

# Inzulinska signalizacija u hipokampusu modela Alzheimerove bolesti u transgeničnih miševa

---

**Kovač, Diana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:123262>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**Sveučilište u Zagrebu**

**Medicinski fakultet**

**Diana Kovač**

**INZULINSKA SIGNALIZACIJA U HIPOKAMPUSU MODELA ALZHEIMEROVE  
BOLESTI U TRANSGENIČNIH MIŠEVA**

**Zagreb, 2022.**

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju na Zavodu za farmakologiju i Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorskim vodstvom izv.prof.dr.sc. Jelene Osmanović-Barilar u sklopu znanstvenog projekta „**Terapijski potencijal oralne galaktoze u eksperimentalnoj Alzheimerovoj bolesti**“, voditeljice prof.dr.sc. Melite Šalković-Petrišić (šifra projekta HRZZ-IP-2014-09-4639) i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2021./2022.

## POPIS KRATICA

<b>AD</b>	Alzheimerova bolest (engl. <i>Alzheimer's disease</i> )
<b>APP</b>	amiloidni prekursorski protein (engl. <i>amyloid precursor protein</i> )
<b>APS</b>	amonij persulfat (engl. <i>ammonium persulfate</i> )
<b>CAMK</b>	enzimske skupine protein-kinaza ovisnih o $Ca^{2+}$ / kalmodulinu (engl. <i>Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase class of enzymes</i> )
<b>CDK5</b>	ciklin ovisna kinaza 5 (engl. <i>cyclin-dependent kinase 5</i> )
<b>fAD</b>	familijarni oblik Alzheimerove bolesti (engl. <i>familial Alzheimer's disease</i> )
<b>HPC</b>	hipokampus (engl. <i>hippocampus</i> )
<b>HPT</b>	hipotalamus (engl. <i>hypothalamus</i> )
<b>IRS-1</b>	supstrat receptora inzulina (engl. <i>insulin receptor substrate 1</i> )
<b>LSWB</b>	puffer s niskim udjelom soli (engl. <i>low-salt washing buffer</i> )
<b>pCAMK</b>	fosforilirane enzimske skupine protein-kinaza ovisnih o $Ca^{2+}$ / kalmodulinu (engl. <i>phosphorylated Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase class of enzymes</i> )
<b>PI3K</b>	fosfatidilinozitol-3-kinaza (engl. <i>phosphoinositide 3-kinase</i> )
<b>pIRS</b>	fosforilirani oblik supstrata receptora inzulina (engl. <i>phosphorylated insulin receptor substrate 1</i> )
<b>PSEN 1</b>	presenilin 1 (engl. <i>presenilin 1</i> )
<b>PSEN2</b>	presenilin 2 (engl. <i>presenilin 2</i> )
<b>p-TAU</b>	fosforilirani tau protein (engl. <i>phosphorylated tau protein</i> )
<b>sAD</b>	sporadični oblik Alzheimerove bolesti (engl. <i>sporadic Alzheimer's disease, sAD</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	natrij dodecil sulfat - poliakrilamid gel elektroforeza (engl. <i>sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'- tetrametiletildiamin
<b>TG</b>	transgenične životinje (engl. <i>transgenic animals</i> )
<b>t-TAU</b>	ukupan tau protein (engl. <i>total tau protein</i> )
<b>WT</b>	divlji tip (engl. <i>wild type</i> )

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 Alzheimerova bolest .....	1
1.2 Transgenični mišji model Tg2576 .....	2
1.3 Inzulinska signalizacija .....	3
2. HIPOTEZA .....	5
3. OPĆI CILJEVI I METODE .....	5
4. MATERIJALI I METODE .....	6
4.1 Materijali .....	6
4.1.1 Životinje .....	6
4.1.2 Korištena protutijela i reagensi .....	6
4.2 Metode .....	6
4.2.1 Protokol pokusa za određivanje učinka starenja i APP-transgeničnosti na ekspresiju proteina povezanih s inzulinskom signalizacijom .....	6
4.2.2 Protokol žrtvovanja i pohrane tkiva miševa .....	7
4.2.3 Homogeniziranje tkiva .....	7
4.2.4 Mjerenje koncentracije proteina .....	7
4.2.5 Western blot metoda .....	8
4.2.6 Statistička analiza .....	9
5. REZULTATI .....	10
5.1 Western blot analiza ekspresije proteina povezanih s inzulinskom signalizacijom u hipokampusu 7-mjesečnih i 12-mjesečnih miševa .....	10
6. RASPRAVA .....	17
7. ZAKLJUČCI .....	20
8. ZAHVALE .....	21
9. POPIS LITERATURE .....	22
10. SAŽETAK .....	26
11. SUMMARY .....	27
12. ŽIVOTOPIS .....	28



# 1. UVOD

## 1.1 Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AB) je ireverzibilna neurodegenerativna bolest koja umanjuje mentalne sposobnosti, dovodi do poremećaja ponašanja te uzrokuje promjene osobnosti pojedinca (Powell, 1985.). Vodeći je uzrok demencije u starijih od 65 godina te se kontinuirano bilježi porast prevalencije, incidencije i mortaliteta AB-a zbog nepravovremenog postavljanja same dijagnoze (Monfared i sur., 2022.). Najveći broj oboljelih od demencije bilježe zemlje u razvoju, a sama Europska Unija broji oko 6 milijuna slučajeva. Pretpostavlja se da će u periodu između 2001. do 2040. doći do porasta za 100% u zemljama u razvoju te čak 300 % na području Kine, Indije i drugih zemalja južne Azije (Ferri i sur.,2005.). Oko 70% tih novih slučajeva demencije se pripisuje Alzheimerovoj bolesti (Reitz i sur.,2011.). Dr. Alzheimer je prvi opisao abnormalne fibrozne nakupine u citoplazmi piramidalnih neurona te je po njemu bolest i dobila ime (Alzheimer, 1907.). Osim neurofibrilarnih vretena, važan nalaz za postavljanje patološke dijagnoze su i nakupine amiloidnih plakova, vaskularne promjene te postojanje kronične upale (Perl, 2010.). Prema etiopatogenezi, bolest razvrstavamo na: familijarni (engl. *familial Alzheimer's disease, fAD*) i sporadični oblik bolesti (engl. *sporadic Alzheimer's disease, sAD*). Familijarni oblik bolesti nasljeđuje se autosomno dominantno i povezan je s mutacijama gena: protein amiloidnog prekursora (engl. amyloid precursor protein, APP), presenilin 1 (PSEN1) i presenilin 2 (PSEN2). Patološki nalazi objašnjavaju se kao rezultat navedenih mutacija, gdje promjene APP-a dovode do nakupljanja i formiranja abnormalnih amiloidnih plakova, dok PSEN1 i PSEN2 mutacije onemogućuju normalno funkcioniranje  $\gamma$  sekretaze (Kumar i sur., 2022.). Etiologija sporadičnog oblika bolesti je i dalje nerazjašnjena premda postoji više različitih teorija koje pokušavaju objasniti njen nastanak. Budući da je glavni patološki nalaz u oboljelih nakupljanje amiloidnih plakova i neurofibrilarnih vretena, najzastupljenije teorije su: amiloidna kaskadna teorija i tau hipoteza (An i sur., 2018.). Razlikujemo dva puta moguće razgradnje proteina amiloidnog prekursora (APP): amiloidogeni i ne-amiloidogeni put. U ne-amiloidogenom putu APP se razlaže djelovanjem  $\alpha$  te potom  $\gamma$  sekretaze. Tako nastali produkti imaju neuroprotektivni učinak. Amiloidogenim putem uz djelovanje  $\beta$  te potom  $\gamma$  sekretaze nastaje amiloid  $\beta(1-42)$  koji je glavni patološki supstrat odgovoran za nakupljanje i formiranje abnormalnih amiloidnih plakova (Hardy i sur., 1992.). Tau hipoteza objašnjava nastanak neurofibrilarnih snopića. Radi se o intracitoplazmatskim nakupinama pretjerano fosforiliranog tau proteina. Tau protein, u normalnim uvjetima, ima funkciju stabilizacije mikrotubula unutar

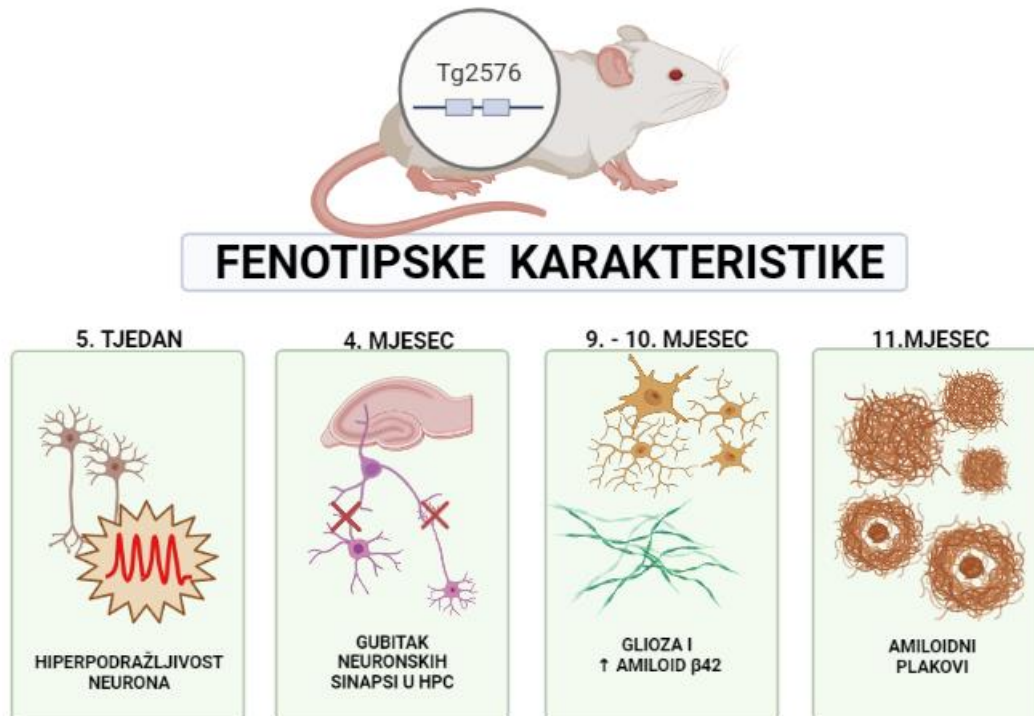
aksona. Nakupljanjem amiloida  $\beta(1-42)$  dolazi do njegove hiperfosforilacije i formiranja spiralnih uzvojnica poznatih pod imenom neurofibrilarni snopići (Querfurth i sur., 2010.). Kolinergička teorija temelji se na pozitivnoj korelaciji između stadija AB i opsega uništenja kolinergičkih neurona. Budući da primjenom inhibitora acetilkolinesteraze dolazi do kognitivnog poboljšanja u oboljelih od AB-a, dio znanstvenika podupire ovu teoriju kao moguće objašnjenje patogeneze same bolesti (Summers i sur., 1986.). Teorija oksidativnog stresa objašnjava nastanak bolesti kao posljedicu negativnog djelovanja slobodnih kisikovih radikala. Smatra se da oksidativni stres doprinosi nastanku amiloidnih plakova i NFT-a, a oni pak pozitivnom povratnom spregom dovode do porasta slobodnih kisikovih radikala čime se zatvara začarani krug (Chauhan i sur., 2006.). Hipoteza moždane deprivacije glukoze za glavni uzrok nastanka bolesti navodi postojanje inzulinske rezistencije u mozgu (engl. insulin resistant brain state, IRBS). Smanjeno iskorištavanje glukoze te postojanje poremećaja inzulinske signalizacije u oboljelih dovelo je do novog naziva za ovu bolest- „dijabetes tip 3“ (Mullins i sur., 2017.).

## **1.2 Transgenični mišji model Tg2576**

Transgenični mišji model Tg2576 nastao je kao posljedica zamijene aminokiseline lizina sa asparaginom na 670. mjestu i metionina s leucinom na 671. mjestu. Rezultat ovakvih promjena jest prekomjerna ekspresija mutirane forme APP-a (Hsiao i sur.,1996.). Najranija fenotipska karakteristika kod ovoga modela jest pojava hiperpodražljivosti neurona u 5. tjednu života. Tijekom REM faze spavanja zabilježeni su potencijali visoke amplitude koji nalikuju interiktalnim šiljcima što se smatra prvim dokazom povećane ekscitabilnosti neurona, budući da su posljedično zabilježeni napadaji kod starijih skupina miševa (Kam i sur.,2016.). U dobi od 4,5 mjeseca dolazi do gubitka dendrita u hipokampalnoj regiji CA1 te se to događa prije formiranja amiloidnih plakova na tom području, a poboljšanje stanja je uočeno kod životinja koje pretjerano ekspimiraju ljudski apoE2 (Lanz i sur.,2003.). Formiranje neurofibrilarnih vretena i gubitak neurona nisu opisani u dostupnoj literaturi (Irizarry i sur.,1997). Tijekom 9. i 10. mjeseca dolazi do povećavanja gustoće mikroglije na područjima na kojima nastaju veće količine amiloidnih plakova kao što su: hipokampus, frontalni korteks, entorinalni korteks i okcipitalni korteks (Frautschy i sur.,1998.). U tom periodu bilježi se i porast u koncentraciji amiloida  $\beta 42$ . Zabilježen je i cijeli niz poremećaja inzulinske signalizacije, što je tema i ovog rada, a detaljnije su opisani u raspravi. Naposljetku, u razdoblju između 11. i 13. mjeseca



formiraju se abnormalni amiloidni plakovi, što je ujedno i glavno obilježje ovoga modela (Hsiao i sur.,1996.). Pregled fenotipskih karakteristika prema vremenu pojavljivanja prikazan je na slici ispod (SLIKA 1.).

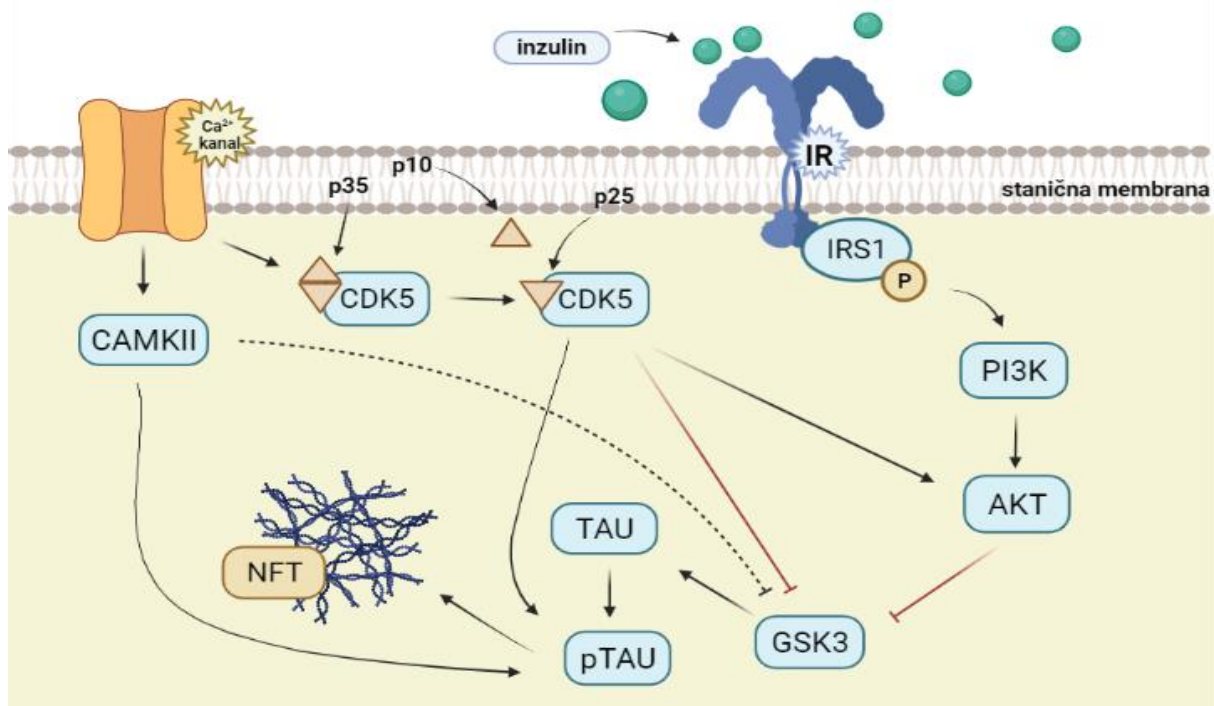


**SLIKA 1. Fenotipske karakteristike transgeničnog mišjeg modela Tg2576 s obzirom na dob.** Slika je izrađena prema bazi AlzForum.org na stranici BioRender.com.

### 1.3 Inzulinska signalizacija

Inzulinski receptor je heterotetramerski transmembranski protein koji se sastoji od dvije ekstracelularne  $\alpha$  podjedinice i dvije transmembranske  $\beta$  podjedinice koje imaju tirozin kinaznu aktivnost. Ekspresija IR-a u mozgu prvi put je potvrđena autoradiografijom receptora s najvećom koncentracijom u području hipotalamusa, hipokampusa i olfaktornog bulbosa 1978. godine (Van Houten i sur., 1979., Havrankova i sur., 1978.). Aktivaciju IR-a potiče inzulin koji do područja mozga najvećim dijelom dolazi iz periferije preko krvno-moždane barijere, a u malom opsegu inzulin se sintetizira i u mozgu (Csajbók i sur., 2016.). Dokazano je da manje od 1% periferno administriranog inzulina doseže do moždanih inzulinskih receptora (Woods i sur., 1977.). Vežanjem inzulina za  $\alpha$  podjedinice dolazi do autofosforiliranja  $\beta$  podjedinica te naknadne fosforilacije nizvodno smještenog supstrata inzulinskog receptora. Fosforilirani

supstrat inzulinskog receptora (IRS) potiče aktivaciju nizvodnih puteva PI3K i MAPK kaskade. Kao rezultat aktivacije PI3K (eng. phosphatidylinositol-3-kinase; PI3K), fosfatidilinozitol (3,4)-bisfosfat (PIP2) prelazi u fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfat (PIP3). Akt protein se veže na PIP3 što omogućava proteinu PDK1 fosforilaciju i aktivaciju Akt proteina (Alessi i sur., 1997.) koji potom vrši fosforilaciju GSK3 i uzrokuje njegovu inaktivaciju (Hooper i sur., 2008.). Pretjerana aktivnost GSK3 proteina dovodi do smanjenja produkcije acetilkolina, hiperfosforilacije tau proteina, pretjeranog nakupljanja plakova te razvitka upalnog odgovora na mjestima patoloških promjena (Pei i sur., 1997.). Na formiranje neurofibrilarnih spletova, važnu ulogu imaju i ciklin-ovisna kinaza 5 (CDK5, engl. cyclin dependent kinase 5) i kalcij/kalmodulin-ovisne protein kinaza II (CaMKII, engl. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II). Odabrani proteini inzulinske signalizacije te njihova međudjelovanja pojednostavljeno su prikazani na slici ispod (SLIKA 2.).



**SLIKA 2. Odabrani proteini inzulinske signalizacije i njihova međudjelovanja.** Na slici je prikazan PI3K/Akt signalizacijski put te utjecaj proteina CDK5 i CaMKII na formiranje neurofibrilarnih vretena. supstrat receptora inzulina (**IRS**), fosforilirani supstrat receptora inzulina (**pIRS**), ukupni tau protein (**tTAU**), fosforilirani tau protein (**pTAU**), fosfatidilinozitol-3-kinaza (**PI3K**), ciklin ovisna kinaza 5 (**CDK5**), enzimske skupine protein-kinaza ovisnih o Ca<sup>2+</sup>/ kalmodulinu (**CAMK**), fosforilirane enzimske skupine protein-kinaza ovisnih o Ca<sup>2+</sup>/ kalmodulinu (**pCAMK**). Slika je izrađena na BioRender.com.

## 2. HIPOTEZA

Promjena u genima i starenje dovode do nastanka poremećaja inzulinske signalizacije u regiji hipokampusa kod transgeničnog mišjeg modela familijarnog oblika Alzheimerove bolesti.

## 3. OPĆI CILJEVI I METODE

### Opći cilj:

Opći cilj rada je ispitati učinak starenja i APP-transgeničnosti na biokemijske promjene inzulinske signalizacije kod transgeničnog mišjeg modela fAB-a i kontrolne skupine miševa u dobi od 7 i 12 mjeseci.

### Specifični ciljevi:

1. Ispitati utjecaj starenja i APP-transgeničnosti na aktivnost IRS proteina u regiji hipokampusa 7-mjesečnih i 12-mjesečnih miševa.
2. Ispitati učinak starenja i APP-transgeničnosti na razine fosforiliranog TAU proteina u hipokampusu miševa, starosti 7 i 12 mjeseci.
3. Utvrditi postojanje promjena u aktivnosti CAMK proteina kod transgeničnog mišjeg modela fAB-a i kontrolne skupine miševa, starosti 7 i 12 mjeseci.
4. Analizirati utječe li APP-transgeničnost i starenje na ekspresiju PI3K i CDK5 proteina u hipokampusu miševa koji predstavljaju pre-simptomatski i blagi stadij bolesti.
5. Usporediti dobivene rezultate ekspresije proteina između dvije starosne skupine te odrediti njihovu povezanost sa stadijem bolesti.

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1 Materijali**

#### **4.1.1 Životinje**

U pokusima su korišteni mužjaci transgeničnih heterozigotnih miševa B6;SJL-Tg(APP<sup>SWE</sup>)2576Kha i kontrolna skupina homozigotnih miševa (Taconic Biosciences Inc., Hudson, SAD) koji su uzgajani u nastambi za laboratorijske životinje na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga (HR-POK-006). Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sa životinjama su rukovale isključivo osobe osposobljene za rad sa njima.

#### **4.1.2 Korištena protutijela i reagensi**

U istraživanju su korištena primarna protutijela: IRS (Cell Signaling, SAD), pIRS(Tyr895) (Cell Signaling, SAD), tTAU (Sigma-Aldrich, SAD), pTAU (Cell Signaling, SAD), CAMKII (Cell Signaling, SAD), pCAMK (Cell Signaling, SAD), PI3K (Cell Signaling, SAD) i CDK5(Tyr15) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., SAD). Od sekundarnih protutijela korištena su s HRP (engl. horseradish peroxidase) povezana protutijela na IgG zeca (anti-Rb) i na IgG miša (anti-Ms) (Cell Signaling, SAD).

### **4.2 Metode**

#### **4.2.1 Protokol pokusa za određivanje učinka starenja i APP-transgeničnosti na ekspresiju proteina povezanih s inzulinskom signalizacijom**

U pokusu su korišteni transgenični Tg2576 miševi i kontrolne skupine, starosti 7 i 12 mjeseci. Životinje su držane u zasebnim kavezima tijekom 2 mjeseca te su nakon provedenih kognitivnih testova žrtvovane. Ekspresija proteina povezanih s inzulinskom signalizacijom određivana je u hipokampusu. Usporedbom između grupa i statističkom analizom određen je učinak starenja i APP-transgeničnosti kod odabranih grupa.

#### **4.2.2 Protokol žrtvovanja i pohrane tkiva miševa**

U svim pokusima, prilikom žrtvovanja miševa, primijenjena je anestezija (kombinacija ketamina (50mg/kg) i ksilazina (5mg/kg)). Šest životinja po skupini je dekapitirano, odstranjen im je mozak koji se razdvoji na hemisfere te se zatim izdvoji hipokampus i sve se zamrzne u tekućem dušiku na -80°C. Kod ostatka životinja provedena je transkardijalna perfuzija na način da se igla sa fiziološkom otopinom (0,9% NaCl) uvede u lijevu srčanu komoru, a desna pretklijetka se otvori malenim rezom. Nakon toga se osigura protok fiziološke sve do trenutka kada koža i sluznica poblijede i fiziološka počne izlaziti u područje zarezanog desnog atrija. Zatim se zaustavlja protok fiziološke, a pušta se paraformaldehid (PFA) od kojeg životinja otvrdne. Tkiva od interesa se izvade i pohrane u 4% puferirani PFA.

#### **4.2.3 Homogeniziranje tkiva**

Tkivo hipokampusa se stavi u otopinu pufera za lizu stanica sastava: 50 mM Trizma baza, pH 8,0 (Sigma Aldrich, SAD) 150 mM NaCl (T.T.T., Hrvatska), 1 mM DTT (Fluka, SAD), 0,5 mM EDTA (Kemika, Hrvatska), 0,01 M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, SAD), 0,5% natrij deoksikolat (AppliChem, Njemačka), 0,1% SDS (Sigma Aldrich, SAD), 1% NP-40 (Sigma Aldrich, SAD), proteaza inhibitori (1:100; Sigma Aldrich, Njemačka) i fosfataza inhibitori (1 tableta na 10mL pufera, Roche, Švicarska) s ciljem izolacije proteina od interesa. Zatim se na ledu homogenizira pomoću sonikatora (Microson Ultrasonic Cell Disruptor XL, Manassas, SAD) te se centrifugira kroz 10 minuta. Supernatant se pohrani u triplikatu na -80 °C.

#### **4.2.4 Mjerenje koncentracije proteina**

Određivanje koncentracije proteina u homogenatima hipokampusa provodi se metodom po Lowryju (Lowry i sur. 1951). 10 µL homogenata se pomiješa sa 2 mL reagensa bakrova sulfata (49 mL otopine 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 0,1 M NaOH i 1 mL otopine dobivene miješanjem 500 µL 1% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O i 500 µL 2% NaK tartarata). Nakon 10 minuta u otopinu dodajemo 200 µL folin reagensa. Otopina se ostavi na pola sata na sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija na valnoj duljini 750 nm. Koncentracija se izračuna preko standardne krivulje otopine albumina goveđeg seruma.

#### 4.2.5 Western blot metoda

Western blot metodu započinjemo pripremom gelova na kojima će se vršiti elektroforeza. Gel priredimo miješanjem komercijalno dostupnih otopina A (2,5ml x n (MINI)) i otopina B (2,5ml x n (MINI)) za donji gel koji služi za razdvajanje proteina. Istovremeno, u drugoj posudici zamiješamo otopinu za koncentriranje A (1,5ml x n (MINI)) i otopinu za koncentriranje B (1,5ml x n (MIDI)) za gornji gel, čija je uloga dovođenje proteina u „istu startnu liniju“. Zatim u obje posudice dodamo istovremeno amonijev persulfat (APS) (30  $\mu$ L x n) za donji, odnosno (10  $\mu$ L x n) za gornji gel. Naposljetku se dodaje N,N,N',N'- tetrametiletilendiamin (TEMED) (3  $\mu$ L x n) za donji, to jest (2  $\mu$ L x n) za gornji gel. TEMED potiče razlaganje APS-a na slobodne sulfatne radikale koji zatim pokreću polimerizaciju akrilamida i bisakrilamida i dolazi do formiranja gela. Prije formiranja gela, otopina se nanese između stakalaca te se stavi češljic za formiranje jažica i ostavi se 30-45 minuta. Za to vrijeme pripremaju se uzorci za lodiranje na gel. Homogenate tkiva pomiješamo sa puferom za nanošenje na gel (engl. sample buffer) (2 mL glicerola; 6 mL 10% SDS; 2,5 mL 1 M Tris (pH 6,7); 3 mg bromfenol plavila i 15%  $\beta$ -merkaptoetanol) u omjeru 1:1. Uzorci se vorteksiraju, centrifugiraju te se po potrebi kuhaju na 95°C tijekom 10 minuta. U slučaju transmembranskih proteina koristili smo niže temperature ili se kuhanje nije niti provodilo. Gelove postavimo u aparaturu za provođenje elektroforeze i uronimo ih u pufer za provođenje elektroforeze (10g SDS-a u 100 mL H<sub>2</sub>O; 30g TRISA i 115,2 g glicina u 1 L H<sub>2</sub>O). Nanesemo prethodno pripremljene uzorke na jažice u količini od 25  $\mu$ g, a u prvu jažicu nanosimo 3  $\mu$ L referentnog standarda koji je važan za lakše određivanje lokacije istraživanog proteina (Precision Plus Protein™ Standard; Bio-Rad Laboratories, Inc., SAD). Nakon toga, slijedi elektroforeza koja traje 45 minuta pri naponu od 150V. Gelovi se potom odvoje od stakalaca te se slikaju pomoću uređaja ChemiDoc MP Imaging System UV transilluminator (Bio-Rad, USA). Gelove zatim položimo na nitroceluloznu membranu natopljenu transfer puferom (TRISbase 1,164g; glicin 0,586g; dH<sub>2</sub>O 100ml; methanol 40ml; SDS 0,75  $\mu$ L) i uloženu između dva seta celuloznih filtera. Transfer se provodi tijekom 7 minuta pri 25V i 2,5 mA. Kako bismo provjerili uspješnost prethodnog koraka, membranu uronimo u 1% Ponceau S u 4% octenoj kiselini, a zatim slijedi ispiranje u LSBW-u (pH 7,5; 1,211 g Trisa i 8,766 g NaCl u 1 L H<sub>2</sub>O) tri puta po 5 minuta. Da bismo spriječili nespecifično vezanje protutijela, membrana se blokira u puferu za blokiranje (1 g nemasnog mlijeka u prahu; 20 mL LSBW; 100  $\mu$ L Tween 20) sat vremena na sobnoj temperaturi. Blok otopina se izlije iz posudice, a na membrane nanese primarna protutijela otopljena u otopini za blokiranje preko noći na 4°C (IRS, pIRS, tTAU, pTAU, CAMK, pCAMK, PI3K, CDK5). Idući dan, primarno

protutijelo se izlije iz posudice i slijedi ponovo ispiranje sa LSBW-om tri puta po pet minuta. Zatim nanosimo sekundarno protutijelo (anti-Mouse 1:2000, anti-Rabbit 1:2000) preko membrane i ostavimo 1h na sobnoj temperaturi. Prije inkubiranja u kemiluminescentnoj otopini, membrane se isperu u LSBW-u tri puta po 5 minuta. Za detekciju signala korišten je komercijalno dostupan kemiluminiscentni reagens SuperSignal™ West Femto (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD) ili ručno priređen kemiluminiscent (0,1M TRIS pH 8,6 10ml; luminol 50  $\mu$ L; p-kumarinska kiselina 22  $\mu$ L; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3  $\mu$ L) te su membrane potom slikane MicroChemiDoc kamerom (DNR BioImaging Systems Ltd., Israel). Dobivene slike analizirane su u programu FIJI (NIH, USA).

#### 4.2.6 Statistička analiza

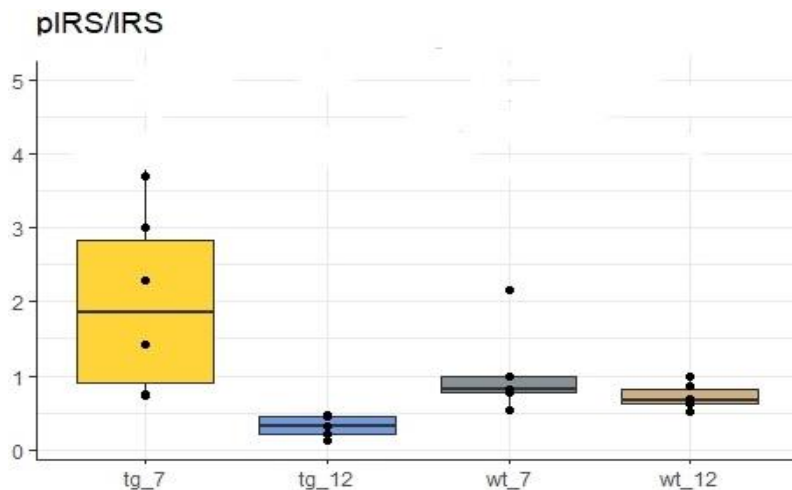
Statistička obrada provedena je korištenjem generaliziranog linearnog modela. Veličine od interesa (u ovom slučaju mjerene vrijednosti ekspresije) nazivamo zavisnom varijablom ili odzivom (engl. response), a skupinu nazivamo nezavisnom varijablom koja u našem slučaju ima četiri razine: 1.) kontrolna skupina starosti 7 mjeseci (WT\_7), 2.) kontrolna skupina starosti 12 mjeseci (WT\_12), 3.) transgenična skupina starosti 7 mjeseci (TG\_7), 4.) transgenična skupina starosti 12 mjeseci (TG\_12). Izmjerene vrijednosti koje nisu slijedile Gaussovu distribuciju su logaritmirane. Rezultati su dobiveni oduzimanjem srednjih vrijednosti dviju skupina, podešenim za vrijednost u ostalim skupinama. Odabrana razina značajnosti je  $p < 0,05$ . Usporedbe korištene u ovoj analizi odgovaraju na slijedeća pitanja: 1.) Postoji li učinak APP-transgeničnosti, odnosno postoji li razlika između transgenične i kontrolne skupine starosti 7 mjeseci? (TG\_7 – WT\_7), 2.) Postoji li učinak APP-transgeničnosti, odnosno postoji li razlika između transgenične i kontrolne skupine starosti 12 mjeseci? (TG\_12 – WT\_12), 3.) Postoji li učinak starenja, odnosno postoji li razlika u ekspresiji između kontrolne skupine starosti 7 mjeseci i 12 mjeseci? (WT\_12 – WT\_7), 4.) Postoji li učinak starenja u transgeničnoj skupini, to jest dolazi li do promjene u ekspresiji proteina između transgenične skupine starosti 7 i 12 mjeseci (TG\_12 – TG\_7). Statistička analiza je rađena u programskom jeziku R (verzija 4.2.0).

## 5. REZULTATI

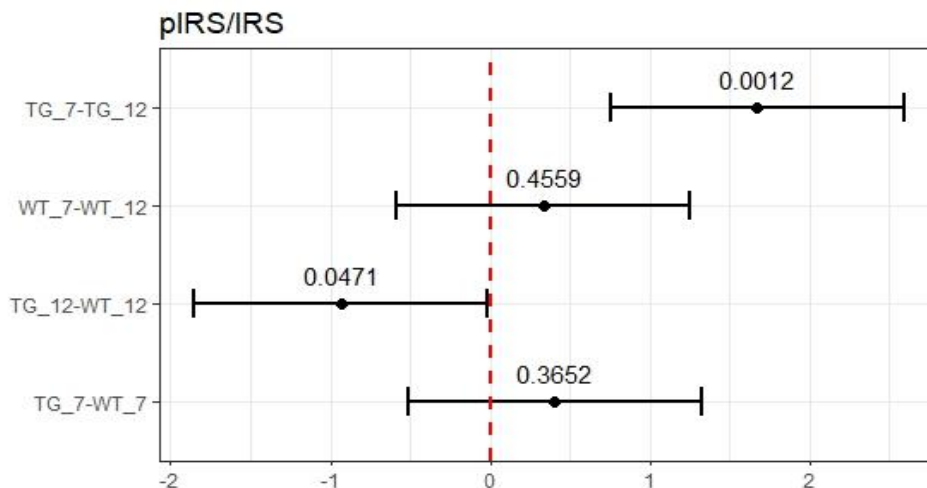
Kako bismo procijenili učinak starenja i APP-transgeničnosti na ekspresiju odabranih proteina inzulinske signalizacije provedena je western blot analiza sljedećih proteina u dvije starosne skupine miševa (7 i 12 mjeseci): supstrat receptora inzulina (**IRS**), fosforilirani supstrat receptora inzulina (**pIRS**), ukupni tau protein (**tTAU**), fosforilirani tau protein (**pTAU**), fosfatidilinozitol-3-kinaza (**PI3K**), ciklin ovisna kinaza 5 (**CDK5**), enzimske skupine protein-kinaza ovisnih o  $Ca^{2+}$ / kalmodulinu (**CAMK**), fosforilirane enzimske skupine protein-kinaza ovisnih o  $Ca^{2+}$ / kalmodulinu (**pCAMK**).

### 5.1 Western blot analiza ekspresije proteina povezanih s inzulinskom signalizacijom u hipokampusu 7-mjesečnih i 12-mjesečnih miševa

A)



B)





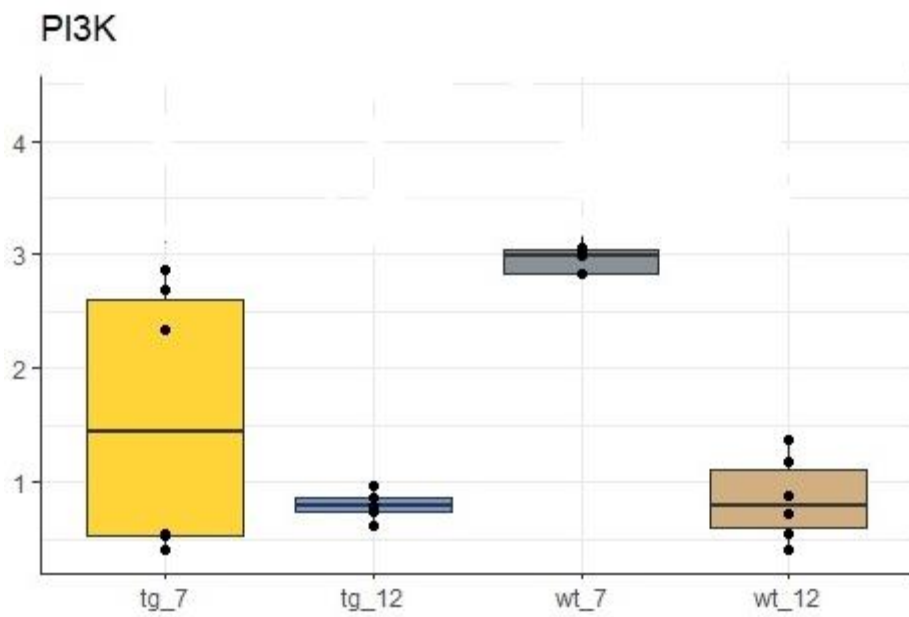
C) 7mjeseci



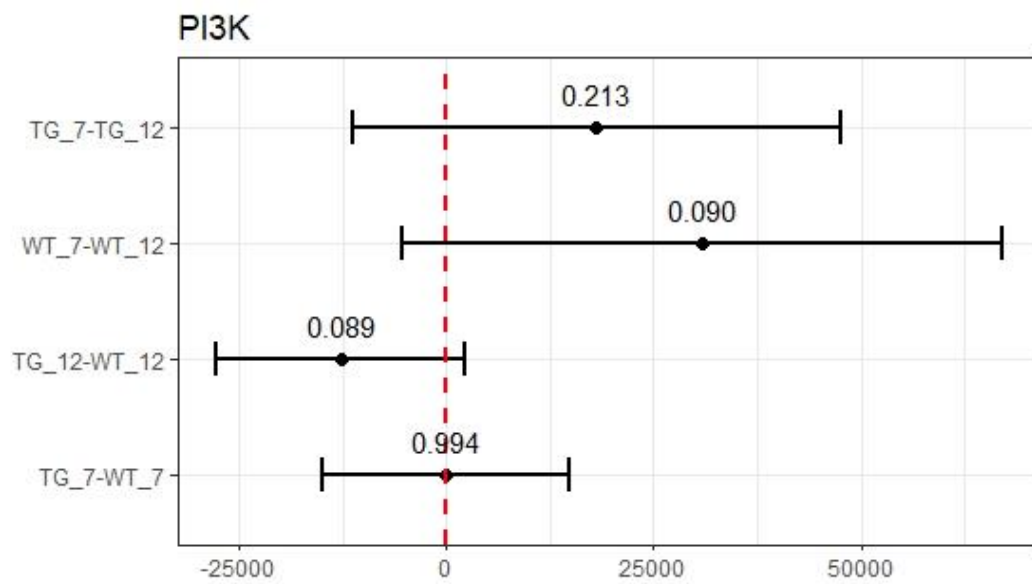
D) 12 mjeseci

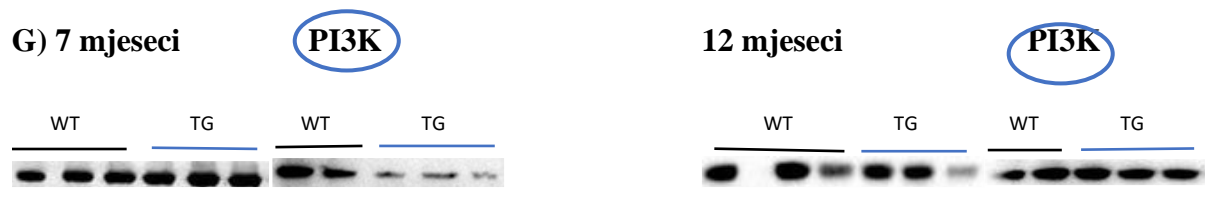


E)

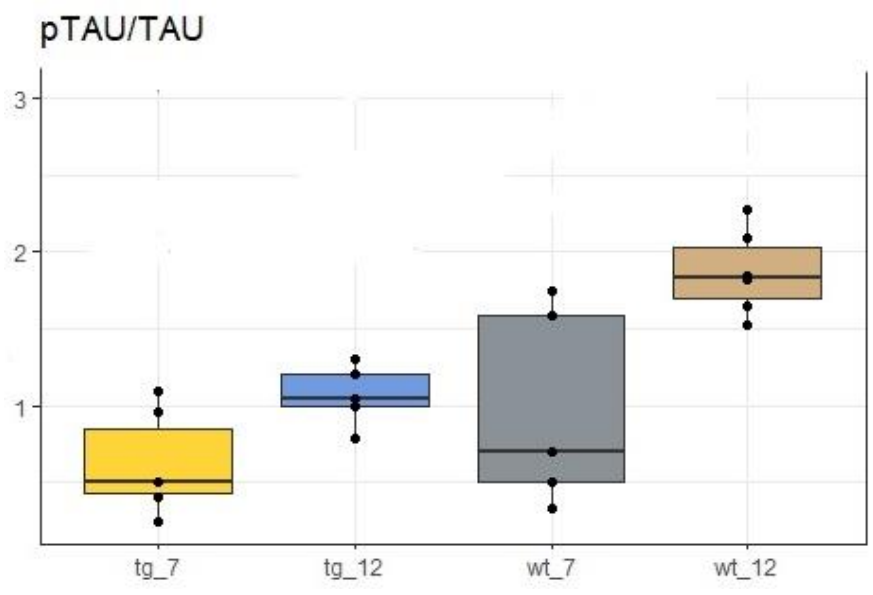


F)

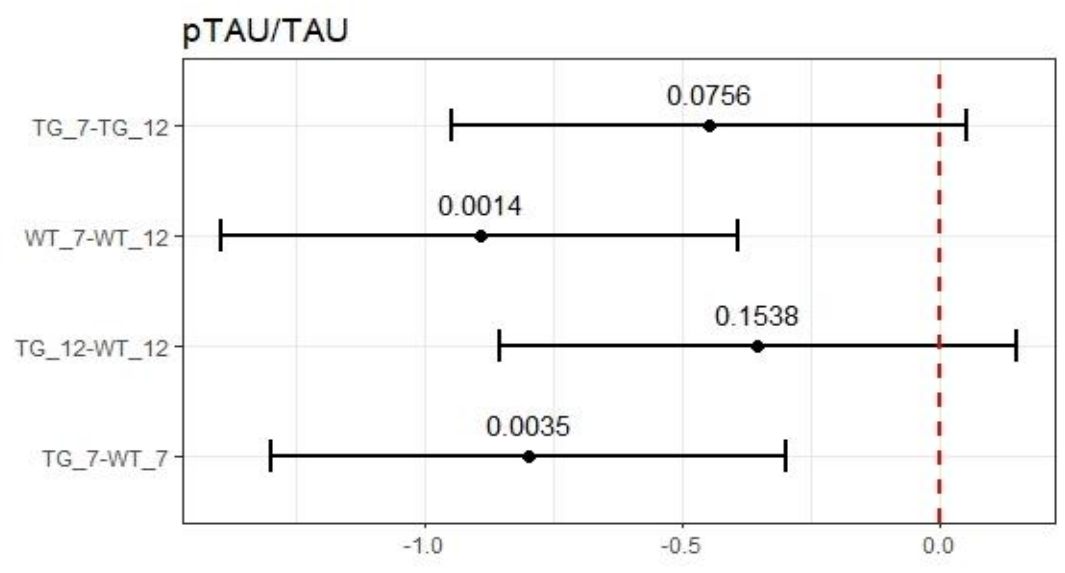




**H)**



**I)**



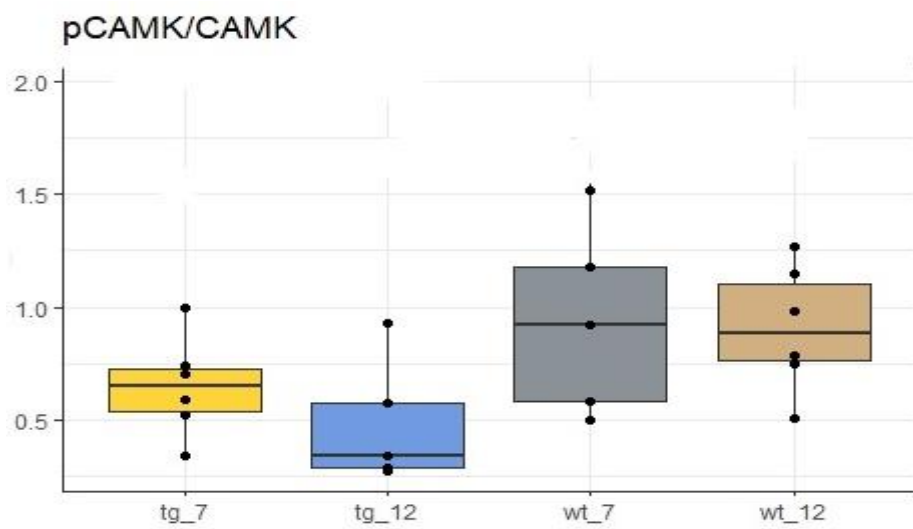
J) 7 mjeseci



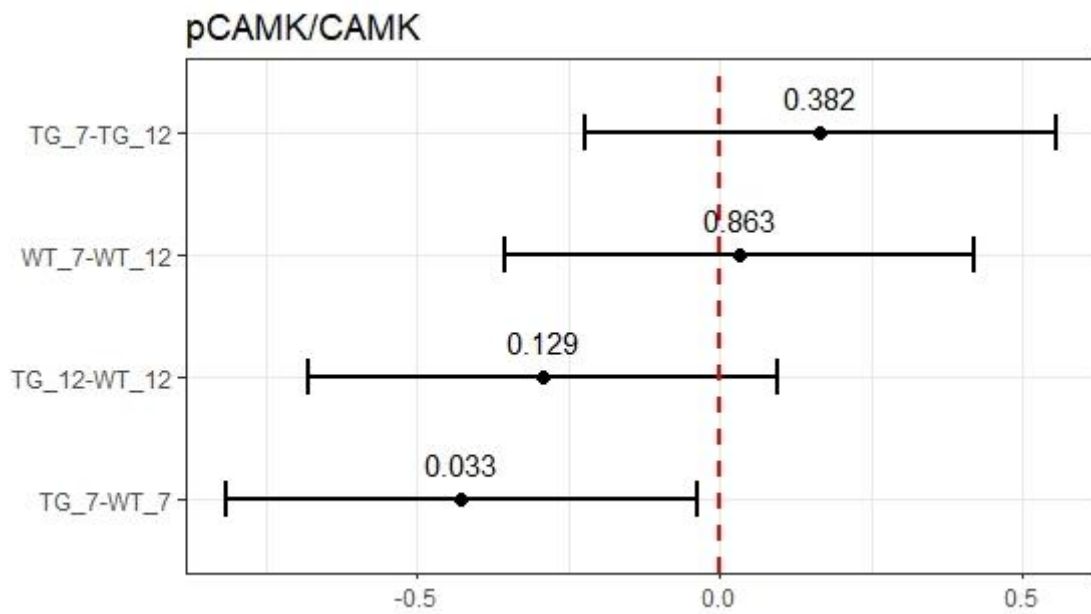
K) 12 mjeseci

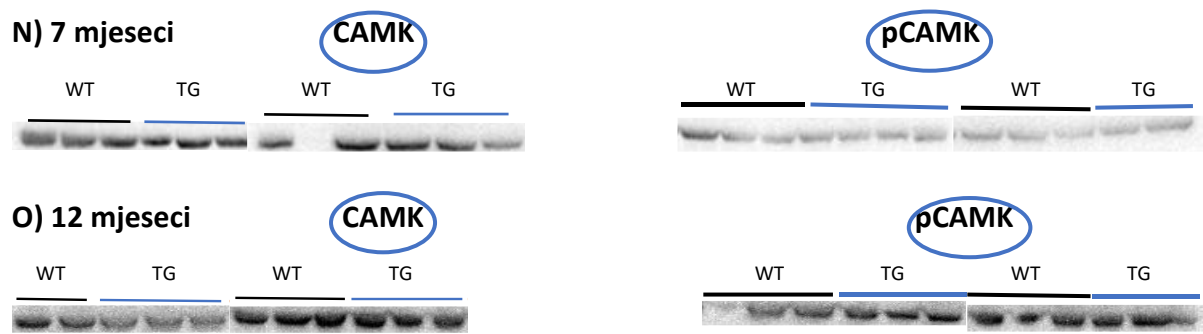


L)

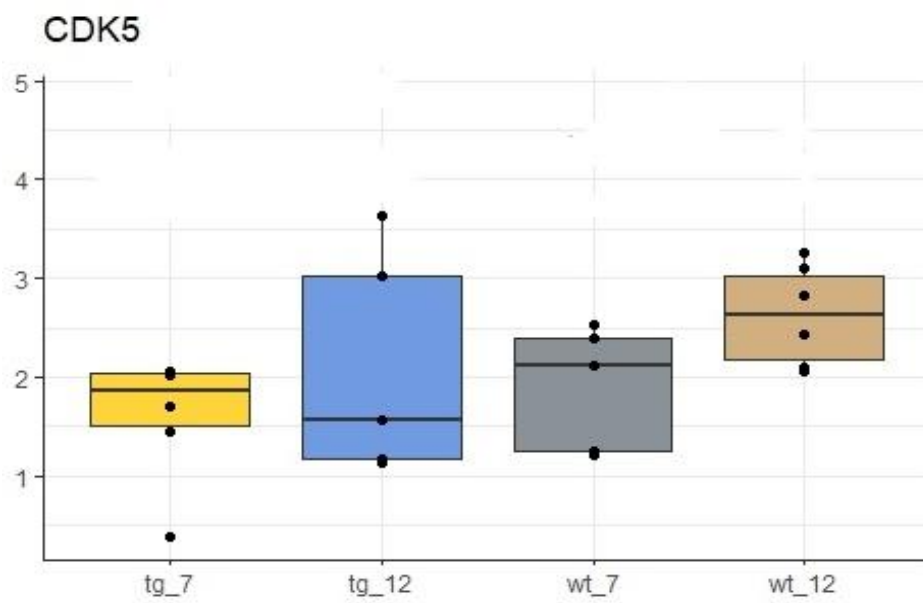


M)

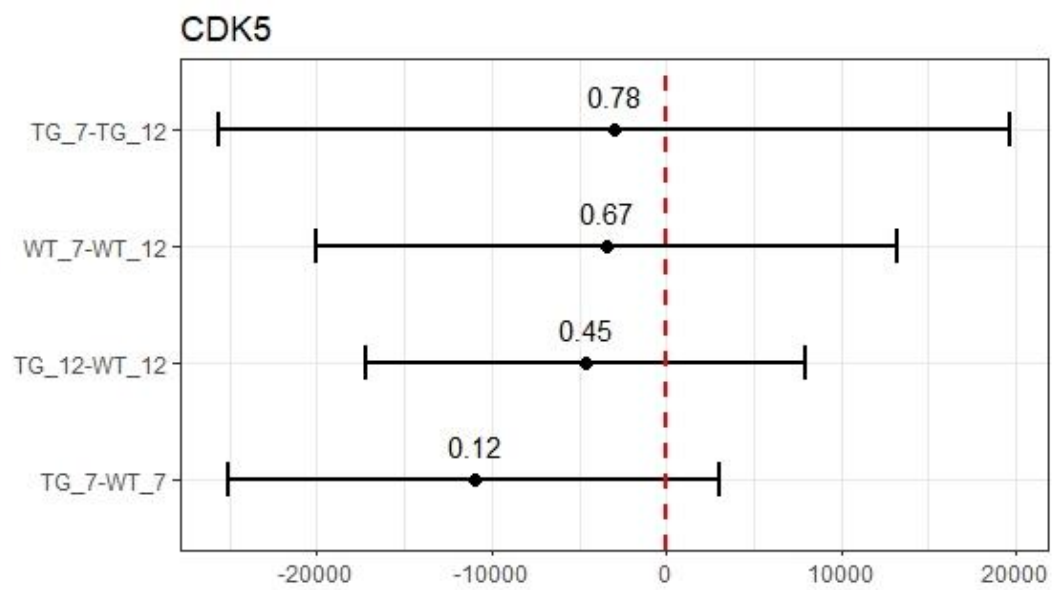


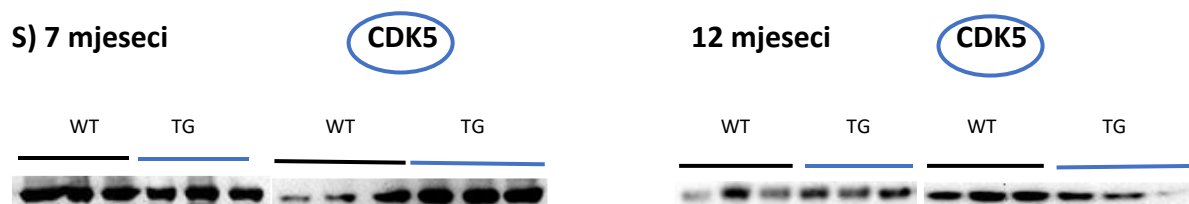


**P)**



**R)**





**SLIKA 1. Western blot analiza** omjera relativnog intenziteta signala fosforiliranog i ukupnog proteina pIRS/IRS (**A-D**) pTAU/TAU (**H-K**), pCAMK/CAMK (**L-O**) te PI3K (**E-G**) i CDK5 (**P-S**) proteina u hipokampusu 7-mjesečnih 12-mjesečnih miševa: kontrolne životinje starosti 7 mjeseci (**WT\_7**), transgenične životinje Tg2576 starosti 7 mjeseci (**TG\_7**), kontrolne životinje starosti 12 mjeseci (**WT\_12**), transgenične životinje Tg2576 starosti 12 mjeseci (**TG\_12**). Rezultati denzitometrije prikazani su box-plotovima kombiniranim s raspršenim grafikonom gdje svaka točka predstavlja jednu životinju (**A,E,H,L,P**). Na grafovima učinka (engl. effect plot) na y-osi prikazane su odabrane usporedbe, a na x-osi označena je kontinuirana varijabla. Kada crna horizontalna linija (interval pouzdanosti) siječe crvenu, isprekidanu liniju kažemo da razlika između odabranih skupina u usporedbi nije značajna. U slučaju kada je ne siječe, razlika između ispitivanih grupa jest značajna (**B,F,I,M,R**). Iznad intervala pouzdanosti označene su p-vrijednosti. Prikazane su nitrocelulozne membrane nakon elektroforetskog razdvajanja proteina obilježene protutijelima: IRS, pIRS, tTAU, pTAU, CAMK, pCAMK, PI3K i CDK5 (**C,D,G,H,K,L,O,S**). **IRS**- supstrat receptora inzulina, **PIRS**- fosforilirani supstrat receptora inzulina, **TTAU**- ukupni tau protein, **PTAU**- fosforilirani tau protein, **PI3K**- fosfatidilinozitol-3-kinaza, **CDK5**- ciklin ovisna kinaza 5, **CAMK**- enzimske skupine protein-kinaza ovisnih o  $Ca^{2+}$ / kalmodulinu, **PCAMK**- fosforilirane enzimske skupine protein-kinaza ovisnih o  $Ca^{2+}$ / kalmodulinu.

Učinci starenja i APP-transgeničnosti na ekspresiju proteina povezanih s inzulinskom signalizacijom u hipokampusu u dvije starosne skupine miševa (7 i 12 mjeseci) sažeto su prikazani u tablici na idućoj stranici (tablica 1), a detaljnije su opisani u diskusiji.

**TABLICA 1. Prikaz učinka starenja i APP-transgeničnosti na ekspresiju proteina povezanih s inzulinskom signalizacijom.**

HIPOKAMPUS	TG_7 – TG_12	WT_7– WT_12	TG_12 – WT_12	TG_7 – WT_7
$\frac{pIRS}{IRS}$	↑	=	↓	=
$\frac{pTAU}{tTAU}$	=	↓	=	↓
$\frac{pCAMK}{CAMK}$	=	=	=	↓
PI3K	=	=	=	=
CDK5	=	=	=	=

## 6. RASPRAVA

Alzheimerova bolest je progresivni neurodegenerativni poremećaj koji dovodi do ireverzibilnih promjena mozga sa posljedičnim djelovanjem na pamćenje, ponašanje i osobnost (Powell, 1985.). Vodeći je uzrok demencije u starijih osoba te se kontinuirano bilježi porast u dijagnosticiranju novih slučajeva. Rezultati populacijskih studija zabilježili su dobnostandardiziranu prevalenciju od 4,4% za AB kod osoba starijih od 65 godina za područje Europe, dok je incidencija za istu tu skupinu iznosila 19,4 na 1000 osoba-godina (Qiu i sur., 2022.). Glavna patološka obilježja Alzheimerove bolesti su: ekstracelularno nakupljanje amiloidnih plakova te formiranje neurofibrilarnih vretena potaknuto hiperfosforilacijom tau proteina unutar neuronske citoplazme. U nekih oboljelih, zabilježeno je postojanje i drugih nespecifičnih patologija za AB (npr. cerebrovaskularna oboljenja, Lewyjeva tjelešca), kod takvih slučajeva govorimo o stanju miješane demencije. U terapiji AB-a koristi se pet lijekova: donepezil, rivastigmin, galantamin, memantin i memantin u kombinaciji sa donepezilom sa svrhom ublažavanja simptoma bolesti. Američka agencija za hranu i lijekove u lipnju 2021. odobrila je Aducanumab, monoklonalno protutijelo usmjereno na abnormalne amiloidne plakove s ciljem njihove razgradnje (Padda i sur., 2022.). Provedena su klinička istraživanja te je zabilježeno smanjenje plakova kod osoba sa blagim oštećenjem kognicije i ranim stadijom demencije, no čini se da su dobiveni rezultati pokazali tek graničnu korist terapije te ostaje pitanje djelotvornosti samog lijeka (Walsh i sur., 2021., Mahase, 2021.). Budući da je etiopatogeneza ovog poremećaja još nedovoljno razjašnjena, mnoga istraživanja su usmjerena na objašnjavanje same podloge bolesti. U svrhu boljeg razumijevanja, razvijeni su animalni modeli koji se koriste u cijelom nizu studija, a transgenični mišji model Tg2576 korišten je u istraživanju opisanom u ovom radu. Radi se o jednom od najboljih modela za familijarni oblik Alzheimerove bolesti, a ovdje su korišteni za ispitivanje ekspresije proteina povezanih sa inzulinskom signalizacijom. Sama ekspresija te njene promjene nastale kao posljedica utjecaja APP- transgeničnosti i starenja, analizirani su metodom Western blot. Supstrat receptora

inzulina (IRS-1) je citoplazmatski adaptorski protein čija je uloga posredovanje i prijenos signala sa IR, IGF-1 te hibridnog IR/IGF-1 receptora (Sun i sur.,1991.). Veličine je 185 kD i ubikvitarno je izražen u stanicama tkiva (White,2002.). Vezanjem inzulina za inzulinski receptor, dolazi do disinhibicije tirozin kinazne aktivnosti IR-a prema IRS i njegove posljedične fosforilacije (Cheng i sur.,2010.). Povećane razine fosforiliranog IRS-a pronađene su u transgeničnom APP/PS1 mišjem modelu na hSer312/mSer307 i hSer636/mSer632 reziduama u području hipokampusa što ukazuje na postojanje inzulinske rezistencije (Bomfim i sur., 2012.). U skupini transgeničnih 12-mjesečnih miševa zabilježili smo smanjenje koncentracije IRS-a fosforiliranog na tirozinskom ostatku u odnosu na kontrolnu 12-mjesečnu skupinu (TG\_12 – WT\_12), što je u skladu sa prethodno navedenim istraživanjem, budući da i ovdje kod starijih transgeničnih miševa nailazimo na poremećaj u inzulinskog signalizaciji. Također, bilježimo porast kod transgeničnih 7-mjesečnih miševa u odnosu na 12-mjesečne (TG\_7 – TG\_12) što možemo objasniti kao posljedicu starenja, ali samo kod transgenične skupine, dok takav učinak u kontrolnoj skupini izostaje. IRS proteini utječu na cijeli niz nizvodnih efektoru kao što su: p85 regulatorna podjedinica PI3K, Grb-2, SHP-2, Fyn, c-Crk, CrkII i Nck. P85 regulacijska podjedinica sadrži SH2-domene koje su ključne za aktivaciju PI3K, a sama kinaza se može vezati na više različitih mjesta na IRS proteinu (White,2002.). Aktivacijom PI3K-Akt-GSK3 puta dolazi do poboljšanja učenja i pamćenja kod sisavaca te potiče nastanak sinapsi (Acebes i sur.,2012.). Nadalje, dokazano je da aktivacija PI3K poboljšava kontekstualno učenje te formiranje dendrita u hipokampusu štakora (Barreto i sur.,2014.). Zanimljivo, u našem istraživanju nisu primjećene značajne razlike između kontrolne „zdrave“ skupine i transgenične skupine, niti je postojao značajan efekt starenja na promjenu ekspresije PI3K. Značajne promjene nisu zabilježene niti u ekspresiji kinaze ovisne o ciklinu 5 (CDK5)- serin/treonin kinaze čija je glavna uloga zaustavljanje i diferencijacija staničnog ciklusa neurona (Shupp i sur.,2017.). Nizvodno, PI3K djeluje na Akt protein, a ona pak dalje utječe na aktivnost GSK3.



Nefosforilirani, aktivni oblik GSK3 potiče fosforilaciju TAU proteina te formiranje neurofibrilarnih vretena. Zanimljivo, u hipokampusu transgeničnih miševa bilježe se niže razine pTAU u odnosu na kontrolnu 7-mjesečnu skupinu (TG\_7 vs WT\_7) što je u skladu sa činjenicom da u ranijim stadijima bolesti u literaturi nisu zabilježene pojave formiranja NFT-a. Također, niže koncentracije uočene su i u starije skupine kontrolnih miševa u odnosu na mlađe, 7-mjesečne miševe (WT\_12 vs WT\_7). CAMKII enzimske skupine protein-kinaza ovisnih o  $Ca^{2+}$ / kalmodulinu imaju važnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti te nizvodno dovode do fosforiliranja tau proteina. Njena poremećena aktivnost posljedično dovodi do poremećaja signalizacije kalcija što naposljetku može dovesti do nastanka patoloških promjena sličnih onima u Alzheimerovoj bolesti. Poremećena intracelularna homeostaza kalcija zabilježena je i u sporadičnom i u familijarnom obliku Alzheimerove bolesti (LaFerla, 2002.). U našem istraživanju, zabilježene su snižene koncentracije fosforiliranog CAMKII u skupini transgeničnih 7-mjesečnih miševa u odnosu na kontrolnu skupinu starosti 7 mjeseci (TG\_7 vs WT\_7) dok ostale usporedbe nisu bile značajne. Uzevši u obzir kompleksnost inzulinske signalizacije te nepostojanje jasnog objašnjenja nastanka patoloških promjena u mozgu oboljelih teško je utvrditi glavni signalizacijski put koji je odgovoran za hiperfosforilaciju tau proteina i nastanak neurofibrilarnih formacija što predstavlja i glavni nedostatak rada. Zaključno, možemo reći da rezultati koji su prezentirani u ovom radu, nude uvid u promjene ekspresije proteina odabranog signalizacijskog puta te omogućuju određivanje utjecaja starenja, ali i APP-transgeničnosti na pojedine promjene ekspresije. Mišljenja smo da bi dobiveni rezultati mogli pridonjeti boljem razumijevanju biokemijskih poremećaja koji se odvijaju u pozadini bolesti, ali i svjesni činjenice da su potrebna dodatna opširna istraživanja kako bi se približili mogućem objašnjenju etiologije ove progresivne i ireverzibilne bolesti.

## 7. ZAKLJUČCI

1. APP-transgeničnost i starenje dovode do povećanja koncentracije fosforiliranog oblika supstrata inzulinskog receptora (IRS-1) kod transgenične skupine 7-mjesečnih miševa u odnosu na 12-mjesečne transgenične miševe (TG\_7 vs TG\_12) te smanjenja kod transgenične skupine 12-mjesečnih miševa u odnosu na kontrolnu skupinu starosti 12 mjeseci (TG\_12 vs WT\_12) što možemo objasniti kao kombinirani utjecaj promijenjenih gena, ali i kasnijeg stadija bolesti, budući da značajne razlike izostaju kod kontrole i transgenične skupine u presimptomatskoj fazi bolesti.
2. Učinak APP-transgeničnosti u 7-mjesečnih miševa dovodi do smanjene koncentracije fosforiliranog tau proteina u odnosu na kontrolu (TG\_7 vs WT\_7) dok isti učinak ima i starenje kod kontrolne skupine 12-mjesečnih miševa u odnosu na kontrolnu skupinu starosti 7-mjeseci (WT\_7 vs WT\_12).
3. Koncentracija fosforiliranog CAMKII snižena je samo u skupini transgeničnih 7-mjesečnih miševa u odnosu na kontrolnu skupinu starosti 7-mjeseci (TG\_7 vs WT\_7) što tumačimo kao izravan učinak promijenjenih gena, dok taj učinak izostaje u skupini miševa starosti 12 mjeseci pa to možemo objasniti da starenje ima obrnuto proporcionalni učinak na ekspresiju od transgeničnosti.
4. Promjena u ekspresiji proteina PI3K i CDK5 nije bila značajna niti u jednoj od provedenih usporedbi što možemo objasniti time da APP-transgeničnost i starenje vjerojatno imaju značajan učinak na neku drugu, nespecificiranu komponentu inzulinskog signalizacijskog puta.

## **8. ZAHVALE**

Hvala prof. dr. sc. Meliti Šalković-Petrišić, voditeljici laboratorija za molekularnu neurofarmakologiju, na prilici da kao studentica učim u njenom laboratoriju.

Veliko hvala mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Jeleni Osmanović-Barilar, na ukazanom povjerenju, stručnom i strpljivom vodstvu te svim savjetima i pomoći prilikom izrade ovoga rada.

Hvala bacc. med. lab. diag. Josipu Paviću što me naučio raditi Western blot.

Naposljetku, najveće hvala mojoj obitelji, ocu Miri, mami Blaženki, sestri Dubravki i bratu Stanku na svemu. Legende ste!

## 9. POPIS LITERATURE

- Acebes A, Morales M. At a PI3K crossroads: lessons from flies and rodents. *Rev Neurosci.* 2012;23(1):29-37.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, i sur., Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol.* 1997;7(4):261-9.
- Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clin Anat.* 1995;8(6):429-31.
- An Y, Varma VR, Varma S, Casanova R, Dammer E, Pletnikova O, i sur., Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2018;14(3):318–329.
- Bomfim TR, Forny-Germano L, Sathler LB, Brito-Moreira J, Houzel JC i sur., An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease- associated A $\beta$  oligomers. *J Clin Invest.* 2012;122(4):1339-53.
- Brenowitz WD, Hubbard RA, Keene CD, Hawes SE, Longstreth WT, i sur., Mixed neuropathologies and estimated rates of clinical progression in a large autopsy sample. *Alzheimers Dement.* 2017;13(6):654-62
- Chauhan V, Chauhan A. Oxidative stress in Alzheimer's disease, *Pathophysiology,* 2006; 13 (3); 195-208.
- Cheng Z, Tseng Y, White MF. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(10):589-98.
- Csajbók ÉA, Tamás G. Cerebral cortex: a target and source of insulin? *Diabetologia.* 2016;59(8):1609-15.
- Enríquez-Barreto L, Cuesto G, Dominguez-Iturza N, Gavilan E, Ruano D, FerrandezRuiz A, i sur. Learning improvement after PI3K activation correlates with de novo formation of functional small spines, *Front. Mol. Neurosci* 2014;6.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, i sur.. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 2005;366(9503):2112-2117.
- Frautschy SA, Yang F, Irrizarry M, Hyman B, Saido TC i sur. Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol.* 1998;152(1):307–17.

- Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1991;12(C):383–8.
- Havrankova J, Roth J and Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 1978;272, 827–829
- Hooper C, Killick R, Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2008;104(6):1433-9.
- Hoshi M, Takashima A, Noguchi K, Murayama M, Sato M, Kondo S, i sur., Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1996; 93:2719–2723.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, i sur. Correlative
- Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT. APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in 154 CA1. *J Neuropathol Exp ,Neurol.* 1997;56(9):965–73.
- Kam K, Duffy Á, Moretto J. Interictal spikes during sleep are an early defect in the Tg2576 mouse model of  $\beta$ -amyloid neuropathology. *Sci Rep* 2016;6: 20119
- Kapasi A, DeCarli C, Schneider JA. Impact of multiple pathologies on the threshold for clinically overt dementia. *Acta Neuropathol* 2017;134(2):171-86.
- Kumar A, Sidhu J, Goyal A, Tsao JW. Alzheimer Disease. 2021 Aug 11. In: *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- LaFerla FM. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(11):862-72.
- Lanz TA, Carter DB, Merchant KM. Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype. *Neurobiol Dis.* 2003;13(3):246-53.
- Lobo A, Launer L, Fratiglioni L, Andersen K, Carlo A, Breteler, M i sur. Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurology.* 2000;54:S4-9.
- Mahase E. Three FDA advisory panel members resign over approval of Alzheimer's drug *BMJ* 2021; 373.
- memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science.* 1996;274(5284):99–102.

- Mullins J, Diehl C, Chia Chee W, Kapogiannis Dimitrios. Insulin Resistance as a Link between Amyloid-Beta and Tau Pathologies in Alzheimer's Disease, *Front. Aging Neurosci.* 2017; 9.
- Padda IS, Parmar M. Aducanumab. 2022 Jan 6. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing;
- Pei J, Tanaka T, Tung YC, Braak E, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1997;56, 70–78.
- Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* 201;77(1):32-42
- Powell LS. Alzheimer's disease: a practical, psychological approach. *Women Health.* 1985;10(2-3):53-62
- Qiu C, Kivipelto M and von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention, 2009., *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 11:2, 111-128.
- Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2010 Jan 28;362(4):329-44 Erratum in: *N Engl J Med.* 2011;364(6):588
- Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2011;7(3):137-152.
- Shupp A, Casimiro MC, Pestell RG. Biological functions of CDK5 and potential CDK5 targeted clinical treatments. *Oncotarget.* 2017;8(10):17373-17382
- Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis.* 2005;7(1):63-80.
- Summers WK, Majovski LV, Marsh GM, Tachiki, K and Kling A. Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type. *The NEJM* 1986; 315(20), 1241–1245.
- Sun X, Rothenberg P, Kahn C. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 1991;352, 73–77.
- Tahami Monfared AA, Byrnes MJ, White LA, Zhang Q. Alzheimer's Disease: Epidemiology and Clinical Progression. *Neurol Ther.* 2022;11(2):553-569.
- Tg2576 | ALZFORUM [Internet]. Dostupno na: <https://www.alzforum.org/research-models/tg257>

- Van Houten M, Posner B, Kopriwa B, Brawer J. Insulin-Binding Sites in the Rat Brain: In Vivo Localization to the Circumventricular Organs by Quantitative Radioautography. *Endocrinology* 1979;105(3): 666–673.
- Walsh S, Merrick R, Milne R, Brayne C. Aducanumab for Alzheimer's disease? *BMJ*. 2021;374:n1682.
- White MF. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283(3):E413-22.
- Woods SC, Porte D Jr. Relationship between plasma and cerebrospinal fluid insulin levels of dogs. *Am J Physiol*. 1977;233(4):E331-4.

## 10. SAŽETAK

### INZULINSKA SIGNALIZACIJA U HIPOKAMPUSU MODELA ALZHEIMEROVE BOLESTI U TRANSGENIČNIH MIŠEVA

**Diana Kovač**

Alzheimerova bolest je progresivni neurodegenerativni poremećaj koji dovodi do ireverzibilnih promjena mozga s posljedičnim djelovanjem na pamćenje, ponašanje i osobnost. Glavna patološka obilježja bolesti su: ekstracelularno nakupljanje amiloidnih plakova te formiranje neurofibrilarnih vretena potaknuto hiperfosforilacijom tau proteina. Razlikujemo dva oblika ove bolesti: sporadični i familijarni oblik. U ovom istraživanju korišteni su transgenični Tg2576 miševi koji predstavljaju model familijarnog oblika Alzheimerove bolesti (fAB). Ispitani su učinci APP-transgeničnosti i starenja u predsimptomatskom i blagom stadiju bolesti. Izmjerena je ekspresija proteina inzulinske signalizacije (IRS, pIRS, PI3K, CDK5, TAU, pTAU, CAMKII i pCAMKII) u hipokampusu u dvije starosne skupine miševa 7 i 12 mjeseci. Naši rezultati ukazuju na postojanje biokemijskih promjena u hipokampusu između dvije različite starosne skupine miševa te ukazuju na važnost odabira odgovarajućeg modela obzirom na dob životinja prilikom provođenja istraživanja.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, inzulinska signalizacija, transgenični miševi, western blot, hipokampus



## **11. SUMMARY**

### **INSULIN SIGNALING IN THE HIPPOCAMPUS OF THE TRANSGENIC MOUSE MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE**

**Diana Kovač**

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder that leads to irreversible brain changes with consequent effects on memory, behavior and personality. The main pathological features of the disease are an extracellular accumulation of amyloid plaques and the formation of neurofibrillary tangles induced by hyperphosphorylation of tau protein. There are two forms of this disease: sporadic and familial. Transgenic Tg2576 mice representing the familial form of Alzheimer's disease (fAB) were used in this study. The effects of APP-transgenicity and aging in the pre-symptomatic and mild stages of the disease were examined. The expression of insulin signaling proteins (IRS, pIRS, PI3K, CDK5, TAU, pTAU, CAMKII, and pCAMKII) was measured in the hippocampus in two age groups of mice, 7 and 12 months. Our results indicate the existence of biochemical changes in the hippocampus between two different age groups of mice indicate the importance of choosing the appropriate age-model when conducting a research.

Key words: Alzheimer's disease, insulin signaling, transgenic mice, western blot, hippocampus

## 12. ŽIVOTOPIS

Moje ime je Diana Kovač. Rođena sam 2.5.1997. godine u Ljubuškom, Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu „Tina Ujevića“ i Gimnaziju „Ljubuški“ završila sam kao Učenica generacije. Godine 2016. upisala sam Medicinski fakultet u Zagrebu gdje sam na 3. godini dobila Dekanovu nagradu za uspjeh (5,0). Tijekom studija obavljala sam demonstrature iz predmeta: Anatomija i klinička anatomija, Temelji neuroznanosti, Patofiziologija i Klinička propedeutika. Članica sam volonterske udruge „Krijesnica“ za pomoć djeci oboljeloj od malignih bolesti i igram futsal u ženskoj futsal sekciji MEF-a.