

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Antonia Oršulić

Ekspresija proteina neuroplastina i kalcijske ATP-
aze stanične membrane u mišjem modelu
neurodegeneracije

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu neurobiologiju i neurokemiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga i Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr.sc Katarine Ilić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

Zahvale:

Najveća hvala dr.sc.Katarini Ilić što mi je pružila priliku da ovaj diplomski rad izradim pod njezinim stručnim vodstvom. Hvala na svim udijeljenim savjetima, na svakoj potpori i jednostavno predivnom iskustvu. Hvala što ste tijekom ovog procesa napravili ugodnu, pozitivnu i motivirajuću atmosferu u kojoj greške nisu nešto loše već samo proces učenja. Cijenim sve što ste napravili za mene, što ste me naučili, a ponajviše hvala što ste najbolji uzor i inspiracija koju sam mogla dobiti.

Zahvaljujem se i prof. dr. sc. Svjetlani Kalanj Bognar i doc. dr. sc. Kristini Mlinac Jerković što su me primile u Laboratorij za molekularnu neurobiologiju i neurokemiju i otvorile mi vrata novih mogućnosti i učenja. Veliko hvala i doktorantima Mariju i Borni koji su izradu ovog diplomskog učinili zanimljivim i ugodnim.

Posebna hvala prof. dr. sc. Dubravki Hranilović koja je kao suvoditelj ovoga diplomskoga rada pripomogla u njegovoj realizaciji.

Hvala roditeljima i bratu na bezuvjetnoj potpori, motivaciji i razumijevanju. Svaki izazov u životu s vama je lakši.

Hvala svim kolegama, prijateljima i cimericama na svim udijeljenim utjehama i podrškama.

Hvala vam što ste sve trenutke ovog puta od suza do smijeha učinili lakšim, podnošljivim i nezaboravnim.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Ekspresija proteina neuroplastina i kalcijske pumpe stanične membrane u mišjem modelu neurodegeneracije

Antonia Oršulić

Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb Hrvatska

Neuroplastini imaju ulogu u rastu neurita, modulaciji dugoročne sinaptičke plastičnosti, ekscitaciji neurona te regulaciji kalcijske ATP-aze stanične membrane PMCA (od engl. *Plasma membrane calcium ATP-ase*) i posljedično razine unutarstaničnog kalcija. Promjena ekspresije neuroplastina i s njim povezane PMCA, dovode do poremećene stanične signalizacije ovisne o kalciju čime se narušava razvoj mreže neurona, smanjuje se oslobađanje neurotransmitera i nemogućnosti održavanja molekularnih mehanizama odgovornih za učenje i pamćenje što može biti podloga neurodegenerativnih promjena u Alzheimerovoj bolesti. U ovom diplomskom radu istraženo je dolazi li do promjene ekspresije neuroplastina i PMCA u neurodegeneraciji u različitim regijama mozga u dvije starosne skupine miševa. Na tkivu mozgova miševa divljeg tipa i 5xFAD, modela za obiteljsku Alzheimerovu bolest, imunohistokemijski je određena lokalizacija i analizirana ekspresija oba proteina u tri moždane regije: hipokampusu, malome mozgu i moždanoj kori, te je kvantificirana razlika u ekspresiji. Preklapanjem imunofluorescentnih signala pokazana je kolokalizacija neuroplastina i PMCA u svim regijama mozga što upućuje na povezanost neuroplastina s ekspresijom i membranskim pozicioniranjem PMCA. Ekspresija neuroplastina i PMCA u modelu 5xFAD je manji u kori velikog mozga i hipokampusu u odnosu na divlji tip što može biti molekularna osnova za poremećaj procesa pamćenja.

(44 stranica, 12 slike, 5 tablica, 101 literaturni navod, hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: neuroplastin, PMCA, 5xFAD, neurodegeneracija

Voditelj: dr.sc. Katarina Ilić

Suvoditelj: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović,

Ocjenjivači:

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

Expression of protein neuroplastin and plasma membrane calcium ATP-ase in a mouse model of neurodegeneration

Antonia Oršulić

Roosveltovej trg 6, 10000 Zagreb Croatia

Neuroplastins play a role in neurite outgrowth, modulation of long-term synaptic plasticity, neuronal excitation, regulation of plasma membrane calcium ATPase (PMCA) and consequently intracellular calcium levels. Alterations in neuroplastin and PMCA expression lead to impaired calcium-dependent cellular signaling and consequently to impaired neuronal network development, decreased neurotransmitter release, and the inability to sustain the molecular mechanisms responsible for learning and memory which could underlie the neurodegenerative mechanisms of Alzheimer's disease. In this work, we investigated whether there is a change in neuroplastin and PMCA expression in neurodegeneration in different brain regions and two age groups of mice. In brain tissue from wild-type mice and 5xFAD, a model for familial Alzheimer's disease, immunohistochemistry was used to determine the localization and expression of both proteins in three brain regions: hippocampus, cerebellum and cerebral cortex, and the difference in expression was quantified. The overlap of immunofluorescence signals showed the colocalization of neuroplastin and PMCA in all brain regions, indicating the association of neuroplastin with the expression and membrane positioning of PMCA. The expression of neuroplastin and PMCA in the 5xFAD model is lower in the cerebral cortex and hippocampus compared to wild type, which may be the molecular basis for the disruption of the memory process.

(44 pages, 12 figures, 5 tables, 101 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: Neuroplastin, PMCA, 5xFAD, neurodegeneration

Supervisor: Dr. Katarina Ilić

Cosupervisor: Dr. Dubravka Hranilović, *Assøe.* Prof.

Reviewers:

Thesis accepted:

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1 Neuroplastin.....	1
1.1.1 Struktura neuroplastina	1
1.1.2 Ekspresija i lokalizacija neuroplastina	2
1.1.3 Uloge neuroplastina	3
1.1.4 Neuroplastin u neurološkim poremećajima	5
1.2 Kalcijaska ATP-aza stanične membrane	7
1.2.1 Struktura kalcijaska ATP-aze stanične membrane	7
1.2.2 Ekspresija i lokalizacija kalcijaska ATP-aze stanične membrane	9
1.2.3 Uloga kalcijaska ATP-aze stanične membrane.....	10
1.2.4 Poveznica između neuroplastina i kalcijaska ATP-aze stanične membrane.....	12
1.3 Neurodegeneracija	13
1.3.1 Alzheimerova bolest	13
2. Cilj	16
2.1 Opći cilj.....	16
2.2 Specifični ciljevi	16
3. Materijali i metode.....	17
3.1 Materijali.....	17
3.1.1 Uzorci.....	17
3.1.2 Kemikalije i materijal.....	18
3.2 Metode	19
3.2.1 Imunohistokemijsko bojenje rezova mišjeg mozga	19
3.2.2 Imunofluorescentno bojenje rezova mišjeg mozga.....	20
3.2.3 Vizualizacija, analiza i obrada imunohistokemijske reaktivnosti	20
3.2.4 Vizualizacija, analiza i obrada imunofluorescentne reaktivnosti.....	20
3.2.5 Statistička analiza.....	20
4. Rezultati	21
4.1 Ekspresija neuroplastina i plazmamembranske kalcijaska ATP-aze u mozgu miša divljeg tipa i modela za Alzheimerovu bolest.....	21
4.2 Analiza ekspresije neuroplastina i plazma membranske kalcijaska ATP-aze kod miševa divljeg tipa i modela za Alzheimerovu bolest imunofluorescentnim bojenjem.....	24

4.3 Analiza kolokalizacije neuroplastina i plazma membranske kalcijske ATP-aze u mozgu miša divljeg tipa i mišjeg modela za Alzheimerovu bolest	30
5. Rasprava.....	31
6. Zaključci	34
7. Literatura.....	35
8. Životopis	44

Popis kratica

5xFAD	oznaka za životinje s 5 genetičkih mutacija koje su pronađene u obiteljskom obliku Alzheimerove bolesti, od engl. <i>Familial Alzheimer's disease</i>
AD	Alzheimerova bolest, od engl. <i>Alzheimer's disease</i>
AICD	APP intracelularna domena vezana za membranu, od engl. <i>APP intracellular domain</i>
ALS	amiotrofična lateralna skleroza, od engl. <i>Amyotrophic lateral sclerosis</i>
AMPA	receptor za glutamat, od engl. <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
APOE	apolipoprotein E
APP	prekursorski protein amiloida, od engl. <i>Amyloid precursor protein</i>
A β	amiloid β
BSA	albumin iz goveđeg seruma, od engl. <i>Bovine serum albumin</i>
CA1	polje 1 Amonovog roga hipokampusa, od lat. <i>Cornu Ammonis 1</i>
CA3	polje 3 Amonovog roga hipokampusa, od lat. <i>Cornu Ammonis 3</i>
CAM	molekula stanične adhezije, od engl. <i>Cell adhesion molecule</i>
DAB	diaminobenzidin, od engl. <i>Diaminobenzidine</i>
DAPI	boja za jezgre stanica, od engl. <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DG	nazubljeni girus hipokampusa, od engl. <i>Dentate gyrus</i>
DT	divlji tip miša
ERK1/2	ekstracelularna signalom-regulirana kinaza 1/2, od engl. <i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
FAD	obiteljski oblik Alzheimerove bolesti, od engl. <i>Familial Alzheimer's disease</i>
FGF	fibroblastni faktor rasta 2 FGF 2, od engl. <i>Fibroblast growth factor 2</i>
FGFR1	receptor za fibroblastni faktor rasta 1, od engl. <i>Fibroblast growth factor receptor</i>
FRET	fluorescentno rezonantni transfer energije, od engl. <i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
GABA _A	receptor γ -aminobutirične kiseline A, od engl. <i>γ-aminobutyric acid type A receptor</i>
GluR1	podjedinica glutamatnog receptora
Ig	imunoglobulin
IHC	imunohistokemija, od engl. <i>Immunohistochemistry</i>
LBD	demencija Lewyjevih tjelešaca, od engl. <i>Lewy body dementia</i>
LTD	dugoročna sinaptička depresija, od engl. <i>Long-term depression</i>
LTP	dugoročna sinaptička promjena, od engl. <i>Long-term potentiation</i>

MCT2	monokarboksilatni transporter 2, od engl. <i>Monocarboxylate transporter 2</i>
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ izmjenjivač, od engl. <i>Sodium-calcium (Na⁺/Ca²⁺) exchanger</i>
NFT	neurofibrilarni snopići, od engl. <i>Neurofibrillary tangles</i>
NGF	faktor rasta živaca, od engl. <i>Nerve growth factor</i>
NMDA	receptor za glutamat, od engl. <i>N-Methyl-D-aspartic acid</i>
Np55	neuroplastin 55
Np65	neuroplastin 65
p38MAPK	mitogenom-aktivirana protein kinaza p38, od engl. <i>Mitogen-activated protein kinase p38</i>
PBS	fosfatni pufer, od engl. <i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	fosfatni pufer s dodatkom detergenta Tweena, od engl. <i>Phosphate buffered saline-Tween</i>
PD	Parkinsonova bolest, od engl. <i>Parkinson's disease</i>
PMCA	kalcijaska ATPaza stanične membrane, od engl. <i>Plasma membrane calcium ATPase</i>
PPI	deficit u shizofreniji; oštećenje prepulsne inhibicije, od engl. <i>Prepulse inhibition</i>
PSD	područje postsinaptičke gustoće, od engl. <i>Postsynaptic density</i>
PSD95	biomarker postsinapse; protein 95 postsinaptičke gustoće, od engl. <i>Postsynaptic density protein 95</i>
PSEN1	presenilin 1, dio kompleksa β-sekretaze
PSEN2	presenilin 2, dio kompleksa β-sekretaze
PVDF	polivinilidenfluorid, od engl. <i>Polyvinylidene fluoride</i>
ROS	reaktivne kisikove jedinice, od engl. <i>Reactive oxygen species</i>
sAPPβ	topljivi amiloidni prekursorski protein β, od engl. <i>Soluble amyloid precursor protein β</i>
SD	standardna devijacija, od engl. <i>Standard deviation</i>
SDS	natrijev dodecil – sulfat, od engl. <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SERCA	kalcijaska ATP-aza sarkoendoplazmatskog retikuluma, od engl. <i>Sarcoendoplasmic reticulum calcium transport ATP-ase</i>
SNP	polimorfizam jednog nukleotida, od engl. <i>Single-nucleotide polymorphism</i>
TRAF6	faktor 6 povezan s receptorom faktora tumorske nekroze od, engl. <i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6</i>

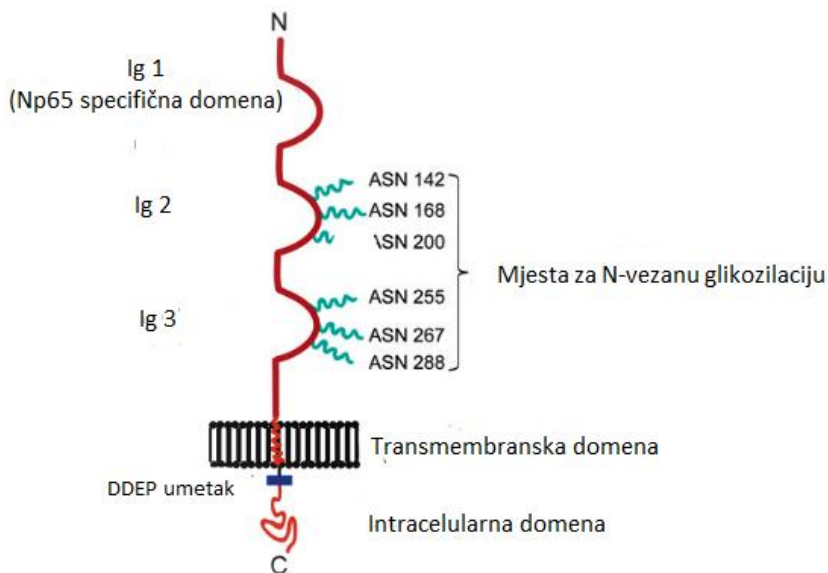
1. Uvod

1.1 Neuroplastin

Neuroplastin je transmembranski glikoprotein koji pripada imunoglobulinskoj superporodici molekula stanične adhezije (CAM, od engl. *Cell adhesion molecule*) te s proteinima bazigin i embigin čini porodicu proteina CD147 (Owczarek i Berezin, 2012). Molekule stanične adhezije, osim što posreduju u izvanstaničnim i unutarstaničnim događajima stanice, imaju esencijalnu ulogu u stvaranju i održavanju funkcionalnih mreža neurona te sudjeluju u moduliranju i plastičnosti sinapsi (Smalla i sur., 2000).

1.1.1 Struktura neuroplastina

Alternativnim prekrajanjem gena *NPTN* nastaju dvije izoforme: Np55 i Np65. Primarna struktura izoformi je vrlo slična, a razlikuju se po broju imunoglobulinskih domena Ig (od engl. *Immunoglobulin*). Np55 sadrži dvije, a Np65 tri Ig domene. Osim ekstracelularnih Ig domena, neuroplastin još sadrži transmembransku i kratku, hidrofobnu intracelularnu domenu. Kao i drugi proteini iz porodice CD147, neuroplastin u transmembranskoj domeni sadrži nabijeni glutamatni ostatak koji posreduje *cis* interakcije s drugim membranskim proteinima, npr. monokarboksilatnim transporterima (Muramatsu i sur., 2003).



Slika 1. Shematski prikaz strukture neuroplastina. Neuroplastini se sastoje od: 2 ili 3 imunoglobulinske (Ig) domene na kojima se nalazi 6 asparaginskih (Asn) ostataka za N-vezanu glikozilaciju te transmembranske i intracelularne domene. Ig1 domena je specifična za Np65, a Ig2 i 3 za obje izoforme. Preuzeto iz Beesley i sur., 2013.

Nadalje, neuroplastin sadrži šest asparaginskih (Asn) ostataka na domenama Ig2 i Ig3 (Slika 1). To su potencijalna mjesta za N-vezanu glikozilaciju. Ovisno o broju glikoziliranih Asn ostataka nastaju različite glikoforme neuroplastina koje se razlikuju u molekularnoj masi. Postoji značajna razlika između glikoformi Np55 u različitim tkivima što potvrđuje tkivno-specifičnu ulogu ugljikohidratnih motiva u funkciji neuroplastina (Langnaese i sur., 1997). Osim što sadrži velik broj oligosaharidnih jedinica, neuroplastin je bogat i sijalinskom kiselinom. Korištenjem specifičnih protutijela je pokazano da Np65 sadrži i glikan fukoza- $\alpha(1-2)$ -galaktozu. Fukozilacija na $\alpha(1-2)$ mjestu terminalnih galaktoznih ostataka glikoproteina u mozgu je važna za plastičnost neurona, dugoročnu staničnu promjenu (LTP, od engl., *Long-term potentiation*) i stvaranje dugoročnog pamćenja (Smalla i sur., 1998).

1.1.2 Ekspresija i lokalizacija neuroplastina

Značajne razlike između izoformi neuroplastina se očituju u njihovoj ulozi i lokalizaciji. Np55 i Np65 pokazuju različite obrasce tkivne, stanične i substanične ekspresije te lokalizacije. Imaju različite razvojne profile u mozgu i fiziološke funkcije.

Iako je Np55 otkriven u moždanom tkivu, kasnije se pokazalo da se eksprimira i u stanicama skeletnih mišića, srca, timusa, slezene, bubrega i jetre (Langnaese i sur., 1997). Prisutan je u neuronima svih regija mozga, ali s različitim razinom ekspresije. Lokalizacija Np55 je detaljno proučena u malom mozgu miša. Imunohistokemijskim bojanjem se pokazalo da je izoforma Np55 karakteristična za mali mozak što potvrđuje i bojanje s protutijelom za Np65, kojim nije zabilježena imunohistokemijska reaktivnost u mozgu miša. Np55 se primarno nalazi u sinapsama paralelnih vlakana Purkinjeovih stanica molekularnog sloja i sinaptičkim glomerulima granularnog sloja malog mozga (Marzban i sur., 2003). Također se nalazi u parasagitalnim zebriin II negativnim prugama (Beesley i sur., 2013). Iako funkcionalni značaj ovakvog obrasca ekspresije Np55 nije u potpunosti objašnjen, smatra se da diferencijalna ekspresija skupa molekula povezanih s glutamatergičnom neurotransmisijom i proizvodnjom energije u parasagitalnim prugama malog mozga utječe na razlike u učinkovitosti sinapsi paralelnih i vitičastih vlakana te mogu biti povezani s dugotrajnom depresijom sinapsi malog mozga (LTD, od engl. *Long-term depression*) (Ito, 2002).

Za razliku od Np55, ekspresija Np65 je tkivno specifična za mozak, mrežnicu i pužnicu. Np65 se u mozgu eksprimira po anteriornoj-posteriornoj osi. Njegova ekspresija je koncentrirana na neurone regija prednjeg mozga: moždanu koru, hipokampus i striatum. Slabije je ekspimiran u regijama međumozga: talamusu i hipotalamusu, a najmanja razina Np65 je zabilježena u neuronima moždanog debla. Imunocitokemijski je pokazano da se Np65 pojavljuje kao točkaste nakupine u neuropilnim regijama II, III i Vb/VI slojeva moždane kore te slojevima *stratum oriens* i *stratum radiatum* hipokampusa. Na hipokampusu glodavaca je pokazano da je najveća ekspresija Np65 u polju CA1 (od lat. *Cornu Ammonis I*) Amonovog roga, a u odnosu

na njega, ekspresija u polju CA3 je puno manja, dok je u nazubljenom girusu DG (od engl. *Dentate gyrus*) umjerena (Smalla i sur., 2000). Biokemijskom analizom frakcija membranskih proteina je pokazano da je Np65 lokaliziran i u presinaptičkim i postsinaptičkim membranama. U postsinaptičkim membranama Np65 se nalazi u područjima velike gustoće proteina (PSD, od engl. *Postsynaptic density*) (Boyken i sur. 2013).

Obrazac ekspresije neuroplastina je vrlo sličan u mozgovima glodavaca i ljudi, no postoje određene razlike. U ljudskom mozgu Np65 ima podjednaku ekspresiju u korama velikog i malog mozga te nije zabilježena ekspresija u parasagitalnim prugama malog mozga. Isto tako jasna razlika u ekspresiji Np65 u slojevima CA1 i CA3 hipokampusa glodavaca nije zabilježena u ljudskom mozgu (Bernstein i sur., 2007, Herrera-Molina i sur., 2017.). I dalje je nepoznato utječu li razlike u ekspresiji Np65 u mozgu čovjeka i glodavaca na njegovu funkciju.

1.1.3 Uloge neuroplastina

Intracelularna domena neuroplastina ne posjeduje katalitičku aktivnost, zbog čega pokretanje signalnih puteva može biti rezultat direktne interakcije s intracelularnim proteinima ili membranskim receptorima (Owczarek i sur., 2012). Obje izoforme neuroplastina sudjeluju u diferencijaciji i induciraju rast neurita. Ig2 domena Np55 sadrži sekvencu od 13 aminokiselina koja pokazuje visoku homologiju s motivom Ig1 domene (D1) receptora za fibroblastni faktor rasta 1 (FGFR1, od engl., *Fibroblast growth factor receptor 1*). Ovo upućuje da se Np55 veže za FGFR, aktivira receptorsku tirozin kinazu i tako potiče rast. Tretiranjem Trex 93 stanica s ektodomenom Np55 i narpinom (Ig2 domena Np55) je postignuta autofosforilacija i aktivacija FGFR-a. Dodavanje FGFR inhibitora SU5402 kulturi hipokampalnih neurona je uzrokovalo inhibiciju izrasta inducirano ektodomenom Np55 i narpinom. Isti ishod je dobiven u kulturi neurona hipokampusa s deletiranim FGFR1 gdje je izrast inhibiran. Signalni put inducirani Np55 još uključuje nizvodnu fosforilaciju i aktivaciju ekstracelularne signalom-regulirane kinaze 1/2 (ERK1/2, od engl. *Extracellular signal-regulated kinase 1/2*) i mitogenom-aktivirane protein kinaze (MAPK, od engl. *Mitogen-activated protein kinase*) p38 što je pokazano i na neuronima tretiranim ektodomenom Np55. Također djelovanjem fibroblastnog faktora rasta 2 (FGF 2, od engl. *Fibroblast growth factor 2*) je povećana fosforilacija ERK1/2, ali ne i p38MAPK-e, dok je djelovanjem inhibitora p38MAPK-e SB202190 inhibiran izrast posredovan Np55 što upućuje da je p38MAP kinaza primarni kandidat koji posreduje u izrastu neurita inducirano Np55 (Owczarek i sur., 2011). Osim aktivacije kinaza i FGFR1-a, tretmanom s ektodomenom Np55 je došlo do značajnog povećanja koncentracije Ca^{2+} iona u sinapsama, dok je suprotan rezultat postignut djelovanjem FGFR1 inhibitora SU5402. Ovo upućuje na to da bi kalcij mogao biti dio kaskade izrasta neurita inducirano Np55 (Owczarek i sur., 2012). Isti rezultati su dobiveni za rast inducirani Np65. Djelovanjem ektodomenom Np65 i enplastinom (Ig3 domena karakteristična samo za Np65) u staničnoj kulturi je potaknut rast neurita hipokampusa štakora i

granularnih stanica malog mozga. Kao i kod Np55, rast neurita se postiže aktivacijom FGFR1 te nizvodnom aktivacijom p38MAPK i ERK1/2. Tretiranjem neurona hipokampusa ektodomenom Np65 i enplastinom povećala se koncentracija Ca^{2+} u citoplazmi i posljedično aktivirala Ca^{2+} /protein kinaza ovisna o kalmodulinu 2. Da bi Ca^{2+} /protein kinaza ovisna o kalmodulinu 2 mogla biti dio kaskade izrasta neurita induciranog Np65 pokazuje i istraživanje u kojem je zbog djelovanja KN-93 (veže se za vezno mjesto Ca^{2+} /kalmodulina u kinazi i inhibira enzim) spriječen izrast neurita (Owvzarek i sur., 2012). Pokazano je da za vrijeme ranog razvoja Np65 sudjeluje u formiranju ranih sinapsi preko faktora 6 povezanog s receptorom faktora tumorske nekroze (TRAF6, engl. *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*) (Vemula i sur., 2020.)

Kako bi u živčanom sustavu brojni neuroni formirali funkcionalnu mrežu, između njih je neophodna dobra povezanost sinapsi. Smatra se da zbog svoje lokalizacije u sinapsama čovjeka i glodavaca, Np65 bi mogao imati ulogu u razvoju sinapsi i stabilizaciji sinaptičkih veza (Yuan i sur., 2017). Istraživanjima na mišjim modelima bez ekspresije Np65 je pokazano da se u regijama CA1 i DG hipokampusa smanjio broj ekscitatornih sinapsi. Također na kulturi neurona hipokampusa dobivenih iz istog mišjeg modela uočeno je povećanje neusklađenosti presinaptičkih i postsinaptičkih regija tijekom razvoja sinapsi i gubitak sinaptičkih veza. Uloga Np65 u sinaptogenezi je pokazana na staničnoj kulturi neurona hipokampusa korištenjem NP65-Fc, rekombinantnog proteina koji imitira ektodomenu Np65. NP65-Fc se homofilno veže za endogeni Np65 što uzrokuje narušavanje sinaptogeneze i destabilizaciju uspostavljenih sinaptičkih veza (Herrera-Molina i sur., 2014). Dodatno, u Np65 deficijentnom mišu se promatrala ekspresija sinaptofizina, biomarkera presinapse i PSD95, biomarkera postsinapse. Primijećeno je da se razina ekspresije PSD95 smanjila, dok je ekspresija sinaptofizina ostala nepromijenjena. Smanjena razina PSD95 u području postsinaptičke gustoće može nepovoljno utjecati na sinaptogenezu jer se smatra da je potreban za inicijaciju postsinaptičke diferencijacije. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdilo je li za regulaciju sinaptogeneze Np65 odgovorna interakcija između Np65 i PSD95 ili samo neuroplastin (Amuti i sur., 2016).

Np65 bi mogao imati ulogu u sinaptičkoj plastičnosti ovisnoj o aktivnosti. Među prvim dokazima za sudjelovanje u sinaptičkoj plastičnosti je bilo istraživanje održavanja dugoročne stanične promjene (LTP, od engl. *Long-term potentiation*) u regiji CA1 hipokampusa. Tretiranjem neurona s antitijelima za Np65 i rekombinantnim proteinima Np65, koji mogu djelovati kao antagonisti endogenog neuroplastina, dolazi do narušavanja njegove funkcije u stanici i inhibicije LTP-a (Smalla i sur., 2000). Mogući mehanizmi koji se povezuju s promjenom LTP-a su aktivacija p38MAPK-e i inkorporacija receptora AMPA. Djelovanje fuzijskog proteina FcIg1-3 neuroplastina dovodi do povećanja fosforilacije p38MAPK-e i posljedične inhibicije LTP-a u ekscitatornim sinapsama hipokampusa. Analogno s time, korištenjem inhibitora 202190 blokira se aktivnost p38MAPK-e i ponovno se uspostavlja stvaranje i održavanje LTP-a. Mehanizam kojim Np65 djeluje na p38MAPK-u je i dalje nepoznat. Kako ne postoji motiv u intracelularnoj strukturi Np65

kojim bi se mogao vezati za enzim, djelovanje je najvjerojatnije indirektno. Jedan od predloženih okidača ove kaskade je povećanje unutarstanične koncentracije Ca^{2+} iona (Owczarek i sur., 2011).

Ravnoteža između ekscitacije i inhibicije sinapsi nužna je za razvoj i konstrukciju neuronskih krugova. Np65 regulira prijenos i stabilizaciju glutamatnih receptora čime može pridonositi organizaciji ekscitacijskih sinapsi (Empson i sur., 2006). Narušavanjem interakcije između neuroplastina može biti okidač za redukciju površinskih podjedinica GluR1 u neuronima CA3 regije hipokampusa. Osim što utječe na razinu podjedinica GluR1, koje su obigatorne za formiranje AMPA u ekscitacijskim sinapsama hipokampusa, mehanizam kojim Np65 regulira prijenos receptora AMPA je i dalje nepoznat. Također Np65 se pokazao i kao medijator drugih ionotropnih glutamatnih receptora kao što je receptor NMDA. Usporedno sa značajnom redukcijom površinskih podjedinica GluR1, djelovanjem FcIg1-3 je zabilježen i pad razine površinske podjedinice NR1 (Empson i sur., 2006). Dodatnim studijama je pokazano povećanje razine podjedinica NR1, NR2A i NR2B receptora NMDA u mišjim modelima koji su deficitarni za Np65 te je ekspresija podjedinice NR2A viši nego u divljem tipu miševa (Amuti i sur., 2016). Također, u odnosu na divlji tip, zabilježena je hiperaktivacija ERK1/2 koja ima važnu ulogu u dugoročnoj modifikaciji efikasnosti sinapsi, plastičnosti neurona i stvaranju dugoročnog pamćenja (Peng i sur., 2010).

U inhibirajućim sinapsama, Np65 je potencijalni regulator receptora γ -aminobutirične kiseline A (GABA_A , od engl. γ -aminobutyric acid type A). Metodom FRET (od engl. *Fluorescence resonance energy transfer*) analizirala se molekularna interakcija između Np65 i receptora GABA_A te je na kulturi neurona hipokampusa pokazana kolokalizacija neuroplastina i podjedinica $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ u sinapsama. Smanjenje ekspresije Np65 korištenjem Np65-shRNA, popraćeno je i smanjenjem ekspresije $\alpha 2$ podjedinice u sinapsama (Sarto-Jackson i sur., 2012). Nadalje na Np65-deficijentom mišu je pokazana neusklađenost između postsinaptičke podjedinice $\alpha 2$ i presinaptičkog vezikularno inhibitorynog transportera aminokiselina (Herrera-Molina i sur., 2014). Ovi rezultati podupiru ulogu Np65 kao regulatora receptora GABA_A preko podjedinice $\alpha 2$ koja je potrebna za prijenos i akumulaciju receptora u inhibirajućim sinapsama (Jacob i sur., 2008).

1.1.4 Neuroplastin u neurološkim poremećajima

Neuroplastin u mozgu je najviše eksprimiran u regijama odgovornim za kogniciju i emocije: kora, hipokampus i amigdala (Pessoa, 2008). Kognitivne poremećaje, poput demencije, karakteriziraju poteškoće u učenju, pamćenju, razmišljanju i koncentraciji. Istraživanja na *knock-out* mišjim modelima za Np65 su pokazala da, u odnosu na divlji tip, modeli imaju promijenjene obrasce kognitivnih funkcija. Ova zapažanja upućuju na to da je Np65 povezan s nekoliko kognitivnih procesa, kao što su inteligencija, učenje i pamćenje (Amuti i sur., 2016). Genetskim istraživanjima je identificiran polimorfizam jednog nukleotida (rs7171755) nizvodno od gena *NPTN* i povezuje s debljinom kore i kvocijentom inteligencije u adolescenata. Njegova varijacija može

uzrokovati smanjenje debljine kore i posljedično intelektualnih sposobnosti (Desrivieres i sur., 2014). U prefrontalnoj kori čovjeka, genska ekspresija *NPTN* prati gensku ekspresiju različitih proteina koji sudjeluju u energetskom metabolizmu, transmisiji u sinapsama, učenju i pamćenju (Desrivieres i sur., 2014). Np65 je potreban za stvaranje LTP-a u sinapsama hipokampusa, što implicira da ima ulogu u učenju i pamćenju. To potvrđuje bihevioralni test na štakorima tretiranim enplastinom (peptidni derivat Np65). Test je pokazao da je enplastin utjecao na endogeni Np65 čime je narušena funkcija neurona hipokampusa te su tretirani štakori već u ranijim fazama pokazali poteškoće u prostornom učenju (Empson i sur., 2006). Nadalje, Np65 potpomaže transport laktata tako što sudjeluje u translokaciji monokarboksilatnog transportera 2 (MCT2., od engl. *Monocarboxylate transporter 2*) na staničnu površinu (Wilson i sur., 2013). MCT2 se eksprimira u glija stanicama i području postsinaptičke gustoće sinapsi te opskrbljuje neurone i sinapse energijom nakon stimulacije (Chiry i sur., 2008). Promjene u energetskom metabolizmu mogu utjecati na kognitivne procese (Zlokovic., 2011). Štakorski model za Alzheimerovu bolest (AD, od engl., *Alzheimer's disease*) pokazuje smanjenu razinu ekspresije MCT2 u moždanoj kori i hipokampusu (Chen i sur., 2013). Isto tako imunohistokemijsko praćenje ekspresije je pokazalo da je ekspresija neuroplastina značajno promijenjena u hipokampusu zahvaćenom AD-om. Tijekom rane faze bolesti dolazi do povećanja ekspresije Np, što se može povezati sa strukturalnom i funkcionalnom reorganizacijom tkiva, ali daljnom progresijom bolesti ekspresija se smanjuje. Promjene u ekspresiji neuroplastina bi mogle biti posljedica reakcije ublažavanja neuropatoloških promjena uzrokovanih AD-om (Ilic i sur., 2019).

Anksioznost je jedan od najčešćih neuropsihijatrijskih poremećaja. Np65-deficijentni miševi pokazuju anksiozno ponašanje tijekom bihevioralnih testova, uključujući test tranzicije svjetla/tame, test na otvorenom prostoru (engl. *Open field test*) i EMP test (od engl. *Elevated plus maze*). Također je zapažen poremećaj u pamćenju straha (Amuti i sur., 2016). Amigdala i hipokampus su uključeni u stjecanje i izražavanju uvjetovanog straha te sinaptička plastičnost ovisna o aktivnosti u ovim regija doprinosi stvaranju i integraciji njegovog pamćenja (Lesting i sur., 2013). Gubitak Np65 u ovim regijama može uzrokovati promjenu u pamćenju straha i anksiozno ponašanje. Shizofrenija je nasljedni poremećaj koji karakteriziraju simptomi kao što su halucinacije, deluzije, kognitivni deficit i promjene u emocijama. Tri SNP-a (od engl., *Single-nucleotide polymorphism*), koji se nalaze na 5'-uzvodnoj regiji ljudskog gena *NPTN* se povezuju sa shizofrenijom. Tako je halotip T-G-T najmanje zastupljen, a del-G-G najviše što je potvrđeno u *in vitro* istraživanju, gdje je zabilježena niža transkripcija halotipa T-G-T u odnosu na del-G-G (Saito i sur., 2007). Također, oštećenje pretpulsne inhibicije (PPI) slušnog refleksa trzaja je uočeno kod miševa s nedostatkom neuroplastina te se gubitak neuroplastina može doprinjeti razvoju fenotipova sličnih shizofreniji (Bhattacharya i sur., 2017).

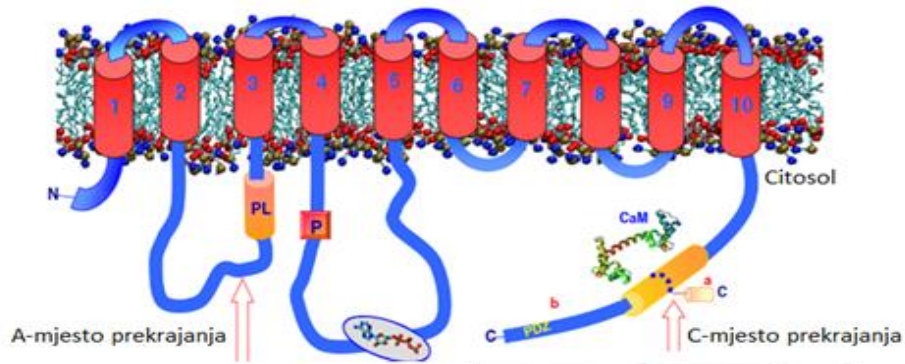
1.2 Kalcijaska ATP-aza stanične membrane

Kalcij (Ca^{2+}) je sekundarni glasnik i važan sudionik mnogih signalnih puteva. Sudjeluje u različitim staničnim procesima kao što su fosforilacija/defosforilacija proteina, fertilizacija, dioba i proliferacija stanica, ekspresija gena i dr. (Kawasaki i sur., 1998). U neuronima Ca^{2+} ima važnu ulogu u otpuštanju neurotransmitera, provođenju signala i plastičnosti sinapse (Frazier i sur., 2017). Za normalno funkcioniranje stanice potrebna je precizna vremenska i prostorna kontrola unutarstanične koncentracije Ca^{2+} koju obavljaju različiti citoplazmatski i membranski nosači i pumpe kao što je kalcijaska ATP-aza stanične membrane (PMCA, od engl. *Plasma membrane calcium ATP-ase*) (Brini i sur., 2012).

PMCA pripada superporodici ATP-aza za transport iona i lipida. Za proteine ove superporodice je karakteristično da imaju jednu katalitičku podjedinicu, da tijekom svakog ciklusa stvaraju prijelazne komplekse fosforilirane na konzerviranom Asp ostatku te da tijekom transporta prolaze kroz velike strukturne promjene. Proteini se razlikuju prema tvari koju prenose i mehanizmu regulacije te su prema tome podijeljeni u pet porodica (P1-P5). PMCA spada u P2 porodicu za prijenos Ca^{2+} (Cali i sur., 2017). Ima veliki afinitet prema Ca^{2+} te za prijenos jednog iona utroši jednu molekulu ATP-a (Brini i sur., 2009).

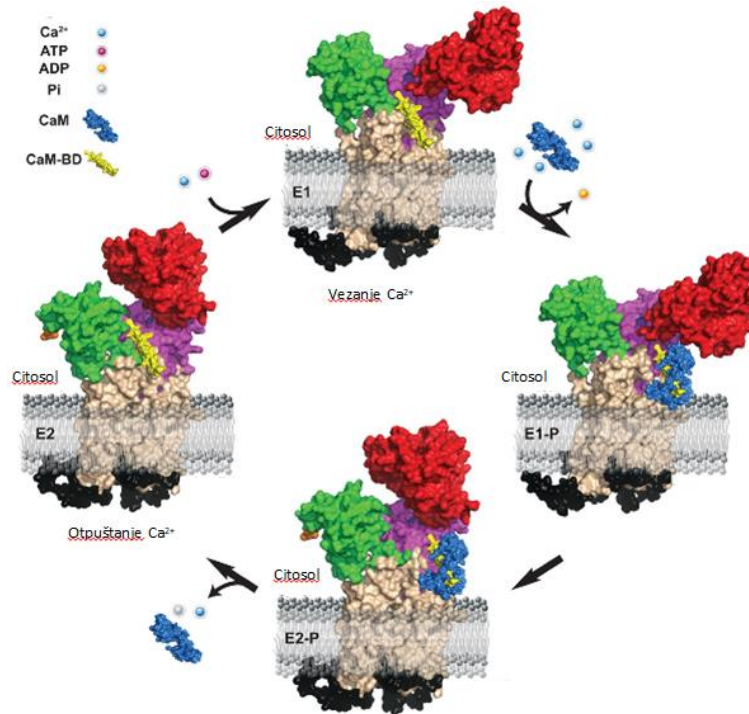
1.2.1 Struktura kalcijaska ATP-aze stanične membrane

PMCA je integralni membranski protein. Sastoji se od 10 transmembranskih domena (M1-10) i velikog citoplazmatskog dijela kojeg čine tri domene (A – pokretačka; N – za vezanje nukleotida; P – fosforilacijska). Na terminalnim krajevima nalaze se regulatorne (R) domene s mjestima za inhibiciju i aktivaciju (Slika 2). A-domena sadrži 3 konzervirana motiva: TGE (Thr-Gly-Glu), TGDN (Thr-Gly-Asp-Asp) i GDGXND (Gly-Asp-Glyx-Asn-Asp). Motiv TGE je važan za katalitičku aktivnost. Jedan je od dva mjesta za aktivaciju proteina kiselim fosfolipidima i mjesto je za autoinhibitornu interakciju s veznim mjestom za kalmodulin na C-terminalnom kraju. Motivi TGDN i GDGXND su uključeni u koordinaciju Mg^{2+} iona potrebnih za vezanje ATP-a na N-terminalnu domenu što omogućuje fosforilaciju konzerviranog Asn ostatka P-domene. Heliksi transmembranskih domena M2, M4 i M6 stvaraju polukanale koji štite vezno mjesto za Ca^{2+} u sredini transmembranske regije (Toyoshima i sur., 2002). Ono što je specifično za PMCA, ali i ne druge Ca^{2+} ATP-aze, je dugačak C-terminalni kraj koji sadrži glavnu regulatornu regiju: vezno mjesto za kalmodulin i aktivacijske kisele fosfolipide unutar R-domene (Brodin i sur., 1992). Vezanje kalmodulina za konzervirano akceptorsko mjesto istiskuje autoinhibitornu regiju N-terminalne domene povezane s veznim mjestom za kalmodulin (Tidow i sur., 2012).



Slika 2. Prikaz domena PMCA. 10 membranskih domena je označeno brojevima 1-10 i prikazano crvenom bojom. A-mjesto prekranja u prvoj citosolnoj petlji i C-mjesto u C-terminalnom repu su označeni crvenim strelicama. C-mjesto se nalazi unutar veznog mjesta za kalmodulin (žuti cilindar), a kalmodulin (CaM) je prikazan strukturnim modelom. PL – domena vezanja fosfolipida, P – mjesto nastanka apartil-fosfata. Preuzeto iz Krebs, 2009.

Tijekom transporta PMCA prelazi iz E1 oblika visokog afiniteta u E2 oblik niskog afiniteta za Ca^{2+} . Vezanje Ca^{2+} na mjesto visokog afiniteta inducira strukturne promjene koje dovode vezno mjesto za Mg^{2+} u blizinu konzerviranog Asp ostatka i omogućava se vezanje ATP-a za N-terminalnu domenu i fosforilacija Asp u P-domeni. Fosforilacijom nastaje E1-P prijelazno oblik te velike strukturne promjene u A-domeni zaklanjaju mjesto vezanja Ca^{2+} i stvaraju izlazni kanal s druge strane membrane čime E1-P prelazi u E2-P. Ovo omogućava otpuštanje Ca^{2+} na izvanstaničnoj strani ATP-aze čime E2-P oblik prelazi u E2. Strukturne promjene koje se događaju prijelazom u E2 oblik dovode Glu ostatak motiva TGE u blizinu fosforiliranog Asp-a što uzrokuje njegovu defosforilacije. Pomicanjem A-domene i preslagivanjem transmembranske regije ponovno se uspostavlja E1 oblik visokog afiniteta za Ca^{2+} (Slika 3) (Cali i sur., 2017).



Slika 3. Prikaz transporta Ca^{2+} s PMCA. U E1 obliku Ca^{2+} se veže visokim afinitetom na citosolnoj strani, dok E2 ima slabi afinitet za Ca^{2+} i otpušta ga u izvanstanični prostor. Konzervirani Asp ostatak je prikazan plavom bojom, A-domena zelenom, P-domena ružičastom, N-domena crvenom, izvanstanična dio membrane crnom, transmembranski smeđom, vezno mjesto za kalmodulin (CaM-BD, od engl. *Calmodulin binding site*) je prikazano žutom bojom, kalmodulin (CaM) svjetlo plavom bojom. Nakon što veže kalcij, kalmodulin aktivira PMCA inducirajući konformacijske promjene koje uključuju citosolne i transmembranske domene. Preuzeto iz Cali i sur., 2017.

1.2.2 Ekspresija i lokalizacija kalcijске ATP-aze stanične membrane

Poznate su 4 izoforme PMCA koje se prepisuju s 4 različita gena *ATP2B1-4* i 4 različita kromosoma te svaka od njih ima svoj set varijanti nastalih alternativnim prekrajanjem (Krebs, 2009). Kod ljudi i miševa izoforme pokazuju različite obrasce prostorne ekspresije. Izoforme PMCA1 i PMCA4 su prisutne svim tkivima, dok je ekspresija PMCA2 i PMCA3 ograničena na ekscitacijske stanice kao što su neuroni i skeletni mišići (Stauffer i sur., 1995). Dosad je identificirano preko 25 varijanti izoforma. Mjesta za prekrajanje se nalaze ili u blizini ili u regulatornim regijama. Sve 4 izoforme imaju 2 karakteristična mjesta prekrajanja: A-mjesto A-domene i C-mjesto unutar veznog mjesta za kalmodulin (Slika 3). Alternativno prekrajanje na C-mjestu je složenije i zahtjeva uvođenje dodatnog egzona te daje puno različitiije varijante PMCA s različitim afinitetom za vezanje kalmodulina i Ca^{2+} (Caride i sur., 2007). PMCA2 ima najveći afinitet za Ca^{2+} i može se aktivirati na

povećanje unutarstanične koncentracije Ca^{2+} i bez prisustva kalmodulina te je najzastupljenija izoforma ekscitacijskih stanica (Burette i sur., 2009). Promjene u izboru mjesta prekrajanja mogu značajno utjecati na svojstva proteina, enzimatsku aktivnost, način regulacije ili lokalizaciju (Black i sur., 2003).

1.2.3 Uloga kalcijске ATP-aze stanične membrane

Svaki tip stanice zahtijeva uspostavljanje optimalne homeostaze Ca^{2+} za svoju fiziološku funkciju. Tako stanice u mirovanju trebaju nisku unutarstaničnu koncentraciju Ca^{2+} kako bi se izbjegla aktivacija stanične smrti posredovane Ca^{2+} . Tri su glavna mehanizma za održavanje citosolne koncentracije Ca^{2+} : ponovni unos Ca^{2+} u endoplazmatski retikulum djelovanjem kalcijске ATP-aze sarkoendoplazmatskog retikuluma (SERCA, od engl. *Sarcoendoplasmic reticulum calcium transport ATP-ase*) i izbacivanje Ca^{2+} iz stanice djelovanjem PMCA i $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmjenjivača (NCX, od engl., *Sodium-calcium ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) exchanger*) (Brini i sur., 2010). PMCA sudjeluje u regulaciji i održavanju lokalne unutarstanične dinamike Ca^{2+} te je tako i jedan je od posrednika aktivacije signalnih puteva ovisnih o Ca^{2+} (Oceandy i sur., 2011). Aktivaciju njihovih efektoru postiže stvaranjem mikrodomena s povećanom koncentracijom Ca^{2+} u subplazmalematskom i perinuklearnom prostoru (Ender i sur., 2011). Također, PMCA unosom H^+ i hidrolizom ATP-a može utjecati na subplazmalematski pH i koncentraciju ATP-a (Tiffert i sur., 2011). Izoforme PMCA imaju različite biokemijske značajke te je moguće da različite izoforme imaju specifične uloge u određenim tipovima stanica te isto tako specifičnu ulogu u razvoju različitih patologija (Stafford i sur., 2017).

1.2.3.1 Uloga kalcijске ATP-aze stanične membrane u središnjem živčanom sustavu i neurodegenerativnim poremećajima

Signalizacija Ca^{2+} u neuronima je važna za regulaciju sinaptičke transmisije, regulaciju oslobađanja neurotransmitera te stvaranje i stabilizaciju pamćenja (Brini i sur., 2014). Istraživanje *in vitro* na stanicama feokromocitoma je pokazalo da delecija PMCA1 uzrokuje nepravilan rast neurita stimuliranih faktorom rasta živaca (NGF, od engl. *Nerve growth factor*) (Brandt i sur., 1996). Isti rezultat je dobiven za PMCA 2 i 3, nakon što su se stanice tretirale *antisense* oligonukleotidima za ta dva proteina (Szemraj i sur., 2004). Ovi rezultati impliciraju da bi PMCA mogla imati ulogu u diferencijaciji neurona. Također na stanicama feokromocitoma je pokazana moguća uloga PMCA u održivosti neurona. Preopterećenjem stanica Ca^{2+} , preživljavanje stanica je bilo poboljšano kod prekomjerne ekspresije, a smanjeno delecijom izoforme PMCA4 (Garcia i sur., 2001). Slično tome, primarni neuroni štakora i stanice humanog neuroblastoma SH-SY5Y transfecirane sa siRNA za PMCA2, nakon stimulacije, pokazuju povišene razine bazalnog Ca^{2+} i smanjeni klirens. Također, tretiranjem stanica agensima koji povećavaju koncentraciju unutarstaničnog Ca^{2+} i agonistima NMDA receptora povećala se stopa stanične smrti (Fernandes i sur., 2007). Pokazano je da velik broj neurotoksičnih agenasa može uzrokovati proteolitičku degradaciju PMCA u kulturama kortikalnih

neurona štakora što upućuje na potencijalnu ulogu PMCA u neurodegeneraciji uzrokovanoj višestrukom etiologijom. Konkretno, pokazano je da se ekspresija PMCA1 i 2 smanjuje u piramidalnim stanicama hipokampusa štakora nakon izazivanja napada kainatima (Garcia i sur., 1997) dok je djelovanje glutamata u toksičnim koncentracijama uzrokovalo reorganizaciju i uklanjanje PMCA iz membrane i posljedično smanjen protok Ca^{2+} (Pottorf i sur., 2006).

Koru malog mozga između ostalih čine i Purkinjeove stanice, a sudjeluju u kontroli motorike i percepciji senzoričkih podražaja. PMCA s NCX-om precizno regulira koncentraciju lokalnog Ca^{2+} u sinapsama ekscitacijskih paralelnih vlakana Purkinjeovih stanica i posljedično djeluje na otpuštanje neurotransmitera (Roome i sur., 2013). Imunolokalizacijskom analizom malog mozga štakora je pokazano da izoforme PMCA imaju specifične obrasce ekspresije, od kojih su najviše eksprimirane PMCA2 i 3. PMCA2 je lokalizirana u presinapsama, a PMCA3 u postsinapsama (Burette i sur., 2007). Ostale izorfome pokazuju manju razinu ekspresije u lipidnim splavima granularnih neurona malog mozga te s NMDA receptorima reguliraju stvaranje dušikovog oksida (Marques da Silva i sur., 2014). Kod pacijenata s ataksijom malog mozga su pronađene dvije neovisne mutacije gena za PMCA3 koje utječu na promjenu veznog mjesta za kalmodulin i s time na izbacivanje Ca^{2+} iz stanice (Zanni i sur., 2012). Farmakološka inhibicija i ablacija PMCA2 u mišjim modelima uzrokovale su smanjen izrast dendrita u Purkinjeovim stanicama (Sherkhane i sur., 2014). Također, mišji *null* mutanti za PMCA2 12. dan nakon rođenja pokazuju značajnu ataksiju malog mozga popraćenu s nemogućnošću održavanja ravnoteže i smanjenjem tjelesne težine (Kozel i sur., 1998). Slični rezultati su dobiveni na soju miševa „*wriggle mouse sagami*“ koji imaju točkastu mutaciju u genu za PMCA2. Miševi pokazuju nehotične distonične pokrete ekstremiteta, grčenje i trzanje trupa i vrata te poteškoće u održavanju uspravnog držanja (Ueno i sur., 2012). Daljnjim istraživanjima na ovom soju transgeničnih miševa je pokazan velik broj poremećaja u funkciji neurona i homeostazi Ca^{2+} . Na primjer, na prerezima malog mozga je pokazan manji porast unutarstanične koncentracije Ca^{2+} i smanjen klirens koji su popraćeni smanjenjem sinaptičkih veza između paralelnih vlakana i dendritičkih trnova Purkinjeovih stanica (Inoue i sur., 1993). Isto tako, poremećaj u regulaciji unutarstanične koncentracije Ca^{2+} u Purkinjeovim stanicama „*knock-out*“ mišjih modela za PMCA2 je uzrokovao nepravilno stvaranje akcijskog potencijala u postsinaptičkim inhibicijskim neuronima (Empson i sur., 2013).

Starenje jedinke je često popraćeno progresivnim opadanjem funkcije neurona, za koji se smatra da je uglavnom potaknut djelovanjem reaktivnih kisikovih jedinki (ROS, od engl. *Reactive oxygen species*). Aktivnost i količina PMCA u membranama sinapsi štakora značajno opada s godinama. Isto tako zbog oksidacije metioninskih ostataka kalmodulina, smanjuje se njegova mogućnost aktivacije PMCA (Jiang i sur., 2012). Pokazano je da različita oksidativna sredstva izazivaju proteolitičku razgradnju i smanjenje funkcije PMCA u sinapsi kortikalnih neurona (Kip i sur., 2007) te internalizaciju i gubitak ekspresije PMCA u

staničnoj kulturi primarnih neurona hipokampusa (Zaidi i sur., 2009). S obzirom na važnu ulogu PMCA u održavanju unutarstanične koncentracije Ca^{2+} , funkcije i vijabilnosti neurona, postoji mogućnost da inaktivacija PMCA djelovanjem ROS-a doprinosi neurodegeneraciji povezanoj sa starenjem.

Upravo su poremećaj u radu Ca^{2+} pumpi i promijenjena regulacija unutarstanične koncentracije Ca^{2+} jedan od faktora za progresiju Alzheimerove bolesti (Bezprozvanny i sur., 2008). Postmortalno na kori mozga pacijenata s AD patologijom je pokazana smanjena ekspresija i pad aktivnosti PMCA u odnosu na kontrole iste starosne dobi. AD karakterizira nakupljanje proteina amiloida β ($\text{A}\beta$) i tau te je pokazano kako oba proteina imaju inhibitorni učinak na aktivnost PMCA u membranskim vezikulama ljudskog hipokampusa i kore mozga. Ovi proteini posebno utječu na aktivnost izoforme PMCA4. Nadalje, pokazano je da oba proteina utječu na aktivnost membranskih, ali ne i intracelularnih ATP-aza, kao što je SERCA. Moguće vezno mjesto $\text{A}\beta$ se nalazi unutar veznog mjesta za kalmodulin. Tako je njegovo uklanjanje proteolizom na pročišćenom PMCA ili korištenjem krnjih oblika izoforme hPMCA4b, uzrokovalo gubitak utjecaja $\text{A}\beta$ na Ca^{2+} -ATP-aznu aktivnost enzima (Berrocal i sur., 2015). Također, istraživanjima utjecaja proteina tau na PMCA pokazano je da se njegovo vezno mjesto isto nalazi na C-terminalnoj domeni. Nadalje, pokazano je da tau, osim ljudskih izoformi PMCA 3 i 4, inhibira i izoformu konstitutivne ekspresije PMCA2b te može inhibirati i izoforme kojima su uklonjena vezna mjesta za kalmodulin. Osim direktnim vezanjem $\text{A}\beta$ i tau za PMCA, inhibicija aktivnosti može biti i rezultat oksidacije PMCA ROS-ovima koji nastaju djelovanjem ovih proteina u stanici. Tako je u stanicama SH-SY5Y tretiranim proteinom tau zabilježen pad vijabilnosti stanica paralelno s povećanjem ROS-ova i smanjenjem aktivnosti PMCA (Berrocal i sur., 2009).

1.2.4 Poveznica između neuroplastina i kalcijске ATP-aze stanične membrane

Donedavno se smatralo da samo ATP-aze porodice P4 za svoju funkciju trebaju najmanje jednu dodatnu podjedinicu s kojom se povezuju u heterokompleks te da sve ostale ATP-aze djeluju kao monomeri ili homodimeri. Schmidt i suradnici su 2017. identificirali PMCA kao heterokompleks koji se sastoji od dvije ATP-aze i dvije esencijalne pomoćne podjedinice: dva neuroplastina ili dva bazigina. Stabilizacija PMCA podjedinicama neuroplastin/bazigin je najvjerojatnije rezultat zajedničkog sastavljanja u endoplazmatskom retikulumu. Krio-elektronskom mikroskopijom kompleksa PMCA1/Np je pokazano da se proteini povezuju preko transmembranske domene neuroplastina s udaljenom transmembranskom domenom 10 (M10) PMCA1. Interakcije s domenama M8 i M9 dodatno stabiliziraju kompleks. Vezanjem Np za M10 potiče konformacijske promjene u PMCA što utječe na vezanje Ca^{2+} (Gong i sur., 2018). Istraživanjima *in vitro* na pročišćenoj izoformi PMCA1 je potvrđen model ovisnosti ATP-azne aktivnosti PMCA1 o neuroplastinu. Isti rezultati su dobiveni na stanicama s inaktiviranim genima za Np i bazigin, kod kojih je zaustavljen transport Ca^{2+} posredovan PMCA (Schmidt i sur., 2017). Nadalje, istraživanjima na T-stanicama je pokazana

kolokalizacija neuroplastina s izoformama PMCA1 i PMCA4 što sugerira da neuroplastin može utjecati i na funkcije ostalih izoformi (Korthals i sur., 2017). Nadalje je pokazano da se povezivanje Np mijenja ovisno o izoformi PMCA i tipu stanica. Aktivnost izoforme PMCA2 se pokazala najmanje ovisnom o neuroplastinu. Prolaznom ekspresijom PMCA2 u stanicama s inaktiviranim genima za Np i bazigin djelomično se uspostavio transport Ca^{2+} (Strehler i sur., 2018). Smatra se da bi transport Ca^{2+} i utjecaj PMCA na signalizaciju Ca^{2+} mogli podupirati i doprinosti mnogim procesima i pleiotrofnim ulogama povezanih s Np i baziginom kao što su neuritogeneza, stvaranje i održavanje sinapsi, plastičnost sinapsi i pamćenje (Schmidt i sur., 2017).

1.3 Neurodegeneracija

Neurodegeneracija je progresivni gubitak strukture i funkcije neurona povezan sa starenjem. U konačnici dolazi do smrti neurona i razvoja kognitivnih i funkcionalnih poremećaja te demencije (Ramanan i Saykin, 2013). U kategoriju neurodegenerativnih bolesti povezanih sa starenjem ubrajamo demenciju Lewyjevih tjelešaca (LBD, od engl. *Lewy body dementia*), Alzheimerovu (AD, od engl. *Alzheimer's disease*) i Parkinsonovu bolest (PD, od engl. *Parkinson's disease*). Unatoč razlikama u kliničkoj slici i patološkim pokazateljima, LBD, AD i PD pokazuju stereotipnu patologiju u određenim regijama mozga, dok ostale regije ostavljaju relativno nepromijenjenima (Pandya i sur., 2021).

1.3.1 Alzheimerova bolest

AD je neurodegenerativni poremećaj, kojeg karakterizira specifičan početak i tijek kognitivnog i funkcionalnog nazadovanja (Lopez i sur., 2019). Promjene u AD-u progrediraju s duljinom trajanja bolesti i selektivno zahvaćaju vulnerabilne regije mozga. One se prvo očituju u entorinalnoj regiji, zatim u limbičkom te naposljetku neokortikalnom području (Gotz i sur., 2009). Bolest se klinički očituje gubitkom pamćenja, propadanjem kognitivnih funkcija i promjenama u ponašanju i osobnosti. Napredovanjem bolesti dolazi do gubitka epizodičkog pamćenja zbog čega pacijenti često ponavljaju razgovore i pitanja. Također pokazuju poteškoće u vremenskom određivanju zbivanja pojedinih događaja te poteškoće u prisjećanju imena objekata i osoba (Smirnov i sur., 2019). Tijekom AD-a dolazi do promjena u metabolizmu i signalizaciji neurona, neurovaskularnim procesima te upalnom odgovoru koji zajedno s ostalim patologijama AD-a uzrokuju gubitak sinaptičke plastičnosti i sinapsi. Promjene u broju sinapsi i postsinaptičkih receptora razvijaju se već u ranijim stadijima bolesti i povezuju se s kognitivnim nazadovanjem (Boros i sur., 2017). Također je pokazana jača ekspresija biljega stanične plastičnosti koji po svojoj funkciji i strukturi pripadaju molekulama stanične adhezije. Pojačana ekspresija biljega stanične plastičnosti se može protumačiti ili kao pokušaj obnavljanja neurodegeneracijom zahvaćenog tkiva ili kao sastavni dio patologije AD-a (Mikkonen i sur., 1999). Iako je uzrok bolesti nepoznat, smatra se da gubitak neurona i sinapsi te posljedični simptomi nastaju zbog

nakupljanja senilnih (amiloidnih) plakova (SP, od engl. *Senile plaque*) i neurofibrilarnih snopića (NFT, od engl. *Neurofibrillary tangle*) (Masters i sur., 2015).

Histološke karakteristike, koje postmortalno potvrđuju dijagnozu, su depoziti proteina amiloida i tau. Protein amiloid β ($A\beta$) nastaje cijepanjem amiloidnog prekursorskog proteina (APP, od engl. *Amyloid precursor protein*) amiloidnim putem. Iako mu je biološka uloga nepoznata, smatra se da bi mogao sudjelovati u održavanju homeostaze sinapse, imuniteta stanice i u obradi lipida (Kumar i sur., 2016). Amiloidni put započinje cijepanjem APP-a β -sekretazom (BACE-1, od engl. *β -site APP cleavage enzyme 1*) čime nastaje ekstracelularni produkt sAPP β i za membranu C-terminalno vezan fragment C99, građen od 99 aminokiselina. Fragment C99 se cijepa γ -sekretazom što rezultira nastankom APP intracelularne domene vezane za membranu (AICD, od engl. *APP intracellular domain*) AICD i $A\beta$ koji se izlučuje. Iako je regulacija ovog puta i dalje nejasna, smatra se da prekomjerna produkcija ili smanjeno uklanjanje $A\beta$ inducira njegovu oligomerizaciju u amiloidna vlakna koja uzrokuju nastanak plakova vidljivih u patološkim uzorcima (Querfurth i sur., 2010). Dosad prikupljeni podaci sugeriraju da su za stanicu toksični i topljivi $A\beta$ i amiloidni plakovi. Induciraju nastanak neurofibrilarnih snopića hiperpolarizacijom proteina tau, uzrokuju ekscitotoksičnost, upale i oksidativni stres. Posljedice ovih događaja su stanična smrt i pad razine neurotransmitera, ponajviše acetilkolina (McLean i sur., 1999).

Protein tau ima ulogu u povezivanju mikrotubula, aksonskom transportu i modulaciji signalnih puteva (Holtzman i sur., 2016). Prekomjerna fosforilacija dovodi do gubitka normalne funkcije i agregacije proteina tau te neurotoksičnosti (Hu i sur., 2016). Promjene u sinapsama koje nastaju zbog hiperfosforilacije proteina tau uzrokuju nepravilnu signalizaciju neurona, funkciju mitohondrija i aksonski transport (Gibbons i sur., 2019). Već u ranijim stadijima razvoja bolesti, hiperfosforilirani tau se nakuplja u dendritičkim trnovima stvarajući NFT-ove. Smatra se da se tau transsinaptički prenosi na susjedni neuron te tako sudjeluje u progresiji AD-a. Također zbog fosforilacije proteina tau, iz aktinskih mikrofilamenata se oslobađa mikrotubularni vezni protein koji ometa aksonski transport (DeVos i sur., 2018).

Tri su biološka čimbenika koji pridonose razvoju AD, a to su dob, spol i genotip *APOE*. Dob predstavlja najveći rizik za razvoj bolesti te je AD najčešći uzrok demencije starijih populacija (Lewandowski i sur., 2020). Također, žene oboljevaju češće od muškaraca (Oveisgharan i sur., 2018). AD se najčešće pojavljuje sporadično, no postoji genetska osnova za nasljedni oblik te se u takvim slučajevima bolest razvija prije 65. godine života (Nussbaum i sur., 2003). Razvoju sporadičnog oblika AD-a doprinosi gen *APOE* tj. polimorfizmi u njegovoj kontrolnoj regiji (Bullido i sur., 1998). Apolipoprotein E (ApoE) sudjeluje u transportu i metabolizmu lipida te služi kao nosač za prijenos $A\beta$ iz mozga u krvne žile te može imati ulogu u održavanju sinapsi i stanične membrane te u popravku nakon ozljede (Belloy i sur., 2019). ApoE ima tri

alela $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ s kojih se prepisuju tri izoforme: apoE2, apoE3 i apoE4. Alel $\epsilon 4$ povećava rizik razvoja AD-a i prepisuje se u skoro 50% slučajeva sporadičnog oblika bolesti (Ashford, 2004). ApoE4 je kolokaliziran s $A\beta$ i pospješuje njegovo odlaganje u sinapsama (Koffie i sur., 2012). To je pokazano i na ljudskim uzorcima mozga s patologijom AD-a, gdje je u odnosu na ostale izoforme, u prisustvu apoE4 povećana razina topljivog $A\beta$ i njegove depozicije te stvaranje amiloidnih plakova. Nasuprot tome, ApoE2 i ApoE3 imaju suprotan učinak, smanjuju odlaganje $A\beta$ i tako smanjuju rizik za razvoj bolesti (Fleisher i sur., 2013). Danas se sve više istražuje zajednički učinak bioloških čimbenika na rizik razvoja bolesti. Tako su istraživanja interaktivnog učinka APOE4 i spola na razvoj patologije AD-a su pokazala da žene, koje nose alel $\epsilon 4$, imaju duplo veći rizik od razvijanja AD-a u odnosu na muškarce s alelom $\epsilon 4$ (Altman i sur., 2014). To je pokazano i istraživanjem na mišjim modelima s mutacijama za prekomjerna ekspresija $A\beta$ i koji sadrže ljudski transgen za *APOE4*. U odnosu na mužjake, ženke su pokazivale jače izražene patohistološke značajke bolesti, veće kognitivno nazadovanje i smanjenu interakciju mikroglije s amiloidnim plakovima (Tai i sur., 2017).

Za proučavanje i razumijevanje patofiziologije neurodegenerativnih poremećaja koriste se različiti mišji modeli koji sadrže mutacije pronađene u obiteljskom obliku. Mišjim modelima za AD se uglavnom uvode mutacije u tri gena pronađena u 30-50% obiteljskog oblika bolesti. Ovi geni kodiraju proteine APP (Mullan i sur., 1992) te proteine koji su dio kompleksa β -sekretaze, presenilin 1 (PS1/PSEN1) i presenilin 2 (PS2/PSEN2) (Rogaev i sur., 1995). Značajan problem mišjih modela za AD je sporo stvaranje toksičnih $A\beta$ i NFT-ova. Zbog toga je 2006., Oakley sa svojim suradnicima razvila dvostruko transgenični APP/PS1 mišji model 5xFAD. Ovaj model sadži mutacije u pet gena koje su pronađene u obiteljskom obliku bolesti kako bi se ubrzalo stvaranje amiloidnih plakova. Tako se u modelu 5xFAD plakovi stvaraju već u dobi od dva mjeseca (Oakley i sur., 2006).

2. Cilj

2.1 Opći cilj

Cilj diplomskog rada je istražiti dolazi li do promjene ekspresije membranskog proteina neuroplastina i kalcijske ATP-aze stanične membrane u neurodegeneraciji te postoji li povezanost između njihovih ekspresija u različitim regijama mozga.

2.2 Specifični ciljevi

Na uzorcima miševa divljeg tipa i 5xFAD miševa, imunohistokemijski odrediti lokalizaciju i ekspresiju neuroplastina i PMCA u tri moždane regije: hipokampusu, malom mozgu i moždanoj kori;

Analizom slika pod mikroskopom i u programu *ImageJ* kvantificirati razliku u ekspresiji neuroplastina i PMCA u tri moždane regije (hipokampus, mali mozak, moždana kora) između miševa divljeg tipa i 5xFAD.

3. Materijali i metode

3.1 Materijali

3.1.1 Uzorci

Korišteni su uzorci moždanog tkiva miševa 5xFAD, mišjeg modela obiteljske Alzheimerove bolesti i kontrola divljeg tipa. Miševi 5xFAD su transgenični miševi s mutacijama u genima za APP i PSEN1 (APP KM670/671NL (Swedish), APP I716V (Florida), APP V717I (London), PSEN1 M146L (A>C), PSEN1 L286V) (<http://www.alzforum.org/research-models/5xfad>). Model je razvijen 2006. godine i koristi se za istraživanja patofiziologije Alzheimerove bolesti (AD, od engl. *Alzheimer disease*) (Oakley, 2006). Već u ranoj dobi miševi pokazuju karakteristične promjene povezane s bolešću uzrokovane intenzivnom akumulacijom toksičnog oligomera A β 42 i nakupljanja amiloidnih plakova. Miševi su dobiveni ljubaznošću prof. dr. Dirka Montaga iz Leibniz instituta za neurobiologiju, Magdeburg, Njemačka.

Za analizu smo koristili 34 životinje: 16 miševa 5xFAD i 18 miševa divljeg tipa oba spola (Tablica 1). Grupirali smo ih u dvije skupine, skupinu u dobi 4-6 mjeseci s ranim neurodegenerativnim promjenama i skupinu 10-15 mjeseci koja pokazuje izražene neurodegenerativne promjene.

Tablica 1. Popis miševa korištenih za imunohistokemijsku analizu

5xFAD	Dob (mjeseci)	Spol	Divlji tip	Dob (mjeseci)	Spol
1	14	M	17	15	M
2	14	M	18	15	M
3	12	Ž	19	12	Ž
4	12	Ž	20	12	Ž
5	12	M	21	12	M
6	10	Ž	22	10	Ž
7	10	Ž	23	10	Ž
8	10	M	24	10	M
9	10	M	25	10	M
10	6	M	26	6	M
			27	6	Ž
			28	6	Ž
11	5,5	Ž	29	5,5	Ž
12	5	Ž	30	5,5	Ž
13	5	Ž	31	5,5	Ž
14	4	M	32	4	M
15	4	M	33	4	M
16	4	M	34	4	M

Za imunohistokemijsku analizu miševa 5xFAD i miševa divljeg tipa smo uskladili prema dobi i spolu. Miševi su anestetizirani izofluranom, nakon čega je uslijedila transkardijalna perfuzija PBS-om i 4%

paraformaldehidom u PBS-u (2mL/min). Mozgovi su se potom inkubirani preko noći u fiksativu (4% paraformaldehid u PBS-u). Nakon fiksacije, uzorci su krioprotektirani u otopinama saharoze u PBS-u: 10%-tnoj saharozi kroz 24 h, 20%-tnoj saharozi kroz 24 h pa 30%-tnoj saharozi kroz 24 h te su se zamrznuti do rezanja. Za analize su korišteni sagitalni rezovi debljine 20 μ m.

3.1.2 Kemikalije i materijal

Za molekularne analize su korištene različite otopine, kemikalije i potrošni materijal naveden u Tablici 2. Osim komercijalnih pufera korišteni su i puferi pripremljeni prema receptu što je prikazano u Tablici 3.

Tablica 2. Popis kemikalija, otopina, potrošnog materijala i njihovih proizvođača

Proizvod	Proizvođač
Albumin iz goveđeg seruma (BSA)	Sigma Aldrich, #A7906
Hidrofobna olovka Pap pen	Vector Laboratories, #H-4000
Komplet za vizualizaciju imunohistokemijskih rezova Sigmafast DAB with metal enhancer	Sigma, #D0426-50
Konjski serum	Gibco, Life Technologies, #16050-130

Tablica 3. Popis i sastav pripremljenih otopina i pufera

Proizvod	Sastav
Citratni pufer za otkrivanje antigena	9,5 mM limunska kiselina, pH = 6,0
Fosfatni pufer (PBS)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Otopina za blokiranje za metodu imunohistokemija proteina	10% konjski serum u 0,5% Triton 1x PBS
Otopina predtretmana	1% H ₂ O ₂ , 25 % (v/v) metanol

Za imunohistološka i imunofluorescentna bojenja korištena su različita primarna i sekundarna protutijela navedena u Tablici 4.

Tablica 4. Popis protutijela

	Protutijelo	Proizvođač		Porijeklo
Primarna	mNp	R&D Systems, sheep anti-mNp #AF5174		Ovca
	pPMCA	Abcam, mouse anti-pPMCA, #ab2825		Miš
	Np65	R&D Systems, sheep anti-Np65, #AF5360		Koza
Konjugirano s:				
Sekundarna	Anti-ovca	Jackson Immunoresearch, #713-035-147	HRP	Magarac
	Anti-miš	Jackson Immunoresearch, #715-035-150	HRP	Magarac
	Anti-ovca	Jackson Immunoresearch, #713-165-003	Cy3	Magarac
	Anti-koza	Jackson Immunoresearch, #705-175-147	Cy5	Magarac
	Anti-miš	Jackson Immunoresearch, # 715-545-150	488	Magarac

3.2 Metode

3.2.1 Imunohistokemijsko bojenje rezova mišjeg mozga

Za imunohistokemijsko bojenje su korištena stakalca sa sagitalnim rezovima debljine 20 μm . Rezovi su rehidrirani u PBS-u (Tablica 3) nakon čega su inkubirani u citratnom puferu (Tablica 3) za otkrivanje antigena. Rezovi su potom inkubirani u otopini predtretmana za inaktivaciju endogene peroksidaze za vizualizaciju DAB-om. Nakon ispiranja predtretmana u PBS-u, rezovi su blokirani otopinom PBS-a s 5% konjski serumom i 0,1% Triton 1 h na sobnoj temperaturi. Prije dodavanja otopine za blokiranje, rezovi su zaokruženi olovkom *Pap pen* kako bi se napravila hidrofobna linija oko rezova koja osigurava da se otopina za blokiranje (i kasnije protutijela) zadrže na stakalcu. Primarna protutijela su razrijeđena u otopini za blokiranje (Tablica 3) u omjerima 1:500 anti-mNp i 1:1000 anti-pPMCA (Tablica 4). Rezovi su inkubirani s primarnim protutijelom preko noći pri 4°C u vlažnoj komori. Nakon ispiranja u PBS-u, rezovi su inkubirani sa sekundarnim protutijelima 2h pri sobnoj temperaturi. Sekundarna protutijela konjugirana s peroksidazom iz hrena (Tablica 4) su razrijeđena u otopini za blokiranje u omjeru 1:10000. Vizualizacija je napravljena otopinom koja sadrži DAB prema uputama proizvođača (Sigma). Nakon ispiranja, stakalca su poklopljena pokrovnica i pohranjena pri 4°C do daljnje analize.

3.2.2 Imunofluorescentno bojenje rezova mišjeg mozga

Sagitalni rezovi debljine 20 μm su podvrgnuti imunofluorescentnom bojenju. Nakon rehidracije, rezovi su inkubirani u citratnom puferu za otkrivanje antigena te nakon ispiranja citratnog pufera u PBS-u blokirani u 10% konjskom serumu 3h na sobnoj temperaturi. Primarna protutijela (anti-mNp, 1:500; anti-Np65, 1:500 i anti-pPMCA 1:1000) su razrijeđena u 10% konjskom serumu u PBS-u s 0,1% Tritonom, nakon čega su rezovi inkubirani s protutijelima 48 h pri 4°C u vlažnoj komori. Nakon ispiranja, uslijedila je inkubacija s odgovarajućim sekundarnim protutijelima koja su konjugirana s različitim fluoroforima (Tablica 4) 2 sata pri sobnoj temperaturi i u tamnoj komori. Nakon ispiranja rezova u PBS-u, slijedilo je bojanje jezgara bojom DAPI. Nakon ispiranja viška boje, na rezove je dodan medij za pokrivanje Mowiol te pokrovnice.

3.2.3 Vizualizacija, analiza i obrada imunohistokemijske reaktivnosti

Uzorci vizualizirani s DAB-om su analizirani pod svjetlosnim mikroskopom Olympus AX70 Provis te fotografirani digitalnom kamerom Nikon DXM 1200 u programu Nikon ACT-1. Za fotografiranje rezova s malim povećanjem je korištena lupa Zeiss Discovery V8 Stereo i kamera Zeiss AxioCam MRc 5, a slike su obrađene u javno dostupnom programu ZEN 2 lite. Također je napravljena semikvantitativna vizualna procjena imunoreaktivnosti preparata mozgovog mišjih modela i odgovarajućih kontrola korištenjem svjetlosnog mikroskopa.

3.2.4 Vizualizacija, analiza i obrada imunofluorescentne reaktivnosti

Za vizualizaciju imunofluorescencije na rezovima mozgovog mišjih modela i njihovih kontrola je korišten laserski konfokalni mikroskop (Zeiss FV3000). Kvantifikaciju imunofluorescencije rezovaje napravljena u javno dostupnom programu za obradu digitalnih slika i fotografija *ImageJ* (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Preparati su podijeljeni na 3 regije: hipokampus, mali mozak i moždana kora.

3.2.5 Statistička analiza

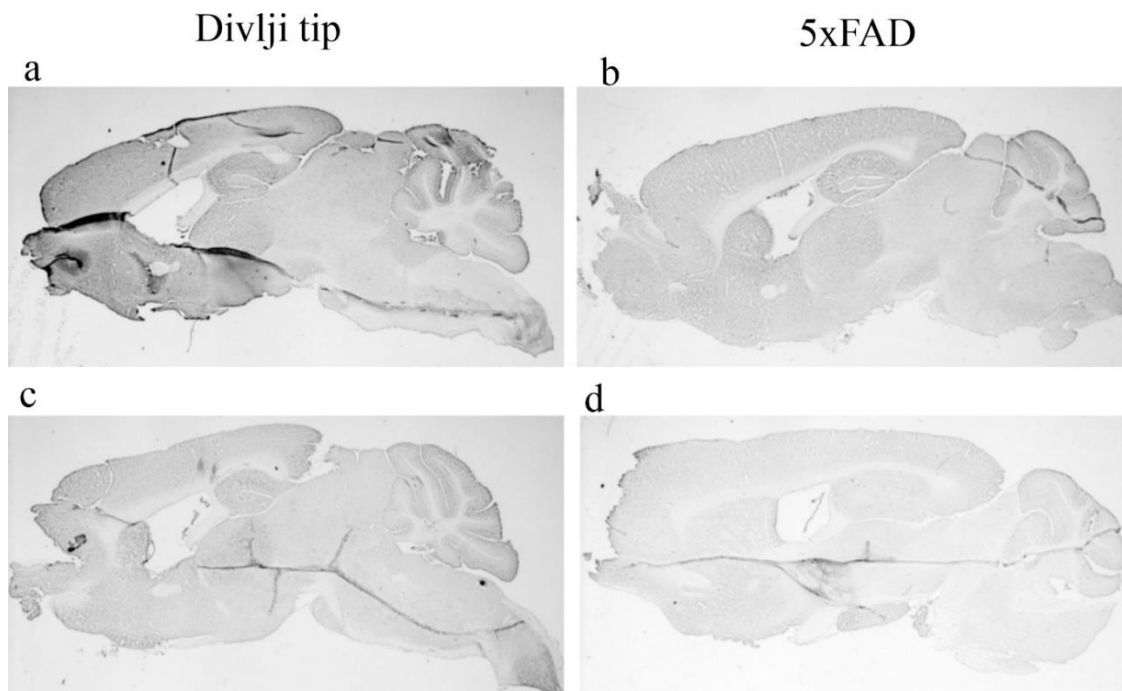
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD, od engl. *Standard deviation*). Vrijednosti $p < 0,05$ su smatrane statistički značajnima. Za analizu promjene ekspresije neuroplastina u mišjim modelima je korišten Studentov *t*-test. Statistička analiza je provedena u GraphPad Prism 8.4.2.

4. Rezultati

4.1 Ekspresija neuroplastina i plazmamembranske kalcijeske ATP-aze u mozgu miša divljeg tipa i modela za Alzheimerovu bolest

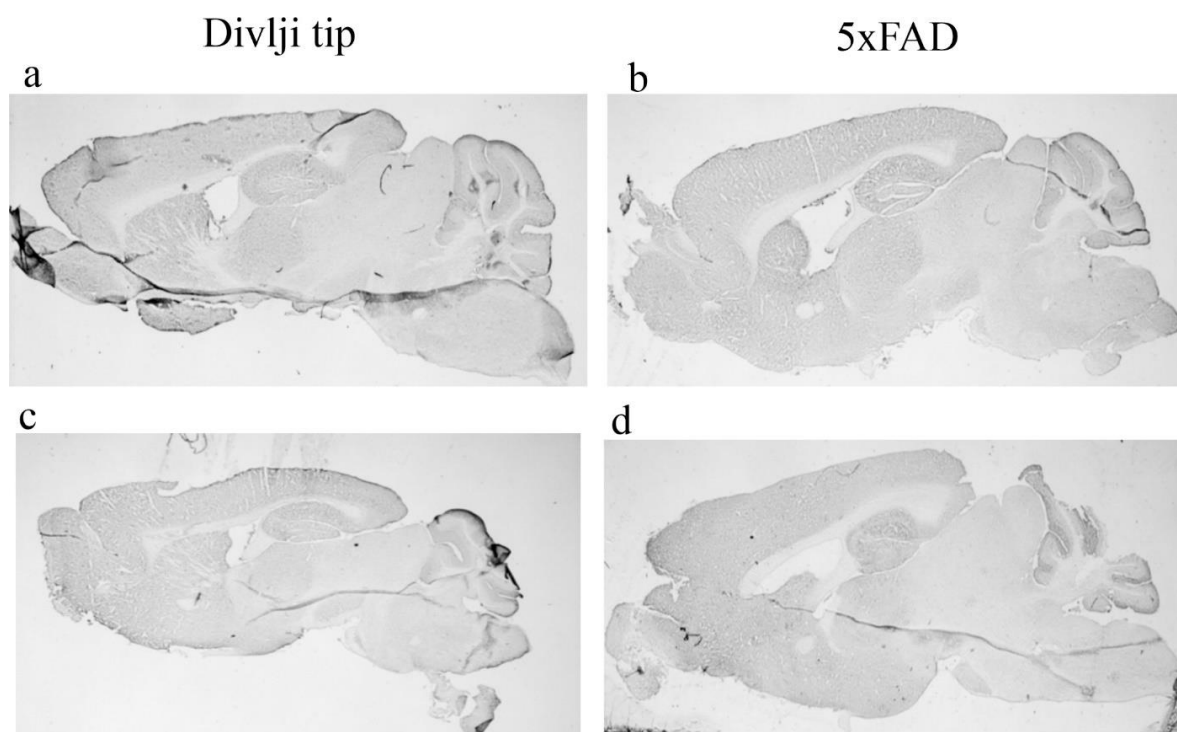
Analizirana je ekspresija neuroplastina u različitim regijama mozga miša divljeg tipa i miša modela za Alzheimerovu bolest. Imunohistokemijskom metodom je analizirana ekspresija neuroplastina protutijelom koje prepoznaje obje izoforme i ekspresije PMCA protutijelom koje prepoznaje sve četiri izoforme. Dva neovisna istraživača su uz pomoć svjetlosne mikroskopije odredila razinu imunoreaktivnosti kao: 0 – nema imunoreaktivnosti, + - slaba imunoreaktivnost, ++ - srednja imunoreaktivnost, +++ - jaka imunoreaktivnost.

Uzorak imunoreaktivnosti, tj. ekspresije neuroplastina po regijama mozga nije promijenjen kada su uspoređivani mišji mozgovi DT i 5xFAD, međutim ukupna imunoreaktivnost neuroplastina je smanjena u kori velikog mozga i hipokampusu mišjeg modela 5xFAD u dobi 10-15 mjeseci s uznapredovalim neurodegenerativnim promjenama. U bijeloj tvari nije zabilježena imunoreaktivnost neuroplastina (Tablica 5, Slika 4). Razlika u imunoreaktivnosti se može primijetiti između dobnih skupina, odnosno kod starijih jedinki obje skupine je smanjena ekspresija neuroplastina u odnosu na mlađu skupinu.



Slika 4. Prikaz imunohistokemijskog bojenja s protutijelom mNp, koje prepoznaje obje izoforme neuroplastina, na rezovima mozgovia divljeg tipa (lijevo) i miševa 5xFAD (desno). Fotografije pod a i b prikazuju prereze miševa dobne skupine 4-6 mjeseci, dok c i d prikazuju dobnu skupinu 10-15 mjeseci. 5xFAD: mišji model za Alzheimerovu bolest.

Analiza imuoreaktivnosti PMCA na mišjim mozgovima DT i 5xFAD ne pokazuje razliku u uzorku imunoreaktivnosti između skupina. Imunoreaktivnosti nije detektirana u bijeloj tvari, dok u kori velikog mozga, hipokampusu i malom mozgu nije zabilježena značajna razlika u intenzitetu imunoreaktivnosti između DT i 5xFAD te dobnih skupina (Tablica 5, Slika 5).



Slika 5. Prikaz imunohistokemijskog bojenja s protutijelom pPMCA, koje prepoznaje sve 4 izoforme PMCA, na rezovima mozga divljeg tipa (lijevo) i miševa 5xFAD (desno). Fotografije pod a i b prikazuju prereze miševa dobne skupine 4-6 mjeseci te c i d prikazuju dobnu skupinu 10-15 mjeseci. PMCA – plazmamembranska kalcijaska ATP-aza, 5xFAD – mišji model za Alzheimerovu bolest.

Tablica 5. Semikvantitativna analiza imunohistokemijskog bojenja moždanih rezova miševa divljeg tipa i miševa 5xFAD s protutijelom mNp i pPMCA.

Dob i vrsta miša		PROTUTIJELO							
		mNp				pPMCA			
		Kora velikog mozga	Hipo-kampus	Mali mozak	Bijela tvar	Kora velikog mozga	Hipo-kampus	Mali mozak	Bijela tvar
4-6 mjeseci	Divlji tip	+++	+++	++	0	++	++	++	0
	5xFAD	++/+++	++/+++	++	0	++	++	++	0
10-15 mjeseci	Divlji tip	++/+++	++/+++	++	0	++	++	++	0
	5xFAD	++	++	+/++	0	++	++	++	0

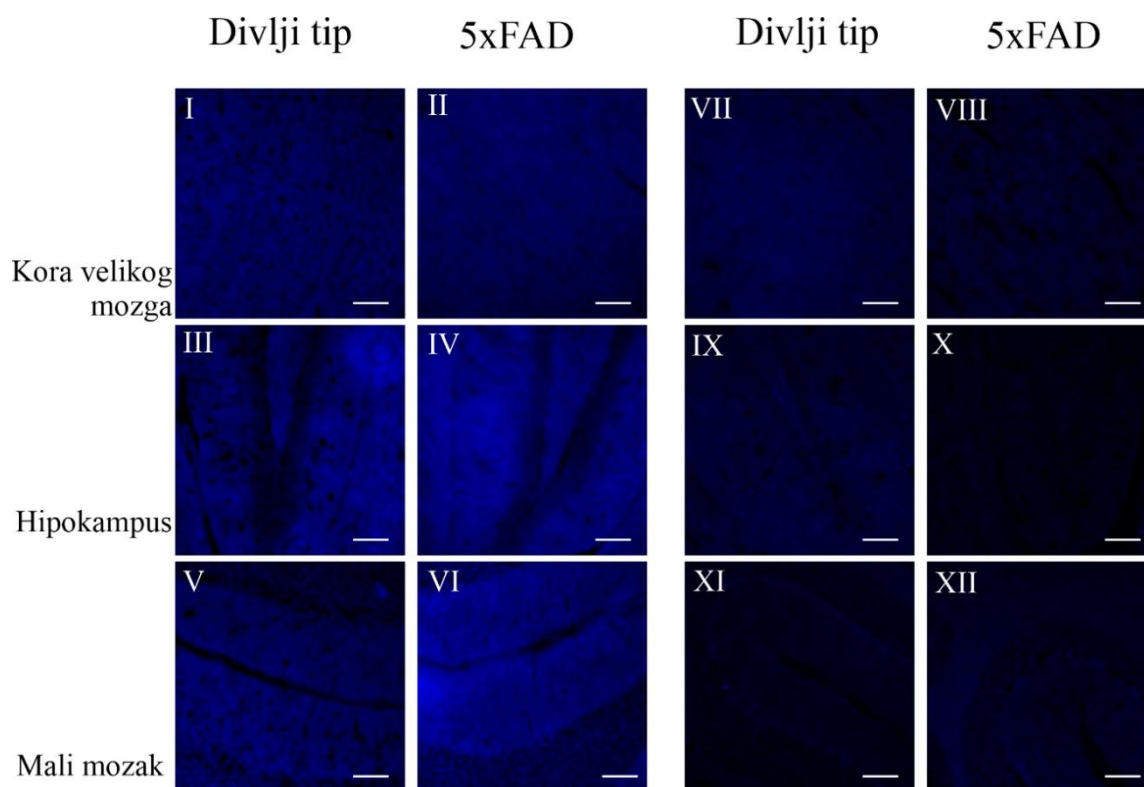
0 – nema reaktivnosti, + - slaba imunoreaktivnost, ++ - srednja imunoreaktivnost, +++ - jaka imunoreaktivnost. 5xFAD – mišji model za Alzheimerovu bolest, PMCA - plazma membranska kalcijaska ATP-aza, mNp: neuroplastin iz miša.

4.2 Analiza ekspresije neuroplastina i plazma membranske kalcijske ATP-aze kod miševa divljeg tipa i modela za Alzheimerovu bolest imunofluorescentnim bojenjem

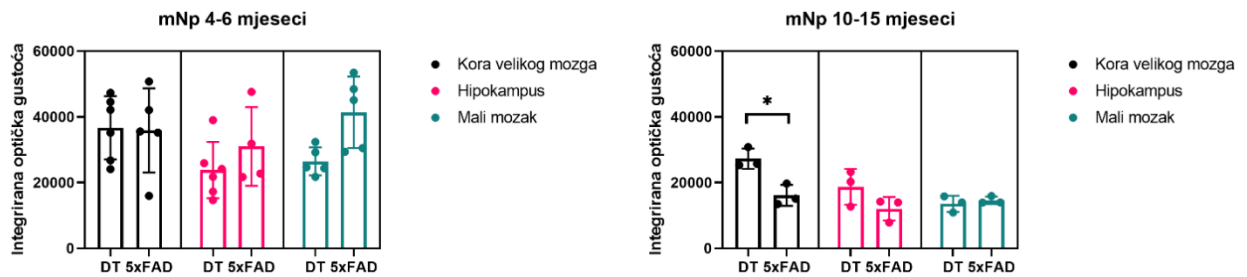
Da bismo detaljnije analizirali ekspresiju obje izoforme neuroplastina i PMCA u tkivu je napravljeno dodatno bojenje imunofluorescentnom metodom. Analizirani su sagitalni rezovi miševa 5xFAD i odgovarajućih kontrola oba spola i dvije dobne skupine, 4-6 i 10-15 mjeseci te u 3 različite moždane regije: kora velikog mozga, hipokampus i mali mozak (Slika 6, Slika 8, Slika 10). Imunofluorescencija je kvantificirana u *ImageJ* programu.

Izoforme neuroplastina su analizirane korištenjem dva protutijela: protutijelo anti-mNp (Slika 6) i protutijelo anti-Np65 (Slika 8). Protutijelo anti-mNp prepoznaje obje izoforme (Np65 i Np55) i veže se za dio strukture neuroplastina koji je identičan u obje izoforme te se na imunohistokemijskoj razini ne može odrediti koju je izoformu protutijelo prepoznalo. Zbog toga smo koristili dodatno protutijelo (anti-Np65) koje prepoznaje treću Ig domenu karakterističnu za Np65.

Analiza imunoreaktivnosti neuroplastina pokazuje trend pada imunoreaktivnosti sa starenjem u svim regijama miševa divljeg tipa i 5xFAD. Kod miševa starosti 4-6 mjeseci u malom mozgu i hipokampusu je zabilježeno povećanje imunoreaktivnosti u miševima 5xFAD u odnosu na miševе divljeg tipa, dok u kori velikog mozga nema razlike u imunoreaktivnosti. Nadalje, kod starijih životinja, u odnosu na divlji tip, miševi 5xFAD pokazuju smanjenje imunoreaktivnosti u hipokampusu i kori velikog mozga gdje je razlika statistički značajna (Studentov *t-test*, $p < 0,05$) dok u regiji malog mozga razlika nije zabilježena (Slika 6 i Slika 7).

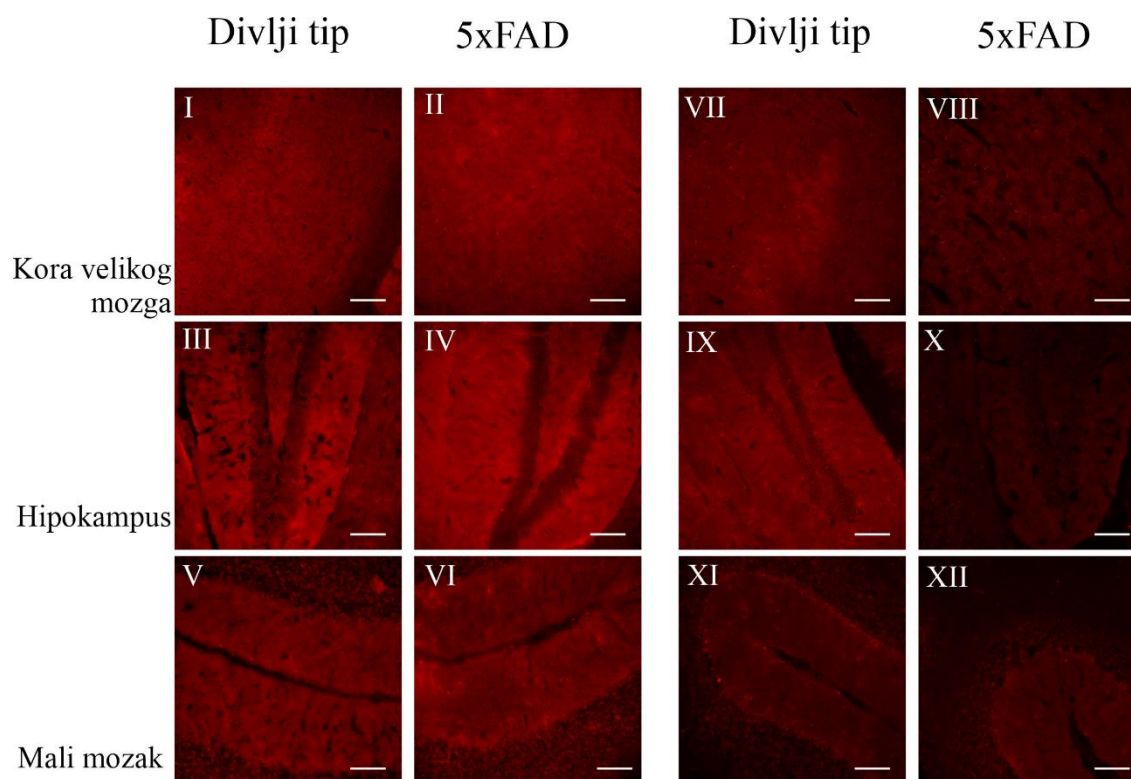


Slika 6. Prikaz imunofluorescentnog bojenja prereza mozgovia mišjeg modela za Alzheimerovu bolest (5xFAD) i miševa divljeg tipa (DT) s protutijelom mNp koje prepoznaje obje izoforme neuroplastina. Prikazane su regije velikog mozga (I, II, VII, VIII), hipokampusa (III, IV, IX, X) i malog mozga (V, VI, XI, XII). Za svaku regiju usporedno su prikazane obje skupine miševa prema dobi od 4-6 (I-VI) i 10-15 mjeseci (VII-XII). 5xFAD – mišji model za Alzheimerovu bolest. Oznaka veličine: 200 μ m.

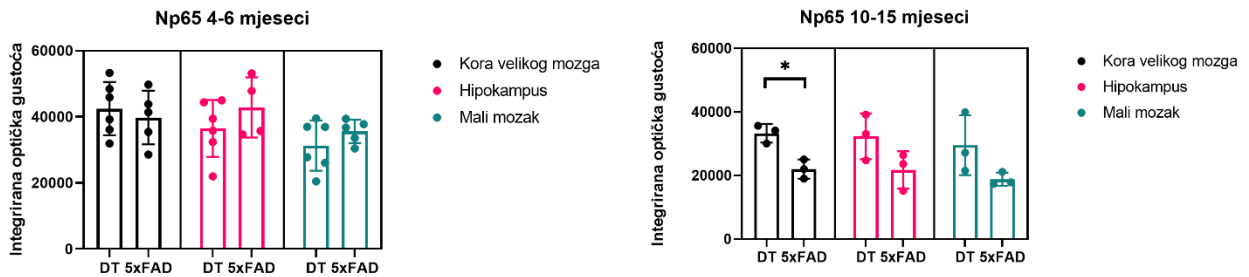


Slika 7. Grafički prikaz integrirane optičke gustoće obje izoforme neuroplastina u kori velikog mozga, malom mozgu i hipokampusu miševa divljeg tipa i miševa 5xFAD. Graf lijevo prikazuje miševe starosti 4-6 mjeseci (broj uzoraka (N) miševa divljeg tipa = 9, miševa 5xFAD = 7), a graf desno skupinu od 10-15 mjeseci (N miševa divljeg tipa = 9, N miševa 5xFAD = 9). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. $*=p<0,05$ (Studentov *t*-test), DT – divlji tip miševa, 5xFAD – mišji model za Alzhemirovu bolest, mNp - neuroplastin iz miša.

Analiza intenziteta imunoreaktivnosti izoforme Np65 u miševa starosti 10-15 mjeseci pokazuje statistički značajno smanjenje imunoreaktivnosti u kori velikog mozga miševa 5xFAD u odnosu na divlji tip. Također, u odnosu na divlji tip, u miševima 5xFAD je zabilježeno smanjenje reaktivnosti i u ostalim analiziranim regijama (Slika 8 i Slika 9).

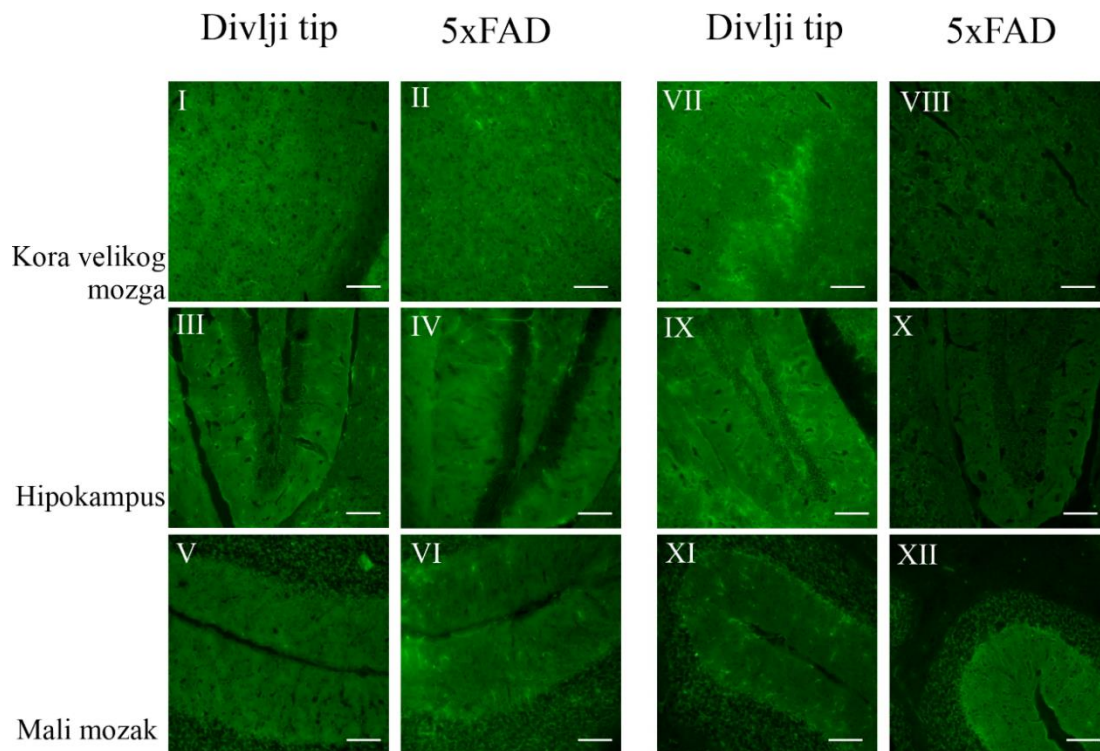


Slika 8. Prikaz imunofluorescentnog bojenja prereza mozgova 5xFAD miša i divljeg tipa (DT) s protutijelom Np65 koje prepoznaje izoformu neuroplastina specifičnu za moždano tkivo. Prikazane su regije velikog mozga (I, II, VII, VIII), hipokampusa (III, IV, IX, X) i malog mozga (V, VI, XI, XII). Za svaku regiju usporedno su prikazane obje skupine miševa prema dobi od 4-6 (I-VI) i 10-15 mjeseci (VII-XII). 5xFAD – mišji model za Alzheimerovu bolewt. Oznaka veličine: 200 μ m.

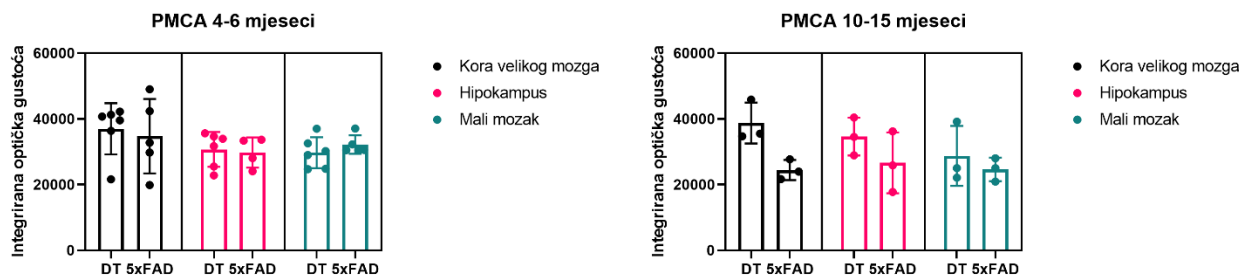


Slika 9. Grafički prikaz integrirane optičke gustoće Np65 u kori velikog mozga, malom mozgu i hipokampusu miševa divljeg tipa i miševa 5xFAD. Graf lijevo prikazuje miševe starosti 4-6 mjeseci (broj uzoraka (N) miševa divljeg tipa = 9, miševa 5xFAD = 7), a graf desno skupinu od 10-15 mjeseci (N miševa divljeg tipa = 9, N miševa 5xFAD = 9). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. *= $p < 0,05$, Studentov *t*-test, DT – divlji tip miševa, 5xFAD – mišji model za Alzhemirovu bolest, Np65 – neuroplastin 65.

U miševa dobi 10-15 mjeseci kvantifikacija imunofluorescentnog signala pokazuje smanjenje intenziteta za protutijelo pPMCA u miševima 5xFAD u odnosu na divlji tipa gdje je, kao i kod neuroplastina, najveća razlika zabilježena u kori velikog mozga. U mlađih miševa u svim analiziranim regijama mozga nije pokazana razlika u intenzitetu signala između oba tipa miševa. Trend smanjenja imunoreaktivnosti između dobnih skupina u svim regijama je pokazan u miševima 5xFAD, a najveća razlika je vidljiva u kori velikog mozga. U divljem tipu miševa nije pokazana razlika u imunoreaktivnosti između dviju dobnih skupina (Slika 10 i Slika 11).



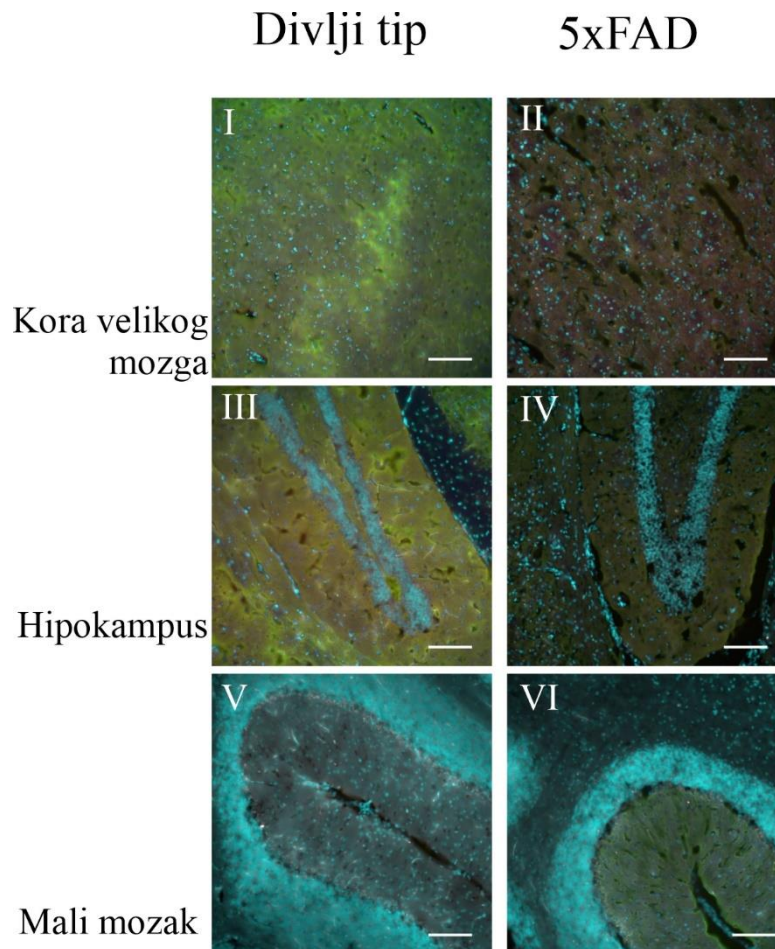
Slika 10. Prikaz imunofluorescentnog bojenja prereza mozгова 5xFAD miša i divljeg tipa (DT) s protutjelom pPMCA koje prepoznaje sve 4 izoforme PMCA. Prikazane su regije velikog mozga (I, II, VII, VIII), hipokampusa (III, IV, IX, X) i malog mozga (V, VI, XI, XII). Za svaku regiju usporedno su prikazane obje skupine miševa prema dobi od 4-6 (I-VI) i 10-15 mjeseci (VII-XII). Oznaka veličine: 200 μm . 5xFAD – mišji model za Alzheimerovu bolest.



Slika 11. Grafički prikaz integrirane optičke gustoće PMCA u kori velikog mozga, malom mozgu i hipokampusu miševa divljeg tipa i miševa 5xFAD. Graf lijevo prikazuje miševe starosti 4-6 mjeseci (broj uzoraka (N) miševa divljeg tipa = 9, miševa 5xFAD = 7), a graf desno skupinu od 10-15 mjeseci (N miševa divljeg tipa = 9, N miševa 5xFAD = 9). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. DT – divlji tip miševa, 5xFAD – mišji model za Alzheimerovu bolest, PMCA – plazma membranska kalcijaska ATP-aza.

4.3 Analiza kolokalizacije neuroplastina i plazma membranske kalcijске ATP-aze u mozgu miša divljeg tipa i mišjeg modela za Alzheimerovu bolest

Preklapanje imunosignala svih analiziranih proteina (Slika 12) pokazuje preklapanje lokalizacije izoformi neuroplastina i PMCA u kori velikog mozga, hipokampusu i malom mozgu miševa divljeg tipa i 5xFAD.



Slika 12. Prikaz imunofluorescentne reaktivnosti izoformi neuroplastina i PMCA u moždanim regijama: kora velikog mozga (I i II), hipokampus (III i IV) i mali mozak (V i VI), u divljem tipu miša (I, III, V) i mišjem modelu 5xFAD (II, IV, VI) dobne skupine 10-15 mjeseci. Np65 - crvena boja, mNp - plava boja, pPMCA - zelena boja, DAPI - tirkizna boja. 5xFAD – mišji model za Alzheimerovu bolest. Oznaka veličine: 200 μ m.

5. Rasprava

Tijekom neurodegeneracije dolazi do narušavanja funkcije različitih staničnih sustava i mehanizama od kojih se neki aktiviraju kao odgovor pomoću kojeg se stanica odupire promjenama nastalim patološkim procesom. Tako je poznato da se u neurodegeneraciji mijenja ekspresija biljega stanične plastičnosti, koje ubrajamo u molekule stanične adhezije, što se može protumačiti kao pokušaj reorganizacije tkiva u neurodegeneraciji (Mikkonen i sur., 2001). Jedan od takvih biljega je i transmembranski glikoprotein neuroplastin koji sudjeluje u velikom broju procesa, koji su molekularna osnova za procese pamćenja i učenja, kao što su izrast neurita, ekscitacija neurona te sinaptička plastičnost (Beesley i sur., 2013.). Za procese učenja i pamćenja nove sinapse nastaju indukcijom LTP-a, mehanizma za koji je neophodan neuroplastin (Smalla i sur., 2000).

U ovom radu analiziran je ekspresija obje izoforme neuroplastina u različitim regijama mozga transgeničnog miša 5xFAD, modela za obiteljski oblik AD-a i pripadajućih kontrola divljeg tipa. Miševi 5xFAD imaju 5 mutacija u genima za proteine APP i PSEN1 koje su pronađene u obiteljskom obliku AD-a i prekomjerno stvaraju i nakupljaju velike količine A β u neuronima te plakove razvijaju već u dobi od dva mjeseca (Oakley i sur., 2006). Ekspresija obje izoforme neuroplastina se pratio imunohistokemijskom i imunofluorescentnom metodom. Dosad objavljeni rezultati pokazuju kako je Np55 izoforma specifična za mali mozak, dok ekspresija i imunoreaktivnost Np65 u ovoj regiji nije zabilježena (Marzban i sur., 2003), međutim u ovome radu smo pokazali da se u malome mozgu može detektirati Np65 izoforma, ali je Np55 dominantna izoforma. Ovo je vidljivo kada je napravljeno bojenje na tkivnim rezovima korištenjem specifičnog Np65 protutijela.

Rezultati svih provedenih metoda pokazuju značajno smanjenje ekspresije izoforme Np65 u kori velikog mozga i hipokampusu 5xFAD miševa u odnosu na divlji tip. Ovi rezultati proširuju analizu neuroplastinskih izoformi i PMCA u 5xFAD miševa (Ilić, 2018) jer su za analize imunofluorescentne imunoreaktivnosti korišteni rezovi sveukupno 34 životinje iz različitih dobnih skupina. Ovi rezultati potvrđuju preliminarne rezultate iz navedene doktorske disertacije. Smanjenje imunoreaktivnosti neuroplastina pronađeno u ovome radu je u suprotnosti s objavljenim rezultatima promjene u ekspresiji Np65 koji su dobiveni na ljudskim prerezima hipokampusa zahvaćenog sporadičnim oblikom AD-a. Na ljudskim prerezima pokazano je povećanje razine Np65 u ranijoj fazi bolesti što bi se moglo protumačiti kao pokušaj tkiva da oporavi sustave nužne za stvaranje ili održavanje pamćenja (Ilić, 2018; Ilic i sur., 2019). Neslaganje rezultata navedenih istraživanja bi se moglo objasniti upotrebom različitih modela s različitim oblikom AD-a. U ovome radu su analizirana mišja tkiva modela za obiteljsku AD, dok je u objavljenom radu analizirano ljudsko hipokampalno tkivo zahvaćeno sporadičnom AD. Kako se i dalje ne zna uzrok bolesti, moguće je da ova dva oblika imaju različite uzroke nastanka te različite mehanizme i odgovor na neurodegeneraciju. Isto tako u mišjem modelu je genetski uvjetovana hiperprodukcija toksičnih produkata zbog čega se već u ranoj dobi mogu primijetiti

posljedice nakupljanja A β , gubitak sinapsi i neurona te je moguće da ne postoji ili su preskočeni mehanizmi kojima tkivo odgovara na promjene nastale neurodegeneracijom u ranim fazama sporadične bolesti. Imunohistokemijska i imunofluorescentna analiza Np55 pokazuju smanjenje ekspresije u kori velikog mozga i hipokampusu miševa 5xFAD u odnosu na divlji tip. Kako smo koristili protutijelo koje prepoznaje obje izoforme, ovo smanjenje dominantno pripisujemo izoformi Np65.

Dodatna potvrda ovih rezultata je napravljena metodom Western blot, kojom se mogu kvantificirati obje izoforme pojedinačno. Analiza Np65 izoforme u frakciji membranskih proteina u potpunosti potvrđuje imunohistokemijske i imunofluorescentne rezultate (statistički značajan pad ekspresije u kori velikog mozga, trend smanjenja u hipokampusu). Kvantifikacija Np55 u ukupnim membranskim proteinima ne pokazuje veće promjene u ekspresiji u kori velikog mozga i hipokampusu, dok u malom mozgu 5xFAD miševa starije dobne skupine dolazi do povećanja u odnosu na divlji tip. Rezultati metode Western blot nisu prikazani jer su u potpunosti u skladu s već objavljenim rezultatima analize membranskih proteina u 5xFAD mišjem modelu (Ilić, 2018). Pokazano je da u malom mozgu dolazi do nakupljanja amiloidnih plakova (Braak i sur., 1989) te da određene regije malog mozga pokazuju atrofiju u pacijenata s AD-om (Guo i sur., 2016). Povećanje ekspresije Np55 u malom mozgu miševa 5xFAD bi mogao biti odgovor na neuropatološke promjene uzrokovanih AD-om.

Mogućnost održavanja optimalne unutarstanične koncentracije Ca²⁺ je bitno svojstvo stanice, koje joj omogućuje preživljavanje i signalizaciju ovisnu o Ca²⁺. Promijenjena regulacija unutarstanične koncentracije Ca²⁺ zbog poremećaja u radu Ca²⁺ pumpi, kao što je PMCA, je još jedan od faktora koji karakterizira AD (Bezprozvanny i sur., 2008). Normalnim starenjem se smanjuje aktivnost PMCA, a ekspresija ostaje nepromijenjena (Zaidi i sur., 1998), no to nije slučaj u AD-u, gdje dolazi do njegovog smanjenja. Nadalje, pokazano je da se PMCA povezuje u heterokompleks s molekulama stanične adhezije, neuroplastinom ili baziginom. Ove pomoćne podjedinice su odgovorne za regulaciju ekspresije, stabilnost, ATP-aznu aktivnost i pozicioniranje PMCA u membrani (Schmidt i sur., 2017). Isto tako pokazano je da u mišjim modelima s narušenom ili smanjenom ekspresijom Np65 dolazi i do smanjenja ekspresije svih izoformi PMCA (Herrera-Molina i sur., 2017). Dosad poznati rezultati i smanjenje ekspresije Np65 u 5xFAD modelu, koje je pokazano u ovom radu, impliciraju da bi se ekspresija PMCA mogla mijenjati u mišjem modelu za AD. Zbog toga smo imunofluorescentnom metodom pratili lokalizaciju i kvantificirali ekspresiju PMCA. Analiza je pokazala da u kori velikog mozga dolazi do smanjenja ekspresije PMCA u miševima 5xFAD u odnosu na divlji tip, ali za razliku od Np65, smanjenje PMCA nije statistički značajno. Također u hipokampusu smanjenje PMCA prati trend pada ekspresije Np65. Dodatno bi se trebale analizirati sve izoforme PMCA jer je u literaturi pokazano da o Np65 najviše ovise PMCA1 i 4 (Korthals i sur., 2017; Herrera-Molina i sur., 2017). Preklapanje imunofluorescentnih signala neuroplastina i PMCA potvrđuje njihovu kolokalizaciju navedenu u literaturi

(Schmidt i sur., 2017) i vjerojatnu ulogu neuroplastina u pozicioniranju PMCA u membrani neurona. Također, opisana ovisnost ekspresije neuroplastina i PMCA bi mogla biti potvrda uloge neuroplastina u regulaciji ekspresije ATP-aze i njihove funkcionalne povezanosti, no kako bi se potvrdila eventualna promjena u funkciji PMCA dodatno bi se trebala analizirati njezina aktivnost. Isto tako, treba uzeti u obzir da PMCA osim s neuroplastinom može stvarati funkcionalni heterokompleks i s baziginom (Schmidt i sur., 2017), zbog čega bi trebalo analizirati dolazi li do promjene njegove ekspresije u modelu 5xFAD te istražiti bi li on mogao biti dodatan mehanizam očuvanja aktivnosti PMCA i posljedična regulacija unutarstaničnog Ca^{2+} .

Sveukupno rezultati ovog rada i dosad objavljena literatura upućuju na to da je neuroplastin potreban za normalnu ekspresiju i lokalizaciju PMCA u membrani preko koje sudjeluje u regulaciji unutarstanične koncentracije Ca^{2+} . Poremećena ekspresija neuroplastina u AD može predstavljati molekularnu osnovu za simptome gubitka pamćenja kao i promijenjenu regulaciju unutarstaničnog kalcija.

Zaključno, normalna ekspresija i membransko pozicioniranje neuroplastina je važno za optimalno funkcioniranje sinapsi, kao i za održavanje adekvatne razine unutarstaničnog kalcija preko PMCA, a gubitak neuroplastina može biti dio patofiziološke kaskade Alzheimerove bolesti. Za buduća istraživanja i otkrivanje konačne uzročno-posljedične kaskade patologije bolesti nužno je, osim analize svakog pojedinog faktora, istražiti i njihova udružena međudjelovanja.

6. Zaključci

- U kori velikog mozga i hipokampusu transgeničnog miša 5xFAD, modela za obiteljski oblik Alzheimerove bolesti, u usporedbi s divljim tipom, dolazi do smanjenja ekspresije izoforme Np65. Smanjenje ekspresije neuroplastina može predstavljati molekularnu osnovu za poremećaj u procesu pamćenja.
- Kompozicija imunofluorescentnih signala potvrđuje kolokalizaciju neuroplastina i PMCA u svim regijama mozga.
- U odnosu na divlji tip miševa, u kori velikog mozga i hipokampusu miševa 5xFAD smanjenje ekspresije neuroplastina prati i smanjenje ekspresije PMCA što potvrđuje njihovu funkcionalnu povezanost.
- Rezultati ovog rada upućuju na to da ekspresija i membransko pozicioniranje PMCA ovisi o neuroplastinu te da bi obje komponente mogle imati ulogu u razvoju složenih kaskada neurodegeneracije i patologije Alzheimerove bolesti. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se odredilo u kojoj su mjeri njihova funkcionalna ovisnost i interakcija odgovorne za promjene karakteristične za neurodegeneraciju.

7. Literatura

- Altmann, A., Tian, L., Henderson, V. W., Greicius, M. D. (2014). Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer disease. *Annals of Neurology*, 75(4), 563-573.
- Amuti, S., Tang, Y., Wu, S., Liu, L., Huang, L., Zhang, H., Yuan, Q. (2016). Neuroplastin 65 mediates cognitive functions via excitatory/inhibitory synapse imbalance and ERK signal pathway. *Neurobiology of Learning and Memory*, 127, 72-83.
- Ashford, J. W. (2004). APOE Genotype Effects on Alzheimer's Disease Onset and Epidemiology. *Journal of Molecular Neuroscience*, 23(3), 157-166.
- Braak, H., Braak, E., Bohl, J., Lang, W. (1989). Alzheimer's disease: amyloid plaques in the cerebellum. *Journal of the Neurological Sciences*, 93(2-3), 277-287.
- Beesley, P., Kraus, M., Parolaro, N. (2013). The Neuroplastins: Multifunctional Neuronal Adhesion Molecules - Involvement in Behaviour and Disease. *Cell Adhesion Molecules*, 61-89.
- Belloy, M. E., Napolioni, V., Greicius, M. D. (2019). A quarter century of APOE and Alzheimer's disease: progress to date and the path forward. *Neuron*, 101(5), 820-838.
- Bernstein, H.-G., Smalla, K.-H., Bogerts, B., Gordon-Weeks, P. R., Beesley, P. W., Gundelfinger, E. D., Kreutz, M. R. (2007). The immunolocalization of the synaptic glycoprotein neuroplastin differs substantially between the human and the rodent brain. *Brain Research*, 1134, 107-112.
- Berrocal, M., Corbacho, I., Vázquez-Hernández, M., Ávila, J., Sepúlveda, M. R., Mata, A. M. (2015). Inhibition of PMCA activity by tau as a function of aging and Alzheimer's neuropathology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(7), 1465-1476.
- Berrocal, M., Marcos, D., Sepúlveda, M. R., Pérez, M., Ávila, J., Mata, A. M. (2009). Altered Ca²⁺ dependence of synaptosomal plasma membrane Ca²⁺-ATPase in human brain affected by Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, 23(6), 1826-1834.
- Bezprozvanny, I., Mattson, M. P. (2008). Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*, 31(9), 454-463.
- Bhattacharya, S., Herrera-Molina, R., Sabanov, V., Ahmed, T., Iscru, E., Stöber, F., Montag, D. (2017). Genetically Induced Retrograde Amnesia of Associative Memories After Neuroplastin Ablation. *Biological Psychiatry*, 81(2), 124-135.
- Black, D. L. (2003). Mechanisms of Alternative Pre-Messenger RNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), 291-336.

- Boros, B. D., Greathouse, K. M., Gentry, E. G., Curtis, K. A., Birchall, E. L., Gearing, M., Herskowitz, J. H. (2017). Dendritic spines provide cognitive resilience against Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 82(4), 602-614.
- Boyken, J., Gronborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Jahn, R., Chua, J. J. E. (2013). Molecular Profiling of Synaptic Vesicle Docking Sites Reveals Novel Proteins but Few Differences between Glutamatergic and GABAergic Synapses. *Neuron*, 78(2), 285-297.
- Brandt, P., Ibrahim, E., Bruns, G.A., Neve, R.L., (1992). Determination of the nucleotide sequence and chromosomal localization of the ATP2B2 gene encoding human Ca⁽²⁺⁾-pumping ATPase isoform PMCA2. *Genomics*, 14, 484-487.
- Brini M, Cali T, Ottolini D, Carafoli E. (2012). Calcium pumps: why so many? *Comprehensive Physiology* 2(2), 1045-1060.
- Brini, M., Cali, T., Ottolini, D., Carafoli, E. (2014). Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(15), 2787-2814.
- Brini, M., Carafoli, E. (2009). Calcium Pumps in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 89(4), 1341-1378.
- Brini, M., Carafoli, E. (2010). The Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase and the Plasma Membrane Sodium Calcium Exchanger Cooperate in the Regulation of Cell Calcium. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(2), a004168-a004168.
- Brodin, P., Falchetto, R., Vorherr, T., Carafoli, E. (1992). Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca²⁺ pump. *European Journal of Biochemistry*, 204(2), 939-946.
- Burette, A. C., Strehler, E. E., Weinberg, R. J. (2009). "Fast" plasma membrane calcium pump PMCA2a concentrates in GABAergic terminals in the adult rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 512(4), 500-513.
- Burette, A., Weinberg, R. J. (2006). Perisynaptic organization of plasma membrane calcium pumps in cerebellar cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 500(6), 1127-1135.
- Cali, T., Brini, M., Carafoli, E. (2017). Regulation of Cell Calcium and Role of Plasma Membrane Calcium ATPases. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 259-296.
- Caride, A. J., Filoteo, A. G., Penniston, J. T., Strehler, E. E. (2007). The Plasma Membrane Ca²⁺Pump Isoform 4a Differs from Isoform 4b in the Mechanism of Calmodulin Binding and Activation Kinetics. *Journal of Biological Chemistry*, 282(35), 25640-25648.

- Chen, X., Lin, R., Chang, L., Xu, S., Wei, X., Zhang, J., Wang, Q. (2013). Enhancement of long-term depression by soluble amyloid β protein in rat hippocampus is mediated by metabotropic glutamate receptor and involves activation of p38MAPK, STEP and caspase-3. *Neuroscience*, 253, 435-443.
- Chiry, O., Fishbein, W. N., Merezhinskaya, N., Clarke, S., Galuske, R., Magistretti, P. J., Pellerin, L. (2008). Distribution of the monocarboxylate transporter MCT2 in human cerebral cortex: An immunohistochemical study. *Brain Research*, 1226, 61-69.
- Desrivières, S., Lourdasamy, A., Tao, C., Toro, R., Jia, T., Schumann, G. (2014). Single nucleotide polymorphism in the neuroplastin locus associates with cortical thickness and intellectual ability in adolescents. *Molecular Psychiatry*, 20(2), 263-274.
- DeVos, S. L., Corjuc, B. T., Oakley, D. H., Nobuhara, C. K., Bannon, R. N., Chase, A., Hyman, B. T. (2018). Synaptic Tau Seeding Precedes Tau Pathology in Human Alzheimer's Disease Brain. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 267.
- Empson, R. M., Buckby, L. E., Kraus, M., Bates, K. J., Crompton, M. R., Gundelfinger, E. D., Beesley, P. W. (2006). The cell adhesion molecule neuroplastin-65 inhibits hippocampal long-term potentiation via a mitogen-activated protein kinase p38-dependent reduction in surface expression of GluR1-containing glutamate receptors. *Journal of Neurochemistry*, 99(3), 850-860.
- Empson, R. M., Huang, H., Nagaraja, R. Y., Roome, C. J., Knöpfel, T. (2013). Enhanced Synaptic Inhibition in the Cerebellar Cortex of the Ataxic PMCA2^{-/-} Knockout Mouse. *The Cerebellum*, 12(5), 667-675.
- Fernandes, D., Zaidi, A., Bean, J., Hui, D., Michaelis, M. L. (2007). RNAi- induced silencing of the plasma membrane Ca²⁺- ATPase 2 in neuronal cells: effects on Ca²⁺ homeostasis and cell viability. *Journal of Neurochemistry*, 102(2), 454-465.
- Fleisher, A. S., Chen, K., Liu, X., Ayutyanont, N., Roontiva, A., Thiyyagura, P., Reiman, E. M. (2013). Apolipoprotein E ϵ 4 and age effects on florbetapir positron emission tomography in healthy aging and Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*, 34(1), 1-12.
- Frazier, H. N., Maimaiti, S., Anderson, K. L., Brewer, L. D., Gant, J. C., Porter, N. M., hibault, O. (2017). Calcium's role as nuanced modulator of cellular physiology in the brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(4), 981-987.
- Garcia, M. ., Murray, K. ., Garcia, V. ., Strehler, E. ., Isackson, P. (1997). Seizure-induced alterations of plasma membrane calcium ATPase isoforms 1, 2 and 3 mRNA and protein in rat hippocampus. *Molecular Brain Research*, 45(2), 230-238.
- Garcia, M. L., Usachev, Y. M., Thayer, S. A., Strehler, E. E., Windebank, A. J. (2001). Plasma membrane calcium ATPase plays a role in reducing Ca²⁺-mediated cytotoxicity in PC12 cells. *Journal of Neuroscience Research*, 64(6), 661-669.

- Gibbons, G. S., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q. (2018). Mechanisms of Cell-to-Cell Transmission of Pathological Tau. *JAMA Neurology*.
- Gong, D., Chi, X., Ren, K., Huang, G., Zhou, G., Yan, N., Zhou, Q. (2018). Structure of the human plasma membrane Ca²⁺-ATPase 1 in complex with its obligatory subunit neuroplastin. *Nature Communications*, 9(1), 3623.
- Gotz, J., Schonrock, N., Vissel, B., Ittner, L. M. (2009). Alzheimer's Disease Selective Vulnerability and Modeling in Transgenic Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 18(2), 243-251.
- Guo, C. C., Tan, R., Hodges, J. R., Hu, X., Sami, S., Hornberger, M. (2016). Network-selective vulnerability of the human cerebellum to Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Brain*, 139(5), 1527-1538.
- Herrera-Molina, R., Mlinac-Jerkovic, K., Ilic, K., Stöber, F., Vemula, S. K., Sandoval, M., Montag, D. (2017). Neuroplastin deletion in glutamatergic neurons impairs selective brain functions and calcium regulation: implication for cognitive deterioration. *Scientific Reports*, 7(1), 7273.
- Herrera-Molina, R., Sarto-Jackson, I., Montenegro-Venegas, C., Heine, M., Smalla, K.-H., Seidenbecher, C. I., Montag, D. (2014). Structure of Excitatory Synapses and GABAAR Receptor Localization at Inhibitory Synapses Are Regulated by Neuroplastin-65. *Journal of Biological Chemistry*, 289(13), 8973-8988.
- Ilić, Katarina. Povezanost sastava gangliozida i izražaja neuroplastina s neurodegenerativnim promjenama, (2018), doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Zagreb
- Ilic, K., Mlinac-Jerkovic, K., Jovanov-Milosevic, N., Simic, G., Habek, N., Bogdanovic, N., Kalanj-Bognar, S. (2019). Hippocampal expression of cell-adhesion glycoprotein neuroplastin is altered in Alzheimer's disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(2), 1602-1607.
- Inoue, Y., Matsumura, Y., Inoue, K., Ichikawa, R., Takayama, C. (1993). Abnormal synaptic architecture in the cerebellar cortex of a new dystonic mutant mouse, Wriggle Mouse Sagami. *Neuroscience Research*, 16(1), 39-48.
- Ito, M. (2002). The molecular organization of cerebellar long-term depression. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(11), 896-902.
- Jacob, T. C., Moss, S. J., Jurd, R. (2008). GABAA receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(5), 331-343.
- Jiang, L., Bechtel, M. D., Galeva, N. A., Williams, T. D., Michaelis, E. K., Michaelis, M. L. (2012). Decreases in plasma membrane Ca²⁺-ATPase in brain synaptic membrane rafts from aged rats. *Journal of Neurochemistry*, 123(5), 689-699.

- Kawasaki, H., Springett, G. M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Graybiel, A. M. (1998). A Family of cAMP-Binding Proteins That Directly Activate Rap1. *Science*, 282(5397), 2275-2279.
- Kip, S. N., Strehler, E. E. (2007). Rapid Downregulation of NCX and PMCA in Hippocampal Neurons Following H₂O₂ Oxidative Stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1099(1), 436-439.
- Koffie, R. M., Hashimoto, T., Tai, H.-C., Kay, K. R., Serrano-Pozo, A., Joyner, D., Spires-Jones, T. L. (2012). Apolipoprotein E4 effects in Alzheimer's disease are mediated by synaptotoxic oligomeric amyloid- β . *Brain*, 135(7), 2155-2168.
- Korthals, M., Langnaese, K., Smalla, K.H., K€ahne, T., Herrera-Molina, R., Handschuh, J., Lehmann, A.C., Mamula, D., Naumann, M., Seidenbecher, C. (2017). A complex of Neuroplastin and Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase controls T cell activation. *Scientific Reports*, 7, 8358.
- Kozel, P. J., Friedman, R. A., Erway, L. C., Yamoah, E. N., Liu, L. H., Riddle, T., Shull, G. E. (1998). Balance and Hearing Deficits in Mice with a Null Mutation in the Gene Encoding Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase Isoform 2. *Journal of Biological Chemistry*, 273(30), 18693-18696.
- Krebs, J., Michalak, M., 2007. Calcium: A Matter of Life or Death. Elsevier, Oxford, UK. Krizaj, D., Demarco, S.J., Johnson, J., Strehler, E.E., Copenhagen, D.R., 2002. Cell-specific expression of plasma membrane calcium ATPase isoforms in retinal neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 451, 1-21,
- Kumar, S. T., Leppert, J., Bellstedt, P., Wiedemann, C., F€andrich, M., G€orlach, M. (2016). Solvent Removal Induces a Reversible β -to- α Switch in Oligomeric A β Peptide. *Journal of Molecular Biology*, 428(2), 268-273.
- Langnaese, K., Beesley, P. W., Gundelfinger, E. D. (1997). Synaptic membrane glycoproteins gp65 and gp55 are new members of the immunoglobulin superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 272(2), 821-827.
- Lesting, J., Daldrup, T., Narayanan, V., Himpe, C., Seidenbecher, T., Pape, H. C. (2013). Directional Theta Coherence in Prefrontal Cortical to Amygdalo-Hippocampal Pathways Signals Fear Extinction. *PLoS ONE*, 8(10), e77707.
- Marques-da-Silva, D., Gutierrez-Merino, C. (2014). Caveolin-rich lipid rafts of the plasma membrane of mature cerebellar granule neurons are microcompartments for calcium/reactive oxygen and nitrogen species cross-talk signaling. *Cell Calcium*, 56(2), 108-123.
- Marzban, H., Khanzada, U., Shabir, S., Hawkes, R., Langnaese, K., Smalla, K.-H., Beesley, P. W. (2003). Expression of the immunoglobulin superfamily neuroplastin adhesion molecules in adult and

developing mouse cerebellum and their localisation to parasagittal stripes. *The Journal of Comparative Neurology*, 462(3), 286-301.

- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 15056.
- McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Konrad Vbeyreuther, Masters, C. L. (1999). Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 46(6), 860-866.
- Mikkonen, M., Soininen, H., Tapiola, T., Alafuzoff, I., Miettinen, R. (1999). Hippocampal plasticity in Alzheimer's disease: changes in highly polysialylated NCAM immunoreactivity in the hippocampal formation. *European Journal of Neuroscience*, 11(5), 1754-1764.
- Mullan, M., Houlden, H., Windelspecht, M., Fidani, L., Lombardi, C., Diaz, P., et al. (1992). A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1- antichymotrypsin gene. *Nature Genetics*, 2(4), 340-342.
- Muramatsu T., Miyauchi, T. (2003). Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histology Histopathology*, 18(1), 981-987.
- Nussbaum, R. L., Ellis, C. E. (2003). Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*, 348(14), 1356-1364.
- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Vassar, R. (2006). Intraneuronal beta-Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *Journal of Neuroscience*, 26(40), 10129-10140.
- Oceandy, D., Mohamed, T. M. A., Cartwright, E. J., Neyses, L. (2011). Local signals with global impacts and clinical implications: Lessons from the plasma membrane calcium pump (PMCA4). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(5), 974-978.
- Oveisgharan, S., Arvanitakis, Z., Yu, L., Farfel, J., Schneider, J. A., & Bennett, D. A. (2018). Sex differences in Alzheimer's disease and common neuropathologies of aging. *Acta Neuropathologica*, 136(6), 887-900.
- Owczarek, S., Soroka, V., Kiryushko, D., Larsen, M. H., Yuan, Q., Sandi, C., i sur. (2011). Neuroplastin-65 and a mimetic peptide derived from its homophilic binding site modulate neurogenesis and neuronal plasticity. *Journal of Neurochemistry*, 117(6), 984-994.
- Owczarek, S., Berezin, V. (2012). Neuroplastin: Cell adhesion molecule and signaling receptor. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(1), 1-5.

- Pandya, V., Patani, R. (2021). Region-specific vulnerability in neurodegeneration: lessons from normal ageing. *Ageing Research Reviews*, 67, 101311.
- Peng, S., Zhang, Y., Zhang, J., Wang, H., Ren, B. (2010). ERK in Learning and Memory: A Review of Recent Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(1), 222-232.
- Pessoa, L. (2008). On the relationship between emotion and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(2), 148-158.
- Pottorf, W. J., Johanns, T. M., Derrington, S. M., Strehler, E. E., Enyedi, A., Thayer, S. A. (2006). Glutamate-induced protease-mediated loss of plasma membrane Ca²⁺ pump activity in rat hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*, 98(5), 1646-1656.
- Querfurth, H. W., LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 329-344.
- Ramanan V. K., Saykin, A. J. (2013). Pathways to neurodegeneration: mechanistic insights from GWAS in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and related disorders. *American Journal of Neurodegenerative Disease*, 2(3), 145-175.
- Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., George-Hyslop, P. H. S. (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*, 376(6543), 775-778.
- Roome, C. J., Empson, R. M. (2012). The Contribution of the Sodium-Calcium Exchanger (NCX) and Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase (PMCA) to Cerebellar Synapse Function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 961, 251-263.
- Saito, A., Fujikura-Ouchi, Y., Kuramasu, A., Shimoda, K., Akiyama, K., Matsuoka, H., Ito, C. (2007). Association study of putative promoter polymorphisms in the neuroplastin gene and schizophrenia. *Neuroscience Letters*, 411(3), 168-173.
- Sarto-Jackson, I., Milenkovic, I., Smalla, K.-H., Gundelfinger, E. D., Kaehne, T., Herrera-Molina, R., Sieghart, W. (2012). The Cell Adhesion Molecule Neuroplastin-65 Is a Novel Interaction Partner of γ -Aminobutyric Acid Type A Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 287(17), 14201-14214.
- Schmidt, N., Kollwe, A., Constantin, C. E., Henrich, S., Ritzau-Jost, A., Bildl, W., Schulte, U. (2017). Neuroplastin and Basigin Are Essential Auxiliary Subunits of Plasma Membrane Ca²⁺ -ATPases and Key Regulators of Ca²⁺ Clearance. *Neuron*, 96(4), 827-838.e9.
- Sherkhane, P., Kapfhammer, J. P. (2013). The Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase2 (PMCA2) Is Involved in the Regulation of Purkinje Cell Dendritic Growth in Cerebellar Organotypic Slice Cultures. *Neural Plasticity*, 2013, 1-7.

- Smalla, K.-H., Angenstein, F., Richter, K., Gundelfinger, E. D., Staak, S. (1998) Identification of fucose alpha(1-2) galactose epitope-containing glycoproteins from rat hippocampus. *NeuroReport*, 9(5), 813-817.
- Smalla, K.-H., Matthies, H., Langnaese K., Shabir, S., Bockers, T. M., Wyneken, U., Staak, S., Krug, M., Beesley, P. W., Gundelfinger, E. D. (2000). The synaptic glycoprotein neuroplastin is involved in long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(8), 4327-4332.
- Smirnov, D. S., Galasko, D., Hansen, L. A., Edland, S. D., Brewer, J. B., Salmon, D. P. (2019). Trajectories of cognitive decline differ in hippocampal sclerosis and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 75, 169-177.
- Soria Lopez, J., Gonzalez, H., Leger, G. (2019). "Alzheimer's disease" in DeKosky, S.T., Asthana, S. *Handbook of Clinical Neurology*, (167), 231-255.
- Stafford, N., Wilson, C., Oceandy, D., Neyses, L., Cartwright, E. J. (2017). The Plasma Membrane Calcium ATP-ases and Their Role as Major New Players in Human Disease. *Physiological Reviews*, 97(3), 1089-1125.
- Stauffer, T. P., Guerini, D., Carafoli, E. (1995). Tissue Distribution of the Four Gene Products of the Plasma Membrane Ca Pump. *Journal of Biological Chemistry*, 270(20), 12184-12190.
- Strehler, E.E., Filoteo, A.G., Penniston, J.T., and Caride, A.J. (2007). Plasma-membrane Ca(2+) pumps: structural diversity as the basis for functional versatility. *Biochemical Society Transactions*, 35, 919-922.
- Szemraj, J., Kawecka, I., Bartkowiak, J., Zylinska. L. (2004). The effect of antisense oligonucleotide treatment of plasma membrane Ca(2+)-ATPase in PC12 cells. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 9, 451-464.
- Tai, L. M., Balu, D., Avila-Munoz, E., Abdullah, L., Thomas, R., Collins, N. LaDu, M. J. (2017). EFAD transgenic mice as a human APOE relevant preclinical model of Alzheimer's disease. *Journal of Lipid Research*, 58(9), 1733-1755.
- Tidow, H., Poulsen, L. R., Andreeva, A., Knudsen, M., Hein, K. L., Wiuf, C., Nissen, P. (2012). A bimodular mechanism of calcium control in eukaryotes. *Nature*, 491(7424), 468-472.
- Tiffert, T., Lew, V. L. (2011). Elevated intracellular Ca²⁺ reveals a functional membrane nucleotide pool in intact human red blood cells. *The Journal of General Physiology*, 138(4), 381-391.
- Toyoshima, C., Nomura, H., (2002). Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature*, 418, 605-611.

- Ueno, T., Kameyama, K., Hirata, M., Ogawa, M., Hatsuse, H., Takagaki, Y., Kudo, Y. (2002). A mouse with a point mutation in plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2 gene showed the reduced Ca²⁺ influx in cerebellar neurons. *Neuroscience Research*, 42(4), 287-297.
- Vemula, S. K., Malci, A., Junge, L., Lehmann, A.-C., Rama, R., Hradsky, J., Herrera-Molina, R. (2020). The Interaction of TRAF6 With Neuroplastin Promotes Spinogenesis During Early Neuronal Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 579513.
- Wilson, M. C., Kraus, M., Marzban, H., Sarna, J. R., Wang, Y., Hawkes, R., Beesley, P. W. (2013). The neuroplastin adhesion molecules are accessory proteins that chaperone the monocarboxylate transporter MCT2 to the neuronal cell surface. *PLoS ONE*, 8(11), e78654.
- Yuan Q., Li H. (2017). Functions and dysfunctions of neuroplastin65 in the nervous system. *Stem Cell Research & Therapy*, 3(2), 253-257.
- Zaidi, A., Fernandes, D., Bean, J. L., Michaelis, M. L. (2009). Effects of paraquat-induced oxidative stress on the neuronal plasma membrane Ca²⁺-ATPase. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(10), 1507-1514.
- Zanni, G., Cali, T., Kalscheuer, V. M., Ottolini, D., Barresi, S., Lebrun, N., Carafoli, E. (2012). Mutation of plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoform 3 in a family with X-linked congenital cerebellar ataxia impairs Ca²⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(36), 14514-14519.
- Zlokovic, B. V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(12), 723-738.
- <http://www.alzforum.org/research-models/5xfad>

8. Životopis

Antonia Oršulić rođena je 1.9.1995. u Zagrebu. Nakon završetka općeg gimnazijskog obrazovanja u Vinkovcima, 2014. upisuje Odjel za biologiju u Osijeku. Nakon završenog prvostupničkog stupnja, 2018. upisuje diplomski studij molekularne biologije. Tijekom studija sudjelovala je u različitim znanstveno popularizacijskim projektima kao što su „Biolog i ja“, „Tjedan mozga“ i „Noć biologije“. 2019. godine priključuje se na praksu te izradu diplomskog rada u Laboratoriju za molekularnu neurobiologiju i neurokemiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga i Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje usvaja mnoge vještine.