

# Analiza supstrata enzima BACE1 u endosomalnim frakcijama moždanih regija miševa NPC1<sup>-/-</sup> i divljeg tipa miša (NPC1<sup>+/+</sup>)

---

Meglaj, Sarah

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:819821>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Sarah Meglaj

ANALIZA SUPSTRATA ENZIMA BACE1 U  
ENDOSOMALNIM FRAKCIJAMA MOŽDANIH REGIJA  
MIŠEVA *NPC1*<sup>-/-</sup> I DIVLJEG TIPA MIŠA (*NPC1*<sup>+/+</sup>)

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za istraživanje neurodegenerativnih bolesti na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, pod voditeljstvom doc. dr. sc. Silve Katušić Hećimović te suvoditeljstvom dr. sc. Julije Erhardt. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

*Zahvaljujem mentorici, dr. sc. Silvi Katušić Hećimović na trudu, profesionalnosti, pristupačnosti te pomoći tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada. Iznimno sam zahvalna što sam imala priliku izraditi diplomski rad u laboratoriju za istraživanje neurodegenerativnih bolesti pod njenim stručnim vodstvom.*

*Hvala dr. sc. Juliji Erhardt na strpljenju, razumijevanju i riječima motivacije.*

*Hvala curama iz labosa na uvijek ugodnoj i veseloj atmosferi, a najveće hvala Ani Rastiji na velikom trudu, pomoći, strpljenju i svemu što me naučila.*

*Veliko hvala cijeloj mojoj obitelji i prijateljima, a posebno mami, tati i sestri što su uvijek bili tu za mene. Hvala vam za sve razgovore i šetnje i za sve riječi podrške, ali i ohrabrenja i utjehe kada je bilo potrebno.*

*Luka, hvala ti što si uvijek bio uz mene i što si vjerovao da mogu i onda kada ja nisam.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## ANALIZA SUPSTRATA ENZIMA BACE1 U ENDOSOMALNIM FRAKCIJAMA MOŽDANIH REGIJA MIŠEVA $NPC1^{-/-}$ I DIVLJEG TIP A MIŠA ( $NPC1^{+/+}$ )

Sarah Meglaj

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Niemann-Pickova bolest tipa C (NPC) nasljedna je, rijetka neurodegenerativna bolest nakupljanja lipida uzrokovana mutacijama u genu  $NPC1$ , a rjeđe  $NPC2$ . NPC dijeli niz karakteristika s kompleksnom Alzheimerovom bolesti (AB), ukazujući na postojanje zajedničkih patoloških procesa. Neke od zajedničkih karakteristika su disfunkcija endolizosomalnog puta te nedavno otkrivena povećana proteoliza supstrata  $\beta$ -sekretaze (BACE1) – enzima ključnog u patogenezi AB. Cilj rada bio je ispitati hipotezu da je povećana proteoliza supstrata BACE1 u moždanim regijama miševa  $NPC1$  ( $NPC1^{-/-}$ ) u odnosu na miševe divljeg tipa (WT,  $NPC1^{+/+}$ ) posljedica nakupljanja supstrata i/ili enzima BACE1 u endosomima – organelima odgovornima za cijepanje BACE1. Metodom ultracentrifugiranja u diskontinuiranom gradijentu saharoze, izdvojene su frakcije ranih endosoma te kasnih endosoma/lizosoma iz malog mozga i hipokampus a devet tjedana starih miševa  $NPC1$  i WT te su analizirane metodom *western blotting*, a dobiveni signali kvantificirani su softverom *ImageJ*. Rezultati pokazuju različitu distribuciju i razinu biljega ranih endosoma i kasnih endosoma/lizosoma u moždanim regijama  $NPC1$  u odnosu na WT miševe. Također, uočeno je značajno nakupljanje BACE1 supstrata  $Sez6L$  u ranim endosomima moždanih regija miševa  $NPC1$  vs. WT. Zaključno, rezultati ukazuju da je Alzheimeru sličan fenotip u bolesti NPC jednim dijelom vjerojatno posljedica poremećaja transporta u endolizosomalnom putu te nakupljanja i povećanja cijepanja supstrata BACE1 u endosomima.

(48 stranica, 13 slika, 3 tablice, 64 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Niemann-Pickova bolest tipa C, Alzheimerova bolest, frakcioniranje, endosomi

Voditelj: doc. dr. sc. Silva Katušić Hećimović,

Suvoditelj: dr. sc. Julija Erhardt, viši predavač

Ocjenitelji: dr. sc. Julija Erhardt, viši predavač

izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

prof. dr. sc. Biljana Balen

zamjena: doc. dr. sc. Romana Gračan

Rad prihvaćen: 24.6.2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Master thesis

### DISTRIBUTION OF BACE1 SUBSTRATES IN THE ENDOSOMAL FRACTIONS ISOLATED FROM THE BRAIN REGIONS OF *NPC1*<sup>-/-</sup> DISEASE MOUSE MODEL AND WILD TYPE MICE (*NPC1*<sup>+/+</sup>)

Sarah Meglaj

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Niemann-Pick type C disease (NPC) is a rare, inherited, neurodegenerative lipid storage disorder caused by mutations in *NPC1* or *NPC2* gene. NPC shares several features with the complex Alzheimer's disease (AD), including endolysosomal dysfunction and the increased proteolysis of the substrates of  $\beta$ -secretase (BACE1), a key protease in AD pathogenesis. The goal of this work was to test the hypothesis that increased proteolysis of BACE1 substrates in brain regions of NPC1 (*NPC1*<sup>-/-</sup>) compared to wild-type mice (WT, *NPC1*<sup>+/+</sup>) is due to accumulation of BACE1 substrates and/or enzyme BACE1 in endosomes. Ultracentrifugation in a discontinuous sucrose gradient was used to isolate fractions of early and late endosomes/lysosomes from the cerebellum and hippocampus of nine-week-old NPC1 and WT mice. The fractions were analyzed by western blotting, and the obtained signals were quantified using ImageJ software. Different distribution and level of markers of early and late endosomes/lysosomes in the brain regions of NPC1 vs. WT mice was observed. Also, significant accumulation of BACE1 substrate Sez6L was detected in early endosomes in brains of NPC1 mice. In conclusion, the results suggest that the Alzheimer-like phenotype in NPC disease is likely due to endolysosomal dysfunction causing accumulation and increased cleavage of BACE1 substrates in endosomes.

(48 pages, 13 figures, 3 tables, 64 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in the Central Biological Library

Key words: Alzheimer's disease, Niemann-Pick type C disease, fractionation, endosomes

Supervisor: dr. Silva Katušić Hećimović, Asst. Prof.

Cosupervisor: dr. Julija Erhardt

Reviewers: Dr. Julija Erhardt

Assoc. Prof. Jasna Lajtner

Prof. Biljana Balen

Substitution: Asst. Prof. Romana Gračan

Thesis accepted: 24.6.2021.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Niemann-Pickova bolest tipa C .....	1
1.1.1. Proteini NPC1 i NPC2.....	2
1.1.2. Mehanizam djelovanja proteina NPC1 i NPC2.....	3
1.2. Alzheimerova bolest .....	5
1.2.1. Molekularna osnova Alzheimerove bolesti .....	6
1.3. Poveznica bolesti NPC i Alzheimerove bolesti .....	8
1.4. $\beta$ -sekretaza i terapijski potencijal .....	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	11
3. MATERIJALI I METODE .....	12
3.1. MATERIJALI.....	12
3.2. METODE.....	15
3.2.1. Homogenizacija tkiva i frakcioniranje endosoma u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze .....	15
3.2.2. Mjerenje koncentracije proteina – BCA.....	16
3.2.3. ANALIZA WESTERN BLOTTING .....	16
3.2.4. Određivanje razine kolesterola.....	19
4. REZULTATI.....	21
4.1. Uspostava metode razdvajanja vezikula endolizosomalnog puta centrifugiranjem u diskontinuiranom gradijentu saharoze.....	21
4.2. Analiza razine i distribucije biljega ranih endosoma i kasnih endosoma/lizosoma u razdvojenim frakcijama malog mozga devet tjedana starih miševa WT i NPC1 .....	24
4.3. Analiza razine i distribucije supstrata i enzima BACE1 u razdvojenim endosomalnim frakcijama malog mozga devet tjedana starih miševa WT i NPC1 .....	27
4.4. Preliminarna analiza razine i distribucije biljega ranih endosoma i kasnih endosoma/lizosoma u razdvojenim frakcijama hipokampusa devet tjedana starih miševa WT i NPC1 .....	30
4.5. Preliminarna analiza razine i distribucije supstrata i enzima BACE1 u razdvojenim endosomalnim frakcijama hipokampusa devet tjedana starih miševa WT i NPC1.....	33
5. RASPRAVA .....	36
6. ZAKLJUČAK .....	39
LITERATURA.....	40
ŽIVOTOPIS .....	48

## POPIS KRATICA:

A $\beta$  – peptid beta-amiloid

AB – Alzheimerova bolest (eng. *Alzheimer's disease*)

ApoE – apolipoprotein E

APP – amiloidni prekursorski protein (eng. *amyloid precursor protein*)

APP<sub>fl</sub> – od eng. *full-length amyloid precursor protein*

APS – amonijev persulfat

BACE1 – od eng.  *$\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*

BCA – bicinhoninska kiselina (eng. *bicinchoninic acid*)

BSA – goveđi serumski albumin (eng. *bovine serum albumin*)

CatD – katepsin D

DTT - ditiotreitol

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

HB – homogenizacijski pufer

HRP – peroksidaza iz hrena (eng. *horseradish peroxidase*)

LDL – lipoproteinske čestice niske gustoće (eng. *low density lipoprotein*)

NFT – neurofibrilni snopić (eng. *neurofibrillary tangle*)

NPC – Niemann-Pickova bolest tipa C

NPC1 – protein Niemann-Pick tipa C1

NPC2 – protein Niemann-Pick tipa C2

PBS – fosfatni pufer (eng. *phosphate buffer saline*)

PHF – spareni helikalni filamenti (eng. *paired helical filaments*)

PS1 – presenilin 1

reH<sub>2</sub>O – redestilirana voda

RIPA – od eng. *radio-immunoprecipitation assay*

sAPP $\alpha/\beta$  – topivi N-terminalni odsječci proteina APP nastali djelovanjem  $\alpha$ -, odnosno  $\beta$ -sekretaze (eng. *soluble APP $\alpha/\beta$* )

SDS – natrijev dodecilsulfat

Sez6 – od eng. *seizure protein 6*

Sez6L – od eng. *seizure 6-like protein*

TBS-T – Tris-solni pufer s Tweenom (eng. *Tris buffered saline – Tween*)

TEMED – tetrametiletildiamin



# 1. UVOD

Lizosomske bolesti nakupljanja (eng. *lysosomal storage diseases*) skupina su od 70-ak monogenских poremećaja koje karakterizira disfunkcija lizosoma, a većina kojih se nasljeđuje autosomno recesivno. To su genetički i klinički heterogene bolesti koje se mogu pojaviti u odrasloj dobi, no najčešće se javljaju kao pedijatrijski neurodegenerativni poremećaji koji su često popraćeni visceromegalijom<sup>1</sup> (Parenti i sur., 2015; Platt i sur., 2018). Uzrokuju ih mutacije gena koji kodiraju za različite lizosomske enzime (npr. lizosomske glikozidaze i proteaze) i lizosomske integralne membranske proteine, što dovodi do poremećenog procesiranja i razgradnje supstrata, narušenog transporta lipida i metabolita te progresivne akumulacije nerazgrađenih ili djelomično razgrađenih makromolekula unutar lizosoma. Navedeni poremećaji u konačnici uzrokuju oštećenje stanica, staničnu disfunkciju i/ili staničnu smrt.

Kao skupina, lizosomske bolesti nakupljanja učestale su, s incidencijom 1:5,000 do 1:5,500, no pojedinačno su to rijetke bolesti s procijenjenom incidencijom 1:50,000 do 1:250,000 novorođenčadi (Meikle i sur., 1999). Stanična patogeneza ovih bolesti kompleksna je i još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Primjer takve bolesti jest Niemann-Pickova bolest tipa C (NPC), kod koje gubitak normalne funkcije NPC1 proteina (uslijed mutacije u genu *NPC1*), a rjeđe proteina NPC2 (u 5% slučajeva, uslijed mutacije u genu *NPC2*), dovodi do akumulacije kolesterola i sfingolipida u kasnim endosomima i lizosomima, disfunkcije lizosoma i progresivne neurodegeneracije prvenstveno Purkinjeovih neurona u malom mozgu te značajne neuroinflamacije. Međutim, molekularna osnova pojave neurodegeneracije i neuroinflamacije u bolesti NPC, kao i interakcije između njih još uvijek nije razjašnjena. Interesantno je da niz staničnobioloških poremećaja u bolesti NPC dijeli zajedničke karakteristike s Alzheimerovom bolesti (Auer i sur., 1995; Platt i sur., 2018), ukazujući da u pozadini ovih dviju etiološki različitih bolesti, NPC (monogenske rijetke autosomno recesivne bolesti) i AB (najčešće kompleksne neurodegenerativne bolesti), mogu biti zajednički molekularno stanični putevi.

## 1.1. *Niemann-Pickova bolest tipa C*

Niemann-Pickova bolest tipa C (NPC) je autosomno recesivni, neurovisceralni poremećaj nakupljanja lipida (Bräuer i sur., 2019; Hammond i sur., 2019). To je rijetka bolest koja se javlja u 1:120,000 do 1:150,000 novorođenčadi, okarakterizirana brojnim visceralnim i neurološkim simptomima, uz progresivnu neurodegeneraciju i značajnu neuroinflamaciju. Klinička slika bolesti NPC izrazito je heterogena te pokazuje značajnu citopatologiju u svim

---

<sup>1</sup> Visceromegalija – povećanje abdominalnih organa, poput jetre i slezene

tkivima, a posebno u mozgu, jetri, slezeni i povremeno u plućima. Heterogenost kliničkih simptoma glavni je razlog kasne, tj. nepravovremene dijagnoze bolesti. Hepatosplenomegalija predstavlja glavnu visceralnu karakteristiku bolesti, dok neurološki simptomi uključuju ataksiju<sup>2</sup>, distoniju<sup>3</sup>, gubitak motoričkih sposobnosti, napadaje, disfagiju<sup>4</sup>, dizartriju<sup>5</sup>, demenciju (Baudry i sur., 2003; Bräuer i sur., 2019; Hammond i sur., 2019).

Što se bolest klinički javlja ranije, to su simptomi teži i izraženiji. Teški slučajevi bolesti podliježu unutar prvih šest mjeseci života zbog posljedica otkazivanja visceralnih organa, dok se pojava bolesti u odrasloj dobi manifestira simptomima sličnima juvenilnoj NPC bolesti, uz dodatnu pojavu psihoza (Geberhiwot i sur., 2018; Rego i sur., 2019; Vanier, 2010). Najčešće bolest pogađa djecu, a smrt nastupa između 10-25 godine života.

Ovu monogensku bolest u 95% slučajeva uzrokuje mutacija gena *NPC1* (Carstea i sur., 1997) koji se nalazi na kromosomu 18q11-12, dok je u ostalim slučajevima uzrok mutacija gena *NPC2* (poznat i kao gen *HEI*), koji je lociran na kromosomu 14q24.3 (Naureckiene i sur., 2000). Oba oblika bolesti klinički su jednaka i okarakterizirana su nakupljanjem slobodnog neesterificiranog kolesterola i drugih lipida u kasnim endosomima/lizosomima (Dixit i sur., 2011). Analiza nakupljanja slobodnog kolesterola u primarnim fibroblastima pacijenata metodom bojanja filipinom koristi se za dijagnosticiranje NPC bolesti. Geni *NPC1/2* visoko su konzervirani (Higaki i sur., 2004; Lopez i Scott, 2013) te su prisutni u većini tkiva sisavaca.

### **1.1.1. Proteini *NPC1* i *NPC2***

Do sada je opisano više od 400 mutacija gena *NPC1* koje uzrokuju bolest NPC (Shammas i sur., 2019). Ekspresijom gena *NPC1* nastaje velik transmembranski glikoprotein od 1278 aminokiselina, molekularne mase 142 kDa (Carstea i sur., 1997; Scott i Ioannou, 2004). Protein NPC1 sadrži 13 transmembranskih domena smještenih na membrani kasnih endosoma i lizosoma (Infante, Radhakrishnan, i sur., 2008; Kobayashi i sur., 1999), od kojih pet predstavlja senzorske domene za sterole (SSD – eng. *sterol sensing domains*). Naime, u transmembranskim domenama 3-7, proteinska sekvencija NPC1 pokazuje homologiju sa senzorskim domenama za sterole proteina koji su esencijalni za održavanje stanične homeostaze kolesterola, poput HMG-CoA (3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A) reduktaze i proteina SCAP (*SREBP cleavage activating protein*) (Neufeld i sur., 1999; Storch i Xu, 2009).

---

<sup>2</sup> Ataksija (eng. *ataxia*) – manjak koordinacije voljnih pokreta

<sup>3</sup> Distonija (eng. *dystonia*) – poremećaj normalnoga mišićnog tonusa koji rezultira nevoljnim kontrakcijama mišića (www.lexico.com)

<sup>4</sup> Disfagija (eng. *dysphagia*) – otežano gutanje (www.enciklopedija.hr)

<sup>5</sup> Dizartrija (eng. *dysarthria*) – poremećaji u motorici govora

Protein NPC1 ima ulogu u retrogradnom transportu slobodnog kolesterola, moguće i proteina, iz kasnih endosoma do drugih staničnih odjeljaka, kao npr. endoplazmatskog retikuluma, *trans*-Golgijske mreže i stanične membrane (Scott i Ioannou, 2004), a pokazao se potrebnim i za prodor virusa ebole u citoplazmu stanice, gdje služi kao unutarstanični receptor nakon što je virus internaliziran (X. Li i sur., 2016).

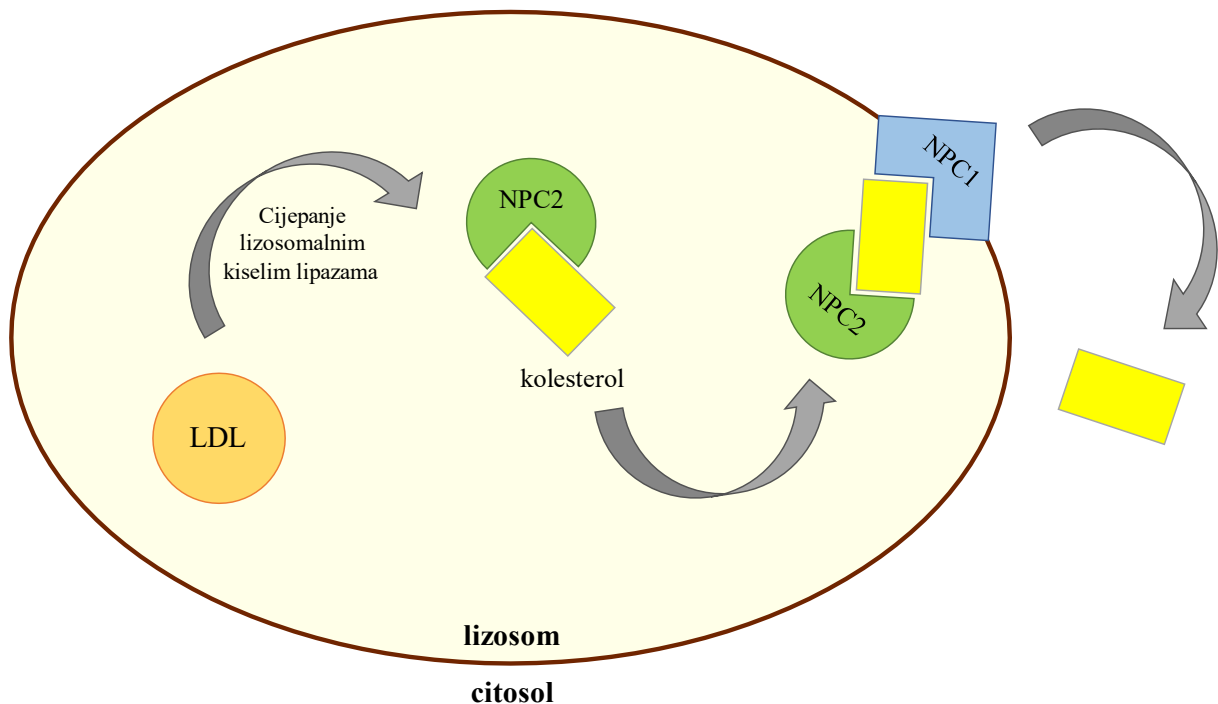
S druge strane, gen *NPC2* (*HE1*) kodira za mali, topivi kolesterol-vezujući glikoprotein NPC2 od 132 aminokiseline, molekularne mase oko 25 kDa, koji se nalazi u lumenu lizosoma. NPC2 sadrži četiri ECR (eng. *evolutionary constrained regions*) regije: A, B, C i D, a regija ECR D odgovorna je za vezanje kolesterola (Ko i sur., 2003; Pfeffer, 2019; Storch i Xu, 2009; Vanier i Millat, 2004). Prvotno je opisan kao protein pasjemenika, gdje sudjeluje u sazrijevanju spermija, no pokazalo se da je prisutan i u većini tkiva, gdje sudjeluje u transportu sterola, ljudskom mlijeku, žuči i plazmi (Naureckiene i sur., 2000; Storch i Xu, 2009; Vanier i Millat, 2004).

### **1.1.2. Mehanizam djelovanja proteina NPC1 i NPC2**

Kolesterol je važan prekursor brojnih biološki aktivnih molekula poput steroidnih hormona i žučnih kiselina te ima važnu ulogu u strukturi i funkciji stanične membrane. Sintetizira se *de novo* u endoplazmatskom retikulumu ili se unosi endocitozom (Storch i Xu, 2009). Iako je amfifilan, kolesterol je slabo topiv u vodenom okolišu, pa su za njegov transport između staničnih odjeljaka potrebni proteinski nosači ili lipoproteinske čestice (X. Li i sur., 2016).

Proteini NPC1 i NPC2 djeluju zajednički kako bi neesterificiranom kolesterolu koji potječe od lipoproteina niske gustoće (LDL – eng. *low density lipoprotein*) olakšali izlazak iz endosomalnih i lizosomalnih odjeljaka (Infante, Wang, i sur., 2008; Kwon i sur., 2009). LDL čestice koje sadrže kolesterol endocitiraju se i prenose do kasnih endosoma i lizosoma, gdje podliježu razgradnji lizosomalnom kiselom lipazom, uz niski pH. Smatra se da NPC2 u lizosomima veže slobodan kolesterol i prenosi ga do N-terminalne domene proteina NPC1. Još uvijek nije poznato kako se kolesterol prenosi od membrane lizosoma do drugih organela, no pretpostavka je da NPC1 „detektira“ povišene razine membranskog kolesterola te signalizira pupanje membrane lizosoma, čime bi se teret prenio do udaljenih odredišta unutar stanice (Bräuer i sur., 2019; Pfeffer, 2016). Također, lizosomi membranskim kontaktnim mjestima ostvaruju direktan fizički kontakt s endoplazmatskim retikulumom, peroksisomima, *trans*-Golgijskom mrežom i mitohondrijima, čime se omogućuje prijenos kolesterola u stanici (Meng i sur., 2020).

Podatci istraživanja Trinh i sur. (2018) podupiru hipotezu o „primopredajnom“ modelu NPC puta prema kojem dolazi do prijenosa lipidnog liganda (kolesterola) s proteina NPC2 na protein NPC1 (slika 1.), a sličnost biokemijskih fenotipova koji su rezultat gubitka jednog od navedenih proteina, podupire model prema kojem su uloge ova dva proteina usko povezane (Dixit i sur., 2011).



**Slika 1.** - Shematski prikaz primopredajnog modela NPC puta. (LDL – lipoproteinska čestica niske gustoće)  
(izrađeno prema: Peake i Vance, 2010)

Gubitak funkcije navedenih proteina, uzrokovan mutacijama odgovarajućih gena, dovodi do poremećaja u transportnom putu lipida i remeti lipidnu homeostazu, što uzrokuje zastoj u prometu lipida (eng. „*lipid traffic jam*“) i njihovo nakupljanje u kasnim endosomima i lizosomima. Lipidi koji se nakupljaju uključuju kolesterol, razne sfingolipide, ganglioziide GM2 i GM3 te glikolipide. Kod većine pacijenata kolesterol i sfingomijelin pretežno se nakupljaju u perifernim tkivima, dok u mozgu prevladava nakupljanje glikosfingolipida. Poremećaj lipidne homeostaze pokreće i patološke procese kao što su manjak kalcija, oksidativni stres, disfunkcija neurona i neurodegeneracija, neuroinflamacija, stanična smrt i slično (Hammond i sur., 2019; Nixon, 2004). Iako neurodegeneracija zahvaća većinu središnjeg živčanog sustava, najznačajniji gubitak stanica vidljiv je u malom mozgu, gdje dolazi do izrazito progresivnog gubitka Purkinjeovih stanica (Bräuer i sur., 2019; H. Li i sur., 2005).

Također, manjak normalne funkcije proteina NPC1/2 dovodi do poremećaja glija stanica koje toksičnim citokinima (npr. IL-1 $\beta$ ) uzrokuju degeneraciju živčanih stanica, dodatno aktivirajući

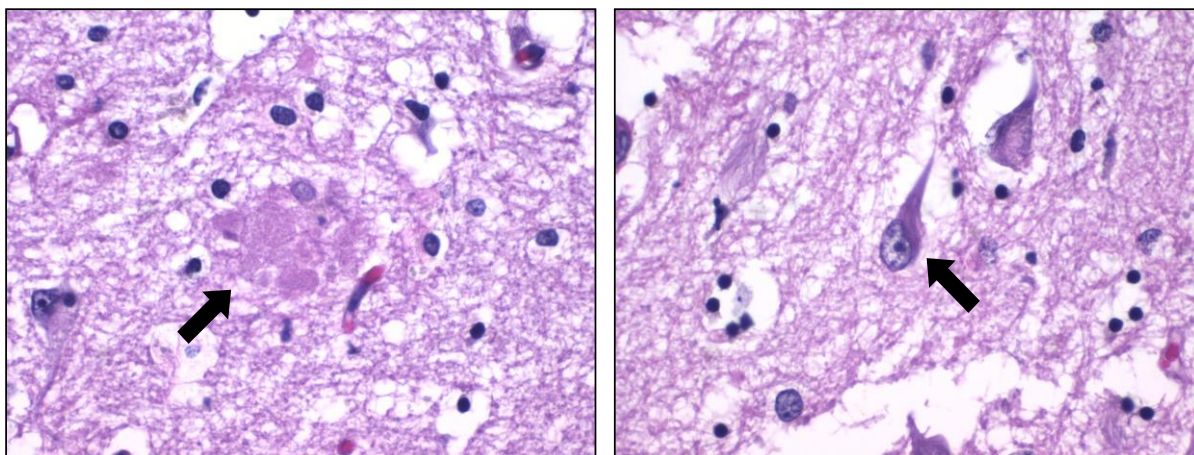
astrocite, čime se pogoršava patologija bolesti. Smatra se da aktivacija mikroglia stanica prethodi neurodegeneraciji, dok su promjene astroglia stanica vjerojatno posljedica degeneracije živčanih stanica (Baudry i sur., 2003).

Trenutno za bolest NPC ne postoji lijek, no iminošećer Miglustat (N-butildeoksinojirimicin) jedina je zasad odobrena terapija u Europi te se koristi kao simptomatska terapija NPC bolesti. Miglustat je mala molekula koja inhibira glikozilceramid sintazu, ključnu komponentu biosinteze glikosfingolipida, čime se smanjuje unutarstanično nakupljanje lipida. Dugoročna terapija Miglustatom pokazala je produljenje životnog vijeka i stabilizaciju neuroloških funkcija bolesnika (Bräuer i sur., 2019).

## **1.2. Alzheimerova bolest**

Alzheimerova bolest (AB) heterogena je bolest kompleksne patologije te je ujedno i najčešći uzrok progresivne demencije, za koju još uvijek ne postoji lijek. Uglavnom zahvaća osobe starije od 65 godina (kasni oblik AB – eng. *late-onset Alzheimer's disease* (LOAD)), dok se rani oblik bolesti (eng. *early-onset Alzheimer's disease* (EOAD)) javlja u samo 5% svih slučajeva AB. Smatra se da na razvoj Alzheimerove bolesti utječe kombinacija različitih rizičnih faktora, uključujući genetičke i okolišne čimbenike. Kao jedan od glavnih genetičkih rizičnih faktora za razvoj AB, pokazao se alel  $\epsilon 4$  apolipoproteina E (*ApoE- $\epsilon 4$* ). Apolipoprotein E (ApoE) glavni je proteinski nosač kolesterola u mozgu. Kod čovjeka postoje tri izoforme – ApoE2, ApoE3 i ApoE4, a alel  $\epsilon 3$  je najčešći i smatra se neutralnim ApoE genotipom. *ApoE- $\epsilon 4$*  povezuje se s povećanim rizikom za razvoj Alzheimerove bolesti, dok se genotip *ApoE- $\epsilon 2$*  smatra protektivnim protiv AB (Malnar i sur., 2014).

Klinički simptomi Alzheimerove bolesti uključuju poremećaje u pamćenju te neuropatološku sliku koja uključuje nakupljanje peptida  $\beta$ -amiloida ( $A\beta$ ) u obliku vanstaničnih senilnih plakova te prisustvo neurofibrilnih snopića (NFT – eng. *neurofibrillary tangles*) (**slika 2.**) i neuropilnih niti (eng. *neuropil threads*), sastavljenih od agregiranog hiperfosforiliranog proteina tau, unutar neurona (Long i Holtzman, 2019; Malnar i sur., 2009).



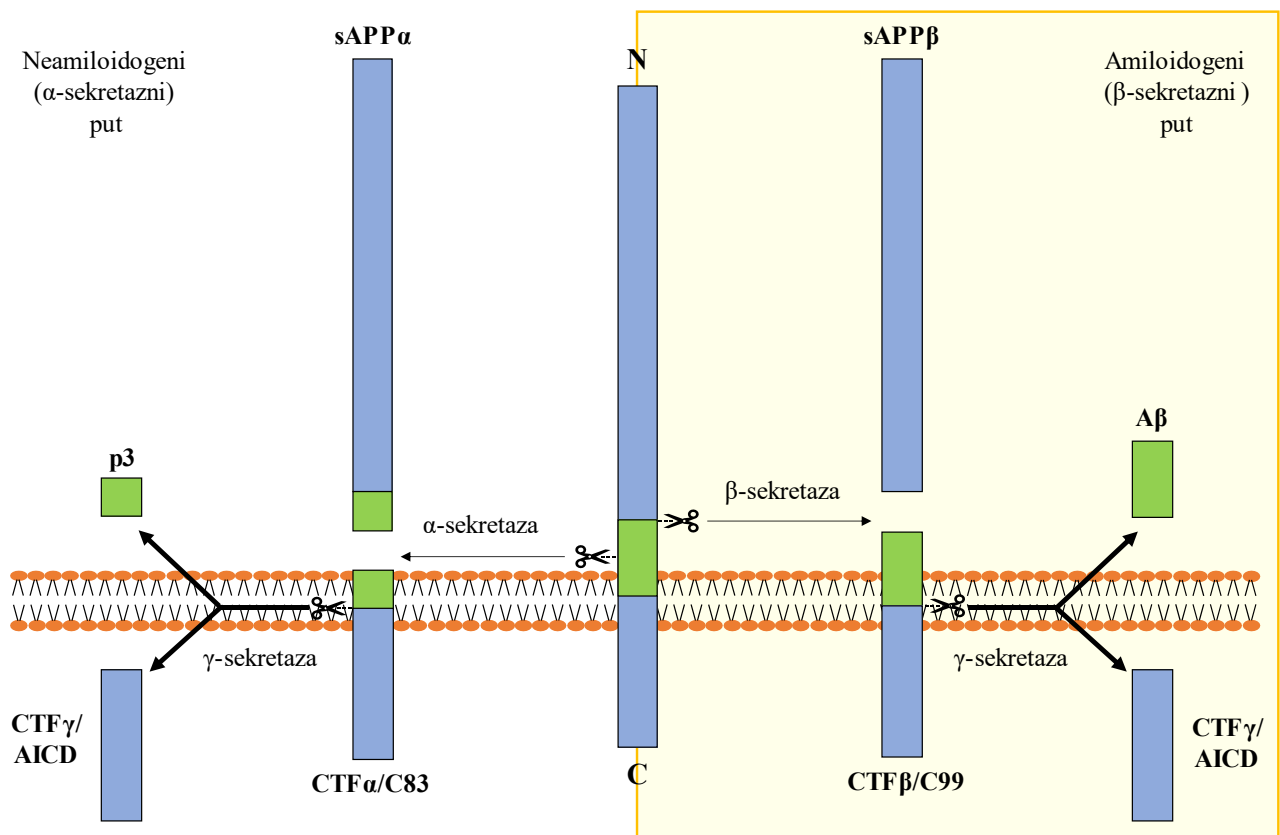
**Slika 2.** - Mikroskopski prikaz amiloidnog plaka (lijevo) i neurofibrilnog snopića (desno)  
(commons.wikimedia.org)

### 1.2.1. *Molekularna osnova Alzheimerove bolesti*

Dominantna hipoteza nastanka Alzheimerove bolesti je hipoteza amiloidne kaskade. Prema hipotezi amiloidne kaskade, peptid A $\beta$  smatra se glavnom molekulom u patogenezi AB, čijom se akumulacijom i agregacijom pokreću patološki procesi bolesti (Jin i sur., 2004; Malnar i sur., 2014). Nedavni rezultati pokazuju da nakupljanje A $\beta$  započinje 10-20 godina prije nastupa demencije, što dodatno ukazuje na kritičnu ulogu A $\beta$  u patogenezi AB (Vassar, 2014). Peptid  $\beta$ -amiloid inače je uobičajen produkt metabolizma svake stanice, no promjenama u metabolizmu amiloidnog prekursorskog proteina (APP), dolazi do povećanog stvaranja i/ili smanjenje razgradnje te nakupljanja A $\beta$  (Malnar i sur., 2010).

Amiloidni prekursorški protein transmembranski je protein koji sadrži kratku C-terminalnu citoplazmatsku domenu i veliku N-terminalnu ektodmenu. U tzv. amiloidogenom putu, koji se primarno odvija u endosomima,  $\beta$ -sekretaza proteolitički cijepa APP, pri čemu nastaju topivi N-terminalni fragment sAPP $\beta$  (eng. *soluble APP $\beta$* ) i C-terminalni fragment C99, vezan za membranu. U alternativnom, neamiloidogenom putu,  $\alpha$ -sekretaza (ADAM10) cijepa unutar A $\beta$  sekvence, čime se onemogućuje nastanak A $\beta$ . Cijepanjem  $\alpha$ -sekretazom nastaje topivi N-terminalni fragment sAPP $\alpha$  (eng. *soluble APP $\alpha$* ) te C-terminalni fragment C83, vezan za membranu. Fragmenti C83 i C99 supstrati su  $\gamma$ -sekretaze, membranskog kompleksa koji se sastoji od četiri proteina: nikastrina, proteina PEN-2 i APH-1 te presenilina (PS1 ili PS2) u aktivnom mjestu kompleksa (Edbauer i sur., 2003). Cijepanje fragmenta C83  $\gamma$ -sekretazom rezultira nastankom neamiloidogenog peptida p3 koji ne pokazuje tendenciju akumulacije i stvaranja plakova, dok cijepanjem C99 fragmenta, nastaju peptidi  $\beta$ -amiloida - A $\beta$ 40 ili A $\beta$ 42 (**slika 3.**) (Burns i sur., 2003; Jin i sur., 2004; Vassar i sur., 1999). Peptidi A $\beta$  nakupljaju se u oligomere i fibrile koji imaju brojne nepovoljne učinke na funkciju neurona, uključujući

poremećaje u sinaptičkoj aktivnosti i gubitak sinapsi te direktno poticanje tau patologije stimulirajući hiperfosforilaciju proteina tau.



**Slika 3.** – Shematski prikaz procesiranja amiloidnog prekursorškog proteina (APP) amiloidogenim, odnosno neamiloidogenim putem. Aβ regija proteina APP označena je zelenom bojom. (Aβ – peptid beta-amiloid; sAPPα/β – topivi N-terminalni odsječci proteina APP nastali djelovanjem α-, odnosno β-sekretaze; CTFα (C83) – C-terminalni odsječak proteina APP sastavljen od 83 aminokiseline nastao djelovanjem α-sekretaze; CTFβ (C99) – C-terminalni odsječak proteina APP sastavljen od 99 aminokiselina nastao djelovanjem β-sekretaze; CTFγ (AICD) – C-terminalni odsječak proteina APP nastao djelovanjem γ-sekretaze; unutarstanična domena proteina APP; p3 – neamiloidogeni peptid) (izrađeno prema Zhang i sur., 2019)

Protein tau topivi je protein koji se nalazi u aksonima živčanih stanica, gdje se veže na mikrotubule i regulira stabilnost citoskeleta. Hiperfosforilacija proteina tau uzrokuje promjene u strukturi mikrotubula te njegovo nakupljanje u obliku neurofibrilnih snopića i neuropilnih niti unutar stanice, što za posljedicu ima poremećenu funkciju neurona i sinapsi. Neurofibrilni snopići i neuropilne niti građene su od sparenih helikalnih filamenata (PHFs – eng. *paired helical filaments*) koje tvori netopivi, hiperfosforilirani protein tau (PHF-tau) (Long i Holtzman, 2019; Malnar i sur., 2009). Neurofibrilni snopići smatraju se jednom od glavnih značajki

Alzheimerove bolesti, iako su prisutni i u brojnim drugim neurodegenerativnim bolestima, tzv. tauopatijama<sup>6</sup>.

Pokazalo se da značajnu ulogu u razvoju Alzheimerove bolesti ima i metabolizam kolesterola (Burns i sur., 2003). Lipidni metabolizam i endocitni transport imaju ključnu ulogu u regulaciji procesiranja APP te se smatra da promjena razine kolesterola indirektno utječe na aktivnost  $\beta$ -sekretaze te na procesiranje APP-a i nastanak fragmenata C99 i A $\beta$  (Jin i sur., 2004; Malnar i sur., 2010). Također, pretpostavlja se da su promjene metabolizma kolesterola i njegovo nakupljanje uzrok stvaranja neurofibrilnih snopića (Distl i sur., 2003; Treiber-Held i sur., 2003).

### **1.3. Poveznica bolesti NPC i Alzheimerove bolesti**

Zanimljivo, Niemann-Pickova bolest tipa C pokazuje niz značajki kompleksne Alzheimerove bolesti (AB), uključujući disfunkciju endolizosomalnog puta, povećanje razine peptida A $\beta$  i C-terminalnog odsječka proteina APP (CTF-APP $\beta$ ) u neuronima, hiperfosforilaciju proteina tau i nastanak neurofibrilnih snopića te utjecaj ApoE genotipa na razvoj bolesti (*ApoE- $\epsilon$ 4* povezuje se s povećanom progresijom bolesti NPC i AB).

Kod većine juvenilnih i odraslih NPC pacijenata, pronađeni su neurofibrilni snopići (NFT) jednaki onima u Alzheimerovoj bolesti. U mozgovima pacijenata koji pate od AB, neurofibrilni snopići bogati PHF-tau filamentima i senilni amiloidni plakovi koegzistiraju, dok su kod NPC pacijenata najčešće prisutni samo NFT bogati PHF-tau filamentima. Godine 2002., kod nekoliko NPC pacijenata pronađene su nakupine A $\beta$  u obliku plakova. Ti pacijenti pokazivali su i snažnu tauopatiju s brojnim neurofibrilnim snopićima u neuronima te su bili homozigoti za alel *ApoE- $\epsilon$ 4*. Pretpostavlja se da mutacije gena *NPC1/2* u kombinaciji s homozigotnim genotipom za alel *ApoE- $\epsilon$ 4* kod NPC pacijenata uzrokuju neuropatologiju sličnu onoj u AB (Auer i sur., 1995; Saito i sur., 2002).

Pokazalo se da nakupljanje kolesterola gubitkom funkcije proteina NPC1/2 utječe na proteolitičku razgradnju APP u ranim endosomima tako da remeti njegovu ekspresiju na površini stanice te favorizira cijepanje APP-a  $\beta$ -sekretazom, što rezultira povišenim razinama sAPP $\beta$ , C99 i A $\beta$  u stanicama. Jednaki učinci mogu se inducirati tretiranjem neurona spojem U18666A<sup>7</sup>. Intraneuralno, U18666A uzrokuje povišene razine C99 i netopivog A $\beta$ 42 koji su distribuirani većinom u ranim endosomima, dok se kolesterol akumulira u kasnim endosomima i lizosomima. Smanjenje razine kolesterola u NPC stanicama „ispravlja“ fenotip nalik AB, tako

---

<sup>6</sup> Tauopatija – neuropatija kod koje dolazi do nakupljanja viška proteina tau u lezijama mozga (Lackie, 2019)

<sup>7</sup> U18666A – amfifilna molekula koja direktno inhibira funkciju proteina NPC1 i inducira fenotip bolesti NPC.



da poveća ekspresiju APP na površini stanica, što ukazuje na to da je poremećaj transporta APP-a jedan od glavnih uzroka patogeneze AB (Jin i sur., 2004; Malnar i sur., 2010).

Prisustvo endosomalnih abnormalnosti dodatno potvrđuje redistribucija lizosomalne hidrolaze katepsin D (CatD) u rane endosome, gdje je kolokalizirana s C99 te nakupljanje presenilina 1 (PS1) u ranim endosomima, što rezultira povišenom aktivnošću  $\gamma$ -sekretaze i većom proizvodnjom peptida A $\beta$  u tim organelima (Burns i sur., 2003; Jin i sur., 2004).

Zbog zajedničkih karakteristika ovih bolesti, Niemann-Pickova bolest tipa C također se naziva juvenilnom Alzheimerovom bolesti (Čaušević i sur., 2018).

Unatoč brojnim sličnostima, ove dvije bolesti pokazuju i jasne neuropatološke razlike. Za razliku od AB, gdje neurodegeneracija zahvaća primarno hipokampus i moždanu koru, a neuroni malog mozga čine se zaštićeni, u bolesti NPC opisana je izrazita neurodegeneracija Purkinjeovih stanica u malom mozgu (*cerebellum*), a nasuprot tome, u hipokampusu degeneracija živčanih stanica nije primijećena (Čaušević i sur., 2018; Malnar i sur., 2014). Također, pokazalo se da se CatD, koji ima ulogu u procesiranju APP-a ([www.uniprot.org/uniprot/P07339](http://www.uniprot.org/uniprot/P07339)), u NPC bolesti nakuplja u Purkinjeovim i mikroglija stanicama, ali ne i u hipokampalnim neuronima, dok se nakupljanje CatD kod AB može vidjeti u neuronima hipokampusa i moždane kore (Jin i sur., 2004). Proučavanje razlika regionalno specifične neurodegeneracije između AB i bolesti NPC, moglo bi dovesti do otkrića protektivnih i/ili rizičnih mehanizama neurodegeneracije te ključnih čimbenika tih procesa.

#### **1.4. $\beta$ -sekretaza i terapijski potencijal**

Budući da je Alzheimerova bolest vrlo kompleksna, monogenska Niemann-Pickova bolest tipa C predstavlja pogodan model u kojem se mutacija jednog gena koristi kako bi se razjasnili pojedini molekularni aspekti kompleksne AB. Nedavni rezultati Čaušević i sur. (2018) ukazali su na povećanu proteolizu supstrata enzima BACE1 u moždanim regijama mišjeg modela bolesti NPC (*NPCI<sup>-/-</sup>*). Enzim BACE1 (eng.  *$\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*), odnosno  $\beta$ -sekretaza, transmembranska je asparaginska proteaza tipa 1, građena od 501 aminokiseline te je usko povezana s proteazama iz skupine pepsina (Vassar, 2014). Optimum aktivnosti enzima BACE1 je pri kiselom pH, a katalitička domena nalazi se u lumenu kiselih unutarstaničnih odjeljaka, uključujući endosome i *trans*-Golgijevu mrežu. Budući da uzrokuje stvaranje toksičnih peptida  $\beta$ -amiloida koji se nakupljaju u mozgu oboljelih, BACE1 se smatra ključnim enzimom u patogenezi Alzheimerove bolesti te se stoga inhibitori ove proteaze intenzivno ispituju u razvoju terapije za AB (Čaušević i sur., 2018; Vassar i sur., 1999). Problem u ovom pristupu predstavlja pronalazak dodatnih supstrata enzima BACE1,

koji ukazuje da bi potpuna inhibicija ovog enzima mogla dovesti do smanjene proteolize drugih važnih proteina te uzrokovati neželjene nuspojave (Kuhn i sur., 2012; Stützer i sur., 2013; Zhou i sur., 2012). Detaljna analiza neuropatoloških karakteristika mozгова *BACE1*<sup>-/-</sup> miševa utvrdila je nekoliko vrlo značajnih heterogenih simptoma, ukazujući na važnost ovog enzima za normalni razvoj i funkciju neurona (Yan i Vassar, 2014).

Za razliku od amiloidnog prekursorskog proteina, koji se osim enzimom BACE1 može cijepati i  $\alpha$ -sekretazom (Kuhn i sur., 2010), proteini Sez6 (eng. *seizure protein 6*) i Sez6L (eng. *seizure 6-like protein*) isključivi su fiziološki supstrati proteaze BACE1 u mozgu (Kuhn i sur., 2012; Yan i Vassar, 2014). Uloga proteina Sez6 i Sez6L još uvijek nije poznata, no smatra se da oba proteina imaju ulogu u (dis)funkciji sinapsi – jednoj od karakteristika bolesti NPC, kao i Alzheimerove bolesti (Osaki i sur., 2011). Smatra se da protein Sez6 djeluje na površini stanica i upravlja grananjem dendrita živčanih stanica, čime utječe na povezivanje kortikalnih neurona (Gunnarsen i sur., 2007). Također, pokazalo se da Sez6 ima ulogu u rastu aksona i stvaranju sinapsi, što upućuje na ulogu proteaze BACE1 u razvoju i pravilnom umrežavanju neurona u mozgu (Kuhn i sur., 2012).

Identifikacija fizioloških supstrata enzima BACE1 važna je za razumijevanje njegove funkcije, a razumijevanje biologije ovog enzima i njegovih supstrata bitno je za što bolju procjenu terapijskog potencijala enzima BACE1 u liječenju AB, a potencijalno i bolesti NPC te predviđanje potencijalnih nuspojava lijekova inhibitora enzima BACE1.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati molekularnu pozadinu povećane proteolize supstrata enzima BACE1 u moždanim regijama mali mozak i hipokampus NPC1 (*NPCI<sup>-/-</sup>*) miševa u odnosu na divlji tip (*NPCI<sup>+/+</sup>*) miševa. Temeljeno na prethodnim rezultatima Malnar i sur. (2012) i Čaušević i sur. (2018), pretpostavka je da je nakupljanje supstrata - APP, Sez6, Sez6L i enzima BACE1 u ranim endosomima, uslijed disfunkcije endolizosomalnog transporta u NPC bolesti, uzrok poremećene funkcije BACE1 i povećane proteolize enzimom BACE1. Kako bih ovu pretpostavku ispitala, u ovom radu sam provela *ex vivo* frakcioniranje i analizu izdvojenih endolizosomalnih vezikula iz tkiva navedenih moždanih regija NPC1 i divljeg tipa miševa.

Ciljevi:

- Uspostaviti metodu frakcioniranja endosomalnih vezikula iz izdvojenih mišjih moždanih regija centrifugiranjem u diskontinuiranom gradijentu saharoze.
- Identificirati frakcije ranih endosoma i kasnih endosoma/lizosoma pomoću specifičnih markera (EEA1 – rani endosomi, Rab7 – kasni endosomi i LAMP1 - lizosomi).
- Analizirati razinu i distribuciju enzima BACE1 i njegovih supstrata (APP, Sez6 i Sez6L) u izdvojenim endosomalnim frakcijama moždanih regija NPC1 u odnosu na divlji tip miševa.
- Odrediti razinu slobodnog kolesterola u izdvojenim frakcijama moždanih regija NPC1 u odnosu na divlji tip miševa.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### ○ Kemikalije:

- Akrilamid (Sigma-Aldrich, SAD)
- Amido crna boja (*Amido black 10B*, Merck, Njemačka)
- Amonijev persulfat (APS) (Sigma-Aldrich, SAD)
- Cikloheksimid (Sigma-Aldrich, SAD)
- COZY proteinski marker (*Cozy<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder*, highQu GmbH, Njemačka)
- Etanol (Kemika, Hrvatska)
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (Kemika, Hrvatska)
- I-Block (*Tropix® I-block*, Applied biosystems, ThermoFisher Scientific, SAD)
- Imidazol (Fluka<sup>TM</sup>, Honeywell, SAD)
- Inhibitori fosfataza (*Phosphatase inhibitor cocktail - PhosSTOP*, Roche, SAD)
- Inhibitori proteaza (*Protease inhibitor cocktail – cOmplete*, Roche, SAD)
- Izopropanol (Gram-Mol, Hrvatska)
- Metanol (Kemika, Hrvatska)
- Natrijev klorid (NaCl) (Kemika, Hrvatska)
- Octena kiselina (Gram-Mol, Hrvatska)
- Redestilirana voda (reH<sub>2</sub>O)
- Saharoza (Alfa Aesar, ThermoFisher Scientific, SAD)
- TEMED (Sigma-Aldrich, SAD)
- Tween® 20 (Sigma-Aldrich, SAD)

##### ○ Komercijalni setovi kemikalija:

- *Amplex® Red Cholesterol Assay Kit* (Invitrogen, SAD)
- *Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific, SAD)
- *SuperSignal<sup>TM</sup> West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific, SAD)

○ Puferi i otopine:

- **Fosfatni pufer (PBS, eng. *Phosphate buffer saline*)**  
(sastav: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- **Homogenizacijski pufer (HB, eng. *Homogenization buffer*)**  
(sastav: 250 mM saharoza, 3 mM imidazol (pH 7.4), 0.5 M EDTA uz dodatak inhibitora proteaza i fosfataza te 0.03 mM cikloheksimida)
- **Otopina za odbojavanje** (450 mL MetOH, 70 mL CH<sub>3</sub>COOH, reH<sub>2</sub>O do 1 L)
- **Otopine saharoze (25%, 35%, 62%)**  
25% (sastav: 0.806 M saharoza, 3 mM imidazol (pH 7.4), 1 mM EDTA, reH<sub>2</sub>O)  
35% (sastav: 1.177 M saharoza, 3 mM imidazol (pH 7.4), 1 mM EDTA, reH<sub>2</sub>O)  
62% (sastav: 2.351 M saharoza, 3 mM imidazol (pH 7.4), 1 mM EDTA, reH<sub>2</sub>O)
- **Pufer za blokiranje (I-block)**  
(0.6 g I-blocka u 300 mL 1xPBS-a, uz dodatak 300 µL Tween20 nakon hlađenja)
- **Pufer za elektroforezu (RB, eng. *Running buffer*)**  
(sastav: Tris baza (3 g/L), glicin (14,4 g/L) i natrijev dodecilsulfat (SDS) (1 g/L) u deH<sub>2</sub>O)
- **Pufer za ispiranje membrana (TBS-T, eng. *Tris buffered saline – Tween*)**  
(sastav: 2.4 g Tris baze, 8.8 g NaCl, 1mL Tween20, dH<sub>2</sub>O do volumena 1 L (pH 7,6))
- **Pufer za lizu stanica (RIPA, eng. *Radio-immunoprecipitation assay*)**  
(sastav: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na-deoksikolat, 0.1% SDS)
- **Pufer za nanošenje uzoraka (6xSB, eng. *sample buffer*)**  
(sastav: 6 mL glicerola, 1.2 g SDS-a, 0.31 g ditiotreitola (DTT), 1.25 mL 0.5 M Tris (pH 6.8), oko 5 mg boje bromfenol plavo, dH<sub>2</sub>O do volumena od 10 mL)  
\*nereducirajući pufer za nanošenje uzoraka priprema se na isti način, ali bez dodavanja DTT-a i i boje bromfenol plavo
- **Pufer za prijenos (TB, eng. *Transfer buffer*)**  
(sastav: 200 mL/L metanola, 14,4 g/L glicina i 3,03 g/L Tris baze u deH<sub>2</sub>O)
- **1 M Tris (pH 6.8)** (60,57 g Tris; reH<sub>2</sub>O do 500 mL)
- **1.5 M Tris (pH 8.8)** (90,885 g Tris; reH<sub>2</sub>O do 500 mL)

○ Antitijela:

**Tablica 1. - Popis primarnih antitijela korištenih u analizi *western blotting***

Antitijelo	Domaćin	Razrjeđenje	Proizvođač	Molekularna masa proteina
<b>Sez6</b>	Štakor (Rt)	1:1000	Dobiveno ljubaznošću dr. Lichtenhaler	180 kDa
<b>Sez6L</b>	Štakor (Rt)	1:10	Dobiveno ljubaznošću dr. Lichtenhaler	180 kDa
<b>EEA1</b>	Kunić (Rb)	1:1000	CellSignaling	170 kDa
<b>22C11</b>	Miš (Mo)	1:1000	Chemicon®	130 kDa
<b>LAMP1</b>	Kunić (Rb)	1:1000	Sigma-Aldrich	120 kDa
<b>BACE1</b>	Kunić (Rb)	1:1000	Epitomics	56 kDa
<b>Rab7</b>	Kunić (Rb)	1:1000	RabMab	23 kDa

**Tablica 2. - Popis sekundarnih antitijela korištenih u analizi *western blotting***

Antitijelo	Razrjeđenje	Proizvođač
anti-mouse IgG + HRP	1:5000	Bio-Rad
anti-rat IgG + HRP	1:5000	Sigma-Aldrich
anti-rabbit IgG +HRP	1:5000	Bio-Rad

### ***NPC1* mišji model**

Heterozigotni miševi *NPC1*<sup>+/-</sup> (BALB/cNctr-Npc1<sup>m1N</sup>/J) (003092), nabavljeni iz The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, SAD), sadrže spontanu mutaciju jednog alela gena *NPC1*, što onemogućuje stvaranje NPC1 proteina. Miševi su uzgajani u Pogonu laboratorijskih životinja na Institutu Ruđer Bošković, u skladu s EU direktivom 2010/63/EU za provođenje pokusa na životinjama, u 12-satnim ciklusima dan/noć te uz dostupnost vode i standardne mišje prehrane *ad libitum*. Budući da *NPC1*<sup>-/-</sup> miševi nisu fertilni, ženke i mužjaci *NPC1*<sup>+/-</sup> miševa pareni su kako bi se proizveli *NPC1*<sup>-/-</sup> (NPC1) miševi, koji pokazuju patološke karakteristike bolesti NPC te *NPC1*<sup>+/+</sup> miševi (divlji tip; eng. *wild-type*, WT). Genotipizacija je provedena lančanom reakcijom polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) na uzorku DNA izoliranom iz vrha repa novorođenih miševa prema protokolu na poveznici <https://www.jax.org/strain/003092>.

Miševi su uzgajani do starosti od devet tjedana te su potom žrtvovani cervikalnom dislokacijom, nakon čega je odmah učinjena disekcija mozgov. Dob miševa odabrana je sukladno progresiji bolesti – četiri tjedna stari miševi smatraju se asimptomatskima, dok miševi stari 9-10 tjedana

pokazuju značajnu neurodegeneraciju i neuroinflamaciju, uz pojavu tremora (Čaušević i sur., 2018). Iz svake polutke mozga izolirana su četiri zasebna dijela – mali mozak (*cerebellum*), hipokampus (*hippocampus*), korteks (*cortex*) i ostalo (ostatak moždanog tkiva), koji su potom brzo smrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni na -80°C za buduće analize.

## 3.2. METODE

### 3.2.1. *Homogenizacija tkiva i frakcioniranje endosoma u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze*

Frakcioniranje endosoma u gradijentu gustoće iz malih mozgova i hipokampusa devet tjedana starih WT i NPC1 miševa, provela sam prema protokolu de Araújo i sur. (2015), uz manje promjene. Cijeli postupak potrebno je izvoditi uz hlađenje na ledu.

Prije homogenizacije, smrznute uzorke tkiva malog mozga i hipokampusa izvagala sam na analitičkoj vagi. Tkivo sam spatulom prebacila u staklene homogenizatore na ledu (jedan za WT i jedan za NPC1 uzorke). U staklene homogenizatore dodala sam po 8 µL HB za svaki mg tkiva (*8x volume to weight ratio*) te sam tkivo homogenizirala s po 30 udaraca. Dobivene homogenate propustila sam 10-15 puta kroz iglu (23G), pritom pazeći da ne nastanu mjehurići zraka. Homogenate sam centrifugirala 10 minuta na 1000 g, pri 4°C te sam dobivene supernatante ponovno centrifugirala 10 minuta na 3000 g, pri 4°C (Eppendorf Centrifuge 5810R, Eppendorf Austria GmbH), kako bih uklonila jezgre i ostatke liziranih stanica („stanični otpad“). Tako dobiveni supernatant predstavlja PNS (eng. *postnuclear supernatant*), koji sam razrijedila u 62% otopini saharoze u 3 mM imidazolu, pH 7.4 (omjer 1:1.2 – PNS:62% saharoza), kako bih dobila 40.6% otopinu saharoze. Tri mililitra navedene smjese prebacila sam na dno tubice za ultracentrifugu (14x89mm, Beckman Coulter, SAD). Na taj sloj sam lagano, uz stijenku epruvete redom ispustila 1.5 volumen (4.5 mL) 35% otopine saharoze, 1 volumen (3 mL) 25% otopine saharoze te 1 mL homogenizacijskog pufera (8% otopina saharoze). Tako pripremljen gradijent centrifugirala sam na ultracentrifugi (Beckman Coulter Optima XL-100K Ultracentrifuge, rotor SW41.Ti) tri sata na 210 000 g i 4°C. S vrha gradijenta potom sam sakupila 12 frakcija po 1 mL te sam svaku frakciju razrijedila u 1 mL otopine 3 mM imidazola (pH 7.4) i 1 mM EDTA. Pripremljene frakcije centrifugirala sam jedan sat na 100 000 g i 4°C (Beckman Coulter; rotor 50.4Ti). Dobivene pelete resuspendirala sam u puferu za lizu stanica (RIPA), prebacila ih u epice od 1.5 mL i smrznula u tekućem dušiku.

Tako pripremljene frakcije dalje sam koristila za identifikaciju ranih i kasnih endosoma te lizosoma markerima EEA1, Rab7, LAMP1 i analizu enzima BACE1 i njegovih supstrata (APP,

Sez6 i Sez6L) metodom *western blotting* te za određivanje ukupne razine kolesterola u pojedinim frakcijama.

### **3.2.2. Mjerenje koncentracije proteina – BCA**

U prikupljenim frakcijama odredila sam koncentraciju proteina koristeći komplet *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific, SAD), koji se temelji na biuretnoj reakciji u kojoj dolazi do reakcije proteinske redukcije bakrovih  $\text{Cu}^{2+}$  iona u lužnatom mediju, pri čemu se pomoću bicinhoninske kiseline (BCA) kolorimetrijski detektiraju novonastali bakrovi  $\text{Cu}^+$  ioni. Serijska razrjeđenja goveđeg serumskog albumina (BSA) (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0 mg/mL) pripremala sam u RIPA puferu te sam ih koristila kao standarde za izradu baždarnog pravca. Na mikrotitarsku pločicu s 96 „bazečića“ (TPP, Švicarska) pipetirala sam u duplikatima po 10  $\mu\text{L}$  najprije standarde (serijska razrjeđenja), a potom i uzorke. Pripremila sam radnu otopinu u omjeru 50:1 (*Pierce™ BCA reagens A*: *Pierce™ BCA reagens B*) te sam višekanalnom pipetom u svaki „bazečić“ nanijela po 200  $\mu\text{L}$  radne otopine. Pločicu sam ostavila 30 minuta u mraku, na sobnoj temperaturi te sam prije mjerenja iglom uklonila zaostale mjehuriće zraka. Nakon 30 minuta, apsorbanciju sam mjerila na spektrofotometru (Labsystems Multiskan MS, ThermoFisher Scientific, SAD) pri valnoj duljini od 570 nm. Koncentracije proteina u uzorcima (izražene u mg/mL) izračunala sam iz jednadžbe baždarnog pravca.

### **3.2.3. ANALIZA WESTERN BLOTTING**

#### ***Gel elektroforeza u poliakrilamidnom gelu i prijenos proteina na membranu***

Proteine iz uzoraka (frakcija) razdvajala sam gel elektroforezom u 8% ili 15%-tnom poliakrilamidnom gelu za razdvajanje (detaljan sastav gelova prikazan je u **tablici 3.**), ovisno o veličini proteina koje sam kasnije htjela detektirati. Pri izradi poliakrilamidnih gelova debljine 1.5mm, gelove za razdvajanje (eng. *resolving gels*) sam odmah nakon izlijevanja nadslojila s izopropanolom kako bi se površina gela za razdvajanje izravnala. Nakon polimerizacije gela za razdvajanje, uklonila sam izopropanol te sam 5%-tni gel za sabijanje (eng. *stacking gel*) uzoraka, u koji se umeću češljici za formaciju jažica, izlila na donji gel (gel za razdvajanje). Kada gel za sabijanje polimerizira, češljici se izvade i gel je spreman za nanošenje uzoraka u formirane jažice.



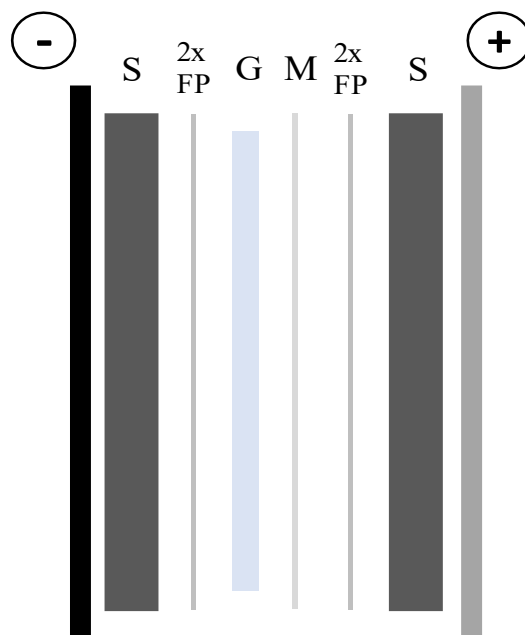
**Tablica 3. – Sastav poliakrilamidnih gelova**

	<b>8% gel</b>	<b>15% gel</b>	<b>5% gel</b>
	Volumen komponenata u mL		
<b>reH<sub>2</sub>O</b>	4.7	2.4	2.13
<b>30% otopina akrilamida*</b>	2.7	5.0	0.5
<b>1.5 M Tris (pH 8.8)</b>	2.5	2.5	-
<b>1 M Tris (pH 6.8)</b>	-	-	0.38
<b>10% APS</b>	0.1	0.1	0.03
<b>TEMED</b>	0.006	0.004	0.003

\*otopina akrilamida sastoji se od akrilamida i bisakrilamida u omjeru 29:1

Prije nanošenja na gel, uzorke sam pripremila u 6x koncentriranom reducirajućem ili nereducirajućem (+DTT ili -DTT) puferu za nanošenje uzoraka (6xSB, eng. *sample buffer*), ovisno o svojstvima antitijela koja sam kasnije željela detektirati. Nakon dodavanja 6xSB, uzorke sam izmiješala na vibracijskoj miješalici („vorteks“) i potom inkubirala 10 minuta u termobloku (neoBlock 1, neoLab Migge GmbH, Njemačka) pri 70°C, a zatim ih ponovno vorteksirala te centrifugirala 1 minutu na maksimalnoj brzini (14680 rpm) (Eppendorf centrifuge 5424, Eppendorf Austria GmbH). Tako pripremljene uzorke u jednakom sam volumenu nanosila u sve jažice gela, a kao marker molekularne mase proteina koristila sam *Cozy<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder* (highQu GmbH, Njemačka).

Elektroforezu sam provodila u puferu za elektroforezu (eng. *running buffer*) pri stalnom naponu od 100 V prvih 20 minuta, a nakon toga 150 V, pri temperaturi od 4°C. Nakon elektroforeze, slijedi prijenos proteina na sintetsku PVDF (eng. *polyvinylidene difluoride*) membranu (Roche), koju sam prethodno aktivirala dvije minute u metanolu. Gelove sam najprije isprala 10 minuta u puferu za prijenos (eng. *transfer buffer*), a potom sam složila kazete za prijenos proteina iz gela (tzv. *sandwich* konstrukcije) prema shemi prikazanoj na **slici 4**. Transfer se odvijao u puferu za prijenos, u uvjetima konstantne jakosti struje od 100 mA i u trajanju od 960 minuta, pri 4°C.



**Slika 4.** - Shematski prikaz slaganja kazete za prijenos proteina. (-) katoda, (+) anoda (smjer kretanja proteina je katoda → anoda); S - spužvica; FP - filter papir; G - gel; M - PVDF membrana

### ***Bojanje membrana bojom Amido crno***

Kako bih provjerila uspješnost prijenosa proteina na membranu, nakon transfera sam provela postupak bojanja membrana bojom Amido crno. Cijeli postupak provodi se uz njihanje membrana na tresilici (UltraRocker™ Rocking Platform, Bio-Rad, SAD). Membrane sam najprije ispirala 10 minuta u fosfatnom puferu (PBS), a potom sam ih inkubirala u boji Amido crno 1-2 minute. Nakon bojenja, membrane sam ispirala u otopini za odbojavanje dva puta po 30 minuta. Odbojane membrane ispirala sam 3-4 puta u reH<sub>2</sub>O, ovisno o tome osjeti li se miris octene kiseline, a potom 20 minuta u puferu za ispiranje membrana TBS-T.

Nakon ispiranja, membrane sam inkubirala 55 minuta u otopini za blokiranje kako bi se spriječilo nespecifično vezanje antitijela na membrane te sam potom blokirane membrane inkubirala u željenim primarnim antitijelima preko noći uz miješanje na *roller* mješalici (Scilogex MX-T-6S, Scilogex, SAD), pri 4°C. Popis primarnih antitijela korištenih pri izradi ovog rada nalaze se u **tablici 1.**, na početku poglavlja.

### ***Imunodetekcija proteina na membrani***

Membrane inkubirane u odgovarajućim primarnim antitijelima ispirala sam tri puta po 10 minuta u TBS-T puferu uz kontinuirano njihanje, kako bi se uklonio suvišak primarnog antitijela. Potom sam membrane inkubirala 90 minuta u odgovarajućem sekundarnom antitijelu konjugiranom s peroksidazom iz hrena (HRP, eng. *horseradish peroxidase*) (**tablica 2.**).

Sekundarna antitijela pripremala sam u puferu za blokiranje ili 1xPBS-u, u razrjeđenju 1:5000. Nakon inkubacije u sekundarnom antitijelu, membrane sam ponovno ispirala tri puta po 10 minuta u TBS-T puferu kako bih uklonila suvišak sekundarnog antitijela, i dalje uz njihanje. Nakon ispiranja membrana, proteine na membrani detektirala sam pomoću supstrata *SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* (ThermoFischer Scientific, SAD). Reakcija se temelji na oksidaciji kemiluminiscencijskog supstrata luminola peroksidazom iz hrena uz prisustvo peroksida, pri čemu dolazi do nastanka obojenja na mjestu vezanja sekundarnog antitijela. Otopinu za razvijanje membrana pripremila sam prema uputama proizvođača, miješanjem otopina luminola i peroksida u omjeru 1:1. Otopinu za razvijanje direktno sam pipetom ispustila na membranu. Nakon jedne minute inkubacije, membranu sam stavila u prozirnu foliju te sam signale na membrani detektirala na uređaju Uvitec Alliance Q9 mini (Uvitec Cambridge, UK) pri različitim trajanjima ekspozicije, ovisno o jačini i kvaliteti dobivenog signala.

Signale dobivene u obliku tamnih pruga analizirala sam pomoću računalnog programa *ImageJ*. Navedeni program, preuzet s internetske stranice američkog Nacionalnog instituta za zdravlje (*ImageJ* (nih.gov)), koristi se za obradu i analizu fotografija te sam pomoću njega, prema uputama s navedene stranice, odredila jačinu signala u svakoj frakciji.

### **3.2.4. Određivanje razine kolesterola**

Ukupnu razinu slobodnog kolesterola u pojedinim frakcijama analizirala sam *Amplex® Red Cholesterol Assay Kit* (Invitrogen, SAD) setom, koji omogućuje detekciju slobodnog kolesterola i kolesteril-estera.

Kolesterol se oksidira kolesterol oksidazom, pri čemu se otpušta vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ). Uz prisustvo peroksidaze iz hrena (HRP), reagens *Amplex® Red* reagira s otpuštenim peroksidom, pri čemu nastaje fluorescirajući produkt rezorufin.

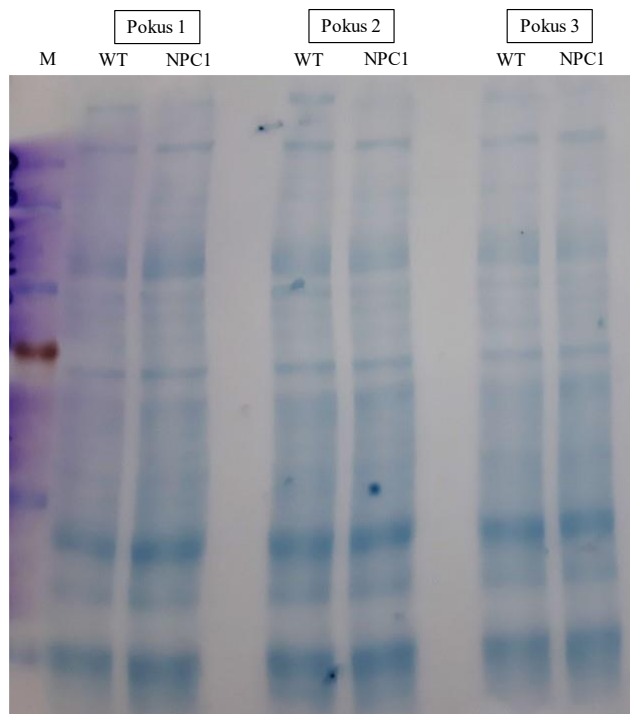
Standardna razrjeđenja (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156, 0  $\mu\text{g/mL}$ ) pripremila sam razrjeđivanjem referentnog standarda kolesterola (eng. *Cholesterol reference standard*) u prethodno pripremljenom reakcijskom puferu (eng. *Reaction buffer*), pri čemu koncentracija od 0  $\mu\text{g/mL}$  predstavlja reakcijski pufer bez kolesterola kao negativnu kontrolu. Pozitivnu kontrolu pripremila sam otapanjem  $H_2O_2$  u reakcijskom puferu, a alikvotne uzorke razrijedila sam 40 puta, također u reakcijskom puferu. Serijska razrjeđenja, kontrole i razrijeđene uzorke nanosila sam u duplikatima na mikrotitarsku pločicu s 96 bazenčića. Budući da je reagens *Amplex® Red* osjetljiv na svjetlost, koristila sam crne mikrotitarske pločice (ThermoFischer Scientific, SAD). Zatim sam u bazenčiće koji sadrže serijska razrjeđenja, kontrole i razrijeđene uzorke dodala

pripremljenu radnu otopinu (sastav: 300  $\mu$ M *Amplex*<sup>®</sup> *Red* reagens, 2 U/mL peroksidaza hrena, 2 U/mL kolesterol oksidaza). Mikrotitarsku pločicu s reakcijskim otopinama inkubirala sam 30 minuta pri 37°C, a potom sam fluorescenciju mjerila pobuđivanjem pri 530 nm i detekcijom pri 590 nm u uređaju Fluoroskan Ascent FL (ThermoFischer Scientific, SAD).

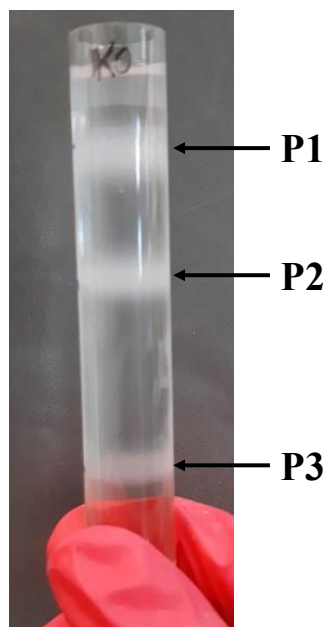
## 4. REZULTATI

### 4.1. *Uspostava metode razdvajanja vezikula endolizosomalnog puta centrifugiranjem u diskontinuiranom gradijentu saharoze*

Metodu frakcioniranja endolizosomalnih vezikula iz odabranih moždanih regija (mali mozak i hipokampus) miševa  $NPC1^{-/-}$  (NPC1) i  $NPC1^{+/+}$  (WT) uspostavila sam kako bih razdvojila rane endosome od kasnih endosoma/lizosoma te pratila razinu i raspodjelu biljega ovih organela u izdvojenim frakcijama, kao i razinu i raspodjelu enzima BACE1 i njegovih supstrata APP, Sez6 i Sez6L. Homogenizirano tkivo centrifugirala sam kako bih dobila PNS, koji sam potom razdvojila u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze (opis postupka nalazi se u poglavlju 3.). Prethodno sam izmjerila koncentraciju proteina u PNS frakcijama dobivenima homogenizacijom tkiva malog mozga miševa WT i NPC1, za sva tri ponavljanja pokusa. Dobivene koncentracije proteina u PNS-u bile su podjednake između uzoraka (divlji tip u odnosu na NPC1 miševе) i između triplikata pokusa. Kako bih dodatno provjerila navedeno, proteine sam razdvojila gel elektroforezom te sam provela postupak prijenosa proteina na membranu. Tako dobivenu membranu obojala sam bojom Amido crno (**slika 5.**). Na obojanoj membrani može se vidjeti da je intenzitet obojenja razdvojenih proteina podjednak između uzoraka i između pokusa, što ukazuje na podjednake koncentracije proteina u frakcijama PNS uzoraka miševa WT i NPC1. Nakon centrifugiranja u ultracentrifugi u tubicama su bila vidljiva tri prstena (**slika 6.**), po jedan na svakoj međufazi. U prvom prstenu (P1 - međufaza 8%/25%) nalaze se kasni endosomi i lizosomi, u drugom prstenu (P2 - međufaza 25%/35%) rani endosomi, a treći prsten (P3 - međufaza 35%/40.6%) predstavlja tzv. tešku frakciju – ostatke membrana, endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog aparata. Iz centrifugiranog gradijenta izdvojila sam i pripremila 11 frakcija (1 mL) koje sam koristila za kasnije analize.

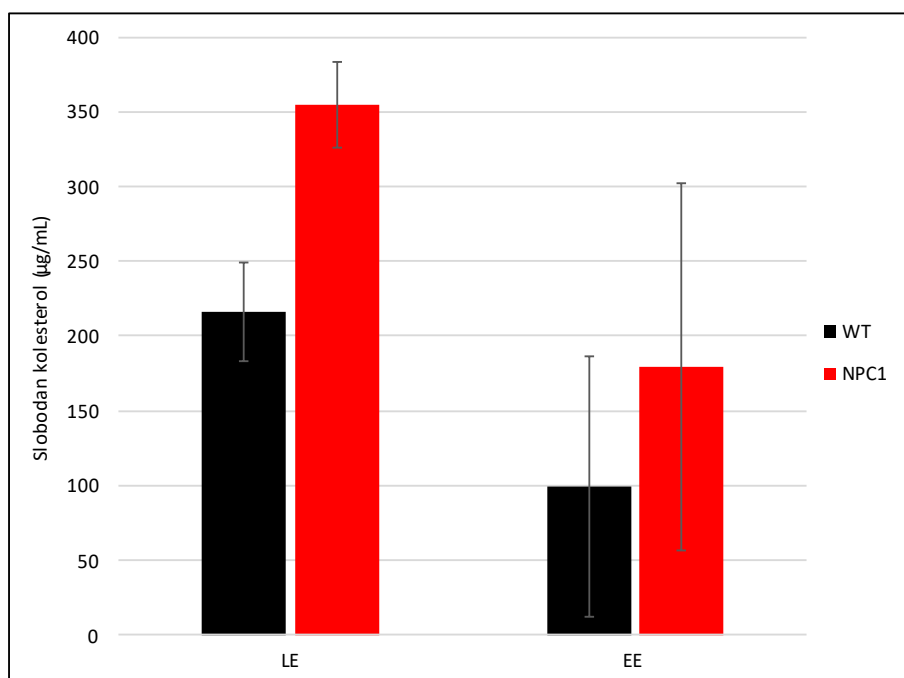


**Slika 5.** - Kvalitativna analiza razine proteina bojanjem membrane bojom Amido crno u uzorcima PNS-a dobivenim iz homogenata malog mozga miševa WT i NPC1 (M – biljeg molekulske mase proteina; WT – uzorci miša divljeg tipa; NPC1 – uzorci miševa NPC1<sup>-/-</sup>)



**Slika 6.** – Prikaz dobivenih prstenova nakon ultracentrifugiranja u diskontinuiranom gradijentu saharoze uzoraka PNS iz mišjih moždanih regija. Prstenovi predstavljaju mjesta nakupljanja pojedinih organela u međufazama: P1 – kasni endosomi i lizosomi, P2 – rani endosomi, P3 – teška frakcija

Uspješnost metode frakcioniranja endolizosomalnih vezikula centrifugiranjem u diskontinuiranom gradijentu gustoće dodatno sam provjerila mjerenjem razine slobodnog kolesterola, u onim frakcijama koje su obuhvaćale prstenove P1 - frakcije 1 i 2 za kasne endosome/lizosome te P2 – frakcije 4 i 5 za rane endosome, pomoću komercijalnog seta *Amplex® Red*. Dobivene vrijednosti fluorescencije prikazane su kao srednja vrijednost količine slobodnog kolesterola (izražena u  $\mu\text{g/mL}$ ) u frakcijama kasnih endosoma/lizosoma i ranih endosoma miševa WT u odnosu na miševe NPC1 (**slika 7.**). Iz grafičkog prikaza na slici 7. vidljivo je da je u frakcijama kasnih endosoma/lizosoma prisutno više slobodnog kolesterola nego u ranim endosomima. Također, frakcije NPC1 pokazuju veću količinu slobodnog kolesterola u odnosu na frakcije WT kasnih i ranih endosoma, no navedena razlika statistički je značajna samo za frakcije kasnih endosoma.



**Slika 7.** - Koncentracija slobodnog kolesterola u frakcijama kasnih endosoma/lizosoma i ranih endosoma izdvojenih iz malog mozga devet tjedana starih miševa WT i NPC1. (LE – kasni endosomi/lizosomi; EE – rani endosomi)

#### **4.2. Analiza razine i distribucije biljega ranih endosoma i kasnih endosoma/lizosoma u razdvojenim frakcijama malog mozga devet tjedana starih miševa WT i NPC1**

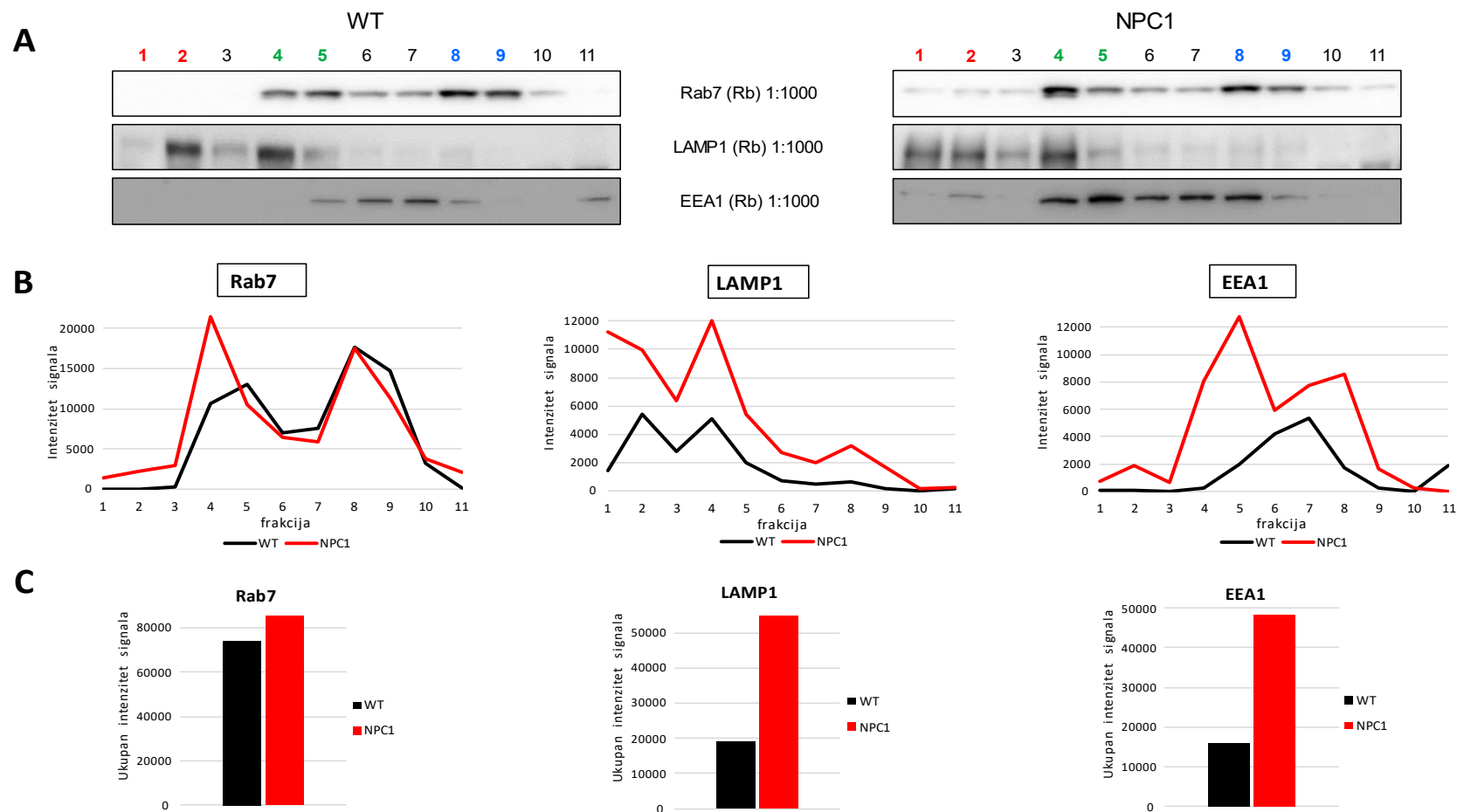
Frakcije dobivene metodom frakcioniranja endosomalnih vezikula centrifugiranjem u diskontinuiranom gradijentu gustoće ispitala sam analizom *western blotting*, a razdvojene proteine detektirala sam antitijelima specifičnima za pojedine biljege organela, enzim BACE1 te njegove supstrate APP, Sez6 i Sez6L. Postupak frakcioniranja i analizu *western blotting* napravila sam u triplicatu, a na **slikama 8., 9. i 10.** prikazani su reprezentativni rezultati *western* analize.

Kako bih potvrdila da sam uspostavila metodu, tj. uspješno razdvojila kasne endosome/lizosome od ranih endosoma, najprije sam analizirala prisustvo proteinskih biljega kasnih endosoma (Rab7)/lizosoma (LAMP1) i ranih endosoma (EEA1) u izdvojenim frakcijama, a dobiveni rezultati prikazani su na **slici 8.** Rezultati na slici 8-A prikazuju signale proteinskih biljega izdvojenih organela endolizosomalnog puta (tzv. *blottove*) dobivene *western* analizom. Pojedine frakcije označene su brojevima 1-11, pri čemu frakcija 1 predstavlja najlakšu (najrjeđu), a frakcija 11 najtežu (najgušću) frakciju. Tako dobivene signale (*blottove*) analizirala sam i kvantificirala pomoću programa *ImageJ*, a dobivene vrijednosti intenziteta signala prikazala sam grafički (slika 8-B). Na slici 8-C, prikazan je odnos ukupnog intenziteta signala (zbroj intenziteta signala svih 11 frakcija) između uzoraka miševa WT i NPC1.

Rab7 je proteinski biljeg kasnih endosoma, no na slici 8-A i B, može se vidjeti da je najjači signal prisutan u frakcijama 4 i 5, u uzorcima miševa WT i NPC1. Ove frakcije pokazale su pozitivan signal i za biljeg ranih endosoma EEA1 kao i za biljeg lizosoma LAMP1 u oba genotipa. Također, može se uočiti da kod miševa NPC1 postoji slabiji signal Rab7 u frakcijama kasnih endosoma (frakcije 1 i 2), no kod miševa WT, signal u tim frakcijama uopće nije prisutan, već kao da je potpuno zaostao u 4. i 5. frakciji. Za razliku od Rab7, biljeg lizosoma LAMP1 pokazuje jake signale u frakciji 2 WT miševa te u frakcijama 1 i 2 miševa NPC1. Također se čini da je LAMP1 djelomično zaostao i u ranim endosomima budući da pokazuje relativno jak signal u 4. frakciji WT i NPC1 miševa. Proteinski biljeg ranih endosoma, EEA1, nešto je drugačije distribuiran između genotipova. Kod miševa WT, signal se pojavljuje u frakcijama 5-8, a najjači je u 6. i 7. frakciji, dok je kod miševa NPC1 signal prisutan u gotovo svim frakcijama, a najjači je u frakciji 5. Rezultati na slici 8-A ukazali su da sam korištenom metodom uspjela razdvojiti lizosome (LAMP1) od ranih endosoma (EEA1), dok su se kasni endosomi (Rab7) većinom preklapali s biljekom ranih endosoma (EEA1), tj. vjerojatno su



uključivali detekciju tzv. miješanih organela sazrijevanja ranih u kasne endosome. Ovo je bilo naročito vidljivo u frakcijama dobivenim iz miševa NPC1 u odnosu na miševe WT, što ukazuje na različitu distribuciju ranih i kasnih endosoma, odnosno različitu gustoću ovih organela u moždanoj regiji malog mozga između miševa NPC1 i WT. Nadalje, analiza distribucije intenziteta signala analiziranih biljega po frakcijama (slika 8-B) ukazuje da miševi NPC1 pokazuju različit intenzitet i distribuciju naročito EEA1 biljega (u frakciji 4 i/ili 5) u odnosu na miševe WT. Različit intenzitet (ali ne i distribucija) signala za Rab7 i LAMP1 uočen je u frakciji 4 u uzorcima NPC1 u odnosu na WT miševe. Što se tiče ukupnog intenziteta signala, na slici 8-C može se vidjeti da je ukupan signal sva tri biljega veći u uzorcima malog mozga miševa NPC1 u odnosu na miševe WT, s time da je kod biljega Rab7 razlika između miševa WT i NPC1 znatno manja nego kod preostala dva biljega. Sumarno, ovi rezultati pokazali su da mali mozak miševa NPC1 pokazuje različitu razinu i distribuciju vezikula endolizosomalnog puta u odnosu na miševe WT, ukazujući na poremećaj u endolizosomalnom transportu i poremećaj u biogenezi endolizosomalnog puta. Ovaj poremećaj naročito je vidljiv u biogenezi ranih i kasnih endosoma koji su u istim frakcijama miševa NPC1 pokazali podjednak signal, dok je njihov signal u frakcijama malog mozga miševa WT bio donekle razdvojen.

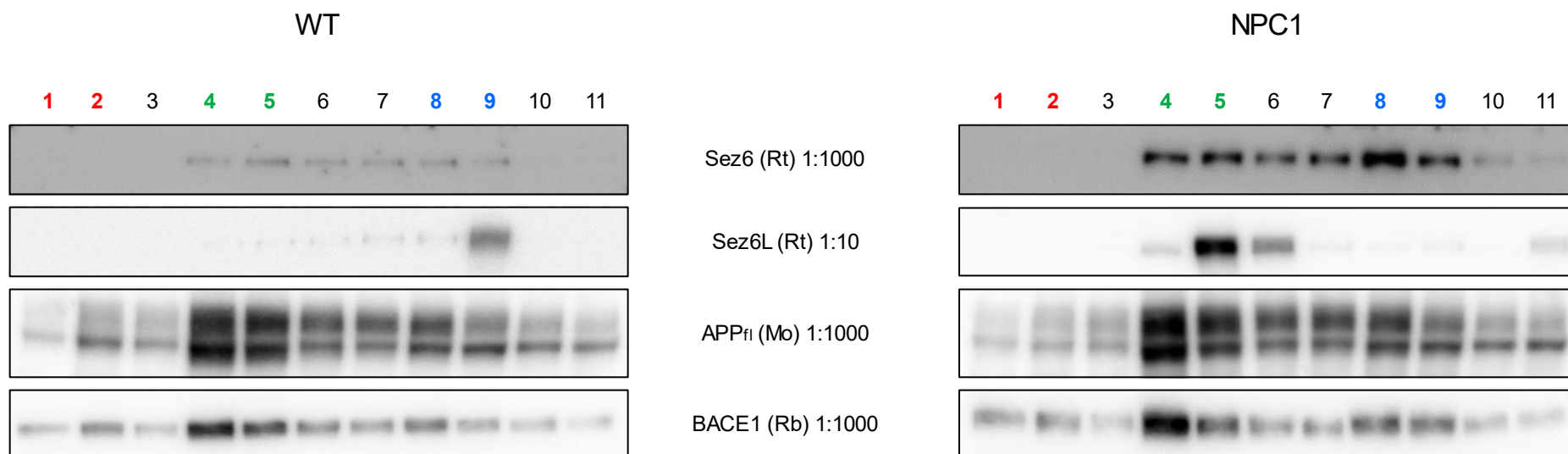


**Slika 8.** – Rezultati analize razine i distribucije proteinskih biljega kasnih endosoma/lizosoma te ranih endosoma u izdvojenim frakcijama endolizosomalnog puta tkiva malog mozga devet tjedana starih miševa WT i NPC1. A) Signali (*blottovi*) dobiveni detekcijom pomoću primarnih protutijela Rab7 (RabMab), LAMP1 (Sigma-Aldrich) te EEA1 (Cell Signaling). Pojedine frakcije označene su brojevima 1-11, pri čemu je frakcija 1 najlakša (najrjeđa), a frakcija 11 najteža (najgušća) frakcija. Brojevi frakcija od interesa označeni su bojama: crvenom – frakcije kasnih endosoma/lizosoma, zelenom – frakcije ranih endosoma te plavom – teške frakcije (ostatci staničnih membrana, endoplazmatskih retikuluma i Golgijevih aparata). B) Grafički prikazi intenziteta signala proteinskih biljega kasnih i ranih endosoma te lizosoma po frakcijama između miševa WT i NPC1, dobiveni kvantifikacijom dobivenih signala pomoću programa *ImageJ*. C) Grafički prikazi odnosa ukupnog intenziteta signala (zbroj intenziteta signala svih 11 frakcija) proteinskih biljega kasnih i ranih endosoma te lizosoma između miševa WT i NPC1.

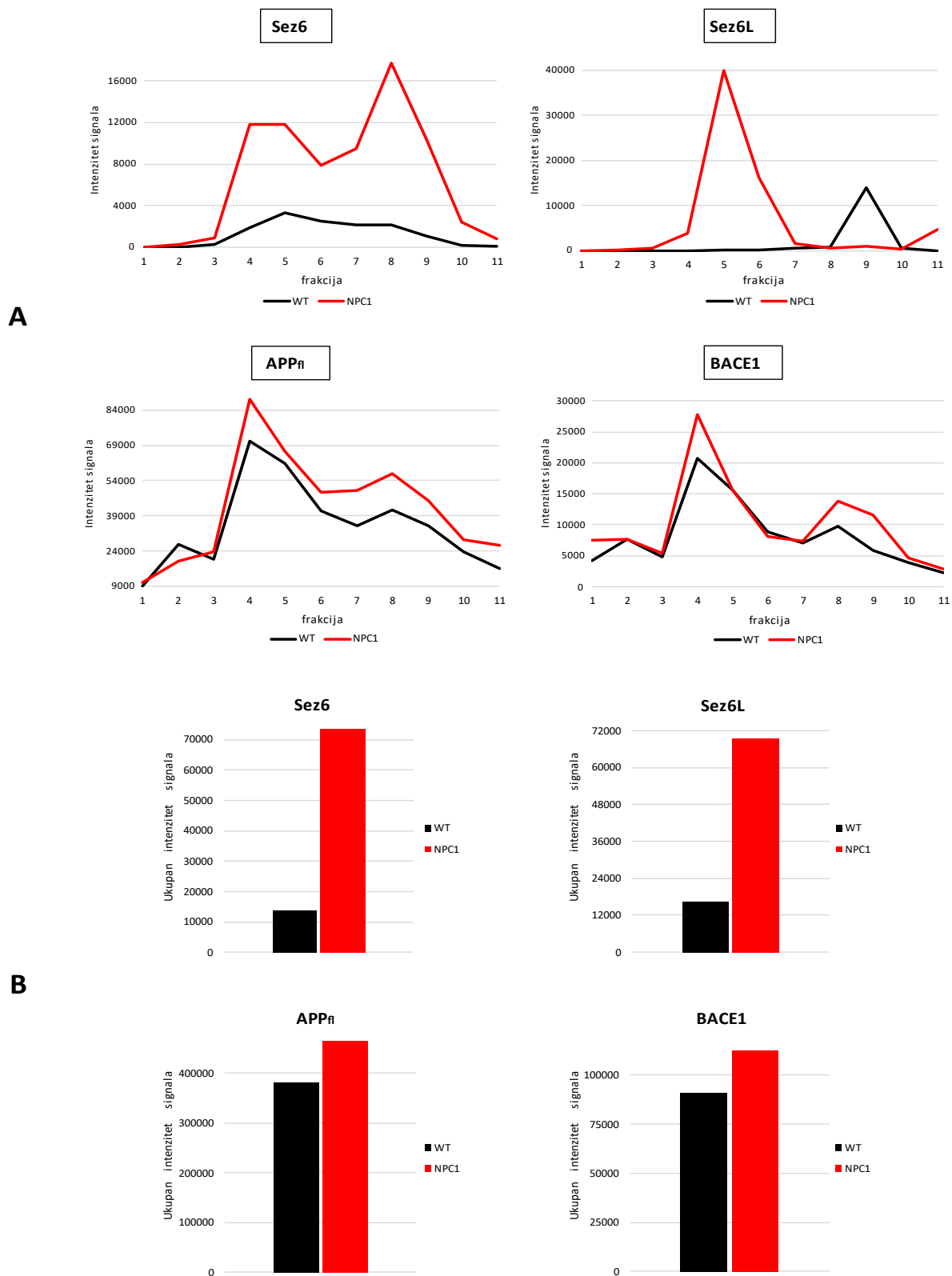
#### **4.3. Analiza razine i distribucije supstrata i enzima BACE1 u razdvojenim endosomalnim frakcijama malog mozga devet tjedana starih miševa WT i NPC1**

Nakon analize proteinskih biljega endosomalnih vezikula u izdvojenim frakcijama, analizirala sam distribuciju enzima BACE1 i njegovih supstrata (Sez6, Sez6L i APP $\pi$ ) između frakcija dobivenih iz tkiva malog mozga miševa WT i NPC1. Na **slici 9.** prikazane su dobivene membrane te su pojedine frakcije ponovno označene brojevima 1-11, pri čemu je 1 najrjeđa, a 11 najgušća frakcija. Frakcije 1 i 2 predstavljaju kasne endosome/lizosome, 4 i 5 rane endosome, a frakcije 8 i 9 su teške frakcije. Dobivene signale (proteinske vrpce) također sam analizirala i kvantificirala pomoću programa *ImageJ*, a dobivene vrijednosti intenziteta signala u pojedinim frakcijama te razliku ukupnog intenziteta signala među genotipovima prikazala sam grafički (**slika 10.**).

Supstrati Sez6 i Sez6L isključivi su fiziološki supstrati enzima BACE1 ( $\beta$ -sekretaza) u mozgu, za razliku od proteina APP koji se primarno cijepa enzimom  $\alpha$ -sekretaza. Na slici 9 i 10-A može se vidjeti da ova dva supstrata pokazuju različitu razinu i/ili distribuciju u tkivu malog mozga 9 tjedana starih miševa WT i NPC1. Supstrat Sez6 kod miševa WT pokazuje slab signal u frakcijama 4-9, u odnosu na miševe NPC1, kod kojih je ovaj signal prisutan u istim frakcijama znatno jači. Stoga se može zaključiti da supstrat Sez6 ne pokazuje značajnu razliku u distribuciji u endolizosomalnom putu između malog mozga miševa NPC1 i WT, ali da je njegova razina u ovim frakcijama znatno veća u uzorcima NPC1 u odnosu na uzorke WT ukazujući na potencijalno nakupljanje ovog supstrata enzima BACE1 u ovim vezikulama. Za razliku od supstrata Sez6, supstrat Sez6L pokazuje potpuno drugačiju raspodjelu u stanicama tkiva malog mozga između miševa WT i NPC1. U stanicama tkiva miševa WT, supstrat Sez6L pokazuje najjači signal u teškoj frakciji 9, dok je kod miševa NPC1 signal najjači u ranim endosomima (5. frakcija). Enzim BACE1 i supstrat APP $\pi$  pokazuju podjednaku raspodjelu između frakcija različitih genotipova, pri čemu su signali većinom nakupljeni u frakcijama ranih endosoma (4 i 5). Na slici 10-B jasno se vidi da se ukupan intenzitet signala enzima BACE1 i supstrata APP $\pi$  u izdvojenim frakcijama između genotipova NPC1 i WT ne razlikuje značajno, iako je ukupan signal u uzorcima miševa NPC1 nešto veći nego u miševa WT. Ukupan intenzitet signala supstrata Sez6 i Sez6L znatno je veći u izdvojenim frakcijama tkiva malog mozga miševa NPC1 u odnosu na miševe WT, ukazujući na nakupljanje ovih supstrata BACE1 u izdvojenim frakcijama moždane regije malog mozga miševa NPC1 vs. WT.



**Slika 9.** - Rezultati analize razine i distribucije enzima BACE1 i njegovih supstrata – Sez6, Sez6L i APPfl u izdvojenim endosomalnim frakcijama tkiva malog mozga devet tjedana starih miševa WT i NPC1. Prikazani su signali (proteinske vrpce) dobiveni imunodetekcijom pomoću primarnih protutijela Sez6, Sez6L (dobiveno ljubaznošću dr. Lichtenhaler, DZNE-Minhen, Njemačka), 22C11 (Chemicon®) te BACE1 (Epitomics). Protutijelo 22C11 korišteno je za detekciju supstrata APPfl. Pojedine frakcije označene su brojevima 1-11, pri čemu je frakcija 1 najlakša (najrjeđa), a frakcija 11 najteža (najgušća) frakcija. Brojevi frakcija od interesa označeni su bojama: crvenom – frakcije kasnih endosoma/lizosoma, zelenom – frakcije ranih endosoma te plavom – teške frakcije (ostatci staničnih membrana, endoplazmatskih retikuluma i Golgijevih aparata).



**Slika 10.** - Rezultati analize razine i distribucije enzima BACE1 i njegovih supstrata – Sez6, Sez6L i APPn u izdvojenim endosomalnim frakcijama tkiva malog mozga devet tjedana starih miševa WT i NPC1. A) Grafički prikazi intenziteta signala proteinskih biljega kasnih i ranih endosoma te lizosoma po frakcijama između miševa WT i NPC1 dobiveni kvantifikacijom signala (slika 9.) pomoću programa *ImageJ*. B) Grafički prikazi odnosa ukupnog intenziteta signala (zbroj intenziteta signala svih 11 frakcija) proteinskih biljega kasnih i ranih endosoma te lizosoma između miševa WT i NPC1.

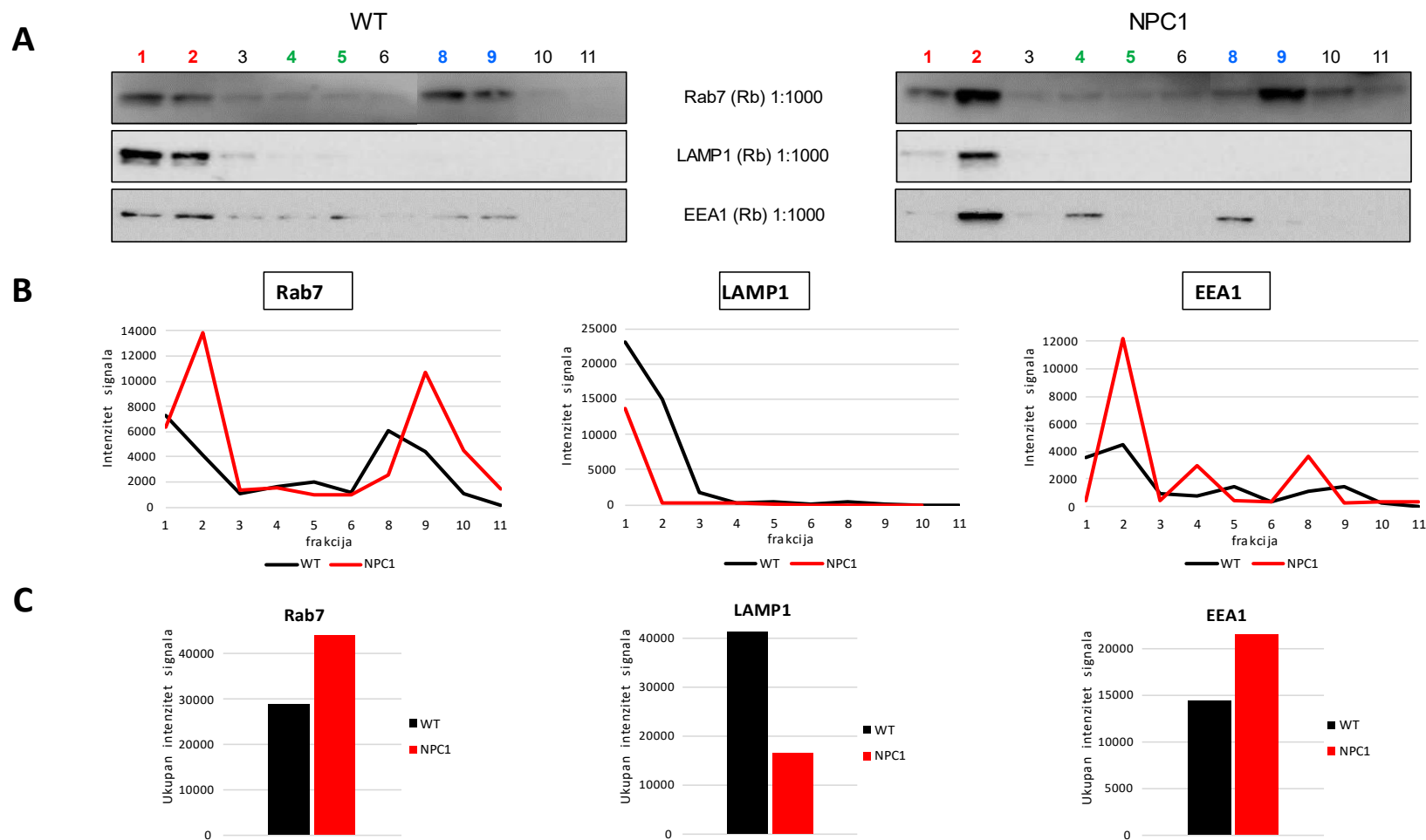
#### **4.4. Preliminarna analiza razine i distribucije biljega ranih endosoma i kasnih endosoma/lizosoma u razdvojenim frakcijama hipokampusa devet tjedana starih miševa WT i NPC1**

Tkivo hipokampusa devet tjedana starih miševa WT i NPC1 homogenizirala sam te sam provela metodu frakcioniranja endolizosomalnih vezikula u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze na jednak način kao i za tkivo malog mozga. Dobivene frakcije potom sam analizirala metodom *western blotting*. Budući da je zbog nedostatka tkiva u periodu izrade ovog diplomskog rada provedeno samo jedno ponavljanje pokusa, rezultati (slika 11., 12. i 13.) su prikazani kao preliminarni.

Uzorka frakcije 7 nije bilo dovoljno za ispitati sva antitijela, stoga sam analizom *western blotting* ispitala frakcije 1-6 i 8-11 (ukupno 10 frakcija). Kao i kod tkiva malog mozga, kako bih potvrdila uspješnost metode frakcioniranja, najprije sam analizirala prisustvo i distribuciju proteinskih biljega kasnih endosoma (Rab7) / lizosoma (LAMP1) i ranih endosoma (EEA1) u navedenim frakcijama, a potom i distribuciju enzima BACE1 i njegovih supstrata. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 11. Slika 11-A prikazuje dobivene signale analiziranih biljega organela (proteinske vrpce) u frakcijama 1-6 i 8-11, pri čemu je frakcija 1 najrjeđa, a frakcija 11 najgušća frakcija. Signale dobivene analizom *western blotting* kvantificirala sam pomoću programa *ImageJ*, a dobivene vrijednosti jačine signala po frakciji prikazala sam grafički (slika 11-B). Također, prikazani su grafički prikazi odnosa ukupnog intenziteta signala (zbroy intenziteta signala svih 10 frakcija) između miševa WT i NPC1 (slika 11-C).

Proteinski biljezi kasnih endosoma, Rab7 i lizosoma, LAMP1 pokazuju najjači signal u „najlakšim“, frakcijama 1 i/ili 2 i u uzorcima miševa WT i NPC1, što se razlikuje od rezultata distribucije ovih biljega u malom mozgu miševa NPC1 i WT. Na slici 11-A i B, može se uočiti da Rab7 i LAMP1 kod miševa WT daju podjednako jak signal u prve dvije frakcije (1 i 2), dok je kod miševa NPC1 najjači signal ovih biljega prisutan u 2. frakciji. Proteinski biljeg ranih endosoma, EEA1, pokazuje signal u 4. (miševi NPC1), odnosno 5. frakciji (miševi WT), tj. na intersekciji između 25% i 35% saharoze. Međutim, najjači signali EEA1 uočeni su u frakcijama 1 i 2 u uzorcima hipokampusa miševa WT, odnosno frakciji 2 u miševa NPC1. Jak signal biljega EEA1 u frakcijama 1 i/ili 2 nismo očekivali te je potrebno ponoviti ovaj pokus na dodatnim uzorcima hipokampusa kako bismo ovaj nalaz potvrdili. Naime, kako su sva tri biljega pokazala najjači signal u frakciji 1 i/ili 2 i u uzorcima miševa WT i NPC1, rezultat ukazuje da metoda razdvajanja endolizosomalnih vezikula vjerojatno nije bila sasvim uspješna. Grafički prikazi na slici 11-C pokazuju da je ukupan intenzitet signala proteinskih biljega Rab7 i EEA1 bio veći u

uzorcima miševa NPC1, u odnosu na miševe WT, dok je LAMP1 sumarno pokazao znatno jači signal u uzorcima miševa WT nego miševa NPC1. S obzirom da sam zbog ograničenja u broju uzoraka izdvojenih hipokampusa bila limitirana napraviti ovaj pokus samo jedan put, frakcioniranje i analizu potrebno je ponoviti u triplicatu kako bi ovi preliminarni rezultati mogli biti validirani.

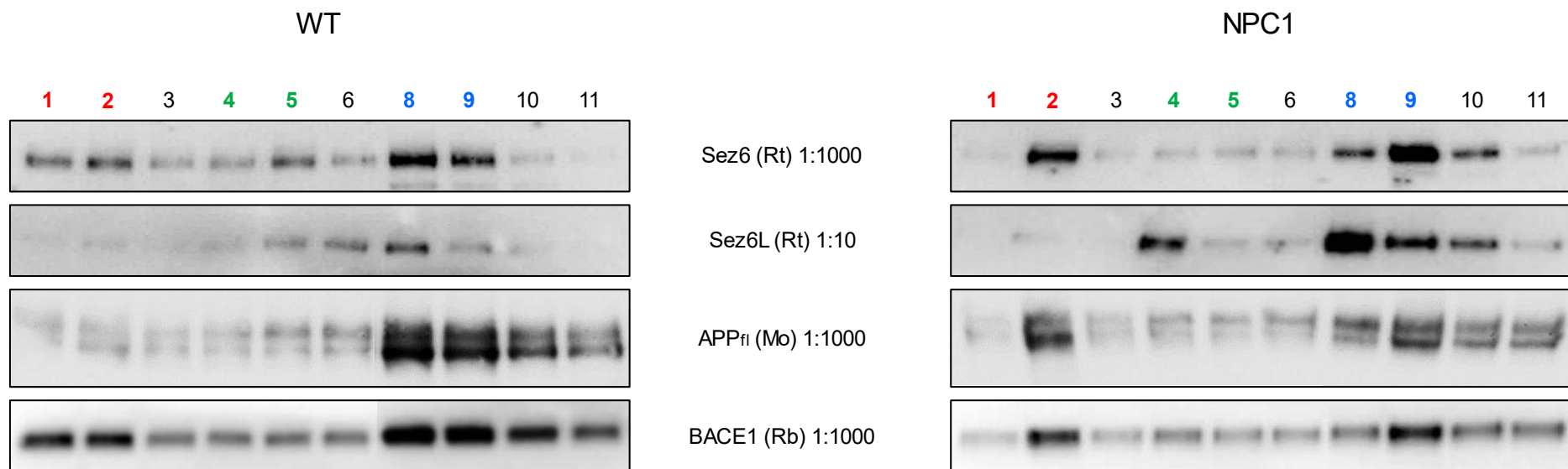


**Slika 11.** – Preliminarni rezultati analize razine i distribucije proteinskih biljega kasnih, odnosno ranih endosoma i lizosoma u izdvojenim endosomalnim frakcijama tkiva hipokampusa devet tjedana starih miševa WT i NPC1. A) Signali (proteinske vrpce) dobiveni imunodetekcijom pomoću primarnih protutijela Rab7 (RabMab), LAMP1 (Sigma-Aldrich) te EEA1 (Cell Signaling). Pojedine frakcije označene su brojevima 1-6 i 8-11, pri čemu je frakcija 1 najlakša (najrjeđa), a frakcija 11 najteža (najgušća) frakcija. Sedma frakcija izostavljena je jer je nije bilo dovoljno za analizu. Brojevi frakcija od interesa označeni su bojama: crvenom – frakcije kasnih endosoma/lizosoma, zelenom – frakcije ranih endosoma te plavom – teške frakcije (ostatci staničnih membrana, endoplazmatskih retikuluma i Golgijevih aparata). B) Grafički prikazi intenziteta signala proteinskih biljega kasnih i ranih endosoma te lizosoma po frakcijama između miševa WT i NPC1 dobiveni kvantifikacijom signala pomoću programa *ImageJ*. C) Grafički prikazi odnosa ukupnog intenziteta signala (zbroj intenziteta signala svih 10 frakcija) proteinskih biljega kasnih i ranih endosoma te lizosoma između miševa WT i NPC1.

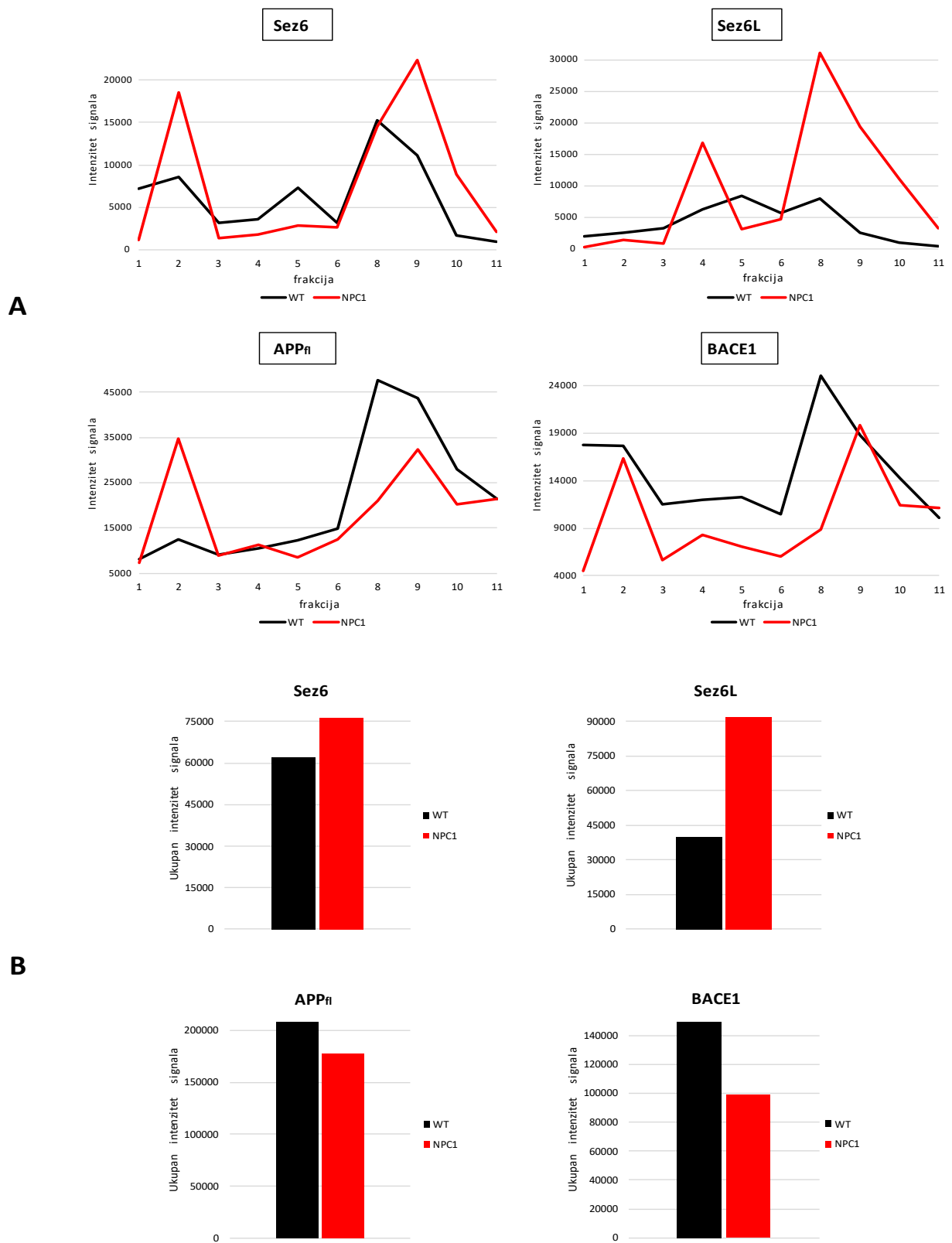


#### **4.5. Preliminarna analiza razine i distribucije supstrata i enzima BACE1 u razdvojenim endosomalnim frakcijama hipokampusa devet tjedana starih miševa WT i NPC1**

Rezultati dobiveni analizom i kvantifikacijom enzima BACE1 i njegovih supstrata (Sez6, Sez6L i APP<sub>fl</sub>), prikazani su na **slikama 12. i 13.** Pojedine frakcije označene su brojevima 1-6 i 8-11. Na slici 12. i 13-A može se vidjeti da supstrat Sez6L ima potpuno drugačiju raspodjelu po frakcijama, u odnosu na supstrate Sez6 i APP<sub>fl</sub> te enzim BACE1, čija je raspodjela po frakcijama podjednaka. U hipokampusu miševa WT i NPC1, supstrat Sez6 daje signal u frakcijama kasnih endosoma 1 i/ili 2. Za razliku od supstrata Sez6, supstrat Sez6L pokazuje najizraženiji signal u frakcijama 5 i 6 miševa WT, dok je u frakcijama miševa NPC1 ovaj signal najjači u frakciji 4. Ovaj rezultat ukazuje na različitu distribuciju supstrata Sez6L u endolizosomalnim vezikulama hipokampusa između miševa NPC1 i WT te na njegovo nakupljanje u ranim endosomima u hipokampusu miševa NPC1. Distribucija supstrata APP<sub>fl</sub> u hipokampusu miševa NPC1 potpuno prati distribuciju supstrata Sez6, kao i distribuciju enzima BACE1, tj. signal supstrata APP<sub>fl</sub> najjači je u frakciji 2, što ukazuje na njegovo nakupljanje u kasnim endosomima. U hipokampusu miševa WT nije uočeno nakupljanje supstrata APP<sub>fl</sub> u frakciji 2 kasnih endosoma, već je signal podjednako slab u svim frakcijama ranih/kasnih endosoma, frakcijama 1-5. Raspodjela enzima BACE1 po frakcijama izdvojenim iz hipokampusa miševa NPC1 gotovo u potpunosti prati onu supstrata Sez6 i APP<sub>fl</sub> - signal je prisutan u svim frakcijama, no u frakciji 2 kasnih endosoma/lizosoma je najjači. U uzorcima miševa WT, enzim BACE1 pokazuje jak signal također u frakcijama kasnih endosoma 1 i 2. Ukupan intenzitet signala između miševa WT i NPC1 jači je kod miševa NPC1 za supstrate Sez6 i Sez6L, dok je ukupan intenzitet signala miševa WT jači za supstrat APP<sub>fl</sub> i enzim BACE1 (slika 13-B).



**Slika 12.** – Preliminarni rezultati analize razine i distribucije enzima BACE1 i njegovih supstrata – Sez6, Sez6L i APP<sub>fl</sub> u endosomalnim frakcijama dobivenim iz tkiva hipokampusa devet tjedana starih miševa WT i NPC1. A) Signali (proteinske vrpce) dobiveni imunodetekcijom pomoću primarnih protutijela Sez6, Sez6L (dobiveno ljubaznošću dr. Lichtenhaler), 22C11 (Chemicon®) te BACE1 (Epitomics). Protutijelo 22C11 korišteno je za detekciju supstrata APP<sub>fl</sub>. Pojedine frakcije označene su brojevima 1-6 i 8-11, pri čemu je frakcija 1 najlakša (najrjeđa), a frakcija 11 najteža (najgušća) frakcija. Sedma frakcija nije prikazana jer nije bilo dovoljno uzorka za *western* analizu. Brojevi frakcija od interesa označeni su bojama: crvenom – frakcije kasnih endosoma i lizosoma, zelenom – frakcije ranih endosoma te plavom – teške frakcije (ostatci staničnih membrana, endoplazmatskih retikuluma i Golgijevih aparata).



**Slika 13.** – Preliminarni rezultati analize intenziteta i distribucije enzima BACE1 i njegovih supstrata – Sez6, Sez6L i APPn u endosomalnim frakcijama izdvojenim iz tkiva hipokampusa devet tjedana starih miševa WT i NPC1. A) Grafički prikazi intenziteta signala enzima BACE1 i njegovih supstrata – Sez6, Sez6L i APPn po frakcijama između miševa WT i NPC1 dobiveni kvantifikacijom signala pomoću programa *ImageJ*. B) Grafički prikazi odnosa ukupnog intenziteta signala (zbroj intenziteta signala svih 10 frakcija) enzima BACE1 i njegovih supstrata – Sez6, Sez6L i APPn između miševa WT i NPC1.

## 5. RASPRAVA

Budući da je proteaza BACE1 ključan enzim u patogenezi Alzheimerove bolesti (AB), inhibitori ove  $\beta$ -sekretaze intenzivno se istražuju kao potencijalni terapeutici AB. Kako bi se u što većoj mjeri izbjegle potencijalne nuspojave ovakvih lijekova te omogućila njihova maksimalna učinkovitost, važno je što bolje razumjeti biološka svojstva i funkciju enzima BACE1 kao i njegovih supstrata. Nedavna istraživanja u laboratoriju dr. Katušić Hećimović na Institutu Ruđer Bošković (Čaušević i sur., 2018) pokazala su povećanu proteolizu BACE1 supstrata APP, Sez6 i Sez6L u mozgovima mišjeg modela NPC bolesti (*NPCI<sup>-/-</sup>*) u odnosu na mozgove miševa divljeg tipa (WT, *NPCI<sup>+/+</sup>*). Vodeći se pretpostavkom da je nakupljanje supstrata i enzima BACE1 u ranim endosomima, uslijed disfunkcije endolizosomalnog transporta, uzrok poremećene funkcije ovog enzima te njegove povećane aktivnosti, ispitala sam molekularnu pozadinu povećane proteolize supstrata enzima BACE1 u odabranim moždanim regijama miševa NPC1 u odnosu na miševe WT.

Kako bih mogla pratiti distribuciju enzima BACE1 i njegovih supstrata u endolizosomalnom putu, uspostavila sam metodu frakcioniranja endosomalnih vezikula iz tkiva malog mozga i hipokampusa centrifugiranjem u diskontinuiranom gradijentu saharoze. Uspješnost postavljene metode, odnosno razdvajanja kasnih endosoma/lizosoma od ranih endosomalnih vezikula pokazala sam različitim biljezima – Rab7 i LAMP1 za kasne endosome/lizosome te EEA1 za rane endosome. Budući da je endolizosomalni put izrazito dinamičan, odnosno da neprestano dolazi do sazrijevanja vezikula i izmjene materijala između ranih i kasnih endosoma/lizosoma te njihove interakcije, nije moguće dobiti u potpunosti čiste lizosome i kasne, odnosno rane endosomalne vezikule. Međutim, primjenom ove metode pokazala sam da sam uspješno razdvojila biljeg lizosoma LAMP1 i donekle biljeg kasnih endosoma Rab7 od ranih endosoma – biljega EEA1 u uzorcima malog mozga miševa WT, ukazujući na uspješno uspostavljenu metodu frakcioniranja endolizosomalnih vezikula centrifugiranjem u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze. Međutim, u frakcijama izdvojenim iz uzoraka malog mozga miševa NPC1 u odnosu na miševe WT, uočila sam značajnu razliku u distribuciji biljega ranih endosoma EEA1, koja je bila slična distribuciji biljega kasnih endosoma Rab7 u ovim mozgovima. Iz dobivenog rezultata može se zaključiti da mali mozak miševa NPC1 pokazuje poremećaj u endolizosomalnom transportu te poremećaj u biogenezi ranih i kasnih endosoma, pri kojem vrlo vjerojatno dolazi do nakupljanja hibridnih vezikula na prijelazu ranih u kasne endosome. Ovaj rezultat je važan, jer pokazuje da lizosomalna bolest nakupljanja lipida NPC ne pokazuje samo disfunkciju lizosoma, što se smatra jednom od glavnih karakteristika bolesti,

već obuhvaća puno širi defekt u endolizosomalnom putu koji uključuje i rane i kasne endosome, tj. biogenezu endosoma.

Uspješnost metode izdvajanja endolizosomalnih vezikula iz mišjih moždanih regija provjerila sam i mjerenjem razine slobodnog kolesterola u kasnim, odnosno ranim endosomalnim vezikulama. Prethodna istraživanja (Kobayashi i sur., 1999; Xie i sur., 2000) pokazala su da u bolesti NPC dolazi do nakupljanja kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima zahvaćenih stanica. Sukladno tome, rezultati dobiveni u ovom radu pokazali su višu razinu kolesterola u kasnim endosomima, u odnosu na rane endosome, što je dodatan pokazatelj uspješno postavljene metode frakcioniranja endosoma. Sukladno očekivanjima i rezultatima dobivenima u CHO staničnim linijama<sup>8</sup> (Malnar i sur., 2012), pokazana je veća razina slobodnog kolesterola u kasnim, odnosno ranim endosomima u tkivu malog mozga miševa NPC1 u odnosu na miševe WT, s time da je razlika statistički značajna samo za frakcije kasnih endosoma.

Uspješno uspostavljena metoda omogućila je praćenje distribucije enzima BACE1 i njegovih supstrata u dvije regije mozga devet tjedana starih miševa - malom mozgu i hipokampusu. S obzirom da broj uzoraka izoliranih hipokampusa nije bio dovoljan za ponavljanje pokusa u triplikatu, dobiveni rezultati analize hipokampusa prikazani su kao preliminarni. Devet tjedana stari miševi pokazuju patologiju karakterističnu za terminalne stadije bolesti NPC, uključujući snažnu neurodegeneraciju Purkinjeovih neurona, dok se hipokampus smatra očuvanom regijom (Baudry i sur., 2003; Čaušević i sur., 2018). Bez obzira na različitu podložnost neurodegeneraciji Purkinjeovih neurona iz malog mozga i neurona hipokampusa, pokazala sam da i u malom mozgu i u hipokampusu dolazi do jasne redistribucije i nakupljanja supstrata, prvenstveno Sez6L u vezikulama ranih endosoma u miševima NPC1, u odnosu na miševe WT. Ovaj supstrat jedini je pokazao jasnu razliku i promjenu u distribuciji i u malom mozgu i u hipokampusu u miševima NPC1, u odnosu na miševe WT, što se slaže s prethodno objavljenim rezultatima Čaušević i sur., 2018. u kojima je pokazano da devet tjedana stari miševi NPC1 pokazuju značajno povišeno cijepanje BACE1 supstrata Sez6L, za razliku od supstrata APP i Sez6, u moždanim regijama miševa NPC1 u odnosu na miševe WT. Supstrat Sez6 također pokazuje promjenu distribucije te pokazuje određenu razliku između malog mozga i hipokampusa miševa WT i NPC1, no budući da su rezultati dobiveni za hipokampus preliminarni, ne može se pretpostaviti je li ta razlika značajna. Za supstrat APP<sub>fl</sub> nisu uočene veće razlike između genotipova. Budući da se APP cijepa  $\alpha$ - i  $\beta$ -sekretazom, vjerojatno dolazi do ravnoteže između ta dva metabolička puta. Dobiveni rezultati ukazuju da je promjena u

---

<sup>8</sup> CHO stanične linije – stanične linije jajnika kineskog hrčka (eng. *chinese hamster ovary*)

endolizosomalnom transportu supstrata enzima BACE1 ključna za povećano cijepanje tih supstrata u mozgovima mišjeg modela NPC1 bolesti te potvrđuju da je prethodno uočena povećana proteoliza supstrata BACE1 u mozgovima NPC1 mišjeg modela bolesti (Čaušević i sur., 2018), vrlo vjerojatno posljedica njihovog nakupljanja u ranim endosomima, čiji je pH optimalan za aktivnost enzima BACE1.

U tkivu malog mozga bilježi endolizosomalnih vezikula, kao i supstrati Sez6 i Sez6L, značajno su povećani u mozgovima miševa NPC1, u odnosu na miševе WT, što ukazuje na poremećaj u njihovoj ili ekspresiji ili razgradnji, vjerojatno zbog disfunkcije endolizosomalnog puta. Disfunkcija endolizosomalnog puta i poremećaj transporta unutar tog puta smatraju se okidačem neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove bolesti, a rezultati pokazuju da je takva disfunkcija prisutna i kod bolesti NPC. S obzirom na to, može se pretpostaviti da je Alzheimeru sličan fenotip u bolesti NPC u stvari posljedica defekta u transportu proteina i enzima u endolizosomalnom putu. Stoga „popravak“ biogeneze endolizosomalnog puta i dinamike stvaranja i sazrijevanja njegovih vezikula može predstavljati novi pristup u razvoju terapije protiv bolesti NPC kao i niza drugih neurodegenerativnih oboljenja za koje je karakteristična disfunkcija endolizosoma.

## 6. ZAKLJUČAK

Kompleksna Alzheimerova bolest (AB) vodeći je uzročnik demencije u svijetu. Budući da Niemann-Pickova bolest tipa C (NPC) i AB dijele određene patološke karakteristike, uključujući disfunkciju endolizosomalnog puta i povećano cijepanje enzimom BACE1, bolest NPC pokazala se dobrim modelom za istraživanje određenih molekularnih aspekata AB.

Cilj ovog diplomskog rada bio je analizirati molekularnu pozadinu povećane proteolize supstrata enzima BACE1 u malom mozgu i hipokampusu miševa NPC, u odnosu na miševe WT. Ispitala sam hipotezu da je povećana proteoliza supstrata BACE1 u moždanim regijama NPC1 u odnosu na WT miševe posljedica promijenjenog transporta ovih supstrata i/ili enzima BACE1 u endolizosomalnom putu te njihovog nakupljanja u ranim endosomima – vezikulama čiji je pH optimalan za aktivnost enzima BACE1. Dobiveni rezultati pokazali su sljedeće:

- iako proteinski biljezi ukazuju na uspješno postavljenu metodu frakcioniranja endosomalnih vezikula, zbog dinamike endolizosomalnog puta nije moguće dobiti u potpunosti čiste rane, odnosno kasne endosomalne/lizosomalne vezikule
- u kasnim endosomima miševa NPC1 u odnosu na miševe WT dolazi do nakupljanja slobodnog kolesterola
- distribucija biljega ranih i kasnih endosoma ukazala je na poremećaj njihove biogeneze u malom mozgu miševa NPC1 u odnosu na miševe WT te vjerojatno dolazi do nakupljanja hibridnih vezikula ranih/kasnih endosoma u malom mozgu miševa NPC1
- povećana proteoliza supstrata enzima BACE1 posljedica je njihovog nakupljanja u ranim endosomalnim vezikulama, a ne poremećaja u transportu enzima BACE1
- kao i kod drugih neurodegenerativnih bolesti, i kod bolesti NPC dolazi do disfunkcije endolizosomalnog puta i poremećaja transporta u tom putu te je ovaj defekt vjerojatno uzrok pojave fenotipa sličnog Alzheimerovoj bolesti u bolesti NPC

Ovi rezultati doprinose boljem razumijevanju mehanizama i funkcije enzima BACE1 i njegovih supstrata u Niemann-Pickovoj bolesti tipa C i Alzheimerovoj bolesti te boljem razumijevanju uloge poremećaja endolizosomalnog puta kao okidača ovih bolesti. Prema tome, važno je dalje istražiti potencijalnu ulogu enzima BACE1 i njegovih supstrata, naročito Sez6L, u patogenezi bolesti NPC kao i u razvoju terapije zasnovane na „popravku“ biogeneze endolizosomalnog puta za liječenje bolesti NPC, kao i niza drugih neurodegenerativnih oboljenja za koje je karakteristična disfunkcija endolizosoma.

## LITERATURA

1. Auer, I. A., Schmidt, M. L., Lee, V. M. Y., Curry, B., Suzuki, K., Shin, R. W., Pentchev, P. G., Carstea, E. D., i Trojanowski, J. Q. (1995). Paired helical filament tau (PHFtau) in Niemann-Pick type C disease is similar to PHFtau in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 90(6), 547–551. <https://doi.org/10.1007/BF00318566>
2. Baudry, M., Yao, Y., Simmons, D., Liu, J., i Bi, X. (2003). Postnatal development of inflammation in a murine model of Niemann-Pick type C disease: Immunohistochemical observations of microglia and astroglia. *Experimental Neurology*, 184(2), 887–903. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00345-5](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00345-5)
3. Bräuer, A. U., Kuhla, A., Holzmann, C., Wree, A., i Witt, M. (2019). Current challenges in understanding the cellular and molecular mechanisms in Niemann–Pick disease type C1. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4392. <https://doi.org/10.3390/ijms20184392>
4. Burns, M., Gaynor, K., Olm, V., Mercken, M., LaFrancois, J., Wang, L., Mathews, P. M., Noble, W., Matsuoka, Y., i Duff, K. (2003). Presenilin redistribution associated with aberrant cholesterol transport enhances  $\beta$ -amyloid production in vivo. *Journal of Neuroscience*, 23(13), 5645–5649. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-13-05645.2003>
5. Carstea, E. D., Morris, J. A., Coleman, K. G., Loftus, S. K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M. A., Pavan, W. J., Krizman, D. B., Nagle, J., Polymeropoulos, M. H., i sur. (1997). Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science*, 277(5323), 228–231. <https://doi.org/10.1126/science.277.5323.228>.
6. Čaušević, M., Dominko, K., Malnar, M., Vidatić, L., Čermak, S., Pignoni, M., Kuhn, P. H., Colombo, A., Havas, D., Flunkert, S., McDonald, J., Gunnensen, J. M., i sur. (2018). BACE1-cleavage of Sez6 and Sez6L is elevated in Niemann-Pick type C disease mouse brains. *PLoS ONE*, 13(7), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200344>
7. de Araújo, M. E. G., Lamberti, G., i Huber, L. A. (2015). Isolation of early and late endosomes by density gradient centrifugation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(11), 1013–1016. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot083444>
8. Distl, R., Treiber-Held, S., Albert, F., Meske, V., Harzer, K., i Ohm, T. G. (2003). Cholesterol storage and tau pathology in Niemann-Pick type C disease in the brain. *Journal*



*of Pathology*, 200(1), 104–111. <https://doi.org/10.1002/path.1320>

9. Dixit, S. S., Jadot, M., Sohar, I., Sleat, D. E., Stock, A. M., i Lobel, P. (2011). Loss of niemann-pick C1 or C2 protein results in similar biochemical changes suggesting that these proteins function in a common lysosomal pathway. *PLoS ONE*, 6(8), e23677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023677>
10. Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., i Haass, C. (2003). Reconstitution of  $\gamma$ -secretase activity. *Nature Cell Biology*, 5(5), 486–488. <https://doi.org/10.1038/ncb960>
11. Geberhiwot, T., Moro, A., Dardis, A., Ramaswami, U., Sirrs, S., Marfa, M. P., Vanier, M. T., Walterfang, M., Bolton, S., Dawson, C., Héron, B., Stampfer, M., i sur. (2018). Consensus clinical management guidelines for Niemann-Pick disease type C. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 13(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0785-7>
12. Gunnensen, J. M., Kim, M. H., Fuller, S. J., De Silva, M., Britto, J. M., Hammond, V. E., Davies, P. J., Petrou, S., Faber, E. S. L., Sah, P., i Tan, S. S. (2007). Sez-6 proteins affect dendritic arborization patterns and excitability of cortical pyramidal neurons. *Neuron*, 56(4), 621–639. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.018>
13. Hammond, N., Munkacsi, A. B., i Sturley, S. L. (2019). The complexity of a monogenic neurodegenerative disease: More than two decades of therapeutic driven research into Niemann-Pick type C disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(8), 1109–1123. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.04.002>
14. Higaki, K., Almanzar-Paramio, D., i Sturley, S. L. (2004). Metazoan and microbial models of Niemann–Pick Type C disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1685(1–3), 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2004.08.010>
15. Infante, R. E., Radhakrishnan, A., Abi-Mosleh, L., Kinch, L. N., Wang, M. L., Grishin, N. V., Goldstein, J. L., i Brown, M. S. (2008). Purified NPC1 Protein: II. Localization of sterol binding to a 240-amino acid soluble luminal loop. *Journal of Biological Chemistry*, 283(2), 1064–1075. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707944200>
16. Infante, R. E., Wang, M. L., Radhakrishnan, A., Hyock, J. K., Brown, M. S., i Goldstein, J. L. (2008). NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15287–15292.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0807328105>

17. Jin, L. W., Maezawa, I., Vincent, I., i Bird, T. (2004). Intracellular accumulation of amyloidogenic fragments of amyloid- $\beta$  precursor protein in neurons with Niemann-Pick type C defects is associated with endosomal abnormalities. *American Journal of Pathology*, *164*(3), 975–985. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63185-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63185-9)
18. Ko, D. C., Binkley, J., Sidow, A., i Scott, M. P. (2003). The integrity of a cholesterol-binding pocket in Niemann-Pick C2 protein is necessary to control lysosome cholesterol levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(5), 2518–2525. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530027100>
19. Kobayashi, T., Beuchat, M.-H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R. D., Sakuraba, H., Parton, R. G., i Gruenberg, J. (1999). Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nature Cell Biology*, *1*(2), 113–118. <https://doi.org/10.1038/10084>
20. Kuhn, P. H., Koroniak, K., Hogg, S., Colombo, A., Zeitschel, U., Willem, M., Volbracht, C., Schepers, U., Imhof, A., Hoffmeister, A., Haass, C., Roner, S., Bräse, S., i Lichtenthaler, S. F. (2012). Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons. *EMBO Journal*, *31*(14), 3157–3168. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.173>
21. Kuhn, P. H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J. W., Kremmer, E., Roßner, S., i Lichtenthaler, S. F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive  $\alpha$ -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO Journal*, *29*(17), 3020–3032. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.167>
22. Kwon, H. J., Abi-Mosleh, L., Wang, M. L., Deisenhofer, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S., i Infante, R. E. (2009). Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell*, *137*(7), 1213–1224. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.049>
23. Lackie, J. M. (2019). *Englesko-hrvatski rječnik stanične i molekularne biologije* (A. Vraneša, P. Korać, i M. Pavlica (eds.); 1. izdanje). Dominović d.o.o.
24. Li, H., Repa, J. J., Valasek, M. A., Beltroy, E. P., Turley, S. D., German, D. C., i Dietschy, J. M. (2005). Molecular, anatomical, and biochemical events associated with neurodegeneration in mice with Niemann-Pick type C disease. *Journal of Neuropathology*

- and Experimental Neurology*, 64(4), 323–333. <https://doi.org/10.1093/jnen/64.4.323>
25. Li, X., Wang, J., Coutavas, E., Shi, H., Hao, Q., i Blobel, G. (2016). Structure of human Niemann-Pick C1 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(29), 8212–8217. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607795113>
  26. Long, J. M., i Holtzman, D. M. (2019). Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies. *Cell*, 179(2), 312–339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001>
  27. Lopez, M. E., i Scott, M. P. (2013). Genetic dissection of a cell-autonomous neurodegenerative disorder: lessons learned from mouse models of Niemann-Pick disease type C. *Disease Models & Mechanisms*, 6(5), 1089–1100. <https://doi.org/10.1242/dmm.012385>
  28. Malnar, M., Hećimović, S., Mattsson, N., i Zetterberg, H. (2014). Bidirectional links between Alzheimer's disease and Niemann-Pick type C disease. *Neurobiology of Disease*, 72(Part A), 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.05.033>
  29. Malnar, M., Košiček, M., i Hećimović, S. (2009). Alzheimerova bolest: Od molekularnog mehanizma do rane dijagnoze. *Medicina*, 45(3), 234–243. <https://hrcak.srce.hr/43664>
  30. Malnar, M., Košiček, M., Lisica, A., Posavec, M., Krolo, A., Njavro, J., Omerbašić, D., Tahirović, S., i Hećimović, S. (2012). Cholesterol-depletion corrects APP and BACE1 misstrafficking in NPC1-deficient cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(8), 1270–1283. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.04.002>
  31. Malnar, M., Košiček, M., Mitterreiter, S., Omerbašić, D., Lichtenthaler, S. F., Goate, A., i Hećimović, S. (2010). Niemann-Pick type C cells show cholesterol dependent decrease of APP expression at the cell surface and its increased processing through the  $\beta$ -secretase pathway. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1802(7–8), 682–691. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.05.006>
  32. Meikle, P. J., Hopwood, J. J., Clague, A. E., i Carey, W. F. (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*, 281(3), 249–254. <https://doi.org/10.1001/jama.281.3.249>
  33. Meng, Y., Heybrock, S., Neculai, D., i Saftig, P. (2020). Cholesterol handling in lysosomes and beyond. *Trends in Cell Biology*, 30(6), 452–466. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.02.007>
  34. Naureckiene, S., Sleat, D. E., Lackland, H., Fensom, A., Vanier, M. T., Wattiaux, R., Jadot, M., i Lobel, P. (2000). Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease.

*Science*, 290(5500), 2298–2301. <https://doi.org/10.1126/science.290.5500.2298>

35. Neufeld, E. B., Wastney, M., Patel, S., Suresh, S., Cooney, A. M., Dwyer, N. K., Roff, C. F., Ohno, K., Morris, J. A., Carstea, E. D., Incardona, J. P., Strauss, J. F., i sur. (1999). The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *Journal of Biological Chemistry*, 274(14), 9627–9635. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.14.9627>
36. Nixon, R. A. (2004). Niemann-Pick type C disease and Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*, 164(3), 757–761. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63163-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63163-X)
37. Osaki, G., Mitsui, S., i Yuri, K. (2011). The distribution of the seizure-related gene 6 (Sez-6) protein during postnatal development of the mouse forebrain suggests multiple functions for this protein: An analysis using a new antibody. *Brain Research*, 1386, 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.02.025>
38. Parenti, G., Andria, G., i Ballabio, A. (2015). Lysosomal storage diseases: from pathophysiology to therapy. *Annual Review of Medicine*, 66, 471–486. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-122313-085916>
39. Peake, K. B., i Vance, J. E. (2010). Defective cholesterol trafficking in Niemann-Pick C-deficient cells. *FEBS Letters*, 584(13), 2731–2739. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.047>
40. Pfeffer, S. R. (2016). Clues to NPC1-mediated cholesterol export from lysosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(29), 7941–7943. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608530113>
41. Pfeffer, S. R. (2019). NPC intracellular cholesterol transporter 1 (NPC1)-mediated cholesterol export from lysosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 294(5), 1706–1709. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.004165>
42. Platt, F. M., D'Azzo, A., Davidson, B. L., Neufeld, E. F., i Tiffit, C. J. (2018). Lysosomal storage diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1–25. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0025-4>
43. Rego, T., Farrand, S., Goh, A. M. Y., Eratne, D., Kelso, W., Mangelsdorf, S., Velakoulis, D., i Walterfang, M. (2019). Psychiatric and cognitive symptoms associated with Niemann-Pick type C disease: neurobiology and management. *CNS Drugs*, 33(2), 125–142. <https://doi.org/10.1007/s40263-018-0599-0>

44. Saito, Y., Suzuki, K., Nanba, E., Yamamoto, T., Ohno, K., i Murayama, S. (2002). Niemann-Pick type C disease: Accelerated neurofibrillary tangle formation and amyloid  $\beta$  deposition associated with apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 homozygosity. *Annals of Neurology*, 52(3), 351–355. <https://doi.org/10.1002/ana.10266>
45. Scott, C., i Ioannou, Y. A. (2004). The NPC1 protein: structure implies function. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1685(1–3), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2004.08.006>
46. Shamma, H., Kuech, E.-M., Rizk, S., Das, A. M., i Naim, H. Y. (2019). Different Niemann-Pick C1 genotypes generate protein phenotypes that vary in their intracellular processing, trafficking and localization. *Scientific Reports*, 9, 5292. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41707-y>
47. Storch, J., i Xu, Z. (2009). Niemann–Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(7), 671–678. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.02.001>
48. Stützer, I., Selevsek, N., Esterházy, D., Schmidt, A., Aebersold, R., i Stoffel, M. (2013). Systematic proteomic analysis identifies  $\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 2 and 1 (BACE2 and BACE1) substrates in pancreatic  $\beta$ -cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), 10536–10547. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.444703>
49. Treiber-Held, S., Distl, R., Meske, V., Albert, F., i Ohm, T. G. (2003). Spatial and temporal distribution of intracellular free cholesterol in brains of a Niemann-Pick type C mouse model showing hyperphosphorylated tau protein. Implications for Alzheimer’s disease. *Journal of Pathology*, 200(1), 95–103. <https://doi.org/10.1002/path.1345>
50. Trinh, M. N., Brown, M. S., Seemann, J., Goldstein, J. L., i Lu, F. (2018). Lysosomal cholesterol export reconstituted from fragments of Niemann-Pick C1. *ELife*, 7, e38564. <https://doi.org/10.7554/eLife.38564>
51. Vanier, M. T. (2010). Niemann-Pick disease type C. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-16>
52. Vanier, M. T., i Millat, G. (2004). Structure and function of the NPC2 protein. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1685(1–3), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2004.08.007>
53. Vassar, R. (2014). BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer’s disease.

54. Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., i sur. (1999).  $\beta$ -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286(5440), 735–741. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.735>
55. Xie, C., Burns, D. K., Turley, S. D., i Dietschy, J. M. (2000). Cholesterol is sequestered in the brains of mice with Niemann-Pick type C disease but turnover is increased. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 59(12), 1106–1117. <https://doi.org/10.1093/jnen/59.12.1106>
56. Yan, R., i Vassar, R. (2014). Targeting the  $\beta$  secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *The Lancet Neurology*, 13(3), 319–329. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70276-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70276-X)
57. Zhang, T., Chen, D., i Lee, T. H. (2019). Phosphorylation signaling in APP processing in Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 209. <https://doi.org/10.3390/ijms21010209>
58. Zhou, L., Barão, S., Laga, M., Bockstael, K., Borgers, M., Gijssen, H., Annaert, W., Moechars, D., Mercken, M., Gevaer, K., i De Strooper, B. (2012). The neural cell adhesion molecules L1 and CHL1 are cleaved by BACE1 protease in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 287(31), 25927–25940. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.377465>

Internetski izvori:

<https://www.jax.org/strain/003092> (pristupljeno 21.2.2021.)

<https://www.uniprot.org/uniprot/P07339> (pristupljeno 22.3.2021.)

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Histopathology\\_of\\_amyloid\\_plaque\\_in\\_Alzheimer%27s\\_disease.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Histopathology_of_amyloid_plaque_in_Alzheimer%27s_disease.jpg) (pristupljeno 29.3.2021.)

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Histopathology\\_of\\_neurofibrillary\\_tangles\\_in\\_Alzheimer%27s\\_disease.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Histopathology_of_neurofibrillary_tangles_in_Alzheimer%27s_disease.jpg) (pristupljeno 29.3.2021.)

<https://www.enciklopedija.hr> (*Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021., pristupljeno 10.4.2021.)

<https://www.lexico.com/definition/dystonia> (pristupljeno 10.4.2021.)

## ŽIVOTOPIS

Rođena sam 28. prosinca 1996. godine u Zagrebu, gdje sam pohađala osnovnu školu Petra Preradovića i Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga, smjer: prirodoslovna gimnazija. Godine 2015. upisala sam preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a po završetku istog, svoje obrazovanje nastavila sam na diplomskom studiju eksperimentalne biologije, modul fiziologija i imunobiologija, na istom fakultetu. Dobitnica sam STEM stipendije Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske te stipendije Grada Zagreba za izvrsnost studentima. Tijekom studija sam stekla dodatno praktično iskustvo držanjem demonstratura iz kolegija Morfologija i anatomija biljaka te odrađivanjem laboratorijskih praksi na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu (voditelj prakse: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović) te na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, Odsjek za razvojnu neuroznanost (voditelj prakse: doc. dr. sc. Goran Sedmak). Također, uz nekoliko *online* tečajeva iz područja matičnih stanica i anatomije, položila sam i LabAnim (kategorija A) tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama. Godine 2018. sudjelovala sam na manifestaciji „Noć biologije“, a 2019. godine na predavljanju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta na Smotri Sveučilišta u Zagrebu. Krajem 2020. godine sudjelovala sam u organizaciji i provedbi dvodnevnog *online* Studentskog kongresa o karcinomu Studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa.