojavljuju u prenositelja na mišjem modelu bolesti NPC.

1.2.1. Klinička slika prenositelja

Hipoteza da heterozigotnost mutacije gena *NPC1* i *NPC2* može predstavljati rizik pojave neurodegeneracije u kasnijoj životnoj dobi dodatno je podržana visokom stopom pojave neurodegenerativnih bolesti među članovima obitelji pacijenata oboljelih od NPC (Schneider i sur. 2019). Osobe oboljele od NPC pokazuju složenu patologiju endosomskog puta usljed nakupljanja kolesterola koje su uzrokovane disfunkcijom proteina NPC1 ili NPC2. Kolesterol se u takvim uvjetima ne može transportirati do plazma membrane i ER-a što dovodi do njegovog nakupljanja u kasnim endosomima te lizosomima i do pojave neurodegeneracije. Kod osoba koji su prenositelji promijenjenih gena *NPC1* i *NPC2*, primijećeni su nemotorički poremećaji (autonomna uključenost) poput oslabljenog mirisa, ortostatske hipotenzije, konstipacije, naglih potreba za mokrenjem, impotencije i poremećaja spavanja (Bremova-Ertl i sur. 2020). Također, primijećeni su konzistentna splenomegalija te promijenjeni elektrofiziološki markeri koji su detektirani transkranijalnom magnetskom stimulacijom (Benussi i sur. 2019). Drugi elektrofiziološki znakovi koji su otkriveni u simptomatskih prenositelja bolesti NPC bili su: oslabljena intrakortikalna facilitacija, kratka aferentna inhibicija i dugotrajna potencijacija (*engl. Long-term potentiation, LTP*) (Benussi i sur. 2017). Iz kliničkog iskustva je poznato da se bolest NPC, čak kada je prisutan sav karakterističan fenotip, pogrešno dijagnosticira ili se dijagnosticira s velikim zakašnjenjem. Slično je i s osobama prenositeljima bolesti NPC u slučaju kada se ne pojavljuju kliničke značajke koje jasno upućuju na genetski uzrok. Stoga je vrlo vjerojatno da će neurodegeneracija u heterozigota biti nedovoljno dijagnosticirana (Schneider i sur. 2019).

1.2.2. Neuropatološke karakteristike prenositelja u mišjem modelu bolesti Niemann-Pick tipa C

Miševi s mutiranim genom *NPC1* naširoko su korišteni životinjski model za proučavanje bolesti NPC (Schneider i sur., 2019). Najčešće korišten mišji model bolesti je *NPC1^{-/-}* (*NPC1^{nh}*) kojem nedostaje protein NPC1 i koji u potpunosti rekapitulira glavna patološka obilježja NPC bolesti, uključujući neurodegeneraciju i aktivaciju mikroglia i astrocita (Loftus i sur. 1997). Radi se o vrlo progresivnom modelu bolesti koji najbolje odražava oblik NPC-a koji se pojavljuje u infantilnoj dobi. Miševi sa spontanom mutacijom koja je rezultirala nedovoljnom proizvodnjom proteina NPC, sterilni su te ne preživljavaju dulje od 10 do 14 tjedana. Još jedan mišji model koji se koristi u istraživanjima je *NPC1^{I1061T}*, a za njega je značajno da ima mutaciju koja je najčešća mutacija gena *NPC1* u ljudi i pokazuje blaži oblik (Liu i sur. 2021; Praggastis i sur. 2015). Oba mišja modela se koriste za molekularna istraživanja s ciljem boljeg razumijevanja patologije bolesti NPC te za dizajn novih terapijskih opcija. Za razliku od *NPC1^{nh}* modela, koji bolje odražava oblik bolesti koja se pojavljuje u infantilnoj dobi, model *NPC1^{I1061T}* bolji je za proučavanje NPC koji se pojavljuje u kasnijoj životnoj dobi. Što se tiče

prenositelja bolesti NPC, jedino istraživanje koje je do sada objavljeno na heterozigotnim miševima s mutacijom gena *NPCI* je pokazalo karakteristično nakupljanje kolesterola u stanicama i odumiranje Purkinjeovih neurona u malom mozgu (Yu i sur., 2005). Istraživanje provedeno u laboratoriju dr. sc. Katušić Hećimović (Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković - IRB), u kojem sam izradio ovaj diplomski rad, ukazala su na postojanje dodatnih neuropatoloških karakteristika bolesti NPC u heterozigotnih miševa *NPCI*^{+/-} starih dvije godine, poglavito postojanje neuroinflamacije za koju se u zaključku rada navodi da bi mogla biti najraniji patološki događaj i „okidač“ za pokretanje kaskade ostalih neuropatoloških karakteristika bolesti NPC (Zovko 2021).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada jest utvrditi rane neuropatološke promjene u prenositelja bolesti NPC u mišjem modelu soja BALB/cNctr-Npc1m1N/J. Pri tome je cilj ispitati neuropatološke karakteristike bolesti NPC u mladim miševa heterozigotnih za gen *NPCI* (NPC1-het) starih 20 i 40 tjedana. Ovaj se rad izravno nastavlja na prethodna istraživanja Laboratorija za istraživanje neurodegenerativnih bolesti, provedenih na 100-tjedana starim miševima NPC1-het, iz kojih je proizašao zaključak da bi neuroinflamacija mogla biti najraniji patološki događaj u mozgovima s mutacijom u *NPCI*, zaslužan za pokretanje kaskade ostalih neuropatoloških karakteristika bolesti NPC. Pretpostavka je da bi se u populaciji mlađih heterozigota mišjeg modela bolesti NPC (starih 20 i 40 tjedana) mogao pronaći odgovor na dob javljanja neuroinflamacije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzgoj miševa i uzorkovanje mozгова

Heterozigotni miševi $NPC1^{+/-}$, koji će u ostatku ovog diplomskog rada biti označeni s NPC1-het, pripadaju soju BALB/cNctr-Npc1m1N/J (003092), The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, SAD). Miševi su uzgajani u Pogonu laboratorijskih životinja na Institutu Ruđer Bošković u skladu s EU direktivom 2010/63/EU za provođenje pokusa na životinjama. Ovaj mišji model je najčešće korišten model u istraživanjima bolesti NPC. Miševi su uzgajani u ciklusima 12 sati dan/12 sati noć uz dostupnost vode i standardne mišje hrane (Mucedola, Italija) *ad libitum*. Ženke i mužjaci heterozigotnih miševa su pareni kako bi se dobili miševi NPC1-het i $NPC1^{+/+}$, odnosno divlji tip (WT, od engl. *wild-type*) te $NPC1^{-/-}$ (NPC1) koji su korišteni kao kontrole za validaciju karakterističnih neuropatoloških promjena bolesti NPC u mozgu. Miševi su genotipizirani metodom PCR na uzorcima DNA izoliranim iz tkiva vrha repa prema protokolu The Jackson Laboratory (<https://www.jax.org/Protocol?stockNumber=003092&protocolID=27890>). Genotipizaciju i izolaciju mozgovia napravila je neposredna voditeljica ovog diplomskog rada, Lea Vidatić. Nakon odvajanja miševa od majke s četiri tjedna starosti. Miševi su potom uzgajani do određene starosti (9, 20 i 40 tjedana) te žrtvovani cervikalnom dislokacijom koja je u skladu s propisima o postupanju s laboratorijskim životinjama. Nakon izolacije mozgovia, lijeve hemisfere fiksirane su u 4%-tnom paraformaldehidu tijekom 24 sata pa isprane u rastućem gradijentu saharoze (15% i 30%) otopljene u fosfatnom puferu (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) tijekom 24 sata. Hemisfere su zatim uronjene u medij za smrzavanje (Shandon M-1 Embedding Matrix, Thermo Scientific, SAD) te krioprezervirane uranjanjem kalupa u izopentan koji je ohlađen na suhom ledu. Uzorci su zatim pohranjeni pri -80 °C do provođenja imunohistokemijske analize.

3.2. Imunohistokemijska analiza kriorezova mišjih mozgovia

Za potrebe ovog diplomskog rada koristio sam prethodno pripremljene sagitalne kriorezove mozgovia 6 miševa po svakoj dobnoj skupini (3 mužjaka i 3 ženke). Kriorezovi debljine 30 μm i 15 μm pripremljeni su na kriotomu Leica CM 1850 (Zavod za molekularnu biologiju, IRB). Rezovi su nanoseni na predmetna stakla (Menzel-Gläser Superfrost Plus, Thermo Scientific, SAD), osušeni i pohranjeni pri -80 °C do daljnje analize. Imunohistokemijsku analizu proveo sam na fiksiranim i kriozastićenim lijevim hemisferama mozgovia miševa NPC1-het i WT, te kontrolama WT i NPC1. Imunohistokemijsko bojanje sam proveo prema sljedećem protokolu: sagitalne kriorezove mišjih mozgovia koji se nalaze na predmetnici sam sušio u laminaru, pod strujom zraka, tijekom jednog sata. Potom sam uzorke okružio hidrofobnom olovkom (PAP pen, Sigma Aldrich, SAD) te ih inkubirao pri sobnoj temperaturi 30 minuta u puferu TBS koji sadrži 0,5% Triton X-100 (TBS-T od engl. *Tris buffer saline - Triton*). Detaljan sastav

pufera za permeabilizaciju je prikazan u Tablici 1. Uzorke sam zatim blokirao 1 sat u otopini 4% -tnog magarećeg seruma (Sigma Aldrich, SAD) u puferu TBS-T. Nakon blokiranja, kriorezovi su preko noći inkubirani u otopini za blokiranje koja sadrži različita primarna protutijela (popis protutijela i razrjeđenja korištenih za izradu ovog diplomskog rada nalazi se u Tablici 2.). Sljedeći dan sam ispirao kriorezove 3 puta tijekom 10 minuta u puferu TBS-T, a zatim ih inkubirao u mraku u otopini sa sekundarnim protutijelima (Tablica 2.) tijekom 3 sata. Nakon tri ispiranja tijekom 10 minuta u puferu TBS-T, bojao sam slobodni kolesterol inkubiranjem uzoraka 20 minuta u otopini filipina (Sigma Aldrich, SAD) finalne koncentracije 100 µg/mL ili sam bojao nukleinske kiseline 20 minuta bojom Hoechst (ThermoFisher Scientific, SAD) koju sam priredio u puferu HBSS (Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD) u razrjeđenju 1:2000. Uslijedilo je ispiranje 3 puta tijekom 10 minuta u puferu TBS-T pa sušenje uzoraka 1 sat u laminaru. Uzorke sam uklopio koristeći medij za uklapanje Fluoromount (Sigma Aldrich, SAD) te ih prekrio pokrovnica (Marienfeld, Njemačka). Nakon provedenog imunohistokemijskog bojenja uzorci su analizirani na konfokalnom mikroskopu (Laser Scanning Spectral Confocal Microscope Leica TCS SP2 AOBS, Zavod za molekularnu biologiju, IRB), a dobivene slike sam kvantitativno analizirao koristeći program ImageJ (National Institutes of Health, SAD) prema protokolu <https://www.unige.ch/medecine/bioimaging/files/1914/1208/6000/Quantification.pdf>. Dobivene vrijednosti sam statistički obradio t-testom (two-tailed, unpaired). Promjene sam smatrao značajnim pri p vrijednostima $<0,05$ (* $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$).

Tablica 1. Detaljan sastav pufera za permeabilizaciju.

Pufer za permeabilizaciju
TBS 10x (500mM, pH 8): 60,75 g Trizma baza + 70,25NaCl u 1L dH ₂ O; 1L 1xTBS 1X + 5mL Triton X-100

Tablica 2. Popis protutijela korištenih u imunohistokemijskoj analizi.

Protutijelo	Biološko podrijetlo	Razrjeđenje	Klon, proizvođač
Anti-GFAP	miš	1:500	GA5, Cell Signaling, SAD
Anti-CD68	štakor	1:750	FA-11, Bio-Rad, SAD
Anti-Lamp1	štakor	1:200	1D4B, Santa Cruz, SAD
Anti-NeuN	kunić	1:250	ABN78, Sigma Aldrich, SAD
Anti-calbidin	miš	1:500	D-28k, Swant, Švicarska
Anti-IgG štakora+Alexa Fluor 488	magarac	1:200	Invitrogen, ThermoFisher Scientific, SAD
Anti-IgG miša+Alexa Fluor 594	magarac	1:200	Invitrogen, ThermoFisher Scientific, SAD
Anti-IgG kunića+Alexa Fluor 680	magarac	1:200	Invitrogen, ThermoFisher Scientific, SAD

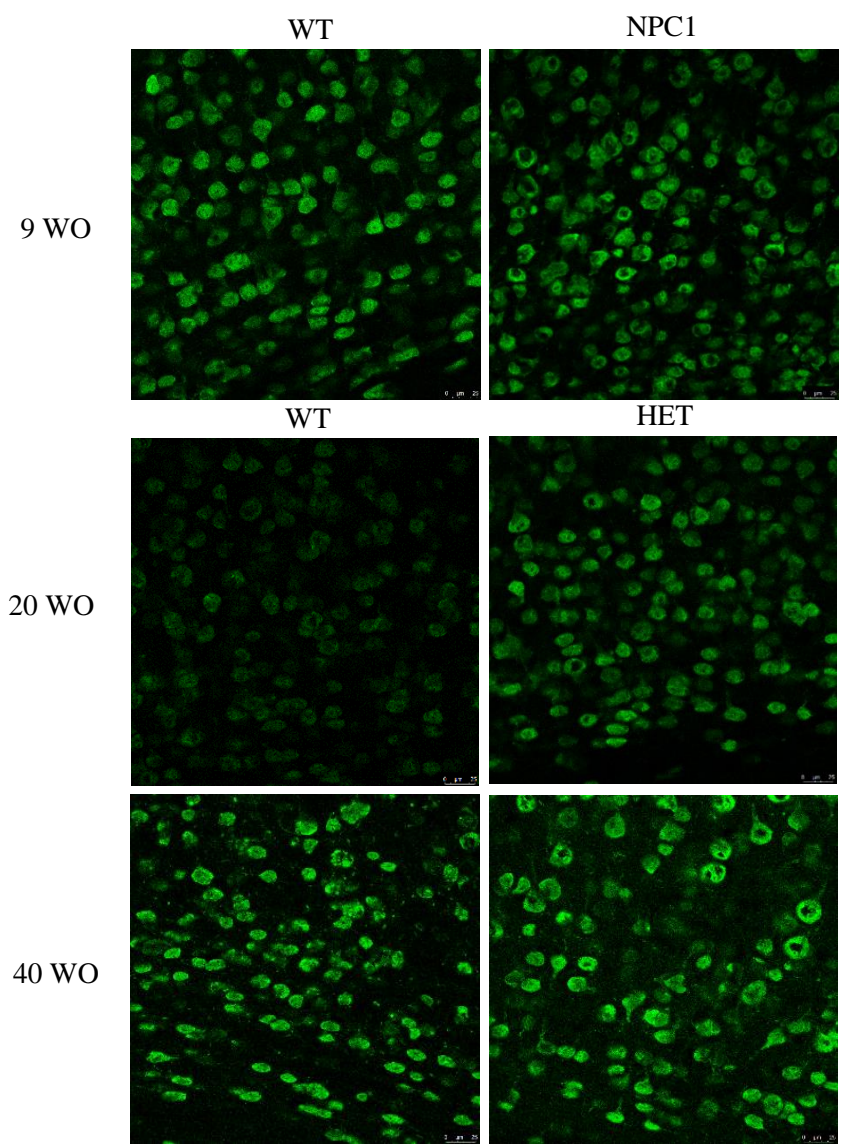
*GFAP je biljeg astrocita, CD68 je biljeg aktiviranih mikroglia, Lamp1 je biljeg lizosoma, calbidin je biljeg Purkinjeovih neurona u malom mozgu i NeuN je biljeg jezgara zrelih neurona.

4. REZULTATI

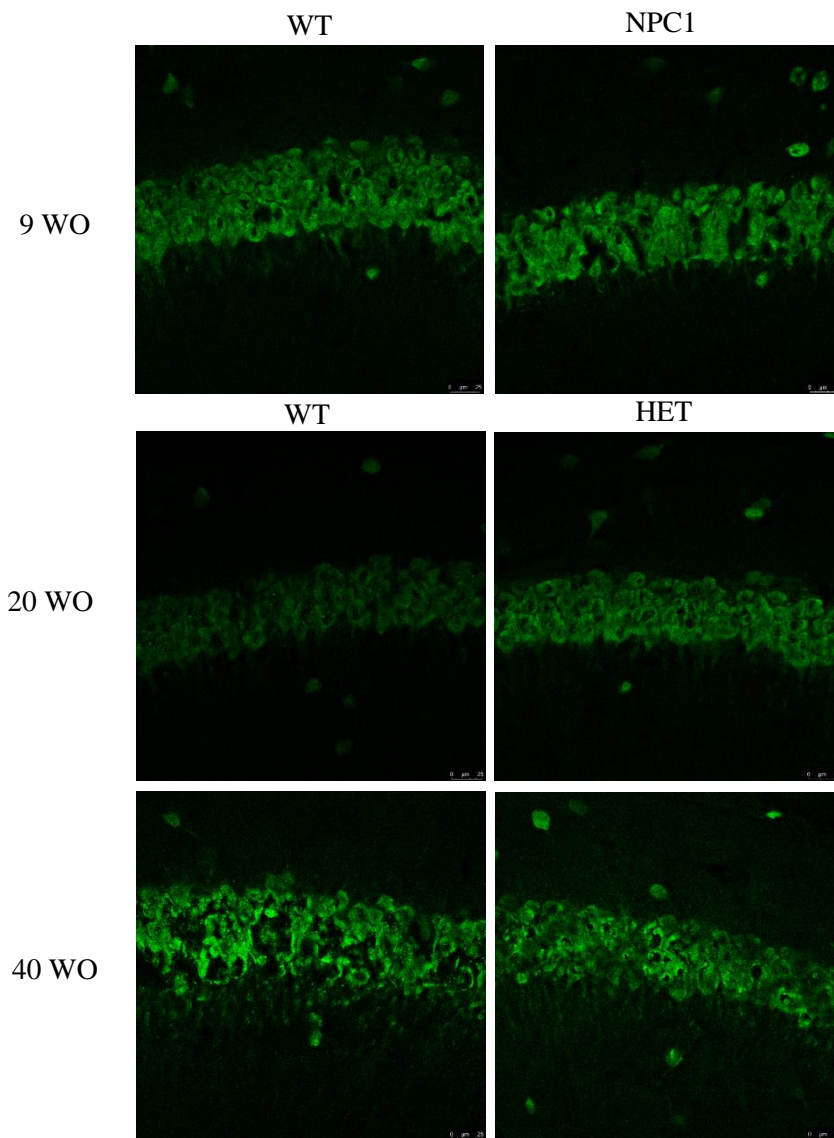
Prethodna istraživanja u Laboratoriju za istraživanje neurodegenerativnih bolesti Instituta Ruđer Bošković, koja su bila provedena na heterozigotnim NPC1 (NPC1-het) miševima starim 100 tjedana, pokazala su da gubitak jednog alela gena *NPC1* može dovesti do pojave neuroinflamacije u kasnijoj životnoj dobi (Zovko 2021). Ovaj nalaz je bio u suprotnosti s dosada uvriježenim mišljenjem da su prenositelji recesivnih oboljenja, kao što je rijetka nasljedna i lizosomska bolest nakupljanja NPC, zdravi. Stoga je cilj mog diplomskog rada bio dodatno ispitati ove detalje, tj. utvrditi eventualno postojanje najranijih neuropatoloških karakteristika u heterozigotnih NPC1 miševa starih 20 i 40 tjedana u usporedbi s miševima divljeg tipa iste starosti. Kao kontrole za validaciju karakterističnih neuropatoloških promjena u bolesti NPC koje sam analizirao, koristio sam mozgove NPC1 miševa starih 9 tjedana. Pri tom sam proveo imunohistokemijsku analizu na sagitalnim kriozovima mišjih mozгова. Rezultati su prikazani na slikama. Svaka slika dobivena je preklapanjem dviju slika: jedne na kojoj se vidi obojenje prereza određene regije mozga specifičnim protutijelom te druge na kojoj je ta ista regija mozga obojena bojom Hoechst, koja boji nukleinske kiseline čime nam omogućuje vizualizaciju položaja jezgara stanica. Preklapanjem sam dobio topološku sliku histološkog prereza koja potvrđuje određenu regiju mozga prikazanu na slici. Uz to, kao dodatak slikama, prikazani su i grafovi dobiveni kvantifikacijom slika u programu ImageJ. Na njima se vidi prosječna površina obojenja protutijelima za svaku od eksperimentalnih skupina mišjih mozgov. Rezultate sam podijelio u tri kategorije: (i) analiza neurodegeneracije provedena bojenjem biljezima Purkinjeovih neurona (calbidin) i jezgara zrelih neurona (NeuN), zatim (ii) analiza neuroinflamacije koja je provedena bojenjem aktiviranih astrocita i mikroglia protutijelima GFAP i CD68 te (iii) analiza poremećenog endolizosomskog puta provedena biljezima lizosoma (Lamp1) i slobodnog kolesterola (filipin).

4.1. Analiza neurodegeneracije u kori velikog mozga, regijama hipokampusa i u malom mozgu

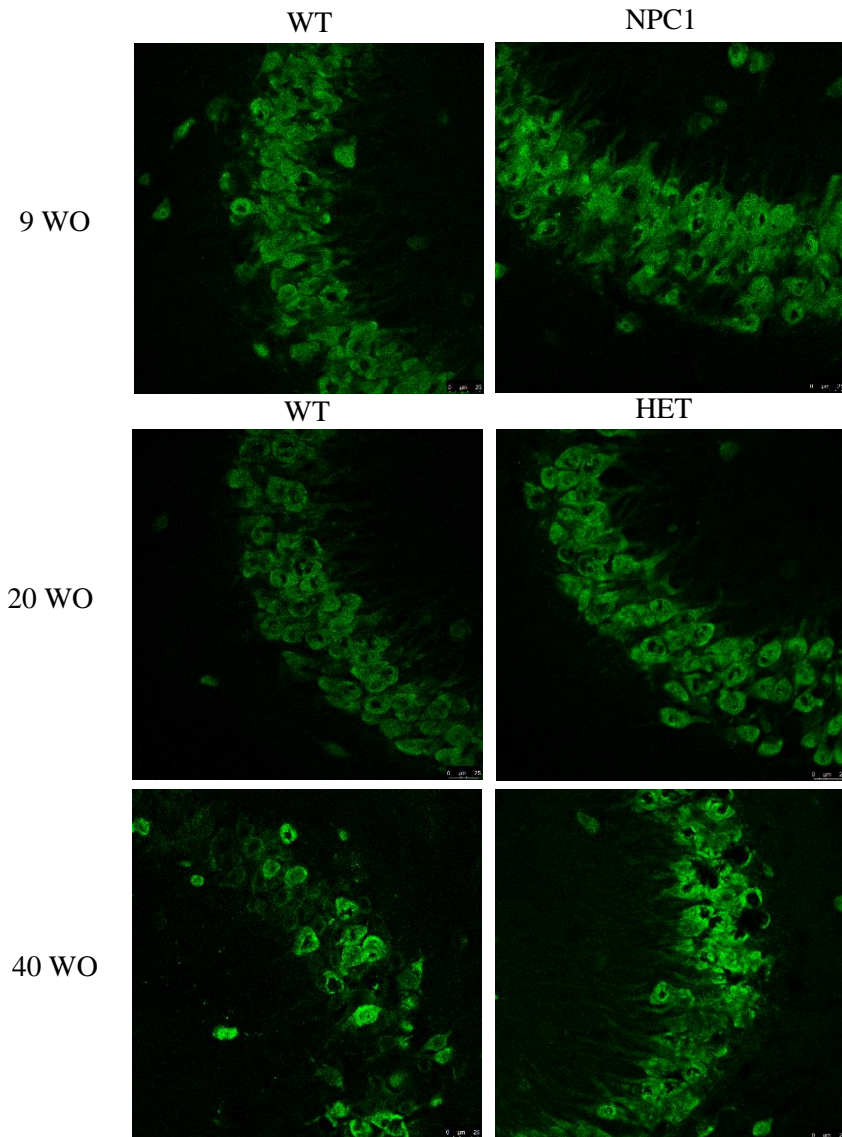
S obzirom da je jedan od najznačajnijih simptoma bolesti NPC ataksija, uzrokovana propadanjem Purkinjeovih neurona u malom mozgu, proveo sam imunohistokemijsku analizu koristeći biljege neurodegeneracije NeuN (engl. *Neuronal nuclei*) i calbidin. Slike su posložene tako da svaka prikazuje pojedinačnu moždanu regiju kod svih eksperimentalnih grupa (9, 20 i 40 tjedana starosti – označene s WO prema engl. *weeks old*). Rezultati bojanja protutijelom anti-NeuN, koje sam proveo na moždanim regijama kore velikog mozga, CA1 i CA3 regijama hipokampusa i malom mozgu nisu pokazala razliku, odnosno na slikama se ne primjećuje neurodegeneracija niti u jednoj moždanoj regiji NPC1 heterozigota kod svih eksperimentalnih grupa u usporedbi s miševima iste starosne dobi divljeg tipa (Slike 3-6).



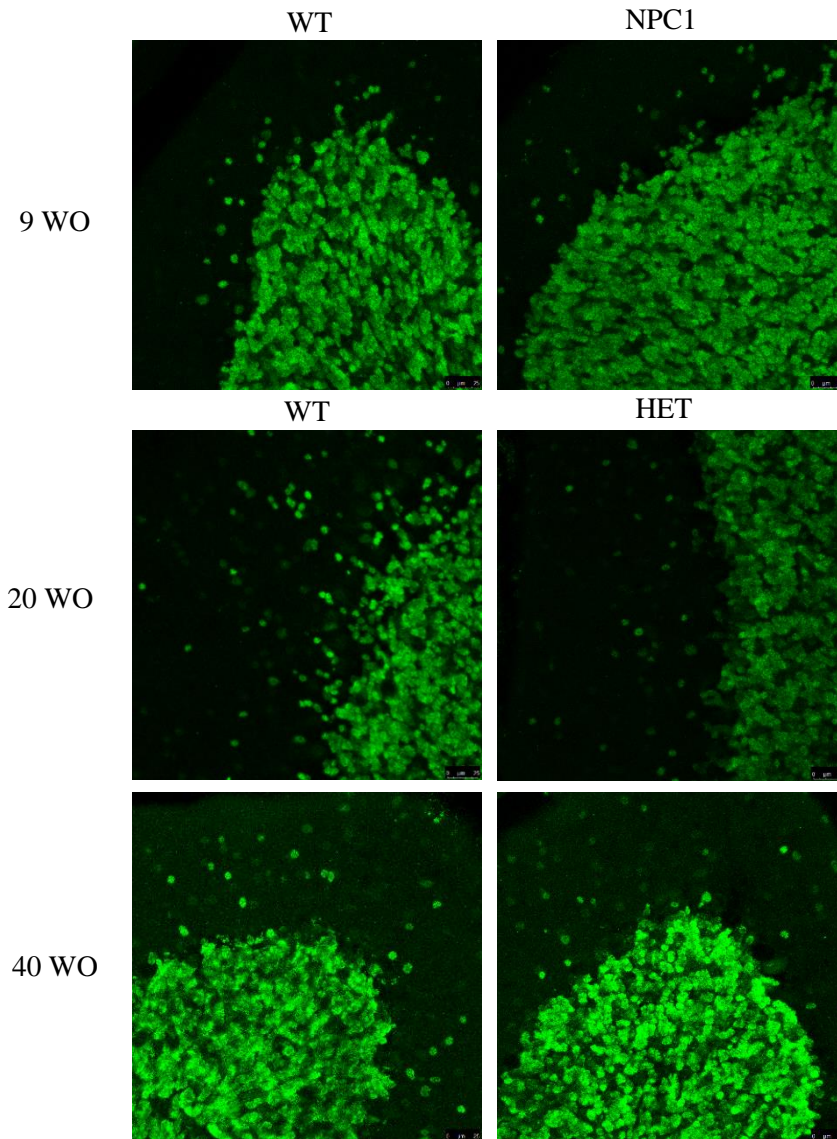
Slika 3. Imunohistokemijsko bojanje prereza mozgovu u području kore velikog mozga 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana protutijelom anti-NeuN (zelena boja).



Slika 4. Imunohistokemijsko bojanje prereza mozgovia u području moždane regije CA1 u hipokampusu 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana protutijelom anti-NeuN (zelena boja).

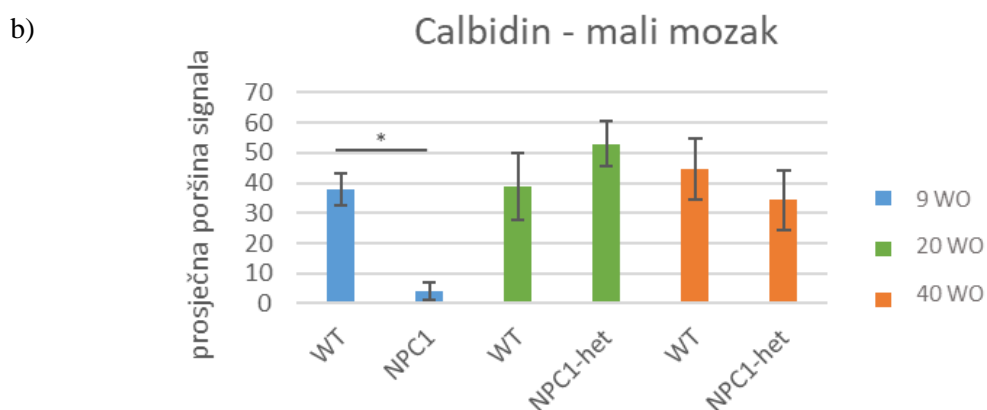
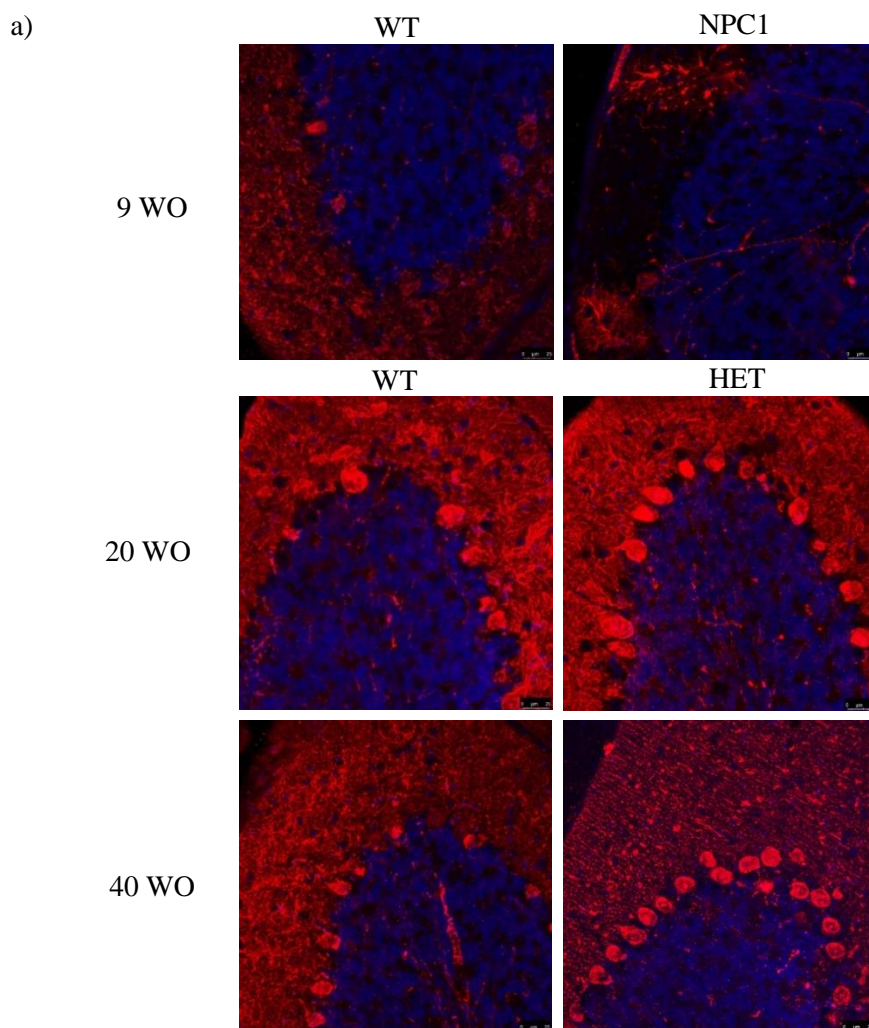


Slika 5. Imunohistokemijsko bojanje prereza mozgova u području moždane regije CA3 u hipokampusu 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana protutijelom anti-NeuN (zelena boja).



Slika 6. Imunohistokemijsko bojanje prereza prednjih režnjeva malog mozga 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana protutijelom anti-NeuN (zelena boja).

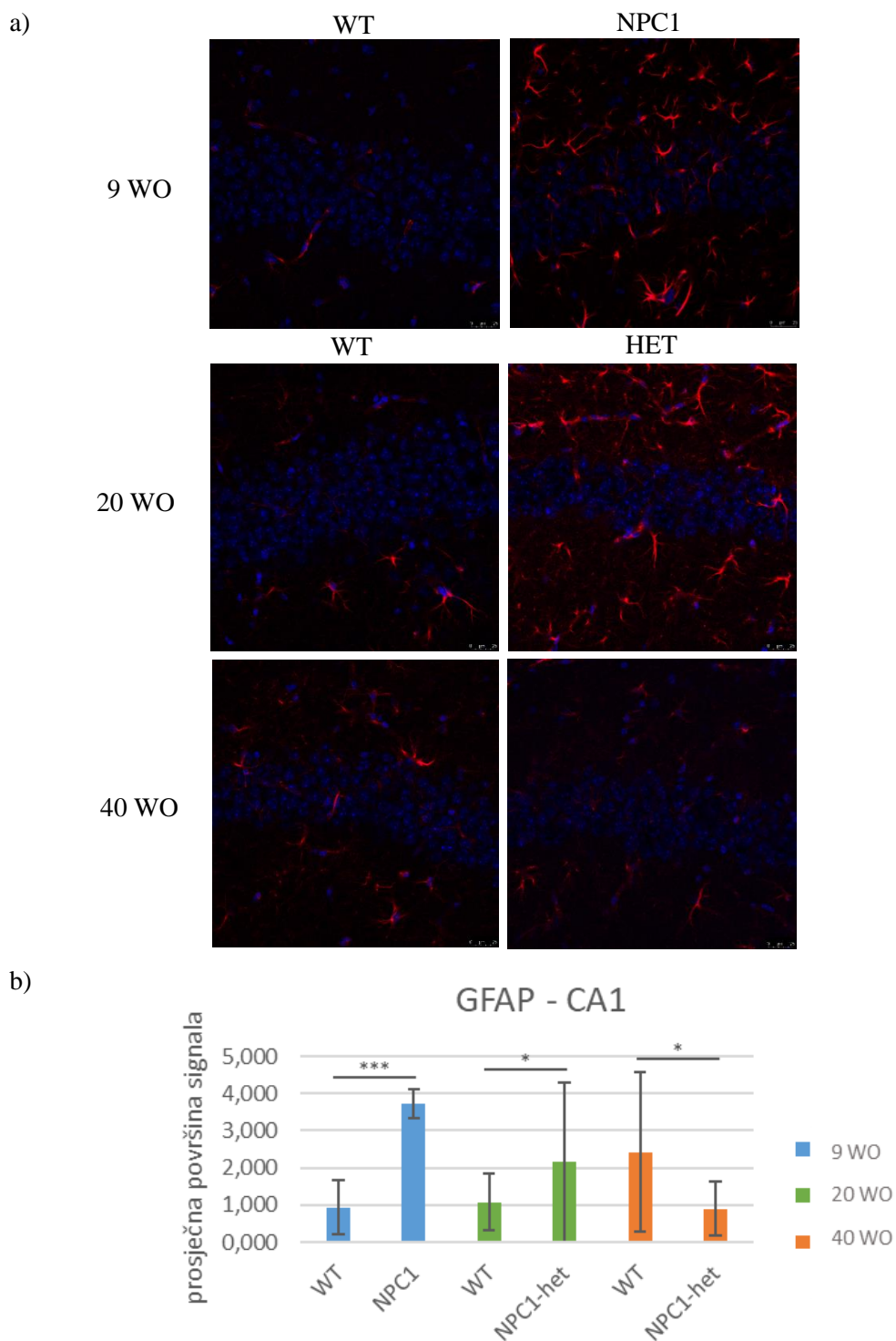
Imunohistokemijsko bojanje protutijelom anti-calbidin proveo sam samo na uzorcima malih mozgova s obzirom da je calbidin biljeg Purkinjeovih neurona. Rezultati pokazuju neurodegeneraciju samo kod kontrolne grupe, odnosno 9 tjedana starih NPC1 miševa dok se kod 20 i 40 tjedana starih miševa ne vidi razlika u propadanju tijela Purkinjeovih neurona niti dendritičke mreže uspoređujući mozgove WT i NPC1-het (Slika 7a). Prikazani su rezultati bojanja samo prednjeg režnja malog mozga. Kvantifikacija dobivenog signala, koristeći ImageJ, potvrdila je značajnu razliku kod kontrolne grupe, kao i izostanak značajne razlike bojanja calbindina između skupine WT i NPC1-het 20 i 40 tjedana starosti (Slika 7b).



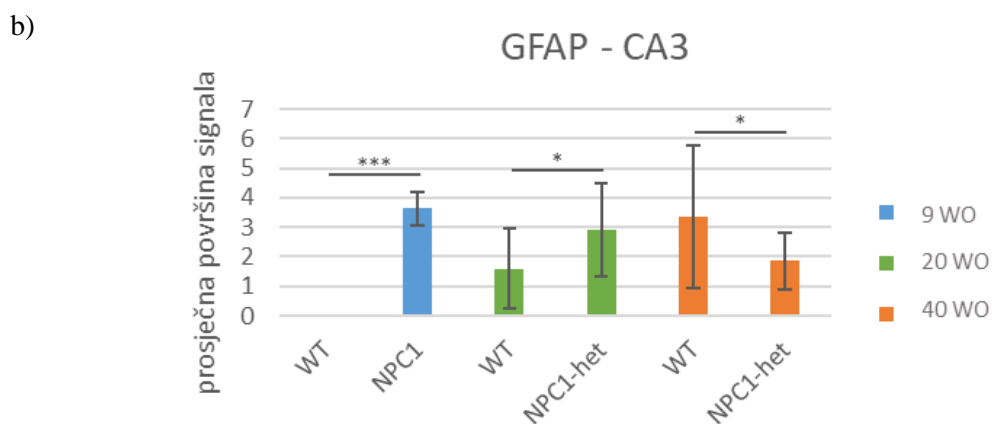
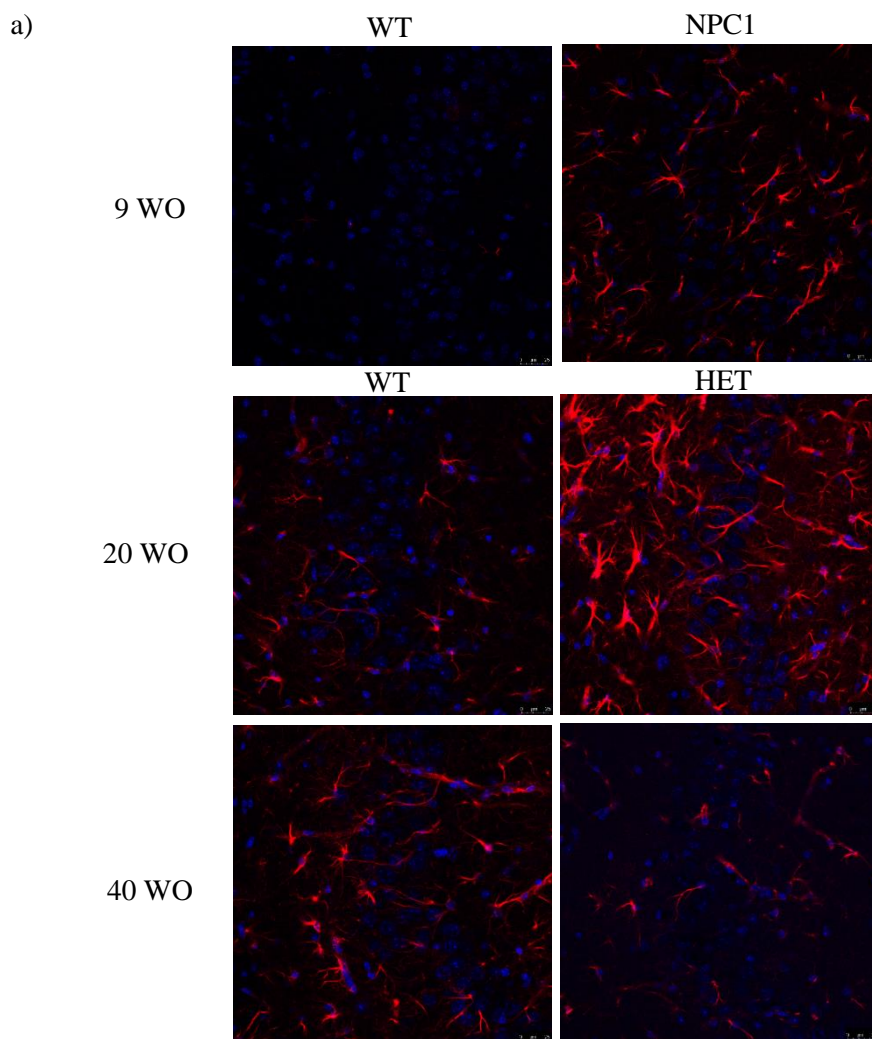
Slika 7. (a) Imunohistokemijsko bojanje prereza prednjeg režnja malih mozгова 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana protutijelom anti-calbidin (crvena boja) i bojom Hoechst (plava boja). (b) Kvantifikacija dobivenih signala programom ImageJ prikazana grafom s vrijednostima pogreške izraženim standardnom devijacijom. Statistički značajna razlika označena je s * ($p < 0,05$).

4.2. Analiza neuroinflamacije u kori velikog mozga, regijama hipokampusa i u malom mozgu

S obzirom da su prethodna istraživanja Colombo i sur. 2021 i istraživanja diplomskog rada Zovko A (2021) ukazala da bi neuroinflamacija mogla predstavljati najraniji patološki proces u bolesti NPC te biti okidač daljnje neuropatologije, odlučio sam imunohistokemijski analizirati pojavu neuroinflamacije u mozgovima miševa NPC1-het starosti 20 i 40 tjedana. Pri tom sam kao kontrolne uzorke koristio mozgove miševa WT i NPC1 starosti 9 tjedana, koji su pokazali značajnu neuroinflamaciju, tj. aktivaciju astrocita (biljeg - kiseli glijalni fibrilarni protein, odnosno GFAP, od engl. *Glial Fibrillary Acidic Protein*, Slike 8 i 9) te aktivaciju mikroglia (biljeg - stanični diferencijacijski antigen 68, odnosno CD68, od engl. *Cluster of Differentiation 68*, Slike 10-13) u svim ispitanim regijama: u kori velikog mozga, regijama hipokampusa i u malom mozgu. Rezultati koje sam dobio u analiziranim uzorcima miševa WT i NPC1-het odražavaju značajnu aktivaciju astrocita u regijama hipokampusa u 20 tjedana starim miševima NPC1-het u odnosu na divlji tip iste starosne dobi. Međutim, takav trend nije uočen u 40 tjedana starim miševima NPC1-het u odnosu na miševe divljeg tipa (Slike 8a i 9a). Suprotno, aktivacija astrocita kod te dobne skupine čak je blago izraženija u skupini divljeg tipa što je potvrdila i kvantifikacija (Slike 8b i 9b).

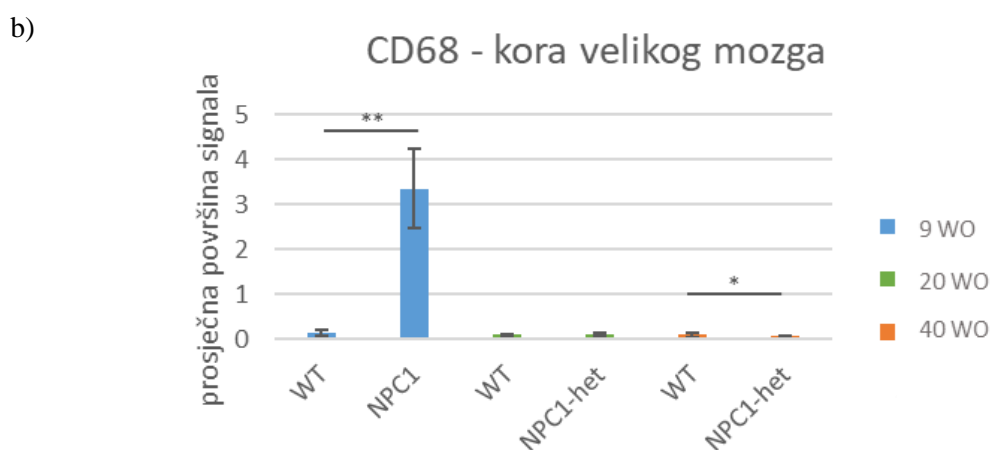
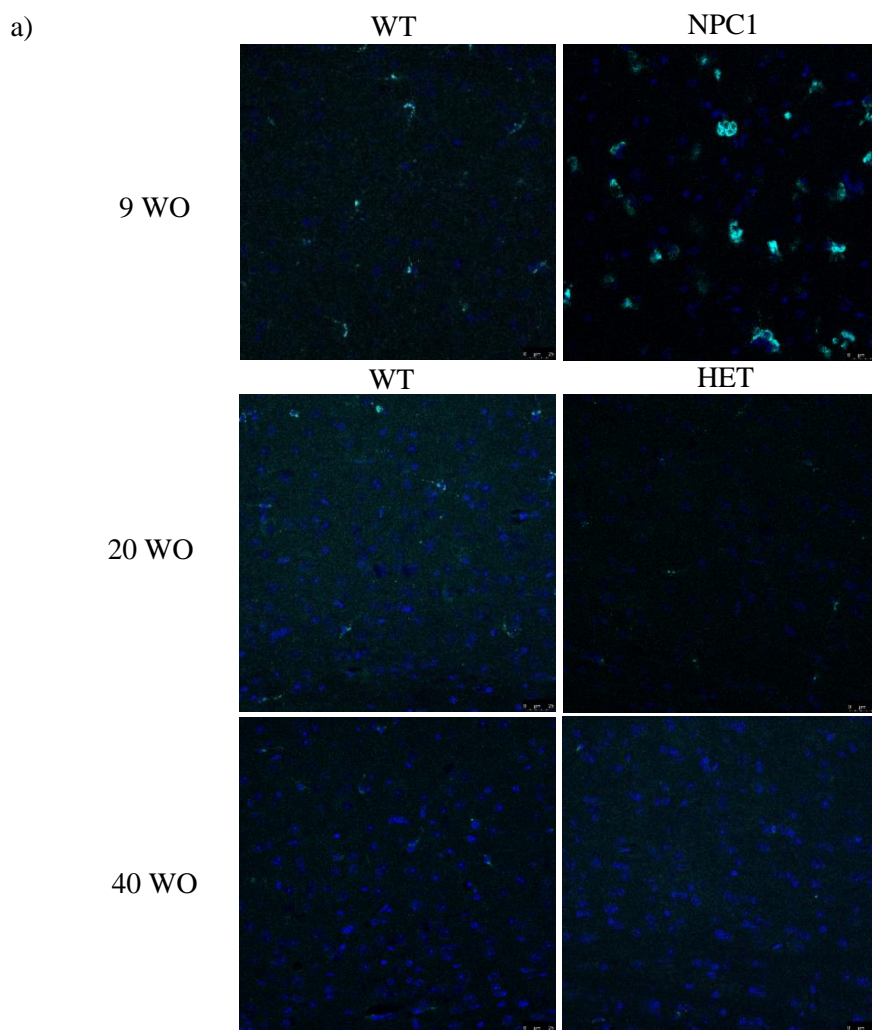


Slika 8. (a) Imunohistokemijsko bojanje prereza mozгова u području moždane regije CA1 u hipokampusu 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana protutijelom anti-GFAP (crvena boja) i bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plava boja). (b) Kvantifikacija dobivenih signala programom ImageJ prikazana grafom s vrijednostima pogreške izraženim standardnom devijacijom. Statistički značajna razlika označena je s * ($p < 0,05$); *** ($p < 0,001$).

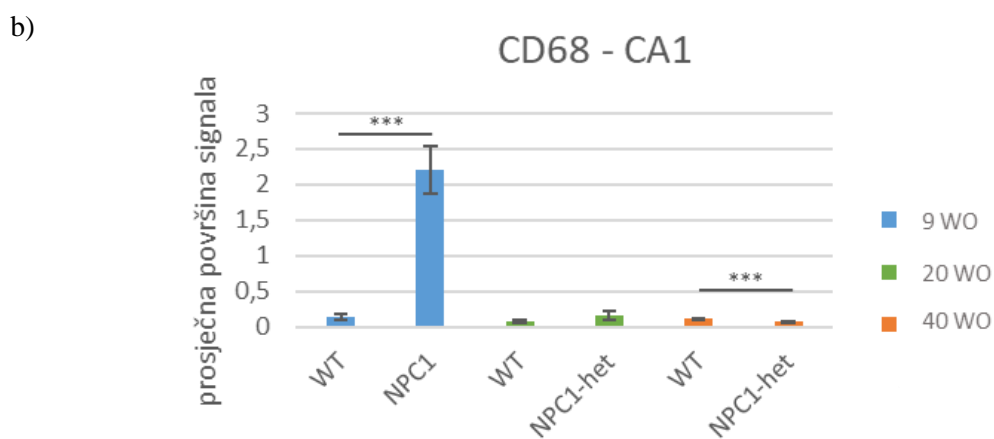
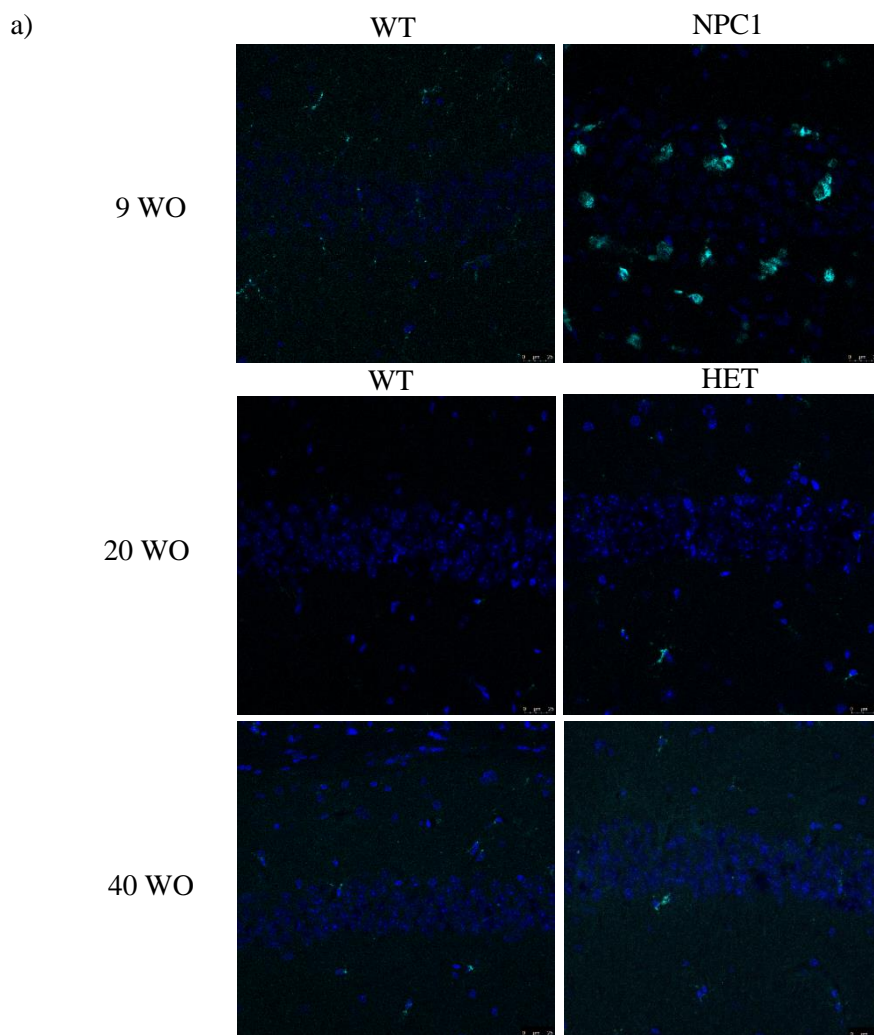


Slika 9. (a) Imunohistokemijsko bojanje prereza mozгова u području moždane regije CA3 u hipokampusu 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana protutijelom anti-GFAP (crvena boja) i bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plava boja). (b) Kvantifikacija dobivenih signala programom ImageJ prikazana grafom s vrijednostima pogreške izraženim standardnom devijacijom. Statistički značajna razlika označena je s * ($p < 0,05$); *** ($p < 0,001$).

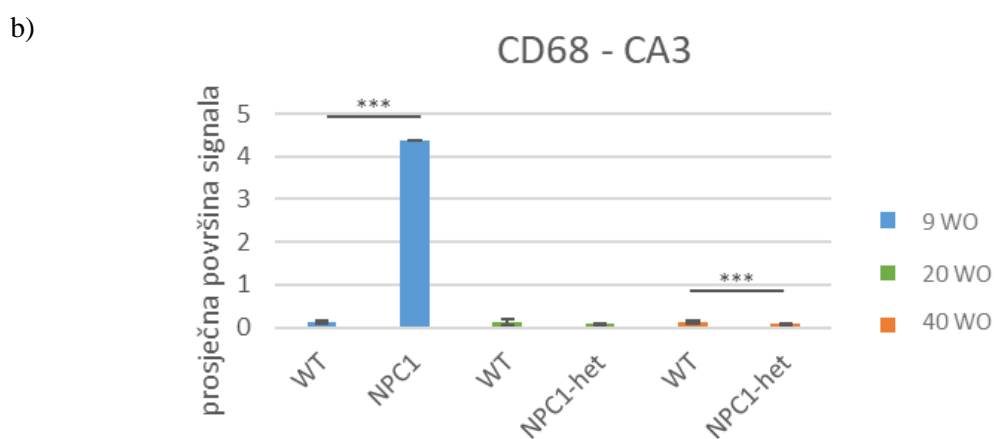
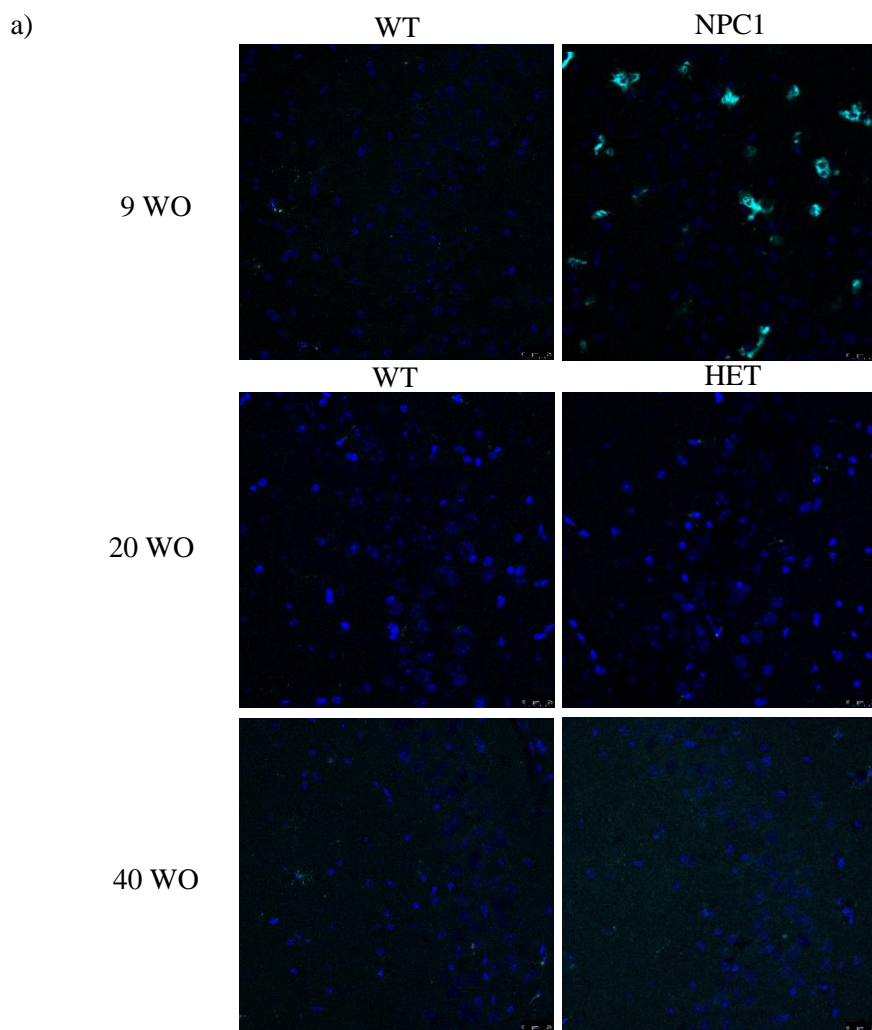
Rezultati imunohistokemijskog bojanja anti-CD68 protutijelom nisu ukazali na razliku između divljeg tipa i mozgova NPC1-het 20 i 40 tjedana starih miševa (Slike 10a-13a). Međutim, rezultati kvantifikacije dobivenih signala pokazuju statistički značajno smanjenje signala u 40 tjedana starih mozgova NPC1-het u području kore velikog mozga (Slika 10b), CA1 i CA3 regija hipokampusa (Slike 11b i 12b) u odnosu na divlji tip iste starosne dobi. U svih 20 tjedana starih mozgova nema statistički značajne razlike između NPC1-het i divljeg tipa, a u malom mozgu nema statistički značajne razlike niti u jednoj starosnoj skupini (Slika 13b).



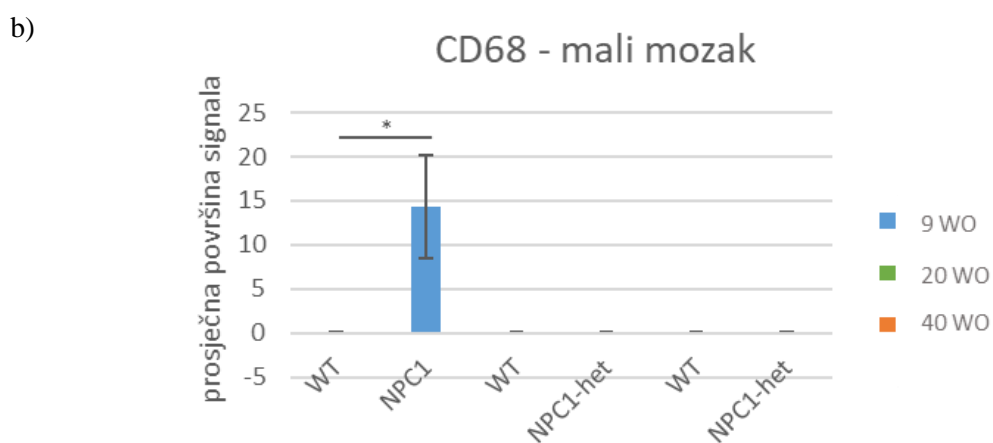
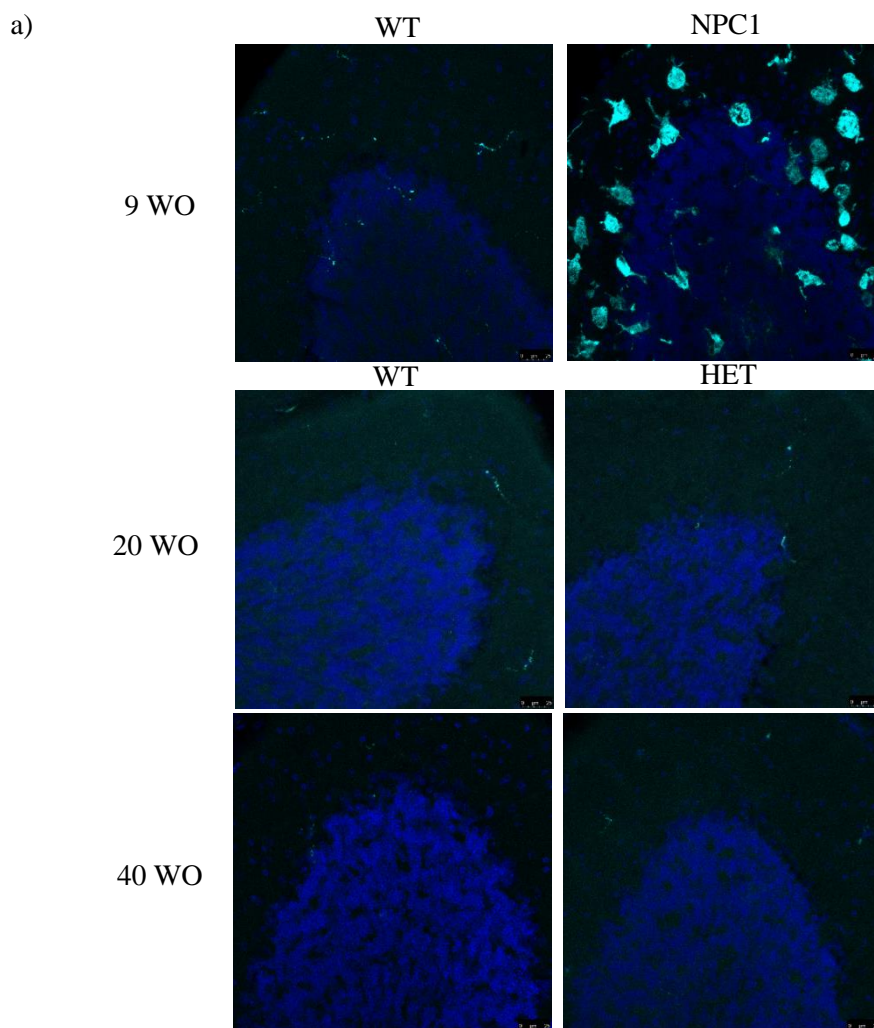
Slika 10. (a) Imunohistokemijsko bojanje prereza mozгова u području kore velikog mozga 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana protutijelom anti-CD68 (tirkizna boja) i bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plava boja). (b) Kvantifikacija dobivenih signala programom ImageJ prikazana grafom s vrijednostima pogreške izraženim standardnom devijacijom. Statistički značajna razlika označena je s * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$).



Slika 11. (a) Imunohistokemijsko bojanje prereza mozga u području moždane regije CA1 u hipokampusu 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana protutijelom anti-CD68 (tirkizna boja) i bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plava boja). (b) Kvantifikacija dobivenih signala programom ImageJ prikazana grafom s vrijednostima pogreške izraženim standardnom devijacijom. Statistički značajna razlika označena je s *** ($p < 0,001$).



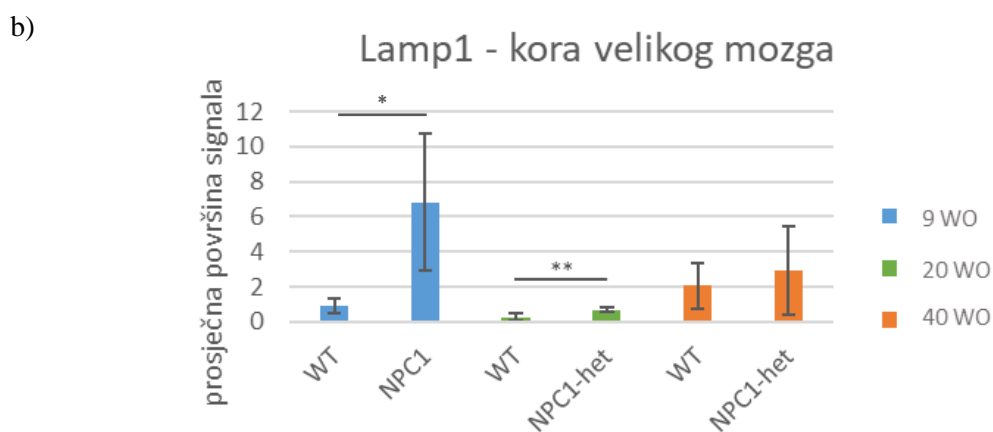
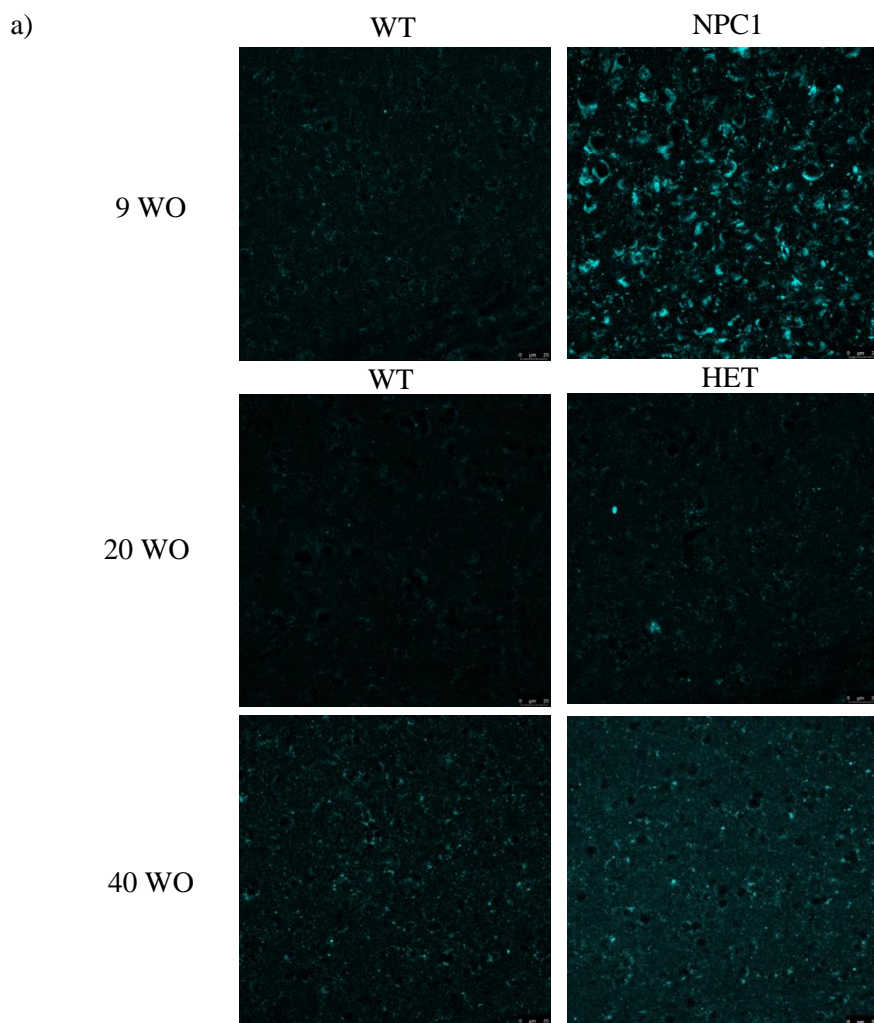
Slika 12. (a) Imunohistokemijsko bojanje prereza mozga u području moždane regije CA3 u hipokampusu 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana protutijelom anti-CD68 (tirkizna boja) i bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plava boja). (b) Kvantifikacija dobivenih signala programom ImageJ prikazana grafom s vrijednostima pogreške izraženim standardnom devijacijom. Statistički značajna razlika označena je s *** ($p < 0,001$).



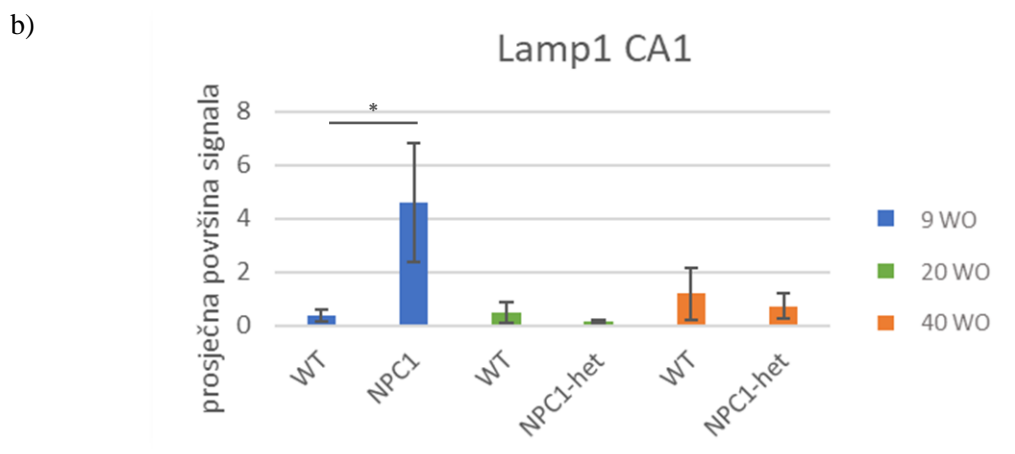
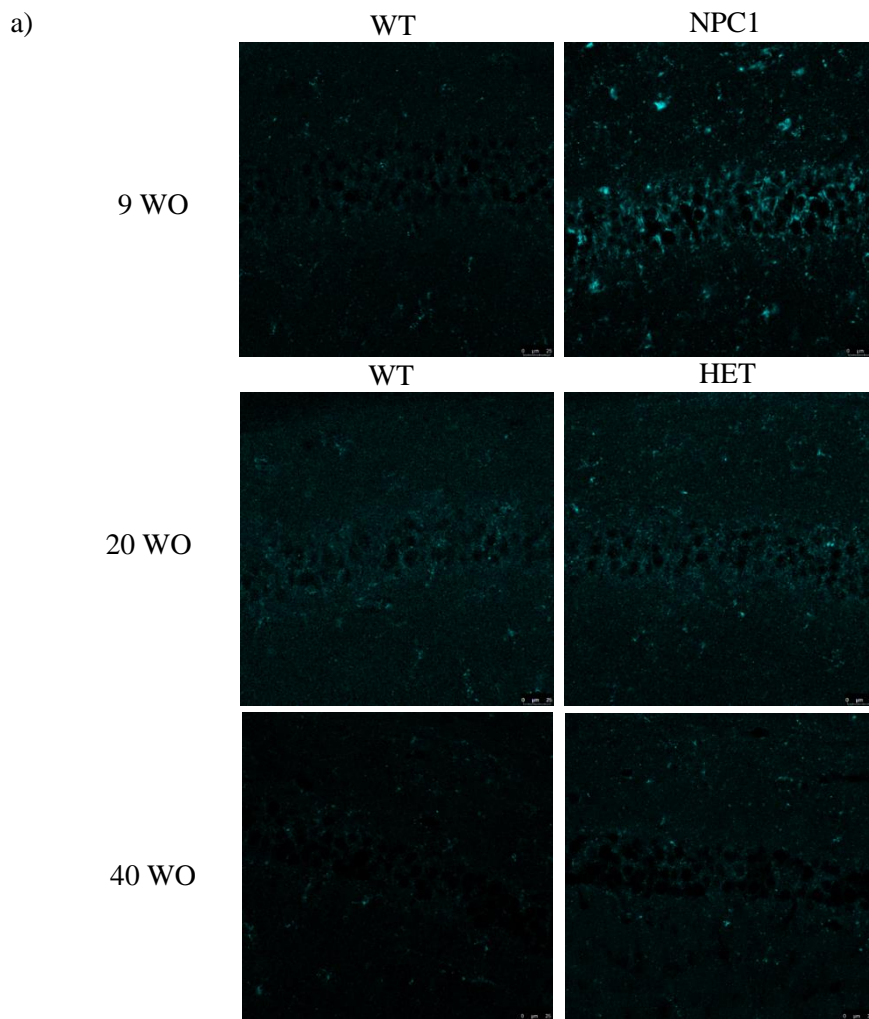
Slika 13. (a) Imunohistokemijsko bojanje prereza prednjeg režnja malog mozga 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana protutijelom anti-CD68 (tirkizna boja) i bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plava boja). (b) Kvantifikacija dobivenih signala programom ImageJ prikazana grafom s vrijednostima pogreške izraženim standardnom devijacijom. Statistički značajna razlika označena je s * ($p < 0,05$).

4.3. Analiza disfunkcije endolizosomskog puta u kori velikog mozga, regijama hipokampusa i u malom mozgu

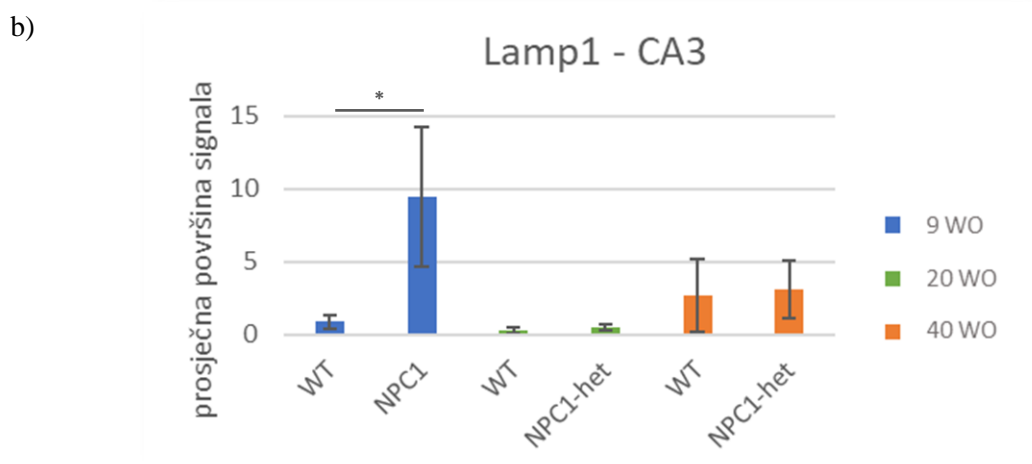
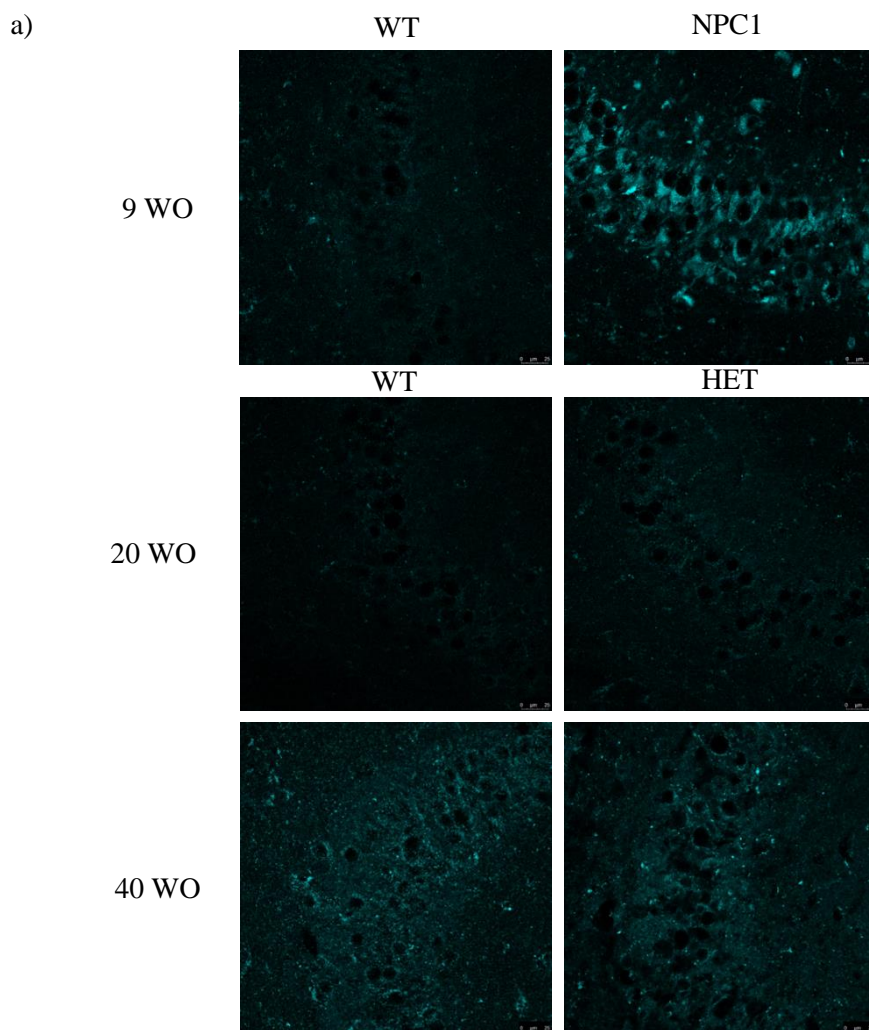
Mutacije gena *NPC1* ili *NPC2* uzrokuju stvaranje disfunkcionalnih istoimenih proteina što onemogućuje transport slobodnog kolesterola iz kasnih endosoma i lizosoma do njegovih krajnjih odredišta unutar stanice. Za posljedicu poremećena funkcija proteina NPC1/NPC2 dovodi do nagomilavanja kolesterola u lizosomima što je i glavna molekularno patološka karakteristika bolesti NPC. Proveo sam imunohistokemijsko bojanje protutijelom Lamp1 (engl. *Lysosome Associated Membrane Protein 1*) koji je biljeg lizosoma (Slike 14-17) te filipinom koji boji slobodni kolesterol (Slike 18-21). Rezultati pokazuju povišen signal bojanja protutijelom anti-Lamp1 u svim ispitanim moždanim regijama 20 tjedana starih miševa, osim CA1 regije hipokampusa, u uzorcima NPC1-het uspoređujući ga s WT pri čemu su povišenja u kori velikog mozga i malom mozgu statistički značajna. Također, u kori velikog mozga i malom mozgu 40 tjedana starih miševa NPC1-het primjećuje se povišen signal u usporedbi s WT, ali on nije statistički značajan (Slike 14b-17b).



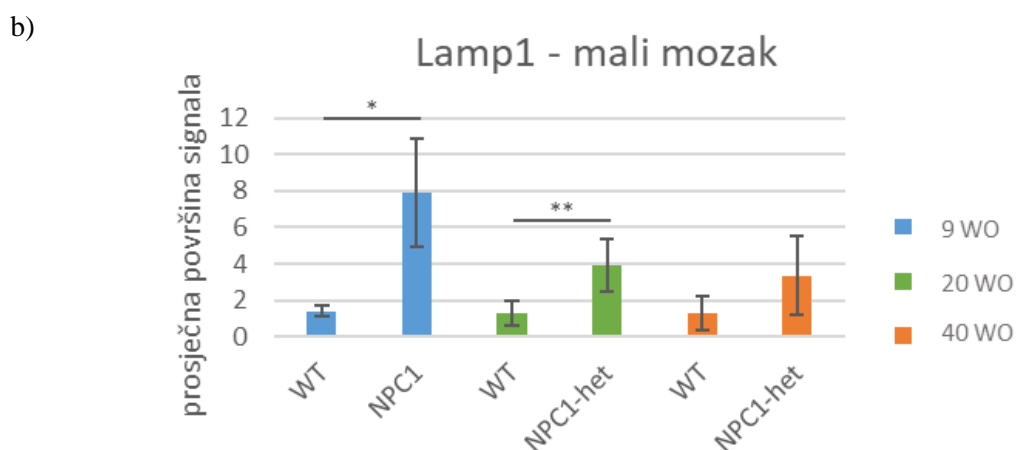
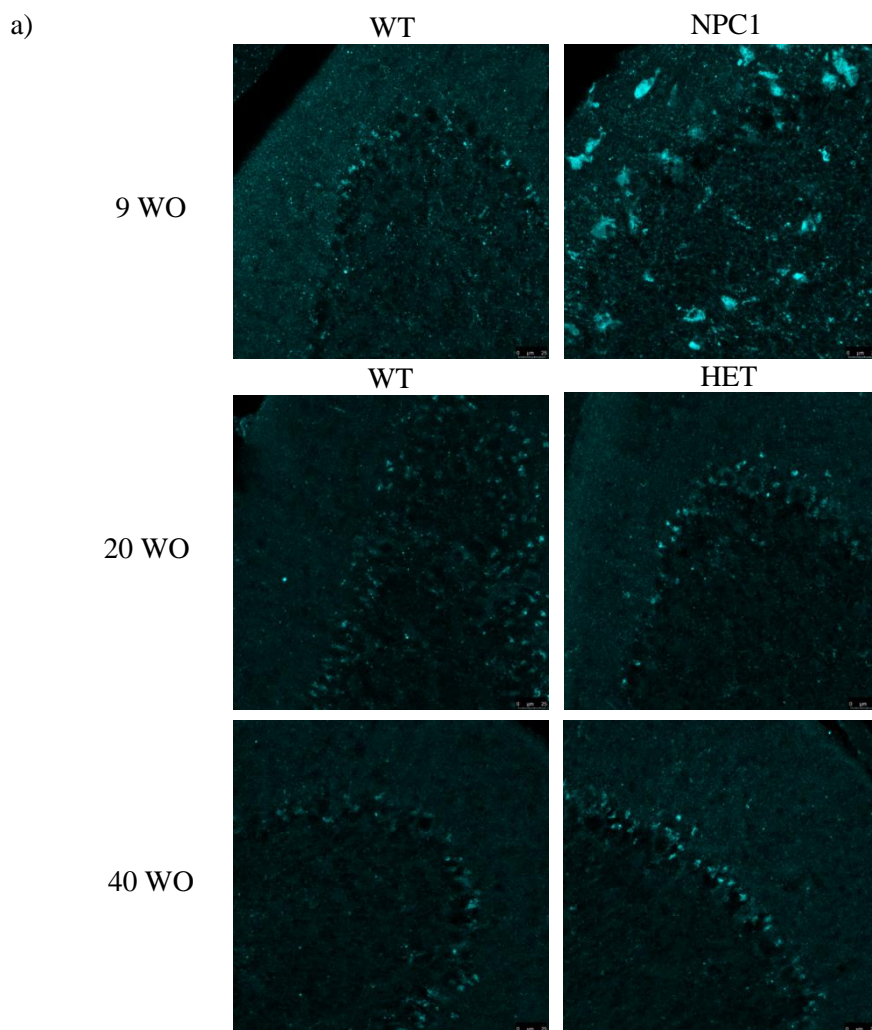
Slika 14. (a) Imunohistokemijsko bojanje prereza mozgovog u području kore velikog mozga 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana protutijelom anti-Lamp1 (tirkizna boja). (b) Kvantifikacija dobivenih signala programom ImageJ prikazana grafom s vrijednostima pogreške izraženim standardnom devijacijom. Statistički značajna razlika označena je s ** ($p < 0,01$).



Slika 15. (a) Imunohistokemijsko bojanje prereza mozga moždane regije CA1 u hipokampusu 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana protutjelom anti-Lamp1 (tirkizna boja). (b) Kvantifikacija dobivenih signala programom ImageJ prikazana grafom s vrijednostima pogreške izraženim standardnom devijacijom. Statistički značajna razlika označena je s * ($p < 0,05$).

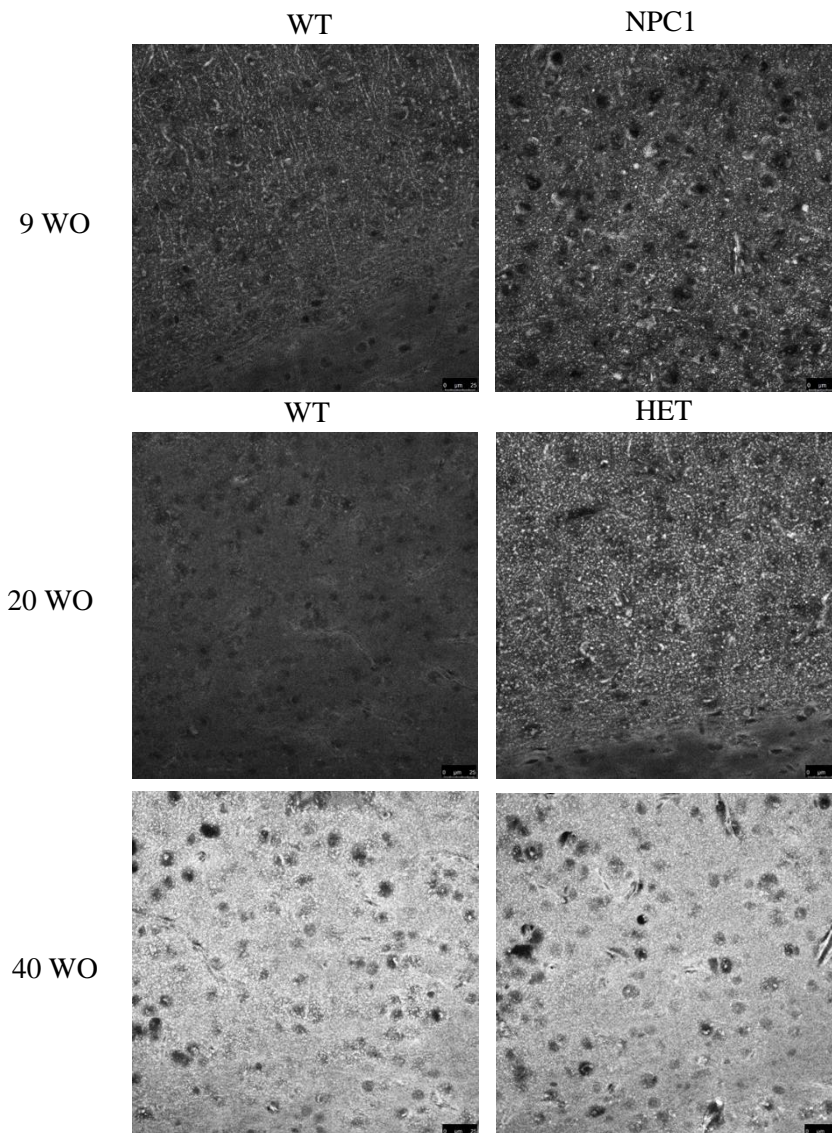


Slika 16. (a) Imunohistokemijsko bojanje prezeza mozgovu u području moždane regije CA3 u hipokampusu 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana protutijelom anti-Lamp1 (tirkizna boja). (b) Kvantifikacija dobivenih signala programom ImageJ prikazana grafom s vrijednostima pogreške izraženim standardnom devijacijom. Statistički značajna razlika označena je s * ($p < 0,05$).

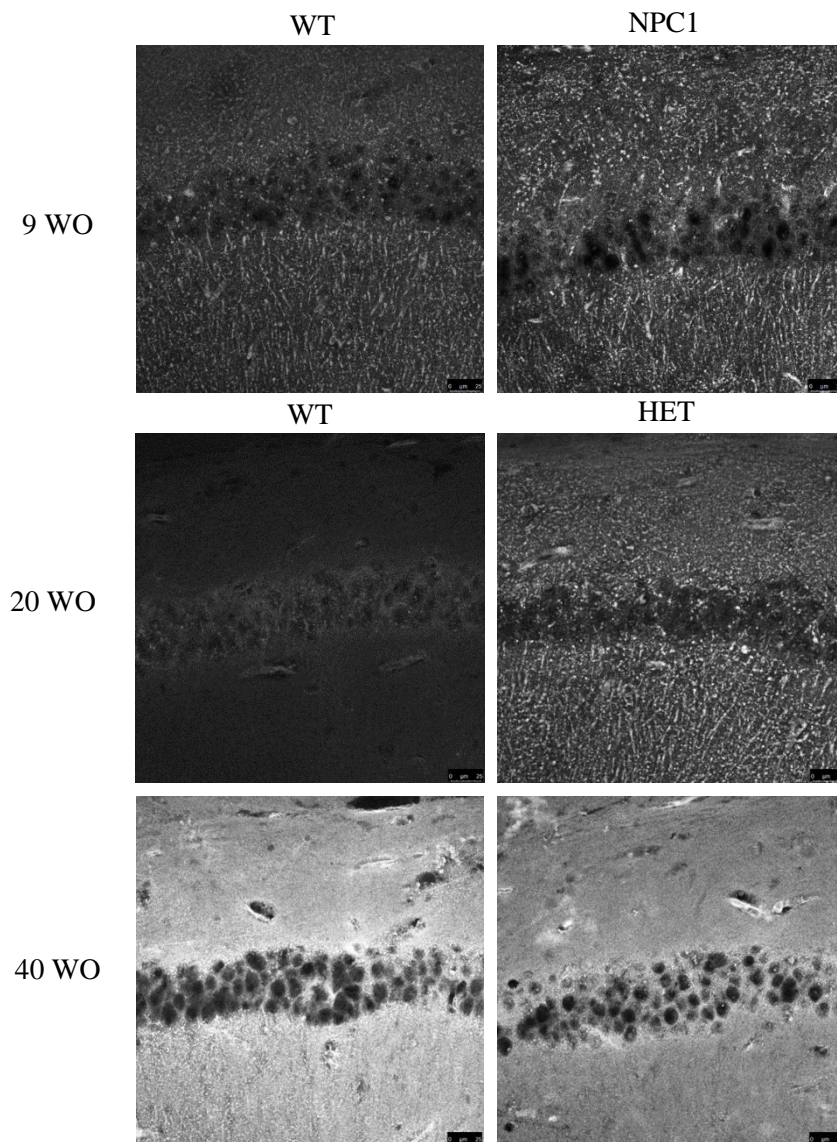


Slika 17. (a) Imunohistokemijsko bojanje prereza prednjeg režnja malih mozgova 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana protutijelom anti-Lamp1 (tirkizna boja). (b) Kvantifikacija dobivenih signala programom ImageJ prikazana grafom s vrijednostima pogreške izraženim standardnom devijacijom. Statistički značajna razlika označena je s * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$).

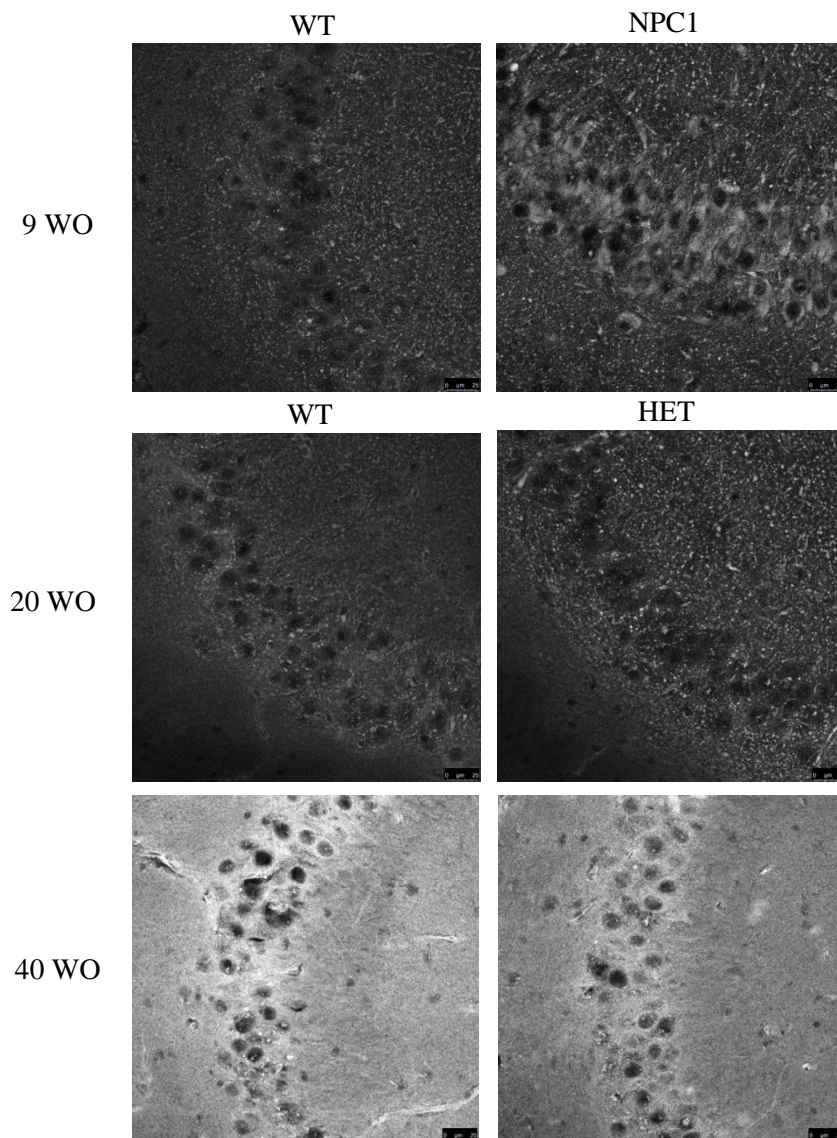
U svrhu analiziranja nakupljanja slobodnog kolesterola u mozgovima miševa NPC1-het i usporedbe s onim u mozgovima divljeg tipa, bojao sam mozgove filipinom. Bojanje filipinom pokazalo je trend nakupljanja slobodnog kolesterola u mozgovima NPC1-het u odnosu na divlji tip u svim ispitanim moždanim regijama 20 tjedana starosti, dok je nakupljanje kolesterola znatno veće u 40 tjedana starih jedinki u usporedbi s 20 tjedana starim jedinkama NPC1-het u odnosu na divljeg tipa što se očituje znatno svijetlijim signalom (Slike 18-21).



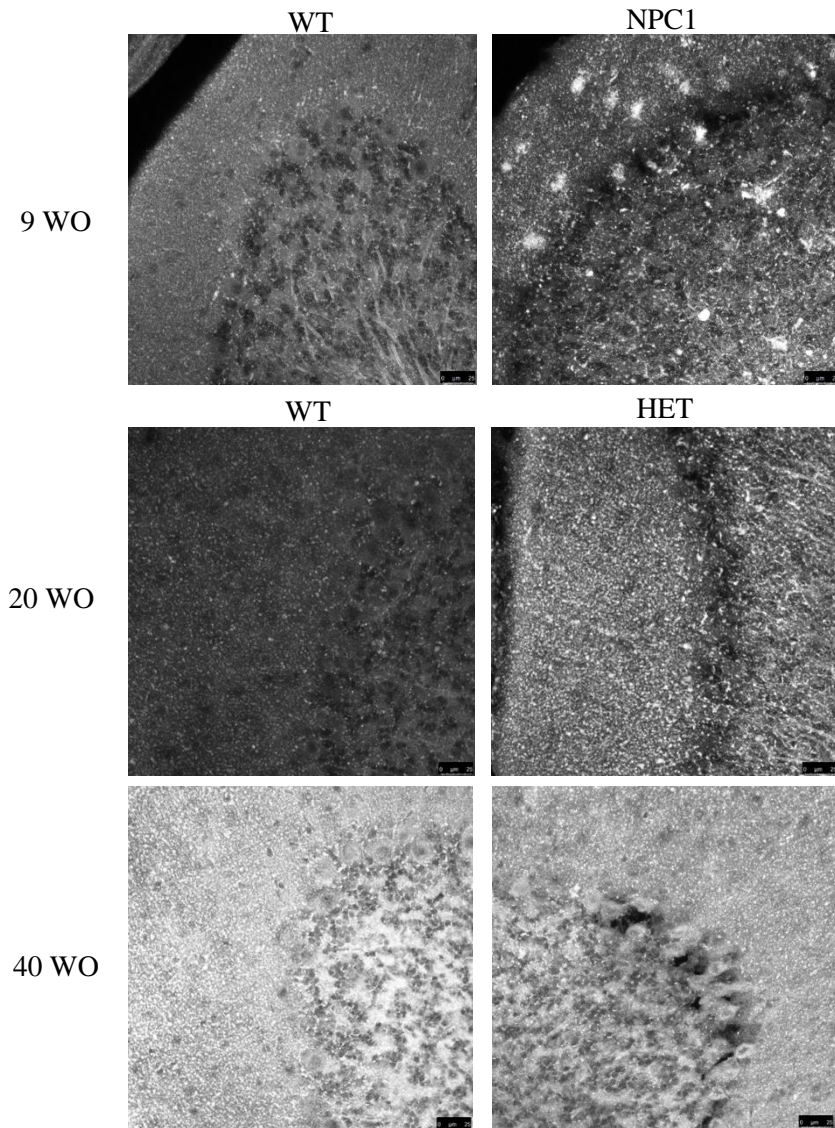
Slika 18. Bojanje prereza mozgovia u području kore velikog mozga 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana filipinom (boji slobodni kolesterol).



Slika 19. Bojanje prereza mozгова u području moždane regije CA1 u hipokampusu 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana filipinom (boji slobodni kolesterol).



Slika 20. Bojanje prereza mozgovu u području moždane regije CA3 u hipokampusu 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana filipinom (boji slobodni kolesterol).



Slika 21. Bojanje prereza prednjeg režnja malih mozgova 9 tjedana starih kontrola WT i NPC1 te miševa WT i NPC1-het starih 20 i 40 tjedana filipinom (boji slobodni kolesterol).

5. RASPRAVA

Bolest NPC je autosomno recesivna rijetka bolest nakupljanja, uzrokovana mutacijama u jednom od dva gena: *NPC1* (čije su mutacije odgovorne za 95% slučajeva) ili *NPC2* (Evans i Hendriksz 2017). Gen *NPC1* kodira veliki transmembranski protein, a gen *NPC2* manji luminalni protein za koje se smatra da imaju sinergističku ulogu u transportu neesterificiranog kolesterola iz kasnih endosoma/lizosoma do njegovih krajnjih odredišta u stanici poput endoplazmatskog retikula ili stanične membrane. Mutacije u ovim genima rezultiraju gubitkom funkcije istoimenih proteina dovodeći do nakupljanja slobodnog neesterificiranog kolesterola i niza sfingolipida u kasnim endosomima i lizosomima. Iako je u NPC bolesti prisutna disfunkcija proteina NPC1/NPC2 u svim stanicama/tkivima, neurodegeneracija i neuroinflamacija predstavljaju najznačajnija patološka obilježja koja dovode do smrtnog ishoda u najvećem broju slučajeva. Zanimljivo je da su se prenositelji bolesti NPC (osobe koje imaju mutaciju u samo jednom alelu gena *NPC1/2*) smatrali zdravima sve do nedavno, dok se nisu primjetile određene neuropsihijatrijske promjene u starijoj životnoj dobi (Schneider i sur. 2019). Naime, nedavna istraživanja provedena na prenositeljima bolesti NPC ukazala su na prisustvo subkliničkih nedostataka koji zauzvrat mogu posredovati u pojavi neuroloških poremećaja (Benussi i sur. 2019). Hipoteza da heterozigotnost mutacije gena *NPC1* može predstavljati rizik pojave neurodegeneracije u kasnijoj životnoj dobi dodatno je podržana visokom stopom pojave neurodegenerativnih bolesti među članovima obitelji pacijenata s bolesti NPC (Schneider i sur. 2019). Do danas je objavljeno samo jedno istraživanje koje je proučavalo neuropatološke karakteristike bolesti NPC u heterozigotnih *NPC1* miševa. To je istraživanje pokazalo karakteristično nakupljanje kolesterola u stanicama te odumiranje Purkinjeovih neurona u malom mozgu u jedinkama heterozigotnih *NPC1* miševa 104 tjedana starosti (Yu i sur. 2005). Zaključci spomenutog istraživanja sugeriraju da do neuropatoloških karakteristika bolesti NPC u heterozigotnih *NPC1* miševa dolazi tek u starijoj životnoj dobi zbog mutacije samo jednog alela gena *NPC1*. Naime, postojanje jednog zdravog alela gena ne može nadomjestiti nedostatak drugog niti se funkcija proteina može obavljati u istom obujmu. Ipak, napredak razvoja bolesti djelomično je usporen pa se i simptomi, odnosno neuropatološke karakteristike pojavljuju tek u starijoj životnoj dobi. Prethodna istraživanja provedena u laboratoriju dr. sc. Katušić Hećimović (Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković – IRB), u kojem sam izradio svoj diplomski rad, ukazala su na postojanje dodatnih neuropatoloških karakteristika bolesti NPC u heterozigotnih *NPC1* miševa starih 100 tjedana (Zovko 2021). Točnije, pokazalo se da bi neuroinflamacija mogla biti glavni „okidač“ za pokretanje daljnje kaskade patoloških procesa u prenositelja bolesti NPC, ali da su neophodna daljnja istraživanja na populacijama mlađih heterozigotnih miševa. Upravo se u tom smjeru nastavio moj diplomski rad te je cilj bio utvrditi najranije neuropatološke promjene u prenositelja bolesti NPC u mlađih heterozigotnih *NPC1* miševa starih 20 i 40 tjedana u mišjem modelu *NPC1^{+/-}* soja BALB/cNctr-Npc1m1N/J. Kako bih ispitao ove ciljeve proveo sam imunohistokemijsku analizu na sagitalnim kriorezovima mišjih mozгова starih 20 i 40 tjedana. Pri tom sam koristio sagitalne kriorezove mozgov

miševa divljeg tipa i skupine NPC1-het. Kao kontrola su mi poslužili sagitalni kriorezovi 9 tjedana starih mozgov divljeg tipa i *NPC1^{-/-}* (*NPC1^{nih}*) miševa. Imunohistokemijskim bojanjem analizirao sam tri glavne neuropatološke karakteristike bolesti NPC: (i) neurodegeneraciju, bojanjem biljezima Purkinjeovih neurona (calbidin) i jezgara zrelih neurona (NeuN), (ii) neuroinflamaciju, bojanjem aktiviranih astrocita i mikroglija te (iii) poremećeni endolizosomski put, bojanjem biljezima lizosoma (Lamp1) i slobodnog kolesterola (Filipin).

Yu i sur. (2005) proveli su imunohistokemijsku analizu u 104 tjedana starim mozgovima miševa NPC1-het kako bi ispitali događa li se u malim mozgovima mišjeg modela prenositelja bolesti NPC propadanje Purkinjeovih neurona, jer je u konačnici progresivna neurodegeneracija glavno patološko obilježje bolesti NPC. Njihovi su rezultati pokazali da je u ispitanim mozgovima zaista smanjen broj Purkinjeovih neurona u skupini NPC1-het uspoređujući je s divljim tipom iste starosti. Imunohistokemijsku analizu proveli su bojanjem uzoraka biljegom Purkinjeovih neurona, calbidinom. U diplomskom radu Zovko (2021), provedeno je slično imunohistokemijsko bojanje u 100 tjedana starim mozgovima NPC1-het. No, za razliku od rezultata Yu i sur. (2005) nije utvrđena neurodegeneracija u malim mozgovima ovih miševa NPC1-het. U mom sam istraživanju proveo imunohistokemijsku analizu mišjih mozgov NPC1-het starih 20 i 40 tjedana i mišjih mozgov divljeg tipa iste starosne dobi pri čemu sam pojavu neurodegeneracije pratio bojanjem protutijelima anti-calbidin i anti-NeuN. Dobiveni rezultati ukazuju da nema progresivne neurodegeneracije Purkinjeovih neurona u malom mozgu, kao ni odumiranja kortikalnih i hipokampalnih neurona u miševa prenositelja bolesti NPC, NPC1-het, starosti 20 i 40 tjedana. Iako sam analizirao sve režnjeve malog mozga, u radu je prikazano samo bojanje prednjeg režnja iz razloga što je za patologiju bolesti NPC karakteristično propadanje Purkinjeovih neurona od prednjih prema stražnjim režnjevima (Martin i sur. 2020).

Analizirajući dobivene rezultate bojanja astrocita biljegom GFAP jasno se može uočiti da odražavaju upalni proces u mozgovima heterozigotnih NPC1 miševa starih 20 tjedana uspoređujući ih sa skupinom divljeg tipa. Aktivacija stanica mikroglije prisutna je kod obje eksperimentalne dobne skupine miševa prenositelja bolesti NPC (20 i 40 tjedana), ali rezultati ne ukazuju na povećanu razinu signala, odnosno pojačanu aktivaciju mikroglije kod skupine NPC1-het u odnosu na divlji tip. Istraživanje Zovko (2021) prvo je istraživanje koje je ispitalo i ukazalo na pojavu neuroinflamacije u heterozigotnih NPC1 miševa, prenositelja bolesti NPC. Rezultati su pokazali da se u 100 tjedana starih miševa NPC1-het može primijetiti pojačan signal GFAP i CD68 proteina kada se uspoređuju s divljim tipom. Cilj mog diplomskog rada bio je ispitati najraniju dob ispoljavanja znakova neuroinflamacije, odnosno aktivacije astrocita i mikroglije u mozgovima prenositelja bolesti NPC, miševa NPC1-het starosti 20 i 40 tjedana. Jedan od razloga uočenog slabijeg signala aktivacije mikroglije mogao bi biti u samom začetku procesa neuroinflamacije kao i u nemogućnosti metode imunohistokemije, koja je kvalitativna metoda, u detektiranju značajnije razlike između skupine NPC1-het i skupine divljeg tipa. Potrebna su daljnja istraživanja neuroinflamacije u heterozigotnih NPC1 miševa u svrhu dobivanja boljeg uvida u status

mikroglije u prenositelja bolesti NPC, primjerice provođenjem kvantitativnih ispitivanja poput Western blot analize. Jedno od mogućih objašnjenja zašto se neuroinflamacija javlja prije neurodegeneracije moglo bi se kriti u funkciji astrocita. Naime, astrociti su poznati po tome što su najmnogobrojnije stanice u mozgu koje podržavaju homeostazu (Gee i Keller 2005), ukazujući na mogućnost da je pojava neuroinflamacije prije neurodegeneracije u patologiji bolesti NPC potreba da se održi homeostaza u mozgu. Uz to, moguće je da i drugi patološki procesi koji se odvijaju u neuronima te su prikazani u ovome radu, kao što su nakupljanje slobodnog kolesterola ili poremećeni endolizosomski put, izazivaju pojavu neuroinflamacije. Sjetimo se da zreli neuroni zadovoljavaju svoje potrebe za kolesterolom uz pomoć astrocita koji mogu lučiti lipoproteine bogate kolesterolom (Arenas i sur. 2017). Još jedna od mogućnosti je i da pojava neuroinflamacije može biti odgovor na početak neurodegeneracije koja još nije vidljiva zbog plastičnosti sinapsi, tj. sposobnosti neurona na prilagodbu na oštećenja neuralnih mreža. Astrociti se aktiviraju na razna patološka stanja pa prolaze kroz morfološke, molekularne i funkcionalne promjene (Staurenghi i sur. 2021). Proces neurodegeneracije, koji su možda tek na svojim začecima, izazivaju astrocite na aktiviranje i poticanje upalnog procesa, a isti taj dalje podržava nastavak neurodegeneracije.

Poremećaj endolizosomskog puta analizirao sam imunohistokemijskim bojanjem lizosoma, koristeći protutijelo na protein Lamp1. U 20 tjedana starih mozgov miševa NPC1-het koje sam analizirao može se vidjeti značajno pojačan signal proteina Lamp1 u odnosu na WT uzorke u u kori velikog mozga i u malom mozgu. U 40 tjedana starih mozgov, iako sam pojačan signal Lamp1 uočio isto u uzorcima kore velikog mozga i u malom mozgu miševa NPC1-het u odnosu na WT, ove razlike nisu bile statistički značajne. Nedavno je istraživanje pokazalo da se visoko glikozilirani oblik proteina Lamp1 može povezati s gubitkom Purkinjeovih neurona jer je takav oblik proteina bio ko-lokaliziran s aktiviranim mikroglijama, sugerirajući moguću ulogu proteina Lamp1 u neuroinflamatornom procesu bolesti NPC (Cawley i sur. 2020). Istraživačka skupina predlaže dva moguća modela uloge proteina Lamp1 u procesu neuroinflamacije; interakcijom i signalnim procesima visoko glikoziliranog oblika proteina Lamp1 na površini stanica mikroglije ili promjenama u procesima glikozilacije proteina Lamp1 u stanicama SŽS-a. U istraživanju se navodi da ovaj visoko glikozilirani oblik proteina Lamp1 nije pronađen u mišjim modelima drugih neurodegenerativnih bolesti, već se samo može povezati s mišjim modelom neurodegeneracije u bolesti NPC. To nam daje mogućnost za daljnje istraživanje bolesti NPC i uloge disfunkcije endolizosomskog puta u neuroinflamaciji.

Kako bih analizirao nakupljanje slobodnog kolesterola u mozgovima miševa NPC1-het i usporedio ih s onim u mozgovima divljeg tipa, bojao sam mozgove filipinom. Bojanje filipinom je standardna metoda za dobivanje uvida u nakupljanje slobodnog kolesterola u stanicama, a koristi se i u dijagnostičke svrhe bolesti NPC (Reid i sur. 2004). Rezultati dobiveni nakon provedenog bojanja sugeriraju da postoji trend nakupljanja kolesterola u skupina NPC1-het u odnosu na divlji tip te da je količina nakupljenog kolesterola veća u starijih jedinki (40 tjedana starih miševa) jer je signal znatno svjetliji kod te skupine

u odnosu na skupinu 20 tjedana starih miševa. Razlozi za to mogu biti u činjenici da se radi o starijim jedinkama, tj. da je potrebno vrijeme (proces starenja) da dođe do nakupljanja kolesterola u prenositelja bolesti NPC te njegove detekcije bojanjem filipinom. Starenje dovodi do poremećaja u metabolizmu kolesterola i samim time njegovog akumuliranja u jetri i mozgu (Nunes i sur. 2022).

U budućim bi se istraživanjima trebala provesti daljnja analiza mozgova još mlađih miševa NPC1-het s obzirom da rezultati mojih istraživanja ukazuju na prisutnost neuroinflamacije, poremećenog endolizosomskog puta i pojave nakupljanja kolesterola u prenositelja bolesti NPC, tj. u miševima NPC1-het starim 20 tjedana. S obzirom da uloga proteina NPC1 još u potpunosti nije razjašnjena, upravo istraživanja na heterozigotnim NPC1 modelima, tj. prenositeljima bolesti NPC mogu dati uvid u procese koji su najosjetljiviji na gubitak jednog alela *NPC1*. Detektirani proces/biljeg može predstavljati kandidata za razvijanje ciljanih kliničkih terapija. Otkrivanje uloge proteina NPC1 bi omogućilo bolje razumijevanje molekularnih mehanizama koji pokreću patološke procese u bolesti NPC te bi pomoglo u borbi protiv ove još uvijek smrtonosne i neizlječive bolesti.

6. ZAKLJUČCI

- Mlađi prenositelji mišjeg modela bolesti NPC, tj. heterozigotni NPC1 miševi stari 20 tjedana pokazuju neuroinflamaciju. Ovaj nalaz ukazuje da je jedna od ključnih značajki bolesti NPC, neuroinflamacija, prisutna i u prenositelja bolesti te da može biti ključna za pojavu neuroloških poremećaja u osoba s mutacijom jednog alela gena *NPCI*. Osim toga, ovaj nalaz ukazuje da bi neuroinflamacija mogla biti najraniji patološki događaj u bolesti NPC, tj. da su stanice glija i njihova funkcija „osjetljive“ na gubitak već jednog alela gena *NPCI*.
- Otkriveni su i poremećaji endolizosomskog puta, tj. povećano bojanje biljega lizosoma Lamp1 i nakupljanje kolesterola u heterozigotnih NPC1 miševa starih 20 i 40 tjedana u svim analiziranim moždanim regijama. Ovaj nalaz ukazuje da je primarna značajka bolesti NPC, nakupljanje kolesterola i disfunkcija lizosoma, prisutna i u prenositelja bolesti te da može biti ključna za pojavu neuroloških poremećaja u osoba s mutacijom jednog alela gena *NPCI*.
- U mlađih heterozigotnih NPC1 miševa starih 20 i 40 tjedana nije detektirana neurodegeneracija u malom mozgu kao ni u kori velikog mozga, dvije glavne moždane regije zahvaćene degeneracijom neurona u bolesti NPC. Ovaj rezultat ukazuje da neuroni u gore spomenutim moždanim regijama mogu kompenzirati gubitak jednog alela gena *NPCI* na način da ne dolazi do njihove smrti.
- U mlađih heterozigotnih NPC1 miševa starih 20 i 40 tjedana nije detektirana neurodegeneracija niti u hipokampusu, moždanoj regiji koja je primarno zahvaćena u Alzheimerovoj bolesti. Ovaj rezultat ukazuje da neuroni hipokampusa mogu kompenzirati gubitak jednog alela gena *NPCI* na način da ne dolazi do njihove smrti.
- Nalaz da se u mišjem modelu prenositelja bolesti NPC javlja neuroinflamacija, a ne i neurodegeneracija ukazuje da bi neuroinflamacija mogla biti začetnik patoloških procesa u bolesti NPC i/ili da su stanice glija, za razliku od stanica neurona, osjetljivije na gubitak funkcije proteina NPC1, ukazujući na važnu ulogu ovog proteina i općenito normalne homeostaze kolesterola za funkcioniranje ove populacije stanica u mozgu.
- Sumarno, rezultati ovog diplomskog rada ukazuju da bi prenositelji bolesti NPC sa starenjem mogli pokazivati određene neuropatološke poremećaje, uključujući neuroinflamaciju, nakupljanje kolesterola i disfunkciju lizosoma. Daljnja istraživanja bi trebala utvrditi poveznicu neuroinflamacije, nakupljanja kolesterola i disfunkcije lizosoma te se usredotočiti na pronalazak najranijeg događaja usljed gubitka jednog alela gena *NPCI* na mišjem modelu bolesti NPC, tj. u heterozigotnih NPC1 miševa kao i u osoba prenositelja bolesti NPC.

7. LITERATURA

Arenas F., Garcia-Ruiz C., Fernandez-Checa J.C. (2017): Intracellular cholesterol trafficking and impact in neurodegeneration. *Front. Mol. Neurosci.* **10**: .

Benussi A., Cotelli M.S., Cosseddu M., Bertasi V., Turla M., Salsano E., Daris 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. *JIMD Rep.* **36**: 19–27.

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 Rep.* **49**: 80–88.

Brady R.O., Kanfer J.N., Mock M.B., Fredrickson D.S. (1966): The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **55**: 366–369.

Bremova-Ertl T., Sztatecsny C., Brendel M., Moser M., Möller B., Clevert D.A., Beck-Wödl S., Kun-Rodrigues C., Bras J., Rominger A., Ninov D., Strupp M., Schneider S.A. (2020): Clinical, ocular motor, and imaging profile of Niemann-Pick type C heterozygosity. *Neurology* **94**: E1702–E1715.

Burns M., Gaynor K., Olm V., Mercken M., LaFrancois J., Wang L., Mathews P.M., Noble W., Matsuoka Y., Duff K. (2003): Presenilin redistribution associated with aberrant cholesterol transport enhances β -amyloid production in vivo. *J. Neurosci.* **23**: 5645–5649.

Burton B. K., Ellis A. G., Orr B., Chatlani S., Yoon K., Shoaff J. R., Gallo D. (2021): Estimating the prevalence of Niemann-Pick disease type C (NPC) in the United States. *Mol. Genet. Metab.* **134**: 182–187.

Calabresi P., Centonze D., Pisani A., Cupini L.M., Bernardi G. (2003): Synaptic plasticity in the ischaemic brain. *Lancet Neurol.* **2**: 622–629.

Cariati I., Masuelli L., Bei R., Tancredi V., Frank C., D’arcangelo G. (2021): Neurodegeneration in niemann–pick type c disease: An updated review on pharmacological and non-pharmacological approaches to counteract brain and cognitive impairment. *Int. J. Mol. Sci.* **22**: .

Carstea E.D., Morris J.A., Coleman K.G., Loftus S.K., Zhang D., Cummings C., Gu J., Rosenfeld M.A., Pavan W.J., Krizman D.B., Nagle J., Polymeropoulos M.H., Sturley S.L., Ioannou Y.A., Higgins M.E., Comly M., Cooney A., Brown A., Kaneski C.R., Blanchette-Mackie E.J., Dwyer N.K., Neufeld E.B.,

Chang T.Y., Liscum L., Strauss J.F. 3rd, Ohno K., Zeigler M., Carmi R., Sokol J., Markie D., O'Neill R.R., van Diggelen O.P., Elleder M., Patterson M.C., Brady R.O., Vanier M.T., Pentchev P.G., Tagle D.A.. (1997): Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science*. 277(5323): 228-31.

Cataldo A.M., Barnett J.L., Pieroni C., Nixon R.A. (1997): Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: Neuropathologic evidence for a mechanism of increased β -amyloidogenesis. *J. Neurosci*. **17**: 6142–6151.

Cawley N.X., Sojka C., Cougnoux A., Lyons A.T., Nicoli E.R., Wassif C.A., Porter F.D. (2020): Abnormal LAMP1 glycosylation may play a role in Niemann-Pick disease, type C pathology. *PLoS One* **15**: 1–19.

Cologna S.M., Cluzeau C.V.M., Yanjanin N.M., Blank P.S., 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. *J. Inherit. Metab. Dis*. **37**: 83–92.

Colombo A., Dinkel L., Müller S.A., Sebastian Monasor L., Schifferer M., Cantuti-Castelvetri L., König J., Vidatic L., Bremova-Ertl T., Lieberman A.P., Hecimovic S., Simons M., Lichtenthaler S.F., Strupp M., Schneider S.A., Tahirovic S. (2021): Loss of NPC1 enhances phagocytic uptake and impairs lipid trafficking in microglia. *Nat. Commun*. **12**: 1–20.

Crocker A.C. (1961): the Cerebral Defect in Tay-Sachs Disease and Niemann-Pick Disease. *J. Neurochem*. **7**: 69–80.

Davidson C.D., Walkley S.U. (2010): Niemann-Pick Type C Disease—Pathophysiology and Future Perspectives for Treatment. *US Neurol*. **06**: 88.

Egawa J., Pearn M.L., Lemkuil B.P., Patel P.M., Head B.P. (2016): Membrane lipid rafts and neurobiology: age-related changes in membrane lipids and loss of neuronal function. *J. Physiol*. **594**: 4565–4579.

Evans W.R.H., Hendriksz C.J. (2017): Niemann-Pick type C disease – the tip of the iceberg? A review of neuropsychiatric presentation, diagnosis and treatment. *BJPsych Bull*. **41**: 109–114.

Gee J.R., Keller J.N. (2005): Astrocytes: Regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. **37**: 1145–1150.

German D.C., Liang C.L., Song T., Yazdani U., Xie C., Dietschy J.M. (2002): Neurodegeneration in the Niemann-Pick C mouse: Glial involvement. *Neuroscience* **109**: 437–450.

Ioannou Y.A. (2005): Guilty until proven innocent: The case of NPC1 and cholesterol. *Trends Biochem. Sci.* **30**: 498–505.

Ko D.C., Gordon M.D., Jin J.Y., Scott M.P. (2001): Dynamic movements of organelles containing Niemann-Pick C1 protein: NPC1 involvement in late endocytic events. *Mol. Biol. Cell* **12**: 601–614.

Liu E.A., Mori E., Hamasaki F., Lieberman A.P. (2021): TDP-43 proteinopathy occurs independently of autophagic substrate accumulation and underlies nuclear defects in Niemann-Pick C disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **47**: 1019–1032.

Loftus S.K., Morris J.A., Carstea E.D., Gu J.Z., Brown A., Ellison J., Ohno K., Rosenfeld M.A., Danilo A., Pentchev P.G., Pavan W.J., Loftus S.K., Morris J.A., Carstea E.D., Gu J.Z., Cummings C., Brown A., Ellison J., Ohno K., Rosenfeld M.A., Tagle D.A., Pentchev P.G., Pavan W.J. (1997): Murine Model of Niemann-Pick C Disease : Mutation in a Cholesterol Homeostasis Gene Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2893573> digitize , preserve and extend access to Science Murine. **277**: 232–235.

Luo J., Jiang L., Yang H., Song B.L. (2017): Routes and mechanisms of post-endosomal cholesterol trafficking: A story that never ends. *Traffic.* **18**: 209-217.

Malnar M., Kosicek M., Mitterreiter S., Omerbasic D., Lichtenthaler S.F., Goate A., Hecimovic S. (2010): Niemann-Pick type C cells show cholesterol dependent decrease of APP expression at the cell surface and its increased processing through the β -secretase pathway. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1802**: 682–691.

Marín-Teva J.L., Cuadros M.A., Martín-Oliva D., Navascués J. (2012): Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biol.* **7**: 25–40.

Martin K.B., Williams I.M., Cluzeau C. V., Cougnoux A., Dale R.K., Iben J.R., Cawley N.X., Wassif C.A., Porter F.D. (2020): Identification of novel pathways associated with patterned cerebellar purkinje neuron degeneration in niemann-pick disease, type C1. *Int. J. Mol. Sci.* **21**: .

Nadjar Y., Vanier M.T. (2018): Niemann-pick disease type c. *Neurometab. Hered. Dis. Adults* 121–146doi:10.1007/978-3-319-76148-0_6.

Nixon R.A. (2004): Niemann-Pick Type C Disease and Alzheimer's Disease: The APP-Endosome Connection Fattens Up. *Am. J. Pathol.* **164**: 757–761.

Nunes V.S., Ferreira S., Carlos E., Quintão R., Paulo S. (2022): 549 Aging. **14**: 1549–1561.

Patterson M.C., Hendriksz C.J., Walterfang M., Sedel F., Vanier M.T., Wijburg F. (2012): Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: An update. *Mol. Genet. Metab.* **106**: 330–344.

Praggastis M., Tortelli B., Zhang J., Fujiwara H., Sidhu R., Chacko A., Chen Z., Chung C., Lieberman A.P., Sikora J., Davidson C., Walkley S.U., Pipalia N.H., Maxfield F.R., Schaffer J.E., Ory D.S. (2015): A murine Niemann-Pick C1 I1061T knock-In model recapitulates the pathological features of the most prevalent human disease allele. *J. Neurosci.* **35**: 8091–8106.

Pressey S.N.R., Smith D.A., 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. *Neurobiol. Dis.* **45**: 1086–1100.

Reid P.C., Sakashita N., Sugii S., Ohno-Iwashita Y., Shimada Y., Hickey W.F., Chang T.Y. (2004): A novel cholesterol stain reveals early neuronal cholesterol accumulation in the Niemann-Pick type C1 mouse brain. *J. Lipid Res.* **45**: 582–591.

Schneider S.A., Tahirovic S., Hardy J., Strupp M., Bremova-Ertl T. (2021): Do heterozygous mutations of Niemann–Pick type C predispose to late-onset neurodegeneration: a review of the literature. *J. Neurol.* **268**: 2055–2064.

Segatto M., Leboffe L., Trapani L., Pallottini V. (2014): Cholesterol homeostasis failure in the brain: implications for synaptic dysfunction and cognitive decline. *Curr. Med. Chem.* **21**: 2788–2802.

Sidransky E., Samaddar T., Tayebi N., Nichols W. C., Pankratz N., Foroud T. (2009): Mutations in GBA are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology.* **73**: 1424-1426.

Spiegel R., Raas-Rothschild A., Reish O., Regev M., Meiner V., Bargal R., Sury V., Meir K., Nadjari M., Hermann G., Iancu T.C., Shalev S.A., Zeigler M. (2009): The clinical spectrum of fetal Niemann-Pick type C. *Am. J. Med. Genet. Part A* **149**: 446–450.

Staurengi E., Giannelli S., Testa G., Sottero B., Leonarduzzi G., Gamba P. (2021): Cholesterol dysmetabolism in alzheimer’s disease: A starring role for astrocytes? *Antioxidants* **10**: .

Thameem Dheen S., Kaur C., Ling E.-A. (2007): Microglial Activation and its Implications in the Brain Diseases. *Curr. Med. Chem.* **14**: 1189–1197.

Walterfang M., Biase M.A. Di, Cropley V.L., Scott A.M., O’Keefe G., Velakoulis D., Pathmaraj K.,

Ackermann U., Pantelis C. (2020): Imaging of neuroinflammation in adult Niemann-Pick type C disease: A cross-sectional study. *Neurology* **94**: E1716–E1725.

Wraith J.E., Baumgartner M.R., Bembi B., Covanis A., Levade T., Mengel E., Pineda M., Sedel F., Topçu M., Vanier M.T., Widner H., Wijburg F.A., Patterson M.C. (2009): Recommendations on the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C. *Mol. Genet. Metab.* **98**: 152–165.

Yamazaki T., Chang T.Y., Haass C., Ihara Y. (2001): Accumulation and Aggregation of Amyloid β -Protein in Late Endosomes of Niemann-Pick Type C Cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 4454–4460.

Yanjanin N.M., Vélez J.I., Gropman A., King K., Bianconi S.E., Conley S.K., Brewer C.C., Solomon B., Pavan W.J., Arcos-Burgos M., Patterson M.C., Porter F.D. (2010): Linear clinical progression, independent of age of onset, in Niemann-Pick disease, type C. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **153**: 132–140.

Yu T., Lieberman A.P. (2013): Npc1 Acting in Neurons and Glia Is Essential for the Formation and Maintenance of CNS Myelin. *PLoS Genet.* **9**: .

Yu W., Ko M., Yanagisawa K., Michikawa M. (2005): Neurodegeneration in heterozygous Niemann-Pick type C1 (NPC1) mouse: Implication of heterozygous NPC1 mutations being a risk for tauopathy. *J. Biol. Chem.* **280**: 27296–27302.

Zhang M., Dwyer N.K., Love D.C., Cooney A., Comly M., Neufeld E., Pentchev P.G., Blanchette-Mackie E.J., Hanover J.A. (2001): Cessation of rapid late endosomal tubulovesicular trafficking in niemann-pick type c1 disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 4466–4471.

Zovko A. (2021): Patološke značajke u mozgu miševa nositelja bolesti Niemann-Pick tipa C. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.

8. ŽIVOTOPIS

Lovro Martinović rođen je 11. listopada 1998. godine u Dubrovniku. Nakon završene Osnovne škole Marina Getaldića i Opće gimnazije Dubrovnik napušta rodni grad te nastavlja školovanje na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, na odjelu za biologiju. Godine 2020. stječe titulu prvostupnika biologije (univ. bacc. biol.) i odlazi u Zagreb s ciljem nastavljanja školovanja na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na kojem upisuje diplomski smjer molekularne biologije. Tijekom studiranja u Zagrebu, odlazi na Erasmus+ studentsku razmjenu na Sveučilište Vic u Španjolskoj, gdje provodi semestar svoj diplomskog studija. Povratkom u Zagreb započinje izradu svog diplomskog rada u Laboratoriju za istraživanje neurodegenerativnih bolesti Instituta Ruđer Bošković, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Silve Katušić Hećimović.