

Utjecaj unutarstaničnoga kolesterola i C-terminalnoga odsječka proteina prekursora amiloida β na funkciju retromera u modelima Alzheimerove bolesti

Dominko, Kristina

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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:105:191606>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Kristina Dominko

**Utjecaj unutarstaničnoga kolesterola
i C-terminalnoga odsječka proteina
prekursora amiloida β na funkciju
retromera u modelima Alzheimerove
bolesti**

DISERTACIJA



Zagreb, 2020.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Kristina Dominko

**Utjecaj unutarstaničnoga kolesterola
i C-terminalnoga odsječka proteina
prekursora amiloida β na funkciju
retromera u modelima Alzheimerove
bolesti**

DISERTACIJA

Zagreb, 2020.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za istraživanje neurodegenerativnih bolesti na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Nataša Jovanov Milošević

Suvoditelj rada: dr. sc. Silva Katušić Hećimović, znanstvena savjetnica

Zahvala

Najiskrenije zahvaljujem mentorici dr. sc. Silvi Katušić Hećimović na idejama, vodstvu, prenesenom znanju, pomoći i podršci na dugom putu do realizacije doktorske disertacije. Hvala Vam što ste me svojim primjerom motivirali da započnem svoj znanstveni put.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Nataši Jovanov Milošević na čitanju disertacije, susretljivosti, pomoći i savjetima.

Najiskrenije hvala svim bivšim i sadašnjim kolegama iz Laboratorija za istraživanje neurodegenerativnih bolesti...

... dr. sc. Martini Malnar koja me vodila u prvim koracima rada u laboratoriju, na svom prenesenom znanju i neiscrpnim savjetima.

... Lei Vidatić, mag. biol. exp., na pomoći sa svim metodama prilikom dovršetka ove disertacije te na mnogobrojnim čitanjima disertacije. Hvala ti na podršci i druženju tijekom ponekad beskonačnih radnih dana.

... Ani Rastiji, mag. biol. mol., na pomoći s bezbrojnim Western blot membranama.

... dr. sc. Marku Košičeku, dr. sc. Mirsadi Čaušević i dr. sc. Stjepku Čermaku koji su mi pomagali svojim dugogodišnjim iskustvom, znanjem i savjetima.

Zahvaljujem svim članovima Zavoda za molekularnu medicinu...

... posebno članovima Laboratorija za mitohondrijsku bioenergetiku i dijabetes, gdje sam uvijek mogla računati na pomoć i podršku. Posebno zahvaljujem dr. sc. Sandri Sobočanec na statističkoj analizi rezultata disertacije, dr. sc. Marijani Popović Hadžiji na svim savjetima te ugodnim razgovorima i dr. sc. Ivi Škrinjar na pomoći i savjetima oko metode RT-PCR. Hvala najboljim tehničarkama Marini Marš i Ivi Pešun Međimorec na velikoj i brznoj pomoći u svakom trenutku.

Neizmjereno zahvaljujem Luciji Horvat, mag. biol. mol., na tehničkoj pomoći tijekom bezbrojnih sati mikroskopiranja na konfokalnom mikroskopu, ali još više moralnoj podršci, ugodnom društvu i prijateljskim razgovorima.

Zahvaljujem djelatnicima Pogona laboratorijskih životinja, dr. sc. Ranku Stojkoviću na savjetima oko organizacije pokusa na životinjama; Višnji Novalić, Maji Boranić i Goranu Golešu na održavanju mišje kolonije i uvijek dostupnoj pomoći.

Zahvaljujem našim suradnicima u inozemstvu gdje sam boravila i stekla znanje i iskustvo što je doprinijelo ovoj doktorskoj disertaciji...

... dr. sc. Sabini Tahirović i njezinom laboratoriju u Munchenu na usavršavanju izolacije Purkinje neurona, ali i teoretskoj pomoći te savjetima u usmjeravanju dokorskog rada.

... prof. dr. sc. Adelaide Fernandes iz Lisabona na svojoj pomoći oko uzgoja neurona i astrocita te imunocitokemije.

... dr. sc. Selmi Kanazir, dr. sc. Desanki Milanović i dr. sc. Aleksandri Mladenović Đorđević iz Beograda na usavršavanju metode RT-PCR te imunohistokemije.

... dr. sc. Lawrenceu Rajendranu iz Zuricha što me naučio kritički razmišljati o dobivenim rezultatima.

Zahvaljujem stručnoj savjetnici poslijediplomskog studija, gospođi Željki Pavlović, na uvijek brzom i efikasnom rješavanju svih problema tijekom dokorskog studija.

Hvala svim kolegama s poslijediplomskog studija s kojima sam dijelila probleme i iskustva u rješavanju istih i koji su mi uskakali tijekom mojih izbivanja zbog inozemnih usavršavanja.

I na kraju, neizmjereno zahvaljujem Mariji Pinterić, mag. biol. mol., dugogodišnjoj kolegici, ali povrh svega prijateljici. Uz razgovore i kave s tobom i najteži dani lakše su prošli...

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojoj obitelji...

... hvala vam što ste bili uz mene tijekom ovog dugog i trnovitog puta, vjerovali u mene, te me naučili da uvijek znam što je u životu najvažnije...

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Alzheimerova bolest	1
1.1.1. Nasljedni oblik Alzheimerove bolesti.....	3
1.1.2. Kompleksni oblik Alzheimerove bolesti	4
1.2. Protein prekursor amiloida β – središnja molekula u Alzheimerovoj bolesti.....	6
1.2.1. Proteolitička razgradnja i funkcija APP-a.....	6
1.2.2. Stanična biologija APP-a	10
1.3. Retromer u Alzheimerovoj bolesti.....	12
1.3.1. Uloga retromera	12
1.3.2. Disfunkcija retromera u Alzheimerovoj bolesti.....	15
1.4. Kolesterol i Alzheimerova bolest	18
1.4.1. Unutarstanični metabolizam kolesterola.....	18
1.4.2. Genetički i epidemiološki čimbenici povezanosti kolesterola i Alzheimerove bolesti.....	19
1.4.3. Kolesterol modulira razgradnju APP – <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> dokazi.....	20
1.5. Bolest Niemann-Pick tipa C kao model istraživanja Alzheimerove bolesti.....	22
1.5.1. Molekularna osnova bolesti NPC	22
1.5.2. Sličnosti i razlike između bolesti NPC i AB.....	23
1.5.3. Naša dosadašnja istraživanja.....	25
2. HIPOTEZA	26
3. CILJEVI RADA	27
3.1. Opći cilj	27
3.2. Specifični ciljevi	27
4. MATERIJALI I METODE	28
4.1. Stanični modeli	28
4.1.1. Uzgoj staničnih linija u kulturi	28
4.1.2. Uzgoj primarnih kultura neurona.....	29
4.2. Uzgoj mišjeg modela bolesti Niemann-Pick tipa C.....	34
4.2.1. Genotipizacija miševa	34
4.3. Modulacija razine kolesterola.....	37

4.3.1. Tretmani za snižavanje i povećanje razine kolesterola u stanicama CHOwt i <i>NPC1</i> -null	37
4.3.2. Tretmani za snižavanje kolesterola u mišjem modelu NPC	38
4.4. Modulacija razine C-terminalnih odsječaka APP-a.....	39
4.4.1. Tretmani za snižavanje i nakupljanje C-terminalnih odsječaka APP-a	39
4.4.2. Prolazna transfekcija stanica	39
4.5. Analiza razine proteina metodom Western blot	40
4.5.1. Homogenizacija proteina	40
4.5.2. Određivanje koncentracije proteina	41
4.5.3. Elektroforeza u gelu poliakrilamida.....	41
4.5.4. Prijenos proteina iz gela na membranu	43
4.5.5. Bojenje membrane metodom Amido Black.....	43
4.5.6. Obilježavanje primarnim i sekundarnim protutijelima	43
4.5.7. Prikaz signala kemiluminiscencijom	44
4.6. Analiza smještaja proteina imunofluorescencijom i konfokalnom mikroskopijom	45
4.6.1. Imunocitokemijska analiza	45
4.6.2. Imunohistokemijska analiza proteina mozga.....	47
4.7. Određivanje koncentracije peptida A β u staničnom mediju.....	49
4.8. Analiza razine i unutarstaničnog nakupljanja kolesterola u staničnim modelima.....	50
4.8.1. Mjerenje razine ukupnog kolesterola u staničnom lizatu	50
4.8.2. Imunocitokemijska analiza nakupljanja slobodnog neesterificiranog kolesterola u stanicama.....	51
4.9. Kvantitativna reakcija lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)	52
4.9.1. Izolacija mRNA i priprema cDNA	52
4.9.2. Analiza ekspresije gena upotrebom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)	52
4.10. Kvantifikacija i statistička obrada podataka	54
5. REZULTATI.....	55
5.1. Razina i smještaj proteina retromernog kompleksa u staničnom modelu bolesti NPC.	55
5.2. Utjecaj modulacije kolesterola na funkciju retromera u staničnom modelu bolesti Niemann-Pick tipa C	67

5.2.1. Utjecaj snižavanja razine kolesterola na smještaj proteina retromernog kompleksa u stanicama <i>NPC1</i> -null	67
5.2.2. Utjecaj povećanja razine kolesterola na smještaj proteina retromernog kompleksa u stanicama divljeg tipa <i>CHOWt</i>	83
5.3. Analiza razine i smještaja proteina retromernog kompleksa u mozgovima mišjeg modela bolesti <i>NPC</i>	96
5.3.1. Analiza utjecaja genotipa <i>NPC1</i> i regije mozga (mali mozak, kora velikog mozga, hipokampus) na razinu retromernog kompleksa u miševa različite starosti	98
5.3.2. Analiza rasprostranjenosti retromernog proteina <i>Vps35</i> i retromernog receptora <i>sorLA</i> u različitim regijama mozga	107
5.3.3. Analiza razine i kolokalizacije retromernog proteina <i>Vps35</i> i retromernog receptora <i>sorLA</i> u mozgu miševa <i>NPC1</i> ovisno o starosti	114
5.3.4. Utjecaj smanjenja razine kolesterola na ekspresiju i rasprostranjenost retromernih proteina i retromernog receptora <i>sorLA</i> u miševima <i>NPC1</i>	118
5.4. Analiza razine i smještaja proteina retromernog kompleksa u primarnim kulturama neurona mišjeg modela bolesti <i>NPC</i>	120
5.4.1. Analiza razine retromernih proteina <i>Vps26</i> i <i>Vps35</i> te retromernog receptora <i>sorLA</i> u kortikalnim neuronima.....	120
5.4.2. Analiza smještaja retromernog proteina <i>Vps35</i> i/ili retromernog receptora <i>sorLA</i> u primarnim kulturama neurona miševa <i>NPC1</i> i <i>wt</i>	122
5.5. Utjecaj C-terminalnih odsječaka proteina prekursora amiloida β na (dis)funkciju retromernog kompleksa	132
5.5.1. Utjecaj razine C-terminalnih odsječaka <i>APP</i> -a na razinu proteina retromernog kompleksa	135
5.5.2. Utjecaj razine C-terminalnih odsječaka <i>APP</i> -a na smještaj retromernih proteina	142
5.6. Utjecaj nakupljanja ili smanjenja razine C-terminalnih odsječaka <i>APP</i> -a na metabolizam kolesterola	152
5.6.1. Utjecaj C-terminalnih odsječaka <i>APP</i> -a na razinu ukupnog kolesterola i smještaj slobodnog kolesterola	152
5.6.2. Utjecaj razine C-terminalnih odsječaka <i>APP</i> -a na razinu proteina <i>NPC1</i>	155
5.6.3. Utjecaj razine C-terminalnih odsječaka <i>APP</i> -a na ekspresiju gena uključenih u metabolizam kolesterola	158
6. RASPRAVA.....	162
6.1. Disfunkcija retromera <i>in vitro</i> u staničnom modelu bolesti <i>NPC</i>	163
6.2. Disfunkcija retromera u staničnom modelu bolesti <i>NPC</i> ovisi o razini kolesterola....	164

6.3. Disfunkcija retromera <i>in vivo</i> u mišjem modelu bolesti NPC	166
6.4. Disfunkcija retromera u aksonalnom transportu u neuronima NPC1	170
6.5. Nakupljanje C-terminalnih odsječaka proteina prekursora amiloida β uzrokuje nakupljanje retromera unutar endosoma.....	173
6.6. Nakupljanje C-terminalnih odsječaka proteina prekursora amiloida β djeluje na ekspresiju gena i proteina uključenih u unutarstanični metabolizam kolesterola.....	176
7. ZAKLJUČCI	179
7.1. Opći zaključak	179
7.2. Specifični zaključci.....	179
8. SAŽETAK.....	180
9. SUMMARY	181
10. LITERATURA.....	182
11. ŽIVOTOPIS	201

POPIS KRATICA

Kratika	Značenje
AB	Alzheimerova bolest
ABCA1	engl. <i>ATP-binding cassette transporter 1</i>
ACAT	acil:kolesterol aciltransferaza
ADAM	skupina enzima α -sekretaza, engl. <i>a disintegrin and metalloprotease</i>
AEP	asparagin endopeptidaza
AICD	unutarstanična domena proteina prekursora amiloida β , engl. <i>amyloid β precursor protein intracellular domain</i>
APH-1	engl. <i>anterior pharynx defective-1</i>
APLP1	engl. <i>amyloid precursor protein-like protein 1</i>
APLP2	engl. <i>amyloid precursor protein-like protein 2</i>
ApoE	apolipoprotein E
ApoJ	apolipoprotein J
APP	protein prekursor amiloida β , engl. <i>amyloid β precursor protein</i>
APP695	protein prekursor amiloida od 695 aminokiseline
APP751	protein prekursor amiloida od 751 aminokiseline
APP770	protein prekursor amiloida od 770 aminokiselina
APP-fl	cjeloviti protein prekursor amiloida β , engl. <i>full-length</i>
A β	peptid amiloid β , engl. <i>amyloid β</i>
A β 38	peptid amiloid β od 38 aminokiselina
A β 40	peptid amiloid β od 40 aminokiselina
A β 42	peptid amiloid β od 42 aminokiseline
A β 43	peptid amiloid β od 43 aminokiseline
B103	stanična linija štakorskih neuroblastoma
BACE1	β -sekretaza, engl. <i>β-site amyloid β precursor protein cleaving enzyme 1</i>
BMP	bis(monoacilglicerol)fosfat
C3	inhibitor β -sekretaze
CA1	Cornu Ammonis 1 regija hipokampusa
CA2	Cornu Ammonis 2 regija hipokampusa

CA3	Cornu Ammonis 3 regija hipokampusa
CHO	stanice jajnika kineskog hrčka, engl. <i>Chinese Hamster Ovary cells</i>
CI-M6PR	kation-neovisni manoza-6-fosfatni receptor, engl. <i>Cation-Independent Mannose 6-Phosphate Receptor</i>
CoIP	koimunoprecipitacijski pufer, engl. <i>coimmunoprecipitation buffer</i>
CR1	receptor komplementa 1, engl. <i>Complement Receptor 1</i>
CRC	podjedinica retromera za prepoznavanje molekula, engl. <i>cargo recognition core</i>
CTF-APP	C-terminalni odsječak proteina prekursora amiloida β , engl. <i>C-terminal fragment of amyloid β precursor protein</i>
CTF α /C83	C-terminalni odsječak proteina prekursora amiloida β nastao cijepanjem α -sekretazom (od 83 aminokiseline)
CTF β /C99	C-terminalni odsječak proteina prekursora amiloida β nastao cijepanjem β -sekretazom (od 99 aminokiselina)
DAPT	inhibitor γ -sekretaze
dKO	dvostruki <i>knockout</i> , engl. <i>double knockout</i>
DR6	engl. <i>death receptor 6</i>
EEA1	biljeg ranih endosoma, engl. <i>early endosome antigen 1</i>
ELISA	imunoenzimska metoda, engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EOAD	rani oblik Alzheimerove bolesti, engl. <i>early-onset Alzheimer's disease</i>
ER	endoplazmatski retikulum
FAD	nasljedni oblik Alzheimerove bolesti, engl. <i>familial Alzheimer's disease</i>
FBS	serum goveđeg fetusa, engl. <i>Fetal Bovine Serum</i>
FTLD	fronto-temporalna demencija
GA	Golgijev aparat
GWAS	asocijacijske studije, engl. <i>genome-wide association studies</i>
HDL	lipoprotein velike gustoće, engl. <i>high-density lipoprotein</i>
HMGCR	hidroksimetil glutaril-koenzim A reduktaza
ICC	imunocitokemija
IHC	imunohistokemija
LAMP1	biljeg lizosoma, engl. <i>lysosomal associated membrane protein 1</i>
LDL	lipoprotein male gustoće, engl. <i>low-density lipoprotein</i>

LDLR	receptor lipoproteina male gustoće, engl. <i>low-density lipoprotein receptor</i>
LOAD	“sporadični” ili kasni oblik Alzheimerove bolesti, engl. <i>late-onset Alzheimer's disease</i>
LPDS	serum bez egzogenog kolesterola, engl. <i>lipid deficient serum</i>
LRP1	receptor lipoproteina male gustoće 1, engl. <i>low-density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
LTP	dugotrajna potencijacija, engl. <i>long-term potentiation</i>
MCI	blagi kognitivni poremećaj, engl. <i>mild-cognitive impairment</i>
miševi NPC1	miševi bez proteina NPC1
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina, engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>
MβC	metil-β-ciklodekstrin
NFTs	neurofibrilarni snopići, engl. <i>neurofibrillary tangles</i>
NPC	bolest Niemann-Pick tipa C
NPC1	protein NPC1
NPC1- <i>null</i>	stanice bez proteina NPC1
NPC2	protein NPC2
P0-P1	postnatalni dan 0-1
PB	Parkinsonova bolest
PBS	fosfatni pufer, engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	lančana reakcija polimerazom, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PEN-2	engl. <i>presenilin enhancer 2</i>
PSEN1	protein presenilin 1
PSEN2	protein presenilin 2
p-tau	hiperfosforilirani oblik proteina tau
PVDF	poliviniliden difluoridna membrana, engl. <i>polyvinylidene difluoride membrane</i>
qRT-PCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu
RAB7	biljeg kasnih endosoma, engl. <i>RAS-related protein 7A</i>
RIP	regulirana unutarmembranska proteoliza, engl. <i>regulated intramembrane proteolysis</i>
S1P	engl. <i>site 1 protease</i>
S2P	engl. <i>site 2 protease</i>

sAPP α	topljivi odsječak proteina prekursora amiloida β nastao cijepanjem α -sekretazom
sAPP β	topljivi odsječak proteina prekursora amiloida β nastao cijepanjem β -sekretazom
SH-SY5Y	stanična linija ljudskih neuroblastoma
SNX	obitelji proteina sortirajućih neksina, engl. <i>sorting nexins</i>
sortLA	engl. <i>sorting protein-related receptor containing low-density lipoprotein receptor class-A repeats</i>
SREBP	proteini koji vežu regulacijske elemente sterola, engl. <i>sterol regulatory element-binding proteins</i>
SŽS	središnji živčani sustav
TAPI	inhibitor α -sekretaze
TBS	tris-pufer, engl. <i>tris-buffered saline</i>
TGN	trans-Golgijeva mrežica
TGN46	biljeg Golgijevog aparata, engl. <i>trans-Golgi network protein 2</i> , 46 kD isoform
Vps26	retromerni protein, engl. <i>Vacuolar protein sorting-associated protein 26</i>
Vps29	retromerni protein, engl. <i>Vacuolar protein sorting-associated protein 29</i>
Vps35	retromerni protein, engl. <i>Vacuolar protein sorting-associated protein 35</i>
WASH	podjedinica retromera, engl. <i>WAS protein family homologue</i>
WB	Western blot
wt	divlji tip, engl. <i>wild-type</i>

1. UVOD

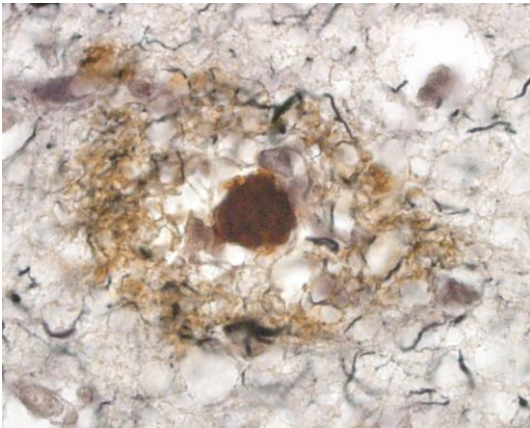
1.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AB) je najčešća neurodegenerativna bolest i najčešći uzrok demencije (u 60-70% slučajeva). Demencija zahvaća 6% ljudi starijih od 65 godina te 20% ljudi starijih od 80 godina. Smatra se da u svijetu od demencije trenutno boluje 40 milijuna ljudi, ali taj broj vjerojatno je puno veći jer kliničkim simptomima prethode prodromalne faze bolesti koje obično traju dulje od dva desetljeća (1). Upravo zbog nedostatka rane dijagnostike i terapije, te zbog produljenja životnog vijeka smatra se da će se do 2050. broj oboljelih utrostručiti (2). AB je svjetski zdravstveni i ekonomski problem te je potrebno bolje razumijevanje molekularnih mehanizama za pravovremenu dijagnostiku i terapiju.

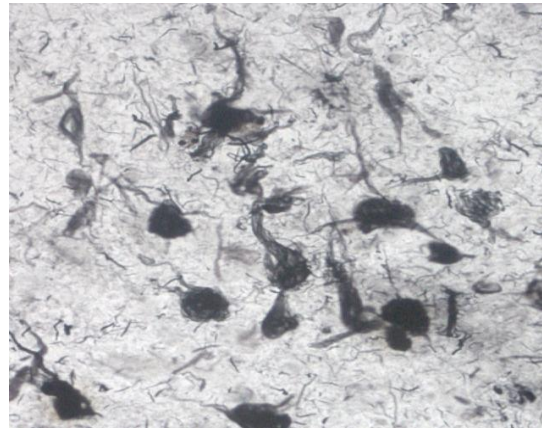
Bolest je otkrio dr. Alois Alzheimer 1901. u pacijentici Auguste D. i opisao neuropatološka obilježja bolesti (3). Glavna obilježja AB su kognitivni simptomi i progresivni gubitak intelektualne sposobnosti – smanjeno prosuđivanje, donošenje odluka i orijentacija, afazija (4), apraksija (5) i agnozija (6).

Atrofija mozga zahvaća cerebralni korteks i hipokampus, započinje u medijalnom temporalnom režnju što dovodi do smanjenja volumena hipokampusa i entorinalnog korteksa, uz povećanje ventrikula. Najosjetljivije su stanice sloja II entorinalnog korteksa, regija CA1 u hipokampusu i dijelovi temporalnog, parijetalnog i frontalnog neokorteksa. Uzrok atrofije mozga je prvenstveno gubitak neuralnih procesa (7). Uz gubitak neuralnih procesa, neuropatološka i neurokemijska obilježja AB su gubitak sinapsi, selektivna smrt neurona, smanjena razina pojedinih neurotransmitera i prisutnost proteinskih nakupina. Proteinske nakupine u neuronima čine neurofibrilarni snopići (od engl. *neurofibrillary tangles* – NFTs), a u izvanstaničnom prostoru cerebrovaskularni, difuzni i neuritski senilni plakovi prvenstveno u medijalnom temporalnom režnju i kori velikog mozga (Slika 1.). Senilni plakovi sastoje se od nakupina peptida amiloida β ($A\beta$) (8,9), a neurofibrilarni snopići od hiperfosforiliranog proteina tau (p-tau) (10,11).

A)



B)



Slika 1. Neuropatološke značajke Alzheimerove bolesti – A) amiloidni plakovi i B) neurofibrilarni snopići hiperfosforiliranog proteina tau. Slike su preuzete iz (12).

S obzirom da je poznato da su $A\beta$, ApoE i tau tri ključne molekule koje doprinose AB, postavljeno je nekoliko hipoteza o nastanku AB. Danas su i dalje najzastupljenije tzv. amiloidna i tau hipoteza. Prema tau hipotezi začetnik patoloških procesa predstavlja hiperfosforilacija topljivog mikrotubularnog proteina tau koja uzrokuje poremećaj mikrotubula te posljedično dovodi do smrti neurona i pojave demencije. Hipoteza amiloidne kaskade pretpostavlja da je nakupljanje peptida $A\beta$, zbog neravnoteže u stvaranju i razgradnji ovog peptida, začetnik patoloških procesa koji dovodi do kaskade događaja, uključujući hiperfosforilaciju proteina tau, oštećenje i prekid sinapsi, nakupljanje neurofilamenata, smrt neurona i aktivaciju stanica glija te rezultira neurodegeneracijom i demencijom (13–17). Nekoliko je argumenata koji govore u prilog amiloidnoj hipotezi. Jedan od njih je da je nakupljanje peptida $A\beta$ karakteristično za AB, a nakupljanje hiperfosforiliranog proteina tau primijećeno je i u drugim neurodegenerativnim bolestima, tj. tauopatijama (poput fronto-temporalne demencije, FTLTD) (18). Prema genetičkoj osnovi, AB se može podijeliti u dva oblika, nasljedni oblik i kompleksni oblik AB.

1.1.1. Nasljedni oblik Alzheimerove bolesti

Nasljedni oblik AB (od engl. *Familiar Alzheimer's disease*, FAD) je rijetka autosomalno dominantna bolest koja uzrokuje tzv. rani oblik AB (od engl. *Early-Onset Alzheimer's disease*, EOAD). FAD oblik bolesti zahvaća oko 10% svih AB pacijenata, a prvi simptomi pojavljuju se prije 65. godine, najčešće između 40. i 60. godine života (19). Najjasniji dokazi koji govore u prilog amiloidnoj hipotezi upravo su otkriveni u FAD. Kao uzrok FAD za sada su otkrivene mutacije u četiri gena.

Prve mutacije koje uzrokuju FAD otkrivene su u genu *APP* (20–25) za protein prekursor amiloida β (APP), a zatim i u genima za proteine presenilin 1 (gen *PSEN1*) i presenilin 2 (gen *PSEN2*) (26,27). Većina oboljelih obitelji ima mutaciju u genima *PSEN1* i *PSEN2* koji kodiraju katalitičke podjedinice enzima γ -sekretaze koja katalizira korak izravnog nastajanja peptida $A\beta$. Mutacije u genima *PSEN1* i *PSEN2* utječu na nastanak peptida $A\beta$ (27–31) prvenstveno povećavajući razinu duljeg peptida $A\beta$ – $A\beta_{42}$ koji je skloniji agregiranju (32).

Mutacije u genu *APP* su većinom pogrešne (od engl. *missense*) mutacije, a nalaze se u blizini mjesta cijepanja peptida $A\beta$ enzimima α -, β - i γ -sekretaza. Nekoliko je mehanizama kojim te mutacije dovode do FAD. Prvo, utječu na pojačano procesiranje enzimima β - i γ -sekretazom čime uzrokuju povećano nastajanje peptida $A\beta$ (33–35). Mutacije u blizini mjesta cijepanja γ -sekretazom dovode do povećanog nastanka duljeg oblika peptida $A\beta$ koji su skloniji agregiranju ($A\beta_{42}$) u odnosu na najčešći nešto kraći oblik $A\beta_{40}$ (31). Nasuprot tome, mutacije koje se nalaze u blizini mjesta cijepanja α -sekretazom povećavaju nastanak formi peptida $A\beta$ koje su sklonije stvaranju oligomera ili se slabije razgrađuju (36). Osim toga, duplikacija cijelog gena *APP*, kao u pacijenata s Downovim sindromom (trisomija 21), dovodi do veće proizvodnje peptida $A\beta$ (37).

Mutacije u tri navedena gena objašnjavaju samo 10% svih EOAD. Zanimljivo, nedavno je otkriven i četvrti gen uključen u nastanak FAD – gen *SORL1*. Otkriveno je pet pogrešnih i dvije besmislene (od engl. *nonsense*) mutacije u ovom genu. Gen *SORL1* kodira za protein sorLA, receptor retromernog kompleksa koji je uključen u unutarstanični prijenos APP-a i peptida $A\beta$. Sve istražene mutacije u genu *SORL1* sprječavaju pravilno smatanje proteina sorLA i gubitak njegove funkcije ili gubitak njegovog vezanja s APP-om ili $A\beta$. Kao rezultat ovih mutacija dolazi do nefunkcionalnog unutarstaničnog prijenosa APP-a i peptida $A\beta$ i time povećanog nakupljanja i agregiranja peptida $A\beta$ u neuronima (38).

1.1.2. Kompleksni oblik Alzheimerove bolesti

Iako je rijetki nasljedni oblik AB poslužio za razumijevanje neurobiologije i molekularnih mehanizama patoloških procesa koji dovode do nastanka AB, uslijed povećanog stvaranja peptida A β , još uvijek nije poznat uzrok najčešćeg, tzv. “sporadičnog” ili kasnog oblika AB (od engl. *Late-Onset Alzheimer's disease*, LOAD) na koji otpada do 95% svih AB pacijenata. Premda se dugo vremena ovaj oblik bolesti smatrao sporadičnim, novija istraživanja ukazuju da genetički čimbenici imaju 80-90% ulogu u razvoju ovog kompleksnog oblika bolesti (39). Naime, genetički rizični čimbenici kasnog oblika AB također reguliraju stvaranje ili razgradnju A β , što govori u prilog da bi geni, tj. njihovi produkti koji reguliraju metabolizam APP-a, mogli utjecati na rizik pojave ovog oblika AB (40).

Najznačajniji genetički rizični faktor razvoja kompleksnog oblika AB je polimorfizam u genu *APOE*. U ljudi postoje tri varijante alela *APOE*, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 4$, ovisno o smještaju dviju aminokiselina na dva položaja. Varijanta alela $\epsilon 4$ je genetički rizični faktor za razvoj AB (41), a $\epsilon 2$ se smatra protektivnom (42). Heterozigoti za alel $\epsilon 4$ imaju tri do četiri puta veći rizik nastanka AB, a homozigoti za alel $\epsilon 4$ čak 15-20 puta (43,44). Također, alel $\epsilon 4$ utječe na raniju pojavu bolesti, pri čemu svaka kopija alela ubrzava pojavu bolesti za 10 godina (41,45).

Nakon *APOE*, pronađeni su i drugi genetički rizični faktori za razvoj AB koji nisu bili tako snažni kao *APOE*, ali su doprinijeli otkrivanju molekularnih puteva koji sudjeluju u nastanku AB. Naime, pronađeni rizični čimbenici sudjeluju u nekoliko bioloških puteva – metabolizmu kolesterola i lipida, upali i imunološkom sustavu te endosomalnom transportnom putu. U metabolizam kolesterola, osim *APOE* (što će detaljno biti objašnjeno u poglavlju 2.4.1) uključen je i rizični čimbenik gen *ABCA7* čiji gubitak funkcije povećava rizik od nastanka AB za tri puta (46).

Danas je poznata važnost aktivacije mikroglia kao odgovora na nakupljanje plakova. Mutacije u genima za proteine mikroglia koji izravno ili neizravno odgovaraju na nakupljanje peptida A β rizični su faktori za nastanak AB. Pronađene su mutacije u tri gena – *CRI* (od engl. *Complement Receptor 1*) (47), *CD33* (48) i *TREM2* (49,50). Smatra se da gubitak funkcije ovih proteina dovodi do nakupljanja peptida A β (47–50).

Geni rizični čimbenici koji su uključeni u endosomalni put su *SORL1* (51), *BINI* (52) i *PICALM* (52,53). Mutacije u genu za protein sorLA (detaljnije će biti opisan u poglavlju 2.3.2.) uključene su i u FAD (38), kao i u kompleksni oblik AB (54). Uloga proteina sorLA je izravno vezanje na APP i prijenos retrogradnim putem (55). Protein PICALM je uključen u

procesiranje APP-a u endosomima (56) kao i u prijenos $A\beta$ preko krvno-moždane barijere (53).

Uz genetičke čimbenike, na razvoj kompleksnog oblika AB utječu i okolišni čimbenici. Najsnažniji okolišni čimbenik razvoja AB je starenje (7). Smatra se da otprilike 5% osoba ima AB sa 65 godina života što se povećava do 50% s 80 godina (57). Osim starenja, rizični faktori za nastanak AB su kardiovaskularne bolesti, hipertenzija, ozljeda glave, dijabetes tipa II, pretilost, slabije obrazovanje i pušenje. Suprotno, protektivni čimbenici u nastanku AB su mentalna aktivnost, prehrana, fizička aktivnost i kognitivna aktivnost (2,7).

1.2. Protein prekursor amiloida β – središnja molekula u Alzheimerovoj bolesti

Peptid A β , čiji se povećano stvaranje i/ili nakupljanje smatra ključnim događajem u nastanku AB, nastaje amiloidogenim putem proteolitičkog cijepanja APP-a (58). Stoga su istraživanja mehanizama koji reguliraju biologiju, smještaj i procesiranje APP-a godinama u središtu istraživanja AB.

APP je transmembranski glikoprotein građom sličan receptorima. Sastoji se od velike izvanstanične domene i kratkog citoplazmatskog repa dugog 47 aminokiselina. Gen *APP* u ljudi je smješten na kromosomu 21 (21q21.3), veličine je 240 kb te sadrži 18 egzona (59). Tijekom prepisivanja gena alternativnim izrezivanjem mogu nastati različite izoforme APP-a (60). Najzastupljenije izoforme su APP695, APP751 i APP770. U neuronima je prvenstveno eksprimirana izoforma APP695 (58,61), a izoforme APP751 i APP770 eksprimirane su ubikvitarno, u perifernim tkivima i fibroblastima (62). U mozgu je APP eksprimiran u ekscitatornim neuronima i GABAergicnim interneuronima, a najznačajnija je ekspresija u kori velikog mozga i hipokampusu (63). Osim u ljudima, APP je eksprimiran u sisavcima kao i u vinskoj mušici roda *Drosophila* (64), obliću *C. elegans* (65) i žabama roda *Xenopus* (66).

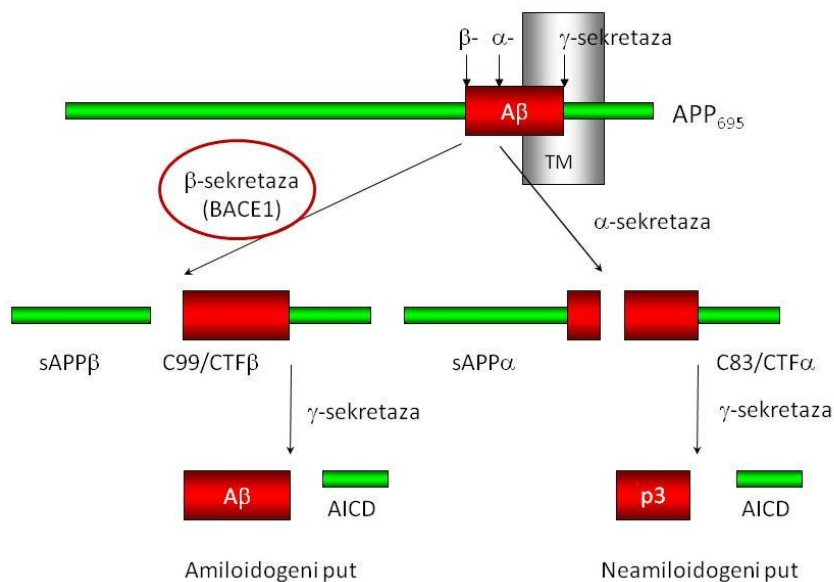
1.2.1. Proteolitička razgradnja i funkcija APP-a

U neuronima se sintetizira velika količina proteina APP, koji se veoma brzo procesira (67). APP se može procesirati dvama različitim putevima, kanonskim i nedavno otkrivenim nekanonskim putem. Kanonsko procesiranje APP-a dijeli se na amiloidogeni put kojim nastaje peptid A β i neamiloidogeni put koji sprječava nastanak peptida A β .

Neamiloidogeno procesiranje APP-a započinje cijepanjem APP-a α -sekretazom unutar sekvence A β te se oslobađa topljivi odsječak sAPP α (68). Aktivnost α -sekretaze u neuronima obavljaju većinom enzimi obitelji ADAM (engl. *A Disintegrin And Metalloprotease*) (69,70), većinom ADAM10, a uključen je i enzim ADAM17. Preostali transmembranski C-terminalni odsječak (CTF), CTF α ili C83, cijepa se γ -sekretazom, multienzimskim proteinskim kompleksom koji se sastoji od proteina presenilina 1 ili 2 (PSEN1, PSEN2), nikastrina te APH-1 (od engl. *anterior pharynx defective-1*) i PEN-2 (od engl. *presenilin enhancer 2*) (71–74). Enzim γ -sekretaza ima sposobnost cijepanja CTF α /C83 na tri mjesta, od C- prema N-terminalnom kraju, prvo cijepa na ϵ -mjestu (oslobađajući AICD, od engl. *APP intracellular domain*), zatim ζ -mjestu i na kraju na γ -mjestu. Ovim cijepanjem, nazvanim regulirana

unutarmembranska proteoliza (od engl. *regulated intramembrane proteolysis*, RIP) (75) oslobađaju se topljivi odsječak p3 i AICD.

Amiloidogeni put cijepanja započinje β -sekretazom (engl. *β -site APP cleaving enzyme 1 – BACE1*) (76–79). BACE1 cijepa cjeloviti APP na N-terminalnom kraju sekvence A β i otpuštaju se topljivi odsječci sAPP β te membranski C-terminalni odsječak CTF β ili C99. Enzim γ -sekretaza cijepa CTF β /C99 u transmembranskoj domeni nakon čega se oslobađa A β (Slika 2). Prvo cijepa na ϵ -mjestu pri čemu nastaje odsječak AICD, a preostali dio može cijepati na nekoliko mjesta što rezultira nastankom peptida A β različite veličine, od 37 do 43 aminokiseline, uključujući A β 38, A β 40, A β 42 i A β 43 (80). A β 40 je najčešći oblik na koji otpada oko 90% ukupnog A β . Drugi najčešći oblik, A β 42, skloniji je agregiranju od A β 40. Upravo je taj korak agregacije A β 42 u oligomere već unutar stanice prvi korak u nastanku amiloidnih plakova i time razvitka AB. Porast omjera A β 42:A β 40 smatra se ključnim u nastanku AB, a ovisi o specifičnosti cijepanja γ -sekretaze (81).



Slika 2. Amiloidogeni i neamiloidogeni put cijepanja proteina prekursora amiloida β (APP). APP se može cijepati α -sekretazom u neamiloidogenom putu ili β -sekretazom u amiloidogenom putu. Rezultat su topljivi odječki sAPP α ili sAPP β te C-terminalni odsječci CTF α /C83 ili CTF β /C99. CTF α /C83 i CTF β /C99 su supstrati γ -sekretaze čijim cijepanjem nastaje AICD (engl. *APP Intracellular domain*) te neamiloidogeni peptid p3 ili amiloidogeni peptid amiloid- β (A β). Preuzeto s (82).

Osim kanonskih puteva cijepanja APP-a, nedavno su otkrivena tri rijetka nekanonska puta cijepanja. Sva tri puta započinju cijepanjem N-terminalno od mjesta cijepanja β -sekretaze. Enzim MT5 ili MM24 cijepa APP na η -veznom mjestu nakon čega cijepaju α - ili β -sekretaze i nastaju peptidi dugi 108 ili 92 aminokiseline koji se nazivaju peptidi $A\eta$ - α ili $A\eta$ - β . MTP5 je cink-ovisna metaloproteaza, slična enzimu ADAM10, većinom smještena u staničnoj membrani i eksprimirana u mozgu (83). Također, postoji i δ -cijepanje enzimom asparagin endopeptidazom (AEP), pH-ovisnom cisteinskom proteazom koja je aktivna u lizosomima (84). Treći nekanonski put je cijepanje enzimom Meprin β na staničnoj membrani. Meprin β je cink-ovisna metaloproteaza kao ADAM10 i MTP5 koja cijepa APP (85).

Iako je protein APP do danas jedan od istraživanih proteina, njegova prava funkcija još uvijek nije poznata. APP ima građu receptora, no nije pronađen njegov ligand. Kroz povijest *in vivo* i *in vitro* istraživanja APP-a pridavale su mu se različite funkcije. Delecija gena za APP u miševima i nedostatak peptida $A\beta$ ne uzrokuje snažni fenotip u odraslim miševima, što otežava istraživanje uloge APP-a u mišjim modelima. Na primjer, APP *knockout* miševi imaju samo diskretne promjene u anatomiji, elektrofiziologiji i ponašanju, koje mogu biti ispravljene već dodavanjem odsječaka sAPP (86–89). Danas se uloge proteina iz obitelji APP – APP, APLP1 (engl. *APP-like protein 1*) i APLP2, te njihovih odsječaka, mogu se podijeliti na transkripcijske faktore i sinaptičke funkcije, uključujući migraciju neurona, rast neurita, navođenje aksona i sinaptogenezu. Osim uloga tijekom razvoja plastičnosti, APP i produkti njegove razgradnje imaju ulogu u pamćenju i neuroprotekciji tijekom sazrijevanja i starenja mozga.

Miševi koji su trostruki *knockout* za APP, APLP1 i APLP2 nisu vijabilni te imaju abnormalnu migraciju kortikalnih neurona (90). Miševi koji su dvostruki *knockout* (dKO) za APP i APLP2 imaju pomiješane presinaptičke i postsinaptičke biljege na neuromuskularnim spojevima (91). U 80 % ovih miševa smrt nastupa u ranoj postnatalnoj fazi (unutar prvog tjedna života) (92), slično kao kod miševa dKO za APLP1 i APLP2. Za razliku od toga, miševi dKO za APP i APLP1 su vijabilni. Istraživanja na miševima KO za jedan ili više proteina iz obitelji APP ukazuju da se njihove uloge međusobno preklapaju te jedan protein može nadoknaditi nedostatak drugog proteina. Također, transgenični miševi koji imaju nadeksprimiran protein APP imaju povećane neurone (93).

Osim u razvoju i neurogenezi, obitelj proteina APP ima važnu ulogu i u odraslom hipokampusu i diferencijalno su eksprimirani u različitim regijama hipokampusa (94) gdje reguliraju sinaptičku plastičnost i pamćenje (95,96). U odraslih životinja, intracerebralne injekcije N-terminalnih odsječaka APP-a mogu poboljšati kognitivne funkcije i gustoću

sinapsi (97). Za veliku aktivnost topljivih odsječaka APP-a odgovorne su dvije heparin-vezne domene. Jedna heparin-vezna domena također je mjesto vezanje F-spondina, jedinog potencijalnog liganda APP-a (98). Identifikacija liganda APP-a je važna jer je građa APP-a slična građi razvojne signalne molekule Notch.

Većina *in vitro* istraživanja potvrdila je da APP ima ulogu u staničnoj homeostazi i rastu. U prolazno transfeciranim stanicama različitih staničnih linija, APP regulira stanični rast, pokretljivost, rast neurita i preživljenje stanice, što sve može biti uloga oslobođenih topljivih odsječaka (99). Izlučeni odsječak sAPP β može biti ligand za DR6 (engl. *Death Receptor 6*). Moguće je da smanjenje faktora rasta potiče cijepanje APP-a pomoću BACE1, oslobađajući sAPP β koji se veže na DR6 i aktivira kaspazu 6 i kaspazu 3 što uzrokuje apoptotsku degradaciju aksona i some neurona. Ovaj mehanizam može biti normalan dio aksonalnog skraćivanja (od engl. *axonal pruning*) ili primarni čimbenik degeneracije neurona (100).

Ovo istraživanje ukazalo je na mogućnost da odsječak sAPP β ima potpuno drugačija svojstva od odsječaka sAPP α (iako je razlika u duljini samo 16 aminokiselina na C-terminalnoj kraju). Naime, zna se da sAPP α ima važne uloge u učenju i pamćenju. Različita istraživanja na animalnim modelima pokazala su ulogu sAPP α u poboljšanju pamćenja (97,101,102), LTP-u (od engl. *long-term potentiation*) (103,104), povećanju gustoći sinapsa (105,106), prostornom (107,108) i socijalnom učenju (109) te oporavku nakon ishemije (110). Također, sAPP α inhibira amiloidogeni put, smanjuje nakupljanje plakova (111) i fosforilaciju proteina tau (112).

Unutarstanični C-terminalni odsječak APP-a (CTF) također ima dvije važne uloge – jedna je u regulaciji transkripcije gena uključenih u metabolizam kolesterola (113–115) (detaljnije objašnjeno u poglavlju 1.4.3.), a druga je u regulaciji vlastitoga unutarstaničnog smještaja preko aminokiselinske domene YENPTY. Domena YENPTY regulira klatrin-ovisnu internalizaciju vezanjem na druge proteine. Ta domena je 100% očuvana u svih životinja i u ljudi. Mutacija u ovoj domeni mijenja endocitozu APP-a (116) i smanjuje nastanak A β (89).

Iako se dugo smatralo da je sam nastanak peptida A β patološki proces, danas se zna da je A β normalni produkt stanice (117,118), ali je za fiziološke koncentracije A β nužan pravilan omjer cijepanja APP-a α - i β -sekretazom. U malim koncentracijama peptid A β ima važnu ulogu u fiziologiji sinapsi, njihovoj regulaciji (119) i oslobađanju sinaptičkih vezikula (120).

1.2.2. Stanična biologija APP-a

APP je transmembranski protein tipa I koji ima veliki izvanstanični, odnosno luminalni dio i kratki citoplazmatski rep. Sintetizira se u endoplazmatskom retikulumu (ER), vezan je na membranu ER-a pri čemu se velika N-terminalna domena nalazi u lumenu ER-a, a kratki C-terminalni rep u citosolu. Nakon odvajanja signalnog peptida kotranslacijski se translocira preko membrane ER-a do Golgijevog aparata (GA). U Golgijevom aparatu nalazi se najveći udio APP-a u stanici, a u tom organelu se odvija posttranslacijska modifikacija APP-a, uključujući O- i N-glikozilaciju, fosforilaciju i sijalinaciju (121,122). U neuronima APP nakon GA putuje aksonom brzim aksonalnim transportom do sinaptičkih završetaka (123).

Neglikozilirani APP naziva se nezrelim (od engl. *immature*), a potpuno posttranslacijski modificirani APP zreli (od engl. *mature*). APP iz GA odlazi sekretornim putem do stanične membrane. U staničnoj membrani APP se ili procesira ili ulazi u stanicu klatrin-ovisnom endocitozom. Nakon endocitoze, APP odlazi u rane endosome gdje se usmjerava u jedan od tri moguća puta – reciklirajućim putem u staničnu membranu, retrogradnim putem do *trans*-Golgijevog aparata (TGN) preko retromernog kompleksa (124) ili degradirajućim putem preko kasnih endosoma do lizosoma (125). S obzirom da su enzimi koji cijepaju APP u kanonskim i nekanonskim putevima aktivni u različitim unutarstaničnim odjeljcima, unutarstanični smještaj APP-a ključan je korak u usmjeravanju u jedan od proteolitičkih puteva.

Enzim α -sekretaza dominantno cijepa APP u sekrecijskim vezikulama i na staničnoj membrani (68,126–130). Cijepanjem APP-a α -sekretazom nastaju velika izvanstanična domena (sAPP α) i membranski C-terminalni odsječak (CTF α ili C83). Na staničnoj membrani dalje CTF α /C83 cijepa γ -sekretaza pri čemu nastaje neamiloidogeni peptid p3. Kao i α -sekretaza, metaloproteaze koje sudjeluju u nekanonskim putevima procesiranja APP-a, enzimi MT5 i meprin β imaju najveću aktivnost u staničnoj membrani (85), a δ -cijepanje odvija se u lizosomima (84).

Za razliku od α -sekretaze, β -sekretaza većinom je smještena u endosomima i ima najveću aktivnost u blago kiselim odjeljcima, tj. endosomima (78). BACE1 može cijepati APP u endosomima nakon endocitoze (131,132). Cijepanjem β -sekretazom u ranim endosomima nastaje veliki topljivi N-terminalni odsječak sAPP β i transmembranski C-terminalni odsječak CTF β /C99. Nastali CTF β /C99 cijepaju se γ -sekretazom već u endosomima ili se prvo recikliraju do stanične membrane i tamo cijepaju (133–135). Cijepanjem CTF β /C99 γ -sekretazom na staničnoj membrani rezultira peptidima A β koji se izlučuju u izvanstanični

prostor, a cijepanjem u endosomima nastaju peptidi A β u lumenu endosoma (136,137) koji se mogu razgraditi u lizosomima ili također izlučiti u izvanstanični prostor (138). Unutarstanični smještaj γ -sekretaze ovisi o sastavu podjedinica. Ako γ -sekretaza sadrži presenilin 1, kompleks γ -sekretaze smješten je unutar sekretornog i endocitoznog puta te se većinom nalazi na staničnoj membrani. Za razliku od toga, kompleks koji se sastoji od presenilina 2 smješten je većinom u kasnim endosomima i lizosomima (126,139).

Razlika u smještaju kompleksa γ -sekretaze ovisno o građevnim podjedinicama zanimljiva je jer se smatra se da su upravo unutarstanični peptidi A β najtoksičniji i uzrokuju oštećenja ključna u razvitku AB (81). Ključno mjesto u kojem se odvija te započinje amiloidogeno cijepanje enzimom β -sekretazom su endosomi. U piramidalnim neuronima pacijenata oboljelih od AB pronađeni su povećani rani endosomi koji sadrže više lizosomalnih proteaza (140). Promjene u endosomalno-lizosomalnom putu prisutne su nekoliko desetljeća prije pojave prvih kliničkih simptoma, a koreliraju s nakupljanjem A β 40 i A β 42 (141), ali i CTF β /C99 (142). Nakupljanje povećanih vezikula endosomalno-lizosomalno puta predstavlja najranije intraneuronalno obilježje sporadičnog oblika AB (143) koje može biti posljedica, ali i uzrok povećanog amiloidogenog cijepanja APP-a (142).

1.3. Retromer u Alzheimerovoj bolesti

1.3.1. Uloga retromera

Iako se dugo vremena promatralo nakupljanje peptida A β kao ključne molekule u nastanku AB, danas se zna da mehanizmi nastanka AB uključuju rane promjene u endosomalno-lizosomalnom putu, poput povećanih endosoma i lizosoma (141). Jedan od ključnih proteinskih kompleksa unutar endosomalno-lizosomalnog puta je retromerni kompleks (ili skraćeno retromer) (144).

Retromer sudjeluje u dva od tri transportna puta iz endosoma – retrogradnom i reciklirajućem transportom putu, održavajući time kontinuirano recikliranje endosomalno-lizosomalnih proteina/enzima i recikliranje receptora/supstrata. U retrogradnom transportnom putu, retromer prenosi proteine iz endosoma u trans-Golgijev aparat (145,146). Ovaj put je posebno važan za prijenos hidrolaza i proteaza uključenih u lizosomalnu degradaciju. U reciklirajućem transportnom putu retromer prenosi molekule iz endosoma na staničnu membranu (147–150). Reciklirajući transportni put važan je za neurone jer služi za prijenos glutamatnih i ostalih receptora tijekom sinaptičkog remodeliranja i plastičnosti (151–153).

Retromer je građen od četiri proteinske podjedinice koje se sastoje od više proteina. Građevne podjedinice retromera su – podjedinica za prepoznavanje molekula (od engl. *cargo recognition core*, CRC), podjedinica za “pristajanje“ na membranu (od engl. „*membrane recruiting*“), podjedinica za tubulaciju (od engl. *tubulation module*) i kompleks WASH.

Podjedinica za prepoznavanje molekula je trimerni kompleks koji se sastoji od proteina Vps26 (od engl. *Vacuolar protein sorting-associated protein 26*), Vps29 (od engl. *Vacuolar protein sorting-associated protein 29*) i Vps35 (od engl. *Vacuolar protein sorting-associated protein 35*) (145,146). Središnja molekula podjedinice CRC, ali i cijelog retromera je Vps35 na koji se vežu Vps26 i Vps29. CRC izabire i veže transmembranske proteine u endosomalnoj membrani i prenosi ih do ciljne membrane. Proteini iz CRC su visokoočuvani među vrstama (154).

Podjedinica za tubulaciju služi za stvaranje i stabilizaciju tubula koji izlaze iz endosoma i usmjeravaju transport molekula prema ciljnom odredištu. Proteini podjedinice za tubulaciju pripadaju obitelji proteina sortirajućih neksina (od engl. *sorting nexins*, SNX) koji imaju domenu BAR. Članovi obitelji SNX koji čine ovu podjedinicu su SNX1, SNX2, SNX5 i SNX6 (155,156). Pojedinica se sastoji od dimera u različitim kombinacijama, a najčešća kombinacija je SNX1 i SNX5 ili SNX6 ili SNX2 s SNX5 ili SNX6 (157). Različite

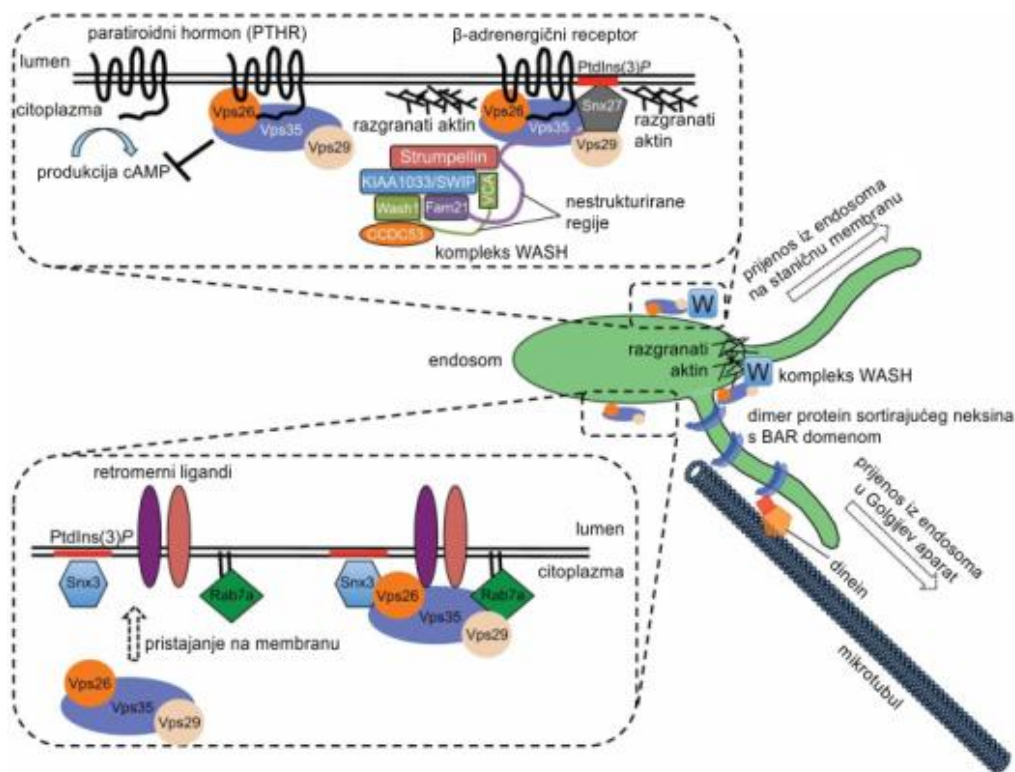
kombinacije SNX omogućavaju veći broj molekula koje retromer može prepoznati i prenositi (158,159).

Podjedinica za "pristajanje" pomaže vezanju CRC na endosomalnu membranu i za stabiliziranje podjedinice CRC nakon „pristajanja“ na membranu. Ovu podjedinicu čine proteini SNX3, RAB7 (engl. *RAS-related protein 7A*) i TBC1D5 (engl. *TBC1 domain family member 5*), dio TRE2-BUB2-CDC16 (TBC) obitelji RAB7 GTPaza-aktivirajućih proteina (155,160). Osim ovih proteina, pristajanju na membranu doprinosi i fosfatidilinozitol-3-fosfat s endosomalne membrane (161).

Kompleks WASH služi za remodeliranje aktina („actin-remodelling“ module). Sastoji se od proteina WASH1 (engl. *WAS protein family homologue 1*), FAM21, strumpellin, CDDC53 (engl. *coiled-coil domain-containing protein 53*), KIAA1022, ili WASH complex subunit 7. Uloga podjedinice WASH je brza polimerizacija aktina povezanih s endosomalnom membranom. Podjedinica WASH veže se na endosomalnu membranu preko proteina Vps35 (162–164) (Slika 3).

Molekule koje retromer prenosi vežu se na Vps35 putem receptora koji se izravno veže na retromer (165). Na receptor se vežu ligandi receptora te se prenose zajedno s receptorom (144). Svi retromerni receptori sadrže intraluminalnu domenu, transmembransku domenu i domenu citosolnog repa. Do sada je otkriveno nekoliko retromernih receptora koji su dio obitelji receptora koji sadržavaju domenu Vps10. Receptori uključuju sortilin, sorLA (51,55), SORCS1, SORCS2, SORCS3, kation-neovisni manoza-6-fosfatni receptor (CI-M6PR) (145,146), glutamatni receptor (151) i fagocitni receptor TREM2 (50). Najvažniji ligand kojeg prenosi retromer je APP, koji se na endosomalnoj membrani veže na receptor sorLA (54,55) (Slika 3.).

Prijenos proteina APP retrogradnim putem ovisan je o receptoru sorLA (166) i retromernom kompleksu (124). Istraživanja su pokazala da se APP izravno veže i za retromer i za receptor sorLA. Također, retromer i sorLA potpuno kolokaliziraju s Vps35 *in vivo* što potvrđuje da retromer prenosi oba proteina (124,165).



Slika 3. Uloga retromera u sortiranju proteina iz endosoma. U reciklirajućem putu retromer prenosi molekule ligande iz endosoma do Golgijevog aparata (poput receptora kation-neovisnog manozna-6-fosfatnog receptora ili sortilina). Za vezanje retromera na molekule ligande potrebno je „pristajanje“ na membranu posredovano proteinima Rab7 i SNX3. Heterodimeri proteina sortirajućih neksina (SNX) u kombinaciji SNX1 ili SNX2 s SNX5 ili SNX6 posreduju stvaranje tubula i povezuju retromer s mikrotubulima. Podjedinica za prepoznavanje molekula liganda (Vps35-Vps26-Vps29) vežu kompleks WASH koji posreduje u grananju aktina na površini endosoma. Pojedinica za prepoznavanje molekula liganda zajedno s SNX27 i kompleksom WASH zajedno prenose β -adrenergični receptor, ali i reguliraju receptor paratiroidnog hormona (PTHr). Preuzeto iz (167).

1.3.2. Disfunkcija retromera u Alzheimerovoj bolesti

Disfunkcija retromera povezana je s najčešćim neurodegenerativnim bolestima, AB, PB, kao i drugima (168). U AB disfunkcija retromera doprinosi ključnim patološkim obilježjima bolesti. U PB studije su otkrile genetičku povezanost disfunkcije retromera s nastankom bolesti (169).

Disfunkcija retromera prvo je primijećena u AB prilikom izrade molekularnog profila regija različito zahvaćenih u AB – entorinalnog korteksa, regije najranije zahvaćene u AB (165) i dentatnog girusa koji je relativno nezahvaćena regija (170). Od svih analiziranih molekula, koje su neovisne o starosti, u istraživanju je primijećeno da entorinalni korteks pacijenata oboljelih od AB ima smanjene razine proteina Vps26 i Vps35 (165).

Rezultati drugih genetičkih studija otkrile su varijante u genima za pojedine proteine svih podjedinica retromera koji imaju povećan rizik za nastankom AB. Te varijante nalaze se u genima za SNX1 (iz podjedinice za tubulaciju), SNX3 i RAB7A (iz podjedinice za pristajanje na membranu) i KIAA1033 (iz podjedinice za remodulaciju aktina) (171). Također, u entorinalnom korteksu i dentatnom girusu različita je razina fosfatidilinozitol-3-fosfata koji pomaže u pristajanju retromera na membranu endosoma (161). Ukupno, sve podjedinice retromera uključene su u AB (171).

U genetičkim studijama (51,172) kao i u velikim asocijacijskim studijama (od engl. *Genome-wide association studies*, GWAS) (47) pronađeno je da neke varijante u genu *SORL1* povećavaju rizik za nastanak kompleksnog oblika AB. Osim mutacija varijanti gena *SORL1* uključenih u kompleksni oblik AB, otkrivene su i mutacije u genu *SORL1* koje uzrokuju nasljedni oblik AB (38). Također, pronađene su varijante gena i za druge retromerne receptore iz obitelji receptora s domenama Vps10 koji povećavaju rizik za nastanak AB (173).

Protektivna uloga retromera, kao i mehanizmi kojima je retromer uključen u patogenezu AB proučavani su u miševima, vinskim mušicama i staničnom kulturama. U miševima je pokazano da mutacija samo jednog alela Vps35 ubrzava patologiju AB (174). Nedostatak retromera *per se* uzrokuje povećano stvaranje A β , disfunkciju hipokampusa i neurodegeneraciju u genetički promijenjenim miševima (166).

Za sada su pronađena tri mehanizma disfunkcije povezanosti retromera s patologijom AB i drugih neuroloških bolesti (168). Prvi mehanizam je da disfunkcija retromera uzrokuje zastajanje molekula u endosomima koje se u normalnim uvjetima brzo prenose iz endosoma. Što se dulje APP zadržava u endosomima, veća je šansa da je procesiran amiloidogenim putem pomoću enzima BACE1. Naime, u primarnim neuronima hipokampusa u kojima je

utišan Vps35 primijećeno je nakupljanje APP i BACE1 u povećanim endosomima some, ali i procesa neurona (175).

Osim što retromer prenosi APP, i enzim BACE1 prenosi se pomoću retromera putem receptora sortilina (176) između endosoma i Golgijevog aparata i pri tome se cijepa APP. Kada je retromer nefunkcionalan, i APP i BACE1 se povećano nakupljaju u endosomima, te ostaju dulje vremena u endosomu nego u normalnim uvjetima. Posljedica ovog nefunkcionalnog transporta retromerom je povećano cijepanje APP-a enzimom BACE1. Odsječci nastali cijepanjem enzimom BACE1 recikliraju se na staničnu membranu, gdje γ -sekretaza prepoznaje odsječak i cijepa ga, što dovodi do povećanog nastanka A β . Također, istraživanja su pokazala da smanjenje Vps35 korelira s povećanim nastankom A β (151).

Drugi mehanizam je da disfunkcija retromera dovodi do smanjenja receptora na staničnoj membrani, poput fagocitnih receptora u mikroglijama. Mikroglije pacijenata oboljelih od AB imaju smanjenu razinu Vps35 (50). Nedavno otkrivene mutacije u fagocitnom receptoru TREM2 dovode do smanjene razine receptora na staničnoj membrani (49,50). TREM2 na staničnoj membrani receptora potiče razgradnju izvanstaničnih proteinskih agregata, uključujući amiloidne plakove te se odnedavno intenzivno istražuje uloga TREM2 u AB (177).

Treći mehanizam disfunkcije retromera povezan je s retrogradnim prijenosom receptora, kao što su CI-M6PR (145,146) ili sortilin (178). Naime, nakon što su ti receptori transportirani iz TGN u endosome, proteaze se odvajaju od receptora i oslobađaju se u endosome te migriraju u lizosome. Funkcija tih proteaza je u degradaciji proteina, oligomera proteina i/ili agregata, unutar endosomalno-lizosomalnog puta. Uloga retromera je u prijenosu receptora iz endosoma natrag u TGN preko retrogradnog puta kako bi se receptori obnovili za daljnji prijenos proteaza (145,146).

Osim važne uloge retromera u staničnoj biologiji proteina APP i njegovih produkata, disfunkcija retromera može se povezati i s patologijom proteina tau. Naime, iako je tau citosolni protein te ključna sastavna komponenta mikrotubula, može se izlučiti u izvanstanični prostor. Nakon toga endocitozom ulazi u neurone (179,180). Smatra se da patološko procesiranje proteina tau započinje upravo u endosomima (180). Mehanizmi kojima disfunkcija retromera može sudjelovati u patologiji proteina tau uključuju smanjeni prijenos fagocitnih receptora u mikroglijama koje mogu razgrađivati izvanstanični protein tau te poremećeni prijenos proteaza endosomalno-lizosomalnog puta, pogotovo katepsina D. Smanjenje aktivnosti proteaze katepsina D uzrokuje toksičnost proteina tau (181).

Retromerni protein Vps26 izravno se veže na retromerni receptor sorLA (182) putem kojeg prenosi APP (55) u organele koji sprječavaju prijenos APP-a iz TGN do stanične membrane (183,184). Razine proteina sorLA smanjene su u neuronima pacijenata oboljelih od AB (185). Smanjenje razine proteina sorLA u transgeničnim životinjama dovodi do nakupljanja A β (55). Međutim, postoji još nekoliko mehanizama kojima sorLA može biti ključan u razvoju AB. Naime, osim što sorLA veže cjeloviti protein APP na N-terminalnom kraju (55), veže i APP na C-terminalnom kraju, stoga može vezati CTF β /C99 i peptid A β (186). Vezanjem na peptid A β , receptor sorLA ga usmjerava u lizosome za razgradnju (187). Stoga, ako je na bilo koji način funkcija proteina sorLA smanjena, smanjuje se razgradnja i povećava razina nakupljenog unutarstaničnog peptida A β . Iako se dugo godina smatralo da je najtoksičniji oblik A β u plakovima, izvanstanični A β , novija istraživanja ukazuju da su najtoksičniji oblici peptida A β upravo unutarstanični peptidi, manji oligomeri (188). Stoga je funkcija sorLA ključna jer sudjeluje upravo u prvom koraku nastanka patoloških promjena koje uzrokuje A β . Osim toga, sorLA je uključen i u transport unutarstaničnog kolesterola, odnosno čestica ApoE, čime je sorLA izravno uključen i u metabolizam kolesterola, važnog čimbenika u nastanku kompleksnog oblika AB (189). Vjerojatno postoje različite verzije i jačina vezanja receptora sorLA za različite izoforme proteina ApoE o kojima ovisi način i učinkovitost prijenosa kolesterola unutar stanice (190).

Novija istraživanja otkrila su da se sorLA može regulirati unutarmembranskom proteolizom. Redukcija aktivnosti γ -sekretaze može spriječiti proteolizu proteina sorLA (191,192). Smatra se da odsječci nastali proteolizom proteina sorLA imaju ulogu u transkripciji gena, međutim funkcija nije do kraja istražena (191).

Proteini ključni za stabilnost i funkciju retromernog kompleksa su Vps26, Vps29 i Vps35. Stoga su Mecozzi i sur. (193) sintetizirali male molekule „chaperone“ koji se vežu na spoju proteina Vps29 i Vps35 i time stabiliziraju retromerni kompleks. Korištenje te molekule povećalo je neamiloidogeno procesiranje, a istovremeno smanjilo amiloidogeno procesiranje APP-a (193). S obzirom da pravilno funkcioniranje retromera djeluje protektivno u vidu smanjenja A β , poremećaj funkcije retromera mogao bi biti važan čimbenik u začetku AB (124,165,175).

1.4. Kolesterol i Alzheimerova bolest

Mozak je organ s najviše kolesterola te sadrži oko 20-25% ukupnog kolesterola u tijelu (194–197). U središnjem živčanom sustavu (SŽS) kolesterol se većinom nalazi u mijelinskim ovojnicama te staničnim membranama astrocita i neurona (197,198). Nedostatak kolesterola dovodi do degeneracije sinapse, neuspješne neurotransmisije i smanjenja plastičnosti sinapse. Poremećaj razine kolesterola u membranama neurona i/ili poremećaj unutarstanične raspodjele kolesterola utječe na razgradnju APP i stvaranje A β (197).

1.4.1. Unutarstanični metabolizam kolesterola

Unutarstanični kolesterol u stanicama potječe od sinteze ili unosa kolesterola lipoproteinima niske gustoće (LDL, engl. *low-density lipoprotein*). Čestice LDL se vežu na receptor LDL (LDLR) ili LDLR-srodan protein (LRP1) te ulaze u stanicu endocitozom. U lizosomima se čestice LDL razgrađuju, a oslobođeni kolesterol prenosi proteinima NPC1 i NPC2 u staničnu membranu ili ER (199). ER je glavno mjesto regulacije sinteze i esterifikacije kolesterola (200).

Homeostaza unutarstaničnoga kolesterola regulirana je transkripcijskim faktorima koji se nazivaju proteinima koji vežu regulacijski element sterola (od engl. *sterol regulatory element-binding proteins*, SREBP) (200). Kada je dovoljno kolesterola u stanici proteini SREBP nalaze se u ER-u, povezani s proteinom SCAP (od engl. *SREBP-cleavage-activating protein*) koji je senzor razine kolesterola (201).

Kada nema dovoljno kolesterola u stanici, proteini SREBP odlaze iz ER-a u GA gdje ih cijepa proteaza S1P (od engl. *site 1 protease*) te dalje mogu biti procesirani pomoću proteaze S2P (od engl. *site 2 protease*). Mehanizam regulacije temelji se na prijenosu transkripcijskog faktora SREBP nastalog u GA do jezgre gdje aktivira gene uključene u sintezu endogenog kolesterola i ulazak egzogenog kolesterola putem endocitoze čestica LDL (199).

Višak kolesterola smanjuje transkripcijsku aktivnost SREBP (199). Proteini SREBP reguliraju transkripciju enzima hidrosimetil glutaril-koenzim A reduktaze (HMGCR), koji katalizira limitirajući korak u sintezi kolesterola, ali i HMG-CoA sintaze (HMGCS), receptora lipoproteina niske gustoće (LDLR) i samog SREBP te mnogih drugih enzima uključenih u biosintezu kolesterola i masnih kiselina (201). Višak kolesterola esterificira acil:kolesterol aciltransferaza (ACAT) (202).

Kolesterol slabo prelazi krvno-moždanu barijeru te se sintetizira u središnjem živčanom sustavu (203). U mozgu se kolesterol sintetizira u astrocitima, veže na ApoE i endocitozom ulazi u neurone preko LDLR. U neuronima višak kolesterola se prevodi enzimom ACAT1 u estere kolesterola ili enzimom 24-hidroksilaza u 24-hidroksi-kolesterol koji se pomoću enzima ABCA1 može izlučiti u cerebrospinalnu tekućinu (202).

1.4.2. Genetički i epidemiološki čimbenici povezanosti kolesterola i Alzheimerove bolesti

Postoje mnogi dokazi o genetičkim i epidemiološkim čimbenicima koji povezuju metabolizam kolesterola i AB. Rizični genetički čimbenici AB reguliraju ključne korake u metabolizmu kolesterola (*APOE*, *CH25H*, *LDLR*, *SORL1*, *ABCA1*, *ABCA7*, *CLU* itd).

Prvi i još uvijek najsnažniji genetički čimbenik koji utječe na kompleksni oblik AB je *APOE* (41). Kod ljudi postoje tri varijante alela *APOE*, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 4$. Mnoga istraživanja pokazala su da prisutnost dvaju alela $\epsilon 4$ povećava rizik obolijevanja od AB 15-20 puta, dok je rizik obolijevanja u ljudi koji imaju prisutan jedan alel $\epsilon 4$ tri do četiri puta veća nego u populaciji koja nema alel $\epsilon 4$ (43,44). Nasuprot tome, alel $\epsilon 2$ gena *APOE* djeluje protektivno te smanjuje rizik obolijevanja od AB (42).

ApoE je glavni prijenosnik kolesterola u mozgu, iz astrocita do neurona. Otkriveno je da se ApoE4 $\epsilon 4$ zajedno s A β nakuplja u amiloidnim plakovima (204). Nekoliko je mehanizama kojima se objašnjava povezanost varijante $\epsilon 4$ proteina ApoE i AB. ApoE ima važnu ulogu u metabolizmu, agregiranju i uklanjanju peptida A β te je otkriveno da je ApoE4 manje učinkovit u razgradnji peptida A β (205). Također, ApoE4 ima slabiji afinitet za peptide A β od najčešće varijante ApoE3 što dovodi do smanjenog uklanjanja peptida A β iz stanica (206). Osim izravne veze ApoE4 s A β , postoje i drugi mehanizmi koji mogu objasniti povezanost ApoE4 genetičkog rizičnog čimbenika i AB. Naime, astrociti preferencijalno razgrađuju ApoE4 u odnosu na ApoE3 te nosioci alela *APOE* $\epsilon 4$ imaju manju ukupnu količinu ApoE (207). Nadalje, ApoE4 je manje efikasan u prijenosu kolesterola, potrebnog za normalnu funkciju neurona (208).

Osim ApoE, otkriven je i utjecaj drugih gena i proteina uključenih u metabolizam kolesterola u mozgu. U astrocitima, ABCA1 je unutarstanični prijenosnik kolesterola koji prenosi kolesterol na protein ApoE. Miševi koji imaju deletiran gen ABCA1 imaju povećano nakupljanje peptida A β u mišjem modelu AB (209). Nasuprot tome, povećanje razine ABCA1 smanjuje stvaranje A β u mišjim stanicama neuroblastoma (210). Također, peptid A β inhibira ekspresiju proteina ABCA1 u astrocitima miševa. Naime, A β regulira izlučivanje kolesterola

putem ABCA1 te inhibicija stvaranja A β dovodi do povećanih razina unutarstaničnog kolesterola u neuronima i smanjenog izlučivanja kolesterola u cerebrospinalnu tekućinu (211). Nadalje, u dvije paralelne analize GWAS otkriven je i polimorfizam gena *CLU* kao genetički rizični čimbenik nastanka sporadičnog oblika AB (47). Gen *CLU* kodira protein klusterin, apolipoprotein J (ApoJ) koji ima ulogu u prijenosu i metabolizmu kolesterola u mozgu. ApoJ sprječava polimerizaciju i agregaciju peptida A β (212) te pospješuje njegovo uklanjanje (213,214).

Općenito, istraživanja kolesterola kao čimbenika u nastanku AB dovela su do mnogobrojnih otkrića. Hiperkolesterolemija je jedan od čimbenika u nastanku AB. Naime, razine lipoproteina niske gustoće (LDL), ali ne i lipoproteina visoke gustoće (HDL), proporcionalne su količini A β 42 u mozgu pacijenata s AB, a razina kolesterola u mozgu pacijenata oboljelih od AB viša je od one u zdravih kontrola slične dobi (215,216). Ova otkrića omogućila su upotrebu lijekova za snižavanje kolesterola, statina, u liječenju pacijenata oboljelih od AB. Međutim, samo neke epidemiološke studije pokazuju pozitivne učinke statina u liječenju AB (217,218).

1.4.3. Kolesterol modulira razgradnju APP – *in vivo* i *in vitro* dokazi

Osim proteina uključenih u metabolizam kolesterola koji su genetički rizični čimbenici za nastanak AB, mnoga *in vivo* i *in vitro* istraživanja otkrila su važnost kolesterola u nastanku AB. Promjene u homeostazi kolesterola utječu na procesiranje APP-a. Povećana razina kolesterola uzrokuje povećano nakupljanje peptida A β i odsječaka CTF te smanjenje razine fragmenta sAPP α u mozgu transgeničnih miševa (219). Povećanje i smanjenje razine kolesterola u staničnim modelima također utječe na stvaranje peptida A β , a tretman stanica statinima koji uzrokuje smanjenje razine membranskog kolesterola smanjuje proizvodnju peptida A β (220–223) i stimulira cijepanje APP-a α -sekretazom u neamiloidogenom putu (224).

Protein APP, β - i γ -sekretaza mogu biti smješteni u membranskim odjeljcima bogatim kolesterolom i sfingolipidima, tzv. lipidnim splavima (od engl. *lipid rafts*) (220,225). Smanjenje razine membranskog kolesterola dovodi do smanjenja aktivnosti γ -sekretaze, a povećanje razine membranskog kolesterola dovodi do povećanja aktivnosti γ -sekretaze u staničnoj membrani (209). Također, povišena razina kolesterola u staničnoj membrani uzrokuje približavanje APP i BACE1 u lipidne splavi na staničnoj membrani što rezultira povećanim nakupljanjem peptida A β u endosomima. Naime, povećana kolokalizacija APP i

BACE1 uzrokuje brzu internalizaciju proteina APP i BACE1 (226). Protein APP se sa stanične membrane internalizira klatrin-ovisnom endocitozom, a njegova prisutnost u endosomima ovisi o regulaciji endocitoze proteina APP s površine stanice. Kolesterol može utjecati na endocitozu jer povišene koncentracije kolesterola uzrokuju smanjenje fluidnosti membrane te povećanu endocitozu (227). Nasuprot tome, smanjenje membranskog kolesterola rezultira smanjenom aktivnosti β - i γ -sekretaze te smanjenjem nastanka $A\beta$ (228). Iako su mnoga istraživanja ukazivala da poremećen metabolizam kolesterola doprinosi amiloidogenom procesiranju APP, točan mehanizam godinama je bio nepoznat. Barrett i sur. su nuklearnom magnetskom rezonancijom analizirali strukturu peptida CTF β /C99. Pokazali su da se slijed G₇₀₀XXXG₇₀₄ unutar C-terminalnog odsječka APP (CTF β /C99), nastalog cijepanjem enzimom BACE1, veže na kolesterol (114) i regulira homeostazu kolesterola (113).

Mogući mehanizmi kako kompleks između CTF β /C99 ili APP i kolesterola doprinosi amiloidogenezi i $A\beta$ su različiti. Prvo, povezanost C99/APP s kolesterolom može poticati dolazak APP u membranske domene bogate proteazama amiloidogenog puta, β - i γ -sekretazom. Drugo, vezanje kolesterola na CTF β /C99 može imati ulogu kofaktora koji omogućuje prepoznavanje supstrata. Treće, mjesto na APP koje cijepa α -sekretaza je odmah do veznog mjesta za kolesterol. Izravno vezanje kolesterola na APP može smanjiti neamiloidogeno cijepanje preko α -sekretaze. Četvrto, vezno mjesto za kolesterol se na CTF β /C99 nalazi unutar domene β -amiloida (aminokiseline 672-711 nalaze se u $A\beta_{40}$). Dakle, kompleks između kolesterola i $A\beta$ može doprinijeti profibrilogenom učinku kolesterola u membrani (114).

Osim što kolesterol može utjecati na cijepanje proteina APP i aktivnost enzima koji sudjeluju u tom procesu, Pierrot i sur. su pokazali da APP i produkti njegovog cijepanja također utječu na metabolizam kolesterola te su predložili model povratne sprege između kolesterola i nastanka peptida $A\beta$. Naime, primijetili su da kod transgeničnih miševa kojima nedostaje protein APP dolazi do promjena u homeostazi lipida, te da peptid $A\beta$ može djelovati kao inhibitor enzima HMGCR i time smanjiti *de novo* sintezu kolesterola (113).

Pierrot i suradnici predložili su točan mehanizam djelovanja APP-a na metabolizam kolesterola u neuronima. Pokazali su da CTF β /C99 kontrolira sintezu kolesterola preko proteina SREBP koji kolokaliziraju u GA. Također, za vezanje CTF β /C99 na SREBP ključan je motiv GXXXG koji je osim za vezanje na kolesterol ključan i za regulaciju ekspresije HMGCR. Otkriće ključnih mjesta na APP na koje se veže kolesterol omogućilo je detaljnije istraživanje međudjelovanja kolesterola i APP (113).

1.5. Bolest Niemann-Pick tipa C kao model istraživanja Alzheimerove bolesti

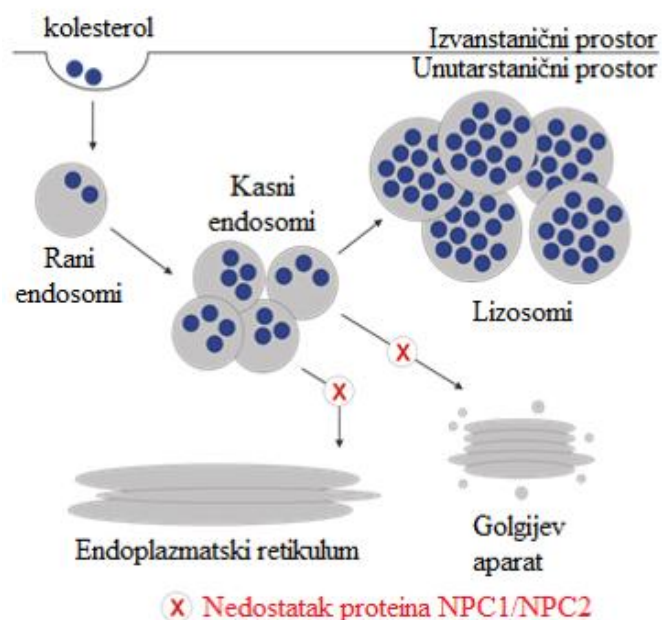
Bolest Niemann-Pick tipa C (NPC) i AB su progresivne neurodegenerativne bolesti različite epidemiologije i etiologije (229). Za razliku od kompleksne AB na koju utječe mnogi genetički i okolišni čimbenici, bolest NPC je rijetka autosomalna recesivna bolest. Međutim, zanimljivo je da bolest NPC pokazuje niz sličnosti s AB, npr. poremećeni metabolizam kolesterola i ApoE4, povećanu razinu CTF β /C99 i peptida A β , tau patologiju, kao i disfunkciju endosoma-lizosoma i neurodegeneraciju (AB-sličan fenotip) (230,231) što ukazuje da bi ove dvije bolesti mogle dijeliti iste molekularne mehanizme nastanka.

Bolest NPC je heterogena neurovisceralna bolest koja se može dijagnosticirati od infantilne dobi do odrasle dobi, a trajanje bolesti je dulje što je bolest otkrivena u kasnijoj dobi pacijenta (232,233). Visceralni organi uključeni u bolest su jetra, slezena i pluća, a glavni visceralni simptom je hepatosplenomegalija uzrokovana izraženim nakupljanjem kolesterola u jetri i slezeni. Osim najtežih juvenilnih oblika, svi pacijenti razvijaju progresivnu i fatalnu neurološku bolest koja uključuje demenciju i psihički poremećaj. Neurološki simptomi uključuju cerebelarnu ataksiju, disartriju, disfagiju i progresivnu demenciju, a karakteristični simptom je vertikalna supranuklearna paraliza pogleda (234).

1.5.1. Molekularna osnova bolesti NPC

Bolest Niemann-Pick tipa C je rijetka nasljedna lizosomska bolest nakupljanja. Uzrokovana je mutacijama u genu *NPC1* (95% slučajeva) (235) ili *NPC2* (236). Disfunkcija proteina NPC1/NPC2 dovodi do nakupljanja kolesterola nakon endocitoze u kasnim endosomima i lizosomima što uzrokuje visceralne i neurološke simptome (Slika 4.) (237–239). Nakupljanje kolesterola u ovim organelima smanjuje koncentraciju kolesterola u ER gdje su smješteni proteini koji „osjećaju“ razinu kolesterola u stanici što dovodi do povećane sinteze kolesterola i smanjenje esterifikacije kolesterola (238) i uzrokuje daljnje nakupljanje unutarstaničnoga kolesterola. Osim kolesterola, u kasnim endosomima i lizosomima se nakupljaju i sfingolipidi, glikolipidi i bis(monoacilglicerol)fosfat (BMP) (240–242).

NPC1 je veliki membranski protein od 1278 aminokiselina, a NPC2 mali topljivi protein od 151 aminokiseline. Oba su ubikvitarno eksprimirana u lizosomima te sadržavaju kolesterol-veznu domenu (235). Točan mehanizam djelovanja prijenosa kolesterola pomoću tih proteina još je nepoznat, ali se smatra da djeluju tandemski u prijenosu kolesterola (243).



Slika 4. Nedostatak proteina NPC1 ili NPC2 uzrokuje nakupljanje kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima. Kolesterol ulazi u stanicu endocitozom nakon vezanja lipoproteinske čestice LDL/ApoE na LDL-receptor. Nakon endocitoze ulazi u endosome koji sazrijevaju do kasnih endosoma i lizosoma u kojima se slobodni neesterificirani kolesterol nakuplja što uzrokuje smanjenu razinu kolesterola u staničnoj membrani i endoplazmatskom retikulumu. Smanjena razina kolesterola u endoplazmatskom retikulumu uzrokuje povećanu sintezu kolesterola unutar stanice.

1.5.2. Sličnosti i razlike između bolesti NPC i AB

U staničnom modelu bolesti NPC, kao i u mozgovima *NPC1 knockout* miševa primijećen je promijenjeni metabolizam APP-a, koji uključuje nakupljanje CTF β /C99 i A β (230,231,244,245). Mnoga istraživanja pokazala su da nakupljanje kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima utječe na procesiranje APP-a i nakupljanje unutarstaničnog A β u stanicama CHO *NPC1-null* (231,244,246). U pacijentima oboljelima od bolesti NPC nisu pronađeni amiloidni plakovi na što može utjecati prebrzi razvoj patologije i nedostatak vremena, tj. procesa starenja za razvoj plakova, kao što je to slučaj u AB (230). Difuzni amiloidni plakovi opisani su u samo jednom istraživanju i to u tri pacijenta oboljela od bolesti NPC koji su bili *APOE* ϵ 4-pozitivni (247). Nedavno istraživanje povezanosti progresije bolesti NPC i genotipa *APOE* je ukazalo na bržu progresiju bolesti u *APOE* ϵ 4 pozitivnih osoba (248). Disfunkcija endosoma-lizosoma također je primijećena u staničnim i mišjim modelima bolesti NPC kao i u fibroblastima pacijenata oboljelih od bolesti NPC. Pokazano je

da se uslijed nedostatka funkcionalnog proteina NPC1, odsječci CTF β /C99 i peptidi A β nakupljaju u kasnim endosomima (230,244), ali i u ranim endosomima (244). Ovi rezultati ukazuju na indirektnu vezu nakupljanja kolesterola i A β te da nakupljanje kolesterola uzrokuje disfunkciju endosomalno-lizosomalnog puta što je povezano s nakupljanjem CTF β /C99 i A β (229). Također, povišena razina peptida A β pronađena je u likvoru pacijenata oboljelih od NPC (249).

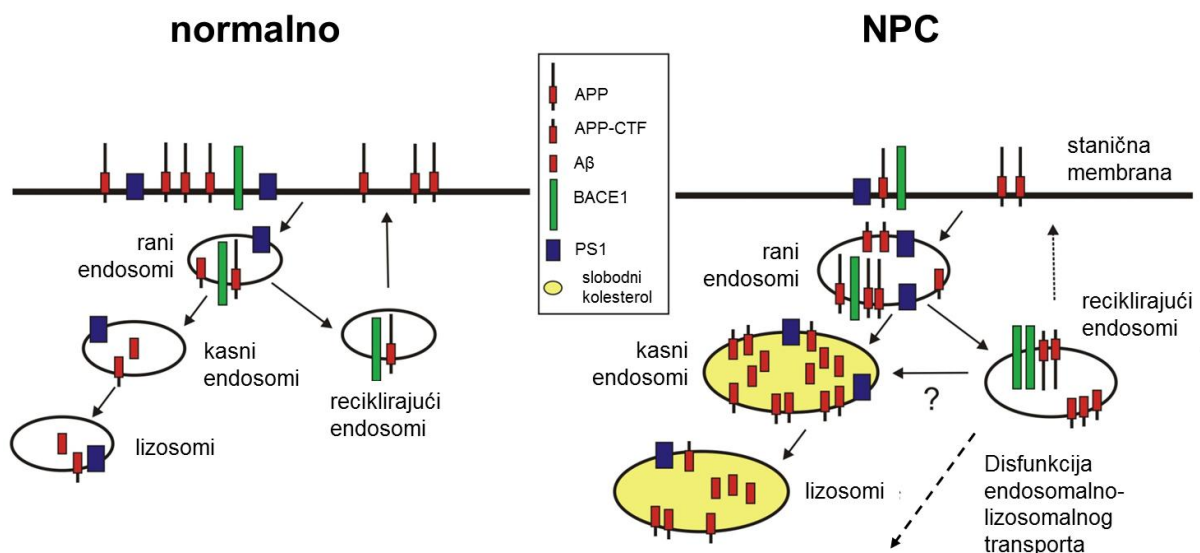
Jedno od patoloških obilježja kasnijih oblika bolesti NPC je nakupljanje neurofibrilarnih snopića proteina tau koji su morfološki i imunološki jednaki snopićima u AB (250). Osim toga, u *APOE* ϵ 4-pozitivnih NPC pacijenata tau patologija, koja uključuje ranije stvaranje i veći broj neurofibrilarnih snopića, ranije se razvija (247). Za razliku od nositelja *APOE* ϵ 4, nosioci *APOE* ϵ 2 kasnije su razvijali bolest NPC (248). Ovi podaci ukazuju da alel *APOE* ϵ 4, osim što je rizični faktor za razvoj AB, utječe na raniju pojavu i brže napredovanje bolesti NPC.

Osim što bolest NPC pokazuje patološke karakteristike AB, u hipokampalnim uzorcima oboljelih od AB primijećen je promijenjeni metabolizam proteina NPC1. Ujedno, promijenjena razina mRNA/proteina NPC1 je detektirana u mozgovima pacijenata oboljelih od AB (251). Studije na mišjim modelima AB su pokazale da delecija jednog alela *NPC1* uzrokuje povećano nakupljanje A β te ubrzava progresiju AB i obrnuto, da povećana ekspresija APP-a (252) kao i uklanjanje gena *APP* (253) u NPC mišjem modelu dovodi do pogoršavanja patoloških procesa NPC bolesti. Osim toga, uz neurodegeneraciju obje bolesti karakterizira pojava neuroinflamacije. Dok se u AB pretpostavlja da je neuroinflamacija odgovor na započete patološke procese koji uključuju degradaciju peptida A β i aktivaciju astrocita i mikroglia, u bolesti NPC neuroinflamacija se javlja puno prije prvih simptoma bolesti i patoloških značajki, tj. odumiranja Purkinje neurona u malom mozgu (254).

Ove dvije bolesti pokazuju i jasne neuropatološke razlike. Za razliku od AB gdje do neurodegeneracije dolazi primarno u hipokampusu i moždanoj kori, a neuroni malog mozga su, čini se, zaštićeni (tj. najkasnije su zahvaćeni), u bolesti NPC je opisana izrazita neurodegeneracija Purkinje neurona u malom mozgu, dok nasuprot tome, u hipokampusu neurodegeneracija nije primijećena (255). Međutim, zbog malog broja NPC pacijenata i nedostatka čimbenika starenja, jer prvenstveno oboljevaju djeca, pretpostavlja se da bi u NPC bolesti i hipokampus mogao biti zahvaćen, ali da je progresija bolesti u hipokampusu sporija. Istraživanja kojima je cilj utvrditi čimbenike osjetljivosti različitih neurona i/ili različitih regija mozga kao i protektivne čimbenike, predstavljaju važan aspekt današnjih istraživanja ovih kao i drugih neurodegenerativnih bolesti.

1.5.3. Naša dosadašnja istraživanja

Naša istraživanja pokazala su da povećana razina kolesterola u bolesti NPC uzrokuje povećano cijepanje APP-a enzimom BACE1 (246) kao posljedicu smanjenog izražaja APP-a na staničnoj membrani te povećanog nakupljanja APP-a i BACE1 u lipidnim splavima (256) i u endosomima (257). Rezultat je povećani nastanak CTF β /C99, sAPP β i unutarstaničnog peptida A β 40 (246). Nasuprot tome, smanjenje kolesterola u stanicama CHO *NPC1*-null povećava izražaj APP-a na staničnoj membrani i snižava razinu A β , CTF β /C99 na razinu sličnu kao u stanicama CHOwt. Ovi rezultati ukazuju da kolesterol modulira procesiranje APP-a neizravnim mehanizmima koji uključuju izražaj APP-a na staničnoj membrani i cijepanje β -sekretazom (246). Također, u stanicama CHO *NPC1*-null nakupljanje kolesterola uzrokuje povećanu kolokalizaciju APP-a i BACE1 unutar povećanih ranih i reciklirajućih endosoma koji dovode do povećanog cijepanja APP-a β -sekretazom (257) (Slika 5.).



Slika 5. Nakupljanje kolesterola u kasnim endosomima-lizosomima u bolesti NPC uzrokuje zastoje u endosomalno-lizosomalnom transportu te nakupljanje proteina APP i BACE1 unutar endosoma i pojavu fenotipa sličnog AB. Disfunkcija proteina NPC1 uzrokuje nepravilni transport proteina APP, BACE1 i PS1. U normalnim uvjetima APP se većinom nalazi na staničnoj membrani, a manje unutar endosoma. Posljedica toga je smanjeno cijepanje APP-a β -sekretazom (BACE1) i smanjeno stvaranje peptida A β . Nakupljanje kolesterola zbog disfunkcije proteina NPC1 uzrokuje zastoje u endosomalno-lizosomalnom transportu te nakupljanje proteina APP i BACE1 unutar endosoma. Posljedica toga je povećana proteoliza APP-a enzimom BACE1 te povećana proizvodnja i nakupljanje APP-CTF i A β što dovodi do patoloških događaja koji dovode do neurodegeneracije. Preuzeto iz (257).

2. HIPOTEZA

Hipoteza ovog rada je da unutarstanično nakupljanje kolesterola ili C-terminalnog odsječka proteina prekursora peptida amiloida β (CTF β /C99) karakteristično za bolest Niemann-Pick tipa C, kao i Alzheimerovu bolest, dovodi do poremećaja funkcije retromernog kompleksa. Stoga pretpostavljamo da disfunkcija retromera može predstavljati dodatnu zajedničku karakteristiku ovih bolesti.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Cilj istraživanja je ispitati međudjelovanje produkata razgradnje proteina prekursora amiloida β (APP), stanične homeostaze kolesterola i (dis)funkcije endosomalno-lizosomalnog puta i puta retromernog kompleksa – dva stanična puta uključena u patogenezu Alzheimerove bolesti.

3.2. Specifični ciljevi

Cilj 1. Ispitati razinu ekspresije i smještaj proteina retromernog kompleksa u staničnim modelima i mišjem modelu neurodegenerativne bolesti NPC.

Cilj 2. Ispitati utjecaj nakupljanja kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima na (dis)funkciju retromernog kompleksa.

Cilj 3. Ispitati ulogu C-terminalnih odsječaka APP-a (CTF-APP) u funkciji endosomalno-lizosomalnog puta, retromernog kompleksa i regulaciji stanične homeostaze kolesterola.

4. MATERIJALI I METODE

Ovaj doktorski rad dio je projekta Švicarske zaklade za znanost, Joint Research Project „The molecular links between cholesterol homeostasis, membrane trafficking and Alzheimer's disease”.

4.1. Stanični modeli

4.1.1. Uzgoj staničnih linija u kulturi

U ovom doktorskom radu korištene su sljedeće stanične linije:

- a) stanična linija jajnika kineskog hrčka (engl. *Chinese Hamster Ovary*, CHO) kojoj je deletiran gen *NPC1* (CHO *NPC1*-null), te parentalna stanična linija CHO divljeg tipa (CHOwt). Obje stanične linije dobivene su ljubaznošću dr. Daniela S. Oryja (Washington University School of Medicine, St. Louis, SAD). Stanice CHO uzgajane su u uvjetima *in vitro* u hranjivom mediju DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, SAD) uz dodatak 10% seruma goveđeg fetusa (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS; Sigma-Aldrich, SAD), 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, SAD) te 1% otopine antibiotika i antimikotika koja sadrži 100 jedinica/mL penicilina, 100 µg/mL streptomicina i 0,25 µg/mL amfotericina B (Sigma-Aldrich, SAD).
- b) stanična linija ljudskih neuroblastoma divljeg tipa (SH-SY5Ywt) te iste stanice kojima je stabilno transfeciran APP (SH-SY5Y-APP). Obje stanične linije dobivene su ljubaznošću dr. Stefana Lichtenthalera (German Center for Neurodegenerative Diseases, Munchen, Njemačka). Stanice SH-SY5Ywt uzgajane su u mediju DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, SAD) uz dodatak 15% FBS (Sigma-Aldrich, SAD), 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, SAD), neesencijalnih aminokiselina (Sigma-Aldrich, SAD) te 1% otopine antibiotika i antimikotika koja sadrži 100 jedinica/mL penicilina, 100 µg/mL streptomicina i 0,25 µg/mL amfotericina B (Sigma-Aldrich, SAD), a SH-SY5Y-APP i uz dodatak 100 µg/mL antibiotika Hygromicina (Thermo Fischer Scientific, SAD).
- c) stanična linija štakorskih neuroblastoma divljeg tipa B103wt u kojoj je razina ekspresije APP veoma smanjena te iste stanice u kojima je eksprimirana najčešća ljudska izoforma APP koja sadrži 695 aminokiselina (B103-*hAPP*₆₉₅). Obje stanične linije dobivene su ljubaznošću dr. Davea R. Schuberta (Salk Institute for Biological

Studies, La Jolla, SAD). Stanice B103wt uzgajane su u mediju DMEM (Sigma-Aldrich, SAD) uz dodatak 10% FBS, 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, SAD), te 1% otopine antibiotika i antimikotika koja sadrži 100 jedinica/mL penicilina, 100 µg/mL streptomocina i 0,25 µg/mL amfotericina B (Sigma-Aldrich, SAD), a B103-*hAPP*₆₉₅ uz još dodatno 400 µg/mL antibiotika G418 (Sigma-Aldrich, SAD).

Stanice su rasle u sterilnim plastičnim T-bocama (Sigma-Aldrich, SAD) u inkubatoru (Fisher Thermo Scientific, SAD) u vlažnoj atmosferi pri 37 °C i 5% CO₂. Stanice su održavane u kulturi redovitim presađivanjem nakon odvajanja od podloge pomoću otopine 0,25% tripsina s dodatkom 0,02% EDTA (Sigma-Aldrich, SAD). Broj stanica i njihova vijabilnost određena je 0,03% otopinom tripanskog modrila (Sigma-Aldrich, SAD) koja mrtve stanice boji u plavo. Stanice su izbrojane na Neubauerovoj komorici pomoću invertnog svjetlosnog mikroskopa (Zeiss Axiovert 25, Zeiss, Njemačka). Za pokuse su stanice različitih linija nasadene u odgovarajućim sterilnim pločama (Sigma-Aldrich, SAD).

4.1.2. Uzgoj primarnih kultura neurona

Za pripremu primarnih kultura neurona korišteni su miševi soja BALB/cNctr-*Npc1*^{m1N/+} (stock number 003092, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, SAD) koji su detaljno opisani u poglavlju 4.2. S obzirom da miševi *NPC1*^{-/-} nisu fertilni, miševi genotipa *NPC1*^{+/+} i *NPC1*^{-/-} dobiveni su parenjem heterozigotnih *NPC1*^{+/-} miševa. Primarne kulture neurona miševa genotipa *NPC1*^{+/+} i *NPC1*^{-/-} dobivene su izolacijom mozgovca mladunaca na postnatalni dan 0 ili 1 (P0-1).

4.1.2.1. Disekcija tkiva i odabir miševa

Mladunci su odvojeni od majke unutar 24 h od okota i žrtvovani dekapitacijom. Odrezana je koža na glavi kako bi bila vidljiva lubanja. Napravljen je rez od baze mozga uz bočne strane lubanje prema naprijed. Gornji, odrezani dio lubanje je odignut i mozak je odvojen od stražnje strane prema naprijed te uronjen u medij za disekciju i disocijaciju (opisan u 4.1.2.2.1.) u plastičnoj petrijevki promjera 30 mm (TPP, Sigma-Aldrich, SAD).

Za disekciju moždanih regija korišten je Olympus SZ61 Stereo Microscope (Olympus, Japan). Odvojeni su mali mozak i olfaktorni bulbus. Mali mozak je uronjen u pufer za disekciju (opisan u 4.1.2.3.1.) u plastičnoj petrijevki promjera 30 mm. Polutke kore velikog mozga razdvojene su sagitalnim rezom duž sredine mozga i uklonjene su meninge. Odvojen je hipokampus. Tkivo pojedinih regija je skupljeno u zasebne eppendorf tubice (jedna za koru

velikog mozga, jedna za hipokampus) koje sadrže medij za disekciju i disocijaciju. Postupak je ponovljen za svakog miša zasebno.

Također, prikupljen je i uzorak repića pojedinog miša koji je kasnije iskorišten za genotipizaciju (prema protokolu opisanom u 4.2.1.).

4.1.2.2. Hipokampalni i kortikalni neuroni

Za izradu kulture primarnih kortikalnih i hipokampalnih neurona korišten je protokol prilagođen prema (258).

4.1.2.2.1. Priprema pribora i kemikalija

Plastična stakalca na kojima će rasti neuroni (12 mm promjera, 1.5 H, Paul Marienfeld GmbH, Njemačka) složena su u porculanske držače te ispirana u staklenoj posudi preko noći u 65% dušičnoj kiselini (Thermo Fischer Scientific, SAD), a zatim u sterilnoj mQ-H₂O pet puta po 30 min. Porculanski držači sa stakalcima premješteni su u suhu staklenu posudu, stakalca su sušena u peći za suhu sterilizaciju (SE-10, Termo-medicinski aparati Bodalec & Havočić, Hrvatska) na 100 °C jedan sat pa sterilizirana pri 220 °C 6 h.

Poli-L-lizin (Sigma-Aldrich, SAD) je otopljen u 0,1 M boratnom puferu (boratna kiselina, Kemika, Hrvatska; natrijev tetraborat, Sigma Aldrich, SAD; voda, pH 8,5) konačne koncentracije 0,5 mg/mL. Steriliziran je filtriranjem koristeći 0,22 µm filter (TPP, Sigma-Aldrich, SAD).

Za nasađivanje neurona korištena su stakalca složena u ploče sa šest bunarića (Nunclon, Thermo Fischer Scientific, SAD; tri stakalca po bunariću) za imunocitokemijsku analizu te plastične petrijevke promjera 6 cm (Nunclon, Thermo Fischer Scientific, SAD) za analizu metodom Western blot. Otopina poli-L-lizina ravnomjerno je raspoređena po stakalcima i po dnu petrijevki tako da ih u potpunosti prekrije. Ploče i petrijevke zatim su inkubirane tri sata u inkubatoru (Thermo Fischer Scientific, SAD) na 37 °C.

Nakon inkubacije, poli-L-lizin je ispran tri puta sterilnom mQ-H₂O. U bunariće ploče te u plastične petrijevke stavljen je medij za nasađivanje pa su ploče i petrijevke vraćene u inkubator do nasađivanja neurona (pri čemu ne smije proći više od 24 h).

Tijekom pripreme kulture korišteni su sljedeći mediji:

- Medij za disekciju i disocijaciju: HBSS bez kalcijevih i magnezijevih iona (engl. *Hank's Balanced Salt Solution*, Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD), s dodatkom 1 mM natrijevog piruvata (Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD), 0,1% D-(+)-

glukoze (Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD), 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich, SAD).

- Medij za nasađivanje: BME (engl. *Eagle's basal media*, Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD), s dodatkom 10% konjskog seruma (Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD), 0,45% D-(+)-glukoza, 1 mM natrijevog piruvata, 2 mM L-glutamina (Gibco) i 1% penicilina/streptomicina (Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD).
- Medij za održavanje: neurobazalni medij (engl. *Neurobasal media*, Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD) s dodatkom 2% B27 (Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD), 2 mM L-glutamina i 1% otopine penicilina/streptomicina. Medij za održavanje uvijek je pripremljen nekoliko sati prije korištenja te stavljen u inkubator do korištenja.

4.1.2.2.2. Obrada tkiva kore velikog mozga i hipokampusa

Izolirano tkivo je isprano dva puta u novom mediju za disekciju i disocijaciju. Tkivo je resuspendirano koristeći novi medij za disekciju i disocijaciju, a zatim je dodana otopina tripsina (konačne koncentracije 0,25%, Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD) i sadržaj je promiješan. Tkivo je inkubirano u vodenoj kupelji pri 37 °C tijekom 20 min, uz miješanje svakih 5 min. Zatim je dodana sterilna DNazaI (Sigma-Aldrich, SAD) te je tkivo inkubirano 5 min. Medij je uklonjen i tkivo je isprano dva puta u mediju za disekciju i disocijaciju te dva puta u mediju za nasađivanje. Tkivo je resuspendirano u mediju za nasađivanje i triturirano koristeći sterilne Pasteur pipete (Carl Roth GmbH, Njemačka) zaobljenog vrha i obložene sterilnim 4%-tnim albuminom iz govedeg seruma (Sigma-Aldrich, SAD). Ovim postupkom je tkivo usitnjeno i dobivena je homogena suspenzija stanica.

Neuroni su nasađeni dodavanjem suspenzije u medij u pločama s bunarićima i petrijevkama promjera 6 cm, koje su zatim inkubirane pri 37 °C kroz 4 h. Stanicama je uklonjen medij za nasađivanje, a dodan medij za održavanje. Stanice su zatim vraćene u inkubator i uzgajane pri 37 °C i 5% CO₂.

4.1.2.2.3. Održavanje kulture

Dva puta tjedno uklonjeno je pola medija iz svakog bunarića, odnosno petrijevke, te je dodan isti volumen novog medija za održavanje. Važno je promijeniti samo pola medija jer neuroni izlučuju faktore neophodne za rast i preživljavanje. Rast neurona praćen jer kroz 14 dana, nakon čega su fiksirani i pripremljeni za daljnju analizu ili pohranjeni.

4.1.2.3. Purkinje neuroni

Kultura Purkinje neurona pripravljena je prema protokolu (259). Ukoliko nije drugačije navedeno, pribor, aparatura i kemikalije korištene za kulturu primarnih Purkinje neurona isti su kao i za kulturu primarnih kortikalnih i hipokampalnih neurona.

4.1.2.3.1. Priprema pribora i kemikalija

Plastična stakalca na kojima će rasti neuroni složena su u porculanske držače te ispirana u staklenoj posudi preko noći u 96% etanolu (Gram-mol, Hrvatska), a zatim u sterilnoj mQ-H₂O tri puta po 30 min. Porculanski držači sa stakalcima premješteni su u suhu staklenu posudu, stakalca su osušena u peći za suhu sterilizaciju 1 h pri 100 °C pa prebačena u staklenu petrijevku i sterilizirana 3 h pri 180 °C.

Poli-L-lizin je otopljen u mQ-H₂O (konačne koncentracije iznosi 0,1 mg/mL) i steriliziran filtriranjem. Stakalca su raspoređena u ploče sa šest bunarića kao i za kortikalne i hipokampalne neurone. Otopina poli-L-lizina ravnomjerno je raspoređena po stakalcima tako da ih u potpunosti prekrije. Ploče su prekrivene aluminijskom folijom i ostavljene pri 4 °C preko noći. Prije početka pokusa, poli-L-lizin je ispran sterilnom mQ-H₂O tri puta, a suhe ploče su zatim ostavljene u laminaru do nasađivanja stanica.

Tijekom pripreme kulture korišteni su sljedeći puferi i mediji, sterilizirani filtriranjem:

- Pufer za disekciju: 0,6% D-(+)-glukoza (Sigma-Aldrich, SAD) u PBS-u (tablete, Sigma-Aldrich, SAD).
- Pufer za disocijaciju: 0,6% D-(+)-glukoza i 0,1% albumin iz goveđeg seruma u HBSS-u s kalcijevim i magnezijevim ionima (Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD).
- Medij sa serumom: BME s dodatkom 0,48% glukoze, 10% konjskog seruma, 2 mM L-glutamina i 1% penicilina/streptomicina.
- Medij bez seruma: BME s dodatkom 0,48% glukoze, 1% albumina iz goveđeg seruma, 1% ITS-a (inzulin-transferin-natrijev selenit, pripremljen u sterilnoj mQ-H₂O, Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD), 2 mm L-glutaminA i 1% penicilina/streptomicina.

4.1.2.3.2. Obrada tkiva malog mozga

Nakon što je mali mozak odvojen od ostatka mozga u pufer za disekciju, uklonjene su meninge i usitnjen je na tri dijela. Svaki od tri dijela malog mozga prebačen je u zasebnu eppendorf tubicu s 0,05%-tnim tripsinom (pripremljenom u puferu za disekciju i

steriliziranom filtriranjem). Inkubacija je trajala 3 min pri sobnoj temperaturi, uz povremeno miješanje.

Nakon inkubacije, dodan je pufer za disocijaciju s dodatkom 10% konjskog seruma za neutralizaciju tripsina, nakon čega je tkivo isprano jednom s hladnim puferom za disocijaciju. Na tkivo je zatim dodan pufer za disocijaciju i sterilna DNazaI (pripremljena u puferu za disocijaciju) te je tkivo trituirano 15 do 20 puta koristeći sterilne Pasteur pipete zaobljenog vrha.

Kada se stanični debris istaložio na dno tubice, skupljen je supernatant sa stanicama i prebačen u novu tubicu. Stanice su centrifugirane u ohlađenoj centrifugi 10 min na 60×g. Supernatant je bačen, a na stanice je stavljen novi pufer za disocijaciju. Stanice su resuspendirane i centrifugirane. Ovaj postupak ponovljen je još dva puta.

Nakon uklanjanja supernatanta, na stanice je dodan medij sa serumom. Stanice su resuspendirane, nakon čega je spojen sadržaj triju tubica istog malog mozga.

Nakon resuspendiranja, suspenzija stanica je nakapana na stakalca. Ploče su stavljene u inkubator na jedan sat, nakon čega je pažljivo dodan medij sa serumom u svaki bunarić ploče. Ploče su vraćene u inkubator. Nakon 2 h, uklonjen je sav medij sa serumom i dodan medij bez seruma.

4.1.2.3.3. Održavanje kulture

Stanice su uzgajane u mediju sa serumom, uz promjenu cijelog medija svaka dva ili tri dana. Rast neurona praćen jer kroz 14 dana, nakon čega su fiksirani i pripremljeni za daljnju analizu ili pohranjeni.

4.2. Uzgoj mišjeg modela bolesti Niemann-Pick tipa C

U sklopu ovog doktorskog rada korišten je mišji soj BALB/cNctr-*Npc1*^{m1N/+} (stock number 003092, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, SAD) uzgajan u Pogonu za laboratorijske životinje Instituta Ruđer Bošković (IRB). Uzgoj životinja i svi pokusi provedeni su u skladu s važećim Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/17) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 39/17), a istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva IRB-a i od strane Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (klasa UP/I-322-01/15-01/42 i klasa UP/I-322-01/17-01/15). U pokusima za analizu razine i smještaja proteina korištene su ukupno 54 životinje genotipa *NPCI*^{+/+} i *NPCI*^{-/-} u različitim fazama bolesti (starosti 4, 7 i 10 tjedana) (254). Za izolaciju tkiva za pripremu primarnih kultura neurona korišteno je 60 mladunaca postnatalnog dana 0 ili 1 (P0-P1). Pokuse na navedenim životinjskima izvodila je doktorandica Dominko (kategorija LabAnim 3, FELASA cat. C equivalent, Potvrda o osposobljenosti, broj 128.3-15, HR 191/02/P, PMF, Zagreb).

Miševi su imali neograničen pristup hrani i vodi. Hranjeni su standardnom hranom za miševe i štakore 4RF21 (Mucedola, Italija, oblik 12 mm), koja sadrži pšenicu, kukuruz, soju, riblji ekstrakt, dikalcijev fosfat, kalcijev karbonat, natrijev klorid, sojino ulje, kvasac i ljuske lješnjaka. Miševi su držani u uvjetima 12 sati svjetla i 12 sati tame pri sobnoj temperaturi od 22 °C i vlažnosti od 60%.

Za održavanje mišje linije i dobivanje uzoraka genotipa *NPCI*^{-/-} kao i kontrolnih uzoraka *NPCI*^{+/+} korišteni su mužjaci i ženke heterozigotnog genotipa *NPCI*^{+/-} jer miševi genotipa *NPCI*^{-/-} nisu fertilni.

4.2.1. Genotipizacija miševa

4.2.1.1. Izolacija DNA iz tkiva

Miševi starosti četiri tjedna odvojeni su po spolu i razvrstavani u kaveze pri čemu je svaki miš obilježen oznakom na uhu (engl. *ear punch*) i uzet mu je uzorak tkiva repa koji je kasnije korišten za genotipizaciju.

Tkivo repa uronjeno je u 400 µL pufera za lizu (0,1 M Tris, pH 8,0, 0,2 M NaCl, 5 mM EDTA i 0,4% SDS u kvarcnoj vodi (mQ-H₂O) uz dodatak proteinaze K u konačnoj koncentraciji 0,2 mg/mL i inkubirano preko noći pri 55 °C u termobloku uz tresenje. Sljedećeg dana uzorci su centrifugirani u centrifugi Eppendorf na 20000×g, 5 min pri sobnoj temperaturi. Supernatant je prebačen u novu sterilnu tubicu te je dodano 500 µL propan-2-ola,

uzorci su dobro promiješani i inkubirani 5-10 min pri sobnoj temperaturi pri čemu je precipitirana DNA postala vidljiva u tubici. Uzorci su zatim centrifugirani na 20000×g, 5 min pri sobnoj temperaturi. Supernatant je otpipetiran, a na talog je dodano 1 mL 70% etanola i uzorci su promiješani te još jednom centrifugirani na 20000×g. Etanol je pažljivo uklonjen, a talog posušen na zraku u otvorenoj tubici (10-20 min). Na svaki talog dodano je 200 µL pufera 1×TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, dH₂O, pH 7,6), tubice su vorteksirane (Vortex Mixer, neoLab Migge GmbH, Njemačka) dok se talog nije odlijepio od stijenke tubice, a zatim stavljene u termoblok pri 55 °C tijekom 10 min nakon čega je temperatura spušta na 37°C sljedećih par sati. Uzorci su ostavljeni pri sobnoj temperaturi preko noći da se DNA dobro otopi. Sljedeći dan izmjerena je koncentracija DNA na spektrofotometru (Implen NanoPhotometer, Implemen GmbH, Njemačka). Nakon mjerenja koncentracije DNA svi uzorci su razrijeđeni u sterilnoj mQ-H₂O do konačne koncentracije DNA 10 ng/µL koja je korištena za daljnju analizu.

4.2.1.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Genotip miševa određen je metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chain reaction*, PCR). Za svaki uzorak napravljene su dvije reakcijske smjese od 20 µL (prema Tablici 1.), jedna je sadržavala početnice za alel *NPCI* divljeg tipa, a druga početnice za mutantni alel *NPCI* (prema Tablici 2.). Reakcija se odvijala u uređaju za PCR (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD) pod uvjetima navedenima u Tablici 3.

Tablica 1. Sastav reakcijskih smjesa za genotipizaciju NPC1 miševa.

PCR za alel <i>NPCI</i> divljeg tipa		PCR za mutantni alel <i>NPCI</i>	
Sterilna mQ-H ₂ O	10,2 µL	Sterilna mQ-H ₂ O	10,2 µL
5×PCR pufer	4 µL	5×PCR pufer	4 µL
2,5 mM dNTP	1,6 µL	2,5 mM dNTP	1,6 µL
20 µM početnica 28	1 µL	20 µM početnica 25	1 µL
20 µM početnica 29	1 µL	20 µM početnica 27	1 µL
10 ng/µL genomska DNA	2 µL	10 ng/µl genomska DNA	2 µL
5 U/µL Taq polimeraza	0,2 µL	5 U/µl Taq polimeraza	0,2 µL
Konačni volumen	20 µL	Konačni volumen	20 µL
<i>Veličina produkta</i>	<i>173bp</i>	<i>Veličina produkta</i>	<i>475 bp</i>

Tablica 2. Popis sekvenci početnica korištenih za genotipizaciju miševa NPC1.

Genotip <i>NPC1</i>	Početnica	Sekvenca 5' → 3'
Divlji tip	oIMR0928	CTG TAG CTC ATC TGC CAT CG
Divlji tip	oIMR0929	TCT CAC AGC CAC AAG CTT CC
Mutantni alel	oIMR4125	GGT GCT GGA CAG CCA AGT A
Mutantni alel	oIMR0927	TGA GCC CAA GCA TAA CTT CC

Tablica 3. PCR program za umnožavanje DNA za genotipizaciju miševa NPC1.

		Temperatura (°C)	Trajanje
Početna denaturacija		94	3 min
35 ciklusa	Denaturacija	94	30 s
	Ljepljenje početnica	63	45 s
	Produljivanje lanaca	72	45 s
Završna polimerizacija		72	2 min
		10	∞

Produkti DNA nastali u reakcijama PCR razdvojeni su horizontalnom elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu. Gel je pripremljen otapanjem agaroze (Sigma-Aldrich, SAD) u puferu 1×TAE (40 mM Tris baza, Sigma-Aldrich, SAD, 20 mM octena kiselina, J.T.Baker, Thermo Fischer Scientific, SAD, 1 mM EDTA, Sigma-Aldrich, SAD, dH₂O). U otopljenu agarozu dodana je boja GelRed u razrjeđenju 1:20000 (GelRed Nucleic Acid Stain, Biotium, SAD). Nakon polimerizacije gela, u jažice gela nanoseno je 20 µL svakog uzorka dobivenog PCR reakcijom. Elektroforeza se odvijala u puferu 1×TAE, pod stalnim naponom od 100 V tijekom 30 min u uređaju za horizontalnu elektroforezu (BioRad, SAD). Razdvojeni produkti PCR reakcije vizualizirani su u aparatu UVITEC (Ujedinjeno Kraljevstvo).

4.3. Modulacija razine kolesterola

Za praćenje utjecaja snižavanja i nakupljanja kolesterola na razinu i smještaj proteina retromera u staničnim linijama, stanice su nasađene u normalnom mediju za rast stanica (uz 10% FBS) u plastičnim pločama s bunarićima odgovarajućih veličina, ovisno o metodi daljnje analize.

4.3.1. Tretmani za snižavanje i povećanje razine kolesterola u stanicama CHOwt i NPC1-null

U svim tretmanima za snižavanje kolesterola stanice su 24 h nakon nasađivanja prvo dva puta isprane u mediju DMEM/F12 bez FBS-a s ciljem uklanjanja tragova FBS-a koji sadrži lipide.

Tretmani za snižavanje razine kolesterola u stanicama CHO NPC1-null (257) uključivali su:

- a) uzgajanje stanica u mediju bez egzogenog kolesterola uz dodatak LPDS (engl. *LiPid Deficient Serum*, LPDS; Cocalico Biologicals, SAD) – tretman LPDS

Nakon ispiranja stanica u mediju DMEM/F12 bez FBS-a na stanice je dodan medij DMEM/F12 s dodatkom 10% seruma bez lipida (LPDS) te su stanice u tim uvjetima uzgajane tijekom 48 h.

- b) uzgajanje stanica u mediju sa statinom (lovastatinom) uz dodatak mevalonata (260) – tretman statini

Tretman statinima u prisustvu niske koncentracije mevalonata inhibira biosintezu kolesterola i snižuje razinu ukupnog kolesterola u stanicama. Nakon ispiranja stanica u mediju DMEM/F12 bez FBS-a stanice su uzgajane u DMEM/F12 mediju s 10% LPDS-a i 4 μ M lovastatinom (Sigma-Aldrich, SAD) s dodatkom 0,25 mM mevalonata (Sigma-Aldrich, SAD) tijekom 48h.

- c) akutni i kronični tretman stanica spojem metil- β ciklodekstrin (engl. *methyl- β cyclodextrin*, M β C)

Spoj metil- β -ciklodekstrin (M β C, Sigma-Aldrich, SAD) specifično uklanja stanični kolesterol (261). U akutnom tretmanu stanice su inkubirane u mediju s 10% LPDS-a i 10 mM spoja M β C tijekom 1 h. Nakon toga, stanicama je promijenjen medij i uzgajane su u mediju s 10% seruma LPDS (bez dodatka spoja M β C) tijekom 24h.

Prilikom kroničnog tretmana stanica spojem M β C (261), stanice su inkubirane u mediju s 10% seruma LPDS i 1 mM spoja M β C u mediju s 10% seruma LPDS tijekom 24 h.

Tretmani za nakupljanje kolesterola u stanicama CHOwt uključivali su:

a) tretman spojem U18666A (249)

Tretman amfifilnim spojem U18666A (3- β -[2-(dietilamino)etoksi]androst-5-en-17-on) se u literaturi koristi za oponašanje fenotipa NPC (262). Nakon 24 h u kulturi, stanicama je dodan medij DMEM/F12 uz 10% FBS i 3 μ g/mL spoja U18666A (Sigma-Aldrich, SAD) tijekom 48h.

b) tretman kompleksom M β C-kolesterol (263)

Kolesterol konjugiran sa spojem M β C je topljiv u vodi te nesmetano ulazi u stanicu gdje uzrokuje povećanje razine kolesterola. Stanice su 24 h nakon nasađivanja prvo dva puta isprane u mediju DMEM/F12 bez FBS-a. S ciljem izgladnjivanja i poticanja unosa kolesterola, prvo su uzgajane u mediju DMEM/F12 s 10% seruma LPDS tijekom 24 sata. Nakon toga im je dodan medij s 10% LPDS i 100 μ g/mL otopine kompleksa M β C-kolesterol tijekom zadnja 4 h pokusa.

4.3.2. Tretmani za snižavanje kolesterola u mišjem modelu NPC

Pokusi koji su uključivali tretmane miševa NPC1 i pripadajućih miševa wt s ciljem snižavanja kolesterola odvijali su se u suradnji s kompanijom JSW (danas QPS-Austria GmbH), Grambach, Austrija. Tretmani su uključivali tretman metil- β -ciklodekstrinom i fluvastatinom u miševima NPC1 starosti 4, 7 i 10 tjedana. Također, po tri miša wt i NPC1 svake starosti primali su placebo koji je uključivao 5% DMSO u fiziološkoj otopini. Miševi konačne starosti 4, 7 i 10 tjedana, žrtvovani su pet sati nakon zadnjeg tretmana. U pokusu je ukupno korišteno 45 miševa raspoređenih u 15 skupina (n=3). Tretmani metil- β -ciklodekstrinom (Sigma S0940, 4000 mg/kg/dan) započinjali su na 24., 45. ili 66. dan starosti i trajali su pet dana, tretman je injiciran subkutanom injekcijom svaki drugi dan, ukupno tri puta. Tretmani fluvastatinom (Tocris #3309 5 mg/kg/dan) započinjali su na 22., 43. ili 64. dan starosti miševa i trajali su sedam dana. Životinje su primale fluvastatin kanilom jednom dnevno, ukupno sedam puta.

4.4. Modulacija razine C-terminalnih odsječaka APP-a

4.4.1. Tretmani za snižavanje i nakupljanje C-terminalnih odsječaka APP-a

Za analizu utjecaja snižavanja i nakupljanja endogenog C-terminalnog odsječaka β (CTF β /C99) na homeostazu kolesterola, disfunkciju endosoma-lizosoma i retromera u stanicama korišten je farmakološki pristup. Nakupljanje CTF β /C99 potaknuto je tretiranjem stanica inhibitorom γ -sekretaze (DAPT) i α -sekretaze (TAPI), a snižavanje razine CTF β /C99 inhibitorom β -sekretaze (C3) (246).

Stanice B103wt i B103-*hAPP* te SH-SY5Ywt i SH-SY5Y-*APP* tretirane su pojedinačnim inhibitorima (DAPT, C3 ili TAPI) ili kombinacijom inhibitora u istoj koncentraciji tijekom 48 h. Za analizu utjecaja C-terminalnih odsječaka APP-a na retromer stanice SH-SY5Ywt i SH-SY5Y-*APP* tretirane su s 10 μ M DAPT ((N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl-L-alanyl)], Sigma Aldrich, SAD), 5 μ M C3 (Calbiochem) i 50 μ M TAPI (Calbiochem) (264,265). Također, korišteni su i tretmani spojem U18666A u koncentraciji 3 μ g/mL spoja i amonijevim kloridom (NH₄Cl) kao inhibitorom lizosoma u koncentraciji 5 mM tijekom 48 h (266). Ovi tretmani su služili kao pozitivna kontrola disfunkcije lizosoma i posredno izazivali nakupljanje odsječaka CTF-APP.

Za analizu utjecaja C-terminalnih odsječaka APP-a na ekspresiju gena uključenih u metabolizam kolesterola, stanice B103wt i B103-*hAPP* su tretirane sljedećim spojevima: 3 μ g/mL U18666A, 1 μ M DAPT te kombinacijom 100 μ M Leupeptina/5 mM NH₄Cl (266) tijekom 24 sata.

4.4.2. Prolazna transfekcija stanica

Osim farmakološkog pristupa za analizu utjecaja CTF β /C99 na homeostazu kolesterola, disfunkciju endosoma-lizosoma i retromera primijenjen je i genetički pristup. Stanice SH-SY5Ywt prolazno su transfecirane konstruktom APP₆₉₅ (267). Za transfekciju je korišten transfekcijski reagens Lipofectamine 3000 (Invitrogen, SAD). Transfekcijska smjesa sastojala se od medija bez seruma i antibiotika, te transfekcijskog reagensa i DNA plazmidnog vektora koji kodira protein APP₆₉₅wt. Transfekcija je provedena prema uputama proizvođača, stanice su transfecirane kada su bile oko 70% konfluentne. Medij je promijenjen nakon 6 h te su i medij i stanični lizat nakon 48 h prikupljeni za daljnju analizu.

4.5. Analiza razine proteina metodom Western blot

4.5.1. Homogenizacija proteina

4.5.1.1. Priprema staničnog lizata

Za analizu količine retromernih proteina metodom Western blot nasadeno je 300000 stanica u 2 mL medija sa serumom u sterilne plastične ploče sa šest bunarića. Stanice su na kraju pokusa bile 90-100% konfluentne. Svi pokusi rađeni su u biološkim duplikatima i validirani u minimalno tri pokusa.

Svi koraci u pripremi staničnog lizata izvođeni su na ledu. Medij sa stanica sakupljen je u plastične mikrotubice te centrifugiran na 720×g tijekom 10 min pri 4 °C (Eppendorf 5408R, Njemačka) s ciljem taloženja staničnog debrisa. Supernatant je ispipetiran u nove mikrotubice te analiziran ili pohranjen pri -80 °C do analize.

Stanice su tri puta isprane u hladnom puferu PBS. Nakon zadnjeg ispiranja sav pufer je pažljivo pokupljen. Stanice su pažljivo odvojene od površine plastične ploče na kojoj su rasle pomoću gumene strugalice (engl. *Policeman, cell scraper*; Sarstedt, Njemačka) u 300 µL pufera RIPA (50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP40, 0,1% SDS, 0,5% natrijev deoksilat) s dodatkom koktela inhibitora proteaza (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka). Stanični lizat prebačen je u mikrotubice volumena 1,5 mL (Sarstedt, Njemačka) te inkubiran 20 min na ledu uz povremeno vorteksiranje. Uzorci su zatim centrifugirani u mikrocentrifugi (Eppendorf 5415R, Njemačka) na 16 000×g, 10 min pri 4 °C kako bi se istaložio stanični debris. Supernatant u kojemu se nalaze stanični proteini ispipetiran je u nove mikrotubice te je odmah određena koncentracija proteina (opisano u 4.5.2.). Lizati su nakon toga analizirani ili pohranjeni pri -80 °C do daljnje analize.

4.5.1.2. Homogenizacija proteina mozga

Miševi su anestetizirani i perfundirani pomoću 0,9% fiziološke otopine. Mozak je izoliran i polutke su razdvojene. Lijeva polutka je korištena za imunohistokemiju (opisano u točki 4.6.2.). Desna polutka disecirana je na mali mozak, hipokampus, koru velikog mozga i ostatak mozga i navedeni dijelovi su trenutno zamrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni pri -80 °C do daljnje analize.

Prilikom pripreme za analizu razine proteina retromera u moždanom tkivu miševa, disecirani smrznuti dijelovi mozga izvagani su i dodan je deset puta veći volumen pufera za homogenizaciju (1:10 w/v), koji je sadržavao 0,25% DEA (dietilamin), 100 mM NaCl i koktel

inhibitora proteaza (Complete, Roche Applied Science). Tkivo je homogenizirano u staklenom homogenizatoru dok lizat nije postao homogen. Uzorci su centrifugirani na $100000\times g$ pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 30 min. Supernatant je pokupljen i prebačen u novu tubicu i pohranjen pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na ovaj način je dobiven uzorak topljivih proteina mozga. Za dobivanje frakcije membranskih proteina mozga (proteini vezani ili uklopljeni u membrane), dobiveni talog je dalje homogeniziran u staklenom homogenizatoru u istom volumenu pufera s 1% Tritona (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 i 2 mM EDTA) s koktelom inhibitora proteaza. Dobiveni lizati su propušteni kroz iglu veličine 23G koristeći špricu od 1 mL sve dok lizati nisu postali homogeni. Homogenati su inkubirani 30 min na ledu i centrifugirani na $100000\times g$ pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 30 min. Nakon centrifugiranja supernatanti su sakupljeni, prebačeni u čiste tubice i pohranjeni pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnje analize.

4.5.2. Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina u staničnim lizatima i homogenatima mozga korišten je komercijalno dostupan komplet Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fischer Scientific, SAD) te je praćen protokol proizvođača. Ukratko, komplet se temelji na dvije reakcije, biuretskoj reakciji i detekciji iona bakra bicinkoniničnom kiselinom (BCA).

Koncentracija proteina određena je u mikrotitarskim plastičnim pločicama s 96 bunarića (TPP). U bunarić je ispipetirano $25\text{ }\mu\text{L}$ standarda ili uzorka pa $200\text{ }\mu\text{L}$ otopine reagensa iz kompleta (A:B=50:1) i inkubirano 30 min pri sobnoj temperaturi. Apsorbancija pri 570 nm očitana je na spektrofotometru (ThermoLab systems Multiskan EX, SAD).

4.5.3. Elektroforeza u gelu poliakrilamida

Smjesa proteina u dobivenim lizatima razdvojena je elektroforezom u gelu poliakrilamida u denaturirajućim uvjetima pri kojoj su proteini razdvojeni na temelju razlike u molekularnoj masi. Uzorci su normalizirani prema koncentraciji proteina.

Stanični lizat je pomiješan s koncentriranim puferom za nanošenje uzoraka, PLD (od engl. *Protein Loading Dye*; 6 \times PLD: 6 mL glicerola, 1,2 g SDS, 0,31 g DTT, 1,25 mL 0,5 M pufera Tris pH 6,8, boja bromfenol modro, dH_2O do ukupnog volumena 10 mL). Tako pripremljeni uzorci denaturirani su pri $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 10 min u termobloku, kratko centrifugirani pri sobnoj temperaturi tijekom 1 min te je na gel nanoseno $10\text{ }\mu\text{g}$ proteina staničnog lizata ili $20\text{ }\mu\text{g}$ homogenata moždanog tkiva.

Proteini retromernog i endosomalno-lizosomalnog puta razdvojeni su elektroforezom pomoću sustava Mini-PROTEAN za vertikalnu elektroforezu (BioRad, SAD) u Tris-glicin gelu u denaturirajućim uvjetima (Tablica 4.) pri konstantnom naponu 150 V. C-terminalni odsječci APP-a razdvojeni su u peptidnom Tris-tricin gelu u denaturirajućim uvjetima (Tablica 5.) pri konstantnom naponu od 120 V (Schägger, 2006). Svaki gel se sastojao od gela za sabijanje s 5% smjese akrilamida i bisakrilamida te gela za razdvajanje proteina. Detaljan opis komponenti gelova i pufera za elektroforezu nalazi se u Tablicama 4. i 5.

Tablica 4. Sastav Tris-glicin poliakrilamidnih gelova (10 mL) te pufera za elektroforezu.

	Gel za sabijanje (mL)	Gel za razdvajanje (mL)			
	5 % gel	6% gel	8 % gel	10 % gel	15% gel
dH ₂ O	6,9	5,4	4,7	4,1	2,4
30 % otopina akrilamida i bisakrilamida (29:1)	1,7	2,0	2,7	3,3	5,0
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	/	2,5	2,5	2,5	2,5
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25	/	/	/	/
10 % APS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,01	0,008	0,006	0,004	0,004
Pufer za elektroforezu: 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS, pH 8,3					

Tablica 5. Sastav peptidnog Tris-tricin gela (volumen za dva 1.5 mm gela) te katodnog i anodnog pufera za elektroforezu.

	Gel za sabijanje (mL)	Diskontinuirani gradijentni gel za razdvajanje (mL)	
	4 % gel	10 % gel	16.5% gel
dH ₂ O	4,2 mL	3,5 mL	/
Peptidni pufer (3 M Tris-HCl pH 8,45, 0,3% SDS)	1,55 mL	2,5 mL	3,5 mL
32% glicerol	/	/	3,5 mL
49,5% otopina akrilamida i bisakrilamida (48,5 : 1,5)	0,5 mL	1,5 mL	3,5 mL
10 % APS	50 µL	35 µL	32,5 µL
TEMED	5 µL	4 µL	4 µL
Katodni pufer: 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M Tricin, 0,1 % SDS Anodni pufer: 0,2 M Tris-HCl, pH 8,9			

4.5.4. Prijenos proteina iz gela na membranu

Proteini razdvojeni elektroforezom u gelu preneseni su na polivinilnu membranu (PVDF, Roche Diagnostics GmbH, Njemačka) također pomoću sustava Mini-PROTEAN. Prijenos proteina na membranu odvijao se pri konstantnoj jakosti struje 100 mA, 16 h u puferu za prijenos (25 mM Tris, 192 mM glicin, 20% metanol, pH 8,4) pri 4 °C.

4.5.5. Bojenje membrane metodom Amido Black

Kontrola prijenosa proteina na membranu i ujednačenog nanošenja proteina na gel provjerena je bojenjem membrane metodom Amido Black. Nakon prijenosa proteina na membranu, membrana je isprana u PBS-u 10 min uz lagano tresenje te inkubirana u otopini za bojenje (Merck Millipore, SAD) tijekom 1-2 min (0,1% (m/V) Amido Black 10B, 20% metanol, 2% octena kiselina, dH₂O), odbojavana u otopini za odbojavanje (45% metanol, 7% octena kiselina, dH₂O) dva puta po 30 min te isprana u reH₂O. Membrana je zatim isprana u puferu za ispiranje TBST (engl. *Tris-Buffered Saline*; 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, i 0,1% Tween-20).

4.5.6. Obilježavanje primarnim i sekundarnim protutijelima

Nakon provjere prijenosa proteina na membranu, membrana je blokirana s ciljem zasićenja svih praznih veznih mjesta na membrani kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela za membranu. Membrana je inkubirana 45 min u 5% otopini reagensa I-Block (Tropix, SAD) u PBS-u. Nakon blokiranja membrana je inkubirana u primarnom protutijelu razrijeđenom u otopini za blokiranje preko noći pri 4 °C uz stalno tresenje (tresilica UltraRocker Rocking Platform, BioRad, SAD). Korištena protutijela navedena su u Tablici 6. Sljedeći dan membrana je isprana tri puta po 10 min u puferu za ispiranje TBST, te inkubirana 90 min u otopini sekundarnog protutijela konjugiranog s peroksidazom hrena (1:5000 v/v) uz stalno tresenje pri sobnoj temperaturi. Korištena su sekundarna protutijela proizvedena protiv IgG miša, kunića i koze (BioRad, SAD) te štakora (Sigma-Aldrich, SAD). Nakon toga membrana je isprana tri puta po 10 min u puferu TBST.

Tablica 6. Popis korištenih protutijela i razrjeđenja za pojedinu metodu.

Protutijelo	Antigen / Organel	WB	ICC / IHC	Proizvođač (kat. br.)
β -actin	β -actin	1:10000	/	Cell Signaling (8H10D10, #3700)
1127 (APP)	C-terminalni kraj APP-a	1:10000	/	dar dr.sc. Mirsada Čaušević
2C11 (APP)	C-terminalni kraj APP-a	1:10	/	dar dr.sc. Stefan Lichtenthaler
Y188 (APP)	C-terminalni kraj APP-a	/	1:100	EPITOMICS; ABCAM (Y188, #32136)
22C11 (APP)	N-terminalni kraj APP-a	1:1000	/	Merck (aa 66-81, clone 22C11, MAB348)
CALBINDIN	Purkinje neuroni	/	1:500	SWANT (D-28k (300))
EEA1	rani endosomi	1:1000	1:100	Cell Signaling (C45B10, #3288)
LAMP1	lizosomi	1:1000	1:100	SANTA CRUZ (1D4B, #sc-199929)
LAMP1	lizosomi	1:1000	1:100	Sigma (L1418)
NPC1	NPC1	1:2000	1:100	Abcam (EPR5209, ab134113)
Rab7	kasni endosomi	1:1000	1:100	Abcam (EPR7589, ab137029)
sorLA	retromerni receptor za APP	/	1:100	Merck (clone 20C11, MABN1793)
sorLA (gp250; LR11)	retromerni receptor za APP	1:500	/	BD (#612633)
TGN 46	<i>trans</i> -Golgijev aparat	/	1:500	Abcam (ab16059)
RECEPTOR TRANSFERINA	reciklirajući endosomi	1:500	1:100	LIFE TECHNOLOGIES (CD71, H68.4)
β III Tubulin	neuronalni biljeg	1:100	1:100	Abcam (ab18207)
TUJ-1	neuronalni biljeg	/	1:1000	Covance (MMS-435P)
Vps26	retromerni protein	1:1000	1:500	Abcam (ab23892)
Vps35	retromerni protein	1:10000	1:500	NovusBio(NB100-1397; IMG3575)

4.5.7. Prikaz signala kemiluminiscencijom

Proteinske vrpce koje su obilježene specifičnim protutijelima vizualizirane su kemiluminiscencijom pomoću komercijalno dostupnog kompleta koji sadrži supstrat peroksidaze hrena, prema uputama proizvođača (BM Chemiluminescence Western Blotting Substrate; Roche Diagnostics GmbH, Njemačka). Signal je analiziran aparatom za prikaz kemiluminiscencije pomoću CCD kamere (UVITEC, Ujedinjeno Kraljevstvo). Kvantitativna analiza dobivenih signala kemiluminiscencije napravljena je korištenjem računalnog programa ImageJ (NIH, SAD).

4.6. Analiza smještaja proteina imunofluorescencijom i konfokalnom mikroskopijom

Smještaj proteina retromera u staničnim modelima, mišjim primarnim neuronima i kriorezovima mozga mišjeg modela NPC analiziran je imunofluorescencijom te konfokalnim laserskim mikroskopom Leica SP8 X FLIM u Zavodu za molekularnu biologiju, IRB. Slike su analizirane u računalnom programu LAS X (Leica, Njemačka).

4.6.1. Imunocitokemijska analiza

Imunocitokemijska analiza smještaja retromernih proteina i njihova kolokalizacija s biljezima staničnih organela (prema Tablici 6.) provedena je u staničnim modelima tretiranim spojevima za snižavanje ili nakupljanje kolesterola ili CTF β /C99. Imunocitokemijom je praćena i (dis)funkcija retromernog transporta u neuronima mišjeg modela bolesti NPC.

4.6.1.1. Nasađivanje i priprema staničnih linija za analizu

Stanice za imunocitokemijsku analizu nasađene su na staklena stakalca promjera 12 mm (VWR, SAD) smještene u plastične ploče s 24 bunarića (Sigma-Aldrich, SAD). U sterilnom laminaru pojedinačno stakalce sterilizirano je provlačenjem kroz plamen te smješteno u bunarić. Ukupno je po bunariću nasađeno 15000 stanica CHOWt ili CHO *NPC1*-null, odnosno 50000 stanica SHSY5Y-APP u 500 μ L medija za nasađivanje. Svi uzorci rađeni su u biološkim duplikatima i validirani u minimalno tri pokusa. Nakon završetka pokusa stanice su isprane tri puta u PBS-u, fiksirane u otopini 4% paraformaldehida u 4% saharozi (oboje od Sigma-Aldrich, SAD) tijekom 20 min. Otopina 4% paraformaldehida u 4% saharozi pripremla se svježe od 16% otopine koja se čuva pri -20 °C. Nakon fiksacije, stanice su isprane tri puta u PBS-u te analizirane ili pohranjene pri 4 °C u otopini PBS-a.

4.6.1.2. Obilježavanje primarnim i sekundarnim protutijelima

Fiksirane stanice permeabilizirane su u 0,2% otopini saponina (Sigma-Aldrich, SAD) u PBS-u tijekom 10 min. Isprane su tri puta u PBS-u te blokirane na sobnoj temperaturi 1 h. Za blokiranje je korištena 4% otopina magarećeg seruma. Nakon blokiranja stanice su obilježene primarnim protutijelima razrijeđenima u otopini za blokiranje. Obilježavanje protutijelima odvijalo se u vlažnoj komori. U čvrstu zatamnjenu posudu stavljen je vlažni papir (Whatman, Sigma-Aldrich, SAD), zatim parafilm (Brand GmbH, Njemačka) na koji je ispipetirano 60 μ L otopine protutijela (razrijeđenja protutijela korištena za ovu metodu nalaze se u Tablici 6.). Svako stakalce je pincetom izvučeno iz bunarića te okrenuto naopako da stanice budu uronjene u otopinu protutijela. Stakalca su inkubirana u primarnom protutijelu preko noći pri 4 °C.

Sljedeći dan stakalca su isprana tri puta u PBS-u te inkubirana u otopini sekundarnog protutijela konjugiranog s fluorokromom razrijeđenog (1:500 v/v) u otopini za blokiranje tijekom 1 h pri sobnoj temperaturi u tamnoj vlažnoj komori. Korištena su sekundarna protutijela iz magarca protiv IgG kunića obilježena AlexaFluor-488, miša obilježena AlexaFluor-594, koze obilježena AlexaFluor-647 i štakora obilježena AlexaFluor-488 (Invitrogen, SAD).

Sekundarna protutijela isprana su tri puta u PBS-u, dva puta u mQ-H₂O te uklopljena na predmetna stakalca (VWR, SAD) koristeći medij za uklapanje Fluoromount (Sigma-Aldrich, SAD). Imunocitokemijsko bojenje analizirano je na konfokalnom laserskom mikroskopu Leica SP8 X FLIM (Zavod za molekularnu biologiju, IRB).

4.6.1.3. Imunocitokemijska analiza primarnih neurona

Za imunocitokemijsku analizu neuronalnog retromernog transporta, neuroni su rasli na plastičnim pokrovnica smještenim u plastičnim pločama sa šest bunarića. Pri završetku pokusa, medij je uklonjen, stanice su odmah fiksirane u otopine 4% paraformaldehida u 4% otopini saharoze 15 min pri sobnoj temperaturi. Neuroni su isprani tri puta u PBS-u, inkubirani u 50 mM otopini NH₄Cl tijekom 10 min pri sobnoj temperaturi (engl. *quenching*; ovaj korak sprječava potencijalnu nespecifičnu pozadinsku fluorescenciju fiksativa) te permeabilizirani u 0,1% otopini Triton X-100 u PBS-u tijekom 3 min. Nakon permeabilizacije neuroni su isprani tri puta u PBS-u te blokirani u otopini za blokiranje i inkubirani u otopini primarnih i sekundarnih protutijela te filipina prema istom protokolu opisanom u 4.6.1.2. i 4.8.2.

4.6.1.4 Analiza funkcije lizosoma bojom LysoTracker

LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes, Thermo Fischer Scientific, SAD) je crvena boja koja se sastoji od fluorofora povezanog sa slabom bazom koja je djelomično protonirana u neutralnom pH zbog čega slobodno prolazi membrane živih stanica. Visoko je selektivna za kisele organele. Na stanice nasadene na stakalcima dodana je boja LysoTracker u konačnoj koncentraciji 200 nM te su stanice inkubirane pri 37 °C tijekom zadnjih 80 min pokusa. Nakon inkubacije, uklonjen je medij, stanice su tri puta isprane u PBS-u i fiksirane u otopini 4% paraformaldehida u 4% saharozi 15 min pri sobnoj temperaturi. Stanične jezgre obilježene su bojom Hoechst (konačne koncentracije 1 µg/mL, Thermo Fischer Scientific, SAD,) u PBS-u tijekom 10 min. Stanice su isprane tri puta u PBS-u i uklopljene na predmetna stakalca te promatrane na konfokalnom mikroskopu pri ekscitaciji 577 nm i emisiji 590 nm.

4.6.2. Imunohistokemijska analiza proteina mozga

4.6.2.1. Krioprotekcija i odabir rezova

Nakon izolacije mozga i razdvajanja polutki, lijeva polutka mozga je fiksirana u 4% paraformaldehidu (Sigma-Aldrich, SAD) u PBS-u tijekom 24 h. Za krioprotekciju, polutka je inkubirana u 15% saharozi pa u 30% saharozi (Alfa Aesar, SAD) u PBS-u. Nakon krioprotekcije polutka je zamrznuta u tekućem 2-metilbutanu (VWR, SAD) prethodno ohlađenom pri -80 °C, koristeći kalupe za zamrzavanje (Sigma-Aldrich, SAD) i matriks za uklapanje (Shandon M1-Embedding Matrix, Thermo Fischer Scientific, SAD). Uklopljene polutke pohranjene su pri -80 °C do rezanja na kriotomu.

Krioočuvani uzorci rezani su na kriotomu (Leica CM 3050S cryotome) za pripremu sagitalnih rezova debljine 10 µm. Rezovi su prikupljeni otprilike 0,24 mm lateralno od središta mozga na način da se skuplja 10 uzastopnih rezova i baca sljedećih 20 rezova. Tako su skupljeni rezovi kroz svih 12 razina (268) kroz cijeli neokorteks i hipokampus. Kriorezovi su zalijepljeni na predmetna stakalca (VWR, SAD) i pohranjeni pri -80 °C do imunohistokemijske analize.

4.6.2.2. Obilježavanje primarnim i sekundarnim protutijelima

Za analizu smještaja retromernih proteina u različitim regijama mozga, kriorezovi su odmah nakon odmrzavanja osušeni u laminaru tijekom 1 h. Tkivo na predmetnom stakalcu okruženo je hidrofobnim markerom Dako Pen (Agilent, SAD) te se daljnje obilježavanje protutijelima odvijalo u mračnoj i vlažnoj kutiji pri sobnoj temperaturi. Uzorci su permeabilizirani u TBST-

u (50 mM TBS, pH 8,0, 0,5% Triton X-100, Sigma Aldrich, SAD) tijekom 30 min. Blokiranje se odvijalo u 4% otopini magarećeg seruma tijekom 1 h. Uzorci su inkubirani u primarnom protutijelu razrijeđenom u otopini za blokiranje (prema Tablici 6.) preko noći. Sljedeći dan kriorezovi su isprani tri puta u TBST-u po 10 min i inkubirani 3 h u sekundarnom protutijelu razrijeđenom u otopini za blokiranje (1:200 v/v). Uzorci su tri puta isprani u TBST-u po 10 min. Stanične jezgre obilježene su bojom Hoechst (konačne koncentracije 0,6 μ M) u HBSS-u tijekom 30 min. Rezovi su ponovno isprani tri puta u TBST-u po 10 min te dva puta po minutu u mQ-H₂O s ciljem potpunog uklanjanja tragova soli iz pufera TBST, te osušeni u mraku u laminaru tijekom 1 h. Osušeni uzorci uklopljeni su u medij za uklapanje (Fluoromount, Sigma Aldrich), poklopljeni pokrovnicom (Paul Marienfeld GmbH, Njemačka) te analizirani na konfokalnom mikroskopu Leica SP8 X FLIM (Zavod za molekularnu biologiju, IRB).

4.7. Određivanje koncentracije peptida A β u staničnom mediju

Izlučeni peptidi A β 40 detektirani su u mediju pomoću komercijalno dostupnog kolorimetrijskog kompleta (Invitrogen, SAD) baziranog na metodi ELISA (od engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) prema uputama proizvođača. Komplet sadrži liofilizirani peptid A β 40 kao standard za određivanje standardne krivulje u rasponu koncentracija 0-500 pg/mL. Iz standardne krivulje izračuna se koncentracija peptida u uzorcima.

Stanice SHSY5Ywt nasadene su u plastične ploče sa šest bunarića, prolazno transfecirane s plazmidnom DNA koja sadrži sekvencu cDNA ljudskog gena *APP*₆₉₅, pomoću transfekcijskog reagensa Lipofectamine 3000 prema protokolu proizvođača. Nakon šest sati promijenjen je transfekcijski medij. Sljedeći dan stanice su tretirane inhibitorima za nakupljanje (DAPT, DAPT+TAPI) ili smanjenje (C3) CTF β /C99 prema protokolu opisanom u poglavlju 4.4.1. Nakon 24 h, medij je sakupljen, a stanice lizirane (prema protokolu opisanom u 4.5.1.1.).

Uzorci standarda i staničnog medija nanášeni su na pločicu s 96 bunarića koji su presvučeni monoklinalnim primarnim protutijelom specifičnim za N-terminalni kraj peptida A β . Na uzorke je zatim dodano poliklonalno zečje primarno protutijelo specifično za C-terminus peptida A β 40 te inkubirano 3 h pri sobnoj temperaturi uz stalno tresenje. Bunarići su dobro isprani četiri puta u puferu za ispiranje te je dodana otopina sekundarnog protuzečjeg protutijela konjugiranog s peroksidazom iz hrena. Nakon inkubacije 30 min pri sobnoj temperaturi, bunarići su isprani i dodana je otopina supstrata peroksidaze (tetrametilbenzidin). Rezultat reakcije peroksidazom je razvitak boje čiji je intenzitet proporcionalan količini peptida A β 40 u uzorku. Reakcija je zaustavljena nakon 30 min i apsorbancija je očitana pri 450 nm na spektrofotometru (Multiskan EX, ThermoLabsystems, SAD). Dobivena koncentracija peptida A β 40 u uzorku u pg/ml normalizirana je prema koncentraciji proteina u uzorku i prema razini APP-fl određenog metodom Western blot i kvantificiranog programom ImageJ (NIH, SAD).

4.8. Analiza razine i unutarstaničnog nakupljanja kolesterola u staničnim modelima

4.8.1. Mjerenje razine ukupnog kolesterola u staničnom lizatu

Za određivanje koncentracije ukupnog slobodnog kolesterola u stanicama korišten je komercijalno dostupan komplet Amplex Red Cholesterol Assay (Invitrogen, SAD) (246). Metoda se temelji na nekoliko enzimskih reakcija što omogućava detekciju slobodnog kolesterola, ali i estera kolesterola. U reakciji sudjeluje kolesterol esteraza koja hidrolizira estere kolesterola do slobodnog kolesterola. Slobodni kolesterol se zatim oksidira enzimom kolesterol oksidaza pri čemu se oslobađa H_2O_2 . Vodikov peroksid reagira stehiometrijski 1:1 s reagensom Amplex Red pomoću enzima peroksidaze pri čemu nastaje fluorescentni spoj resofurin koji se pobuđuje i čija emisija se očitava fluorimetrijski na fluorimetru (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific, SAD). Standardna krivulja definira se iz otopine liofiliziranog kolesterola (dostupan u kompletu) koji u rasponu koncentracija 0-10 $\mu\text{g/mL}$.

Za mjerenje razine ukupnog kolesterola u staničnom lizatu, stanice su nasadene u sterilne plastične ploče sa šest bunarića. Nakon završetka tretmana, lizirane su u puferu CoIP (engl. *CoImmunoPrecipitation buffer*; 50 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP40) s dodatkom koktela inhibitora proteaza (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka). Priprema staničnog lizata detaljno je opisana u poglavlju 4.5.1.1.

U crnoj pločici s 96 bunarića, 50 μL razrijeđenog staničnog lizata (ukupno 10 μg proteina) ili standarda kolesterola pomiješano je s 50 μL reakcijske smjese prema uputama proizvođača. Pločica se inkubirala 30 min pri 37 °C te su se vrijednosti očitale na fluorimetru (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific). Koncentracija ukupnog kolesterola u staničnom lizatu u $\mu\text{g/mL}$ izračuna se pomoću standardne krivulje. Količina kolesterola u staničnom lizatu definira se kao omjer koncentracije kolesterola i koncentracije proteina u pojedinom staničnom lizatu. Stoga je konačna količina kolesterola izražena kao μg kolesterola/mg proteina za pojedini uzorak.

4.8.2. Imunocitokemijska analiza nakupljanja slobodnog neesterificiranog kolesterola u stanicama

Nakupljeni slobodni neesterificirani kolesterol u stanici analiziran je bojenjem otopinom filipina, antibiotika izoliranoga iz aktinomiceta *Streptomyces filipiensis* (Sigma-Aldrich, SAD) (269). Filipin se veže na slobodni kolesterol i ima svojstvo fluorescencije. Obilježavanje filipinom (u finalnoj koncentraciji od 100 µg/mL) odvijalo se u stanicama paralelno s inkubacijom u otopini sekundarnog protutijela. Bojenje stanica filipinom analizirano je na konfokalnom mikroskopu pri ekscitaciji 360 nm i emisiji 465 nm.

4.9. Kvantitativna reakcija lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

Metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) praćena je utjecan nakupljanja ili smanjenja razine CTF-APP-a na ekspresiju gena uključenih u metabolizam kolesterola: njegovu sintezu (*SREBP1/2*, *HMGCR*), unos (*LDLR*, *LRP1*) i iznos iz stanice (*ABCA1*, *NPC1*) (270,271).

4.9.1. Izolacija mRNA i priprema cDNA

Stanice B103wt i B103-*hAPP*₆₉₅ su nasađene (50000 stanica u 500 mL medija za nasađivanje) u plastične ploče s 24 bunarića te tretirane kao što je opisano u poglavlju 4.4.1. Ukupna RNA pripremljena je iz netretiranih i tretiranih stanica u tri neovisna pokusa koristeći reagens Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputi proizvođača. Integritet RNA provjeren je horizontalnom elektroforezom. RNA je tretirana s 1 U/μg DNaseI bez RNaze (*engl.* RNase-free DNase I, Thermo Fisher Scientific, SAD) i reverzno prepisana (RT) u cDNA s nasumičnim heksamerima kao početnicama, koristeći komercijalno dostupan komplet High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, SAD) u uvjetima bez RNaze, pri 25 °C tijekom 10 min, 37 °C tijekom 2 h i pri 85 °C tijekom 5 min. cDNA pohranjena je pri -20 °C do daljnje analize.

4.9.2. Analiza ekspresije gena upotrebom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

Kvantitativna reakcija lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) pripremljena je pomoću komercijalno dostupnog kompleta TaqMan gene expression assay (Applied Biosystems, SAD) koristeći komercijalno dostupne probe Assays-on-Demand Gene Expression za određivanje ekspresije gena. Reakcije su se odvijale u ukupnom volumenu od 20 μL korištenjem 10 μL reagensa TaqMan[®] Gene Expression Master Mix reagent (Applied Biosystems, SAD), 2 μl (50 ng) cDNA kao kalupa, 1 μl odgovarajućih početnica (Tablica 7.), te qH₂O do konačnog volumena. Reakcija se odvijala prema uputama proizvođača u uređaju ABI prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, SAD) pri 50 °C tijekom 2 min, 95 °C tijekom 10 min, te 40 ciklusa pri 95 °C po 15 s, i pri 60 °C po 1 min. Relativna razina ekspresije gena izračunata je korištenjem $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metode u odnosu na kontrolni uzorak (100%).

Tablica 7. Početnice korištene za kvantitativnu reakciju lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR).

Gen	ID (TaqMan[®])	Veličina produkta (pb)
<i>β-actin</i>	Hs99999903_m1	171
<i>ABCA1</i>	Hs01059118_m1	61
<i>HMGCR</i>	Hs00168352_m1	67
<i>LDLR</i>	Hs00181192_m1	61
<i>LRPI</i>	Hs00233856_m1	64
<i>NPCI</i>	Hs00264835_m1	88
<i>SREBF1</i>	Hs01088691_m1	90

4.10. Kvantifikacija i statistička obrada podataka

Rezultati dobiveni imunocitokemijom i Western blot-om uređeni su u računalnom programu Photoshop CS2 (verzija 9.0.; Adobe, SAD). Obilježene proteinske vrpce dobivene Western blot-om kvantificirane su u računalnom programu ImageJ (NIH, SAD).

Za statističku obradu podataka korišten je statistički paket SPSS (v17 za Windows, IBM, SAD). Prije početka obrade, Shapiro-Wilk testom je provjereno jesu li podaci normalno distribuirani. Ako podaci nisu normalno distribuirani, provedena je odgovarajuća transformacija podataka te su daljnje analize napravljene koristeći transformirane podatke. Ako podaci nisu bili normalno distribuirani niti nakon transformacije, korišten je neparametrijski Kruskal-Wallis H-test koristeći Dunnovu proceduru s Bonferronijevom korekcijom za višestruke usporedbe.

Za obradu podataka koji prate normalnu distribuciju, korišteni su parametrijski testovi za razlike između grupa: za određivanje interakcije učinaka između dvije nezavisne varijable na zavisnu varijablu korištena je dvosmjerna ANOVA (uključujući i test homogenosti varijanci za provjeru jednakosti varijanci između grupa za zavisnu varijablu), te analize jednostavnih glavnih učinaka svake nezavisne varijable na zavisnu varijablu. Ako su jednostavni glavni učinci na zavisnu varijablu bili statistički značajni, post-hoc analizom je ustanovljeno gdje postoje razlike između grupa. Za određivanje statistički značajnih razlika između srednjih vrijednosti triju ili više grupa, korištena je jednosmjerna ANOVA s odgovarajućim post-hoc analizama. Studentov *t*-test za nezavisne uzorke korišten je za utvrđivanje razlika između srednjih vrijednosti dviju nezavisnih grupa na zavisnu varijablu. Statistička značajnost testova postavljena je na $p < 0,05$.

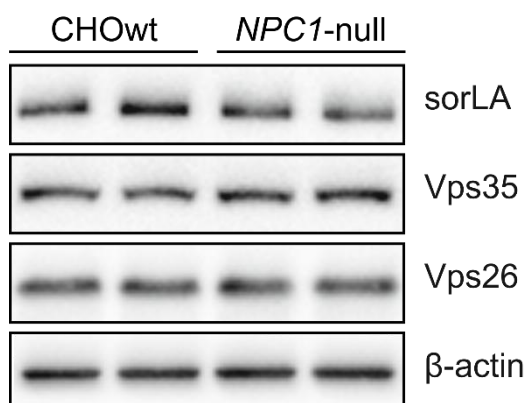
5. REZULTATI

5.1. Razina i smještaj proteina retromernog kompleksa u staničnom modelu bolesti NPC

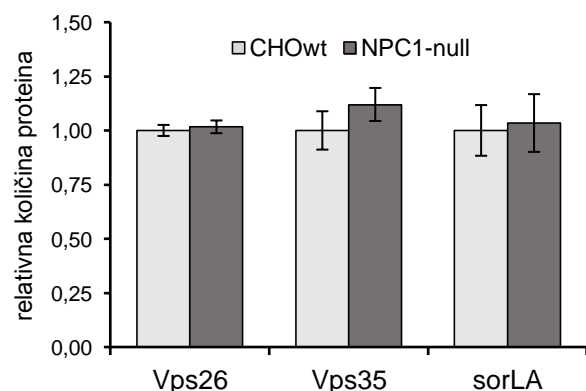
U ovom doktorskom radu praćena je razina i smještaj retromernog kompleksa u staničnim i mišjim modelima bolesti Niemann-Pick tipa C (NPC). U stanicama jajnika kineskog hrčka (CHO, od engl. *Chinese hamster ovary cells*) kojima je deletiran gen *NPC1* (CHO *NPC1*-null, u daljnjem tekstu stanice *NPC1*-null) analizirana je funkcija retromernog kompleksa i uspoređena sa stanicama divljeg tipa (CHOwt). Metodom Western blot praćena je razina proteina retromera Vps26 (od engl. *Vacuolar protein sorting 26*) i Vps35 (od engl. *Vacuolar protein sorting 35*) te retromernog receptora sorLA (od engl. *Sorting protein-related receptor containing low density lipoprotein receptor class-A repeats*). U stanicama *NPC1*-null nije uočena promjena u razini proteina Vps26, Vps35 i sorLA u usporedbi s kontrolnim stanicama CHOwt (Slika 6.A i 6.B).

Unutarstanični smještaj retromernih proteina Vps26 i Vps35 analiziran je imunocitokemijom i konfokalnim laserskim mikroskopom, a usporedno je analizirano i bojenje filipinom, antibiotikom koji veže slobodni neesterificirani kolesterol. Bojenje filipinom pokazalo je karakteristično nakupljanje kolesterola u povećanim kasnim endosomima i lizosomima stanica *NPC1*-null. Iako su u stanicama CHOwt i *NPC1*-null proteini Vps26 i Vps35 potpuno kolokalizirali, uočena je jasna razlika u veličini i smještaju Vps26/Vps35-pozitivnih vezikula. Međutim, u stanicama CHOwt Vps26/Vps35-pozitivne vezikule bile su jednoliko raspršene u citoplazmi, a u stanicama *NPC1*-null su bile izrazito povećane, u velikim nakupinama i smještene većinom na periferiji (Slika 6.C). Imunocitokemijom nije bilo moguće pratiti smještaj retromernog receptora sorLA zbog nepostojanja specifičnog primarnog protutijela za stanice CHO.

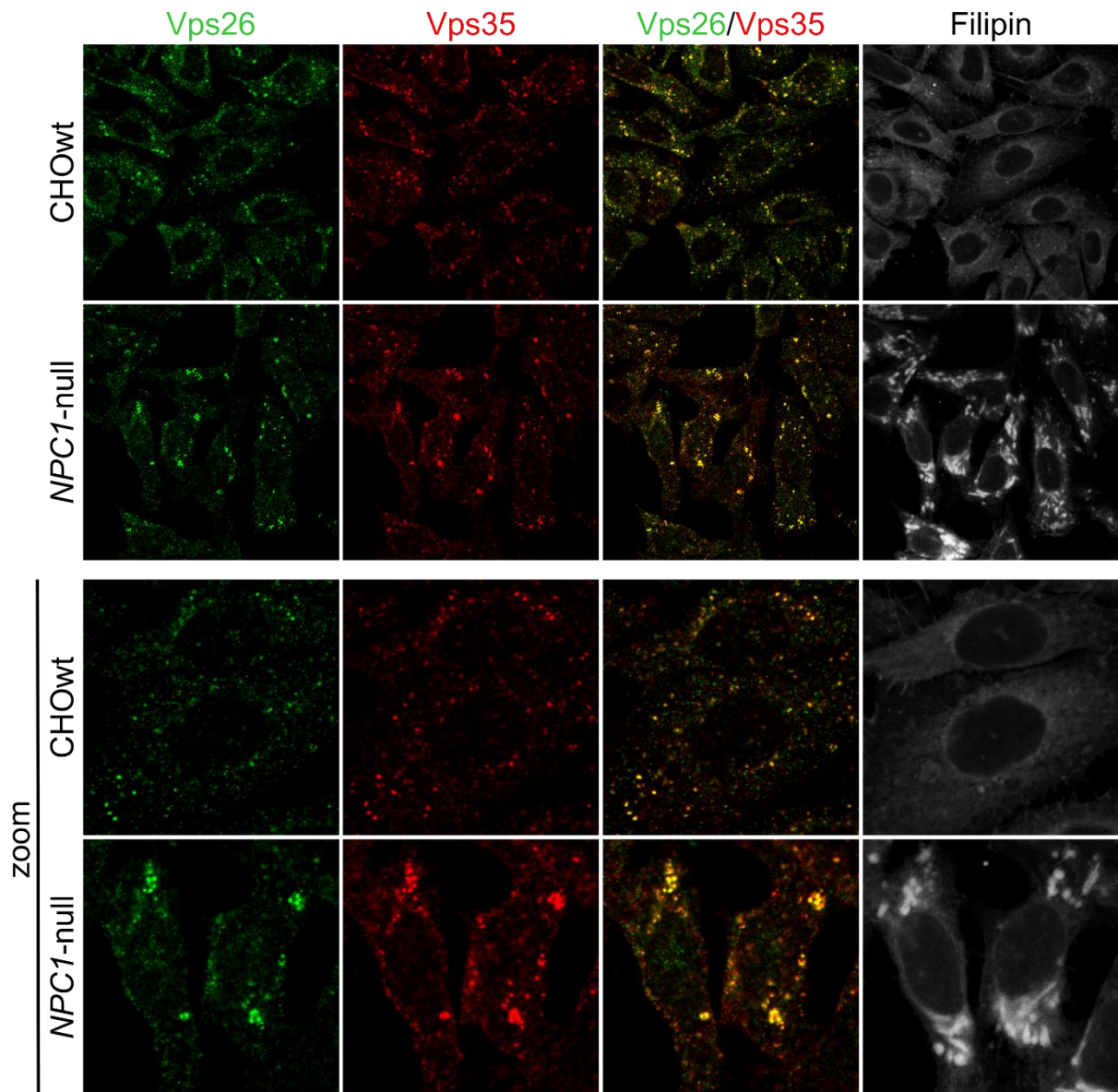
A)



B)



C)



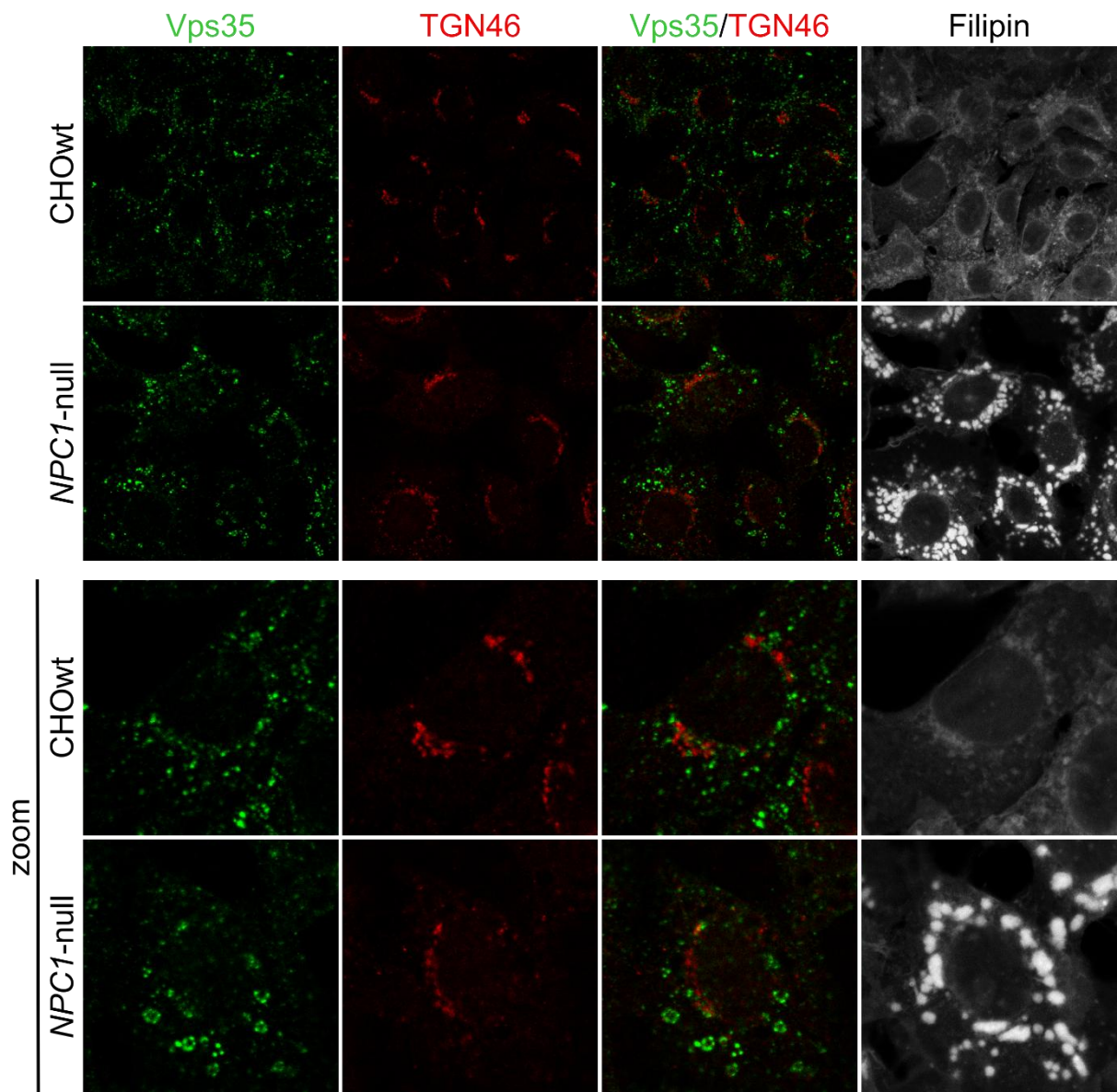
Slika 6. U staničnom modelu bolesti NPC (*NPC1*-null) retromerni proteini Vps26 i Vps35 smješteni su u velikim nakupinama. A) Razina retromernih proteina Vps26 i Vps35 te retromernog receptora sorLA analizirana je metodom Western blot koristeći specifična protutijela. B) Rezultati dobiveni metodom Western blot u tri neovisna pokusa u duplikatima analizirani su software-om ImageJ i normalizirani prema količini proteina β -actina. Dobivene vrijednosti analizirane su studentovim *t*-test-om i nije uočena statistički značajna razlika. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD. C) Za imunocitokemijsku analizu smještaja retromernog kompleksa stanice su fiksirane, te specifično obilježene s dva različita protutijela za proteine retromernog kompleksa (Vps26 i Vps35). Nakupljanje kolesterola u stanicama *NPC1*-null praćeno je bojenjem filipinom. Stanice su analizirane konfokalnim laserskim mikroskopom.

Nakon uočene promijenjene morfologije smještaja proteina retromera u *NPCI*-null stanicama, dodatno je analiziran njihov unutarstanični smještaj prateći kolokolizaciju s biljezima staničnih organela. S obzirom na prethodno opisanu potpunu kolokolizaciju retromernih proteina Vps26 i Vps35, za daljnju imunocitokemijsku analizu korišten je samo Vps35. Kolokolizacija retromernog proteina Vps35 s biljezima trans-Golgijske mrežice (TGN46, od engl. *trans-Golgi network protein 2*, 46 kD isoform, Slika 7.A), ranih endosoma (biljeg EEA1, od engl. *early endosome antigen 1*, Slika 7.B), reciklirajućih endosoma (receptor transferina TfR, od engl. *transferrin receptor*, Slika 7.C.), kasnih endosoma (Rab7, Slika 7.D) i lizosoma (Lamp1, od engl. *lysosomal associated membrane protein 1*, Slika 7.E), praćena je u stanicama CHOwt i *NPCI*-null. Na slikama 7.F. i 7.G prikazani su rezultati razine proteinskih biljega metodom Western blot.

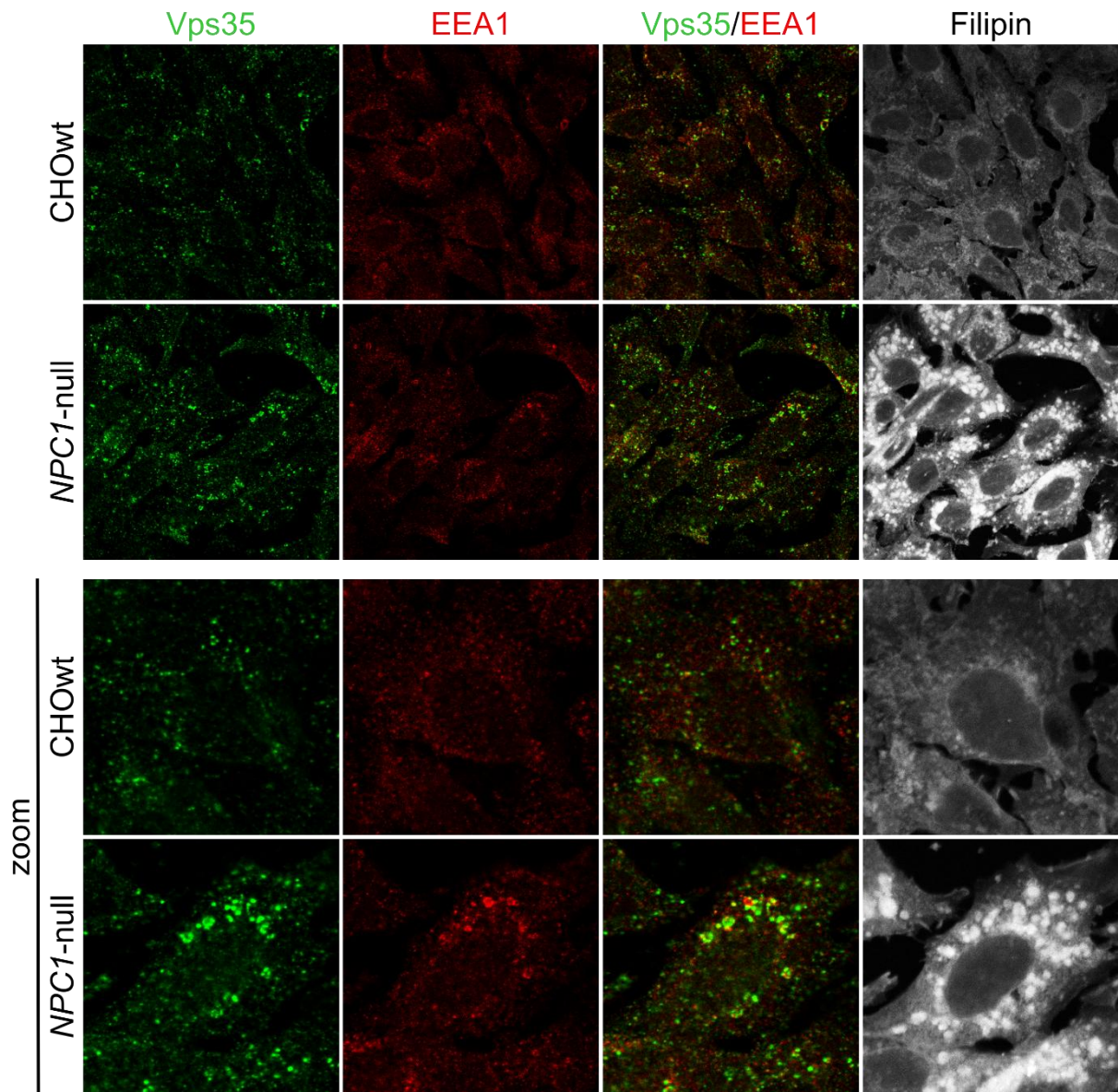
Analizom biljega staničnih organela primijećena je karakteristična disfunkcija endosomalno-lizosomalnog puta u stanicama *NPCI*-null čija su glavna obilježja nakupljanje povećanih ranih (Slika 7.B), reciklirajućih (Slika 7.C) i kasnih (Slika 7.D) endosoma te lizosoma (Slika 7.E) kao i nakupljanje kolesterola (obojenog filipinom, Slika 7.A-E) u povećanim kasnim endosomima i lizosomima. Nasuprot tome, u kontrolnim stanicama CHOwt organeli endosomalno-lizosomalnog puta nalazili su se homogeno raspršeni po staničnom citosolu, bez jasnih nakupina, a bojenje filipinom bilo je izrazito slabog signala. U stanicama CHOwt retromerni protein Vps35 je pokazao tek djelomičnu kolokolizaciju s biljegom ranih endosoma EEA1 što je u skladu sa smještajem i funkcijom retromera. U stanicama *NPCI*-null protein Vps35 je pokazao jasno nakupljanje unutar disfunkcionalnog endosomalno-lizosomalnog puta, pritom je Vps35 u potpunosti kolokolizirao s vezikulama pozitivnima na biljege EEA1 i TfR, odnosno sve vezikule pozitivne na EEA1 ili TfR su bile pozitivne i na Vps35. Uočena je i djelomična kolokolizacija Vps35 s povećanim Rab7-pozitivnim vezikulama, dok je smještaj Vps35-pozitivnih vezikula većinom bio izvan područja smještaja povećanih LAMP1-pozitivnih lizosoma. Protein Vps35 nije kolokolizirao s biljegom Golgijskog aparata (TGN46) u stanicama CHOwt niti u *NPCI*-null.

S obzirom na promijenjenu morfologiju ispitanih biljega staničnih organela te povećanu lokalizaciju proteina Vps35 unutar endosomalno-lizosomalnog puta, analizirana je proteinska razina biljega EEA1, TfR i LAMP1 (Slike 7.F i 7.G). Rezultati dobiveni metodom Western blot potvrdili su da do povećane kolokolizacije Vps35 unutar endosomalno-lizosomalnog puta nije došlo zbog povećane proteinske razine biljega organela endosomalno-lizosomalnog puta EEA1, TfR i LAMP1 (Slike 7.F i 7.G). Biljezi Rab7 i TGN46 nisu analizirani jer se ova specifična primarna protutijela ne mogu koristiti za metodu Western blot.

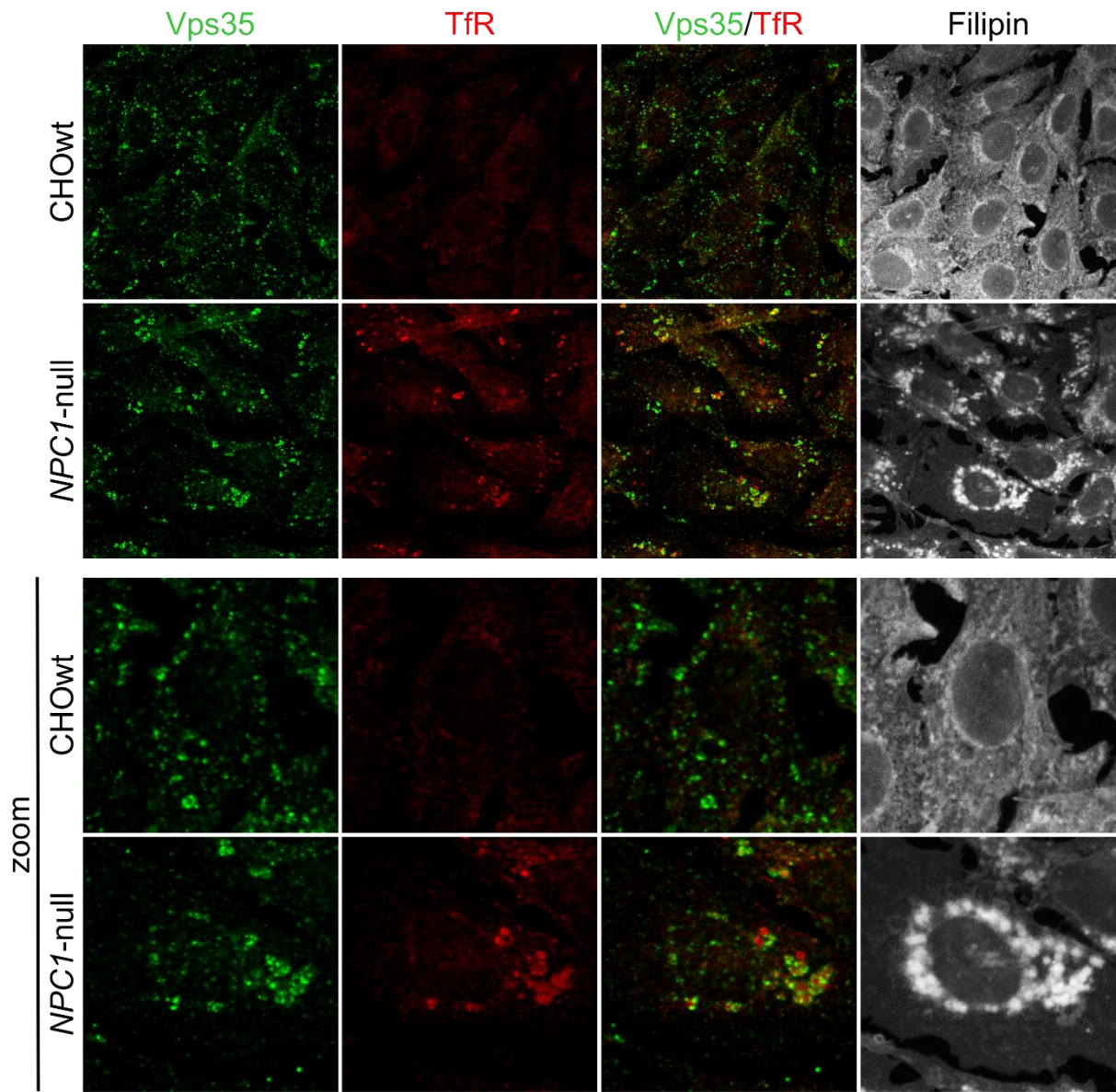
A)



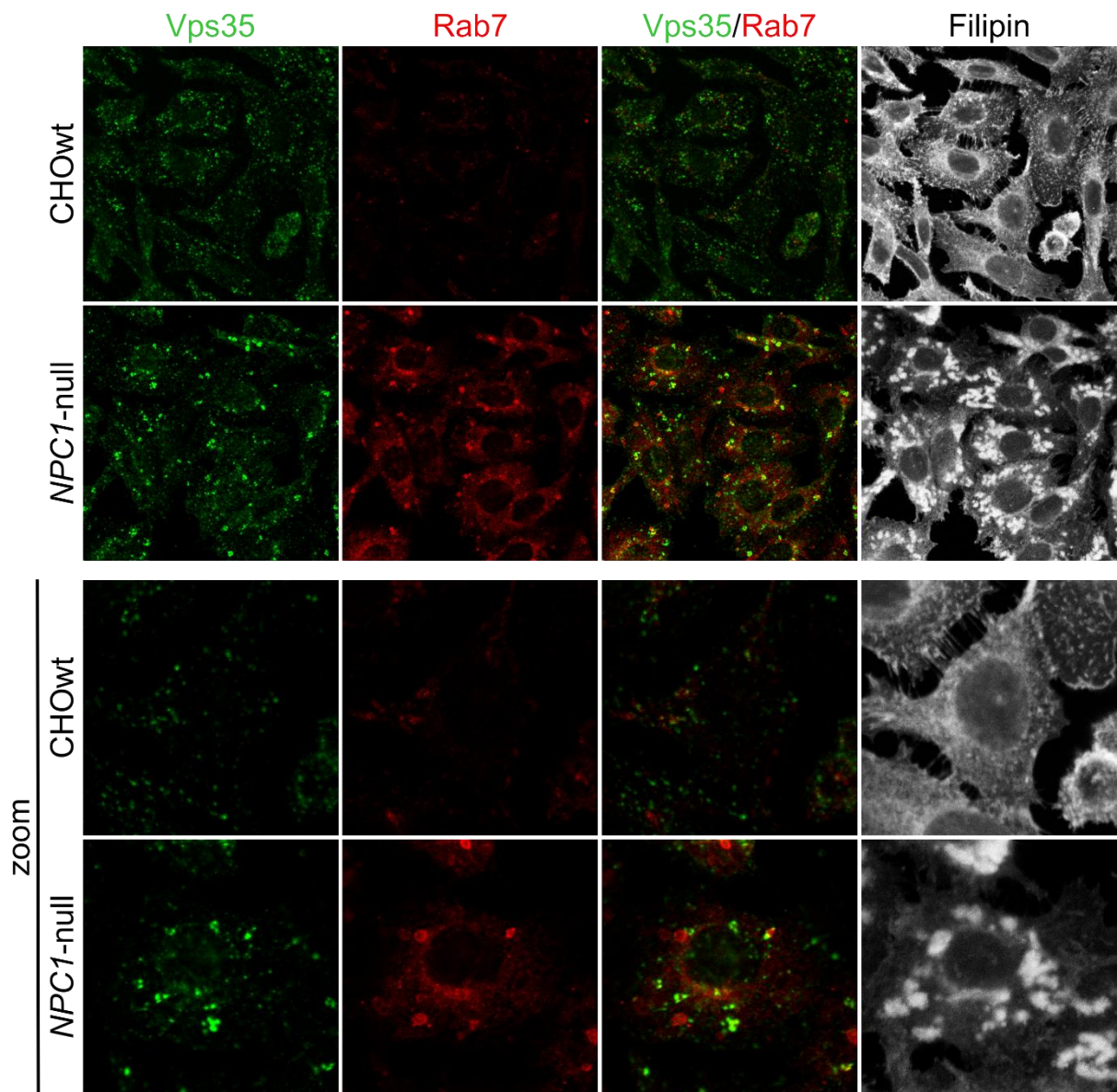
B)



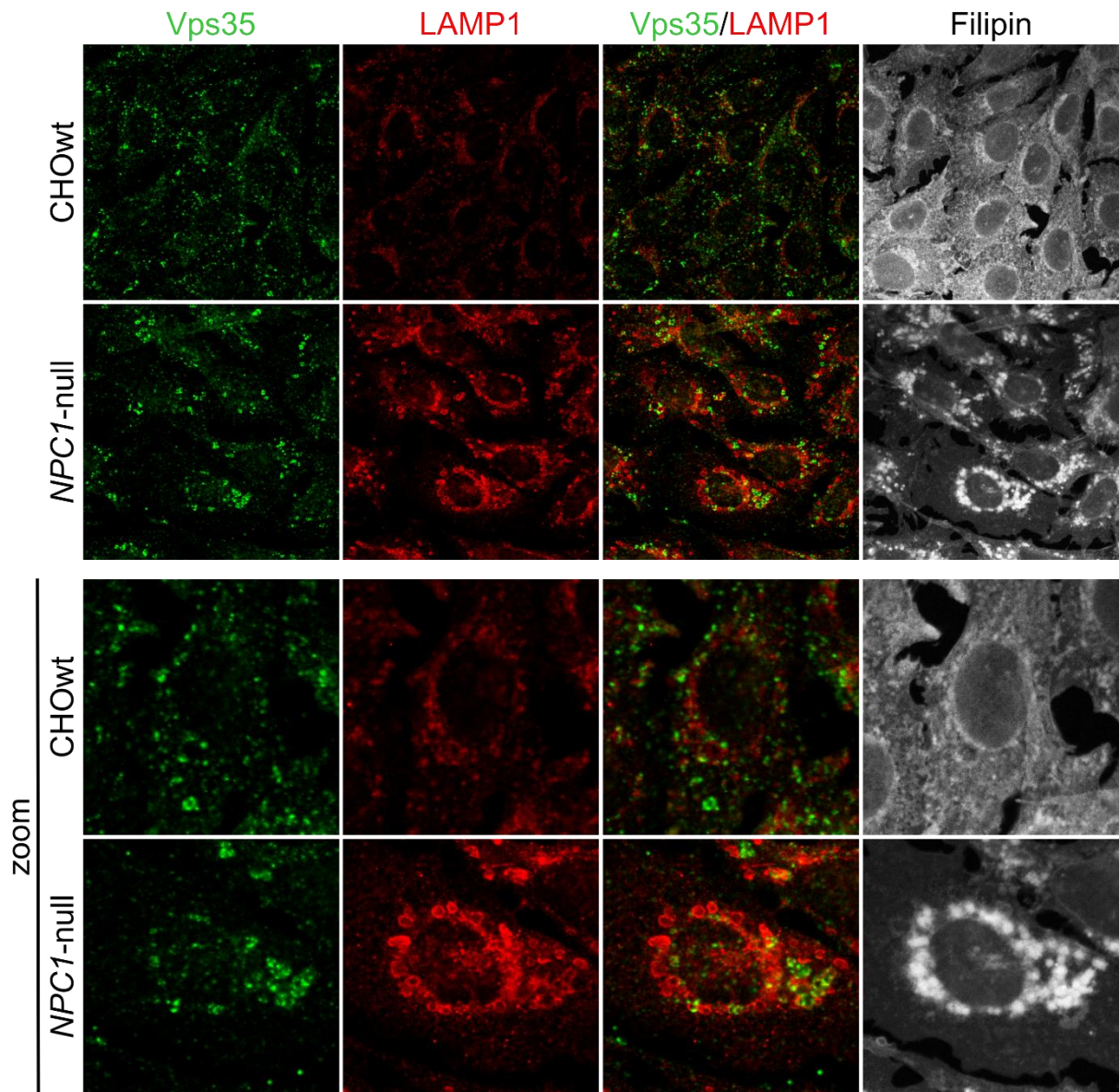
C)

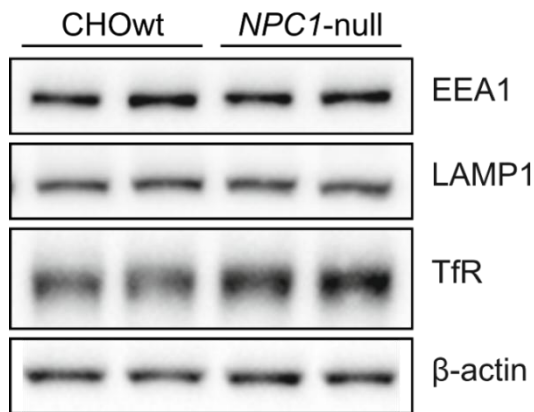
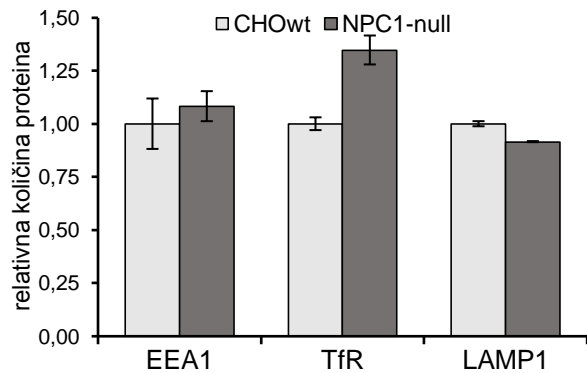


D)



E)

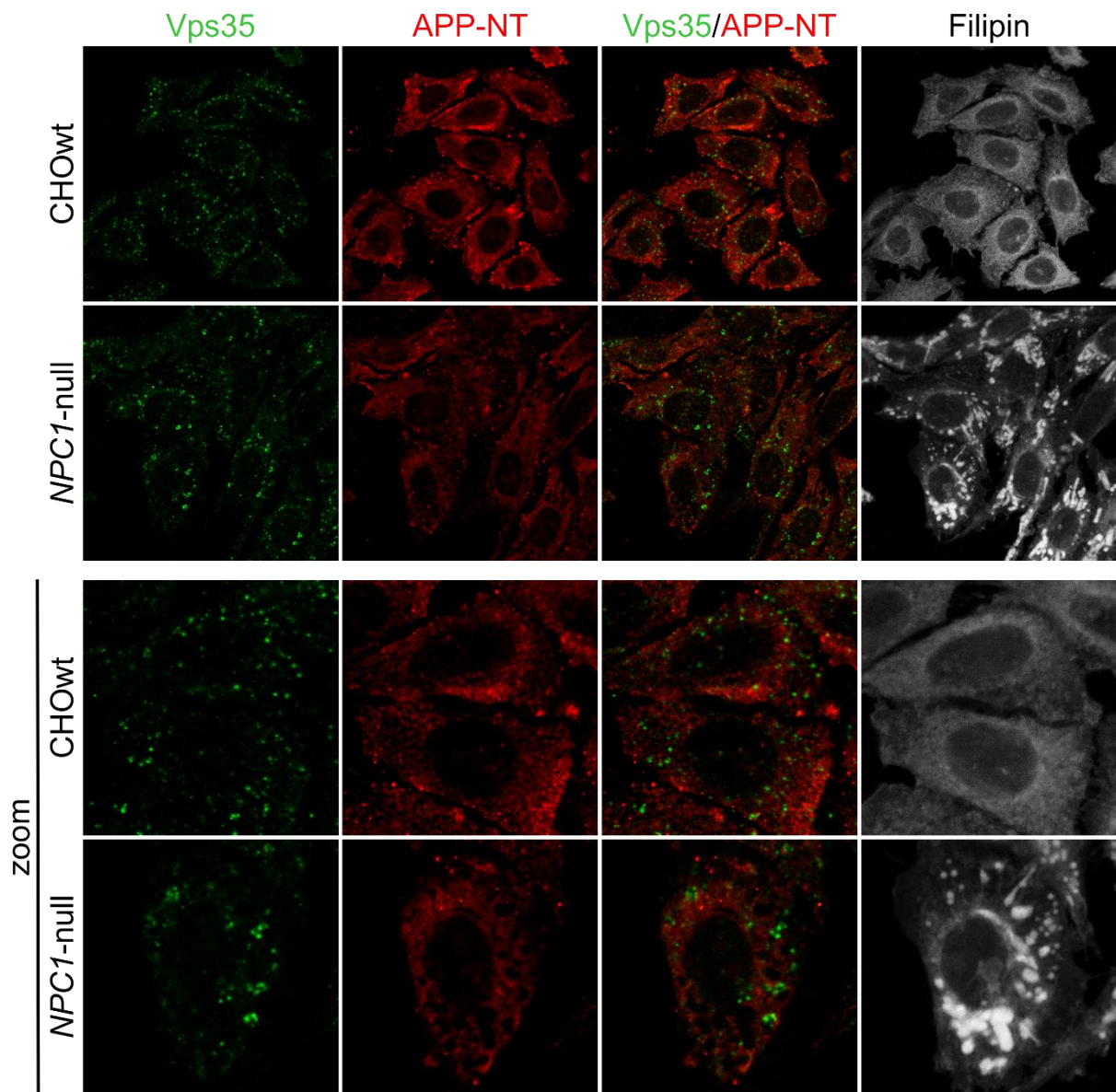


F)**G)**

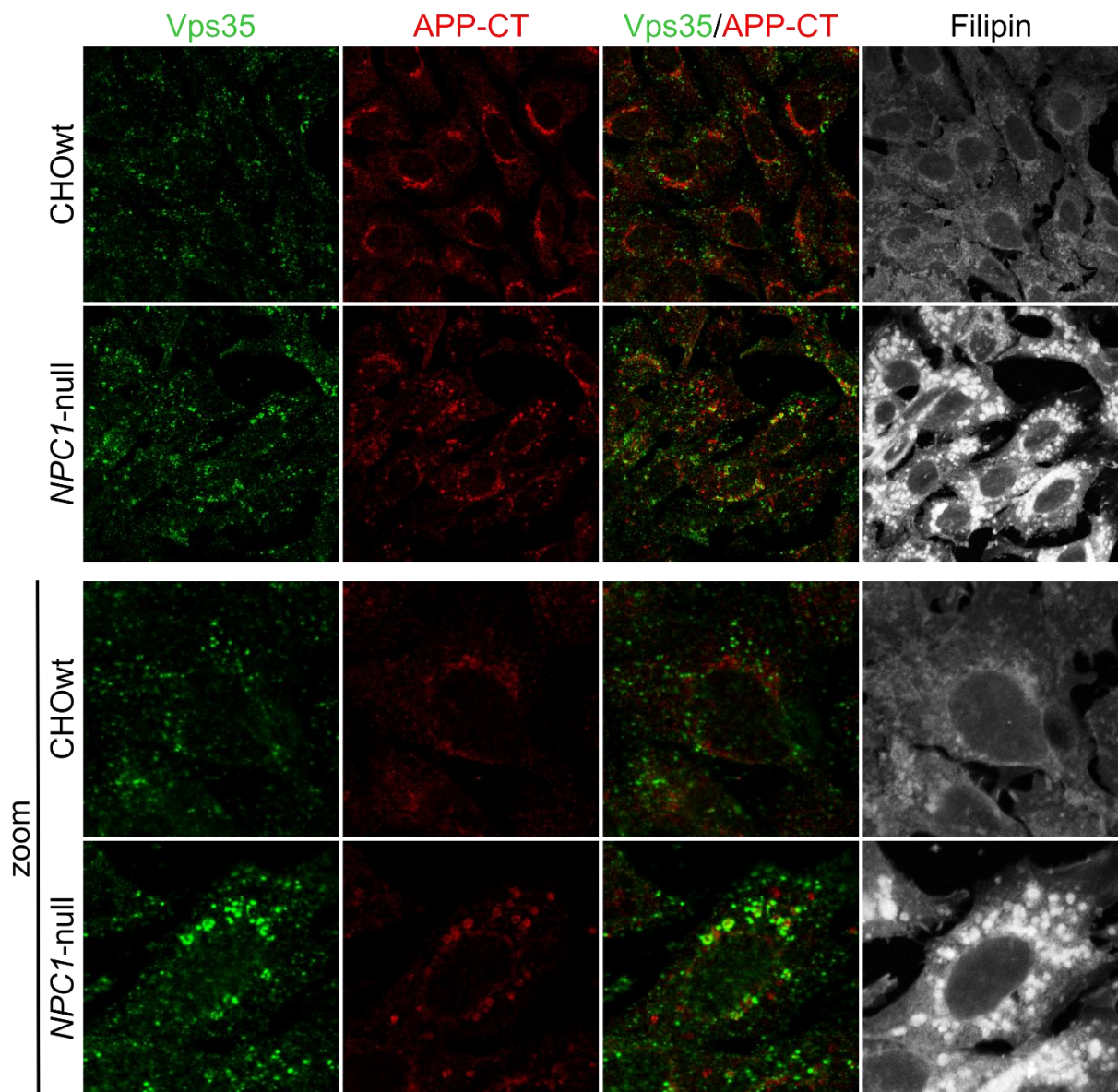
Slika 7. U stanicama *NPC1*-null retromerni kompleks nakuplja se u povećanim endosomima. Za imunocitokemijsku analizu unutarstaničnoga smještaja retromernog kompleksa stanice CHOwt i *NPC1*-null su fiksirane, te specifično obilježene protutijelom za retromerni protein Vps35 i protutijelima za biljege staničnih organela: A) protutijelo TGN46 kao biljeg trans-Golgijeve mrežice, B) protutijelo EEA1 kao biljeg ranih endosoma C) protutijelo za TfR (receptor transferina) kao biljeg reciklirajućih endosoma, D) protutijelo Rab7 kao biljeg kasnih endosoma i E) LAMP1 kao biljeg lizosoma. Bojenjem filipinom praćeno je nakupljanje slobodnog neesterificiranog kolesterola. Stanice su analizirane konfokalnim laserskim mikroskopom. F) Razine proteina EEA1, LAMP1 i TfR u stanicama CHOwt i *NPC1*-null analizirane su metodom Western blot. G) Rezultati dobiveni metodom Western blot u tri neovisna pokusa u duplikatima analizirani su software-om ImageJ i normalizirani prema količini proteina β -actina. Dobivene vrijednosti analizirane su studentovim *t*-test-om i nije uočena statistički značajna razlika. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD.

S obzirom da je retromer uključen u unutarstanični prijenos proteina prekursora amiloida β (od engl. *Amyloid Precursor Protein*, APP), analiziran je njegov smještaj u odnosu na Vps35. Stanice su obilježene protutijelima za N-terminalni (Slika 8.A) i C-terminalni kraj APP (Slika 8.b). Korišteno N-terminalno protutijelo prepoznaje epitope na cjelovitom APP (od engl. *Full length amyloid precursor protein*, fl-APP) kao i na topljivim N-terminalnim odsječcima APP-a (engl. *soluble APP*, sAPP), a C-terminalno protutijelo uz epitope na cjelovitom proteinu, prepoznaje i epitope na C-terminalnim odsječcima APP-a (od engl. *C-terminal fragment of amyloid precursor protein*, CTF-APP). Rezultati obilježavanja N-terminalnim protutijelom (APP-NT, Slika 8.A) pokazali su da je u stanicama CHOwt APP bio smješten raspršeno po citoplazmi uz izraženiji točkasti vezikularni signal na periferiji stanice te da nije bilo kolokalizacije s Vps35. U stanicama NPC1-null signal je bio nehomogen po citosolu, uz dijelove bez signala, najvjerojatnije ukazujući na vezikule u kojima se nakuplja kolesterol, a u kojima APP nije smješten. Naime, u dijelovima bez signala za APP-NT bio je najintenzivniji signal filipina, odnosno nakupljanja slobodnog kolesterola. Osim toga, nije uočena kolokalizacija između APP-NT i Vps35 niti u NPC1-null stanicama. Suprotno, rezultat obilježavanja C-terminalnim protutijelom (APP+CTF, APP-CT, Slika 8.B) za APP dao je drugačije rezultate, odnosno, uočena je djelomična kolokalizacija Vps35 i CTF-APP odsječaka u NPC1-null u odnosu na stanice CHOwt. Za razliku od stanica NPC1-null u kojima se signal za APP-CT nalazio većim dijelom periferno u membranama povećanih vezikula, stanice CHOwt su pokazale perinuklearni signal za APP-CT nalik biljevu Golgijeva aparata te nije postojala kolokalizacija između APP-CT i Vps35. Ovi rezultati ukazali su da se u stanicama NPC1-null koje nakupljaju kolesterol u odnosu na stanice divljeg tipa CHOwt, kompleks retromera i APP-CT nakupljaju u organelima endosomalno-lizosomalnog puta, prvenstveno u vezikulama pozitivnim na biljege ranih i reciklirajućih endosoma.

A)



B)



Slika 8. U stanicama *NPC1*-null kolokalizacija između proteina retromernog kompleksa i APP-a je **povećana**. Za imunocitokemijsku analizu stanice CHOwt i *NPC1*-null su fiksirane, te specifično obilježene protutijelom za retromerni protein Vps35 i A) N-terminalni odsječak proteina APP (APP-NT) i B) C-terminalni odsječak proteina APP (APP-CT, C-terminalni odsječak proteina APP, protutijelo Y188). Bojenjem filipinom praćeno je nakupljanje slobodnog kolesterola. Stanice su nakon imunocitokemijskog bojenja analizirane konfokalnim laserskim mikroskopom.

5.2. Utjecaj modulacije kolesterola na funkciju retromera u staničnom modelu bolesti Niemann-Pick tipa C

S obzirom na uočeni poremećeni unutarstanični smještaj retromernih proteina Vps26 i Vps35 u stanicama koje nemaju protein *NPCI* (*NPCI*-null) cilj je bio analizirati utjecaj kolesterola na razinu i smještaj retromernih proteina. U tu svrhu primijenjena su dva pristupa. Prvi pristup bio je snižavanje razine kolesterola u stanicama *NPCI*-null koje nakupljaju kolesterol u kasnim endosomima i lizosomima. Drugi pristup bio je povećanje razine kolesterola u kontrolnim stanicama divljeg tipa CHOwt. Svi tretmani za modulaciju razine kolesterola detaljno su opisani u poglavlju 4.3. Učinkovitost korištenih tretmana za snižavanje i povećanje razine kolesterola kao i utjecaj modulacije kolesterola na glavna obilježja stanica *NPCI*-null praćeni su pomoću nekoliko metoda. Razina ukupnog i slobodnog kolesterola analizirana je u staničnom lizatu komercijalno dostupnim kompletom „Amplex Red Cholesterol Assay“ (opisanoj u poglavlju 4.8.1.), a nakupljanje kolesterola imunocitokemijski bojenjem slobodnog neesterificiranog kolesterola filipinom (Slika 9.B) te praćenjem lizosomalne funkcije fluoroforom obilježenom probom LysoTracker (Slika 9.C, metoda je opisana u poglavlju 4.6.1.).

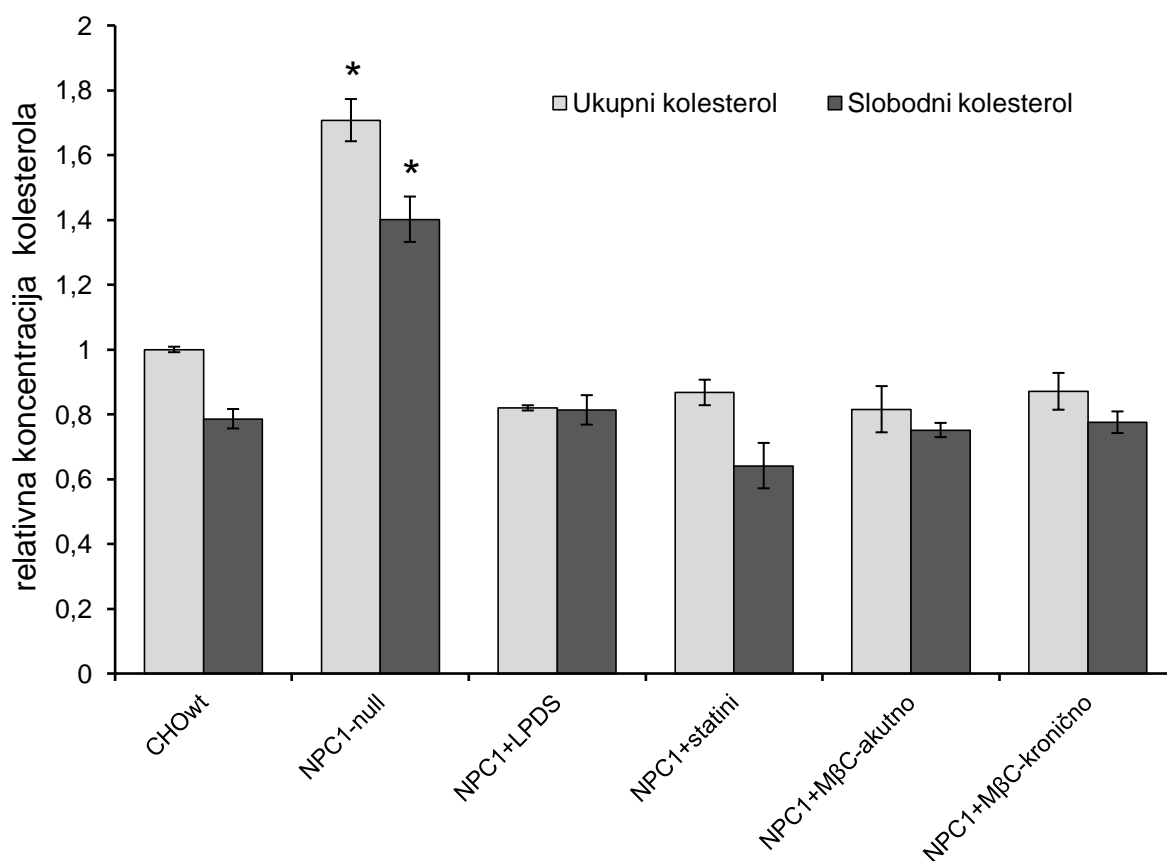
5.2.1. Utjecaj snižavanja razine kolesterola na smještaj proteina retromernog kompleksa u stanicama *NPCI*-null

Za praćenje utjecaja snižavanje kolesterola u stanicama *NPCI*-null ispitana su četiri tretmana (detaljno opisana u 4.3.1.). Tretmani su uključivali uzgoj stanica u mediju sa serumom bez egzogenih lipida LPDS (engl. *Lipid Deficient Serum*), u mediju sa serumom LPDS uz dodatak statina lovastatina (uz dodatak mevalonata) koji inhibira endogenu sintezu kolesterola ili u mediju sa serumom LPDS uz dodatak spoja metil- β ciklodekstrina (od engl. *methyl- β cyclodextrin*, M β C) koji „izvlači“ kolesterol iz membrana i to u akutnim (1 h) ili kroničnim uvjetima (24 h).

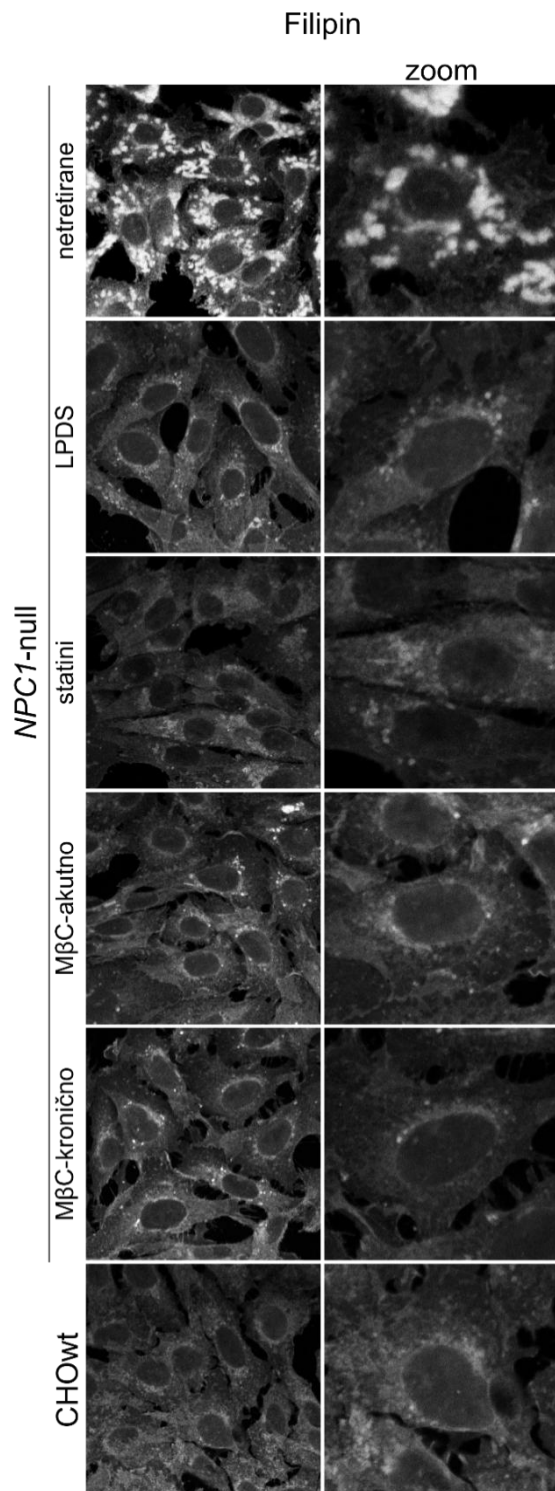
Analizom dobivenih vrijednosti razine ukupnog i slobodnog kolesterola u stanicama CHOwt i *NPCI*-null nakon tretmana za smanjenje razina kolesterola, varijance nisu bile jednake (Leven's test $p < 0,001$), stoga je primijenjena analiza Welch's ANOVA. Post hoc testom Games-Howell uspoređene su razlike srednjih vrijednosti ukupnog i slobodnog kolesterola u kontrolnim i tretiranim stanicama. Stanice *NPCI*-null imale su oko 80% veću razinu ukupnog i slobodnog kolesterola od kontrolnih stanica CHOwt. Sva četiri tretmana za snižavanje

kolesterola u stanicama *NPC1*-null značajno su smanjila razinu ukupnog i slobodnog kolesterola u stanicama *NPC1*-null na razinu sličnu ili nižu u usporedbi sa stanicama CHOwt (Slika 9.A). Bojenje filipinom pokazalo je smanjenje nakupljanja slobodnog kolesterola u tretiranim stanicama *NPC1*-null jer je došlo do gubitka karakterističnog „grudastog“ bojenja, odnosno smanjenja nakupljanja kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima (Slika 9.B). Fluoroforom obilježena proba LysoTracker, koja obilježava organele kiselog pH, potvrdila je nakupljanje povećanih lizosoma u netretiranim stanicama *NPC1*-null u odnosu na CHOwt. Nakon smanjenja razine kolesterola uslijed svih tretmana došlo je do smanjenja signala na razinu kao u stanicama CHOwt (Slika 9.C).

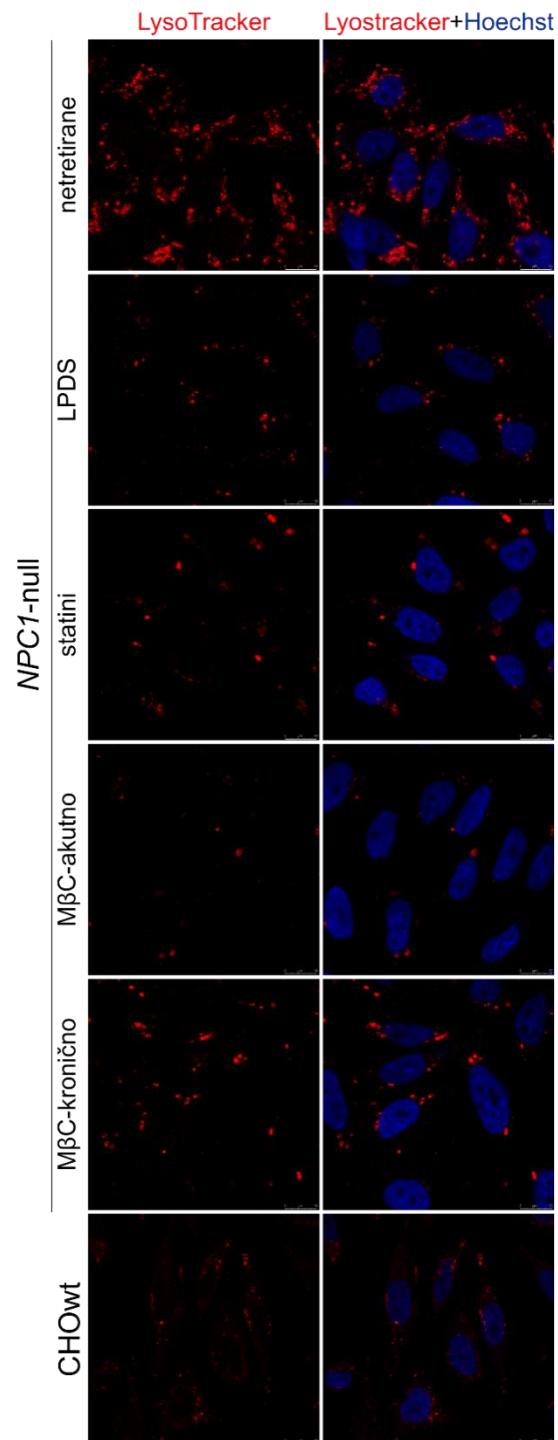
A)



B)



C)

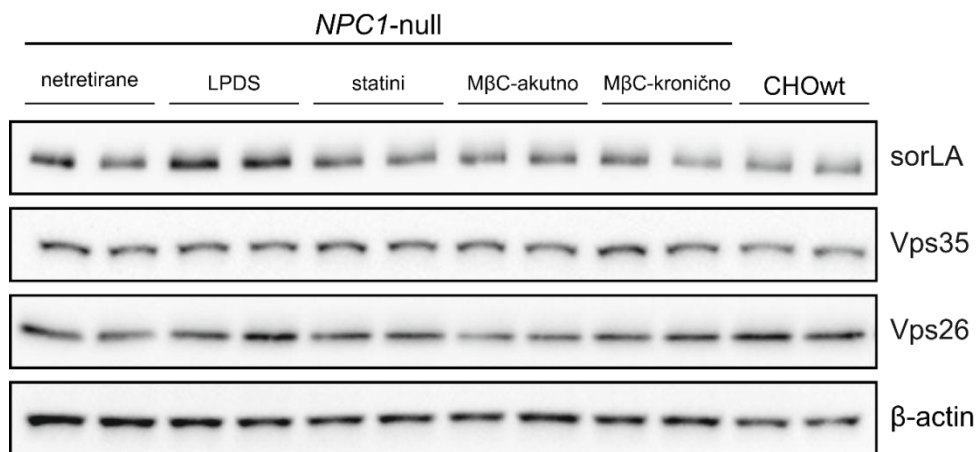


Slika 9. Snižavanje razine kolesterola u stanicama NPC1-null smanjuje nakupljanje kolesterola u lizosomima. Nakupljanje kolesterola u stanicama NPC1-null smanjeno je uzgojem stanica u mediju sa: serumom bez egzogenih lipida (tretman „LPDS“), statinom lovastatinom („statini“), spojem metil-β ciklodekstrinom (MβC) tijekom 1 h („MβC-akutno“) ili 24 h („MβC-kronično“). A) Koncentracija ukupnog i slobodnog kolesterola nakon tretmana izmjerena je u staničnom lizatu komercijalno

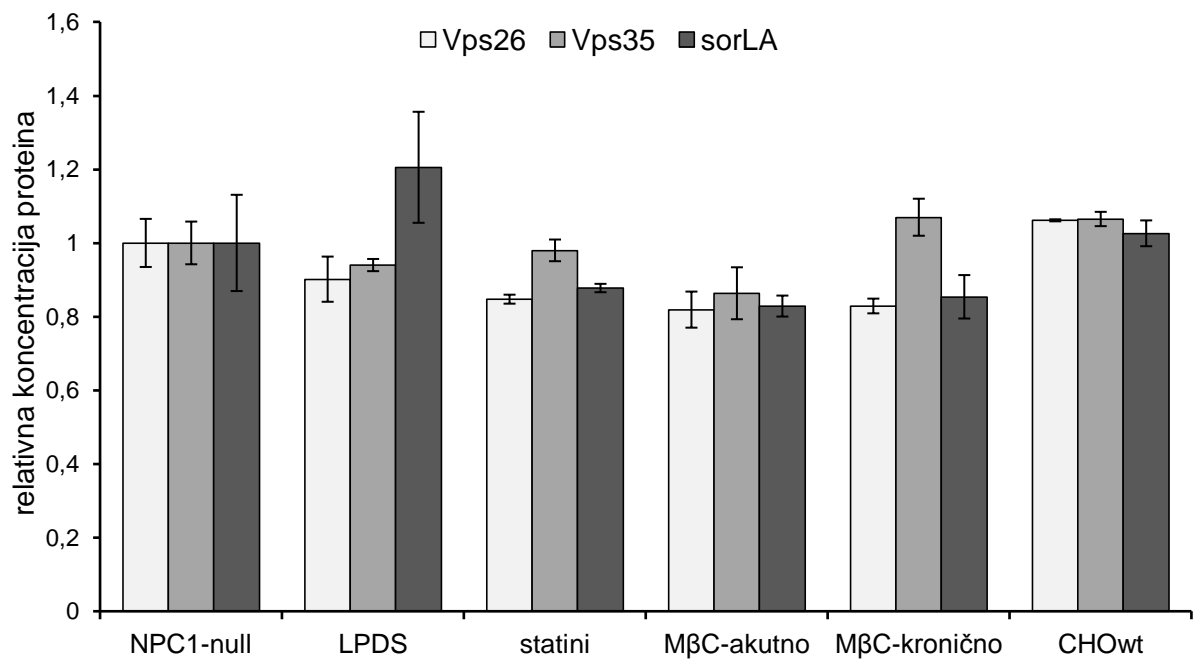
dostupnim kompletom Amplex Red Cholesterol Assay te izražena kao omjer koncentracije kolesterola i ukupnih proteina u staničnom lizatu. Ukupno je relativna koncentracija kolesterola izražena kao omjer prema kontrolnim stanicama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD. Dobivene vrijednosti analizirane su testom ANOVA. Stanice *NPCI*-null imale su značajno veću razinu ukupnog i slobodnog kolesterola ($p < 0,05$). B) Bojenjem filipinom analizirano je nakupljanje slobodnog neesterificiranog kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima. C) Funkcija lizosoma u stanicama nakon snižavanja razine kolesterola analizirana je bojenjem živih stanica fluoroforom obilježenom probom LysoTracker. Nakon toga, stanice su fiksirane, jezgre su obilježene bojom Hoechst i stanice su analizirane konfokalnim laserskim mikroskopom.

Metodom Western blot analizirane su razine retromernih proteina Vps26, Vps35 te retromernog receptora sorLA (Slika 10.A i B) i proteina endosomalno-lizosomalnog puta – EEA1 (biljeg ranih endosoma), TfR (receptor transferina, biljeg reciklirajućih endosoma), LAMP1 (biljeg lizosoma) te retromernog liganda APP (Slika 10.C i D) u stanicama CHOwt i *NPCI*-null te stanicama *NPCI*-null u kojima je razina kolesterola smanjena različitim tretmanima. Nakon tretmana za snižavanje kolesterola razine svih analiziranih i kvantificiranih proteina u stanicama *NPCI*-null nisu bile statistički značajno promijenjene u odnosu na netretirane stanice CHOwt ili *NPCI*-null (analizirano testom varijanci ANOVA; Slika 10).

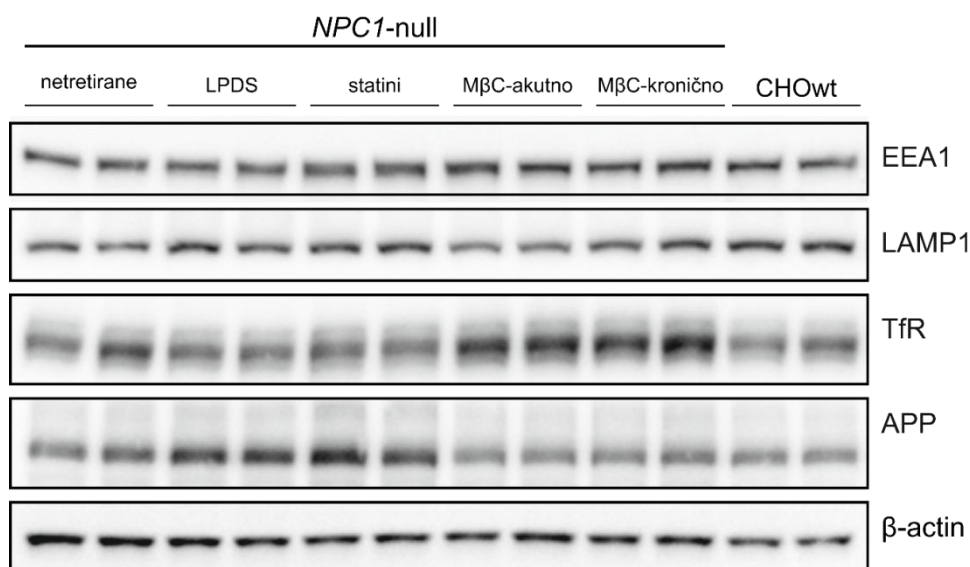
A)



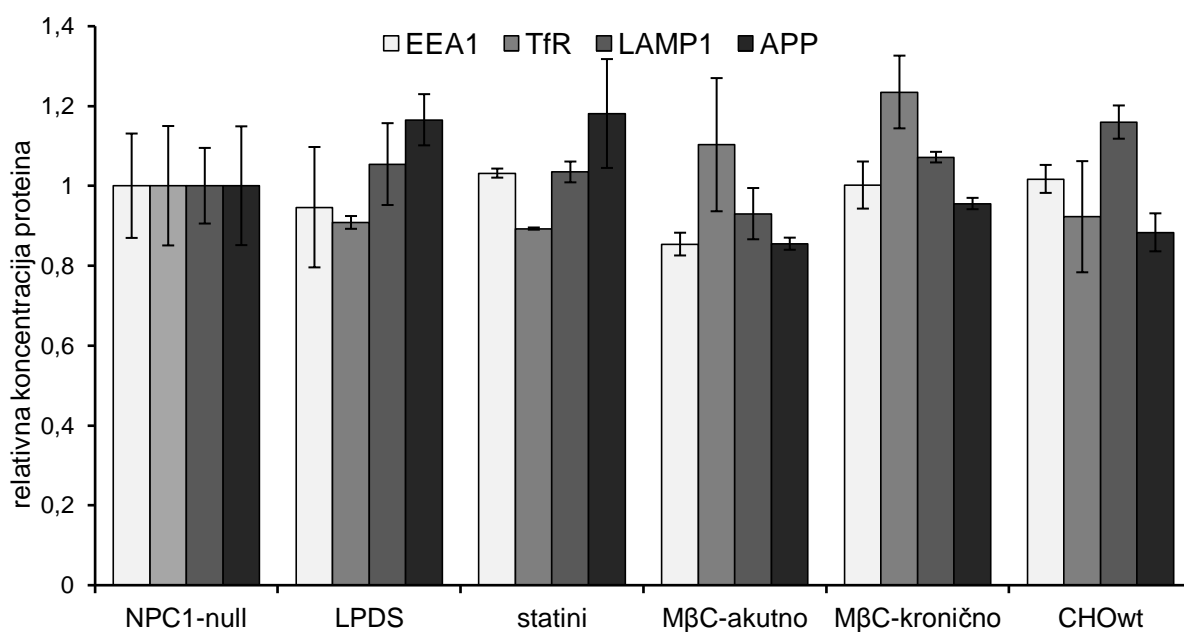
B)



C)



D)



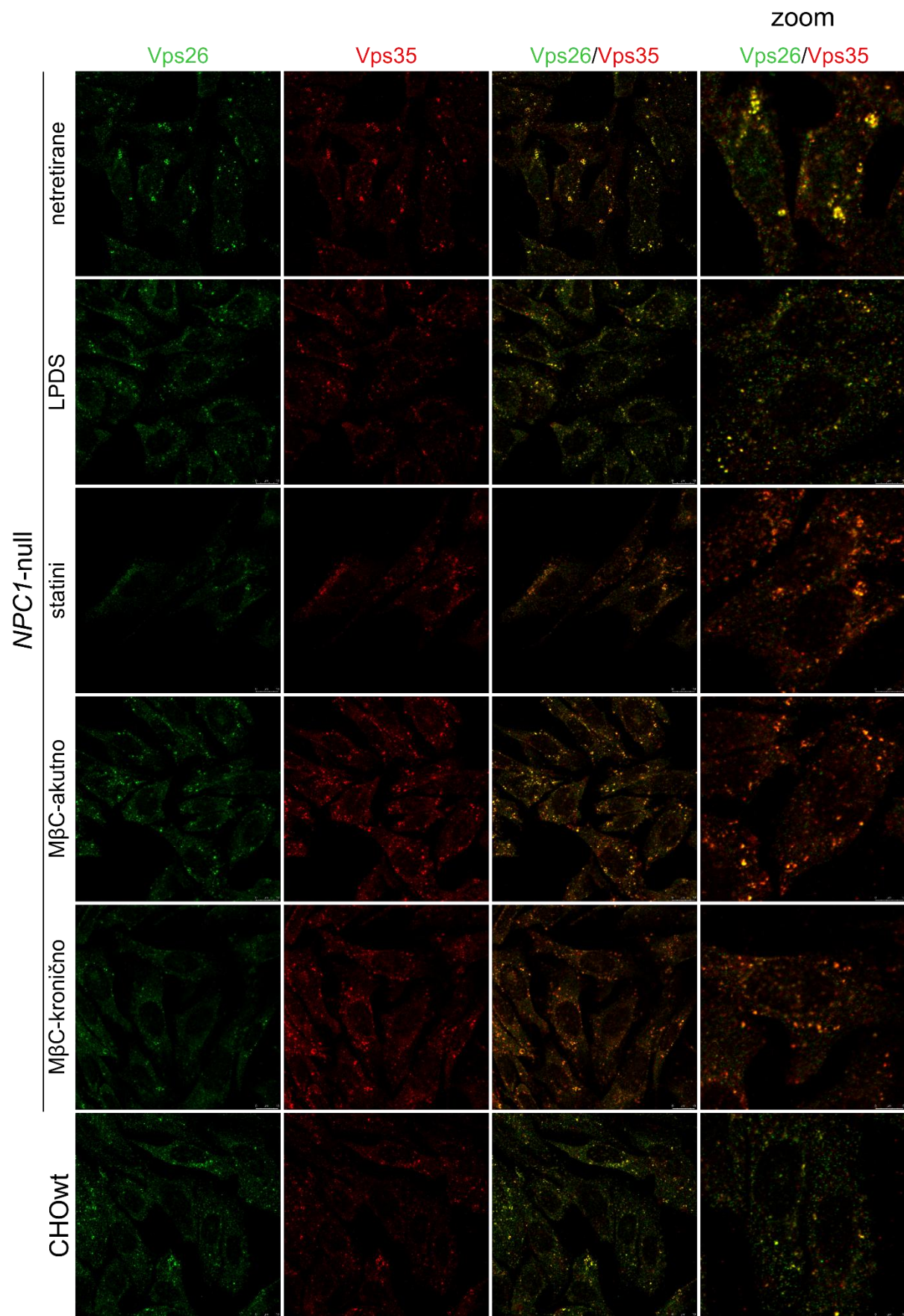
Slika 10. Razine proteina retromera, endosomalno-lizosomalnog sustava kao i razina APP-a nepromijenjene su nakon snižavanja razine kolesterola u stanicama NPC1-null. A) Metodom Western blot analizirane su razine proteina retromernih proteina Vps26, Vps35 te retromernog receptora sorLa i C) razine proteina endosomalno-lizosomalnog puta – EEA1 (biljeg ranih endosoma), TfR (receptor transferina, biljeg reciklirajućih endosoma), LAMP1 (biljeg lizosoma) te retromernog liganda APP analizirane su u stanicama CHOwt i NPC1-null te stanicama NPC1-null u kojima je razina kolesterola smanjena: uzgajanjem u mediju sa serumom bez egzogenih lipida – tretman „LPDS“ (engl. *LiPid Deficient Serum*), u mediju s dodatkom statina lovastatina (uz dodatak mevalonata) – tretman „statini“, u mediju s dodatkom metil-β ciklodekstrina i uzgajanjem 1 h – tretman „MβC-

akutno“ ili uzgajanjem 24 h - tretman „M β C-kronično“. B) i D) Rezultati dobiveni metodom Western blot u tri neovisna pokusa u duplikatima analizirani su software-om ImageJ i normalizirani prema količini proteina β -actina. Dobivene vrijednosti analizirane su testom ANOVA i nije uočena statistički značajna razlika. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD.

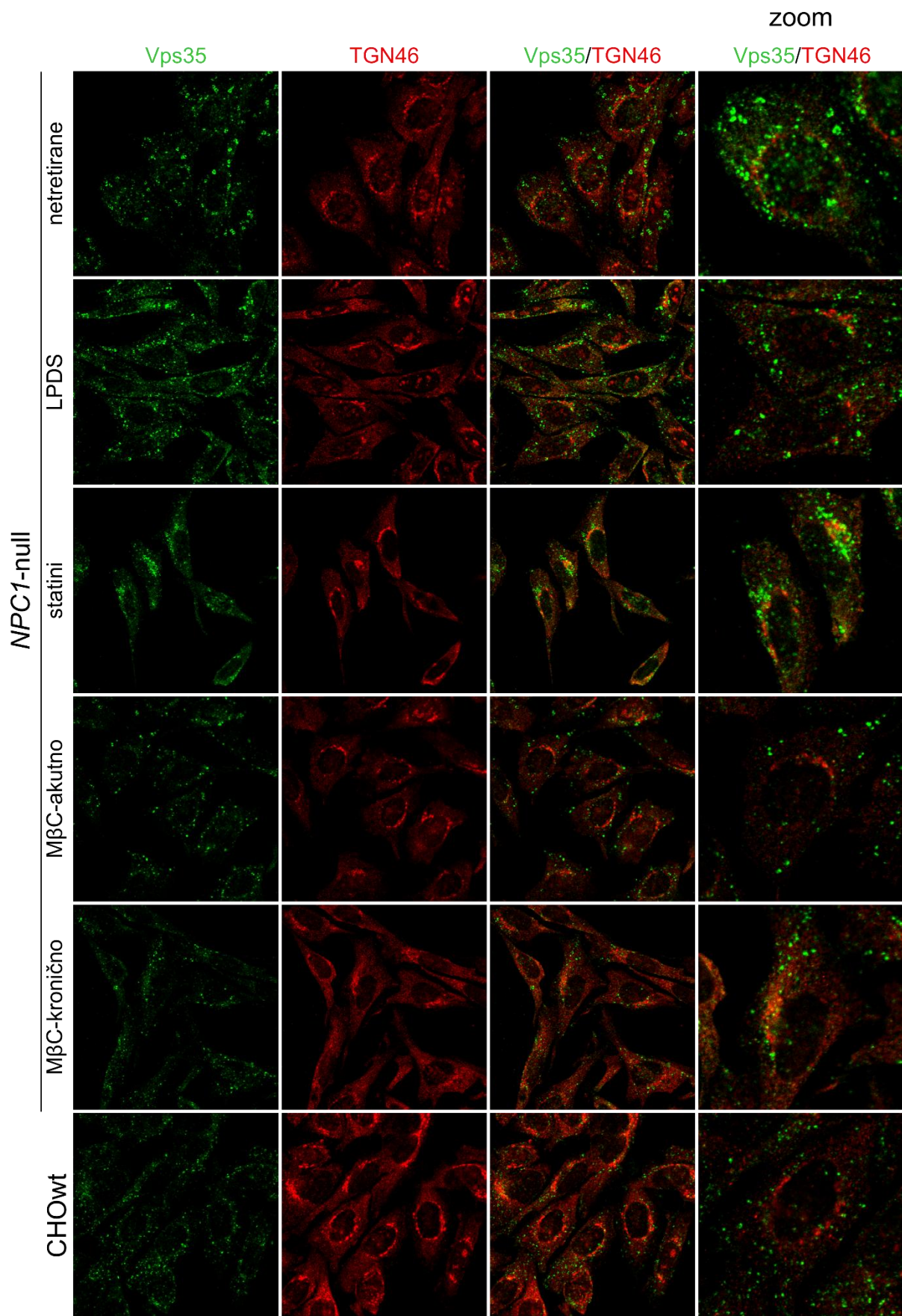
Imunocitokemijskom analizom retromernih proteina Vps26 i Vps35 u stanicama *NPC1*-null nakon tretmana za smanjenje kolesterola, utvrđeno je da je u svim tretmanima za snižavanje kolesterola došlo do smanjenja veličina nakupina retromernih proteina Vps26 i Vps35, signal je bio u manjim nakupinama i homogenije raspršen, sličnije kao u CHOwt nego u *NPC1*-null (Slika 11.A).

Analiza kolokalizacije retromernog proteina Vps35 s biljezima unutarstaničnih organela pokazala je da se uslijed smanjenja razine kolesterola u stanicama *NPC1*-null smanjilo nakupljanje povećanih organela endosomalno-lizosomalnog puta, prvenstveno ranih, kasnih i reciklirajućih endosoma te lizosoma, a organeli su bili raspršeniji i morfološki sličniji kao u kontrolnim stanicama CHOwt. U tretiranim stanicama *NPC1*-null bilo je prisutno i smanjenje kolokalizacije Vps35 s vezikulama pozitivnima na biljege EEA1 (Slika 11.C), TfR (Slika 11.D), Rab7 (Slika 11.E) i LAMP1 (Slika 11.F) te je prisutna djelomična kolokalizacija s biljezima ranih endosoma (EEA1) kao i u stanicama CHOwt. Nakon tretmana za snižavanje kolesterola u stanicama *NPC1*-null, preostale nakupine Vps35 bile su smještene perinuklearno te su kolokalizirale s biljegom Golgijevog aparata (TGN46, Slika 11.A) što nije bilo prisutno ni u stanicama CHOwt niti u *NPC1*-null.

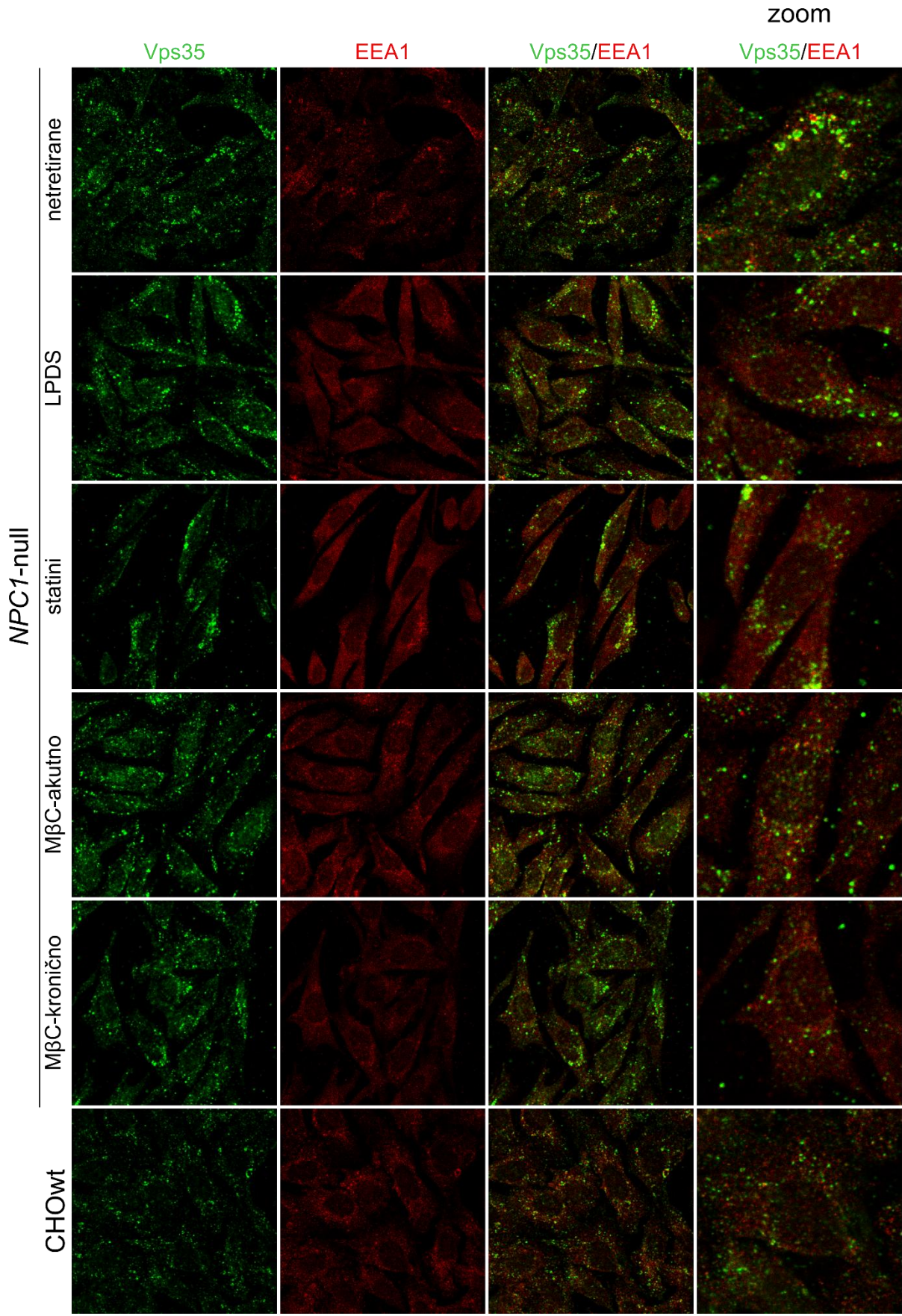
A)



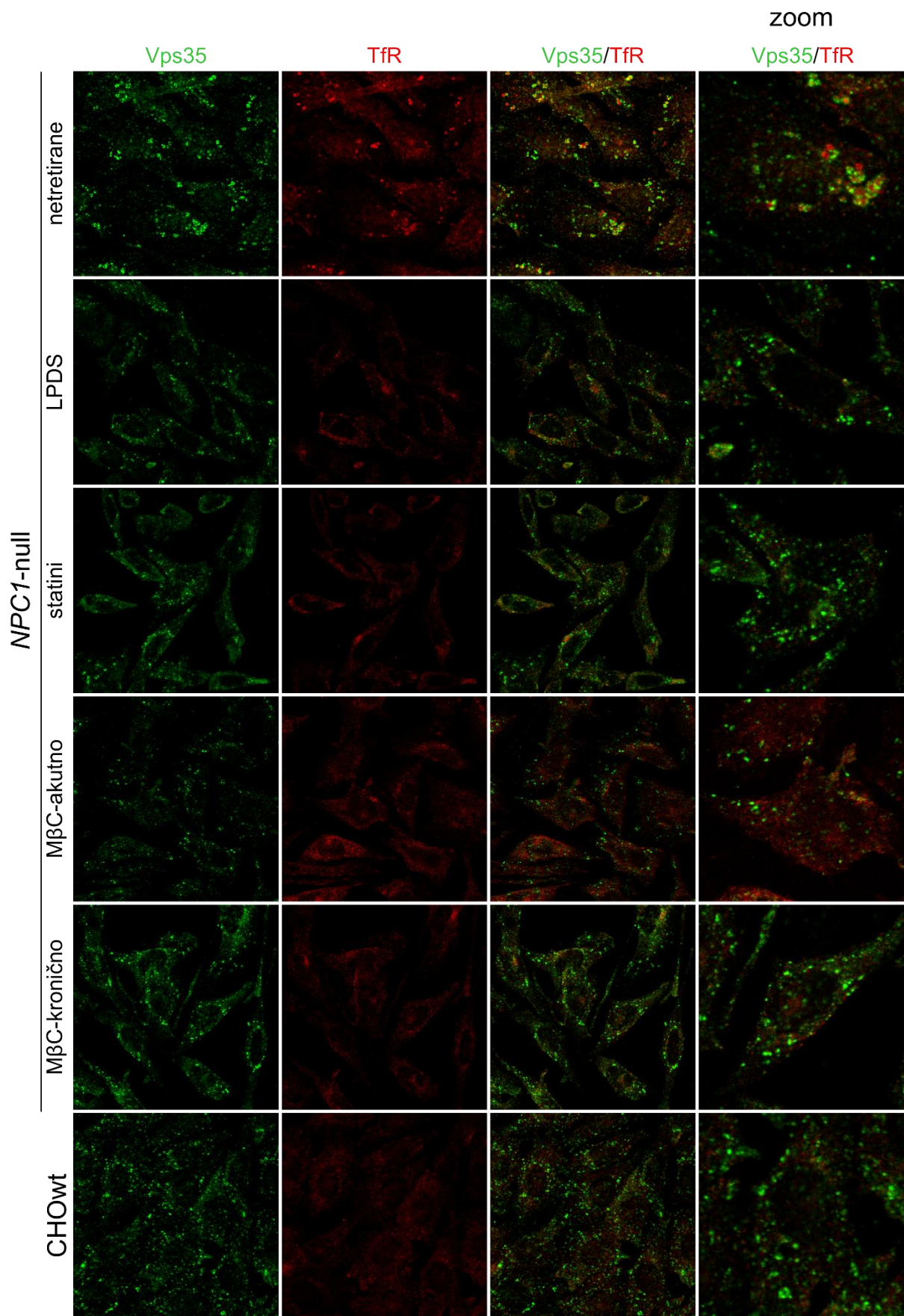
B)



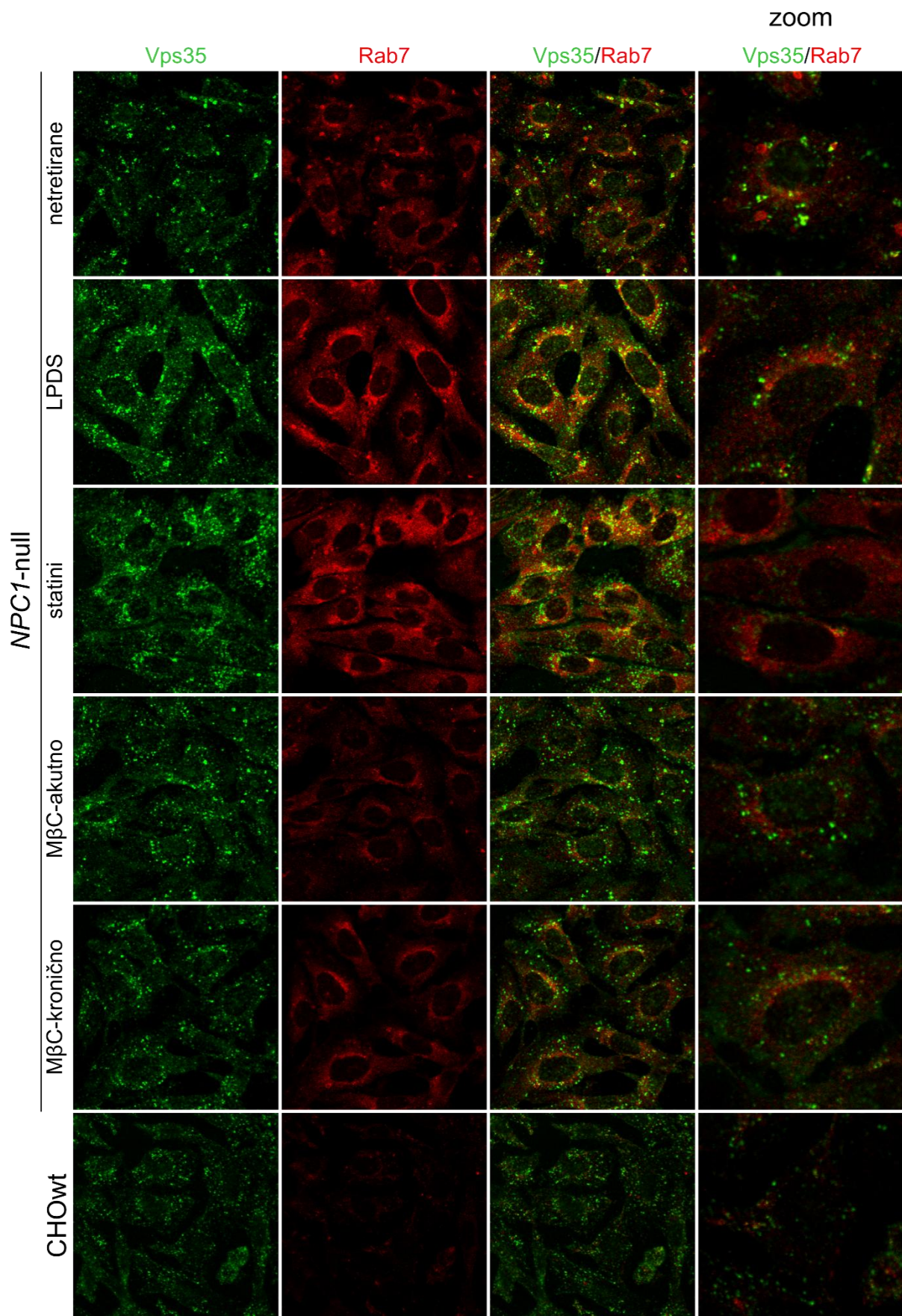
C



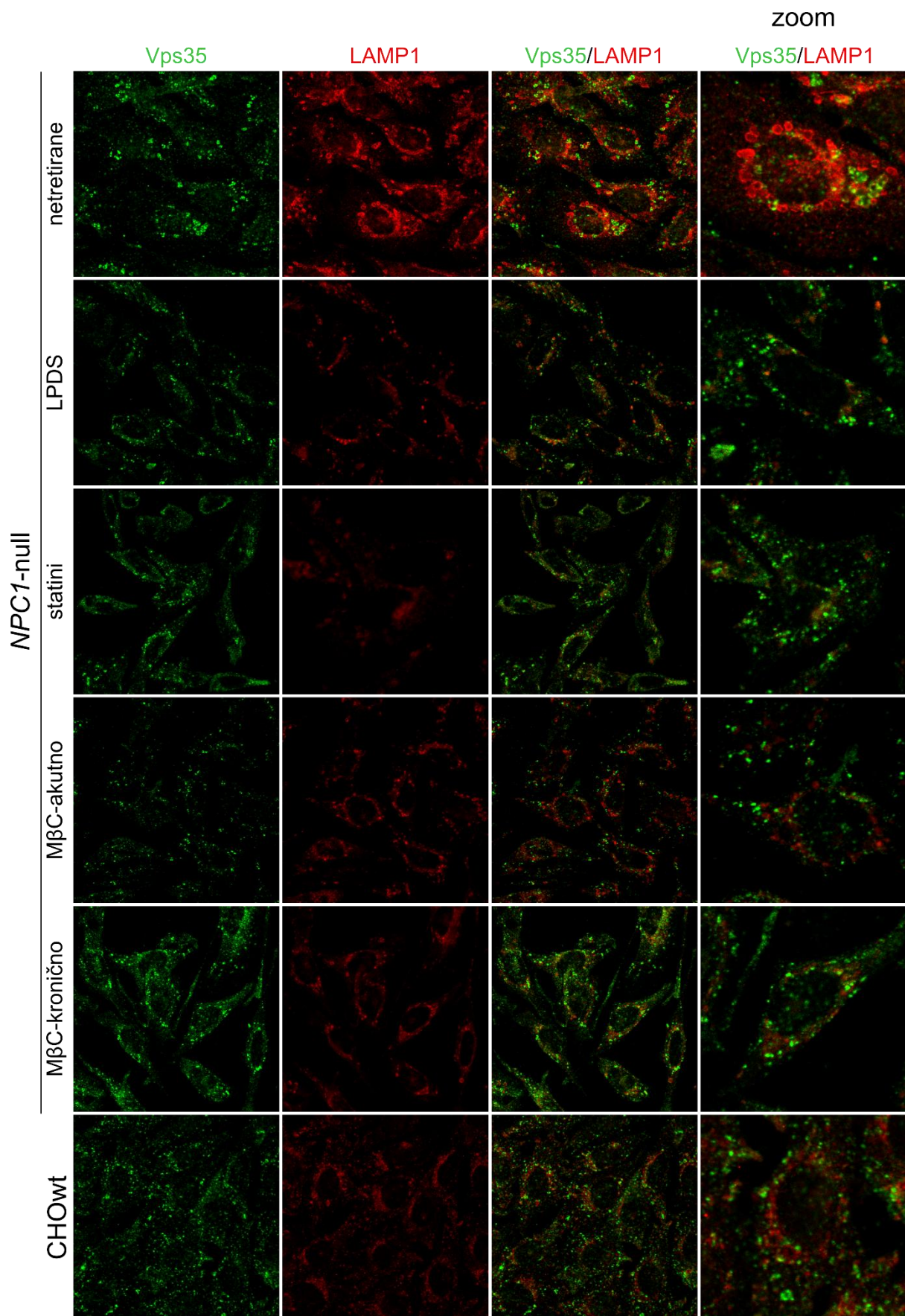
D)



E)

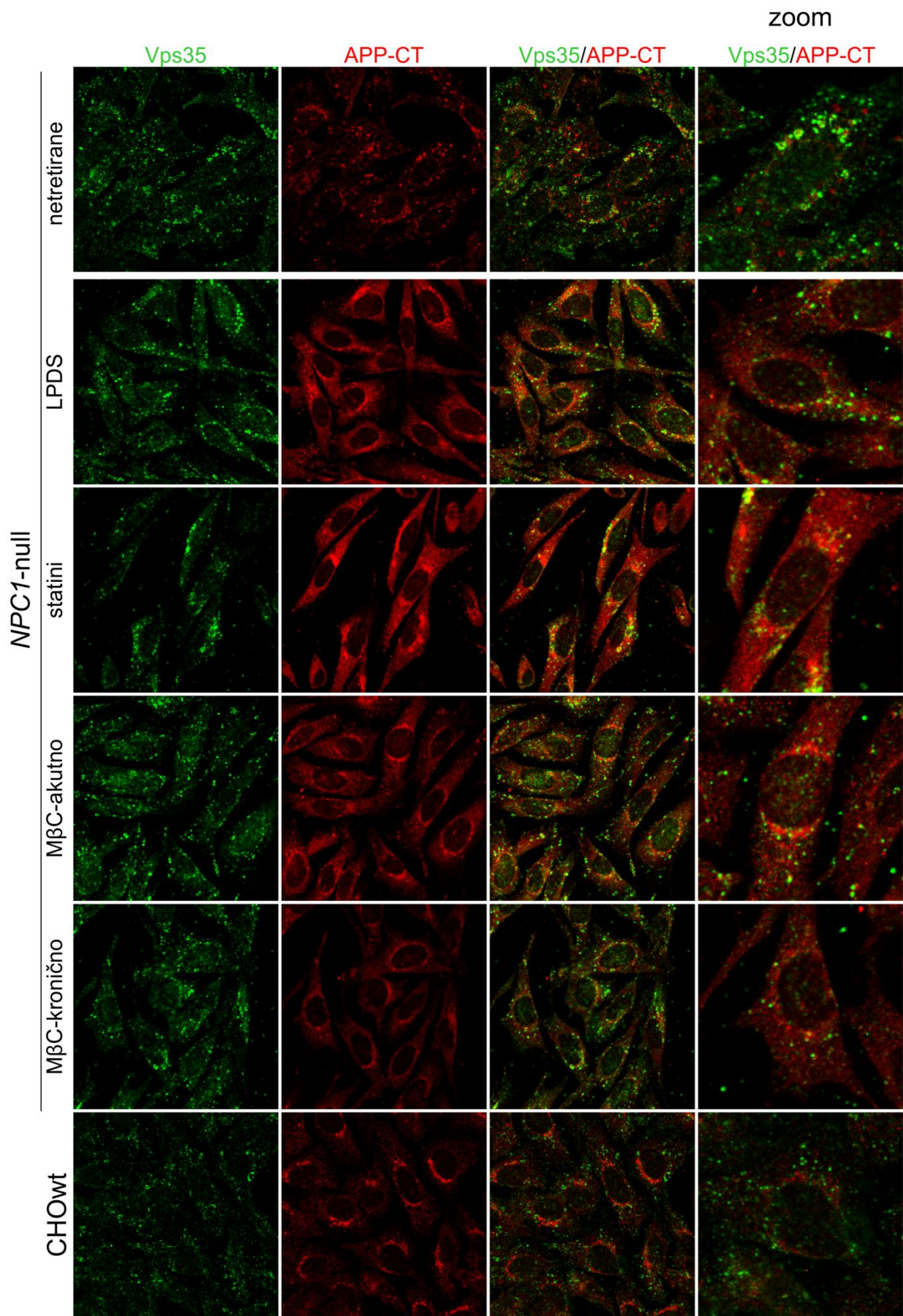


F)



Slika 11. Nakupljanje retromernog kompleksa u endosomima u stanicama NPC1-null ovisno je o nakupljanju kolesterola. U stanicama NPC1-null razina kolesterola smanjena je: uzgajanjem u mediju sa serumom bez egzogenih lipida – tretman „LPDS“ (engl. *LiPid Deficient Serum*), u mediju s dodatkom statina lovastatina (uz dodatak mevalonata) – tretman „statini“, u mediju s dodatkom metil- β ciklodekstrina i uzgajanjem 1 h – tretman „M β C-akutno“ ili uzgajanjem 24 h – tretman „M β C-kronično“. Za analizu smještaja retromernog kompleksa korištena su dva različita protutijela za sastavnice retromernog kompleksa Vps26 i Vps35 te je praćena kolokalizacija retromera s biljezima različitih unutarstaničnih organela. A) Vps26 i Vps35 za retromerni kompleks, B) protutijela TGN46 kao biljeg trans-Golgijeve mrežice, C) protutijelo EEA1 kao biljeg ranih endosoma, D) TfR (receptor transferina) kao biljeg reciklirajućih endosoma, E) Rab7 kao biljeg kasnih endosoma i F) LAMP1 kao biljeg lizosoma. Nakon završetka tretmana, stanice su fiksirane te imunocitokemijski obilježene specifičnim protutijelima te analizirane konfokalnim laserskim mikroskopom.

Osim analize utjecaja smanjenja kolesterola na unutarstanični smještaja retromera, praćena je i kolokalizacija Vps35 s retromernim ligandom APP (Slika 12). Za imunocitokemijsko obilježavanje korišteno je C-terminalno protutijelo (APP-CT). Nakon snižavanja kolesterola, smještaj APP bio je homogeno raspršen bez jasnih nakupina, uz prisutan jači signal u tretmanima LPDS i statini, što odgovara rezultatima dobivenim metodom Western blot, iako bez statističke značajnosti. Kolokalizacija homogeno raspršenih Vps35 i APP bila je djelomična kao i u stanicama CHOwt, prvenstveno u perinuklearnoj regiji koja odgovara smještaju u Golgijevom aparatu.



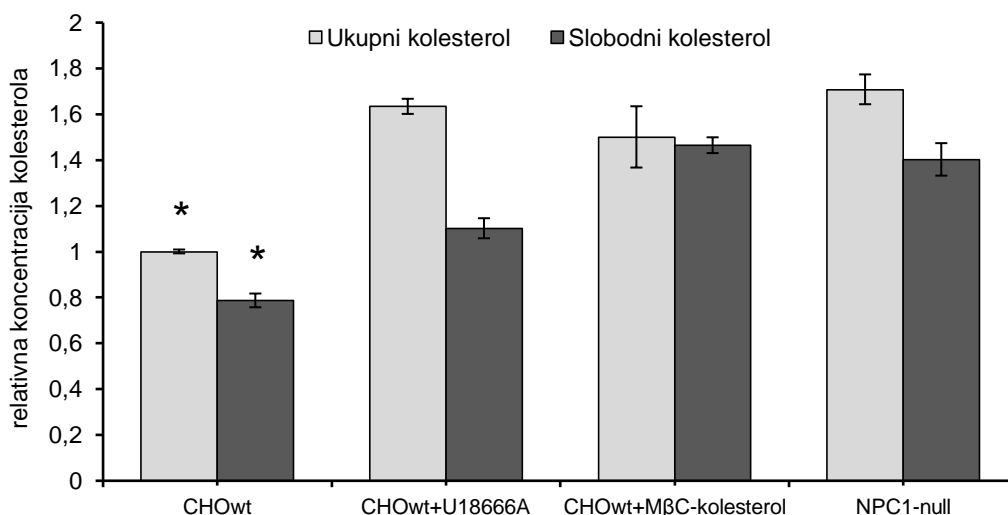
Slika 12. Snižavanje razine kolesterola u stanicama *NPCI*-null smanjuje kolokalizaciju APP-a i retromernog kompleksa. U stanicama *NPCI*-null razina kolesterola smanjena je: uzgajanjem u mediju sa serumom bez egzogenih lipida – tretman „LPDS“ (engl. *LiPid Deficient Serum*), u mediju s dodatkom statina lovastatina (uz dodatak mevalonata) – tretman „statini“, u mediju s dodatkom metil- β ciklodekstrina i uzgajanjem 1 h – tretman „M β C-akutno“ ili uzgajanjem 24 h – tretman „M β C-kronično“. Za analizu kolokalizacije retromernog kompleksa i proteina APP korištena su protutijela Vps35 i APP-CT (protutijelo koje prepoznaje C-terminalni odsječak APP, Y188).

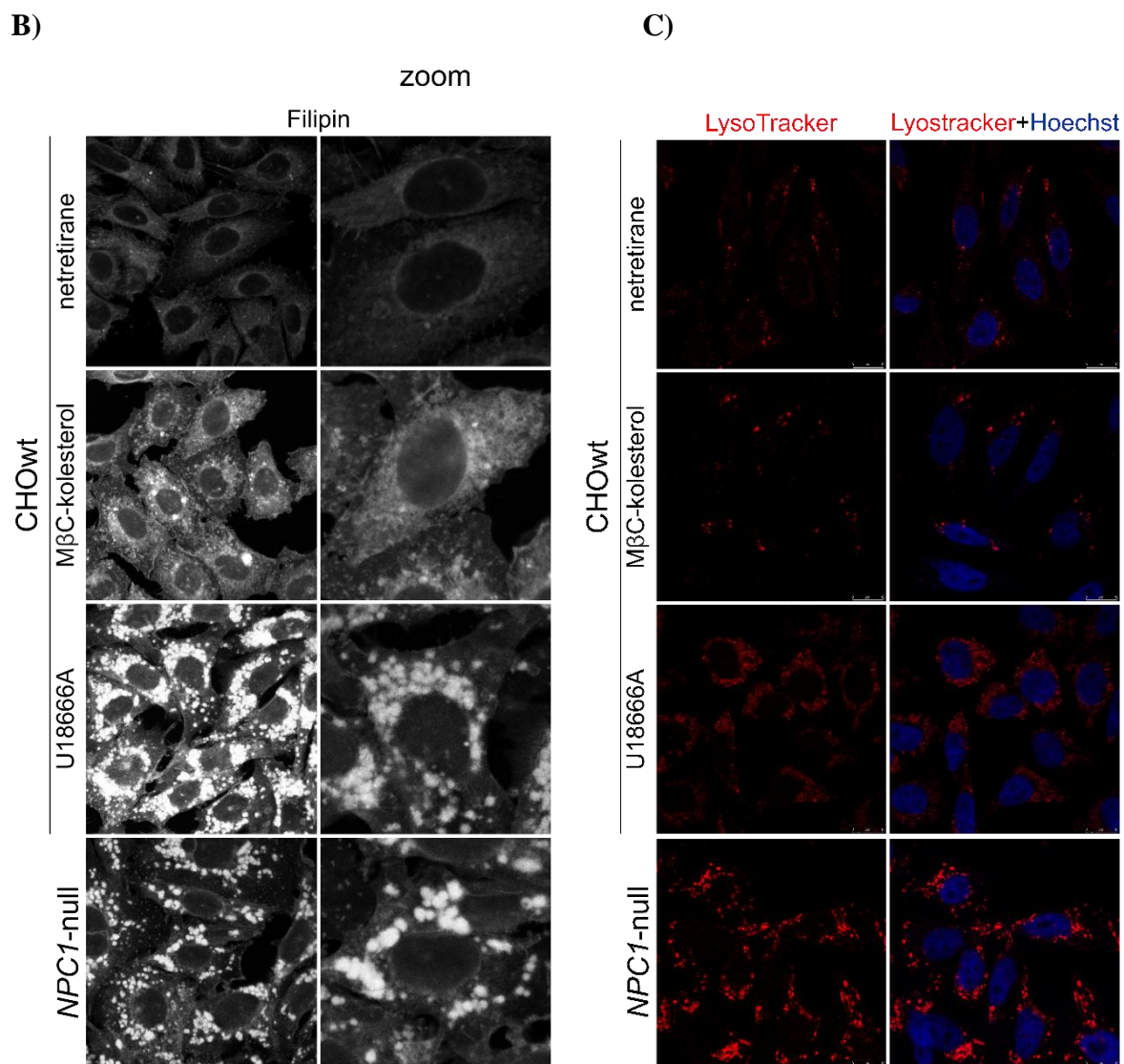
5.2.2. Utjecaj povećanja razine kolesterola na smještaj proteina retromernog kompleksa u stanicama divljeg tipa CHOwt

Za povećavanje razine kolesterola u stanicama CHOwt korištena su dva tretmana (detaljno opisana u 4.3.1.). Tretmani su uključivali uzgoj stanica u mediju sa spojem U18666A koji inhibira funkciju proteina NPC1/NPC2 i koji se koristi za oponašanje fenotipa bolesti NPC te uzgoj stanica u mediju sa serumom bez egzogenih lipida LPDS (engl. *Lipid Deficient Serum*) uz dodatak kompleksa M β C-kolesterol kojim se kolesterol ugrađuje u sve stanične membrane. Analizom dobivenih vrijednosti razine ukupnog i slobodnog kolesterola u stanicama CHOwt i NPC1-null nakon tretmana za povećanje razine kolesterola u stanicama CHOwt, varijance nisu bile jednake (Leven's test $p < 0,001$), stoga je primijenjena analiza Welch's ANOVA. Post hoc testom Games-Howell uspoređene su razlike srednjih vrijednosti ukupnog i slobodnog kolesterola u kontrolnim i tretiranim stanicama. Oba tretmana za povećanje razine kolesterola u stanicama CHOwt značajno su povećala razinu ukupnog i slobodnog kolesterola u stanicama CHOwt na razinu sličnu kao u stanicama NPC1-null (Slika 13.A).

Bojenje filipinom potvrdilo je nakupljanje slobodnog kolesterola u tretiranim stanicama CHOwt koje se očitovalo izraženim karakterističnim „grudastim“ obojenjem uz tretman U18666A te nešto slabiji učinak tretmana M β C-kolesterol (Slika 13.B). Fluoroforom obilježena proba LysoTracker potvrdila je nakupljanje povećanih lizosoma u stanicama CHOwt tretiranim spojem U18666A, dok je utjecaj povećanja kolesterola u tretmanu M β C-kolesterol na funkciju lizosoma slabiji, ali je signal jači od kontrolnih stanica CHOwt (Slika 13.C).

A)



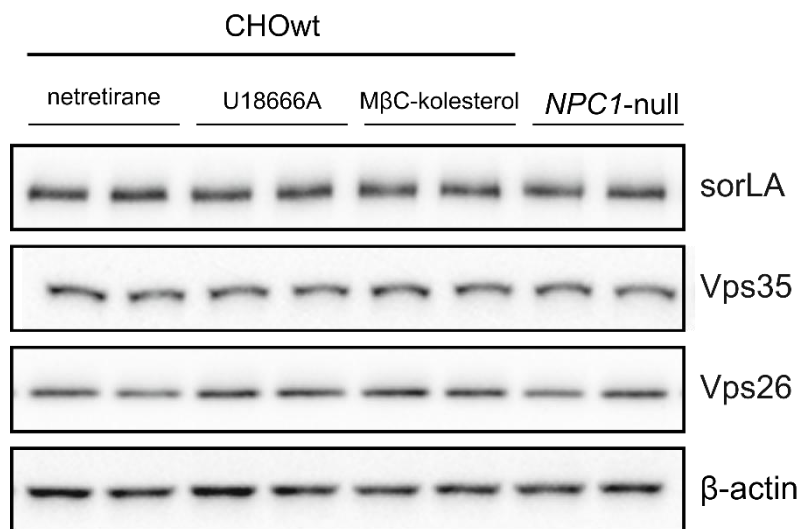


Slika 13. Povećanje razine kolesterola u stanicama CHOWt uzrokuje nakupljanje kolesterola i povećanje organela lizosoma. U stanicama CHOWt razina kolesterola povećana je: uzgajanjem u mediju sa spojem U18666A koji se koristi za oponašanja fenotipa bolesti NPC te u mediju bez egzogenih lipida (engl. *LiPid Deficient Serum*) s dodatkom kompleksa MβC-kolesterol. A) Koncentracija ukupnog i slobodnog kolesterola nakon tretmana izmjerena je u staničnom lizatu komercijalno dostupnim kompletom Amplex Red Cholesterol Assay te izražena kao omjer koncentracije kolesterola i ukupnih proteina u staničnom lizatu. Ukupno je relativna koncentracija kolesterola izražena kao omjer prema kontrolnim stanicama, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD. Dobivene vrijednosti analizirane su analizom ANOVA. Stanice CHOWt imale su značajno manju razinu ukupnog i slobodnog kolesterola ($p < 0,05$). B) Bojenje kolesterola slobodnog neesterificiranog kolesterola praćeno je filipinom. C) Funkcija lizosoma u stanicama nakon povećanja razine kolesterola analizirana je bojenjem živih stanica fluoroforom obilježenom probom LysoTracker.

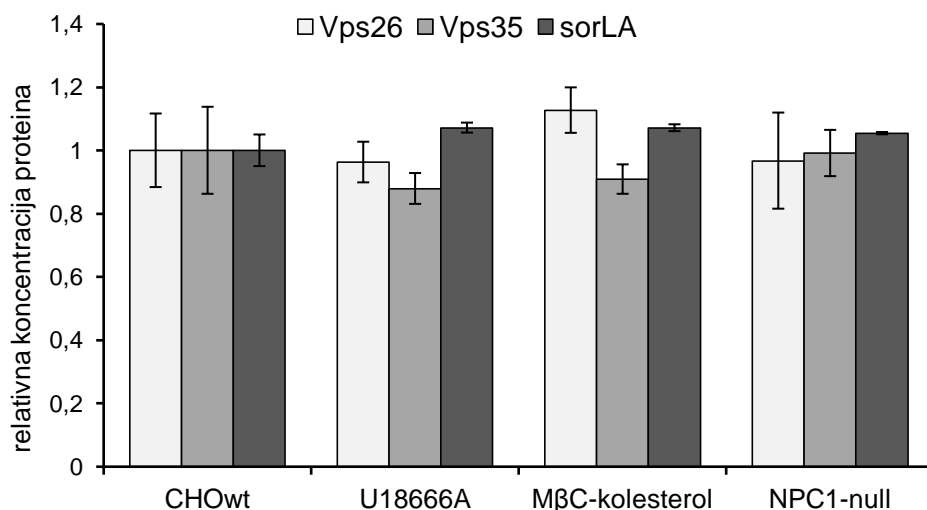
Nakon toga, stanice su fiksirane, jezgre su obilježene bojom Hoechst i stanice su analizirane konfokalnim laserskim mikroskopom.

U stanicama CHOwt kojima je povišena razina kolesterola analizirane su razine retromernih proteina te proteina endosomalno-lizosomalnog puta kao i retromernog liganda APP (Slika 14.). Razine retromernih proteina Vps26 i Vps35 te retromernog receptora sorLA nisu bile promijenjene u stanicama CHOwt nakon povećanja razine kolesterola (Slika 14.A i B). Također, razine endosomalno-lizosomalnih proteina EEA1, TfR i LAMP1, kao i retromernog liganda APP nisu bile statistički značajno promijenjene (Slika 14.C i D).

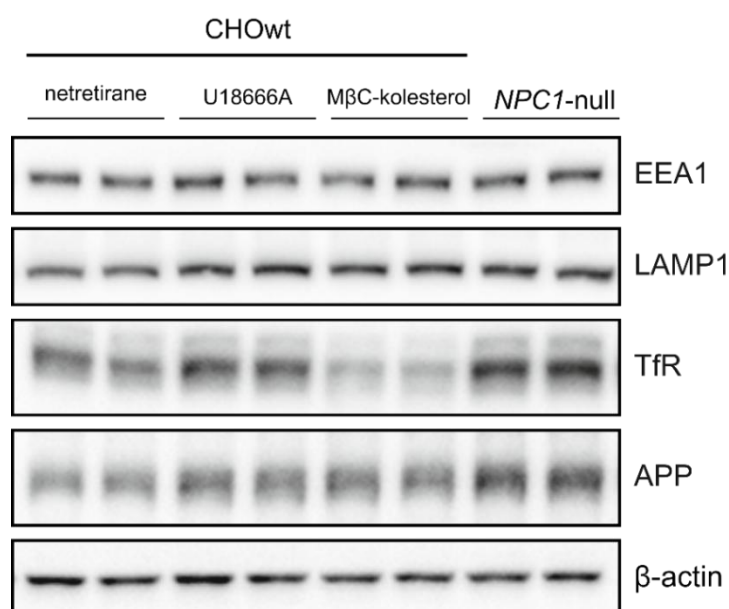
A)



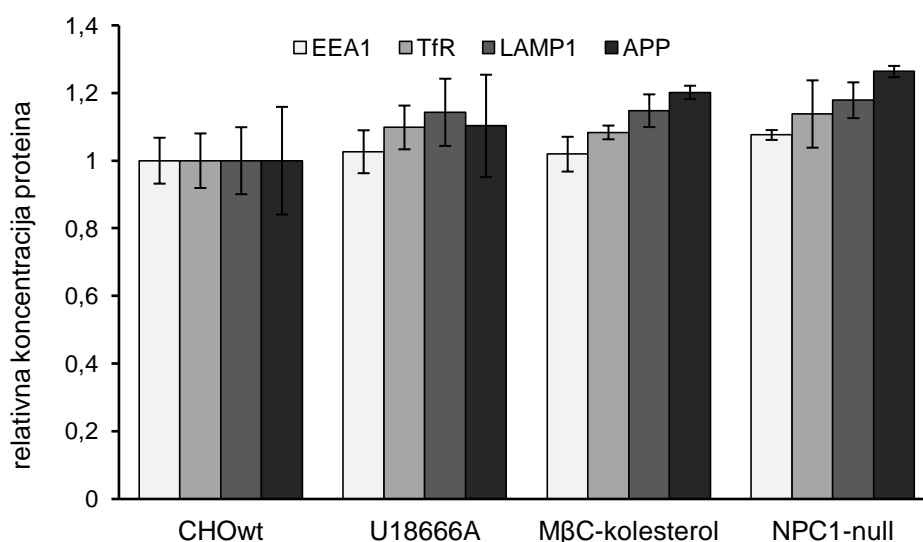
B)



C)



D)

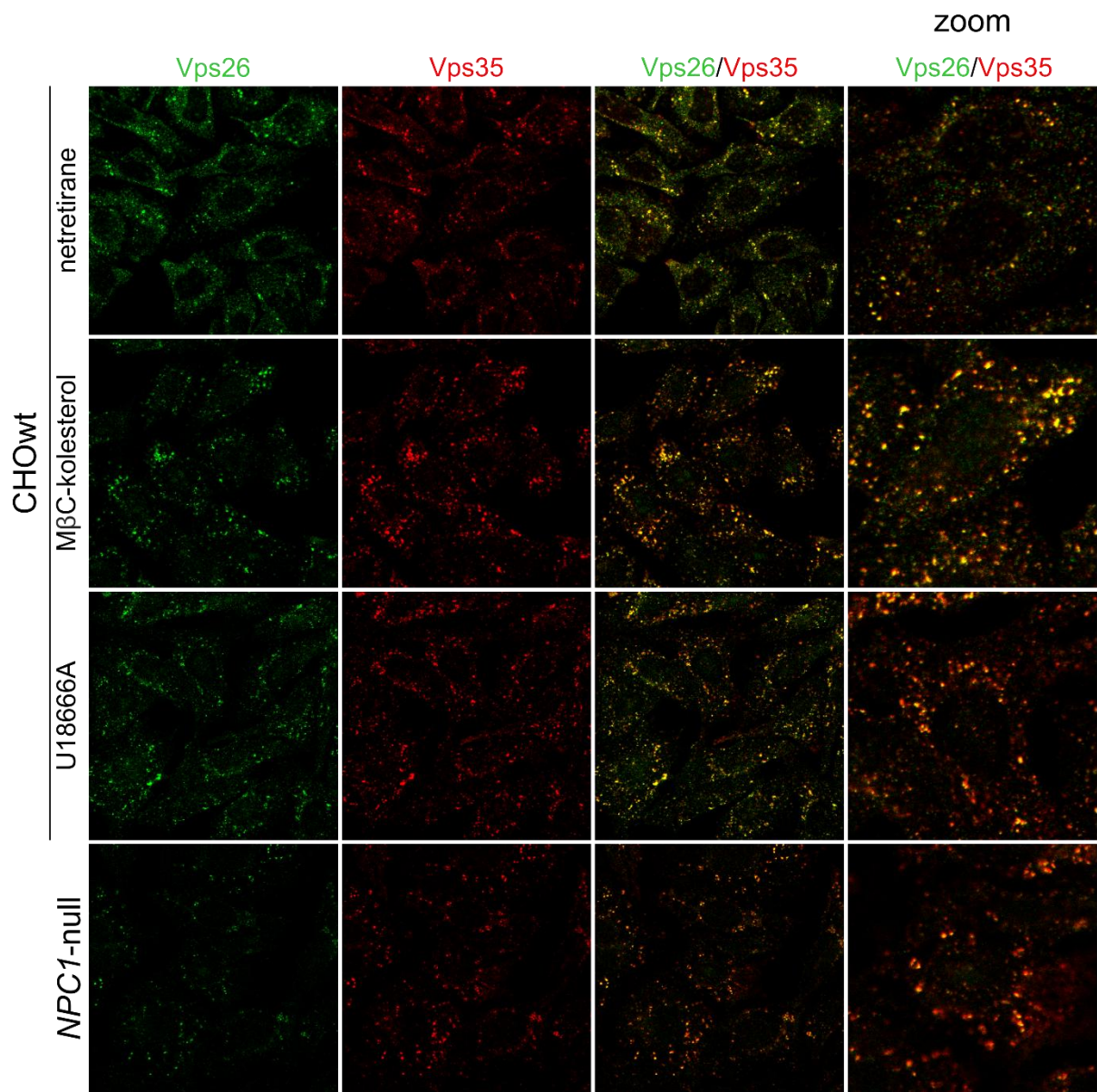


Slika 14. Razine proteina retromera, endosomalno-lizosomalnog puta kao i razina APP-a, nepromijenjene su nakon povećanja razine kolesterola u stanicama CHOwt. U stanicama CHOwt razina kolesterola povećana je: uzgajanjem u mediju sa spojem U18666A koji se koristi za oponašanja fenotipa bolesti NPC te u mediju bez egzogenih lipida (engl. *LiPid Deficient Serum*) s dodatkom kompleksa M β C-kolesterol. A) Metodom Western blot analizirane su razine proteina retromernih proteina Vps26, Vps35 te retromernog receptora sorLa i C) razine proteina endosomalno-lizosomalnog puta – EEA1 (biljeg ranih endosoma), TfR (receptort transferina, biljeg reciklirajućih endosoma), LAMP1 (biljeg lizosoma) te retromernog liganda APP. B) i D) Rezultati dobiveni metodom Western blot u tri neovisna pokusa u duplikatima analizirani su software-om ImageJ i normalizirani prema količini proteina β -actina. Dobivene vrijednosti analizirane su testom ANOVA i nije zabilježena statistička značajnost. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD.

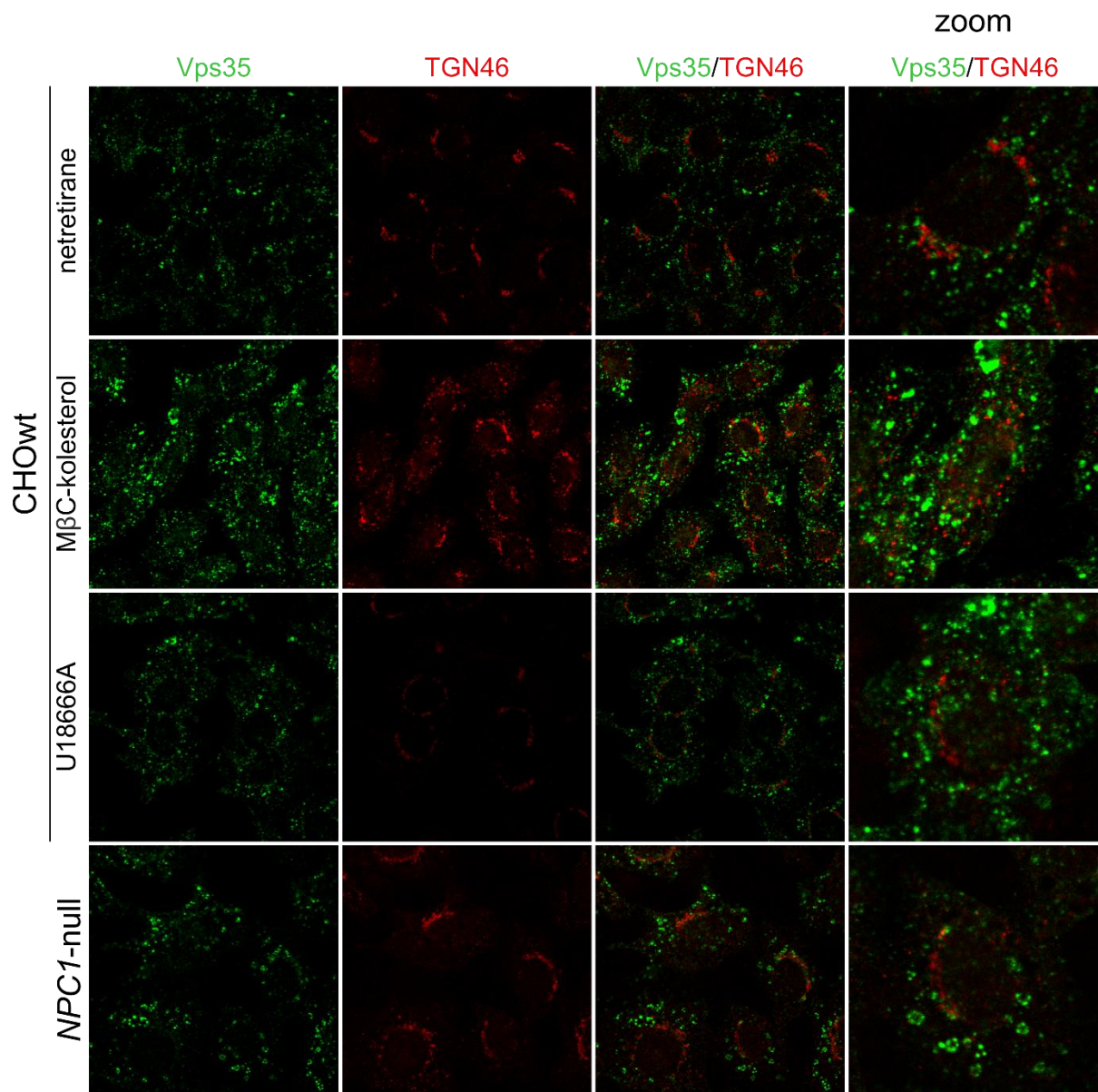
Nakon povećanja razine kolesterola u stanicama CHOwt analiziran je smještaj retromernih proteina i njihova kolokalizacija s biljezima endosomalno-lizosomalnog puta te s ligandom APP. Imunocitokemijskom analizom retromernih proteina Vps26 i Vps35 u stanicama CHOwt nakon tretmana povećanja kolesterola u prisustvu U18666A i kompleksom M β C-kolesterol, utvrđeno je da je došlo do grupiranja retromernih proteina Vps26 i Vps35 u nakupine u perifernom dijelu stanice, slično kao u stanicama *NPCI*-null (Slika 15.A).

Analiza kolokalizacije retromernog proteina Vps35 s biljezima unutarstaničnih organela pokazala je da je povećanje razine kolesterola u stanicama CHOwt uzrokovalo nakupljanje povećanih vezikula endosomalno-lizosomalnog puta, najviše kasnih endosoma (Slika 15.E), ali i ranih endosoma (Slika 15.C) te lizosoma (Slika 15.F), morfološki slično kao u stanicama *NPCI*-null. Uočeno je grupiranje vezikula pozitivnih na TfR, biljega reciklirajućih endosoma, kao i proteina Vps35 u istim dijelovima stanice te je prisutna njihova djelomična kolokalizacija (Slika 15.D). Uslijed povećane razine kolesterola u tretiranim stanicama CHOwt došlo je i potpune kolokalizacije Vps35 s povećanim vezikulama pozitivnima na biljeg EEA1 (Slika 15.C), ali i djelomične kolokalizacije s vezikulama pozitivnima na Rab7 (Slika 15.E). Iako nije uočena kolokalizacija Vps35 s biljegom Golgijevog aparata (TGN46) u netretiranim i tretiranim uvjetima u stanicama CHOwt, u tretiranim stanicama zamijećena je promijenjena morfologija GA koja je nalikovala onoj u stanicama *NPCI*-null, tj. fragmentiranog GA (Slika 15.B).

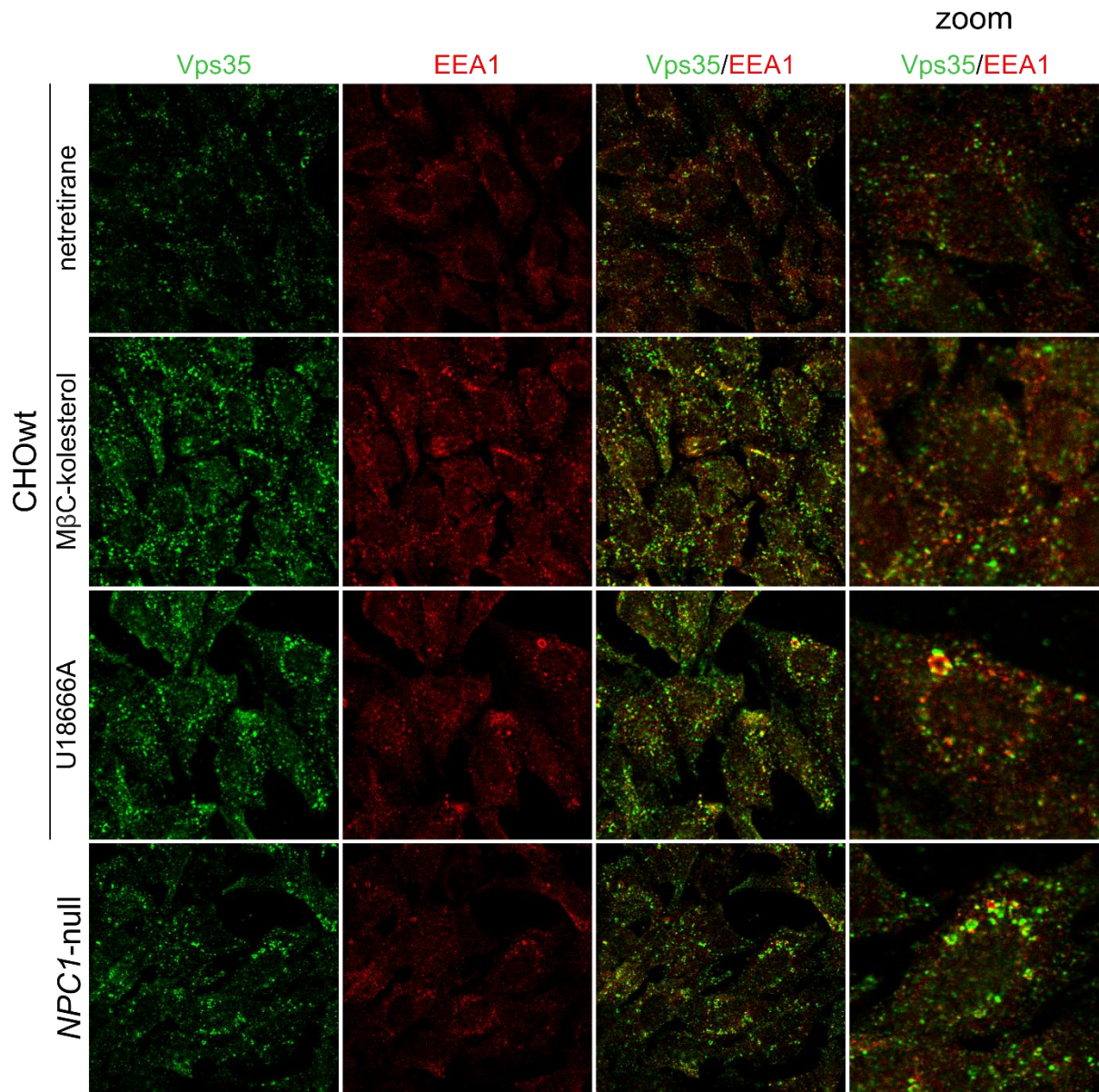
A)



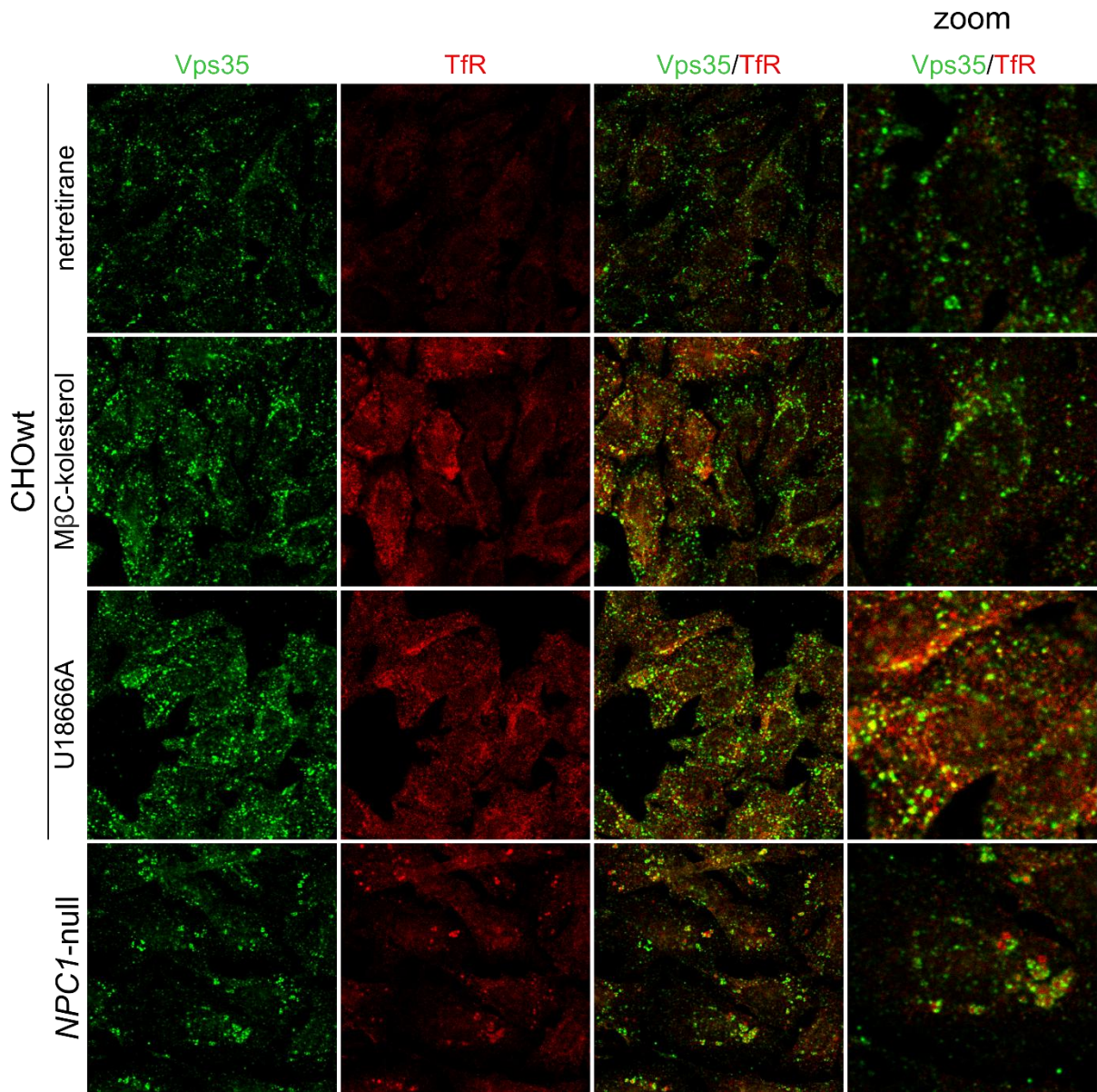
B)



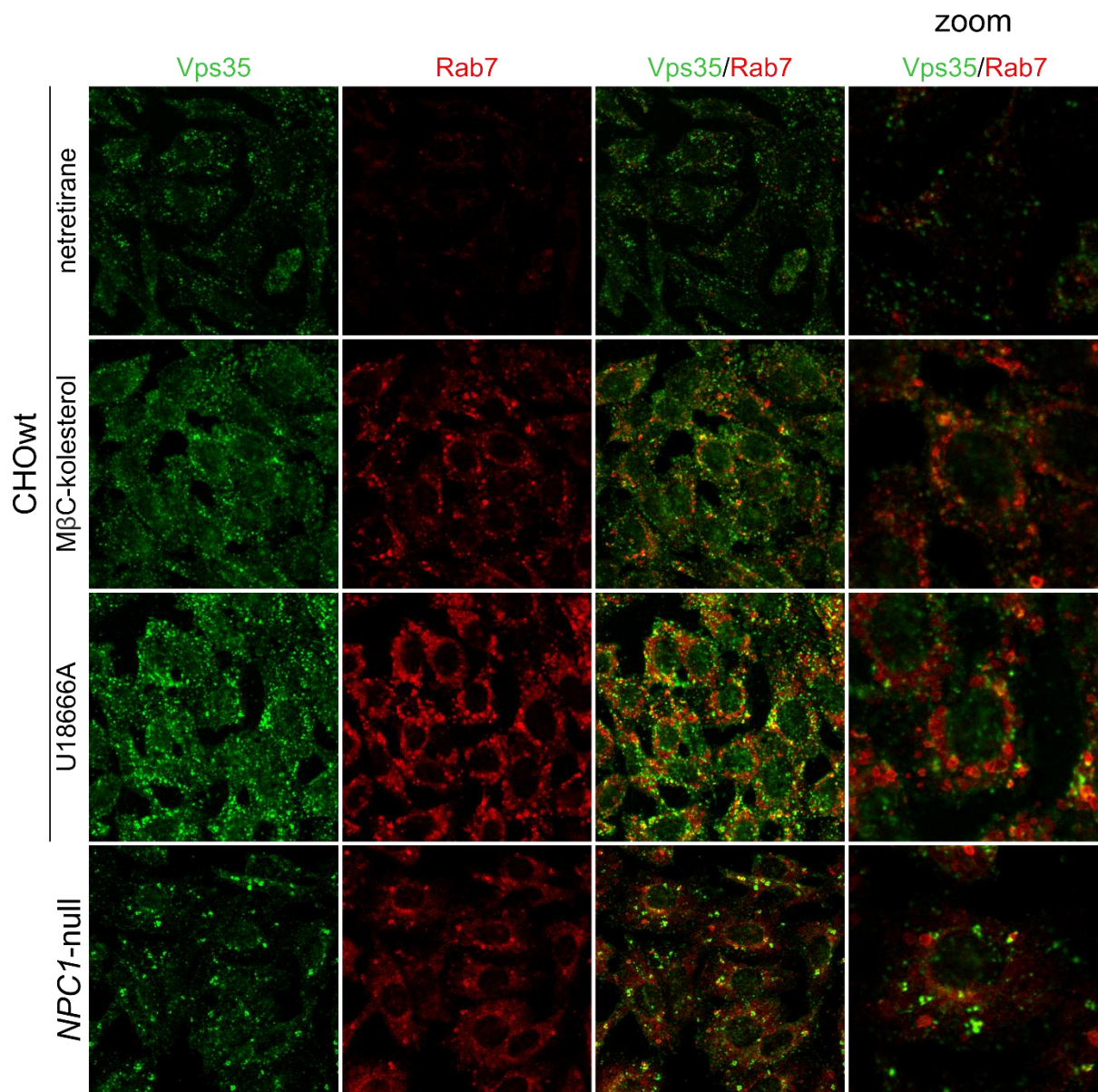
C



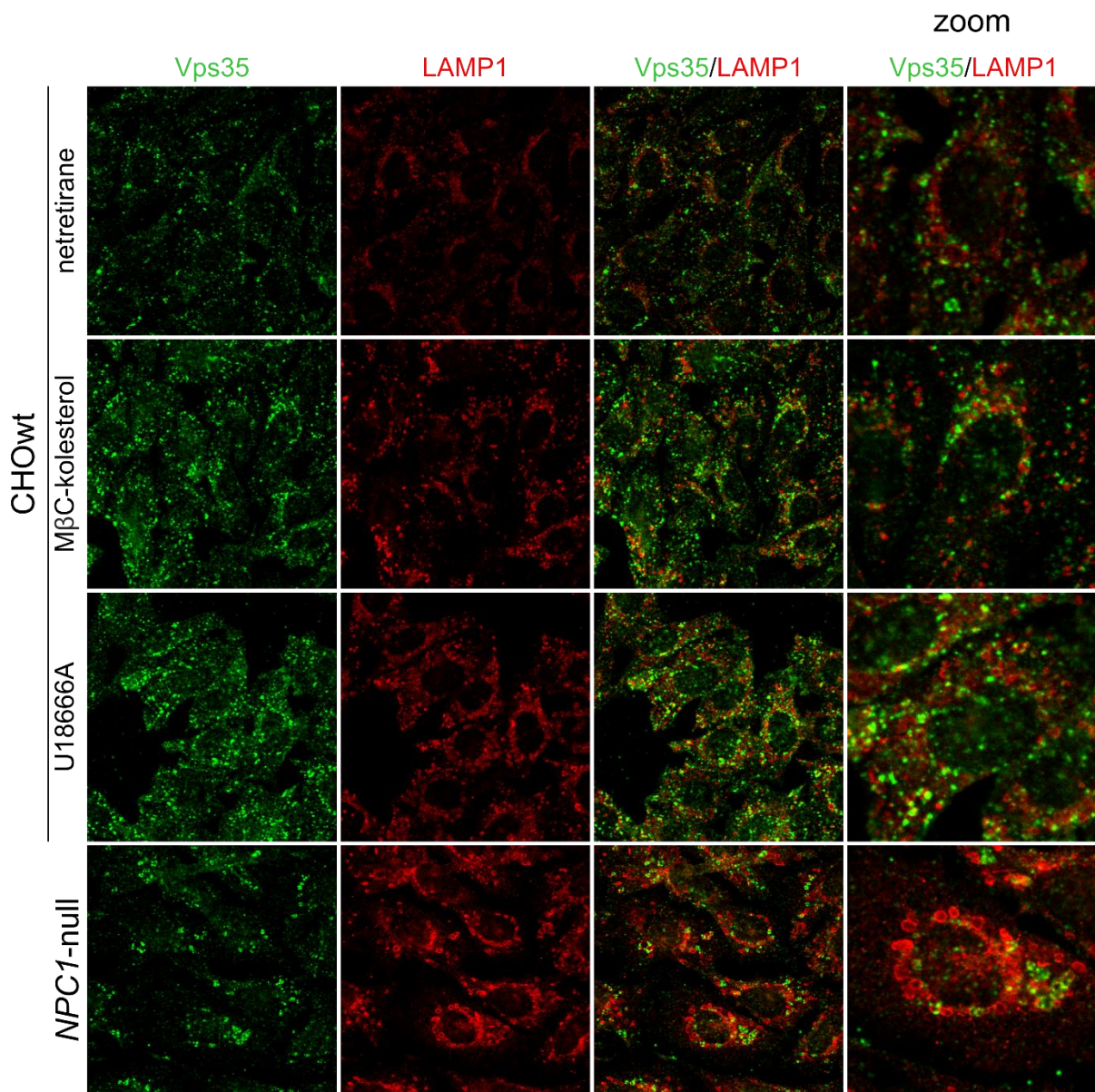
D)



E)

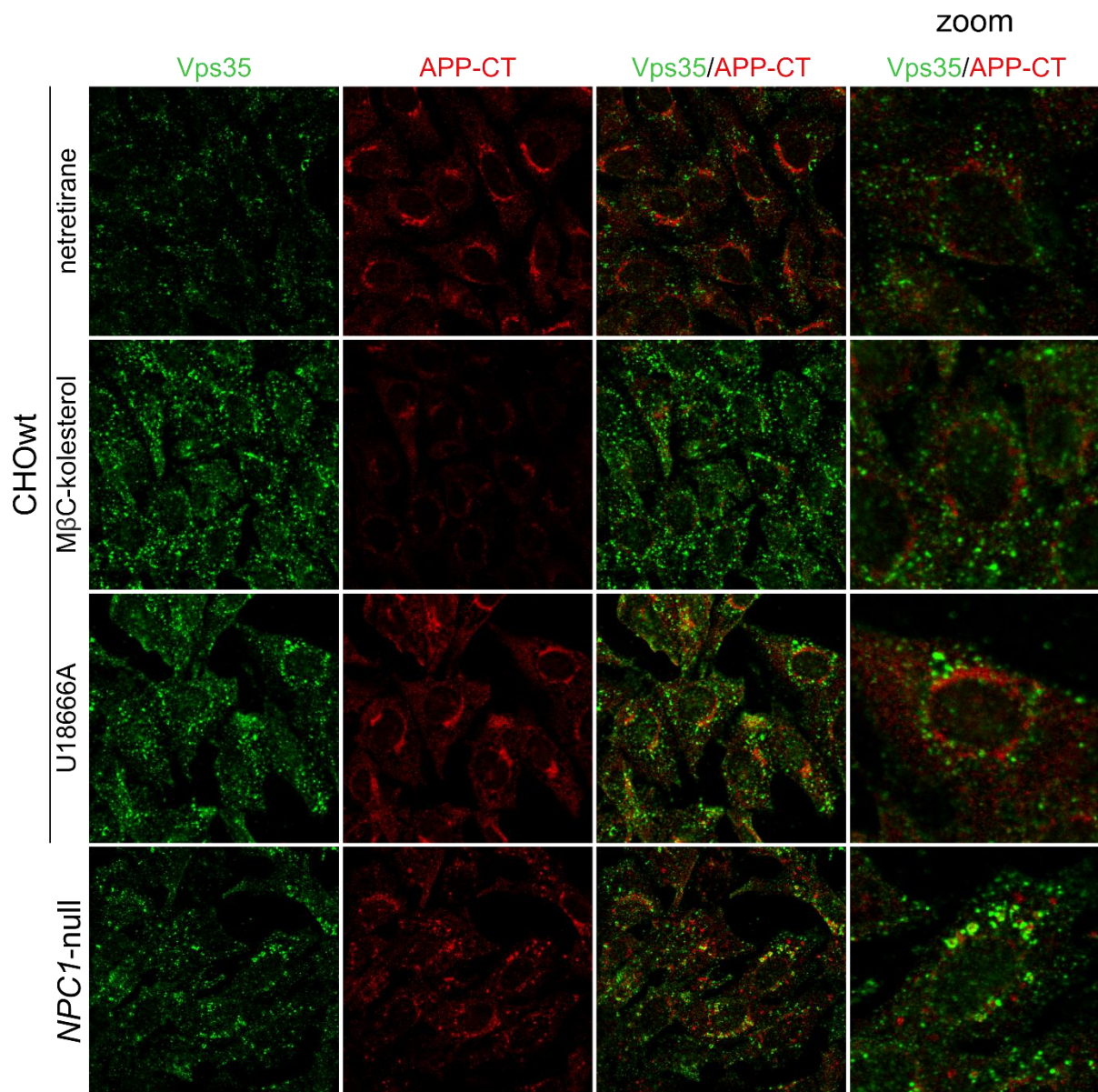


F)



Slika 15. Povećanje razine kolesterola u stanicama divljeg tipa, CHOwt, uzrokuje povećano nakupljanje retromernog kompleksa u ranim endosomima. U stanicama CHOwt razina kolesterola povećana je: uzgajanjem u mediju sa spojem U18666A koji se koristi za oponašanja fenotipa bolesti NPC te u mediju bez egzogenih lipida (engl. *LiPid Deficient Serum*) s dodatkom kompleksa MβC-kolesterol. Za analizu smještaja retromernog kompleksa korištena su dva različita protutijela za komponentne retromernog kompleksa Vps26 i Vps35 te je praćena kolokalizacija retromera s biljezima različitih unutarstaničnih organela. A) Vps26 i Vps35 za retromerni kompleks, B) protutijela TGN46 kao biljeg trans-Golgijsve mrežice, C) protutijelo EEA1 kao biljeg ranih endosoma, D) TfR (receptor transferina) kao biljeg reciklirajućih endosoma, E) Rab7 kao biljeg kasnih endosoma i F) LAMP1 kao biljeg lizosoma. Nakon završetka tretmana, stanice su fiksirane te imunocitokemijski obilježene specifičnim protutijelima te analizirane konfokalnim laserskim mikroskopom.

Kolokalizacija Vps35 s retromernim ligandom APP analizirana je u stanicama CHOwt nakon tretmana za povećanje kolesterola (Slika 16). Za imunocitokemijsko obilježavanje korišteno je C-terminalno protutijelo (APP-CT). Nakon povećanja kolesterola, smještaj APP bio je sličan kao u netretiranim stanicama CHOwt, bez jasnih perifernih nakupina koje su jasno vidljive u stanicama *NPCI*-null, međutim u ponekim stanicama signal je bio manje raspršen te se grupirao u jednu veliku nakupinu. U stanicama CHOwt tretiranim U18666A nakupine Vps35 bile su izraženije smještene točno u dijelovima na kojima se nalazio signal za APP te je stoga i kolokalizacija Vps35 i APP bila djelomično povećana u ovim stanicama u odnosu na netretirane stanice CHOwt.



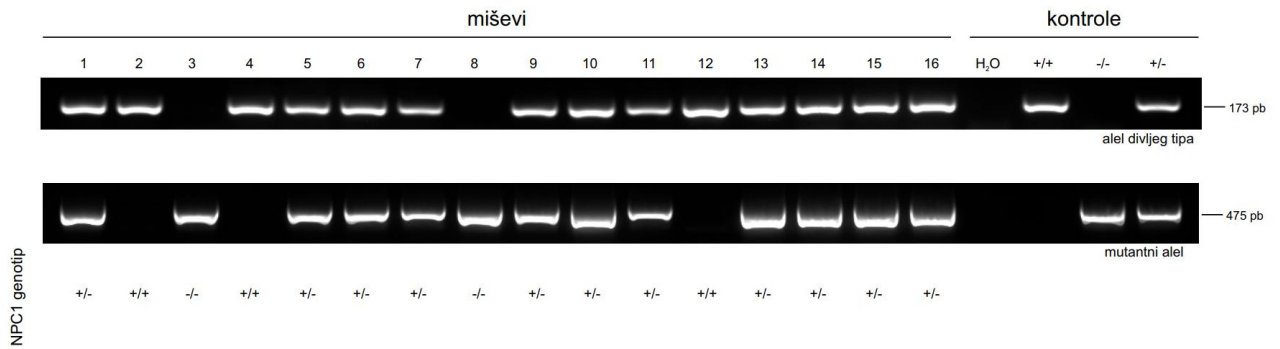
Slika 16. Povećanje razine kolesterola u stanicama CHOwt uzrokuje povećanu kolokalizaciju retromernog kompleksa i proteina APP. U stanicama CHOwt razina kolesterola povećana je: uzgajanjem u mediju sa spojem U18666A koji se koristi za oponašanja fenotipa bolesti NPC te u mediju bez egzogenih lipida (engl. *LiPid Deficient Serum*) s dodatkom kompleksa MβC-kolesterol. Nakon završetka tretmana, stanice su fiksirane te imunocitokemijski obilježene specifičnim protutijelima za Vps35 i APP-CT (protutijelo koje prepoznaje C-terminalni odsječak APP, Y188). Stanice su analizirane konfokalnim laserskim mikroskopom.

5.3. Analiza razine i smještaja proteina retromernog kompleksa u mozgovima mišjeg modela bolesti NPC

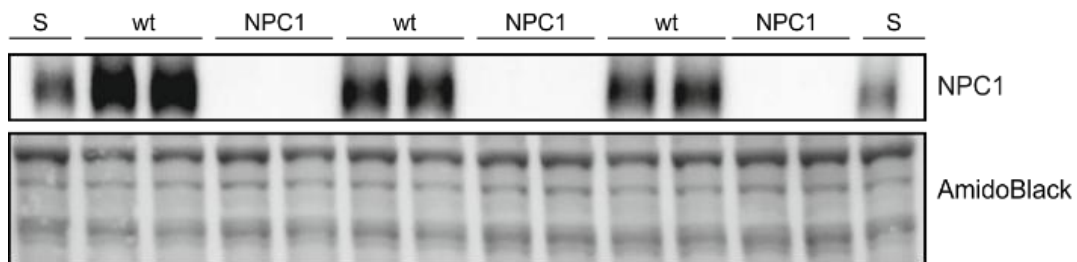
Osim u staničnom modelu bolesti NPC, razina i smještaj retromernog kompleksa analizirani su i u mišjem modelu BALB/c. Za analizu su korišteni miševi divljeg tipa (engl. wild-type, u daljnjem tekstu wt) te miševi kojima je deletiran gen za protein NPC1 (*NPCI*^{-/-}, u daljnjem tekstu miševi NPC1). S obzirom da su miševi NPC1 sterilni, miševi wt i NPC1 dobiveni su parenjem heterozigotnih roditelja (*NPCI*^{+/-}). Nakon četiri tjedna miševi su odvojeni od majke te genotipizirani metodom lančane reakcije polimeraze (PCR, Slika 17.A).

Osim provjere genotipa na razini DNA, metodom Western blot provjerena je i razina proteina NPC1 u tim miševima. U skladu s modelom, u miševima NPC1 nije bilo moguće detektirati protein NPC1 (Slika 17.B). Jedna od ključnih patoloških značajki ovog mišjeg modela je neurodegeneracija Purkinje neurona u malom mozgu koja se razvija nakon četvrtog tjedna starosti, djelomično je prisutna sa sedam tjedana starosti, a u desetom tjednu primijećen je skoro potpuni gubitak Purkinje neurona (Slika 17.C). Stoga su u ovom doktorskom radu korišteni miševi wt i NPC1 različite starosti: 4 tjedna (prije pojave prvih simptoma bolesti), 7 tjedana (nakon pojave prvih simptoma bolesti) i 10 tjedana starosti (terminalna faza bolesti). Razine i smještaj retromernog kompleksa analizirane su u trima regijama mozga koje su različito podložne i različito pogođene u bolesti NPC – u malom mozgu u kojem dolazi do specifičnog i ranog odumiranja Purkinje neurona i posljedično karakteristične pojave tremora, u kori velikog mozga u kojoj dolazi do naknadnog odumiranja neurona, te u hipokampusu koji se smatra najmanje pogođenim, odnosno kod kojeg nije uočena degeneracija neurona u bolesti NPC.

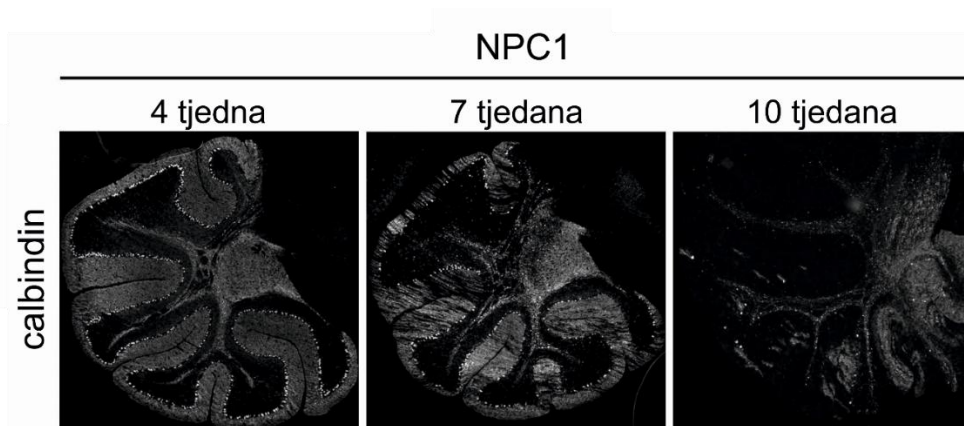
A)



B)



C)

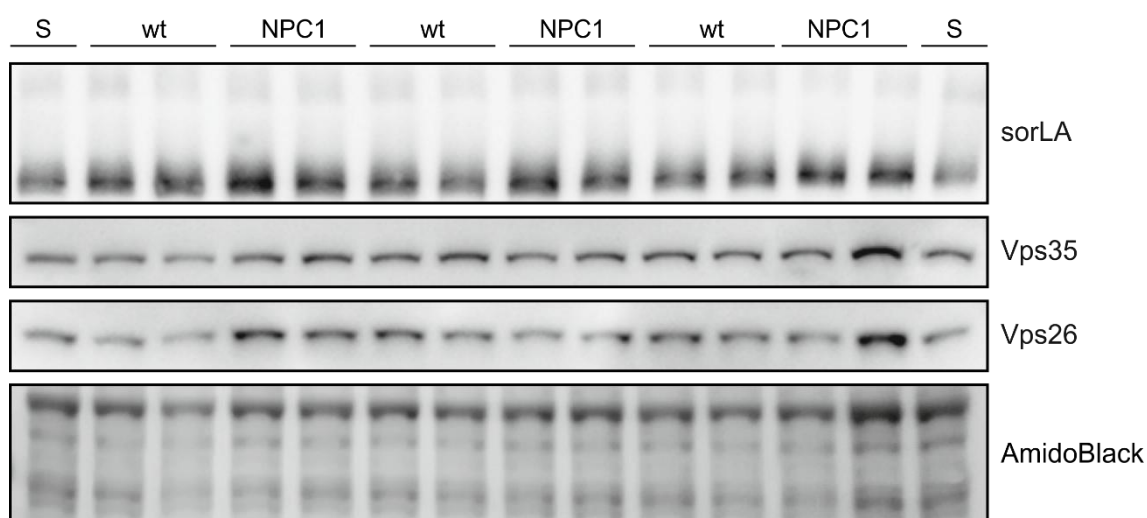


Slika 17. Karakteristika miševa NPC1 (*NPC1*^{-/-}) soja BALB/c je degeneracija Purkinje neurona u malom mozgu koja je izražena nakon četvrtog tjedna starosti. A) Genotip miševa određen je umnažanjem gena *NPC1* metodom PCR i vizualizacijom dobivenih DNA vrpce elektroforezom u gelu. B) Razina, odnosno nedostatak proteina NPC1, provjeren je u kori velikog mozga metodom Western blot. C) Kriorezovi miševa NPC1 starih 4, 7 i 10 tjedana imunohistokemijski su obojeni calbindinom, biljegom Purkinje neurona, te analizirani epifluorescentnim mikroskopom. S – standardni uzorak.

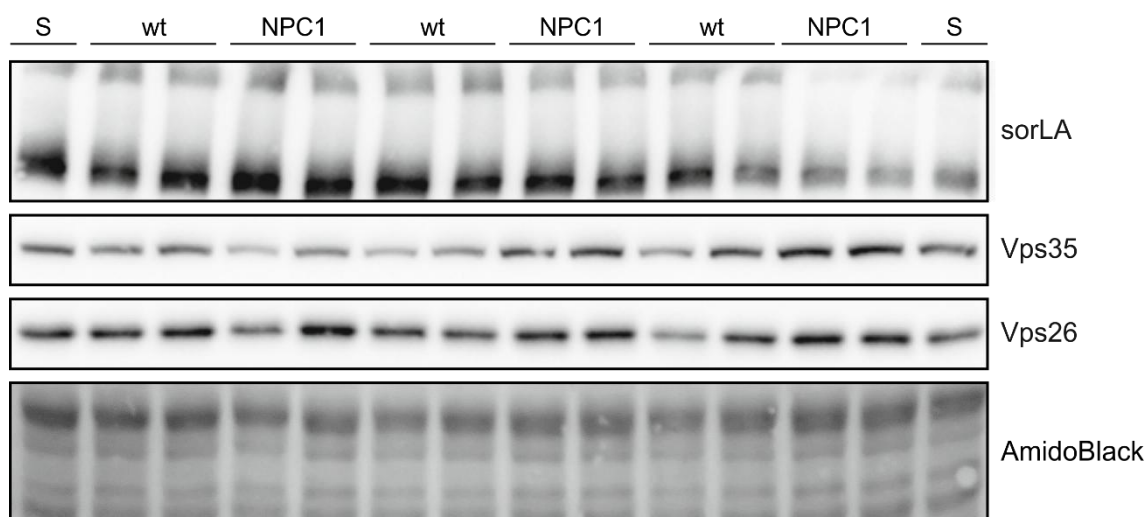
5.3.1. Analiza utjecaja genotipa *NPC1* i regije mozga (mali mozak, kora velikog mozga, hipokampus) na razinu retromernog kompleksa u miševa različite starosti

Analizirana je razina proteina retromernog kompleksa Vps26, Vps35 i retromernog receptora sorLA u miševima wt i NPC1 starosti 4 i 10 tjedana. Analizirane su tri regije (kora velikog mozga, hipokampus i mali mozak), koje su različito zahvaćene u bolesti NPC. Metoda izolacije mozga kao i homogenizacije proteina iz mišjeg mozga detaljno je opisana u poglavlju 4.5.1.2. Rezultati dobiveni metodom Western blot kvantificirani su programom ImageJ, te su statistički obrađeni. Rezultati statističke obrade za pojedini protein prikazani su u posebnim poglavljima 5.3.1.1. – 5.3.1.6.

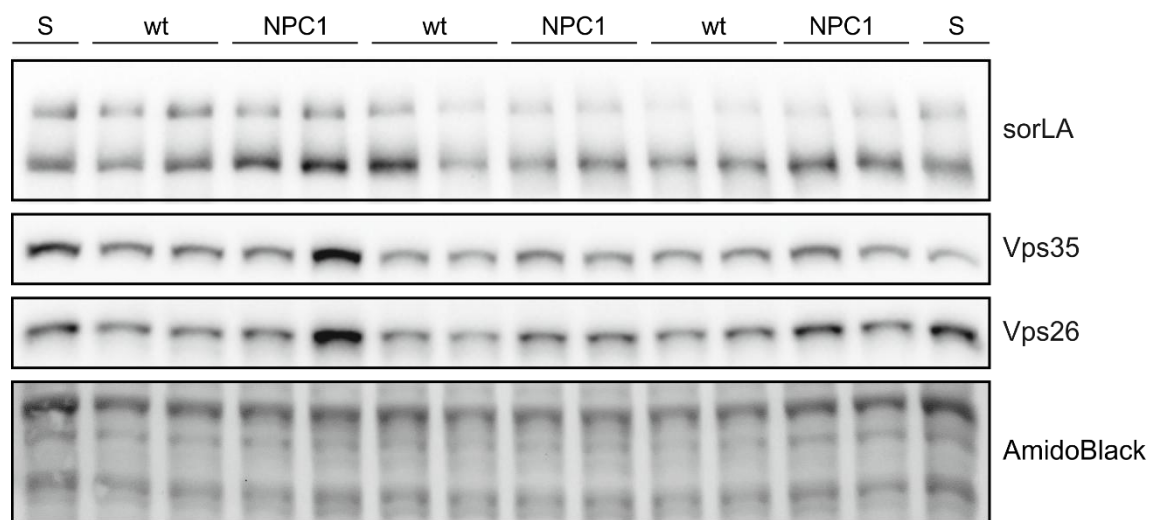
A)



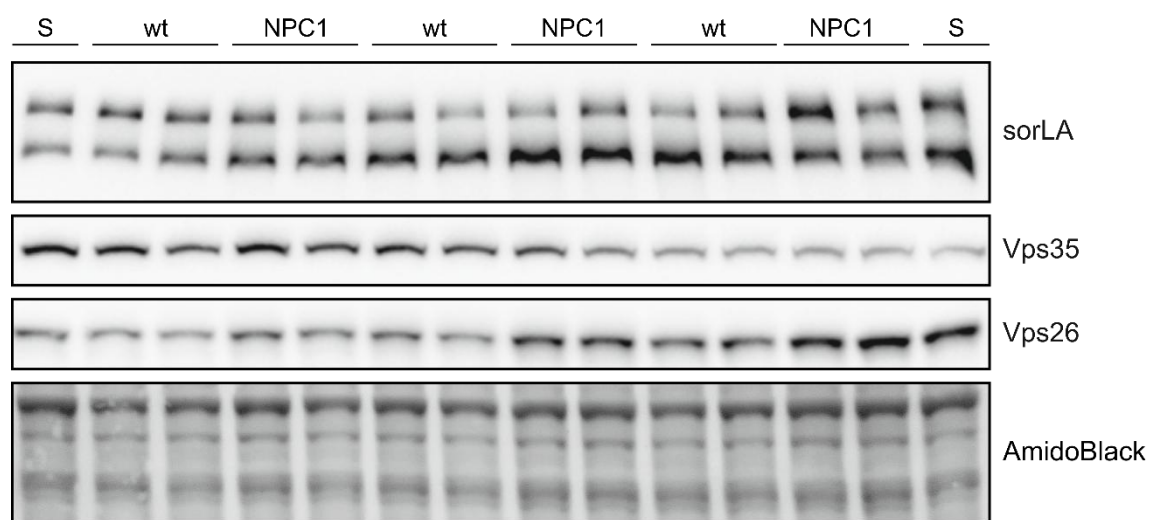
B)

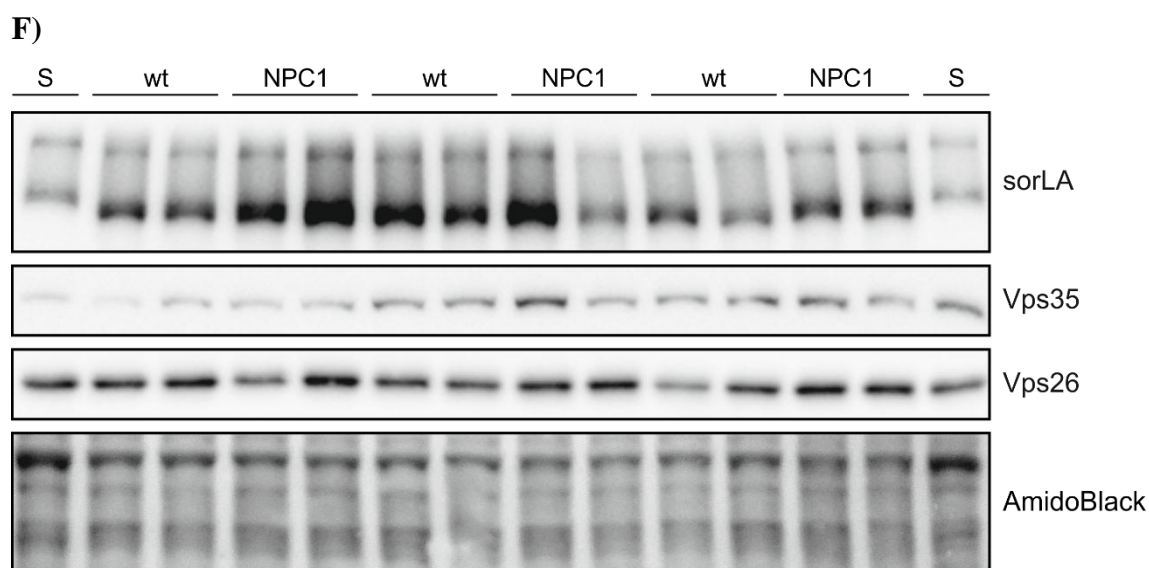
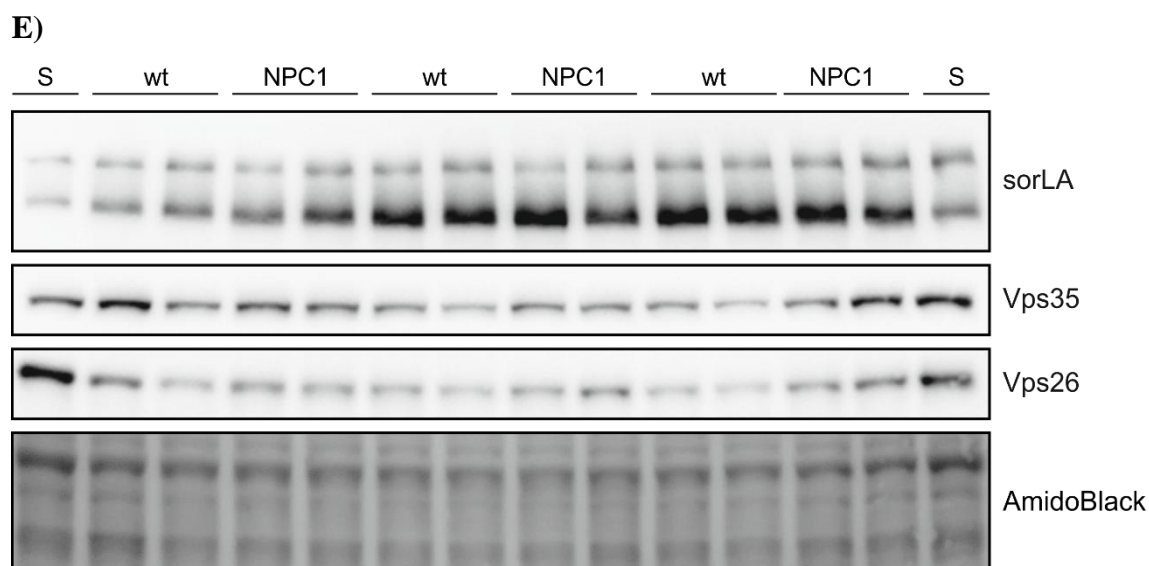


C)



D)





Slika 18. Analiza razine retromernih proteina u različitim regijama mozga miševa wt i NPC1 ovisno o starosti. Metodom Western blot analizirane su razine proteina retromera (Vps26 i Vps35) te retromernog receptora sorLA u sljedećim regijama – kori velikog mozga starosti A) 4 tjedna, B) 10 tjedana, hipokampusu starosti C) 4 tjedna, D) 10 tjedana, malom mozgu starosti E) 4 tjedna, F) 10 tjedana. Rezultati dobiveni metodom Western blot kvantificirani su u programu ImageJ (NIH, SAD) te statistički obrađeni (prikazano na Slikama 19.-21.). S – standardni uzorak.

5.3.1.1. Utjecaj genotipa *NPCI* i regije mozga na ekspresiju retromernog proteina Vps26 u miševa starih 4 tjedna

Analizom razine proteina Vps26 u mozgovima miševa starosti 4 tjedna nije pronađena statistički značajna interakcija između genotipa *NPCI* i regije mozga (kora velikog mozga, hipokampus i mali mozak) na ekspresiju proteina Vps26 ($F(2,30) = 0,526$, $p=0,596$, partial $\eta^2 = 0,034$).

S obzirom da test interakcije nije dao statističku značajnost, analiziran je pojedinačni utjecaj genotipa *NPCI* i regije mozga na ekspresiju proteina Vps26. Utvrđen je statistički značajan utjecaj genotipa *NPCI* na ekspresiju Vps26 ($F(1,30)=9,945$, $p=0,004$, partial $\eta^2=0,249$). Post hoc-testom uz Bonferronijevu korekciju utvrđeno je da su 4 tjedna stari miševi NPC1 imali značajno višu ekspresiju proteina Vps26 (razlika srednjih vrijednosti 0,189 uz 95% CI, od 0,067 do 0,311) od 4 tjedna starih miševa wt uz razinu statističke značajnosti $p=0,004$.

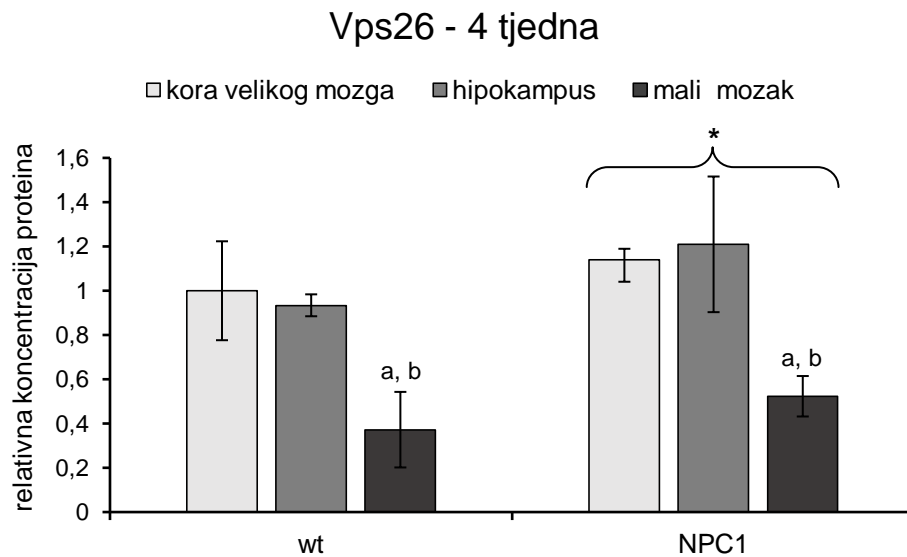
Također, u 4 tjedna starih miševa primijećena je statistički značajna razlika u ekspresiji proteina Vps26 ovisno o regiji mozga ($F(2,30)=48,130$, $p<0,001$, partial $\eta^2=0,762$). Usporedbom razlika srednjih vrijednosti između skupina post-hoc testom uz Bonferronijevu korekciju utvrđeno je da je ekspresija Vps26 u malom mozgu bila statistički značajno smanjena u odnosu na ekspresiju Vps26 u kori velikog mozga (razlika srednjih vrijednosti -0,622 uz 95% CI, od -0,808 do -0,436; $p<0,001$) kao i u odnosu na hipokampus (razlika srednjih vrijednosti -0,624 uz 95% CI, od -0,810 do -0,438; $p<0,001$). Nije bilo razlike u ekspresiji Vps26 u hipokampusu u odnosu na koru velikog mozga (Slika 19.A).

5.3.1.2. Utjecaj genotipa *NPCI* i regije mozga na ekspresiju retromernog proteina Vps26 u miševa starih 10 tjedna

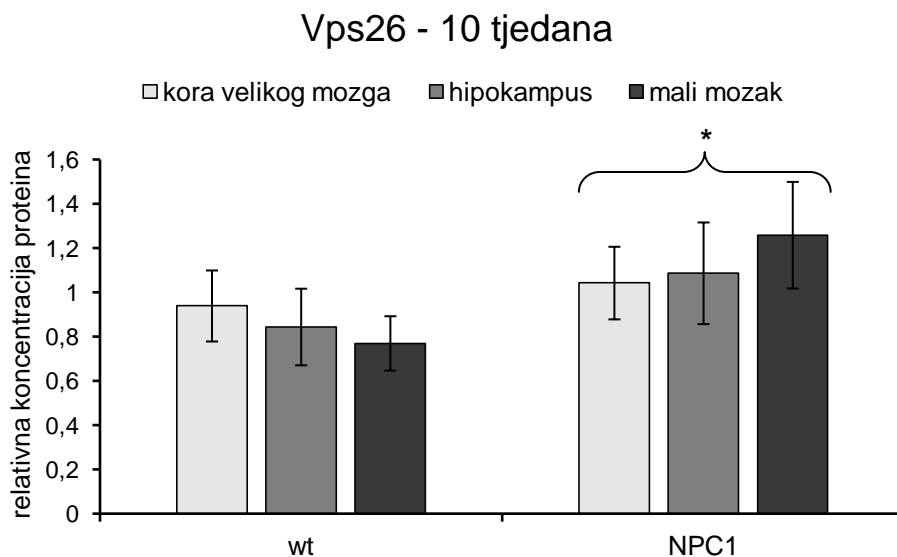
Osim u miševima starima 4 tjedna, analizirana je razina proteina Vps26 u mozgu miševa NPC1 i wt starih 10 tjedana. Utvrđeno je da nema statistički značajne interakcije između genotipa i regije mozga ($F(2,30)=0,114$, $p=0,051$, partial $\eta^2=0,180$).

S obzirom da test interakcije nije dao statističku značajnost, analiziran je pojedinačni utjecaj genotipa *NPCI* i regije mozga na ekspresiju proteina Vps26. Ekspresija proteina Vps26 se značajno razlikovala ovisno o genotipu *NPCI* ($F(1,30)=20,078$, $p<0,001$, partial $\eta^2=0,401$). Post hoc testom uz Bonferronijevu korekciju utvrđeno je da su 10 tjedana stari mozgovi miševa NPC1 (u odnosu na wt) imali višu ekspresiju proteina Vps26 (prosjeak 0,278 uz 95% CI, od 0,151 do 0,405) s razinom statističke značajnosti $p=0,004$. Ekspresija proteina Vps26 u 10 tjedana starih miševa NPC1 u odnosu na wt nije se statistički značajno razlikovala ovisno o regiji mozga ($F(1,30)=0,208$, $p=0,814$, partial $\eta^2=0,014$) (Slika 19.B).

A)



B)



Slika 19. Razina retromernog proteina Vps26 povećana je u mozgu miševa NPC1 i u ranoj (4 tjedna) i u krajnjoj fazi bolesti (10 tjedana). Rezultati dobiveni metodom Western blot analizirani su software-om ImageJ i normalizirani prema razini bojenja AmidoBlack. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD. Dobivene vrijednosti analizirane su dvosmjernim testom ANOVA. Razina retromernog proteina Vps26 povećana je u sve tri analizirane regije mozga (kora velikog mozga, hipokampus i mali mozak) u miševima NPC1 starosti A) 4 tjedna i B) 10 tjedana u odnosu na miševe divljeg tipa (wt). U miševima starima 4 tjedna uočena je značajno manja razina proteina Vps26 u malom mozgu ($p < 0,001$) u odnosu na a) koru velikog mozga i b) hipokampus.

5.3.1.3. Utjecaj genotipa *NPCI* i regije mozga na ekspresiju retromernog proteina Vps35 u miševa starih 4 tjedna

Analizom razine proteina Vps35 u mozgovima miševa starih 4 tjedna utvrđeno je da nema interakcije između genotipa *NPCI* i regija mozga ($F(2,30)=0,756$, $p=0,478$, partial $\eta^2=0,048$). S obzirom da test interakcije nije dao statističku značajnost, analiziran je pojedinačni utjecaj genotipa *NPCI* i regije mozga na ekspresiju proteina, gdje je utvrđeno da u 4 tjedna starih miševa genotip *NPCI* nema značajan utjecaj na ekspresiju Vps35 ($F(1,30)=2,095$, $p=0,158$, partial $\eta^2=0,065$). No, utjecaj regije mozga na ekspresiju proteina Vps35 između 4 tjedna starih miševa *NPCI* i wt bio je statistički značajan ($F(2,30)=8,805$, $p<0,001$, partial $\eta^2=0,370$). Usporedbom razlika srednjih vrijednosti između skupina post-hoc testom uz Bonferronijevu korekciju utvrđeno je da je hipokampus 4 tjedna starih miševa imao veću ekspresiju proteina Vps35 od kore velikog mozga (prosjek 0,400 uz 95% CI, od 0,091 do 0,710; $p=0,008$). Također, hipokampus je imao statistički značajno veću razinu proteina Vps35 od malog mozga (prosjek 0,476 uz 95% CI, od 0,167 do 0,786; $p=0,001$.) (Slika 20.A).

5.3.1.4. Utjecaj genotipa *NPCI* i regije mozga na ekspresiju retromernog proteina Vps35 u miševa starosti 10 tjedana

U miševima starima 10 tjedana nije bilo statistički značajne interakcije genotipa *NPCI* i regije mozga na razinu proteina Vps35 ($F(2,30)=2,782$, $p=0,078$, partial $\eta^2=0,156$). S obzirom da test interakcije nije dao statističku značajnost, analiziran je pojedinačni utjecaj genotipa *NPCI* i regije mozga na ekspresiju proteina, gdje se utvrdilo da u 10 tjedana starih miševa genotip *NPCI* nema značajan utjecaj na ekspresiju Vps35 ($F(1,30)=1,510$, $p=0,229$, partial $\eta^2=0,048$). Također, ekspresija proteina Vps35 nije bila značajno promijenjena u različitim regijama mozga miševa starih 10 tjedana ($F(1,30)=3,149$, $p=0,057$, partial $\eta^2=0,174$) (Slika 20.B).

5.3.1.5. Utjecaj genotipa *NPC1* i regije mozga na ekspresiju retromernog receptora sorLA u miševa starih 4 tjedna

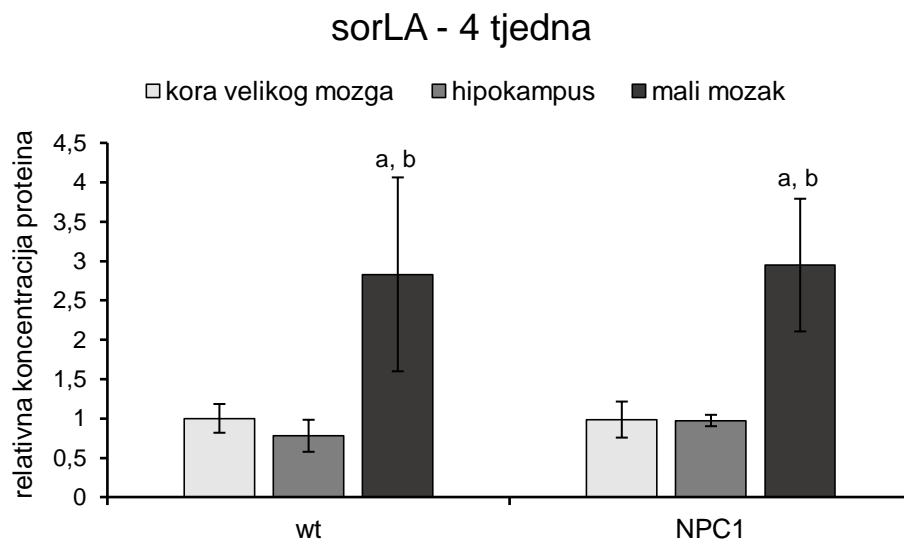
Analizom razine proteina sorLA u mozgovima miševa wt i *NPC1* starosti 4 tjedna utvrđeno je da nije postojala statistički značajna interakcija između genotipa *NPC1* i regije mozga na ekspresiju proteina sorLA ($F(2,30)=0,573$, $p=0,570$, partial $\eta^2=0,038$). S obzirom da test interakcije nije dao statističku značajnost, analiziran je pojedinačni utjecaj genotipa *NPC1* i regije mozga na ekspresiju proteina, te je utvrđeno da se ekspresija proteina sorLA nije statistički značajno razlikovala između 4 tjedna starih miševa wt i *NPC1* ($F(1,30)=1,156$, $p=0,291$, partial $\eta^2=0,038$).

Međutim, razina proteina sorLA u različitim regijama mozga statistički se značajno razlikovala u 4 tjedna starih miševa ($F(2,30)=49,115$, $p<0,001$, partial $\eta^2=0,772$). Mali mozak je imao statistički značajno veću razinu ekspresije proteina sorLA od kore velikog mozga (razlika srednjih vrijednosti 0,508, uz 95% CI, od 0,349 do 0,666; $p<0,001$) kao i od hipokampusa (razlika srednjih vrijednosti 0,570, uz 95% CI, od 0,408 do 0,733; $p<0,001$) (Slika 21.A).

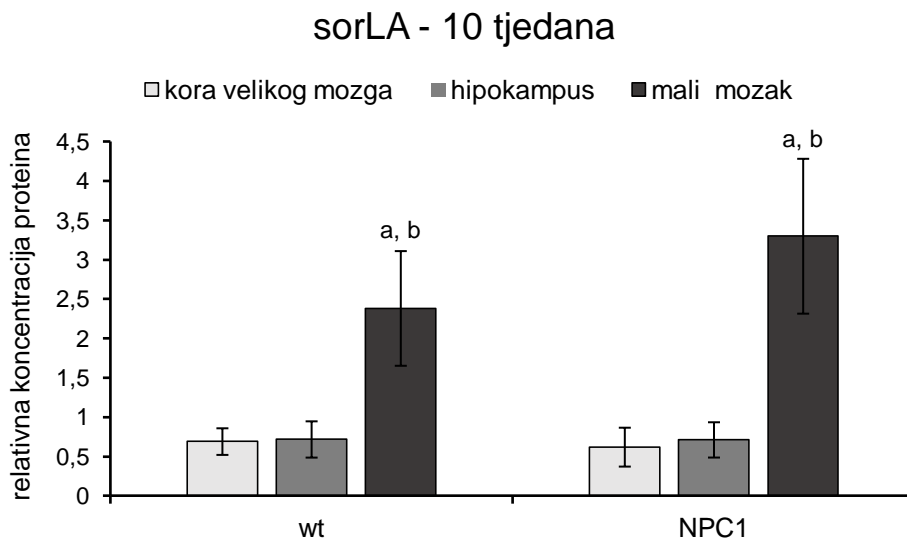
5.3.1.6. Utjecaj genotipa *NPC1* i regije mozga na ekspresiju retromernog receptora sorLA u miševa starih 10 tjedana

Utvrđeno je da nije bilo statistički značajne interakcije genotipa *NPC1* i regije mozga na ekspresiju proteina sorLA u mozgovima miševa wt i *NPC1* starosti 10 tjedana ($F(2,30)=3,250$, $p=0,053$, partial $\eta^2=0,178$). S obzirom da test interakcije nije dao statističku značajnost, analiziran je pojedinačni utjecaj genotipa *NPC1* i regije mozga na ekspresiju proteina, te je utvrđeno da se ekspresija proteina sorLA u 10 tjedana starih miševa nije statistički značajno razlikovala s obzirom na genotip *NPC1* ($F(1,30)=2,511$, $p=0,124$, partial $\eta^2=0,077$), dok je ekspresija proteina sorLA ovisno o regiji mozga bila statistički značajno promijenjena ($F(2,30)=65,986$, $p<0,001$, partial $\eta^2=0,815$). Usporedbom razlika srednjih vrijednosti između skupina post-hoc testom uz Bonferronijevu korekciju utvrđeno je da je razina proteina sorLA u malom mozgu bila statistički značajno veća u odnosu na koru velikog mozga (razlika srednjih vrijednosti 2,186 uz 95% CI, od 1,636 do 2,736; $p<0,001$). Ekspresija proteina sorLA u malom mozgu značajno je bila veća i od ekspresije u hipokampusu (razlika srednjih vrijednosti 2,126 uz 95% CI od 1,577 do 2,676; $p<0,001$) (Slika 21.B).

A)



B)



Slika 21. Razina retromernog receptora sorLA nije promijenjena u miševima NPC1. Rezultati dobiveni metodom Western blot analizirani su software-om ImageJ i normalizirani prema razini bojenja AmidoBlack. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD. Dobivene vrijednosti analizirane su dvosmjernim testom ANOVA. Razina retromernog receptora nije promijenjena ni u jednoj analiziranoj regiji mozga (kora velikog mozga, hipokampus i mali mozak) u miševima NPC1 starosti A) 4 tjedna i B) 10 tjedana u odnosu na miševе divljeg tipa (wt). U miševima starima A) 4 tjedna i B) 10 tjedana uočena je statistički značajno veća razina proteina sorLA u malom mozgu ($p < 0,001$) u odnosu na a) koru velikog mozga i b) hipokampus.

5.3.2. Analiza rasprostranjenosti retromernog proteina Vps35 i retromernog receptora sorLA u različitim regijama mozga

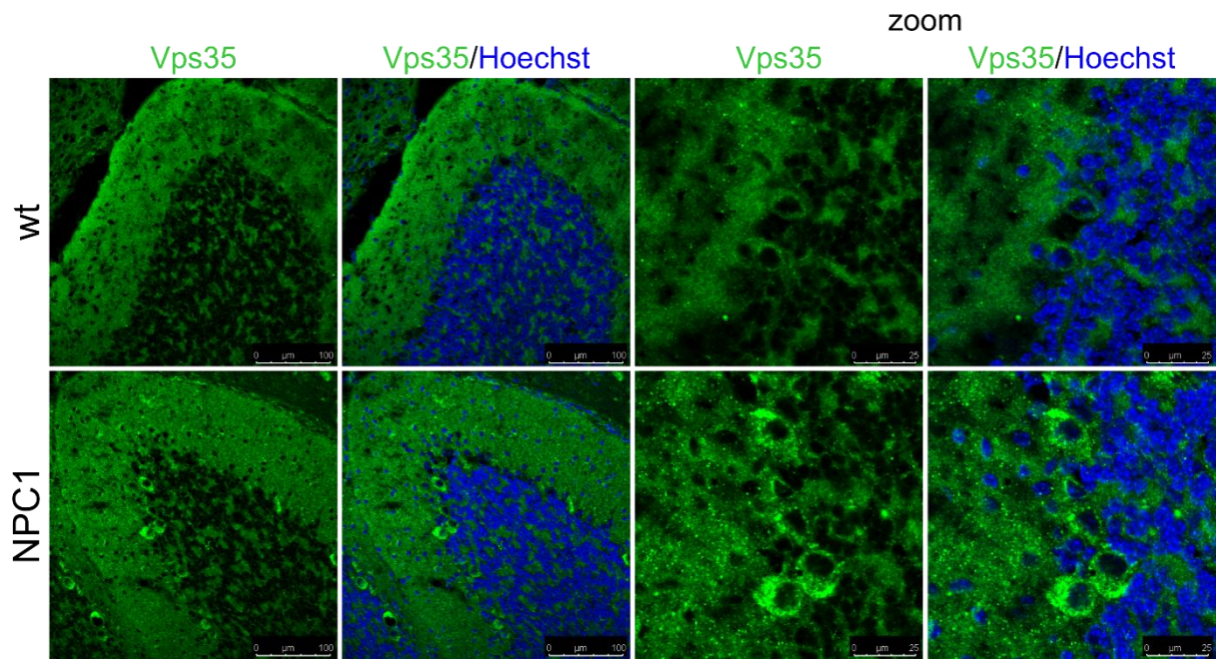
Rasprostranjenost retromernog proteina Vps35 (Slika 22.) te retromernog receptora sorLA (Slika 23.) analizirana je u malom mozgu, kori velikog mozga i hipokampusu miševa NPC1 i wt starih 10 tjedana. Njihov smještaj analiziran je u odnosu na jezgre obilježene bojom Hoechst.

U malom mozgu metodom imunohistokemije praćena je kolokalizacija proteina Vps35 i boje Hoechst kojom su obilježene jezgre stanica. S obzirom da odumiranje Purkinje neurona započinje od frontalnih prema kaudalnim režnjevima, pri čemu su 9. i 10. režanj najočuvaniji (Purkinje neuroni u ovim režnjevima su u 10. tjednu starosti NPC1 miševa još uvijek „otporni“ na degeneraciju), u svim analizama na konfokalnom mikroskopu slikan je uvijek 9. ili 10. režanj. Protein Vps35 smješten je u malom mozgu u somi Purkinje neurona i u molekularnom sloju. Međutim, dok je u somi Purkinje neurona miševa wt protein Vps35 raspoređen jednoliko unutar some, u miševima NPC1 bilo je prisutno nakupljanje proteina Vps35 u somi preostalih Purkinje neurona (Slika 22.A).

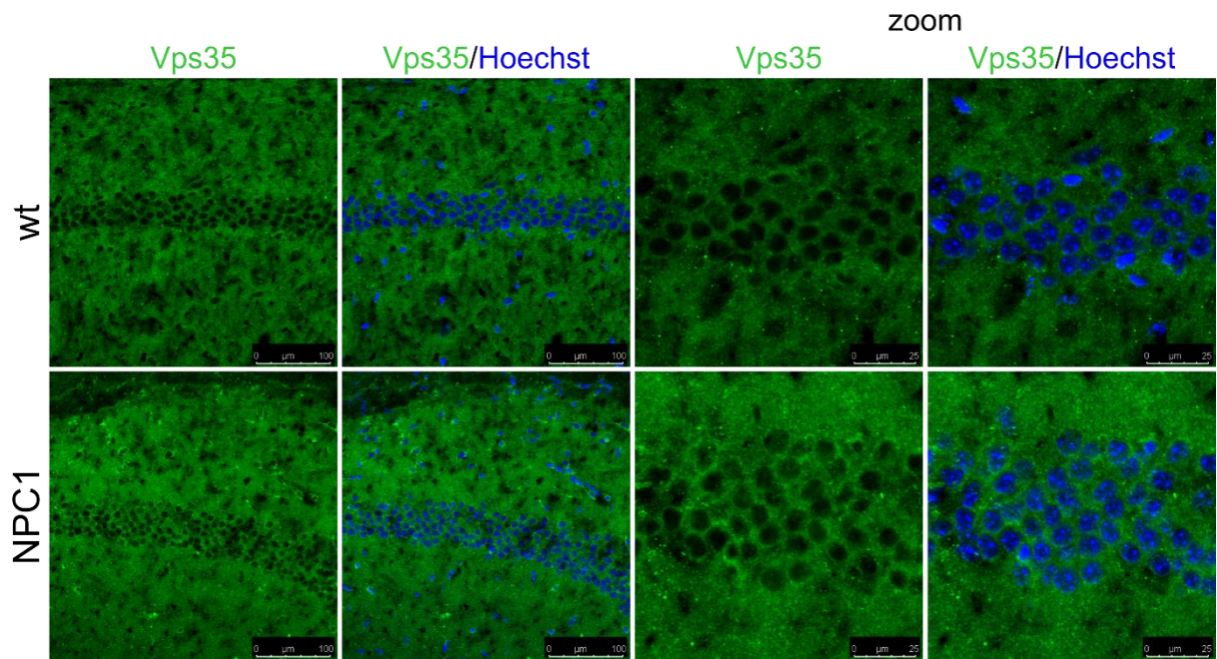
U hipokampusu praćen je smještaj retromernog proteina Vps35 u različitim regijama. Smještaj proteina Vps35 nije primijećen u regijama CA1 (Slika 22.B) i CA2 nego samo u regiji CA3 (Slika 22.C) hipokampusu te u neuronima hilusa dentatnog girusa u miševima wt i NPC1 (Slika 22.D). Uočeno je da je u wt miševima najjači signal proteina Vps35 prisutan u mahovinastim vlaknima (Slika 22.C), dok signal Vps35 nije detektiran u piramidalnim neuronima regije CA3. Za razliku od toga, u miševima NPC1 primijećen je gubitak signala proteina Vps35 u mahovinastim vlaknima, a porast njegovog signala u piramidalnim neuronima regije CA3. Također, u miševima NPC1 Vps35 nakupljao se u hilusu neurona dentatnog girusa (Slika 22.D)

U miševima NPC1 primijećeno je nakupljanje Vps35 u somi neurona kore velikog mozga. Nasuprot tome, u miševima wt signal za protein Vps35 bio je slab, raspršen, bez prisutnog nakupljanja, nalik pozadinskom bojenju (Slika 22.E).

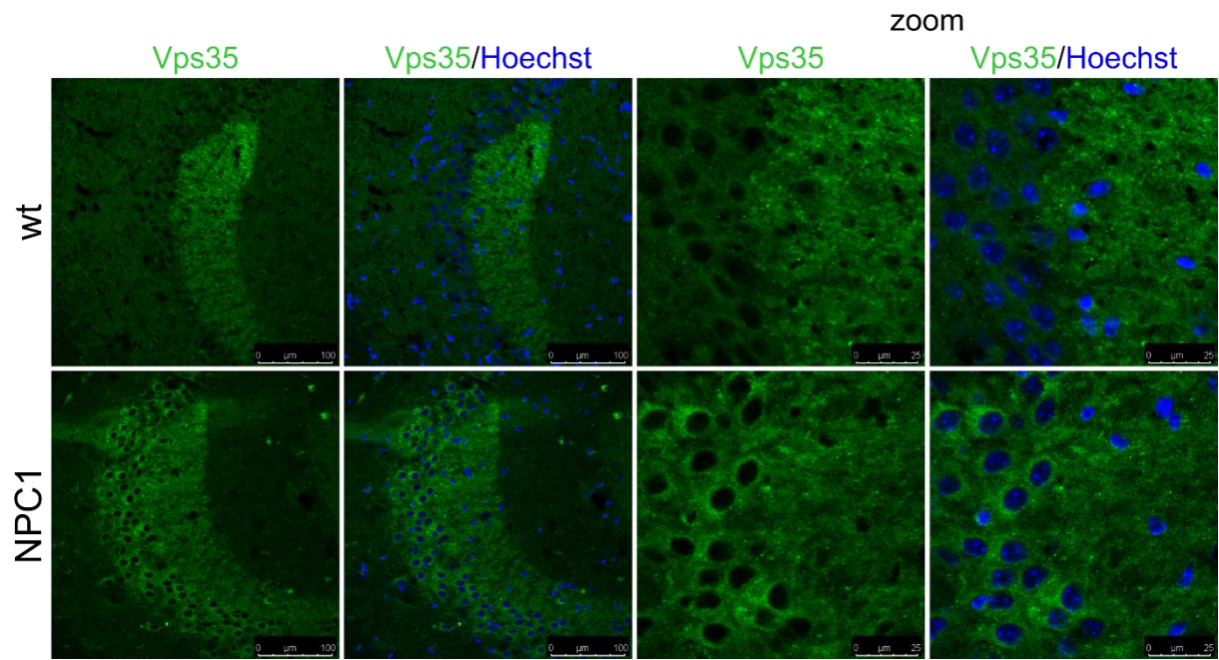
A)



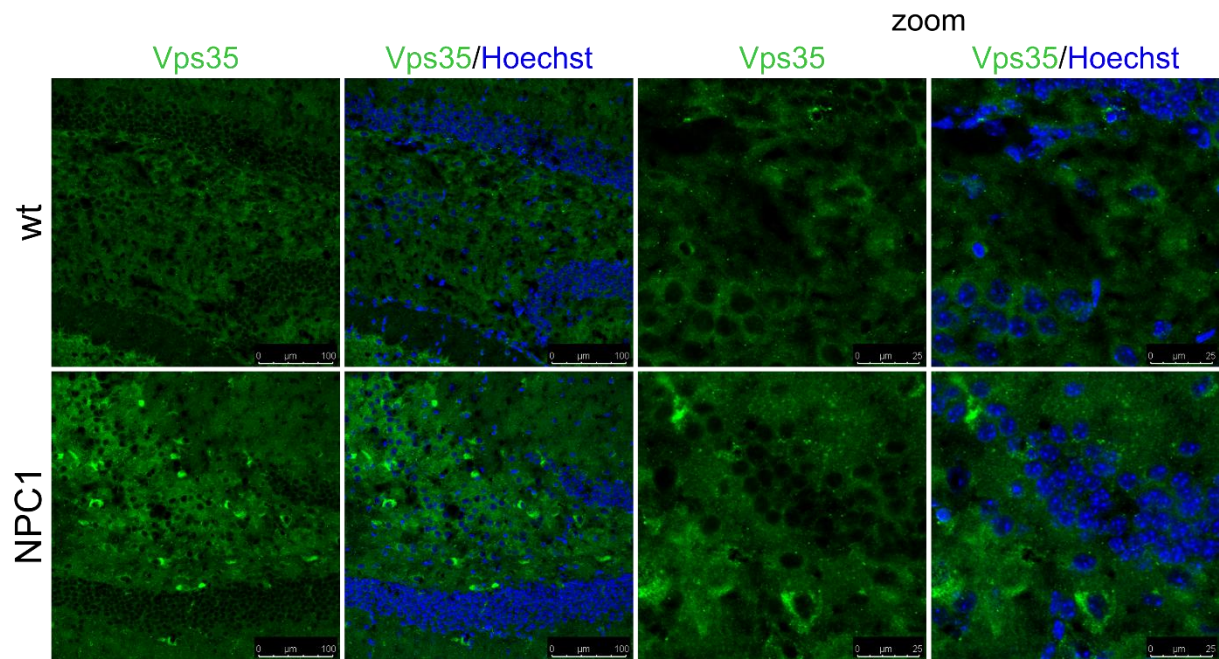
B)



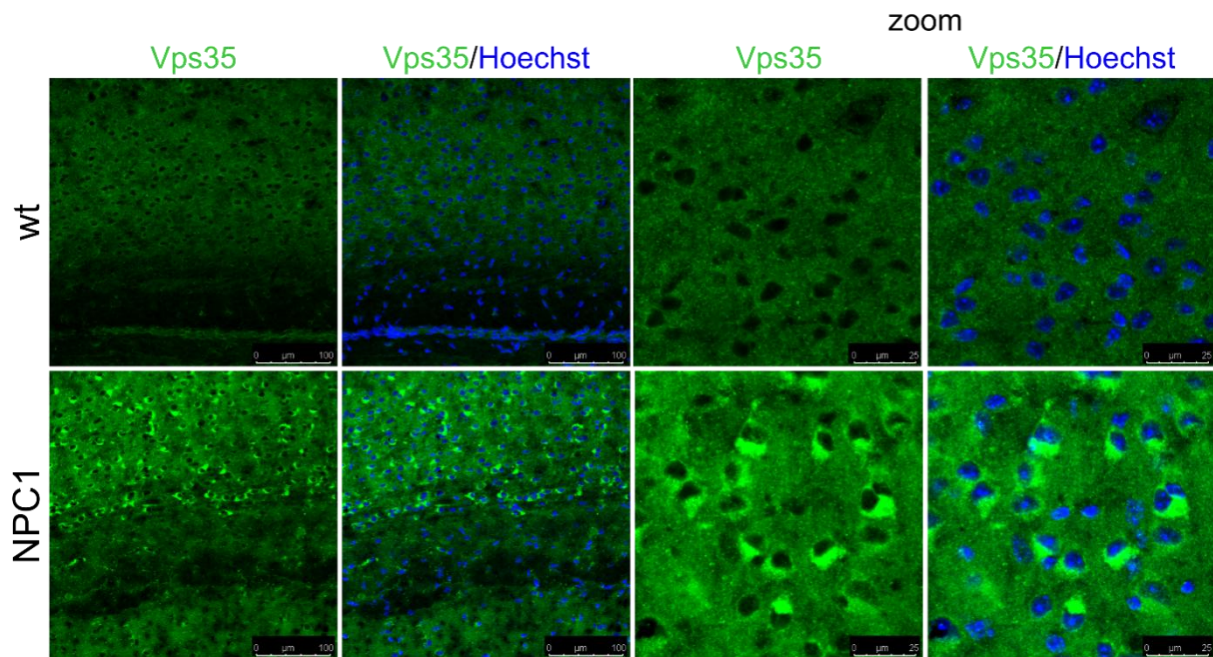
C)



D)



E)



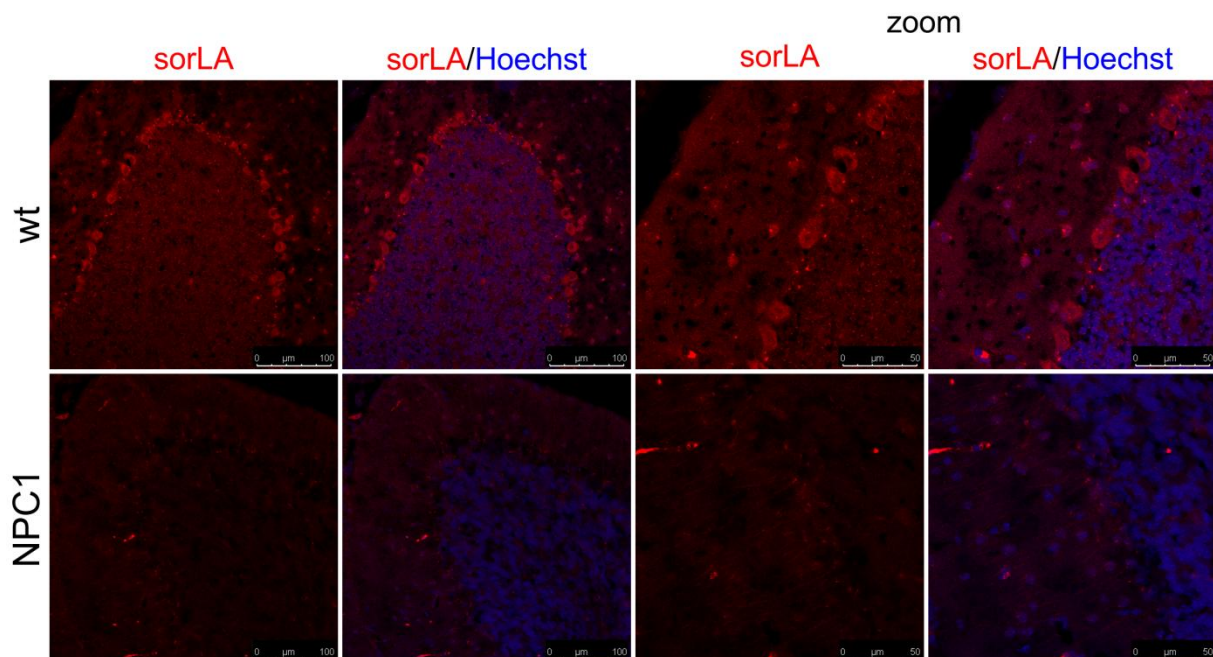
Slika 22. Retromerni protein Vps35 nakuplja se u somama neurona u svim regijama mozga miševa NPC1 starih 10 tjedana. Izolirane polutke mozgova fiksirane su, kriočuvane u otopini saharoze i zamrznute pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do rezanja na kriotomu. Kriorezovi su imunohistokemijski bojani sa specifičnim primarnim protutijelom za protein Vps35 i biljgom staničnih jezgara Hoechst te analizirani konfokalnim laserskim mikroskopom. Prikazane su regije A) mali mozak, B) CA1 regija hipokampusa, C) CA3 regija hipokampusa, D) dentatni girus u hipokampusu, E) kora velikog mozga.

Smještaj retromernog receptora sorLA u malom mozgu praćen je u odnosu na biljeg staničnih jezgri Hoechst. Nije bilo moguće pratiti kolokalizaciju proteina sorLA i calbindina jer su oba primarna protutijela iz iste životinje, miša. U malom mozgu wt miševa receptor sorLA bio je smješten unutar some Purkinje neurona kao i unutar some neurona u molekularnom sloju. U malom mozgu miševa NPC1 signal za receptor sorLA bio je veoma smanjen u odnosu na miševu wt (Slika 23.A).

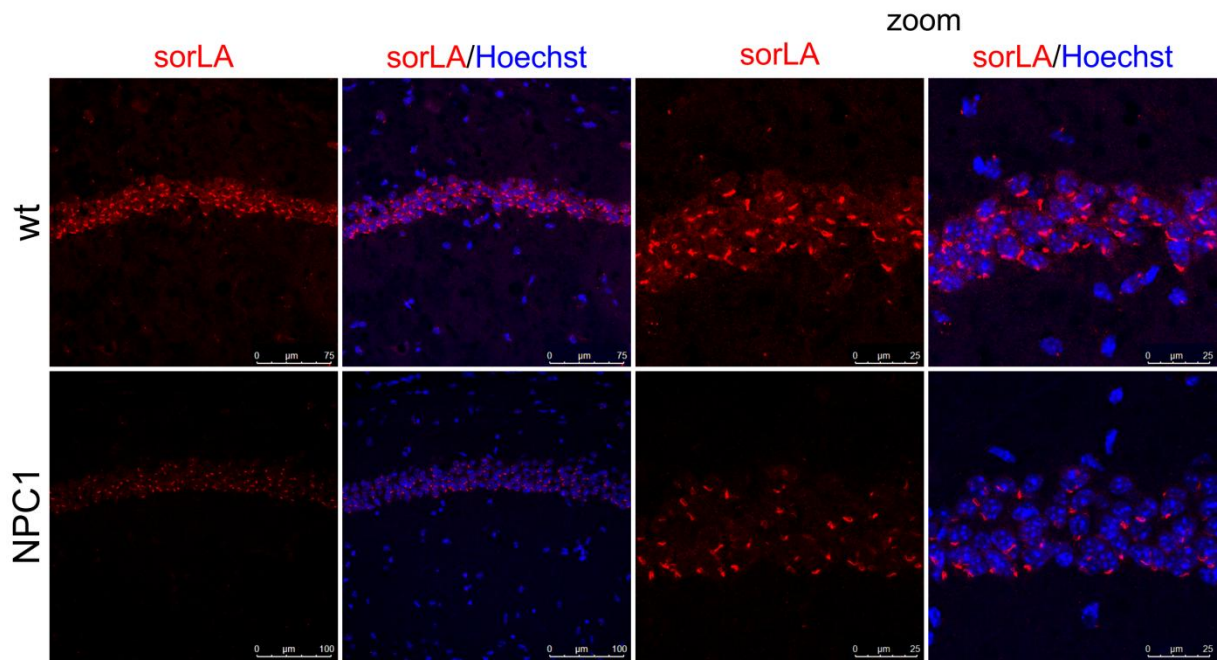
Za razliku od retromernog proteina Vps35 kojega je metodom imunohistokemije u hipokampusu miševa wt i NPC1 bilo moguće detektirati samo u regijama CA3 i u hilusu, signal za receptor sorLA bio je najjači u svim regijama hipokampusa u odnosu na koru velikog mozga i mali mozak. Također, od svih regija hipokampusa, najjači signal za receptor sorLA bio je u regiji CA1 (Slika 23.B). Receptor sorLA bio je smješten perinuklearno u piramidalnim stanicama regije CA1 (Slika 23.B), CA2 i CA3 (Slika 23.C) te hilusa dentatnog girusa, kao i u granularnim stanicama dentatnog girusa (Slika 23.D). Kao i u drugim analiziranim dijelovima mozga, signal za receptor sorLA bio je puno slabiji u svim regijama hipokampusa miševa NPC1 u odnosu na wt (Slika 21).

U kori velikog mozga miševa wt receptor sorLA je bio smješten u somi neurona u karakterističnom prstenastom obliku. U miševima NPC1 signal za protein sorLA bio je u većini neurona puno slabiji nego u korteksu miševa wt (Slika 23.E).

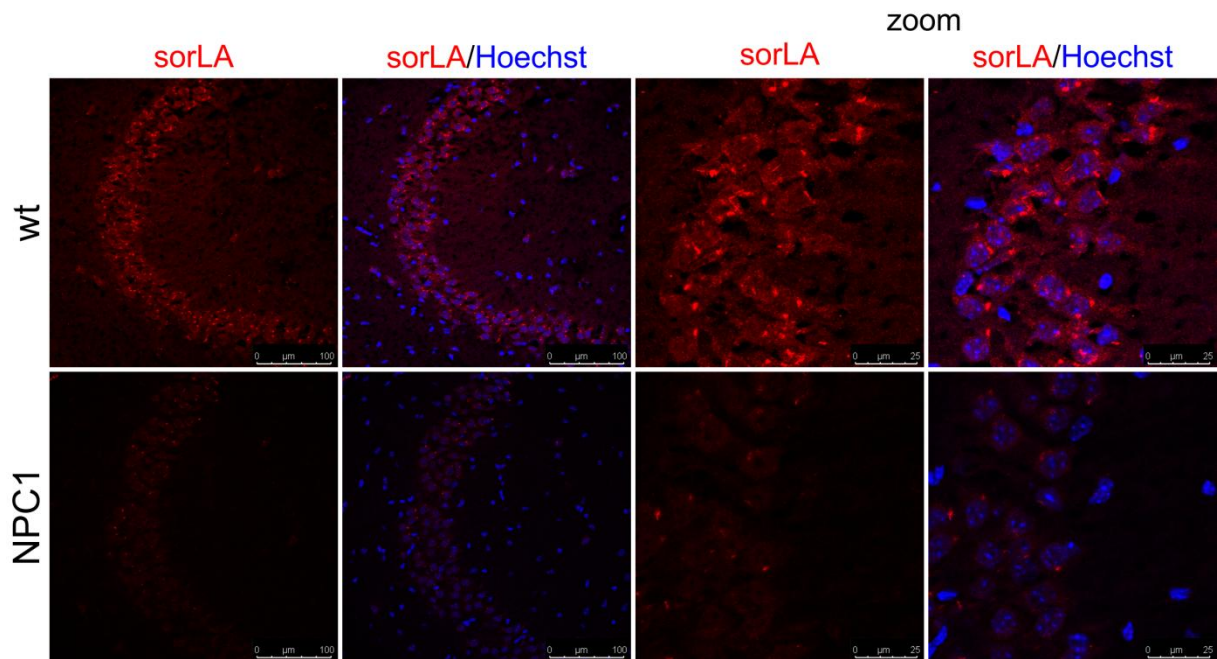
A)



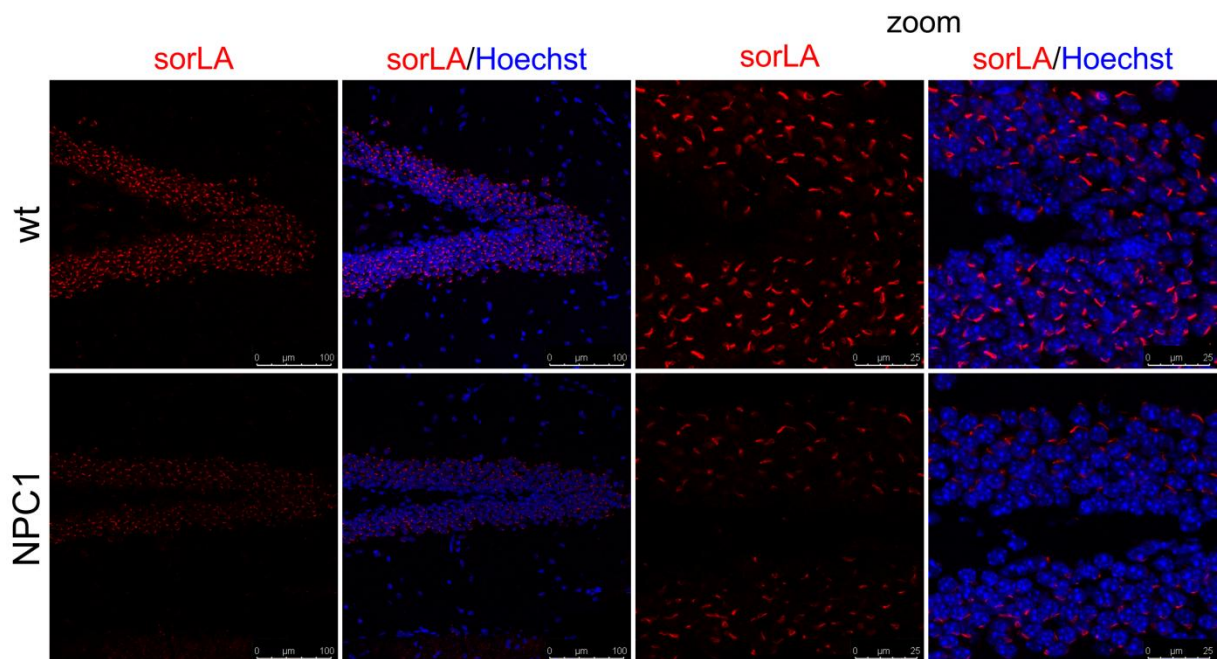
B)



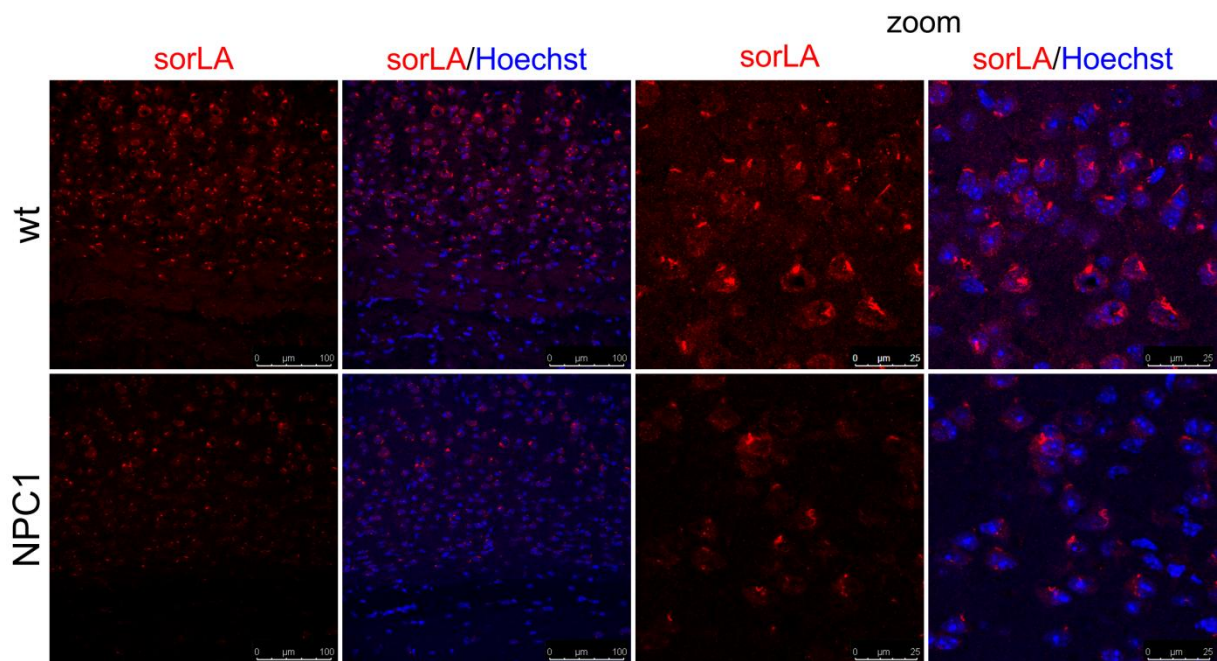
C)



D)



E)



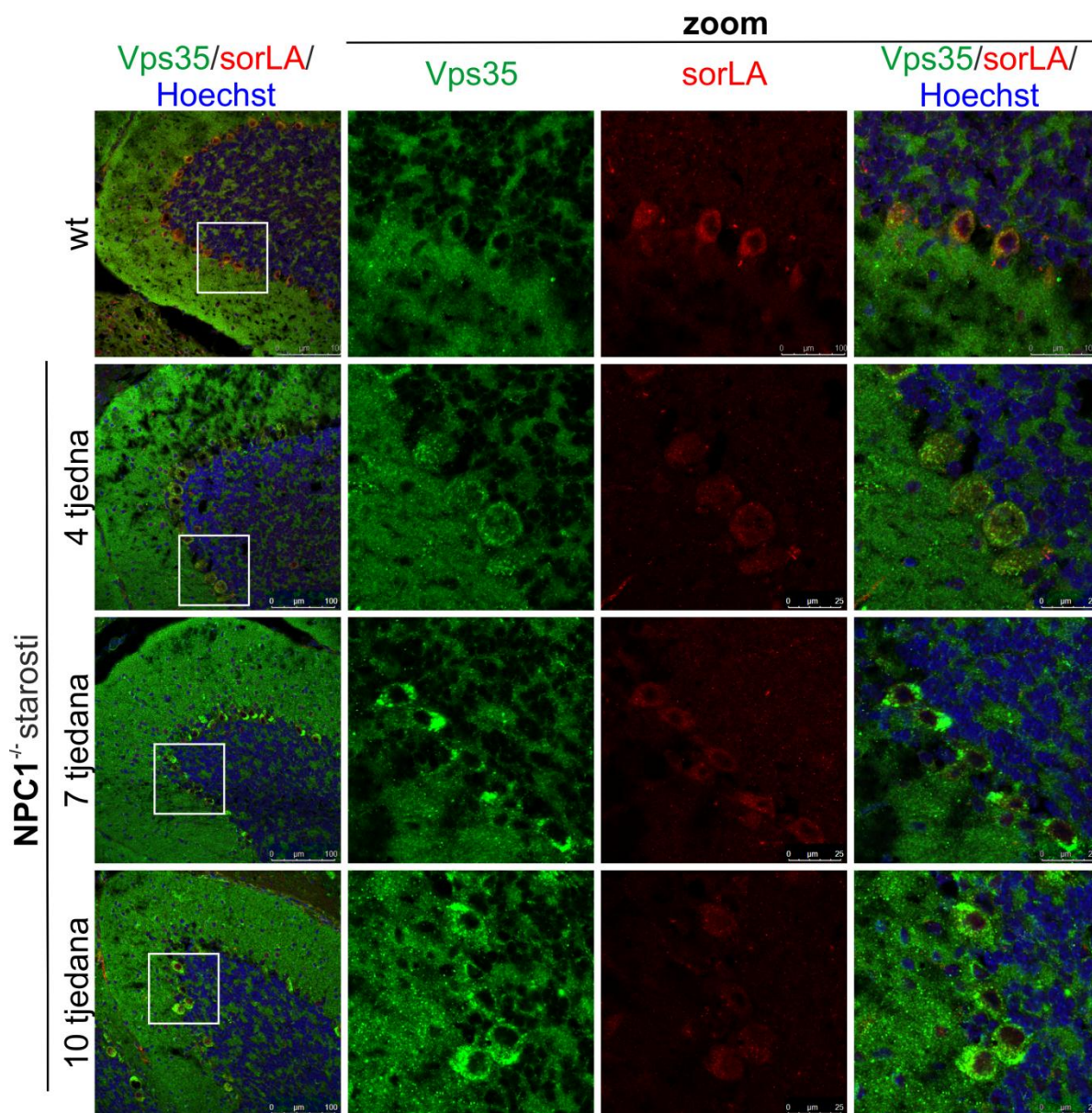
Slika 23. Retromerni receptor sorLA smješten je u somama neurona u svim dijelovima mozga i smanjen je u mozgu miševa NPC1 starih 10 tjedana. Izolirane polutke mozgovia miševa fiksirane su, krioočuvane u otopini saharoze i zamrznute pri -80 °C do rezanja na kriotomu. Kriorezovi su imunohistokemijski bojani sa specifičnim primarnim protutijelom za protein sorLA i biljgom staničnih jezgara Hoechst te analizirani konfokalnim laserskim mikroskopom. Prikazane su regije A)

mali mozak, B) CA1 regija hipokampusa, C) CA3 regija hipokampusa, D) dentatni girus u hipokampusu, E) kora velikog mozga.

5.3.3. Analiza razine i kolokalizacije retromernog proteina Vps35 i retromernog receptora sorLA u mozgu miševa NPC1 ovisno o starosti

Nakon uočene različite distribucije retromernog proteina Vps35 i receptora sorLA u mozgu miševa, kao i promijenjenog smještaja tih proteina u miševima NPC1 u odnosu na miševе wt starosti 10 tjedana, analizirana je promjena smještaja proteina Vps35 i sorLA kao i kolokalizacija ovih proteina u odnosu na progresiju bolesti, tj. u mozgovima 4, 7 i 10 tjedana starih miševa wt i NPC1.

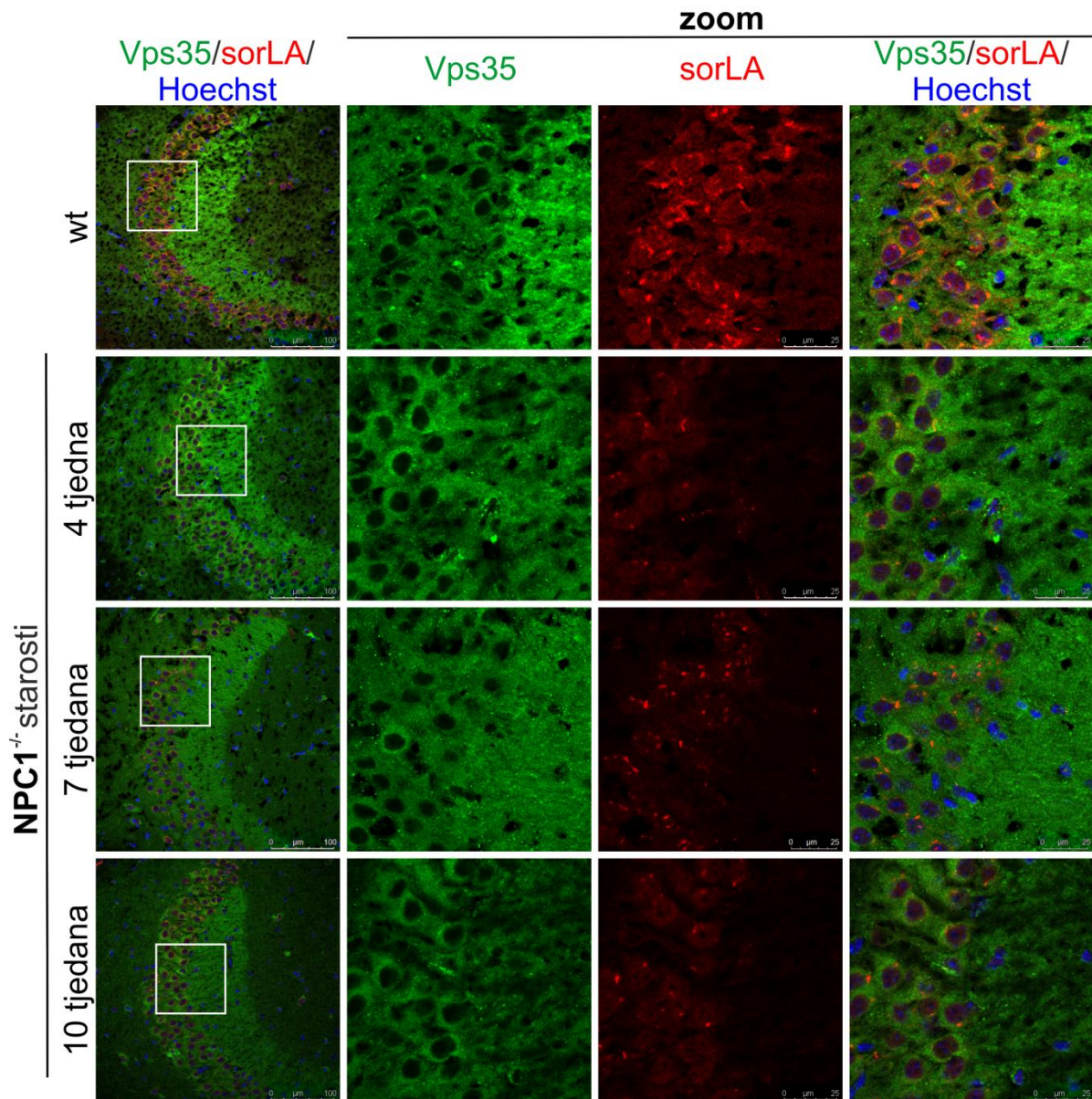
U malom mozgu miševa NPC1 starosti 4, 7 i 10 tjedana praćen je smještaj proteina Vps35 i sorLA i uspoređen sa smještajem u miševima wt. Analiziran je i smještaj proteina Vps35 i sorLA u miševima wt ovisno o starosti. Uočeno je da miševi wt starosti 4, 7 i 10 tjedana ne pokazuju promjene smještaja niti jačine signala za ove proteine. Stoga je u daljnjim pokusima i prikazima rezultata korištena samo jedna kontrola, tj. miševi wt starosti 10 tjedana. U miševima NPC1 različite starosti smještaj proteina Vps35 i sorLA se nije mijenjao, ali je jačina njihovog signala bila različita. S obzirom da nije bilo moguće uzorke usporedno bojiti s biljekom Purkinje neurona, uzorci su bojani bojom za jezgru neurona Hoechst koja dodatno potvrđuje broj i smještaj Purkinje neurona. Prema signalima za Hoechst, ali i Vps35 i sorLA, odumiranje Purkinje neurona uočeno je već u miševa NPC1 starosti 4 tjedana. Ova patološka karakteristika se pogoršava sa starenjem te je u miševima starima 10 tjedana prisutan još mali broj Purkinje neurona u 9. i 10. reznju. U Purkinje neuronima malog mozga već u 4 tjedna starih miševa NPC1 uočen je smanjen signal za receptor sorLA. Nasuprot tome, u somi Purkinje neurona već u 4 tjedna starih miševa NPC1 nakupljao se protein Vps35, a nakupljanje je bilo izraženije sa starenjem. U Purkinje neuronima starim 7 tjedana Vps35 se nakuplja po čitavoj somi, a nakupljanje se nastavilo i dalje u svim preživjelim Purkinje neuronima starima 10 tjedana (Slika 24.).



Slika 24. Ekspresija retromernog receptora sorLA u Purkinje neuronima miševa NPC1 smanjuje se ovisno o starosti. U preživjelim Purkinje neuronima paralelno sa sniženjem ekspresije receptora sorLA dolazi do nakupljanja retromernog proteina Vps35 u somi neurona. Izolirane polutke mozгова miševa fiksirane su, krioočuvane u otopini saharoze i zamrznute pri -80 °C do rezanja na kriotomu. Kriorezovi su imunohistokemijski bojeni specifičnim primarnim protutijelom za protein Vps35 i retromerni receptor sorLA te biljegom staničnih jezgara Hoechst te analizirani konfokalnim laserskim mikroskopom.

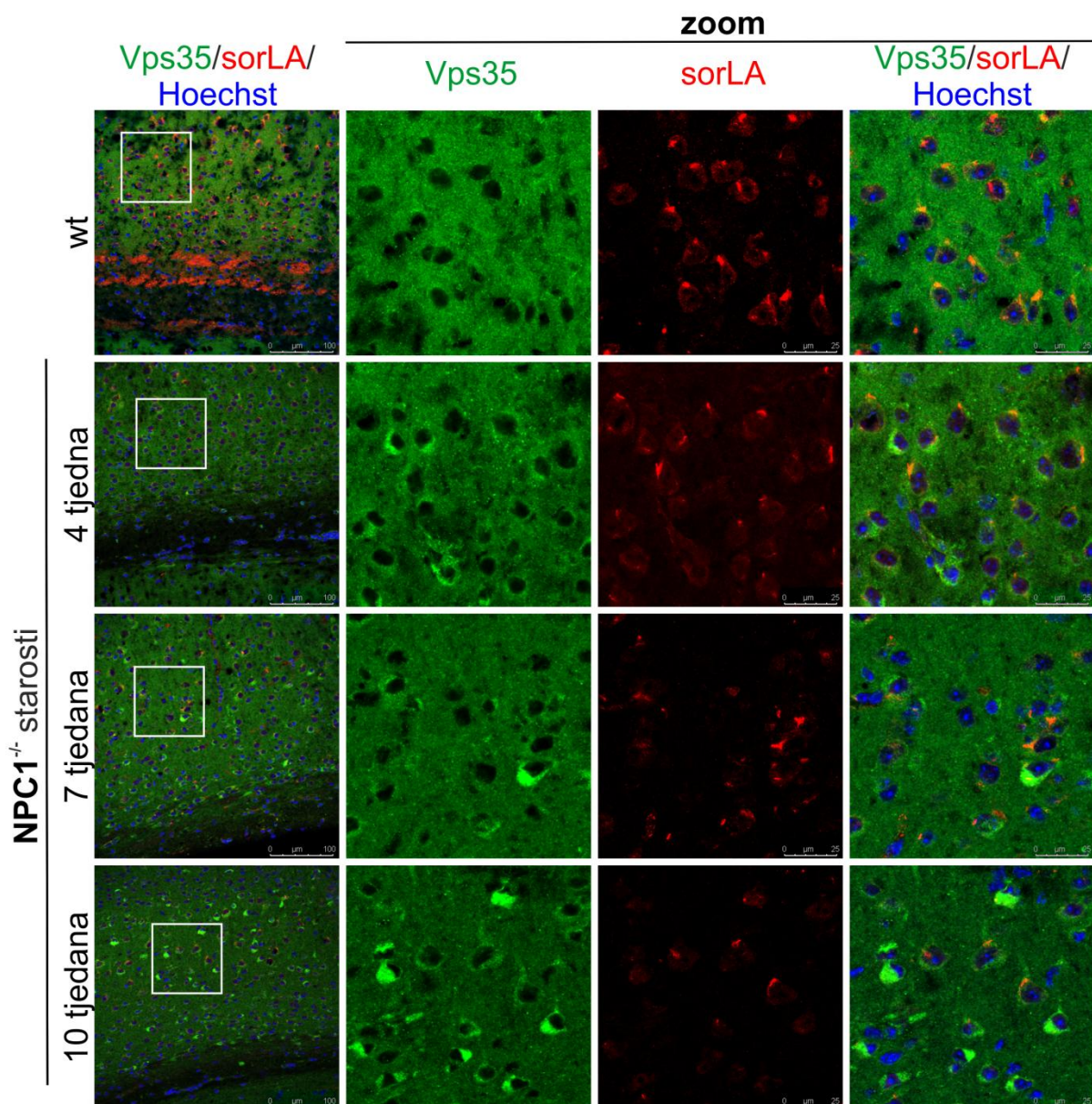
S obzirom da je prethodnom analizom detektiran signal proteina Vps35 samo u regiji CA3 hipokampusa miševa NPC1, kolokalizacija proteina Vps35 i sorLA prikazana je samo u toj regiji hipokampusa. Već u 4 tjedna starih miševa NPC1 uočeno je smanjenje signala za protein sorLA u somama piramidalnih neurona te je primijećeno daljnje snižavanje signala sa

starenjem ovih miševa u odnosu na miševe wt. Dok je protein Vps35 u miševima wt smješten u mahovinastim vlaknima, te nema signala u piramidalnim stanicama regije CA3, u miševima NPC1 već sa 4 tjedna starosti signal Vps35 slabi u mahovinastim vlaknima, a povećava se u somama piramidalnih neurona regije CA3. Taj se učinak nastavlja i povećava sa starenjem miševa NPC1, tj. nakupljanje signala Vps35 u somama piramidalnih neurona jasno je uočeno u 7 i 10 tjedana starih miševa NPC1 (Slika 25.).



Slika 25. Smanjenje ekspresije retromernog receptora sorLA u neuronima regije cornu ammonis 3 (CA3) hipokampusa miševa NPC1 ovisno o starosti dovodi do nakupljanja retromernog proteina Vps35. Izolirane polutke mozgov miševa fiksirane su, krioočuvane u otopini saharoze i zamrznute pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do rezanja na kriotomu. Kriorezovi su imunohistokemijski bojani sa specifičnim primarnim protutijelom za protein Vps35 i retromerni receptor sorLA te biljegom staničnih jezgara Hoechst te analizirani konfokalnim laserskim mikroskopom.

Kao i u malom mozgu i hipokampusu, u kori velikog mozga primijećeno je slabljenje signala za receptor sorLA već u miševima NPC1 starosti 4 tjedna. Paralelno s time, već sa 4 tjedna primijećeno je nakupljanje proteina Vps35 unutar some neurona u kori velikog mozga. Nakupljanje Vps35 sa starenjem miševa NPC1 se dodatno povećavalo. Najviše nakupljanje proteina Vps35 uočeno je u neuronima s najmanjom razinom receptora sorLA. Učinak je bio i obrnut, tj. u somama neurona u kojima je bio najjači signal za receptor sorLA, uočeno je najmanje nakupljanje proteina Vps35 u odnosu na okolne stanice (Slika 26.).

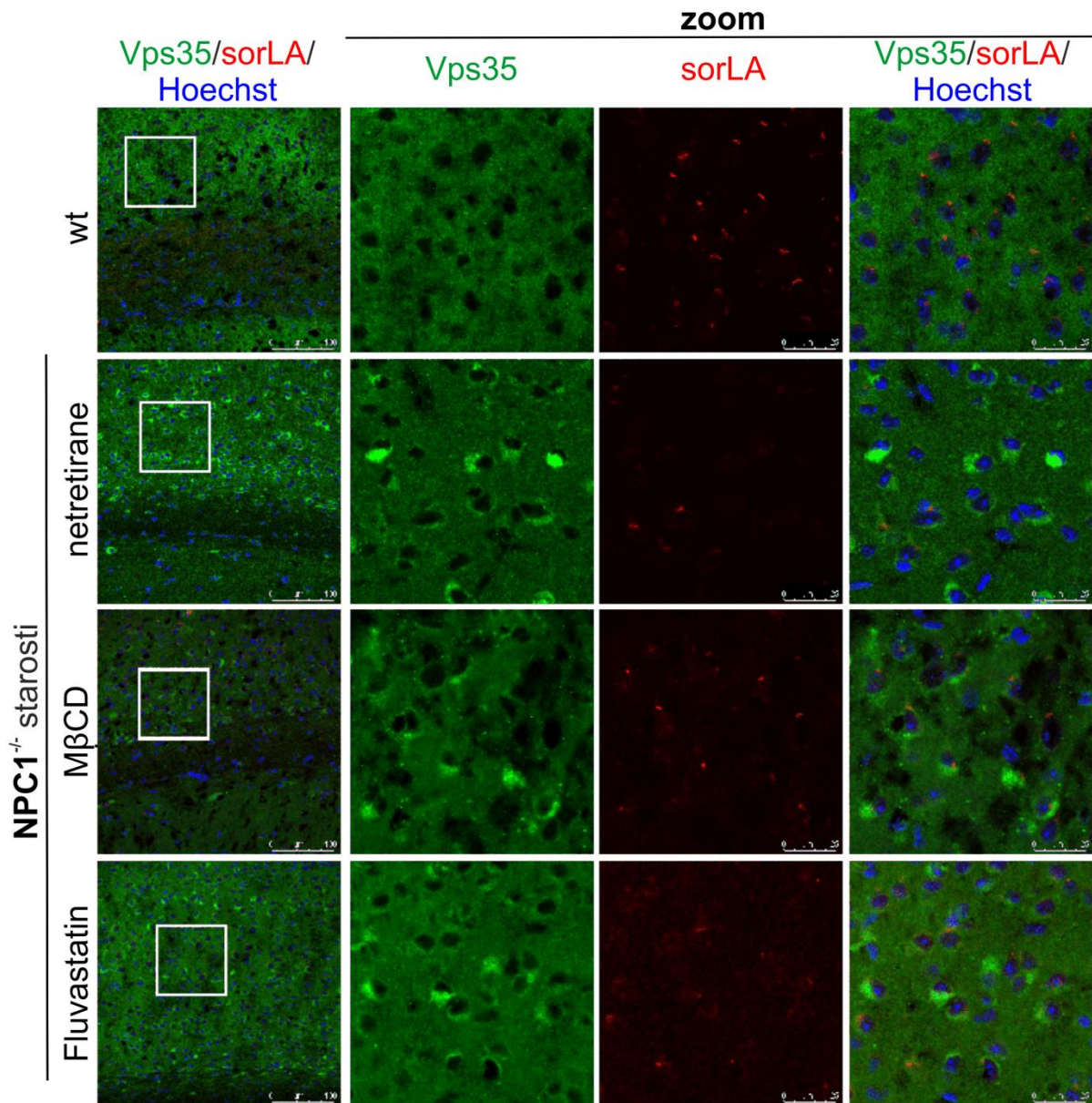


Slika 26. Ekspresija retromernog receptora sorLA u neuronima kore velikog mozga miševa NPC1 smanjuje se ovisno o starosti. Paralelno sa smanjenjem ekspresije receptora sorLA dolazi do nakupljanja retromernog proteina Vps35, i obrnuto. Izolirane polutke mozga miševa fiksirane su, krioočuvane u otopini saharoze i zamrznute pri -80 °C do rezanja na kriotomu. Kriorezovi su imunohistokemijski bojani specifičnim primarnim protutijelom za protein Vps35 i retromerni receptor sorLA te biljegom staničnih jezgara Hoechst te analizirani konfokalnim laserskim mikroskopom.

5.3.4. Utjecaj smanjenja razine kolesterola na ekspresiju i rasprostranjenost retromernih proteina i retromernog receptora sorLA u miševima NPC1

Na temelju prethodno detektiranog promijenjenog smještaja i ekspresije retromernog proteina Vps35 i receptora sorLA u mozgovima miševa NPC1, praćen je utjecaj smanjenja razine kolesterola u miševima NPC1 na smještaj ova dva proteina, tj. može li smanjenje razine kolesterola „popraviti“ transport retromera, proteina Vps35 i sorLA, te „popraviti“ smještaj ovih proteina kao u miševima wt. Metodologija ovih tretmana opisana je u poglavlju 4.3.2.

Nakon tretmana M β C i statinom fluvastatinom, u miševima NPC1 starima 10 tjedana praćena je kolokalizacija proteina Vps35 i sorLA u svim dijelovima mozga. U kori velikog mozga miševa NPC1 uočeno je povećanje razine receptora sorLA skoro na razinu miševa wt, a nakupljanje proteina Vps35 znatno se smanjilo (Slika 27.). Ti rezultati ukazali su da je promijenjen smještaj i ekspresija retromernog proteina Vps35 i receptora sorLA izravno ovisna o nakupljanju kolesterola u kasnim endosomima-lizosomima stanica neurona te da je u miševima NPC1 starima 10 tjedana, koji imaju prisutne simptome bolesti, moguće djelovati na retromer i njegov receptor i povratiti smještaj, a time i funkciju retromernog kompleksa slično onoj kao u miševima wt.



Slika 27. Tretmani snižavanja razine kolesterola u mozgovima miševa NPC1 starih 10 tjedana uzrokuju porast razine sorLA u pojedinim neuronima te u skladu s time manje izraženo nakupljanje retromernog proteina Vps35. Kriorezovi su imunohistokemijski bojani specifičnim primarnim protutijelom za protein Vps35 i retromerni receptor sorLA te biljegom staničnih jezgara Hoechst te analizirani konfokalnim laserskim mikroskopom.

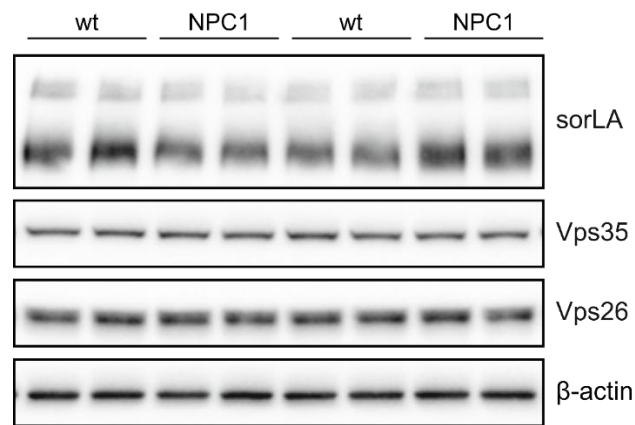
5.4. Analiza razine i smještaja proteina retromernog kompleksa u primarnim kulturama neurona mišjeg modela bolesti NPC

Rezultati dobiveni analizom kriorezova mozgova miševa wt i NPC1 pokazali su da dolazi do promjene u razini i/ili nakupljanju proteina Vps35 i sorLA već u najranijoj fazi NPC bolesti (4-tjedna starosti). Također, ove su promjene za proteine Vps35 i sorLA detektirane u svim analiziranim regijama mozga, bez obzira na različitu osjetljivost neurona u ovim regijama – u Purkinje neuronima malog mozga, u piramidalnim i granularnim stanicama hipokampusa te u neuronima kore velikog mozga. Kako bi se detaljnije ispitala razina i transport retromernih proteina i retromernog receptora u neuronima (u odnosu na prethodno opisanu njihovu analizu u homogenatu različitih stanica u različitim regijama mozga i njihovim rezovima) u daljnjem su doktorskom radu uzgojeni Purkinje, hipokampalni i kortikalni neuroni izolirani iz mladunaca NPC1 i wt postnatalnog dana 0-1 (P0-P1) te je praćena razlika u razini i smještaju proteina Vps26, Vps35 i sorLA metodama Western blot i imunocitokemije. Za pripremu primarnih kultura iz svakog pojedinačnog mladunca P0-P1 izolirani su istovremeno Purkinje neuroni, hipokampalni i kortikalni neuroni. Mladunci su genotipizirani kao što je opisano u poglavlju 4.2.1. i za analizu su korišteni samo miševi wt (*NPCI^{+/+}*) i NPC1 (*NPCI^{-/-}*).

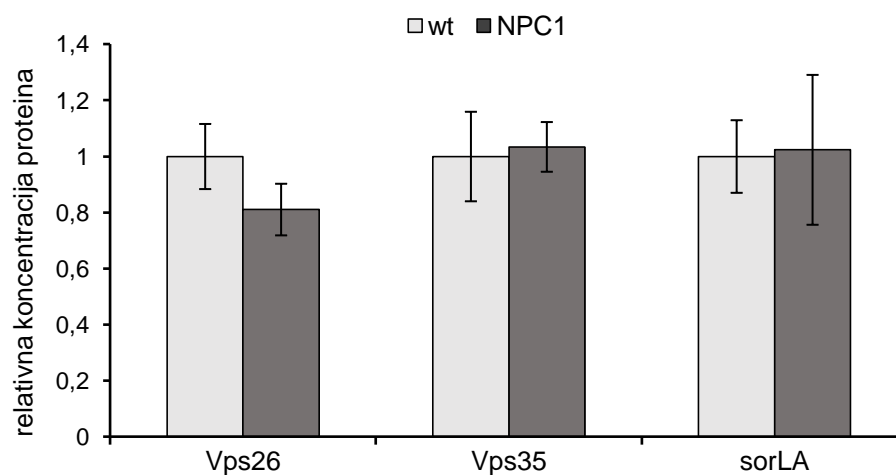
5.4.1. Analiza razine retromernih proteina Vps26 i Vps35 te retromernog receptora sorLA u kortikalnim neuronima

Za analizu razine retromernih proteina Vps26 i Vps35 te retromernog receptora sorLA metodom Western blot korišteni su kortikalni neuroni jer količina Purkinje i hipokampalnih neurona u primarnoj kulturi dobivena iz jednog mladunca starosti P0-P1 nije bila dovoljna za analizu razine proteina metodom Western blot. Stoga su Purkinje i hipokampalni neuroni analizirani samo metodom imunocitokemije. Analiza proteina Vps26, Vps35 i sorLA iz staničnih lizata kortikalnih neurona miševa NPC1 i wt uzgajanih 14 dana u kulturi (opisano u poglavlju 4.1.2.) pokazali su da je razina sva tri proteina nepromijenjena u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 u odnosu na wt (Slika 28.).

A)



B)



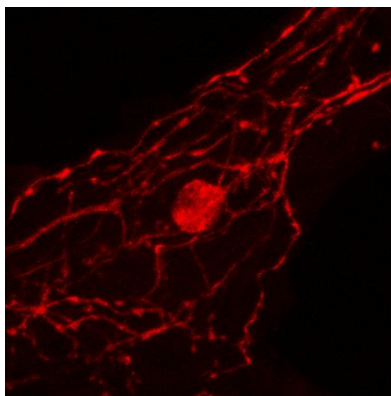
Slika 28. Razina retromernih proteina Vps26/35 i retromernog receptora sorLA nije promijenjena u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 u odnosu na miševe wt. Neuron su izolirani iz mladunaca postnatalnog dan P0-P1 i uzgajani u kulturi 14 dana. Nakon toga pripremljeni su stanični lizati i analizirani metodom Western blot. A) Razina retromernih proteina Vps26 i Vps35 te retromernog receptora sorLA analizirana je metodom Western blot koristeći specifična protutijela. B) Rezultati dobiveni metodom Western blot u tri neovisna pokusa u duplikatima analizirani su software-om ImageJ i normalizirani prema količini proteina β -actina. Dobivene vrijednosti analizirane su studentovim *t*-test-om i nije zabilježena statistička značajnost. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD.

5.4.2. Analiza smještaja retromernog proteina Vps35 i/ili retromernog receptora sorLA u primarnim kulturama neurona miševa NPC1 i wt

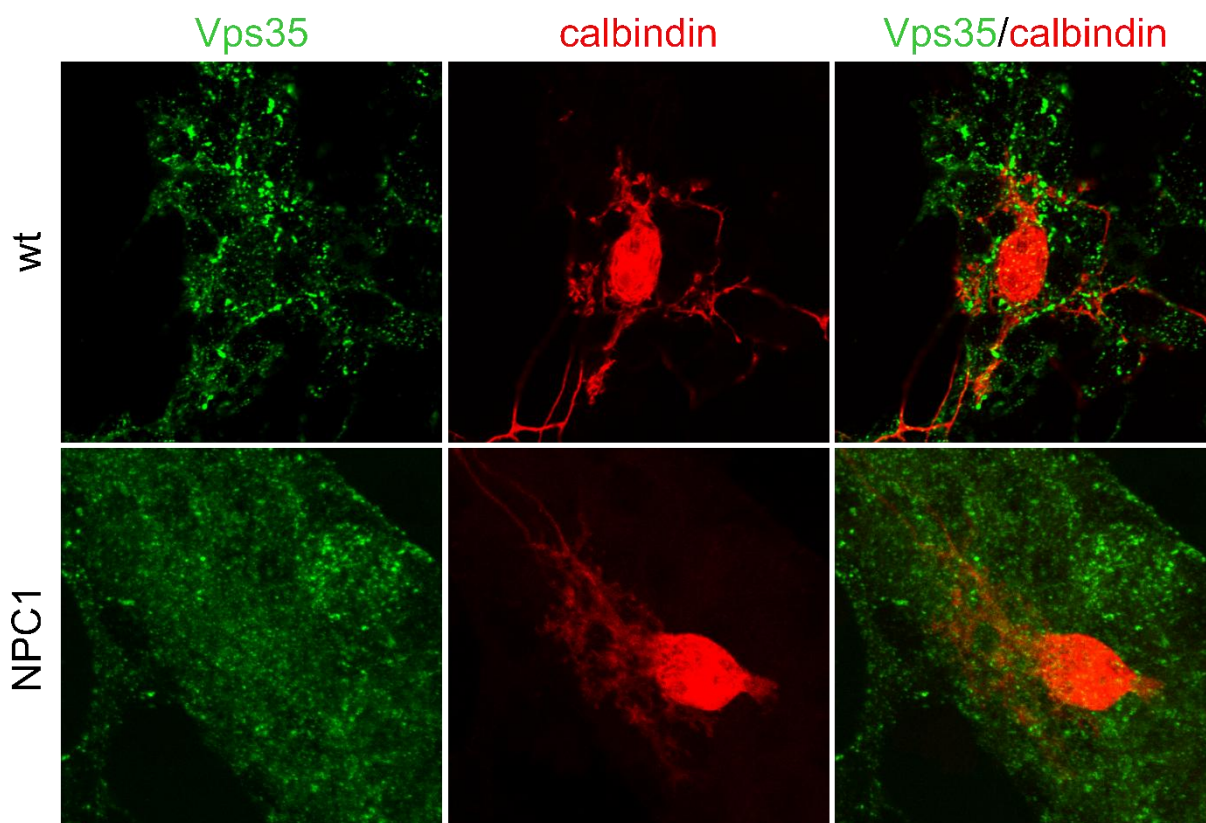
5.4.2.1. Smještaj retromernog proteina Vps35 u primarnoj kulturi Purkinje neurona miševa NPC1 i wt

S obzirom da odumiranje Purkinje neurona predstavlja jednu od najranijih i karakterističnih patoloških karakteristika bolesti NPC, prvo je analiziran transport retromernog proteina Vps35 u primarnoj kulturi ovih neurona. Nakon 14 dana uzgoja u kulturi Purkinje neuroni su bili obilježeni biljegom calbindinom. Nije uočeno različito preživljenje primarnih Purkinje neurona NPC1 u odnosu na neurone wt. Međutim, preživljenje Purkinje neurona je ukupno bilo jako slabo. Također, u skladu s literaturom, uočeno je da Purkinje neuroni uzgojeni u kulturi ne razvijaju karakteristično razgranato dendritičko stablo, nego je stablo puno manje razgranato (Slika 29.)

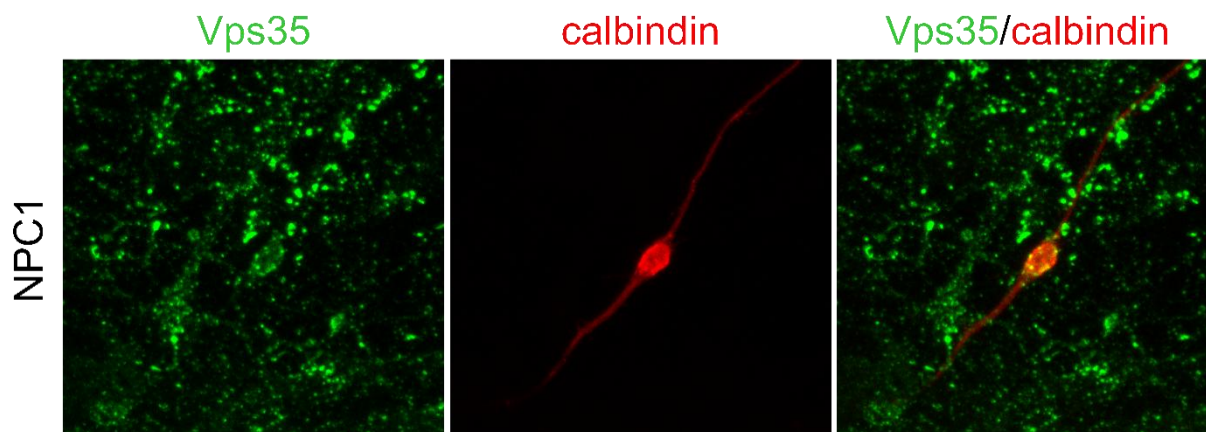
S obzirom da su primarna protutijela za calbindin i protein sorLA iz iste životinje, miša, nije bilo moguće analizirati smještaj receptora sorLA te smo u kulturi Purkinje neurona pratili samo smještaj retromernog proteina Vps35. Obilježje rasta Purkinje neurona je da su uvijek rasli na sloju granularnih stanica unutar kojeg bi se smjestilo razgranato dendritičko stablo. S obzirom na ova obilježja rasta Purkinje neurona bilo je teško pratiti smještaj proteina Vps35 samo unutar some i dendritičkog stabla Purkinje neurona (Slika 29.), jer je Vps35 prisutan i u višeslojevitim granularnim stanicama. Međutim, analizom se moglo uočiti različito imunobojenje proteina Vps35 između primarne kulture Purkinje neurona NPC1 u usporedbi s wt (Slika 30.). Dok je u neuronima wt signal Vps35 dao jasno točkasto obojenje, u neuronima NPC1 bojenje Vps35 je bilo difuznije s manje izraženim i sitnijim točkastim signalom. Imunobojenjem calbindinom uočeno je da Purkinje neuroni iz miševa NPC1 imaju mnoga zadebljanja unutar aksona. Analizom kolokalizacije proteina Vps35 i zadebljanja primijećeno je da se Vps35 nakuplja unutar ovih aksonalnih zadebljanja (Slika 31.).



Slika 29. Purkinje neuron izoliran iz miševa NPC1 uzgojen u primarnoj kulturi. Nakon izolacije tkiva malog mozga iz P0 mladunaca i uzgoja neurona 14 dana u kulturi, Purkinje neuroni imunocitokemijski su obojeni biljegom calbindinom, te promatrani konfokalnim laserskim mikroskopom.



Slika 30. Purkinje neuroni miševa NPC1 imaju smanjenu ekspresiju retromernog proteina Vps35 u dentritičkom stablu neurona u odnosu na Purkinje neurone iz miševa wt. Uzrok pozadinskog bojenja Vps35 je sloj granularnih neurona koji rastu oko Purkinje neurona. Purkinje neuroni su izolirani iz miševa postnatalnog dana P0, uzgajani 14 dana u kulturi. Nakon toga neuroni su fiksirani te obilježeni specifičnim protutijelima za biljeg Purkinje neurona – calbindin te za protein Vps35 i promatrani konfokalnim laserskim mikroskopom.

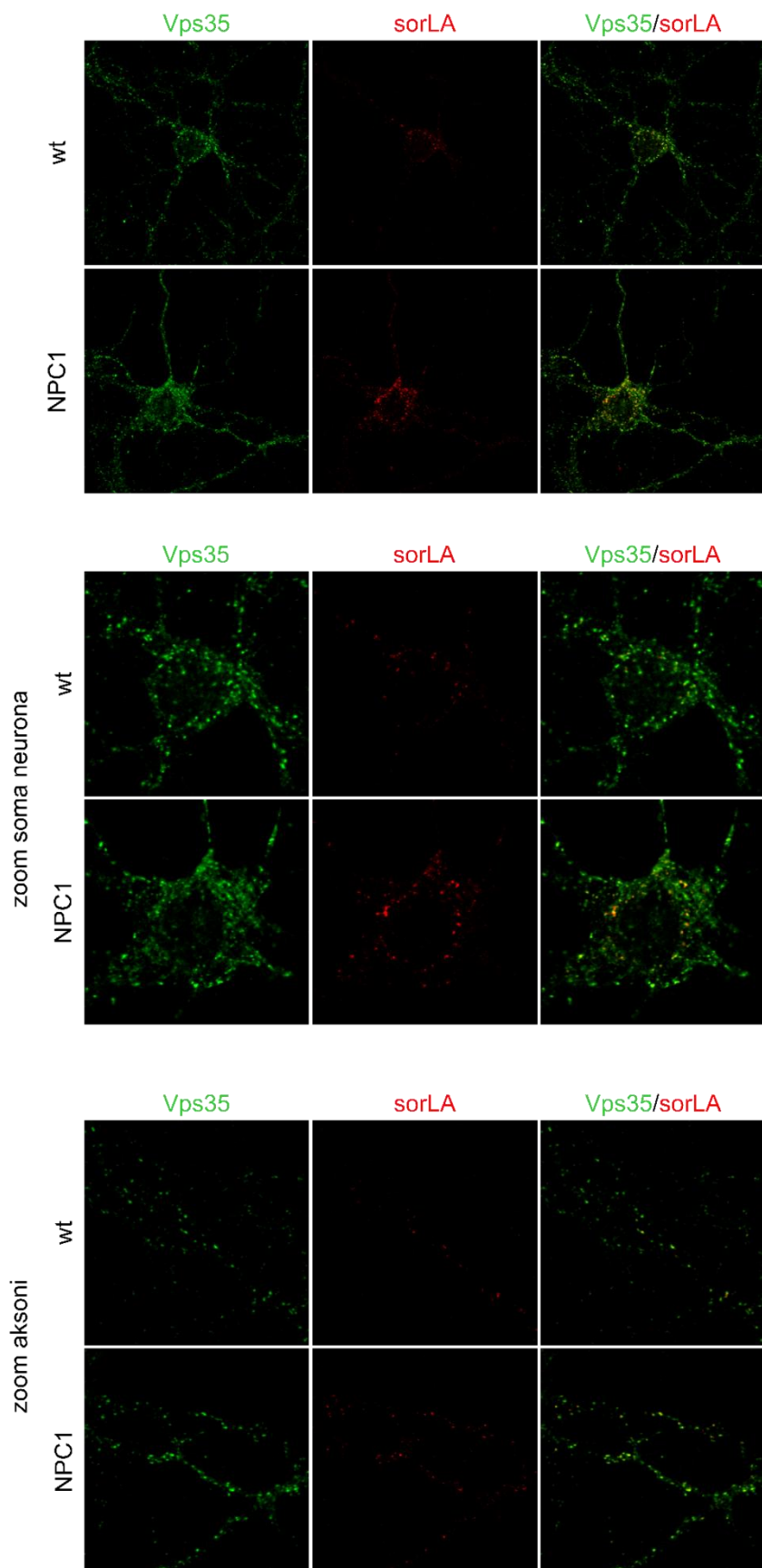


Slika 31. Purkinje neuroni izolirani iz miševa NPC1 imaju karakteristična aksonalna zadebljanja u kojima se nakuplja retromerni protein Vps35. Uzrok pozadinskog bojenja Vps35 je sloj granularnih neurona koji rastu oko Purkinje neurona. Purkinje neuroni su izolirani iz mladunaca postnatalnog dana P0, uzgajani 14 DIV. Nakon toga neuroni su fiksirani te obilježeni specifičnim protutijelima za biljeg Purkinje neurona – calbindin te za protein Vps35 i promatrani konfokalnim laserskim mikroskopom.

5.4.2.2. Smještaj retromernih proteina u primarnoj kulturi hipokampalnih neurona miševa NPC1 i wt

S obzirom da hipokampalni neuroni pokazuju drugačiju vulnerabilnost od Purkinje neurona u bolesti NPC, ispitan je transport retromernog kompleksa u primarnoj kulturi ovih neurona izoliranih iz mladunaca wt i NPC1 prvog postnatalnog dana (P0). Ako disfunkcija retromera predstavlja okidač procesa neurodegeneracije, pretpostavljeno je da bi s obzirom na očuvanost hipokampalnih neurona u bolesti NPC, tj. njihovu najslabiju vulnerabilnost, poremećaj transporta retromernog kompleksa bio najblaži ili ne bi bio prisutan u ovim neuronima. U kulturi hipokampalnih neurona analiziran je smještaj proteina Vps35 i sorLA. Uočeno je da je protein sorLA većinom smješten u somi neurona, oko jezgre u neuronima i wt i NPC1, pri čemu je signal u neuronima NPC1 bio izraženiji i dao bojenje sorLA receptora u većim točkama (Slika 32.). Smještaj receptora sorLA u somi neurona u skladu je s njegovim imunohistokemijskim bojenjem u moždanim kriorezovima. U neuronima wt je protein Vps35 bio smješten perinuklearno u somi i u izdancima neurona. U neuronima NPC1 signal za protein Vps35 bio je puno jači u aksonima, i u većim nakupinama, dok je u somi ovaj signal bio raspršeniji, više na periferiji some, u odnosu na neurone wt. Primijećeni poremećaj u transportu proteina Vps35 i sorLA u primarnoj kulturi hipokampalnih neurona miševa NPC1

u odnosu na wt, rezultirao je njihovom povećanom kolokalizacijom u većim nakupinama i u somi i u aksonima ovih neurona (Slika 32.).

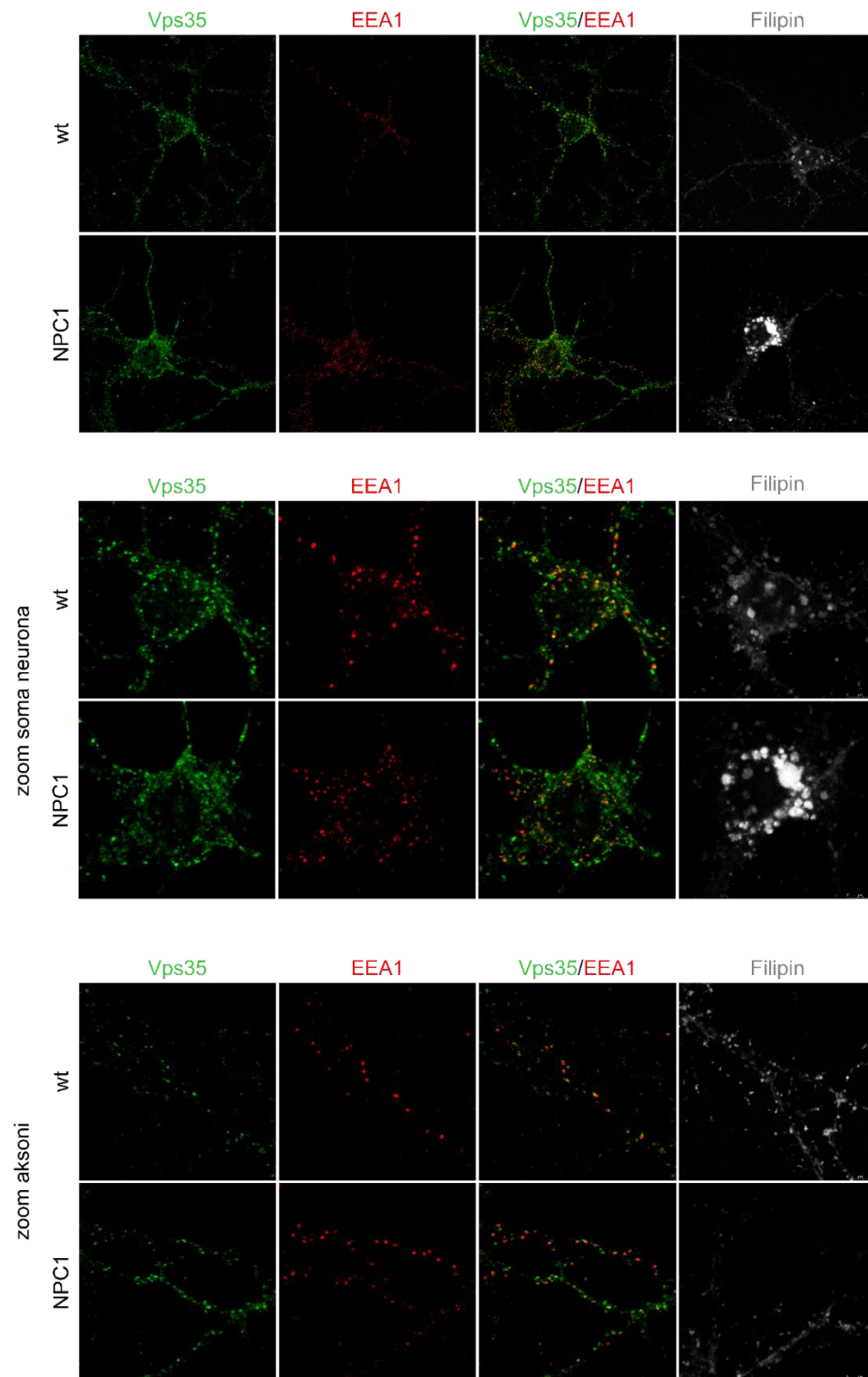


Slika 32. Analiza smještaja retromernog proteina Vps35 i retromernog receptor sorLA u hipokampalnim neuronima miševa NPC1 i wt. Protein Vps35 smješten je u somi i aksonima neurona, a receptor sorLA prvenstveno u somi neurona. Hipokampalni neuroni su izolirani iz mladunaca NPC1 i wt postnatalnog dana P0, uzgajani 14 DIV. Nakon toga neuroni su fiksirani te obilježeni specifičnim protutijelima za retromerni protein Vps35 i retromerni receptor sorLA te promatrani konfokalnim laserskim mikroskopom.

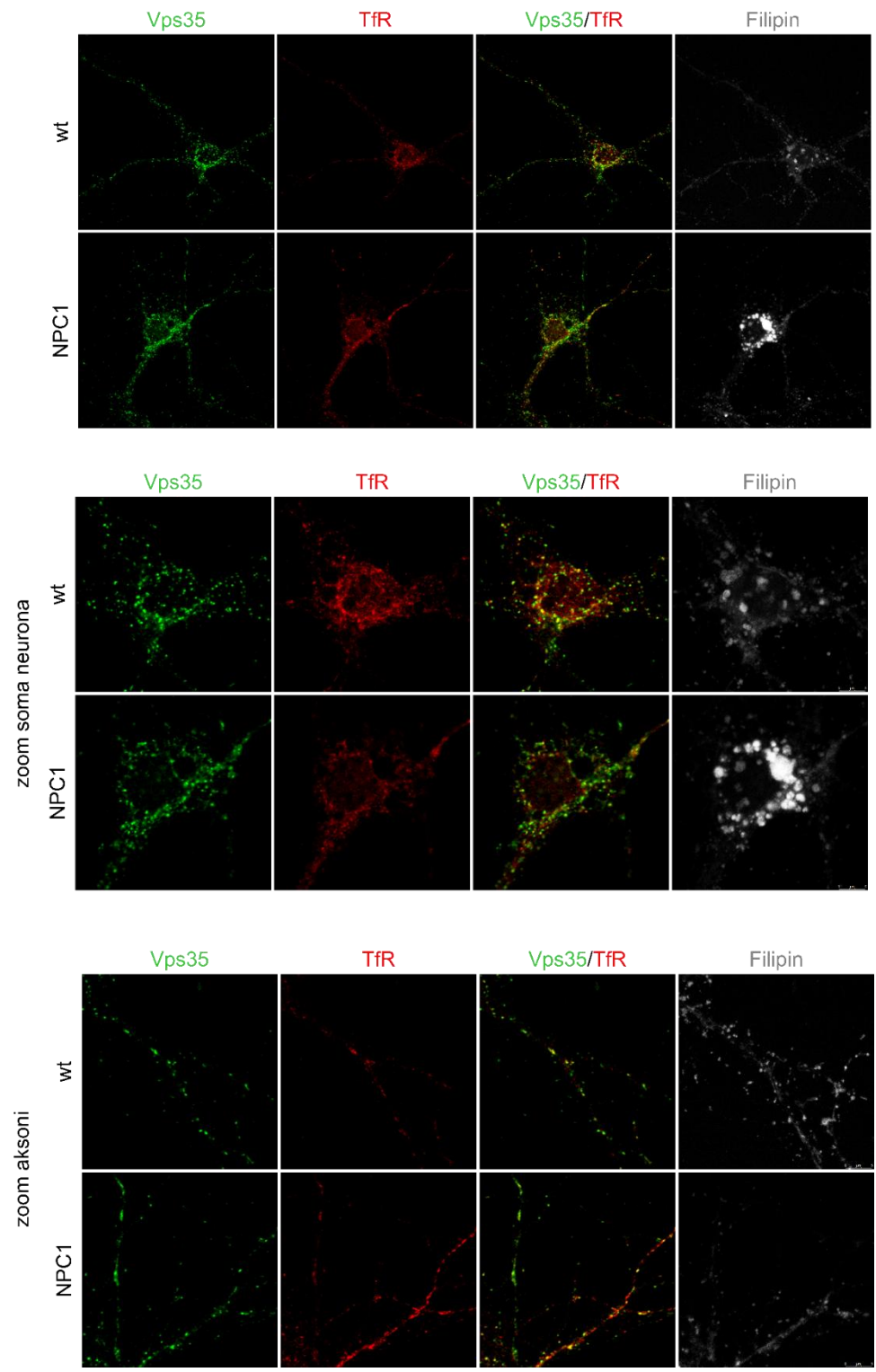
S obzirom da su ovi rezultati ukazali na promijenjeni transport proteina Vps35 u hipokampalnim neuronima NPC1, pogotovo u aksonima, analiziran je smještaj proteina Vps35 unutar endosomalno-lizosomalnog puta u wt i NPC1. Stoga je praćena kolokalizacija proteina Vps35 s biljegom ranih endosoma – EEA1 (Slika 33.A), biljegom reciklirajućih endosoma – TfR (Slika 33.B) i biljegom lizosoma – LAMP1 (Slika 33.C). Paralelno je praćeno i nakupljanje slobodnog neesterificiranog kolesterola bojenjem filipinom (Slika 33.A-C). Bojenje biljegom LAMP1 pokazalo je prisutnost povećanih lizosoma u somi hipokampalnih neurona NPC1 u odnosu na neurone wt, u kojima se nakuplja slobodni kolesterol (Slika 33.C). Ovaj rezultat je pokazao da hipokampalni neuroni u primarnoj kulturi izolirani iz miševa NPC1, iako ne pokazuju značajnu vulnerabilnost u bolesti NPC, pokazuju nakupljanje kolesterola i povećane lizosome – dvije karakteristične patološke odlike bolesti NPC.

U somi hipokampalnih neurona wt i NPC1 protein Vps35 je djelomično bio smješten u vezikulama pozitivnima na EEA1, TfR i LAMP1 (Slika 33.). Dok je kolokalizacija Vps35 s biljezima EEA1 i TfR u somi neurona NPC1 bila smanjena u odnosu na neurone wt, primijećeno je nakupljanje većeg broja i većih vezikula pozitivnih na Vps35 i EEA1, TfR ili LAMP1 u aksonima neurona NPC1 u odnosu na neurone wt. Osim toga, u aksonima NPC1, za razliku od aksona wt, detektirana je potpuna kolokalizacija proteina Vps35 s vezikulama pozitivnima na TfR (Slika 33.B) ili LAMP1 (Slika 33.C) i djelomično EEA1 (Slika 33.A).

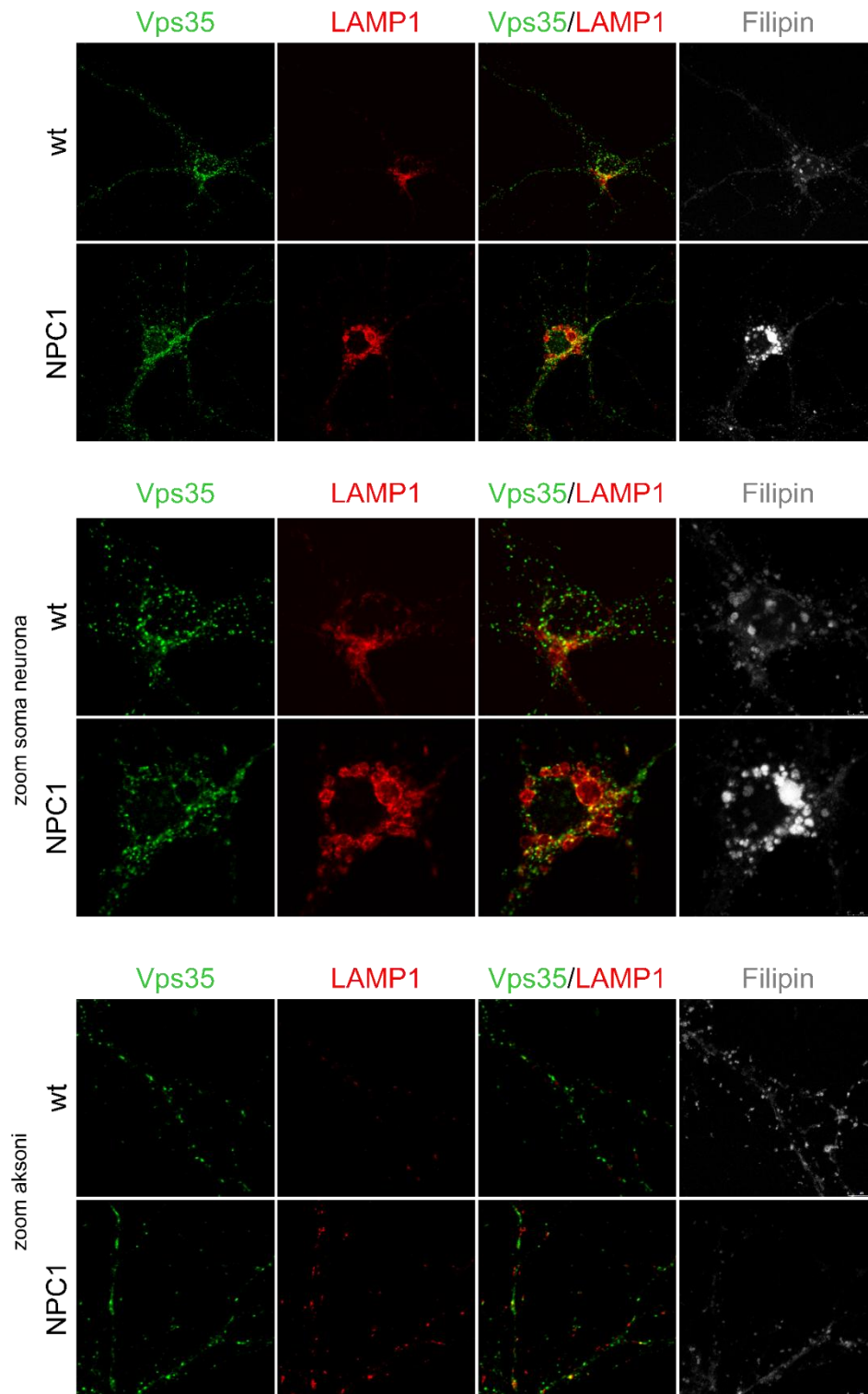
A)



B)



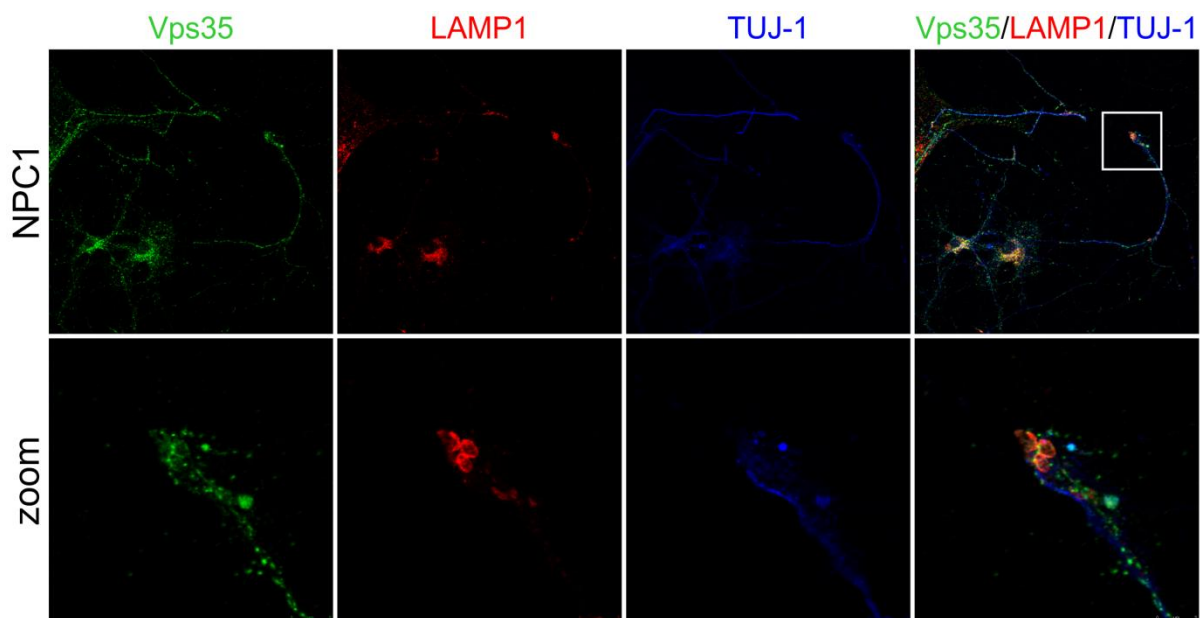
C



Slika 33. Hipokampalni neuroni izolirani iz miševa NPC1 u odnosu na neurone miševa wt pokazuju povećanu kolokalizaciju retromernog proteina Vps35 s biljezima reciklirajućih endosoma i lizosoma (TfR i LAMP1) u aksonima. Hipokampalni neuroni su izolirani iz mladunaca postnatalnog dana P0, uzgajani 14 dana u kulturi. Neuroni su fiksirani te obilježeni specifičnim protutijelima za retromerni protein Vps35 i A) za biljeg ranih endosoma EEA1, B) za biljeg

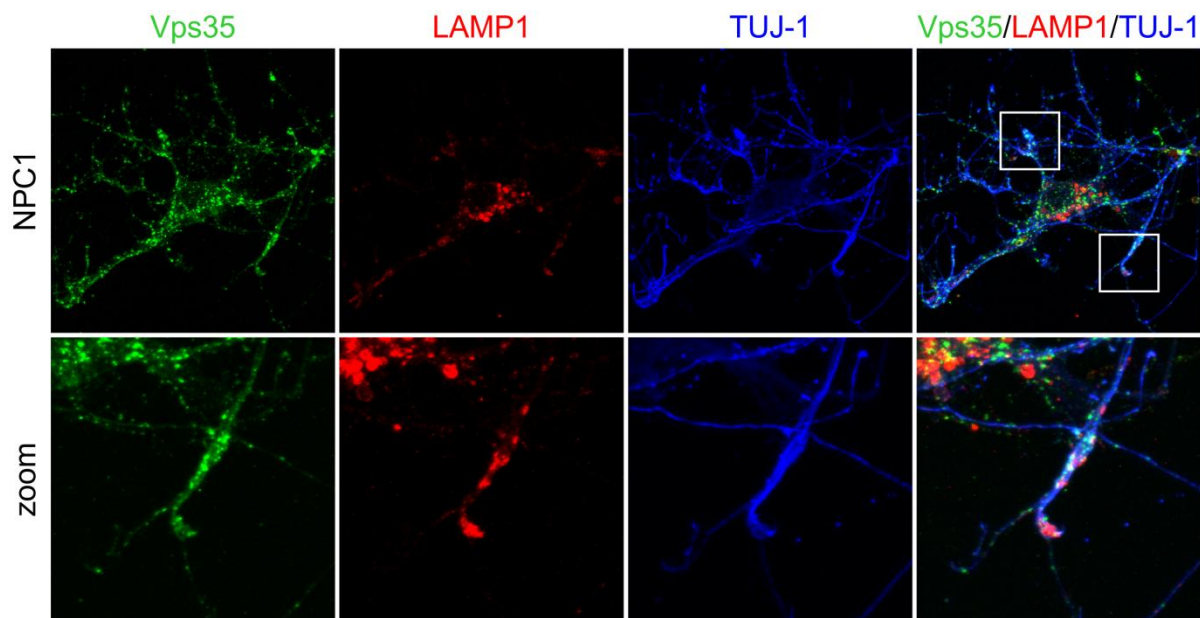
reciklirajućih endosoma – receptor transferina (TfR), C) za biljeg lizosoma LAMP1. Bojenje filipinom je detektiralo nakupljanje slobodnog neesterificiranog koelsterola u somi neurona NPC1 za razliku od neurona wt. Neuroni su promatrani konfokalnim laserskim mikroskopom.

Nakupljanje proteina Vps35 u aksonima hipokampalnih neurona NPC1 zajedno s biljezima ostalih vezikula endosomalno-lizosomalnog puta, ukazalo je na postojanje nefunkcionalnog aksonalnog transporta. S ciljem analize postoje li aksonalna zadebljanja i u hipokampalnim neuronima NPC1, neuroni su obilježeni neuralnim biljegom Tuj-1. Rezultati su pokazali da hipokampalni neuroni NPC1, kao i Purkinje neuroni, pokazuju aksonalna zadebljanja te da se u aksonalnim zadebljanjima hipokampalnih neurona NPC1 (obilježenih s Tuj-1) nakupljaju povećane vezikule pozitivne na Vps35 i LAMP1 (Slika 34.). Ovi rezultati ukazuju da se promjene u endosomalno-lizosomalnom transportu, pogotovo unutar aksona, uočavaju i u hipokampalnim neuronima miševa NPC1.



Slika 34. Hipokampalni neuroni miševa NPC1 imaju aksonalna zadebljanja u kojima se nakupljaju retromerni proteini i proteini endosomalno-lizosomalnog puta. Hipokampalni neuroni su izolirani iz mladunaca NPC1 postnatalnog dana P0, uzgajani 14 dana u kulturi. Neuroni su fiksirani te obilježeni specifičnim protutijelima za retromerni protein Vps35, biljeg lizosoma LAMP1 te neuronalni biljeg (Tuj-1). Neuroni su promatrani konfokalnim laserskim mikroskopom.

S obzirom da su kortikalni neuroni u bolesti NPC vulnerabilniji od hipokampalnih neurona, tj. pokazuju degeneraciju kao i Purkinje neuroni (za razliku od neurona hipokampusa), ali nešto kasnije u patogenezi bolesti, analizirano je i postojanje aksonalnih zadebljanja u primarnoj kulturi kortikalnih neurona NPC1. Imunobojenjem s Tuj-1 primijećeno je da kortikalni neuroni NPC1 imaju puno više prekinutih aksona te više aksonalnih zadebljanja od hipokampalnih neurona NPC1. Analiza smještaja proteina Vps35 i LAMP1 pokazala je da je u svim aksonalnim zadebljanjima (i u onima koja su prethodno već puknula) došlo do nakupljanja velikih vezikula pozitivnih na Vps35 i LAMP1 (Slika 35).



Slika 35. Kortikalni neuroni izolirani iz miševa NPC1 pokazuju značajna aksonalna zadebljanja u kojima se nakupljaju proteini endosomalno-lizosomalnog puta, uključujući retromerni kompleks. Kortikalni neuroni su izolirani iz mladunaca NPC1 postnatalnog dana P0, uzgajani 14 dana u kulturi. Neuroni su fiksirani te obilježeni specifičnim protutijelima za retromerni protein Vps35, biljeg lizosoma LAMP1 te neuronalni biljeg (Tuj-1). Neuroni su promatrani konfokalnim laserskim mikroskopom.

Rezultati dobiveni analizom primarnih kultura hipokampalnih, kortikalnih i Purkinje neurona miševa wt i NPC1 pokazali su nakupljanje proteina uključenih u endosomalno-lizosomalni i retrogradni transport unutar aksona neurona NPC1 i time poremećenu funkciju tih transportnih puteva i poremećen prijenos signala unutar stanica.

5.5. Utjecaj C-terminalnih odsječaka proteina prekursora amiloida β na (dis)funkciju retromernog kompleksa

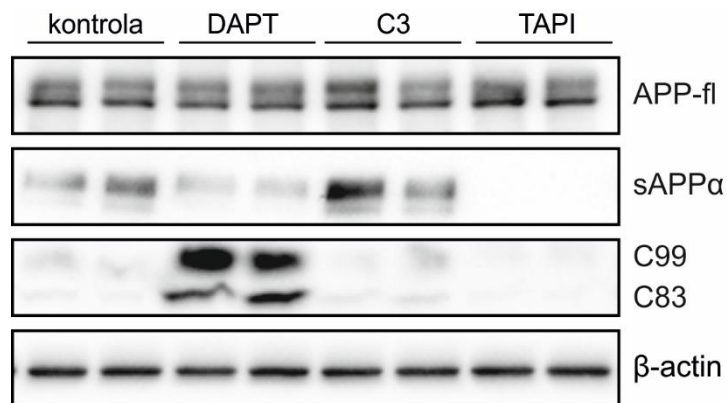
Osim uloge peptida $A\beta$ u patogenezi Alzheimerove bolesti, nedavna istraživanja su pokazala da bi unutarstanično nakupljanje C-terminalnih odsječaka APP-a (CTF-APP) također moglo imati važnu ulogu na nastanak AB. Naime, nakupljanje odsječaka CTF-APP uzrokuje povećanje ranih endosoma, tj. disfunkciju endosomalno-lizosomalnog transporta koji predstavlja jednu od najranijih patoloških karakteristika bolesti (140,141,272). Stoga je uz praćenje utjecaja kolesterola na funkciju retromernog kompleksa, cilj bio istražiti i utjecaj CTF-APP-a na razinu i smještaj retromernog kompleksa. U tu svrhu koristili smo neuralni stanični model ljudskih stanica neuroblastoma SH-SY5Y divljeg tipa (SH-SY5Ywt) te stanice kojima je stabilno eksprimiran protein APP (SH-SY5Y-APP). Za analizu utjecaja CTF-APP-a na razinu i smještaj retromernih proteina korištene su stanice SH-SY5Y koje su bile tretirane različitim inhibitorima ili kombinacijama inhibitora koji su smanjivali ili povećavali nakupljanje CTF-APP-a α i β (CTF α /C83 i CTF β /C99). Korišteni su inhibitori α -sekretaze – TAPI, β -sekretaze – C3 i inhibitor γ -sekretaze – DAPT.

Prvo su optimizirane koncentracije inhibitora i učinkovitost pojedinih tretmana na proteolitičku razgradnju APP-a, tj. na razinu proteina APP (fl-APP), CTF-APP-a – CTF α /C83 i CTF β /C99 te izlučivanje peptida $A\beta$ ($A\beta$ 40). Učinkovitost tretmana prvo je ispitana u stanicama SH-SY5Ywt i SH-SY5Y-APP. Nažalost, nije bilo moguće izmjeriti razinu peptida $A\beta$ u ovim stanicama zbog preniske razine izlučenih peptida u stanicama s endogenom razinom APP-a (SH-SY5Ywt) ili sa stabilno izraženim APP-om (SH-SY5Y-APP). Stoga su stanice SH-SY5Ywt prolazno transfecirane s plazmidnom DNA koja je sadržavala sekvencu ljudskog APP-a (izoforme *APP*₆₉₅, koja je najzastupljenija u ljudskom mozgu) koristeći transfekcijski reagens Lipofectamine. Prema uputama proizvođača, stanicama je promijenjen medij 6 h nakon transfekcije, a nakon 18 h stanice su tretirane spojevima – DAPT u koncentraciji 10 μ M, C3 u koncentraciji 5 μ M te TAPI u koncentraciji 50 μ M. Nakon 24 h tretmana sakupljen je medij i stanični lizat. Metodom WB je analizirana ekspresija prolazno transfeciranog proteina APP-fl i C-terminalnih odsječaka u staničnom lizatu te izlučenih, topljivih odsječaka sAPP α i sAPP β u staničnom mediju. U prisutstvu inhibitora α -sekretaze, TAPI, nije bilo moguće detektirati produkt cijepanja α -sekretaze, sAPP α . Razina CTF-APP-a analizirana metodom WB pokazala je značajno nakupljanje CTF-APP-a u stanicama tretiranim s inhibitorom γ -sekretaze, DAPT. Za razliku od toga, nije bilo moguće detektirati CTF-APP-a u kontrolnim stanicama kao ni u tretmanima C3 i TAPI. Utvrđeno je značajno

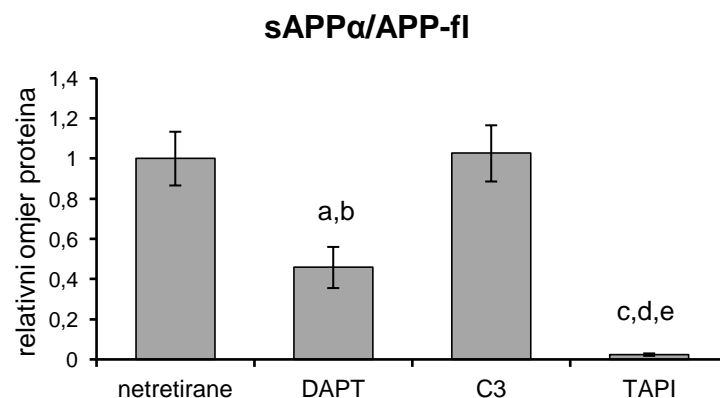
smanjenje omjera sAPP α /APP-fl u tretmanu s inhibitorom DAPT i TAPI u odnosu na kontrolne netretirane stanice, kao i značajno smanjenje u tretmanu TAPI u odnosu na tretmane DAPT i C3 te u tretmanu DAPT u odnosu na tretman C3 (Slika 36.A i B).

Razina izlučenog peptida A β 40 u mediju izmjerena je metodom ELISA. Nažalost, zbog niske koncentracije i/ili neosjetljivog protutijela, bilo je nemoguće detektirati razinu topljivog sAPP β . Razina peptida A β 40 izražena je prema ukupnoj razini transfeciranog proteina APP-fl. Omjer A β 40/APP-fl bio je značajno smanjen u tretmanu DAPT u odnosu na kontrolne netretirane stanice i tretman TAPI, a u tretmanu C3 u odnosu na kontrolu i tretman TAPI (Slika 36.C).

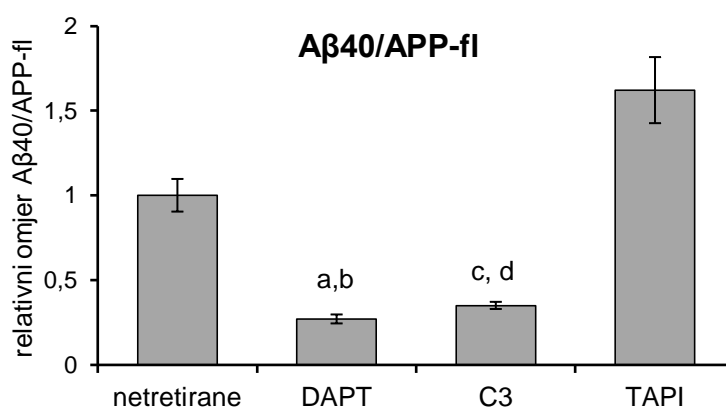
A)



B)



C)

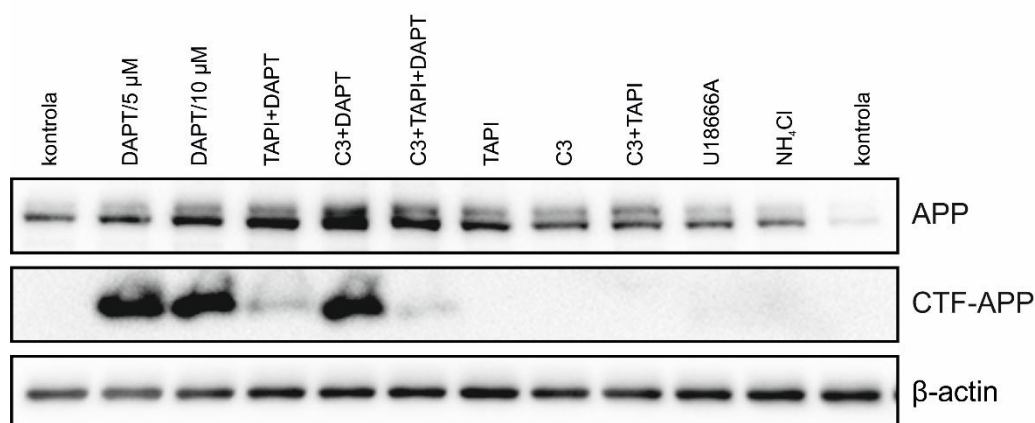


Slika 36. Utjecaj inhibicije α -, β - i γ -sekretaze na proteolitičku razgradnju APP-a u stanicama SH-SY5Y prolazno transfeciranim proteinom APP₆₉₅. Tretman inhibitorom γ -sekretaze (DAPT) uzrokuje nakupljanje C-terminalnih odsječaka APP-a, a smanjuje nastanak A β 40, a inhibitori α - (TAPI) i β -sekretaze (C3) smanjuju nakupljanje CTF-APP-a. Stanice SH-SY5Y su prolazno transfecirane plazmidnim konstruktom APP₆₉₅. Nakon toga su tretirane inhibitorima DAPT (10 μ M), C3 (5 μ M) i TAPI (50 μ M) tijekom 24 h. Medij je prikupljen, a stanice lizirane za analizu. A) Metodom Western blot analizirani su proteini APP-fl (cjeloviti protein APP) i C-terminalni odsječci nastali cijepanjem α -sekretaze (CTF α /C83) ili β -sekretaze (CTF β /C99) u staničnom lizatu, te izlučeni topljivi N-terminalni odsječak nastao cijepanjem APP-a α -sekretazom (sAPP α) u mediju. B) Rezultati dobiveni metodom Western blot su kvantificirani te prikazani kao srednja vrijednost \pm SD. Usporedbom razlika srednjih vrijednosti između skupina post-hoc testom uočeno je da je omjer sAPP α /APP-fl bio smanjen u tretmanu DAPT bila smanjena u odnosu na a) kontrolu ($p=0,016$) i b) tretman C3 ($p=0,013$). U tretmanu TAPI statistički je značajno bila smanjena razina omjera sAPP α /APP-fl u odnosu na c) kontrolu ($p<0,001$) i u odnosu na d) tretman DAPT ($p=0,039$) te e) tretman C3 ($p=0,001$). C) Rezultati mjerenja izlučenog peptida A β 40 dobiveni metodom ELISA, normalizirani prema razini APP-fl, prikazani su kao srednja vrijednost \pm SD. Utvrđeno je da je razina A β 40/APP-fl u tretmanu DAPT bila statistički značajno smanjena u odnosu na a) kontrolu ($p=0,02$) i b) tretman TAPI ($p<0,001$). Razina A β 40/APP-fl u tretmanu C3 bila je statistički značajno smanjena u odnosu na c) kontrolu ($p=0,034$) i d) tretman TAPI ($p=0,02$).

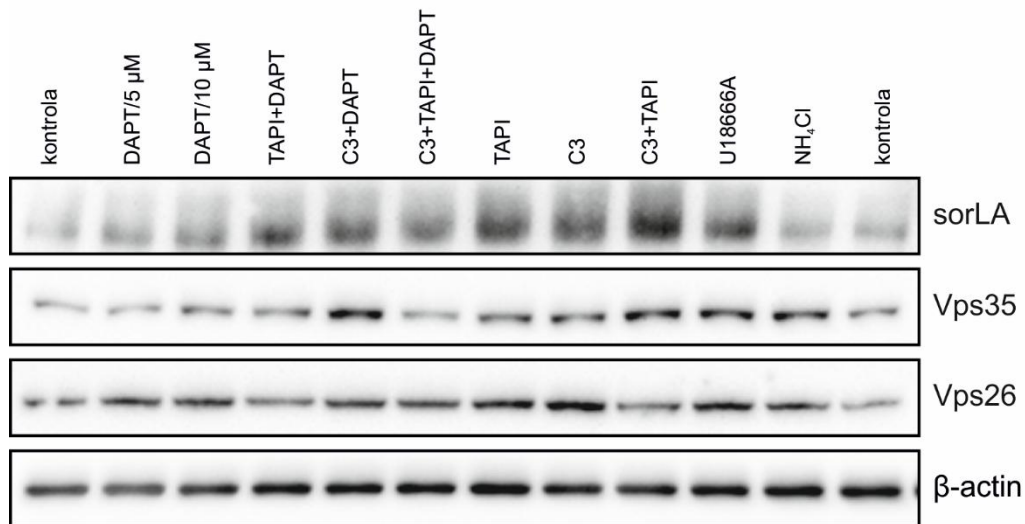
5.5.1. Utjecaj razine C-terminalnih odsječaka APP-a na razinu proteina retromernog kompleksa

Nakon optimiziranja i provjeravanja učinka tretmana inhibitorima α -, β - i γ -sekretaze na procesiranje proteina APP, stanice su tretirane pojedinačnim inhibitorom ili kombinacijom inhibitora s ciljem snižavanja ili povećanja razine CTF α /C83 i/ili CTF β /C99 te praćenja utjecaja nakupljanja odječaka CTF-APP na razinu proteina retromernog kompleksa. Stanice su tretirane pojedinačnim inhibitorom: DAPT 5 μ M i 10 μ M, C3 5 μ M, TAPI 50 μ M ili kombinacijom inhibitora TAPI+DAPT, C3+DAPT, C3+TAPI, C3+TAPI+DAPT (pri čemu je koncentracija DAPT bila 10 μ M, a inhibitora TAPI i C3 u koncentraciji istoj kao i pri pojedinačnoj inhibiciji) te još dodatno spojem U18666A koji se koristi za oponašanje fenotipa NPC (koncentracija 3 μ g/mL) i inhibitorom lizosoma NH₄Cl (5 mM). Za oba ova spoja je u prethodnim istraživanjima utvrđeno da uzrokuju nakupljanje CTF-APP-a. Analizirana je razina retromernih proteina Vps26 i Vps35 te retromernog receptora sorLA (Slika 37.B) u odnosu na nakupljanje ili smanjenje razine cjelovitog APP-fl ili CTF-APP-a (Slika 37.A i 38., Tablica 8.). Kvantifikacije pojedinih proteina prikazane su pojedinačno (Slike 38.-41. i Tablice 8.-11.).

A)

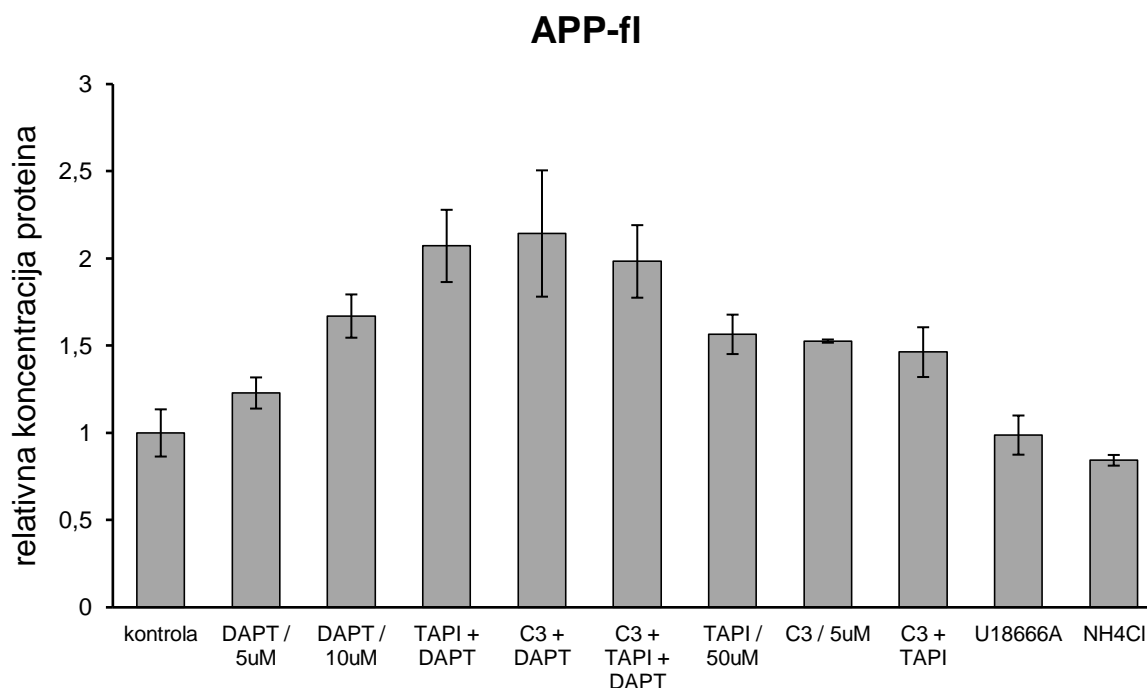


B)



Slika 37. Utjecaj nakupljanja ili smanjenja razine CTF-APP-a na razinu retromernog kompleksa. B) Analiza razine retromernih proteina Vps26, Vps35 te retromernog receptora sorLA u odnosu na A) razinu APP-fl i CTF-APP-a u stanicama SH-SY5Y koje stabilno ekspimiraju APP (SH-SY5Y-APP) i koje su tretirane pojedinačnim inhibitorom (DAPT, TAPI ili C3) ili kombinacijom inhibitora (TAPI+DAPT, C3+DAPT, C3+TAPI, C3+TAPI+DAPT) te još dodatno spojem U18666A i inhibitorom lizosoma NH₄Cl s ciljem snižavanja ili povećanja razine CTF-APP. Nakon tretmana stanice su skupljene, lizirane i razina proteina retromernog kompleksa analizirana je metodom WB. Kvantifikacije pojedinih proteina i statistička obrada prikazani su pojedinačno (Slike 38.-41. i Tablice 8.-11.).

Vrijednosti za razinu APP-fl u kontroli i tretmanima (Slika 37.) kvantificirane su u četiri nezavisna pokusa (Slika 38.). Analizom vrijednosti za razinu APP-fl u stanicama SH-SY5Y-APP nakon tretmana za nakupljanje i smanjenje razina CTF-APP-a, pokazano je da varijance nisu bile jednake (Leven's test $p=0,011$), stoga je primijenjena analiza Welch's ANOVA. Utvrđeno je da se razina APP-fl razlikovala između analiziranih grupa ($F(10,12,043)=69,602$, $p<0,001$). Stoga su post hoc testom Games-Howell uspoređene razlike srednjih vrijednosti između kontrole i skupina te unutar skupina. Dobivena je statistički značajna razlika između kontrole i svih tretiranih skupina, kao i unutar nekih skupina. S obzirom na veliki broj analiziranih skupina, p-vrijednosti prikazane su tablično (Tablica 8.), a statistički značajne p-vrijednosti istaknute su podebljano.



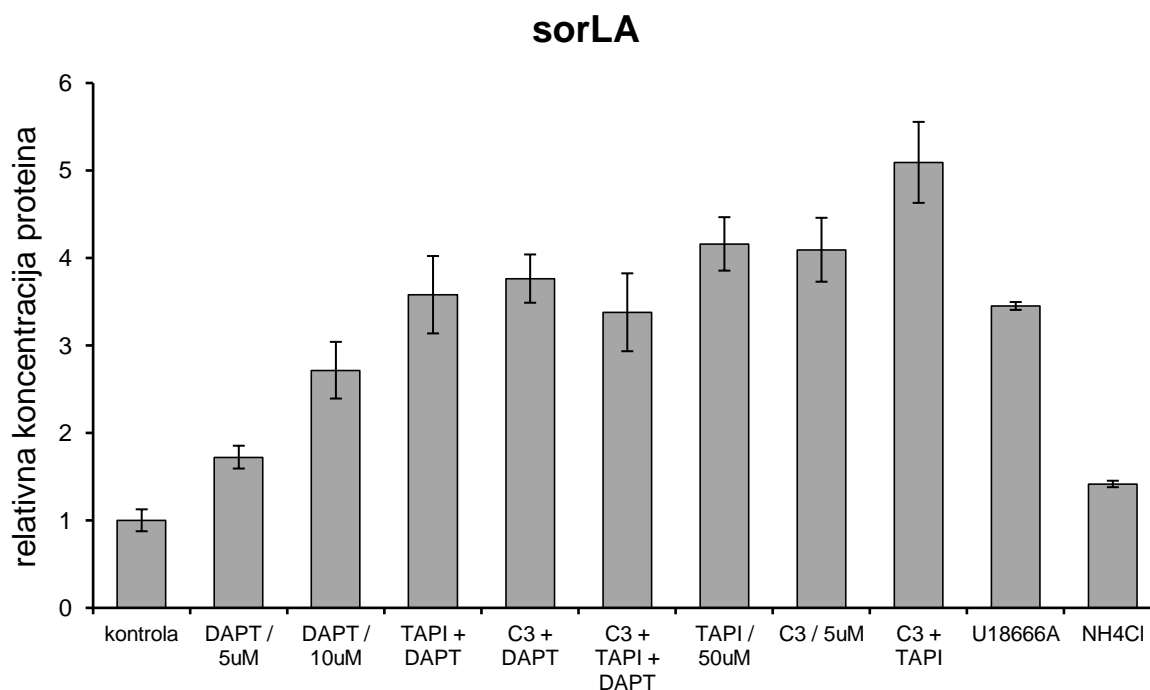
Slika 38. Utjecaj inhibicije α -, β - i γ -sekretaze na proteolitičku razgradnju APP-a u stanicama SH-SY5Y stabilno transfeciranim proteinom APP₆₉₅ (SH-SY5Y-APP). Na slici su prikazane dobivene srednje vrijednosti \pm SD nakon kvantifikacije rezultata dobivenih metodom Western blot u četiri nezavisna pokusa u jednoplikatima. Statistički značajne p-vrijednosti prikazane su u Tablici 8.

Tablica 8. Prikaz p-vrijednosti dobivenih kvantifikacijom rezultata dobivenih analizom Western blot za APP-fl. Rezultati dobiveni metodom Western blot u četiri nezavisna pokusa u jednoplikatima su kvantificirani te statistički obrađeni. Statistički značajne p-vrijednosti ($p < 0,05$) istaknute su podebljanim slovima.

p*	kontrola	DAPT/ 5uM	DAPT/ 10uM	TAPI/DA PT	C3/DAPT	C3/TAPI/ DAPT	TAPI	C3	C3/TAPI	U18666A	NH4Cl
kontrola	/	0,627	0,662	0,784	0,027	0,12	0,903	0,165	0,091	0,007	0,122
DAPT/ 5uM	0,627	/	1	0,056	0,32	0,01	1	0,975	0,779	0,166	0,727
DAPT/ 10uM	0,662	1	/	0,092	0,455	0,02	1	0,994	0,894	0,18	0,807
TAPI/DAPT	0,784	0,056	0,092	/	0,002	0,296	0,208	0,002	0,004	0,001	0,033
C3/DAPT	0,027	0,32	0,455	0,002	/	0,004	0,391	0,089	0,028	0,017	1
C3/TAPI/DAPT	0,12	0,01	0,02	0,296	0,004	/	0,051	0,004	0,006	0,003	0,008
TAPI	0,903	1	1	0,208	0,391	0,051	/	0,928	0,756	0,176	0,666
C3	0,165	0,975	0,994	0,002	0,089	0,004	0,928	/	0,763	0,027	0,879
C3/TAPI	0,091	0,779	0,894	0,004	0,028	0,006	0,756	0,763	/	0,001	0,979
U18666A	0,007	0,116	0,18	0,001	0,017	0,003	0,176	0,027	0,001	/	0,84
NH4Cl	0,122	0,727	0,807	0,033	1	0,008	0,666	0,879	0,979	0,84	/

5.5.1.1. Utjecaj nakupljanja ili smanjenja C-terminalnih odsječaka APP-a na razinu proteina sorLA

Vrijednosti za razinu proteina sorLA u kontroli i tretmanima (Slika 37.) kvantificirane su u četiri nezavisna pokusa (Slika 39.). Analizom vrijednosti za razinu proteina sorLA u stanicama SH-SY5Y nakon tretmana za nakupljanje i smanjenje razina CTF-APP-a, pokazano je da varijance nisu bile jednake (Leven's test $p=0,032$), stoga je primijenjena analiza Welch's ANOVA. Utvrđeno je da se razina proteina sorLA razlikovala između analiziranih grupa ($F(10,12.962)=347,797$, $p<0,001$). Stoga su post hoc testom Games-Howell uspoređene razlike srednjih vrijednosti između kontrole i skupina te unutar skupina. Dobivena je statistički značajna razlika između kontrole i svih tretiranih skupina, kao i unutar nekih skupina. S obzirom na veliki broj analiziranih skupina, p-vrijednosti prikazane su tablično (Tablica 9.), a statistički značajne p-vrijednosti istaknute su podebljano.



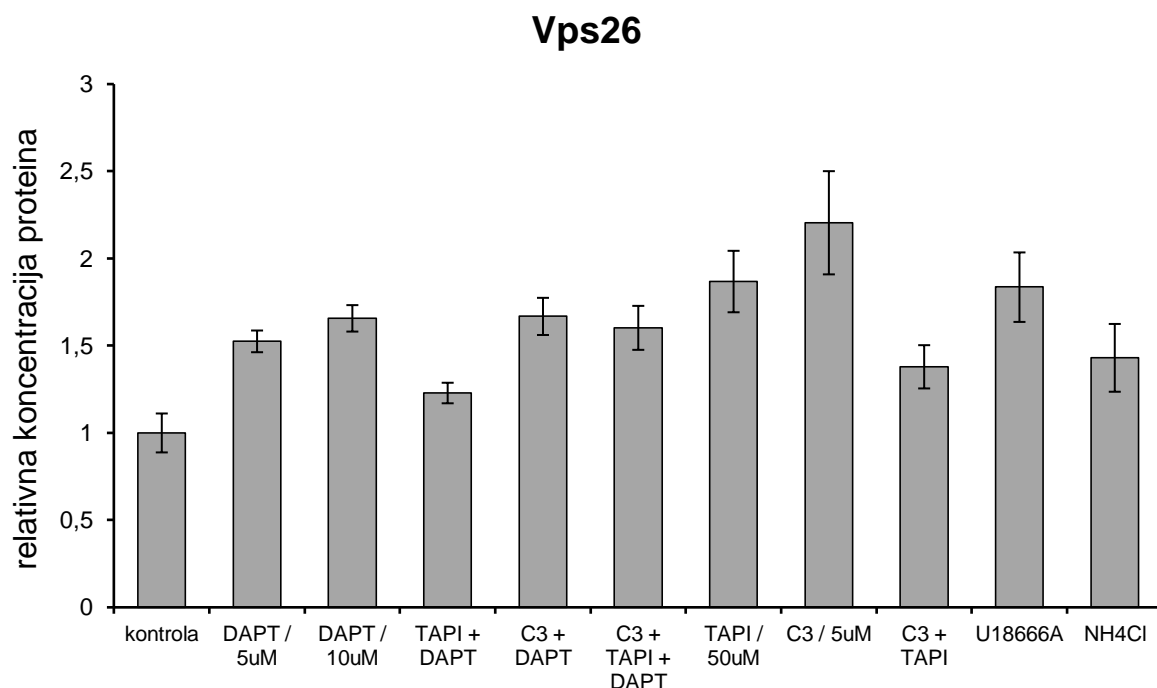
Slika 39. Nakupljanje ili smanjenje C-terminalnih odsječaka APP-a uzrokuje povećanje razine proteina sorLA. Na slici su prikazane dobivene srednje vrijednosti \pm SD nakon kvantifikacije rezultata dobivenih metodom Western blot u četiri nezavisna pokusa u jednoplikatima. Statistički značajne p-vrijednosti prikazane su u Tablici 9.

Tablica 9. Prikaz p-vrijednosti dobivenih kvantifikacijom rezultata dobivenih analizom WB proteina sorLA. Rezultati dobiveni metodom Western blot u četiri nezavisna pokusa u jednoplikatima su kvantificirani te statistički obrađeni. Statistički značajne p-vrijednosti ($p < 0,05$) istaknute su podebljanim slovima.

p*	kontrola	DAPT/ 5uM	DAPT/ 10uM	TAPI/DA PT	C3/DAPT	C3/TAPI/ DAPT	TAPI	C3	C3/TAPI	U18666A	NH4Cl
kontrola	/	0,002	0,01	0,009	0,001	0,012	0,001	0,002	0,002	< 0,001	< 0,001
DAPT/ 5uM	0,002	/	0,051	0,021	0,001	0,031	0,001	0,004	0,003	< 0,001	0,124
DAPT/ 10uM	0,01	0,051	/	0,244	0,043	0,481	0,11	0,22	0,004	0,144	0,031
TAPI/DAPT	0,009	0,021	0,244	/	0,999	1	0,588	0,757	0,049	0,999	0,018
C3/DAPT	0,001	0,001	0,043	0,999	/	0,883	0,695	0,896	0,058	0,585	0,003
C3/TAPI/DAPT	0,012	0,031	0,481	1	0,883	/	0,313	0,445	0,028	1	0,024
TAPI	0,001	0,001	0,011	0,588	0,695	0,313	/	1	0,206	0,135	0,003
C3	0,002	0,004	0,022	0,757	0,896	0,445	1	/	0,189	0,263	0,005
C3/TAPI	0,002	0,003	0,004	0,049	0,058	0,028	0,206	0,189	/	0,044	0,004
U18666A	< 0,001	< 0,001	0,144	0,999	0,585	1	0,135	0,263	0,044	/	< 0,001
NH4Cl	< 0,001	0,124	0,031	0,018	0,003	0,024	0,003	0,005	0,004	< 0,001	/

5.5.1.2. Utjecaj nakupljanja ili smanjenja C-terminalnih odsječaka APP-a na razinu proteina Vps26

Vrijednosti za razinu proteina Vps26 u kontroli i tretmanima (Slika 37.) kvantificirane su u četiri nezavisna pokusa (Slika 40.). Analizom dobivenih vrijednosti za razinu proteina Vps26 u stanicama SH-SY5Y nakon tretmana za nakupljanje i smanjenje razina CTF-APP-a, varijance nisu bile jednake (Leven's test $p=0,002$), stoga je primijenjena analiza Welch's ANOVA. Utvrđeno je da se razina proteina Vps26 razlikovala između analiziranih grupa ($F(10,13.746)=21,414, p < 0,001$). Post hoc testom Games-Howellu uspoređene su razlike srednjih vrijednosti između kontrole i skupina te unutar skupina. Dobivena je statistički značajna razlika između kontrole i svih tretiranih skupina, kao i unutar nekih skupina. S obzirom na veliki broj analiziranih skupina, p-vrijednosti prikazane su tablično (Tablica 10.), a statistički značajne p-vrijednosti istaknute su podebljano.



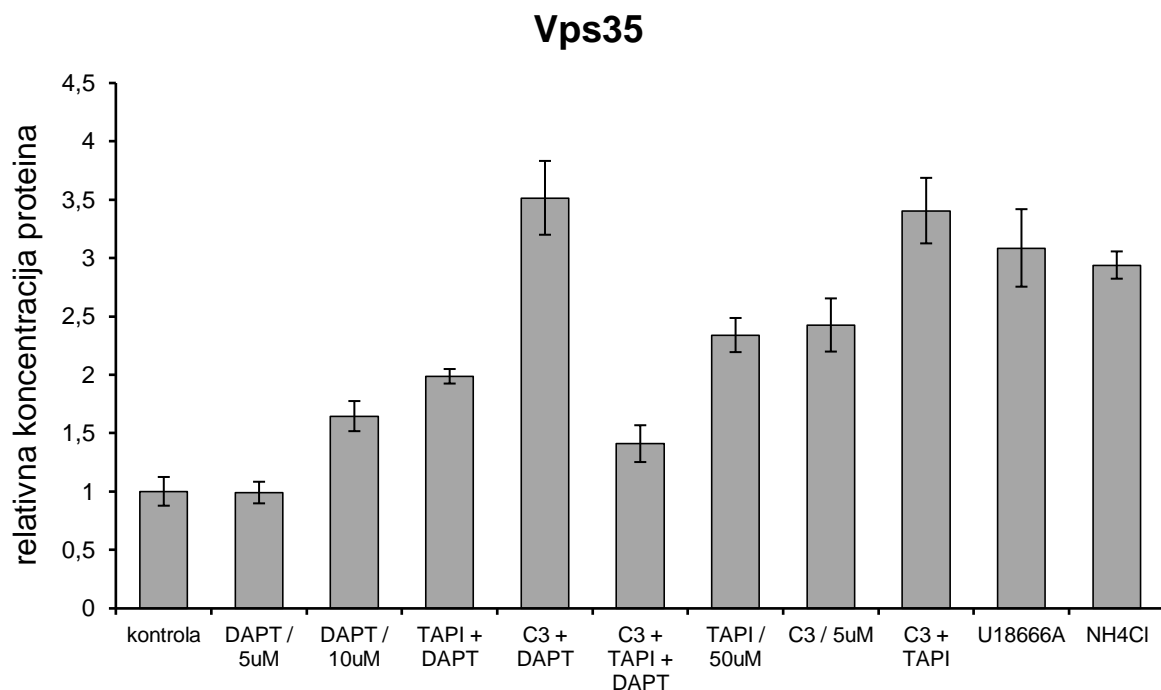
Slika 40. Nakupljanje ili smanjenje C-terminalnih odsječaka APP-a povećava razinu proteina Vps26. Na slici su prikazane dobivene srednje vrijednosti \pm SD nakon kvantifikacije rezultata dobivenih metodom Western blot u četiri nezavisna pokusa u jednoplikatima. Statistički značajne p-vrijednosti prikazane su u Tablici 9.

Tablica 10. Prikaz p-vrijednosti dobivenih kvantifikacijom rezultata dobivenih analizom WB proteina Vps26. Rezultati dobiveni metodom Western blot u četiri nezavisna pokusa u jednoplikatima su kvantificirani te statistički obrađeni. Statistički značajne p-vrijednosti ($p < 0,05$) istaknute su podebljanim slovima.

p*	kontrola	DAPT/5uM	DAPT/10uM	TAPI/DAPT	C3/DAPT	C3/TAPI/DAPT	TAPI	C3	C3/TAPI	U18666A	NH4Cl
kontrola	/	<0,001	<0,001	0,022	0,001	0,005	0,008	0,024	0,038	0,017	0,14
DAPT/5uM	<0,001	/	0,369	0,008	0,525	0,97	0,204	0,137	0,62	0,343	0,988
DAPT/10uM	<0,001	0,369	/	0,003	1	0,998	0,583	0,232	0,142	0,799	0,596
TAPI/DAPT	0,022	0,008	0,003	/	0,014	0,054	0,032	0,051	0,584	0,058	0,674
C3/DAPT	0,001	0,525	1	0,014	/	0,997	0,688	0,244	0,16	0,875	0,06
C3/TAPI/DAPT	0,005	0,97	0,998	0,054	0,997	/	0,463	0,181	0,425	0,671	0,879
TAPI	0,008	0,204	0,583	0,032	0,688	0,463	/	0,681	0,069	1	0,194
C3	0,024	0,137	0,232	0,051	0,244	0,181	0,681	/	0,069	0,629	0,084
C3/TAPI	0,038	0,62	0,142	0,584	0,16	0,425	0,069	0,069	/	0,132	1
U18666A	0,017	0,343	0,799	0,058	0,875	0,671	1	0,629	0,132	/	0,294
NH4Cl	0,14	0,988	0,596	0,674	0,6	0,879	0,194	0,084	1	0,294	/

5.5.1.3. Utjecaj nakupljanja ili smanjenja C-terminalnih odsječaka APP-a na razinu proteina Vps35

Vrijednosti za razinu proteina Vps35 u kontroli i tretmanima (Slika 37.) kvantificirane su u četiri nezavisna pokusa (Slika 41.). S obzirom da su usporedbom dobivenih vrijednosti za razinu proteina Vps35 u stanicama SH-SY5Y-APP nakon tretmana za nakupljanje i smanjenje razina CTF-APP-a, varijance bile jednake (Leven's test $p=0,548$), korištena je analiza ANOVA. Utvrđeno je da se razina proteina Vps26 razlikovala između analiziranih grupa ($F(10,37)=119,33$, $p<0,001$). Post hoc testom utvrđene su razlike srednjih vrijednosti između kontrole i skupina te unutar skupina. Dobivena je statistički značajna razlika između kontrole i svih tretiranih skupina, kao i unutar većine skupina. S obzirom na veliki broj analiziranih skupina, p-vrijednosti prikazane su tablično (Tablica 11.), a statistički značajne p-vrijednosti istaknute su podebljano.



Slika 41. Smanjenje C-terminalnih odsječaka APP-a najviše povećava razinu proteina Vps35.

Na slici su prikazane dobivene srednje vrijednosti \pm SD nakon kvantifikacije rezultata dobivenih metodom Western blot u četiri nezavisna pokusa u jednoplikatima. Statistički značajne p-vrijednosti prikazane su u Tablici 11.

Tablica 11. Prikaz p-vrijednosti dobivenih kvantifikacijom rezultata dobivenih WB proteina Vps35. Rezultati dobiveni metodom Western blot u četiri nezavisna pokusa u jednoplikatima su kvantificirani te statistički obrađeni. Statistički značajne p-vrijednosti ($p < 0,05$) istaknute su podebljanim slovima.

p*	kontrola	DAPT/ 5 μ M	DAPT/ 10 μ M	TAPI/DA PT	C3/DAPT	C3/TAPI/ DAPT	TAPI	C3	C3/TAPI	U18666A	NH ₄ Cl
kontrola	/	1	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
DAPT/ 5 μ M	1	/	<0,001	<0,001	<0,001	0,006	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
DAPT/ 10 μ M	<0,001	<0,001	/	0,193	<0,001	0,569	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
TAPI/DAPT	<0,001	<0,001	0,193	/	<0,001	0,001	0,246	0,077	<0,001	<0,001	<0,001
C3/DAPT	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	/	<0,001	<0,001	<0,001	1	0,275	0,04
C3/TAPI/DAPT	0,001	0,006	0,569	0,001	<0,001	/	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
TAPI	<0,001	<0,001	<0,001	0,264	<0,001	<0,001	/	1	<0,001	0,001	0,009
C3	<0,001	<0,001	<0,001	0,077	<0,001	<0,001	1	/	<0,001	0,004	0,043
C3/TAPI	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	1	<0,001	<0,001	<0,001	/	0,666	0,172
U18666A	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,275	<0,001	0,001	0,004	0,666	/	0,998
NH ₄ Cl	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,04	<0,001	0,009	0,043	0,172	0,998	/

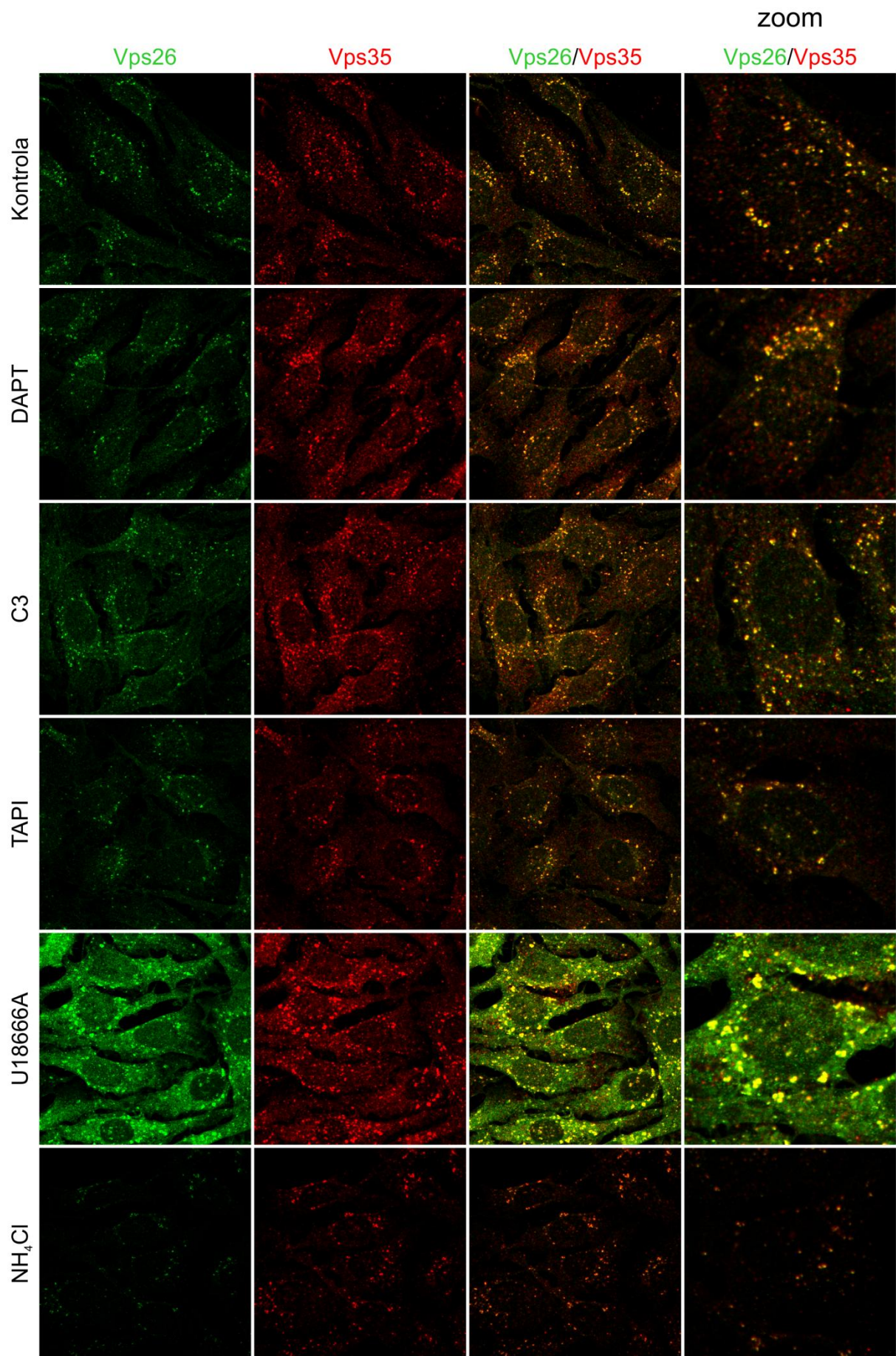
5.5.2. Utjecaj razine C-terminalnih odsječaka APP-a na smještaj retromernih proteina

Nakon što je pokazano kako inhibitori enzima uključenih u procesiranje proteina APP – α , β i γ -sekretaze uzrokuju promjenu razine proteina retromernog kompleksa sorLA, Vps35 i Vps26 uslijed nakupljanja ili smanjenja razine odsječaka CTF-APP-a, analiziran je utjecaj tretmana inhibitorima na smještaj retromernih proteina Vps26 i Vps35 u stanicama SH-SY5Y-APP. Radi jednostavnosti, korišteni su samo pojedinačni inhibitori, bez kombinacija inhibitora. Također, dodatno su kao tretmani korišteni U18666A i NH₄Cl.

Stanice SH-SY5Y-APP nasadene su na stakalca, tretirane inhibitorima DAPT (koncentracija 10 μ M), C3 (5 μ M) i TAPI (50 μ M) te spojevima U18666A (3 μ g/mL) te NH₄Cl (5 mM). Svi tretmani trajali su 48 sati. Nakon 48 sati, stanice su fiksirane, te imunocitokemijski obilježene specifičnim primarnim protutijelima.

Bojenje stanica protutijelima za Vps26 i Vps35 u kontrolnim stanicama pokazalo je da retromerni proteini u potpunosti kolokaliziraju većinom perinuklearno i da se nalaze smješteni u malim vezikulama (Slika 42.). Najveća razlika u usporedbi s kontrolnim stanicama je pri tretmanu U18666A gdje je signal za retromerne proteine bio puno snažniji, a Vps26 i Vps35 su se nakupljali periferno u velikim nakupinama.

U tretmanu DAPT retromerni proteini grupirali su se u određenim dijelovima stanica te su se nakupljali u većim nakupinama. U tretmanu TAPI signal za retromerne proteine bio je najslabiji, a Vps26 i Vps35 nalazili su se u samo nekoliko nakupina. U tretmanima C3 i NH₄Cl Vps26 i Vps35 nalazili su se slično kao u kontrolnim stanicama, u malim sitnim nakupinama jednoliko raspršenim po periferiji stanice (Slika 42.).



Slika 42. Nakupljanje C-terminalnih odsječaka APP-a uzrokuje grupiranje retromernih proteina u povećanim retromernim vezikulama u stanicama SH-SY5Y-APP. Stanice su nasadene na stakalca, tretirane inhibitorom α -sekretaze (TAPI), β -sekretaze (C3) i γ -sekretaze (DAPT) te spojevima U18666A i NH_4Cl tijekom 48 h. Stanice su fiksirane, imunocitokemijski obilježene protutijelima za retromerne proteina Vps26 i Vps35. Smještaj retromernog kompleksa analiziran je konfokalnim laserskim mikroskopom.

Nakon što je primijećen različit smještaj i grupiranje proteina retromernog kompleksa u tretiranim stanicama u usporedbi s kontrolnim stanicama, praćen je stanični smještaj retromernih proteina. S obzirom da Vps26 i Vps35 u potpunosti kolokaliziraju, korišteno je samo primarno protutijelo za protein Vps35. Vps35 je kolokaliziran s biljezima staničnih organela uključenih u endosomalno-lizosomalni puta – biljegom ranih endosoma (EEA1, Slika 43.A), kasnih endosoma (Rab7, Slika 43.B) i lizosoma (LAMP1, Slika 43.C). Nažalost, primarna protutijela za biljege Golgijevog aparata (TGN46) i kasnih endosoma (TfR) korištena u ovom radu nije moguće koristiti u stanicama ljudskog podrijetla poput SH-SY5Y. Imunocitokemijsko bojenje pokazalo je promjene u smještaju biljega endosomalno-lizosomalnog puta (Slika 43.). U odnosu na kontrolne stanice, u svim tretmanima došlo je do povećanja signala i/ili nakupljanja endosoma. Pri tome je naslabiji učinak tretmana na biljeg EEA1 bio u tretmanu C3, gdje je signal bio jači nego u kontrolnim stanicama, ali i dalje homogeno raspršen u stanicama. U tretmanu NH_4Cl signal je bio jači, a i endosomi su bili veći i grupirani. Međutim, najveća razlika u biljegu EEA1 uočena je u tretmanima DAPT, TAPI i U18666A u odnosu na kontrolne stanice. U tim stanicama vezikule pozitivne na biljeg EEA1 bile su puno veće i grupirane (Slika 43.A).

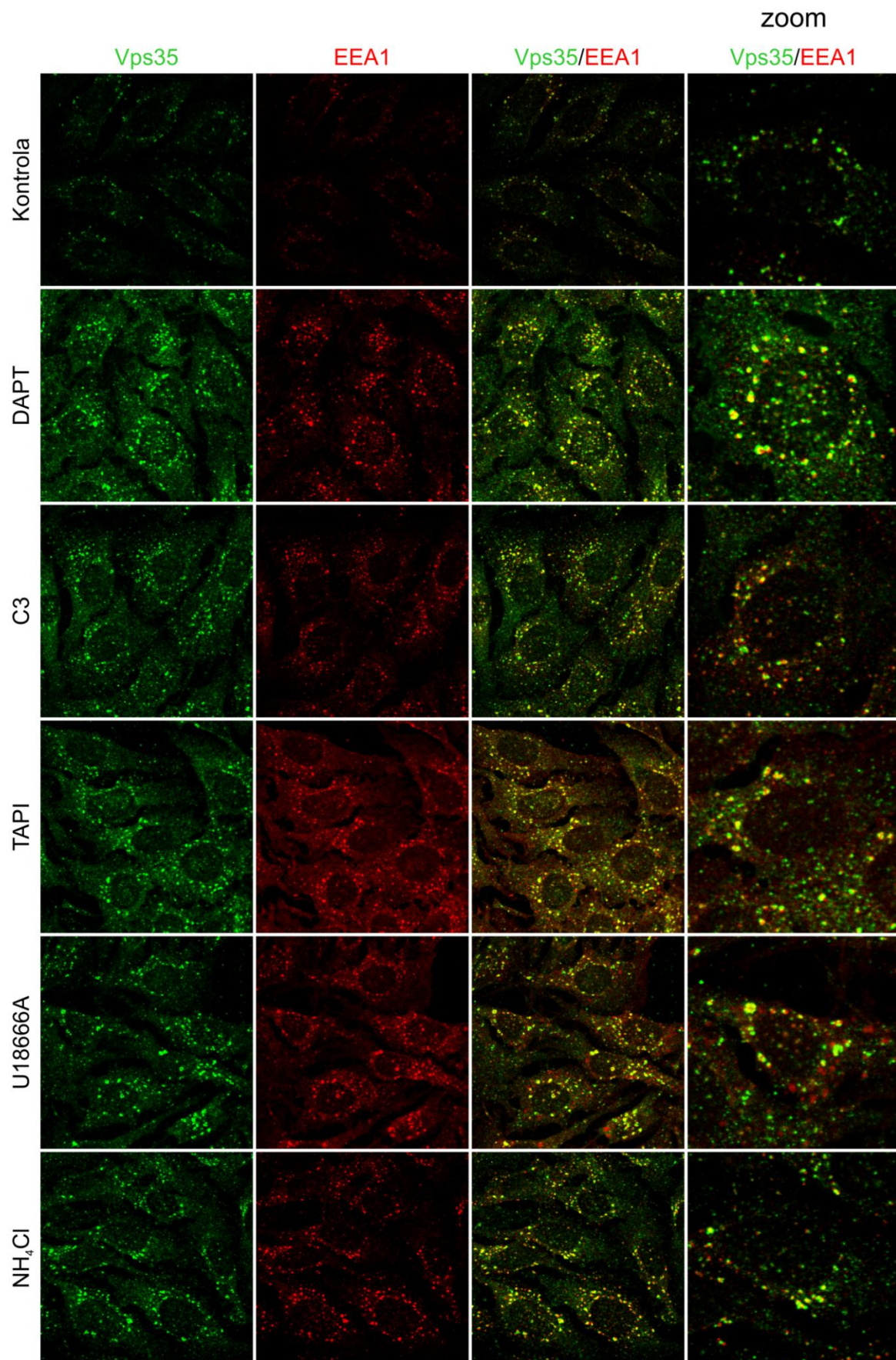
Također, utvrđene su promjene u vezikulama pozitivnima na biljeg Rab7 (Slika 43.B). U kontrolnim stanicama biljeg Rab7 bio je jednoliko raspoređene po stanici. Slično kontroli izgledale su stanice tretirane inhibitorom C3. Međutim, u ostalim tretmanima uočene su razlike. Najsnažniji signal po cijeloj stanici bio je u tretmanu NH_4Cl . U tretmanima DAPT i U18666A signal za Rab7 nije više bio jednoliko raspršen po stanici nego se grupirao u određene dijelove stanice, a u ostalim dijelovima stanica nije bilo bojenja. Najznačajnija razlika bila je u tretmanu TAPI, u kojemu je bojenje za Rab7 u nekim stanicama bilo nalik bojenju u tretmanima DAPT i NH_4Cl , a u većini ostalih stanica oblik velikih vezikula, jako različito od kontrolnih stanica i bilo kojeg drugog tretmana (Slika 43.B). Biljeg lizosoma, LAMP1, bio je povećan otprilike isto u svim tretmanima u odnosu na kontrolne stanice (Slika 43.C).

Praćenjem kolokalizacije retromernog proteina Vps35 s EEA1, uočeno je da u kontrolnim stanicama Vps35 i EEA1 djelomično kolokaliziraju (Slika 43.A). Osim kontrolnih stanicama, djelomična kolokalizacija Vps35 i EEA1 uočena je i u tretmanima C3 i NH₄Cl gdje je uočena kolokalizacija Vps35 s većim EEA1-pozitivnim vezikulama, dok poneke manje EEA1-pozitivne ili Vps35-pozitivne vezikule nisu kolokalizirale. Također, u tretmanu U18666A uočena je kolokalizacija Vps35 u EEA1-pozitivnim vezikulama, pri čemu je sav Vps35 kolokaliziran s velikim EEA1-pozitivnim vezikulama, međutim neke EEA1-pozitivne vezikule bile su bez Vps35. U tretmanima TAPI i DAPT uočena je gotovo potpuna kolokalizacija velikih Vps35- i EEA1-pozitivnih vezikula (Slika 43.A).

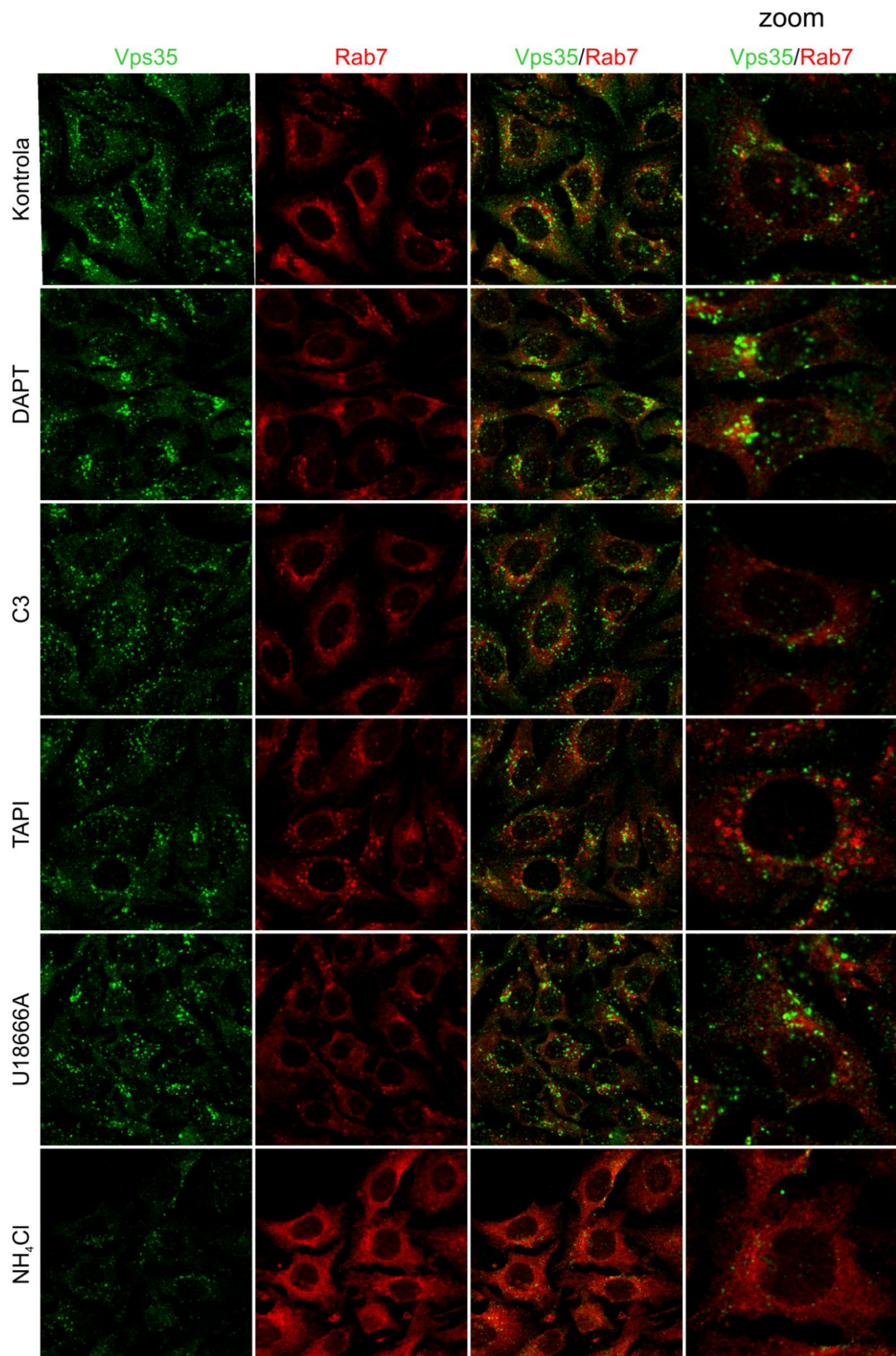
Kolokalizacija Vps35 s biljgom kasnih endosoma u kontrolnim stanicama pokazala je djelomičnu kolokalizaciju (Slika 43.B). Sličan signal za Rab7 i Vps35, pa tako i njihova kolokalizacija bila je uočena u tretmanu C3. U tretmanu NH₄Cl uočena je slaba kolokalizacija. Iako je signal za Rab7 raspoređen po cijeloj stanici, a vezikule pozitivne na Vps35 male i slabog intenziteta, moguće je uočiti signal za samo Vps35, bez kolokalizacije s Rab7. U tretmanima DAPT i U18666A grupirani signal za Rab7 i velike nakupine proteina Vps35 nalazile su se u istim dijelovima stanice te su potpuno kolokalizirale u oba tretmana, odnosno bili su dio iste velike nakupine unutar stanice. Bojenje Vps35 i biljega Rab7 u tretmanu TAPI imalo je istu morfologiju u svim stanicama. U nekim stanicama to je odgovaralo nakupljanju u jednom dijelu stanice, a u drugim stanicama je bilo velikim okruglim točkama, stoga je bila uočena potpuna kolokalizacija Vps35 i Rab7 u tretmanu TAPI (Slika 43.B).

Kolokalizacije retromernog proteina Vps35 s biljgom lizosoma u kontrolnim stanicama nije bilo. U svim tretmanima bilo je prisutno grupiranje signala za Vps35 u dijelovima stanice gdje se nakupljao biljeg LAMP1 (Slika 43.C). Međutim, s obzirom na raširenost signala za LAMP1, teške je uočiti jesu li Vps35 i LAMP1 bili dio iste membrane. Moglo se uočiti da je kolokalizacija Vps35 s biljgom LAMP1 puno slabija u usporedbi s kolokalizacijom s biljezima EEA1 i Rab7 (Slika 43.A i B).

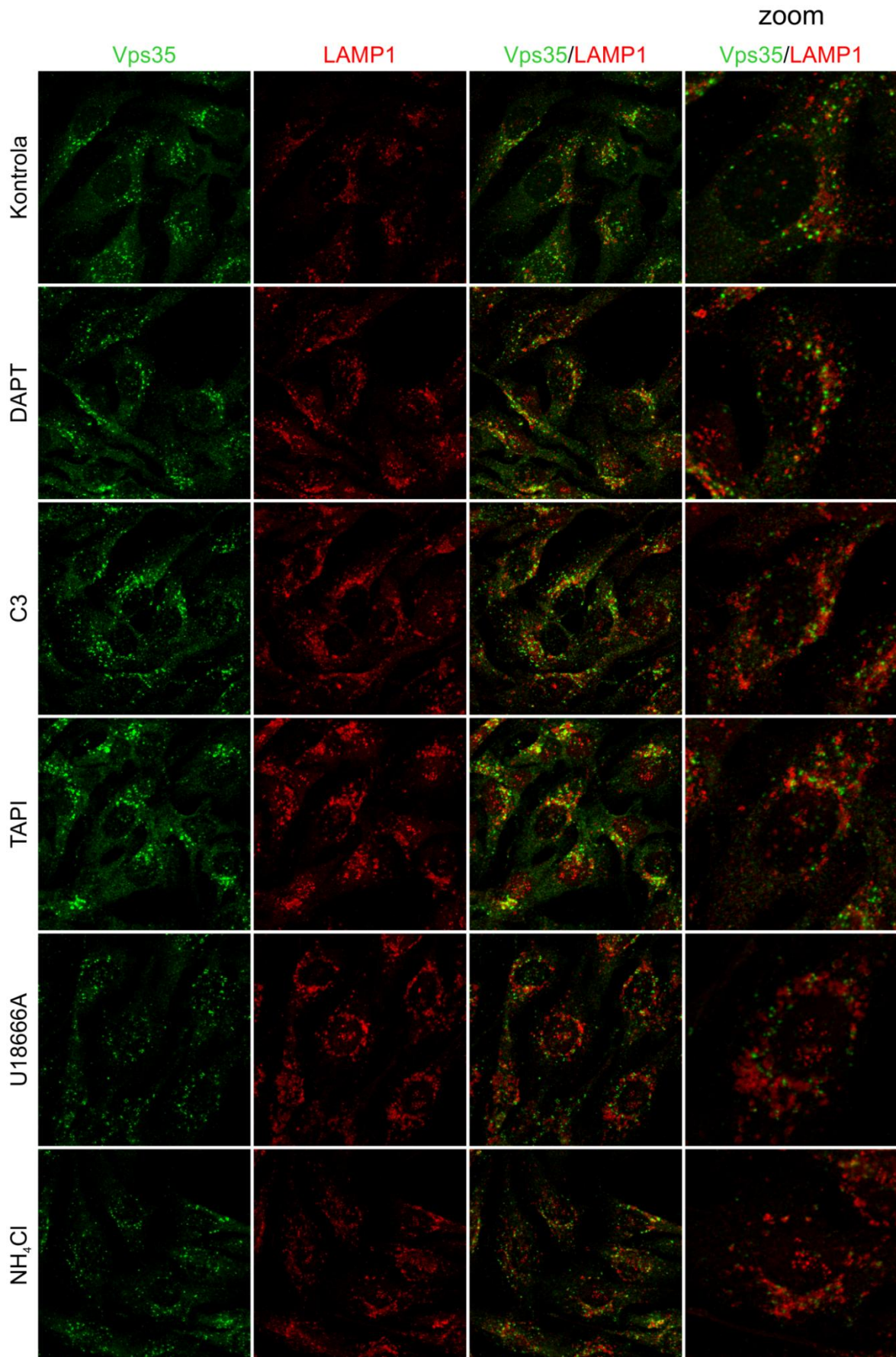
A)



B)



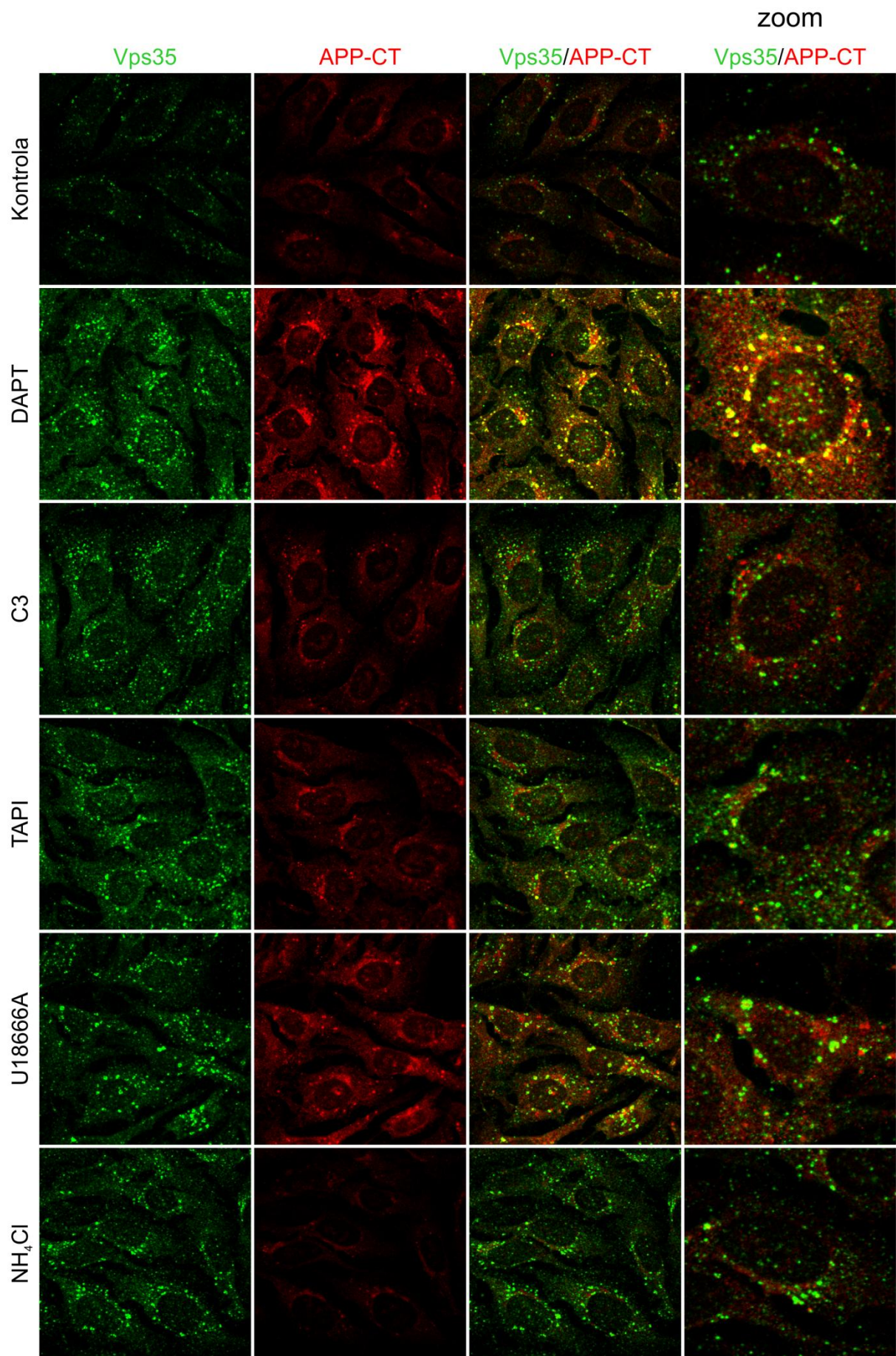
C



Slika 43. Uslijed nakupljanja C-terminalnih odsječaka APP-a povećava se kolokalizacija retromera i s biljezima ranih i kasnih endosoma. Stanice su nasadene na stakalca, tretirane inhibitorom α -sekretaze (TAPI), β -sekretaze (C3) i γ -sekretaze (DAPT) te spojevima U18666A i NH_4Cl tijekom 48 h. Stanice su fiksirane, imunocitokemijski obilježene protutijelima za retromerni proteina Vps35 i A) biljeg ranih endosoma, EEA1, B) biljeg kasnih endosoma Rab7 i C) biljeg lizosoma LAMP1. Smještaj retromernog kompleksa analiziran je konfokalnim laserskim mikroskopom.

Nakon što je utvrđen smještaj retromernog proteina Vps35 unutar ranih endosoma u stanicama koje nakupljaju CTF-APP-a, analizirana je kolokalizacija proteina Vps35 s APP. Korišteno je specifično C-terminalno protutijelo (APP-CT) koje može detektirati APP-fl, ali CTF-APP-a. Primijećeno je da se signal APP-CT mijenja u tretmanima. Naime, u kontroli je primijećeno prstenasto bojenje APP-a blizu jezgre. U tretmanima inhibitorima sekretaze, uz postojeće prstenasto bojenje, pojavljuje se i točkasto bojenje. Pojava točkastog bojenja uočeno je u svim tretmanima, a najsnažnije i prstenasto i točkasto bojenje bilo je u tretmanima DAPT, zatim U18666A, TAPI i C3, a najslabije u tretmanu NH_4Cl (Slika 44.).

Praćenjem kolokalizacije proteina Vps35 protutijelom APP-CT još jednom je uočeno da je raspršeni signal za protein Vps35 prisutan samo u kontrolnim stanicama i u tretmanu C3. U svim ostalim stanicama primijećeno je krupnije točkasto obojenje ili grupiranje nakupina u određenim dijelovima stanica. Također, u kontrolnim stanicama prisutna je samo djelomična kolokalizacija Vps35 i APP-CT, a u tretmanu C3 nema kolokalizacije Vps35 s točkastim obojenjem APP-CT. U svim ostalim tretmanima (DAPT, TAPI, U18666A i NH_4Cl) velika točkasta područja obilježena protutijelima za APP-CT i Vps35 u potpunosti kolokaliziraju (Slika 44.).

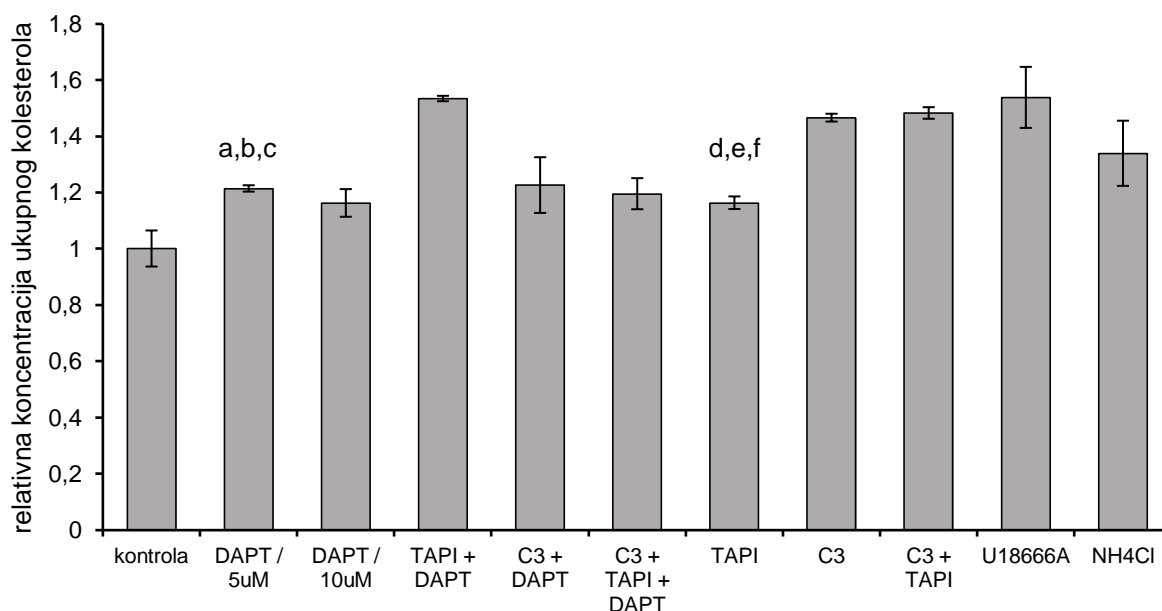


Slika 44. Uslijed nakupljanja C-terminalnih odsječaka APP-a, povećava se kolokalizacija retromera i APP-a (obilježenog C-terminalnim primarnim protutijelom). Stanice su nasadene na stakalca, tretirane inhibitorom α -sekretaze (TAPI), β -sekretaze (C3) i γ -sekretaze (DAPT) te spojevima U18666A i NH_4Cl tijekom 48 h. Stanice su fiksirane, imunocitokemijski obilježene protutijelima za retromerni proteina Vps35 i APP-CT (C-terminalno protutijelo, Y188). Smještaj retromernog kompleksa analiziran je konfokalnim laserskim mikroskopom.

5.6. Utjecaj nakupljanja ili smanjenja razine C-terminalnih odsječaka APP-a na metabolizam kolesterola

5.6.1. Utjecaj C-terminalnih odsječaka APP-a na razinu ukupnog kolesterola i smještaj slobodnog kolesterola

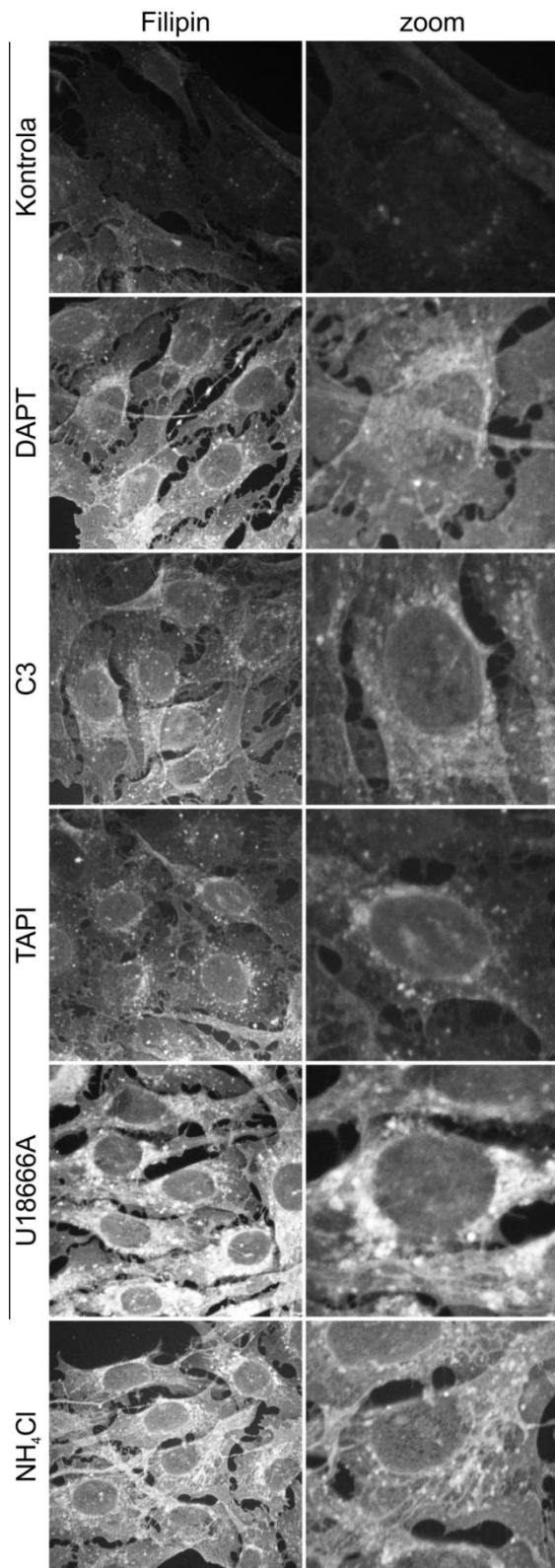
S obzirom na nedavno objavljenu povezanost funkcije retromernog kompleksa i unutarstaničnog transporta slobodnog kolesterola (226), analiziran je utjecaj C-terminalnih odsječaka APP-a (CTF-APP) na metabolizam kolesterola u stanicama SH-SY5Y-APP koje su tretirane istim tretmanima ili kombinacijom tretmana za nakupljanje ili smanjenje CTF-APP-a kao u 5.5. Izmjerena je razina ukupnog kolesterola metodom Amplex Red Cholesterol Assay (opisana u poglavlju 4.8.1). Statističkom analizom utvrđeno je da nije bilo značajnih razlika između kontrolne skupine i tretmana, ali u tretmanima TAPI+DAPT, C3, C3+TAPI i U18666A postoji trend povećanja razine ukupnog kolesterola. Međutim, postojala je značajna razlika između tretmana. Razina kolesterola u tretmanu DAPT (5 μ M) bila je značajno smanjena u odnosu na tretman TAPI+DAPT, tretman C3 i C3+TAPI. U tretmanu TAPI razina kolesterola bila je značajno smanjena u odnosu na tretmane TAPI+DAPT, C3 i C3+TAPI (Slika 45.).



Slika 45. Nakupljanje C-terminalnih odsječaka mijenja razinu ukupnog kolesterola u stanicama SH-SY5Y-APP. Stanice su nasadene, tretirane s navedenim inhibitorima za smanjenje ili nakupljanje C-terminalnih odsječaka APP-a. Nakon završetka tretmana, stanice su lizirane, a ukupni kolesterol izmjeren je metodom Amplex Red Cholesterol Assay. Koncentracija ukupnog kolesterola izražena je

kao omjer prema koncentraciji proteina u svakom uzorku. Relativna koncentracija proteina izražena je kao omjer prema kontrolnom uzorku. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD. Ukupni kolesterol značajno se smanjuje u tretmanu DAPT (5 μ M) u odnosu na a) razinu kolesterola u tretmanu TAPI+DAPT ($p=0,006$) te u odnosu na b) C3 ($p=0,016$) i u odnosu na c) C3+TAPI ($p=0,043$). U tretmanu TAPI razina kolesterola bila je značajno smanjena u odnosu na d) TAPI+DAPT ($p=0,04$), e) C3 ($p=0,034$) i f) C3+TAPI ($p=0,024$).

U stanicama SH-SY5Y-APP koje su tretirane pojedinačnim inhibitorima DAPT, C3 i TAPI praćeno je nakupljanje slobodnog neesterificiranog kolesterola pomoću filipina. Stanice su nasadene na stakalca (metoda opisana u 4.8.2.), tretirane i nakon 48 h, fiksirane i obilježene filipinom te analizirane konfokalnim laserskim mikroskopom. U svim tretmanima za nakupljanje CTF-APP-a ili smanjenje CTF α /C83 ili CTF β /C99 posebno došlo je do nakupljanja slobodnog kolesterola. Kao pozitivna kontrola korišten je tretman U18666A. Tretman U18666A pokazivao je najznačajnije nakupljanje slobodnog kolesterola. Međutim, nakupljanje kolesterola i točkasto bojenje filipinom uočeno je u svim tretmanima (Slika 46.). Ovi rezultati ukazuju da nakupljanje CTF-APP-a djeluje na unutarstanično nakupljanje kolesterola.



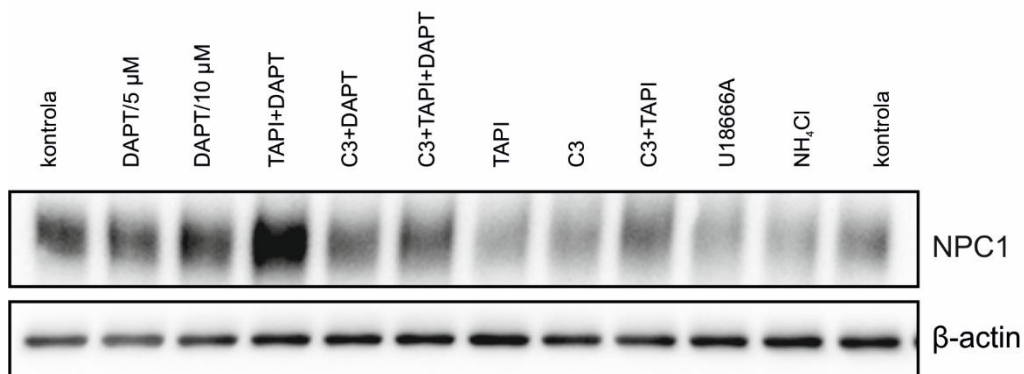
Slika 46. Tretmani inhibitorima α -, β - i γ -sekretaze uzrokuju unutarstanično nakupljanje slobodnog kolesterola u stanicama SH-SY5Y-APP. Nakupljanje kolesterola u tretiranim stanicama SH-SY5Y-APP praćeno je bojenjem filipinom. Nakon nasađivanja, stanice su fiskirane i obojene filipinom. Stanice su analizirane konfokalnim laserskim mikroskopom.

5.6.2. Utjecaj razine C-terminalnih odsječaka APP-a na razinu proteina NPC1

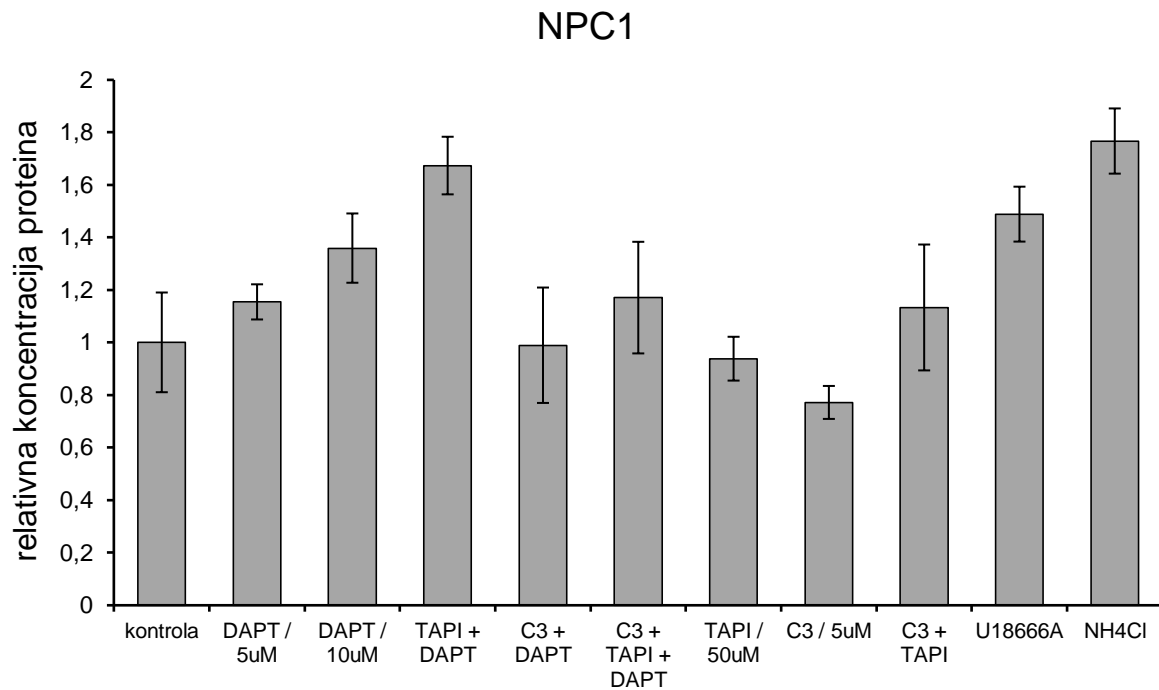
U stanicama SH-SY5Y-APP tretiranih inhibitorima DAPT, C3 ili TAPI ili različitom kombinacijom ovih inhibitora analizirana je razina proteina NPC1. Dobivene vrijednosti za razinu proteina NPC1 u kontroli i tretmanima (Slika 47.) kvantificirane su u četiri nezavisna pokusa.

S obzirom da su usporedbom dobivenih vrijednosti za razinu proteina NPC1 u stanicama SH-SY5Y-APP nakon tretmana za nakupljanje i smanjenje razina CTF-APP-a, varijance bile jednake (Leven's test $p=0,122$), korištena je analiza ANOVA. Utvrđeno je da se razina proteina NPC1 razlikovala između analiziranih grupa ($F(10,37)=16,723$, $p<0,001$). Post hoc testom utvrđene su razlike srednjih vrijednosti između kontrole i skupina te unutar skupina. Dobivena je značajna razlika između kontrole i nekih tretiranih skupina, kao i unutar većine skupina (Slika 47.). S obzirom na veliki broj analiziranih skupina, p-vrijednosti prikazane su tablično (Tablica 12.), a statistički značajne p-vrijednosti istaknute su podebljano.

A)



B)



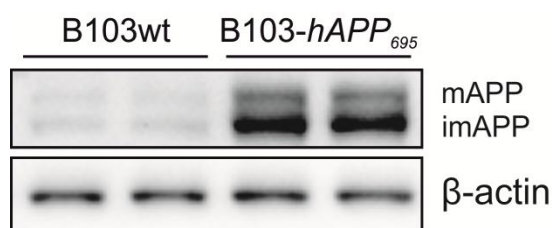
Slika 47. Nakupljanje C-terminalnog odsječka CTF β /C99 (uz tretmane TAPI+DAPT) najviše povećava razinu proteina NPC1. Analiza proteina NPC1 u stanicama SH-SY5Y koje stabilno eksprimiraju APP (SH-SY5Y-APP) i koje su tretirane pojedinačnim inhibitorom (DAPT, TAPI ili C3) ili kombinacijom inhibitora (TAPI+DAPT, C3+DAPT, C3+TAPI, C3+TAPI+DAPT) te još dodatno spojem U18666A i inhibitorom lizosoma NH₄Cl s ciljem snižavanja ili povećanja razine CTF-APP. A) Nakon završetka pokusa stanice su skupljene, stanice lizirane i razina proteina NPC1 analizirana je metodom WB. B) Na slici su prikazane dobivene srednje vrijednosti \pm SD nakon kvantifikacije rezultata dobivenih metodom Western blot u četiri nezavisna pokusa u jednoplikatima. Statistički značajne p-vrijednosti prikazane su u Tablici 12.

Tablica 12. Prikaz p-vrijednosti dobivenih kvantifikacijom rezultata dobivenih analizom WB za protein NPC1. Rezultati dobiveni metodom Western blot u četiri nezavisna pokusa u jednoplikatima su kvantificirani te statistički obrađeni. Statistički značajne p-vrijednosti ($p < 0,05$) istaknute su podebljanim slovima.

p*	kontrola	DAPT/ 5uM	DAPT/ 10uM	TAPI/DA PT	C3/DAPT	C3/TAPI/ DAPT	TAPI	C3	C3/TAPI	U18666A	NH4Cl
kontrola	/	0,874	0,024	<0,001	1	0,792	1	0,411	0,947	0,001	<0,001
DAPT/ 5uM	0,874	/	0,75	0,002	0,917	1	0,687	0,049	1	0,132	<0,001
DAPT/ 10uM	0,024	0,75	/	0,19	0,064	0,83	0,02	<0,001	0,631	0,983	0,028
TAPI/DAPT	<0,001	0,002	0,19	/	<0,001	0,003	<0,001	<0,001	0,001	0,845	0,999
C3/DAPT	1	0,917	0,064	<0,001	/	0,86	1	0,679	0,965	0,003	<0,001
C3/TAPI/DAPT	0,792	1	0,83	0,003	0,86	/	0,593	0,034	1	0,178	<0,001
TAPI	1	0,687	0,2	<0,001	1	0,593	/	0,912	0,8	0,001	<0,001
C3	0,411	0,049	<0,001	<0,001	0,679	0,034	0,912	/	0,077	<0,001	<0,001
C3/TAPI	0,947	1	0,631	0,001	0,965	1	0,8	0,077	/	0,087	<0,001
U18666A	0,001	0,132	0,983	0,845	0,003	0,178	0,001	<0,001	0,087	/	0,338
NH4Cl	<0,001	<0,001	0,028	0,999	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,338	/

5.6.3. Utjecaj razine C-terminalnih odsječaka APP-a na ekspresiju gena uključenih u metabolizam kolesterola

Osim analize utjecaja razine CTF-APP-a na razinu proteina NPC1, koji je odgovoran za unutarstanični transport slobodnog kolesterola iz organela kasnih endosoma-lizosoma u druge stanične odjeljke, pratili smo i utjecaj na ekspresiju gena uključenih u metabolizam kolesterola, pri tome su analizirani geni uključeni u sintezu kolesterola (*HMGCR* i *SREBF1*), u unos kolesterola u stanicu (*LRP1* i *LDLR*) te iznos kolesterola iz stanice (*NPC1* i *ABCA1*). U tu svrhu koristili smo stanice štakorskih neuroblastoma (B103wt) koji imaju jako nisku razinu endogenog APP-a i stanice B103-APP koje su stabilno transfecirane ljudskim genom APP₆₉₅ (Slika 48.).



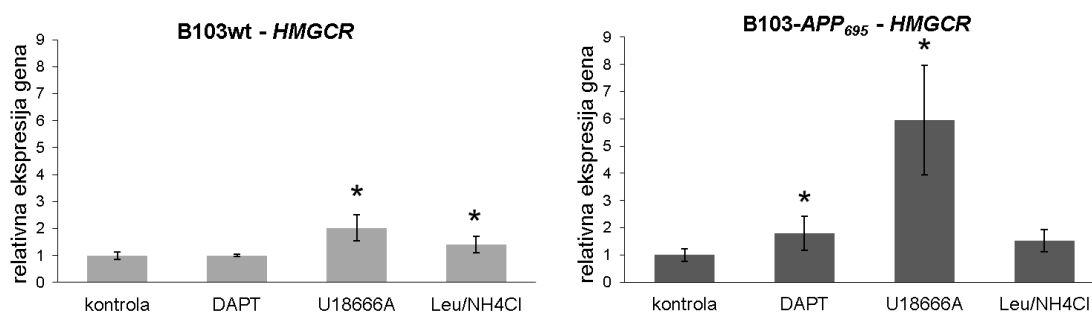
Slika 48. Štakorske neuroblastoma stanice divljeg tipa (B103wt) endogeno eksprimiraju nisku razinu APP-a. Stanice B103wt stabilno su transfecirane s plazmidnom DNA koja sadrži sekvencu cDNA ljudskog gena *APP*₆₉₅. Razina APP-a u stanicama B103wt i B103-APP potvrđena je metodom Western blot.

Stanice B103wt i B103-APP tretirane su različitim spojevima za koje je pokazano da povećavaju razinu CTF-APP-a. Osim inhibitora DAPT, koji izravno uzrokuje nakupljanje CTF-APP-a inhibirajući enzim γ -sekretazu koji direktno sudjeluje u njegovoj proteolizi korišteni su i drugi tretmani (U18666A i kombinacija Leu/NH₄Cl) pri kojima dolazi do neizravnog nakupljanja CTF-APP-a uslijed poremećaja njihove razgradnje. S obzirom da se stanice B103wt i B103-APP razlikuju samo u proteinu APP, cilj je bio istražiti koji geni su promijenjeni u stanicama B103-APP u uvjetima izravnog ili neizravnog nakupljanja CTF-APP-a, a nisu promijenjeni ili su različito promijenjeni u stanicama B103wt pod istim uvjetima. Stanice su nasadene, tretirane i pripremljene za analizu lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (RT-PCR). Stanice su analizirane kao što je opisano u poglavlju 4.9. Rezultati dobiveni RT-PCR-om su kvantificirani te statistički obrađeni. S obzirom na cilj ovih pokusa i radi preglednosti, svaki tretman uspoređen je s kontrolnim stanicama koristeći studentov *t*-test.

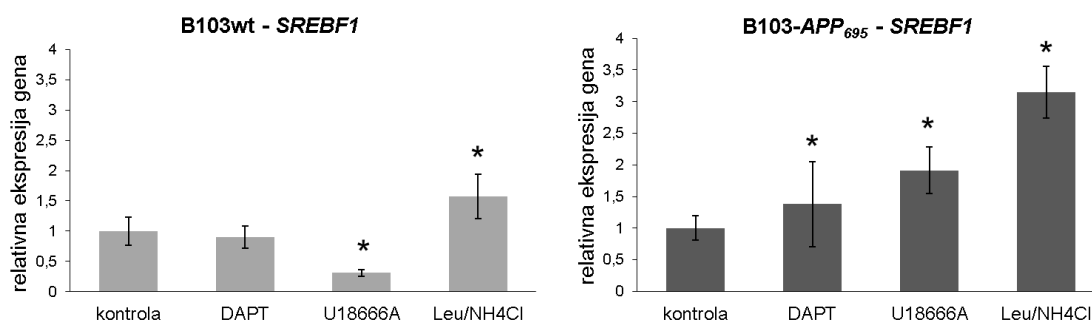
5.6.3.1. Utjecaj razine C-terminalnih odsječaka APP-a na ekspresiju gena uključenih u sintezu kolesterola

Od gena koji su uključeni u sintezu kolesterola analizirana je ekspresija gena *HMGCR*, ključni enzim u sintezi kolesterola te *SREBF1*, gen uključen u regulaciju sinteze kolesterola. Rezultati su pokazali da je ekspresija gena *HMGCR* u stanicama B103-APP u odnosu na B103wt značajno povećana u DAPT-tretiranim stanicama. Statistički značajno povećana ekspresija gena *SREBF1* u stanicama B103-APP u odnosu na B103wt uočena je u tretmanima DAPT i U18666A (Slika 49.). Dakle, ovi rezultati ukazuju da je ekspresija ova dva gena uključena u sintezu kolesterola pod utjecajem izravnog (*HMGCR* i *SREBF1*) i/ili neizravnog (*SREBF1*) nakupljanja CTF-APP-a.

A)



B)

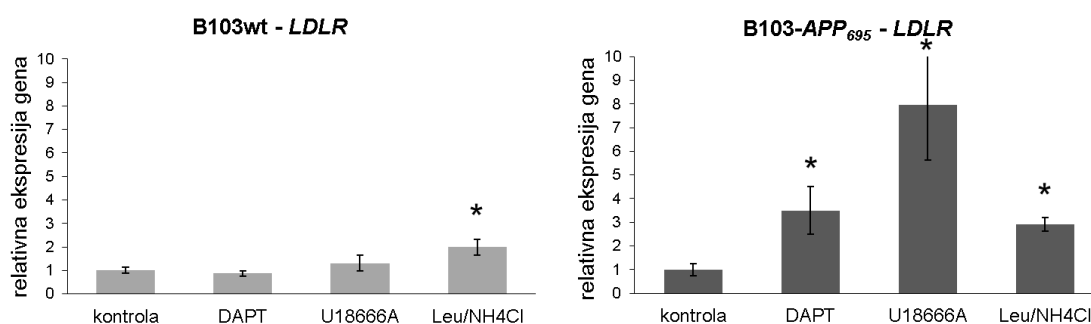


Slika 49. Nakupljanje C-terminalnih odsječaka APP-a povećava ekspresiju gena uključenih u sintezu kolesterola - *HMGCR* i *SREBF1*. Stanice su nasadene za analizu ekspresije gena kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (prema opisu u poglavlju 4.9.). Rezultati su izraženi kao relativna ekspresija gena u odnosu na kontrolne netretirane stanice te prikazani kao srednja vrijednost \pm SD. Razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.

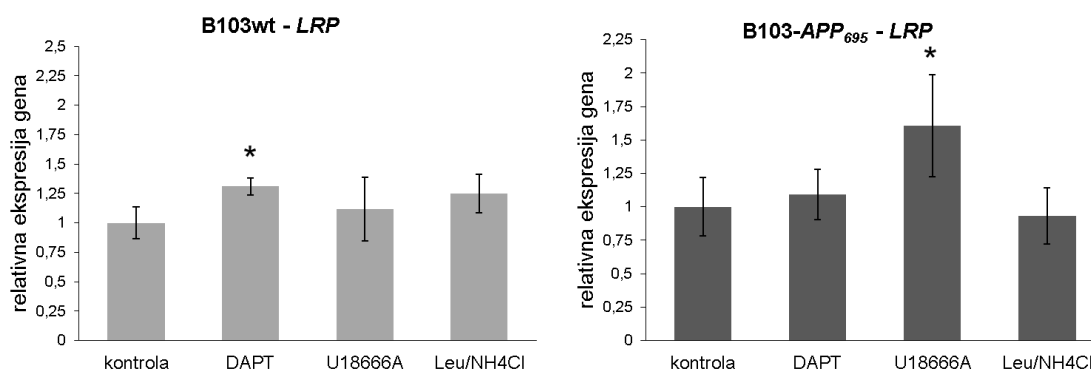
5.6.3.2. Utjecaj razine C-terminalnih odsječaka na ekspresiju gena uključenih u unos kolesterola u stanicu

Praćen je utjecaj izravnog (DAPT) i neizravnog (U18666A, i Leu/NH₄Cl) nakupljanja CTF-APP na ekspresiju gena uključenih u unos kolesterola u stanicu – *LDLR* i *LRP*. Pri tome su, kao što je gore opisano, praćene promjene u ekspresiji gena koje su nađene samo u stanicama koje ekspimiraju APP (B103-APP), a da pri istim uvjetima nisu detektirane u stanicama B103wt koje ne ekspimiraju APP (ili je razina APP vrlo niska). Statistički značajno povećanje ekspresije gena *LDLR* u stanicama B103-APP u odnosu na stanice B103wt uočeno je u tretmanima DAPT i U18666A, dok je povećana ekspresija gena *LRP* u stanicama B103-APP u odnosu na stanice B103wt detektirana samo u tretmanu U18666A (Slika 50.). Ovi rezultati ukazuju da je ekspresija ova dva gena uključena u unos kolesterola pod utjecajem izravnog (*LDLR*) i/ili neizravnog (*LDLR* i *LRP*) nakupljanja CTF-APP-a.

A)



B)



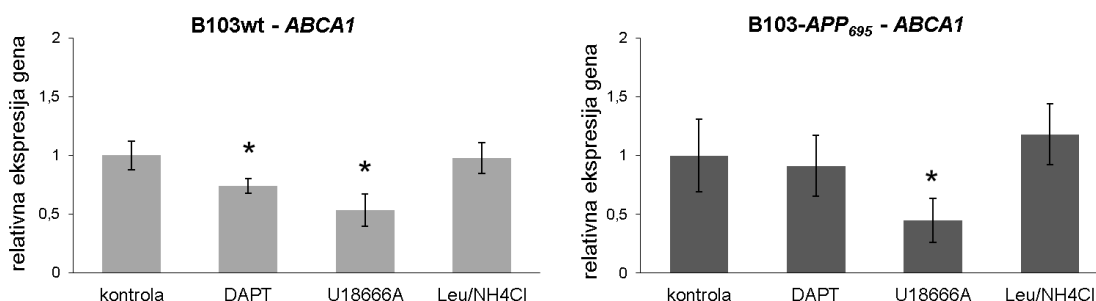
Slika 50. Nakupljanje C-terminalnih odsječaka APP-a utječe na povećanje ekspresije gena *LDLR*, uključenog u unos kolesterola u stanicu. Stanice su nasadene za analizu ekspresije gena kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (prema opisu u poglavlju

4.9.). Rezultati su izraženi kao relativna ekspresija gena u odnosu na kontrolne netretirane stanice te prikazani kao srednja vrijednost \pm SD. Razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.

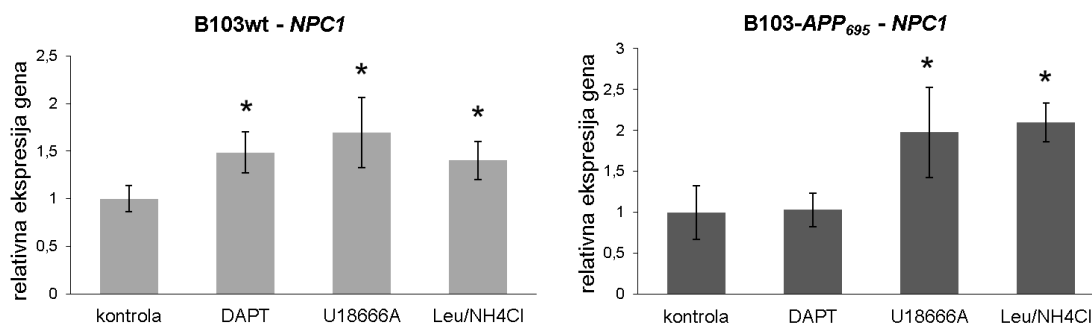
5.6.3.3. Utjecaj razine C-terminalnih odsječaka na ekspresiju gena uključenih u iznos kolesterola

Praćen je utjecaj nakupljanja CTF-APP-a na ekspresiju gena uključenih u iznos kolesterola iz stanica, *ABCA1* i *NPC1*. U stanicama B103-APP nije uočena statistički značajno promijenjena ekspresija gena *ABCA1* i gena *NPC1* u odnosu na B103wt stanice pri svim analiziranim tretmanima (Slika 51.). Za razliku prethodnih rezultata analize ekspresije gena koji sudjeluju u sintezi kolesterola i unosu kolesterola u stanicu, nakupljanje CTF-APP-a ne utječe na ekspresiju gena koji sudjeluju u iznosu kolesterola iz stanice.

A)



B)



Slika 51. Nakupljanje C-terminalnih odsječaka APP-a ne utječe na ekspresiju gena uključenih u iznos kolesterola iz stanice - *ABCA1* i *NPC1*. Stanice su nasadene za analizu ekspresije gena kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (prema opisu u poglavlju 4.9.). Rezultati su izraženi kao relativna ekspresija gena u odnosu na kontrolne netretirane stanice te prikazani kao srednja vrijednost \pm SD. Razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.

6. RASPRAVA

Zanimljivo je da rijetka nasljedna monogenska bolest Niemann-Pick tipa C (NPC) dijeli mnoga zajednička obilježja s kompleksnom Alzheimerovom bolesti (AB) koja nastaje kao posljedica genetičkih i okolišnih čimbenika što ukazuje da bi te dvije bolesti mogle dijeliti iste molekularne mehanizme nastanka.

Prije dvadesetak godina otkriven je retromerni kompleks, ključni kompleks u endosomalnom putu (144). Od tada, retromer se intenzivno istražuje jer je otkrivena njegova protektivna uloga u AB. Naime, retromer sudjeluje u prijenosu ključnih proteina AB, APP i BACE1, iz endosoma do Golgijeva aparata i stanične membrane (145,146,176). Time retromer sprječava zadržavanje APP i BACE1 u endosomima, ključnim organelima gdje enzim BACE1 ima najveću aktivnost i gdje započinje amiloidogeni put cijepanja proteina APP (166,175). Protein APP se indirektno veže na retromer, preko retromernog receptora sorLA, koji je povezan s nastankom nasljednog oblika (38), kao i kompleksnog oblika AB (51,55).

S obzirom da je disfunkcija retromernog kompleksa povezana s nastankom najčešćih neurodegenerativnih bolesti, AB i Parkinsonove bolesti (PB), u ovom doktoratu je po prvi puta ispitano je li (dis)funkcija retromernog kompleksa prisutna i u rijetkoj neurodegenerativnoj bolesti NPC. Disfunkcija retromera mogla bi predstavljati zajednički molekularni put nastanka rijetkih i kompleksnih neurodegenerativnih bolesti.

Naša prethodna istraživanja pokazala su da u stanicama jajnika kineskog hrčka kojima je deletiran gen *NPC1* (*CHO NPC1-null*), uslijed unutarstaničnog nakupljanja kolesterola u kasnim endosomima-lizosomima dolazi do povećanog amiloidogenog cijepanja APP-a enzimom β -sekretaza (BACE1). To je posljedica nakupljanja APP i BACE1 u povećanim vezikulama endosoma (246,257).

S obzirom na opisanu funkciju retromera u transportu proteina APP i BACE1, cilj ovoga rada bio je istražiti je li disfunkcija retromernog transporta uzrok povećanom nakupljanju APP-a i BACE1 unutar endosoma. Također, istražena je uloga nakupljanja kolesterola u bolesti NPC na funkciju retromernih proteina. S obzirom da su u mišjim modelima AB kao i u mozgu AB pacijenata detektirane smanjene razine retromernih proteina, analizirana je njihova razina, kao i smještaj u različitim regijama mozga i u različitim fazama bolesti u mišjem modelu bolesti NPC (254). Funkcionalni endosomalno-lizosomalni transportni put veoma je bitan za pravilno funkcioniranje aksonalnog transporta u neuronima stoga je analizirana i funkcija retromera u primarnim kulturama neurona miševa *NPC1* (166,175).

6.1. Disfunkcija retromera *in vitro* u staničnom modelu bolesti NPC

Ovaj doktorski rad prvi je pokazao disfunkciju retromera u bolesti NPC *in vitro* u stanicama jajnika kineskog hrčka (od engl. *Chinese hamster ovary cells*) kojima je deletiran gen za *NPCI* (*NPCI*-null) kao i u primarnim kulturama neurona izoliranim iz mozga *NPCI*^{-/-} miševa u odnosu na wt (*NPCI*^{+/+}) neurone. S obzirom da nije bilo promjene u razini retromernih proteina, nakupljanje retromernog proteina Vps35 u endosomima stanica *NPCI*-null i u neuronima *NPCI*^{-/-} posljedica je porećenog transporta retromera.

U našim prijašnjim istraživanjima, kao i u istraživanjima drugih grupa, primijećeno je povećano nakupljanje APP-a i BACE1 unutar endosoma (257) te povećano cijepanje APP-a amiloidogenim putem u bolesti NPC (230,231,246). U ovom doktoratu je pokazano da nakupljanje APP i BACE1 u endosomima pa tako i pojava Alzheimeru-sličnog fenotipa u bolesti NPC može biti posljedica disfunkcije retromernog kompleksa. Po prvi puta je pokazan promijenjen smještaj retromernih proteina Vps26 i Vps35 u stanicama *NPCI*-null kao i nakupljanje retromera i APP unutar endosoma. To znači da bi dulje zadržavanje APP-a unutar endosoma te dulji pristup enzimu BACE1 i povećano cijepanje APP-a amiloidogenim putem u bolesti NPC, moglo biti posljedica nefunkcionalnog retromera.

Vrijeme zadržavanja APP-a i BACE1 unutar ranih endosoma ključno je za procesiranje APP-a te je povezano s razinama peptida A β i patologijom bolesti AB (273). Nakupljanje i dulje zadržavanje APP-a i BACE1 unutar ranih endosoma, uslijed smanjene razine ili funkcije retromera, već je prije pokazano na neneuralnim staničnim linijama (124,273–275). Utišavanje retromernog proteina Vps35 u stanicama HEK-293 povećava omjer A β 42:A β 40 (276), a u stanicama HeLa povećava razinu peptida A β 40 za 37%, dok nadekspresija Vps35 smanjuje nakupljanje peptida A β 40 za 40% (273). Ovi rezultati potvrđuju protektivnu ulogu retromernog kompleksa u AB na način da transportom proteina APP i BACE1 iz endosoma smanjuje amiloidogeno procesiranje proteina APP i nastanak peptida A β 40.

6.2. Disfunkcija retromera u staničnom modelu bolesti NPC ovisi o razini kolesterola

Nakon što je pokazana disfunkcija retromera u stanicama *NPCI*-null, sljedeći cilj bio je otkriti mehanizam koji uzrokuje disfunkciju retromera i njegovo nakupljanje u endosomima u ovim stanicama. Smanjenje kolesterola u stanicama *NPCI*-null tretmanima s M β CD te statinima (257) smanjuje nakupljanje retromera unutar endosomalno-lizosomalnih vezikula i smanjuje nakupljanje APP-a unutar endosoma. U stanicama divljeg tipa CHOwt farmakološki tretman za izazivanje fenotipa NPC (U18666A) uzrokuje nakupljanje retromera unutar endosoma i povećanu kolokalizaciju s APP, slično kao i u *NPCI*-null stanicama. Ovim pokusima pokazano je da je povećana razina kolesterola, bez obzira na prisutnost proteina NPC1, uzrok nakupljanju povećanih vezikula endosomalno-lizosomalnog puta i nakupljanju retromera. Snižavanje kolesterola u stanicama, dovoljno je za popravljavanje funkcije retromera i pravilnog transporta APP-a.

Ovo je prvo istraživanje koje analizira ulogu kolesterola u funkciji retromera. Marquer i suradnici (226) pokazali su da utišavanje funkcije retromera izaziva nakupljanje kolesterola što potvrđuje da su metabolizam kolesterola i retromerni put međusobno povezani. S obzirom da u AB bitnu ulogu ima i povećana razina kolesterola (215,216), kao i smanjena funkcija retromera unutar poremećenog endosomalno-lizosomalnog puta (140,141,251,272), daljnja istraživanja su potrebna za otkrivanje molekularnih mehanizama koji povezuju metabolizam kolesterola i retromernu funkciju.

Poznato je da smanjenje razine kolesterola smanjuje nastanak peptida A β (216,219,222–225). Smanjenje razine kolesterola je uzvodni efekt koji ne djeluje na cijepanje γ -sekretazom, izravni korak u nastanku peptida A β , već smanjuje nastanak peptida A β djelujući na transport APP-a i smanjenje nastanka CTF-APP (223). Stoga bi utjecaj razine kolesterola na transport APP-a mogao djelovati upravo preko funkcije retromera. S obzirom na protektivnu ulogu retromera u transportu APP-a i smanjenju njegovog amiloidogenog procesiranja, detaljna istraživanja mehanizma djelovanja retromera vode ka korištenju retromera kao potencijalne ciljne molekule u terapiji bolesti NPC, AB, PB, kao i drugih neurodegenerativnih bolesti (277).

Za sada su otkrivene molekule koje stabiliziraju retromer te time povećavaju njegovu funkciju (193). Za razliku od testiranih inhibitora β - i γ -sekretaze u terapiji AB, koji imaju mnoge nepoželjne nuspojave zbog uloge ovih enzima u proteolizi i drugih supstrata osim APP-a, povećanje funkcije retromera smatra se relativno sigurnim pristupom razvoja terapije protiv neurodegenerativnih bolesti, jer samo održava normalni protok molekula u

endosomalno-lizosomalnom putu (193). S obzirom da ovo istraživanje pokazuje da je povećano nakupljanje kolesterola uzrok disfunkcije retromera, molekule za snižavanje razine kolesterola mogle bi se potencijalno koristiti za poboljšanje funkcije retromera.

6.3. Disfunkcija retromera *in vivo* u mišjem modelu bolesti NPC

Funkcija retromera i retromernog receptora sorLA u mozgu mišjeg modela bolesti NPC (miševi NPC1) analizirana je u malom mozgu, hipokampusu i kori velikog mozga miševa starih 4, 7 i 10 tjedana. U bolesti NPC najranije je pogođen mali mozak (odumiru Purkinje neuroni), slijedi kora velikog mozga, a hipokampus se smatra relativno očuvanim (278). Analizirani su miševi starosti 4 tjedna jer predstavljaju ranu fazu bolesti prije pojave patoloških karakteristika, te starosti 7 i 10 tjedana u središnjoj i završnoj fazi bolesti (254).

Imunohistokemijskom analizom moždanih rezova pokazano je da je protein sorLA smješten perinuklearno u somama neurona - u malom mozgu u somama Purkinje neurona te somama neurona unutar molekularnog sloja, u hipokampusu u somama granularnih neurona dentatnog girusa te piramidalnim stanicama regija CA miševa divljeg tipa. Morfologija smještaja proteina sorLA u somama neurona poklapa se s rezultatima prijašnjih istraživanja (54,55,183). Međutim, u neuronima svih analiziranih moždanih regija miševa NPC1 imunobojenje receptora sorLA smanjeno je već u miševima starih 4 tjedna što se ne poklapa s nepromijenjenom razinom proteina sorLA u ovim moždanim regijama miševa NPC1 u odnosu na wt miševe analiziranom metodom WB.

Podaci o razini proteina sorLA u mozgovima mišjih transgeničnih modela AB, kao i u ljudi oboljelima od AB, kontradiktorni su. U mozgovima mišjeg modela APP/PS1 različite starosti (3, 9 and 18 mjeseci) razina sorLA nepromijenjena je u usporedbi s kontrolama (279), dok je u modelu Tg2576 razina sorLA značajno smanjena u korteksu (280). Istraživanja na ljudskom moždanom tkivu pokazuju smanjenje razine sorLA u sporadičnom obliku AB, kao i u pacijenata s blagim kognitivnim poremećajem (od engl. *mild-cognitive impairment*, MCI), ali ne i u obiteljskom obliku AB (54,185,281). Međutim, u novijem istraživanju pokazana je nepromijenjena razina sorLA između pacijenata oboljelih od AB i zdravih kontrola (281).

Rezultati nepromijenjene razine sorLA u mozgovima mišjeg modela bolesti NPC u odnosu na kontrolne uzorke različite starosti poklapa se s dijelom drugih istraživanja dobivenih na transgeničnim mišjim modelima bolesti AB. Mnoga istraživanja ukazuju na problem korištenja metode WB u praćenju razine proteina sorLA u samom tkivu, zbog ekspresije proteina sorLA u neuronima, ali i u astrocitima (282). S obzirom da je u bolesti NPC astrogliozna jedna od prvih patoloških promjena, moguće je da uslijed povećane reaktivnosti astrocita dolazi do maskiranja mogućih promjena u razini proteina sorLA u neuronima, ali koje su detektirane imunobojenjem.

Smještaj retromernog proteina Vps35 razlikuje se u različitim tipovima neurona, ali je u skladu s dostupnim podacima iz literature (283). Iako je u malom mozgu protein Vps35 smješten raspršeno unutar soma Purkinje neurona, ali i u dendritičkom stablu Purkinje neurona miševa divljeg tipa, u hipokampusu miševa nalazi se samo u mahovinastim vlaknima. U miševima NPC1 protein Vps35 postupno se nakuplja unutar some neurona u svim moždanim regijama, prvenstveno unutar Purkinje neurona, kortikalnih neurona, ali i hipokampalnih neurona regije CA3 već u miševima starosti 4 tjedna. Nakupljanje Vps35 u somama neurona se povećava sa starosti miševa, tj. prati patogenezu bolesti NPC te je najznačajnije u 10 tjedana starih miševa NPC1. Nakupljanje proteina Vps35 u miševima NPC1 slično je imunobojeanjima u transgeničnim miševima *hAPP* (283).

Za razliku od imunobojenja, razina proteina Vps35 analizirana metodom WB u mozgovima miševa NPC1 starima 4 ili 10 tjedana je nepromijenjena, s time da je u hipokampusu detektirana najveća razina proteina Vps35 u odnosu na korteks i mali mozak što je u skladu s podacima iz prijašnjih istraživanja (165). Suprotno od nepromijenjene razine proteina Vps35 i sorLA u mozgovima miševa NPC1, razina proteina Vps26 statistički je značajno povećana u odnosu na miševu divljeg tipa. Razina proteina Vps26 podjednaka je u različitim regijama mozga, što je u skladu s drugim istraživanjima (165).

Razina proteina Vps26 i Vps35 smanjena je u hipokampusu pacijenata oboljelih od AB (165) kao i korteksu, ali ne i u malom mozgu transgeničnog mišjeg modela AB Tg2576 (280). Dapače, mutacija jednog alela Vps35 u miševima Tg2576 ubrzava patologiju AB (284). Osim promjene razine retromernih proteina u transgeničnim modelima AB, u miševima je retromerna disfunkcija (zbog samo jednog funkcionalnog alela Vps26) *per se* dovoljna za kognitivne poremećaje, sinaptičku disfunkciju, neurodegeneraciju, kao i povećanu razinu peptida A β (166).

Iako su razine retromernih proteina u različitim regijama u skladu s razinama u drugim mišjim modelima, rezultati dobiveni na miševima NPC1 razlikuju se od rezultata dobivenih na pacijentima oboljelima od AB, kao i mišjim modelima, što može biti zbog ekspresije retromernih proteina u astrocitima i mikroglijama (285), ali i kraćeg trajanja bolesti.

Smanjenje imunobojenja proteina sorLA u neuronima događa se već u miševima NPC1 starima 4 tjedna (254). U skladu s ovim rezultatima, nekoliko je dokaza koji potvrđuju da je smanjenje imunobojenja proteina sorLA jedno od prvih patoloških događaja i u AB. Smanjenje razine proteina sorLA potvrđeno je samo u kompleksnom obliku AB, ali ne i u nasljednom obliku AB (54) što znači da smanjenje razine sorLA nije posljedica FAD uzrokovane mutacijama u genima *APP* ili *PSI/2*. Smanjenje razine proteina sorLA događa se

već i u MCI, dakle na samom začetku pojave kognitivnih poremećaja karakterističnih za AB (281). Također, genetičkim studijama otkrivene su mutacije u genu *SORLA* (49,51) koje su rizični faktori za razvoj AB, kao i mutacije u genu koje uzrokuju obiteljski oblik AB što znači da je mutacija samo u genu *SORLA* dovoljna za razvoj AB (38).

U mozgovima miševa NPC1 smanjenje imunobojenja receptora sorLA unutar some neurona praćeno je nakupljanjem proteina Vps35 unutar tih neurona što je najizraženije u kortikalnim neuronima, neuroni s najmanjom razinom proteina sorLA najviše su nakupljali Vps35, kao i obrnuto. Nakupljanje retromera može se smatrati kompenzacijskim mehanizmom, tj. odgovorom stanica neurona na smanjenje razine sorLA. Mehanistički se to može objasniti da je uslijed smanjenja razine proteina sorLA smanjen retrogradni prijenos proteina APP iz endosoma, što je u skladu s prijašnjim rezultatima na NPC modelima (230,257,286) i što dovodi do povećane unutarstanične razine peptida A β u modelima AB (273) i u modelima bolesti NPC (230,246).

Kompenzacijski mehanizam na smanjeni prijenos APP-a je povećani prijenos enzima BACE1 iz ranih endosoma. U transport enzima BACE1 također je uključen retromer (176,274), ali vezanjem putem drugog retromernog receptora, sortilina (178). Već je prije pokazano da uslijed smanjene funkcije sorLA u pacijentima oboljelima od kompleksnog oblika, dolazi do nakupljanja receptora sortilina u mozgovima tih pacijenata (54). S obzirom da u ovom radu nije praćeno nakupljanje sortilina, pretpostavka je da bi nakupljanje retromernih proteina Vps26 i Vps35 u mozgovima NPC1 moglo biti paralelno s nakupljanjem sortilina.

S obzirom na različite promjene retromernih proteina, kao i retromernog receptora sorLA, potrebna su dodatna istraživanja za otkrivanje je li moguće ove promjene pripisati i drugim molekularnim putevima, a ne izravno samo prijenosu APP-a. Dostupni podaci o različitoj ekspresiji retromernih proteina i receptora sorLA u različitim dijelovima mozga zanimljivi su jer ukazuju na potencijalnu različitu osjetljivost različitih regija na promjene u funkciji retromera ili retromernog receptora sorLA.

Mali mozak ima najveću razinu proteina sorLA u odnosu na hipokampus i koru velikog mozga što je u skladu s dostupnim podacima (287). U malom mozgu oboljelih od AB nema smanjenja razine sorLA što se smatra jednim od mogućih mehanizama zašto je mali mozak relativno pošteđen patologije u AB (183,280).

Nasuprot tome, mehanizmi kojima su Purkinje neuroni najosjetljiviji u bolesti NPC nisu do kraja poznati. Jedno od mogućih objašnjenja uključuje intrizična svojstva tih neurona i neurodegeneraciju posredovanu mehanizmima uključenima u autofagiju uslijed nedostatka proteina NPC1 (255). Zanimljivo, nova istraživanja ukazuju da bi receptor sorLA, uz

navedene uloge, mogao imati i ulogu u autofagiji (288). S obzirom na sve navedeno, moguće je da je receptor sorLA, osim već poznatih uloga u transportu APP-a, uključen i u mehanizme koji kontroliraju degeneraciju Purkinje neurona miševa NPC1.

Iako se u bolesti NPC hipokampus smatra relativno očuvanom regijom (278), rezultati na moždanim rezovima, ali i primarnim neuronima, pokazuju da se patološke promjene koje uključuju disfunkcionalni retromerni kompleks događaju i u hipokampusu miševa NPC1. Međutim, progresija bolesti NPC u hipokampusu je sporija nego u ostalim regijama mozga, poput malog mozga i kore velikog mozga.

Također, s obzirom da je u hipokampusu miševa wt protein Vps35 bilo moguće detektirati samo u mahovinastim vlaknima, a u miševima NPC1 nakupljanje Vps35 u piramidalnim neuronima regije CA3, moguće je da je u mozgovima NPC1 prisutan i sinaptički defekt uzrokovan nefunkcionalnim retromernim kompleksom. Retromer je smješten i presinaptički u aksonima, ali i postsinaptički u dendritima. Za razliku od postsinaptičke uloge retromera u lokalnom transportu molekula, aksonalni transport važan je u retrogradnom prijenosu receptora i enzima te njihovom recikliranju (283). Disfunkcija retromera u mozgovima miševa NPC1 mogla bi biti povezana sa sinaptičkom disfunkcijom pronađenom već u AB, ali i u PB (174,289).

Nadalje, kao što je pokazano *in vitro* na stanicama NPC1, i *in vivo* utjecaj smanjenja kolesterola u miševima NPC1 potvrđuje da je povećana razina kolesterola primarni uzrok promjena razine imunobojenja proteina sorLA i retromera te da je smanjenjem kolesterola moguće poboljšati funkciju retromera čak i u kasnoj fazi bolesti (10 tjedana).

Potrebna su daljnja istraživanja za otkrivanje različitog napredovanja patologije u različitim regijama mozga NPC1. Poremećaj u razini i funkciji proteina sorLA kao jednog od najranijih patoloških događaja, ali i samog retromernog kompleksa, potencijalno je novo patološko obilježje zajedničko bolestima NPC i AB.

6.4. Disfunkcija retromera u aksonalnom transportu u neuronima NPC1

Iako su rezultati *in vitro* na staničnom modelu CHO *NPC1*-null i *in vivo* na mozgovima mišjeg modela NPC pokazali retromernu disfunkciju, nekoliko je nedostataka tih modela. Stanice CHO *NPC1*-null su neneuralnog podrijetla, a na mišjem tkivu pokazan je smještaj retromera i u aksonima i dendritima neurona. Nasuprot tome, razina proteina retromera u mišjem mozgu analizirana je u cijelom mozgu, što uz neurone uključuje i ostale stanice, poput stanica glija. Također, unutarstanične strukture, poput vezikula endosomalno-lizosomalnog puta nije moguće analizirati u tkivima. Stoga je unutarstanični retromerni transport analiziran u primarnim kulturama neurona izoliranim iz hipokampusa, korteksa i malog mozga (Purkinje neuroni) miševa NPC1 u odnosu na iste neurone iz wt miševa.

Receptor sorLA smješten je perinuklearno u somama hipokampalnih neurona što se podudara s rezultatima dobivenima na moždanim rezovima, kao i s poznatim podacima o smještaju proteina sorLA unutar some neurona, a ne i u procesima (54). Iako je nepromijenjena razina proteina sorLA, rezultat imunocitokemijskog bojenja je nakupljanje retromernog receptora sorLA u somi hipokampalnih neurona NPC1.

Vps35 nalazi se u somi te aksonima i dendritima hipokampalnih neurona, prvenstveno u ranim endosomima i TGN, što je u skladu s drugim istraživanjima (151,175), a smještaj se poklapa i u drugim neneuralnim stanicama (290,291). U neuronima, dodatna uloga retromera je i u aksonalnom transportu, odnosno prijenosu liganda u dendritima te iz aksona do some neurona (151,175). Poznato je da se u neuronima APP prenosi i anterogradnim i retrogradnim transportom u aksonima (123) te da je posljedica nepravilnog transporta APP-a povećano amiloidogeno procesiranje.

Smještaj retromernog kompleksa promijenjen je i u somi, ali i u aksonima i u dendritima neurona NPC1 koji karakteristično nakupljaju kolesterol. Retromer se nakuplja unutar povećanih ranih i reciklirajućih endosoma te lizosoma što ukazuje na disfunkcionalni endosomalno-lizosomalni transport u neuronima NPC1.

Prijašnja istraživanja su pokazala da utišavanje Vps35 u neuronima dovodi do nakupljanja APP-a unutar ranih endosoma u aksonima i dendritima i povećane kolokalizacije s BACE1 te povećanog nastanka peptida A β (175). U neuronima izoliranim iz miševa koji su heterozigotni za Vps35, osim APP, nakuplja se i BACE1 i povećava amiloidogeno cijepanje APP-a (284).

Nadalje, aksoni Purkinje, kortikalnih i hipokampalnih neurona NPC1 imaju zadebljanja koja nisu primijećena u neuronima wt (292). Aksonalna zadebljanja karakteristična su za usporeni i

nefunkcionalni aksonalni transport i dovode do degeneracije aksona i nefunkcionalnih sinapsi (293,294). Aksonalna zadebljanja primijećena su i u AB, ali se smatra da nastaju sekundarno, nakon gubitka neurona (295).

U ovom istraživanju potvrđeno je da se u aksonalnim zadebljanjima proksimalno nakuplja retromer unutar reciklirajućih endosoma i lizosoma. Ti rezultati ukazuju na nefunkcionalan aksonalni transport molekula. Aksonalna zadebljanja u neuronima NPC1 prisutna su u svim analiziranim neuronima. S obzirom da se mogu detektirati i u najočuvanijim neuronima, hipokampalnim neuronima (278), aksonalna zadebljanja mogla bi predstavljati rani korak u patologiji bolesti NPC. Prisutnost izraženijih i mnogorojnijih aksonalnih zadebljanja u kortikalnim neuronima NPC1 može objasniti raniji razvoj patologije u kortikalnim neuronima u usporedbi s hipokampalnim neuronima.

Iako se hipokampus smatra relativno zaštićenim i najmanje „pogođenim“ u bolesti NPC, ovim rezultatima dokazana je prisutnost patoloških promjena i u hipokampalnim neuronima NPC1. Disfunkcionalni retrogradni transport retromerom unutar endosomalno-lizosomalnog transporta, mogao bi biti jedno od prvih patoloških pojava u bolesti NPC. Receptor sorLA, kao i retromerni protein Vps35, ključni su u pravilnom funkcioniranju endosomalno-lizosomalnog puta koji je u neuronima posebno važan za pravilan rad sinapsi (174,289). Degeneracija i gubitak sinapsi smatra se jednim od najranijih patoloških obilježja PB, ali i AB te uključuje i A β i tau patologiju (296).

Retromer je smješten i presinaptički i postsinaptički, a smještaj i uloga retromera mogu ovisiti i o tipu neurona. Na temelju rezultata dobivenih na pacijentima i mišjim modelima, smatra se da u PB odumiranje dopaminergičnih neurona u regiji substantia nigra započinje u procesima u strijatumu, a ne u somi neurona (297). Mutacija D620N u proteinu Vps35, koja uzrokuje nasljedni oblik PB, utječe na metabolizam dopamina u strijatumu (298), što ističe nužnost pravilne funkcije retromera u funkciji sinapse.

S obzirom na nedostatak proteina NPC1, nakupljanje kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima započinje već od najranijih embrionalnih faza što dovodi do povećane sinteze kolesterola te do začaranog kruga koji rezultira sve većim nakupljanjem kolesterola i kao posljedice razvoja patologije bolesti NPC. Iako je nakupljanje kolesterola prisutno u svim stanicama organizma, nije poznato zašto su stanice mozga, a posebno Purkinje neuroni najosjetljivije na povećanu razinu kolesterola.

Kolesterol je nužan za rast i razgranatost dendrita i aksona te stvaranje polarnosti stanice u kulturi te je nejasno zašto su pojedini tipovi neurona osjetljiviji na razinu kolesterola od drugih tipova. Kortikalni neuroni imaju manju razinu kolesterola od hipokampalnih neurona

zbog čega rast njihovih aksona i dendrita započinje ranije. Tretmani za smanjenje kolesterola (M β C) u hipokampalnim neuronima ubrzavaju rast aksona i dendrita, ali tretman za nakupljanje kolesterola ne utječe na ta svojstva hipokampalnih neurona (299). Ovo istraživanje pokazuje da bi hipokampalni neuroni mogli imati intrizična svojstva zbog kojih su otporni na veće razine kolesterola, odnosno, mogu to tolerirati različitim mehanizmima kroz dulje vrijeme od drugih tipova neurona. To bi moglo objasniti prisutnost, ali i najsporiji napredak patologije bolesti NPC u hipokampusu.

6.5. Nakupljanje C-terminalnih odsječaka proteina prekursora amiloida β uzrokuje nakupljanje retromera unutar endosoma

U ovom doktorskom radu dokazana je disfunkcija retromera u bolesti NPC, kao posljedica nakupljanja kolesterola. Sljedeći cilj bio je pronaći potencijalni molekularni mehanizam koji povezuje nakupljanje kolesterola i retromernu disfunkciju. Stoga je ispitana uloga nakupljanja C-terminalnih odsječaka APP-a (CTF-APP) u povezivanju ova dva puta.

Naime, CTF β /C99, nastao cijepanjem APP-a enzimom BACE1, mogao bi biti spona između promijenjenog metabolizma kolesterola i patogeneze AB. S obzirom da su prijašnja istraživanja pokazala da je nakupljanje CTF β /C99 odgovorno za disfunkciju endosoma (300,301), najranije patološko obilježje AB, te za poremećaj memorije i neurotoksičnost, nakupljanje CTF β /C99 bi, uz nakupljanje A β , moglo imati važnu ulogu u patogenezi AB. CTF β /C99 bi mogao djelovati kao signalna molekula koja kontrolira membranski transport i homeostazu kolesterola u ovom procesu.

Kako bi se postiglo nakupljanje različitih C-terminalnih odsječaka proteina APP, neuralne ljudske stanice neuroblastoma koje imaju nadeksprimiran protein APP₆₉₅ (SH-SY5Y-APP) tretirane su različitim inhibitorima sekretaza uključenih u procesiranje APP-a. Stanice su tretirane inhibitorom α -sekretaze (TAPI) za nakupljanje sAPP β , CTF β /C99 i A β , inhibitorom β -sekretaze BACE1 (inhibitor C3) za nakupljanje sAPP- α i CTF α /C83. Za nakupljanje i CTF β /C99 i CTF α /C83 korišten je inhibitor γ -sekretaze (DAPT). Uz ove tretmane, paralelno je korišten i tretman U18666A za oponašanje fenotipa bolesti NPC te NH₄Cl, inhibitor lizosomalne funkcije, koji neizravno dovode do nakupljanja CTF-APP-a.

Razina cjelovitog proteina sorLA u stanicama SH-SY5Y-APP povećana je u svim tretmanima s inhibitorima ili kombinacijom inhibitora α -, β - i γ -sekretaze. S obzirom da receptor sorLA dijeli iste puteve cijepanja kao APP (191) te da je supstrat α -, β - i γ -sekretaze (192), inhibitori tih enzima povećavaju razinu cjelovitog proteina sorLA.

Nakupljanje proteina sorLA u tretmanima koji inhibiraju α - (TAPI) ili β - (C3) sekretazu je približno slično. Također, najsnažnije nakupljanje proteina sorLA prisutno je u kombinaciji tretmana TAPI i C3 kada se najviše nakuplja APP-fl. Nakupljanje proteina sorLA uslijed tretmana TAPI i C3 može biti posljedica smanjenog cijepanja proteina sorLA α - i β -sekretazom, kao i nakupljanja APP-fl zbog inhibicija tih dvaju enzima.

Inhibicija α - i/ili β -sekretaze dovodi do smanjenog cijepanja receptora sorLA te njegovog nakupljanja (192), ali i nakupljanja APP-fl. Jedno objašnjenje je da su APP i sorLA kompetitivni za α -sekretazu ADAM10 (191), a drugo objašnjenje da je porast nakupljanja

sorLA proporcionalan s nakupljanjem APP-a. Naime, sorLA djeluje protektivno jer veže APP i retrogradnim transportom iznosi ga iz ranih endosoma gdje započinje amiloidogeno cijepanje APP, prvi korak u nastanku A β (55).

Porast nakupljanja receptora sorLA u stanicama SH-SY5Y-APP nakon tretmana DAPT proporcionalan je s koncentracijom (5 μ M vs. 10 μ M), kao i u tretmanima U18666A i NH₄Cl ukazuje da izravno ili neizravno nakupljanje CTF-APP-a utječe na porast razine proteina sorLA. Naime, sorLA osim veznog mjesta na N-terminalnom kraju cjelovitog APP-a (55), ima i drugo vezno mjesto na C-terminalnom kraju APP-a, u sekvenci za CTF β /C99, odnosno A β (186). Poznato je da sorLA veže A β i prenosi ga do lizosoma gdje se A β razgrađuje (187). Ta uloga sorLA veoma je važna jer se u kompleksnom obliku AB smanjena razgradnja A β , a ne povećani nastanak, smatra ključnim mehanizmom nastanka AB (187). Ovo je prvi rad u kojem se promatrao utjecaj nakupljanja CTF-APP-a na razinu proteina sorLA, te rezultati ovog istraživanja ukazuju da u stanicama SH-SY5Y-APP sorLA ima ulogu i u prijenosu CTF-APP-a.

Retromerni proteini Vps26 i Vps35 nakupljaju se u stanicama SH-SY5Y-APP u svim tretmanima inhibitorima ili kombinacijom inhibitora α -, β - i γ -sekretaze kao posljedica nakupljanja cjelovitih proteina APP i sorLA, ali i CTF α /C83 i CTF β /C99 te A β . S obzirom da tretmani inhibitorima sekretaza imaju slične učinke na razinu proteina, ali i smještaj retromernog kompleksa kao i farmakološki model bolesti NPC (U18666A), to govori da samo nakupljanje CTF-APP-a ima sličan učinak na retromerni kompleks kao i nakupljanje kolesterola u bolesti NPC.

Nakupljanje CTF-APP-a u stanicama SH-SY5Y-APP uzrokuje poremećenu funkciju retromera i nakupljanje unutar povećanih vezikula endosomalno-lizosomalnog puta. Utjecaj CTF-APP-a na endosomalno-lizosomalni put već je poznat jer je nakupljanje CTF-APP-a u povećanim ranim endosomima (140,141,272) jedno od najranijih patoloških obilježja AB.

Farmakološki tretman za oponašanje fenotipa bolesti NPC (U18666A) uzrokuje najizraženije nakupljanje velikih vezikula endosomalno-lizosomalnog puta. Osim toga, najizraženija disfunkcija u smještaju retromera je uslijed nakupljanja CTF α /C83 i CTF β /C99 (tretman DAPT) ili samo CTF β /C99 (tretman C3). Stoga se može zaključiti da je nakupljanje CTF β /C99 ključno za disfunkciju retromernog kompleksa unutar povećanih vezikula endosomalno-lizosomalnog sustava. Također, kolokalizacija retromera s CTF β /C99, ali ne i CTF α /C83 potvrđuje ulogu CTF β /C99 u nefunkcionalnom transportu retromera.

Ovo je prvi rad koji je istraživao promjenu retromera zbog nakupljanja CTF-APP-a. Nekoliko je radova istraživalo utjecaj mutacije ili utišavanja gena Vps35 na stvaranje CTF α /C83,

CTF β /C99 i A β . Utišavanje proteina Vps35 dovodi do nakupljanja CTF-APP-a, a smanjenja A β 40 u egzosomima stanica HEK-293 (276). Utišavanje SNX6, druge sastavnice retromera, u stanicama SH-SY5Y, također uzrokuje nakupljanje CTF β /C99, ali ne utječe na nakupljanje CTF α /C83 (302). U mišjem transgeničnom modelu AB, Tg2576, razine sAPP β i CTF β /C99 povećane su u hipokampusu miševa heterozigotnih za Vps35. Za razliku od toga, razina CTF α /C83 se ne mijenja (284).

Svi navedeni rezultati pokazuju da retromer ne utječe na aktivnost i procesiranje α -sekretazom, nego da gubitak Vps35 povećava procesiranje APP-a enzimom BACE1, a rezultati o promjeni retromera uslijed nakupljanja prvenstveno CTF β /C99, dodatno potvrđuju povezanost retromera i amiloidogenog procesiranja APP-a.

6.6. Nakupljanje C-terminalnih odsječaka proteina prekursora amiloida β djeluje na ekspresiju gena i proteina uključenih u unutarstanični metabolizam kolesterola

Povezanost metabolizam lipida i proteolitičke razgradnje proteina APP odavno je poznata, a produkti cijepanja APP-a, AICD i $A\beta$ posreduju u metabolizmu lipida i time mogu doprinijeti AB. Međutim, tek nedavna istraživanja pokazala su izravno vezanje kolesterola na APP, odnosno na dio APP-a koji odgovara CTF β /C99 (114) te na regulaciju biosinteze kolesterola (113). Moguće je da je CTF β /C99 spona između poremećenog metabolizma kolesterola i retromernog kompleksa unutar endosomalno-lizosomalnog puta, te je praćen utjecaj CTF β /C99 na razinu i metabolizam kolesterola.

Koncentracija kolesterola povećana je u stanicama SH-SY5Y-APP u tretmanima TAPI+DAPT (nakupljanje C99), C3 (nakupljanje CTF α /C83 i produkata razgradnje C83) i C3+TAPI (nakupljanje APP-fl) te je bila na razini tretmana U18666A za koji je poznato da izaziva nakupljanje kolesterola. Već prije je pokazana povezanost razine kolesterola i aktivnosti β -sekretaze u stanicama SH-SY5Y. Naime, povećana razina kolesterola povećava aktivnost β -sekretaze, a farmakološka inhibicija β -sekretaze u stanicama SH-SY5Y povećava razinu membranskog kolesterola (303).

U mehanizam kojim je procesiranje APP-a uključeno u regulaciju razine kolesterola uključeni su AICD i $A\beta$, koji nastaju cijepanjem γ -sekretazom. Peptid $A\beta$ i AICD zauzvrat smanjuju biosintezu kolesterola i unos kolesterola u stanicu (115). Peptid $A\beta$ snižava *de novo* sintezu kolesterola inhibirajući aktivnost HMGCR (228). Smanjenje razine $A\beta$ smanjuje razinu kolesterola u lipidnim splavima, gdje se APP preferencijalno cijepa β -sekretazom (304). Fibroblasti bez APP ili APLP2 ili bez funkcionalne γ -sekretaze (bez PS1/PS2) imaju povećane razine unutarstaničnog kolesterola *in vitro* i *in vivo*, a taj učinak se može povratiti uz tretman s $A\beta$ 40 (228).

AICD se oslobađa unutarstanično i u amiloidogenom i u neamiloidogenom putu, međutim, moguće je da AICD nastao cijepanjem u amiloidogenom putu ima veću transkripcijsku aktivnost (305). AICD ima važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena jer potiče transkripciju enzima BACE1 i regulira transkripciju APP-a, odnosno, regulira vlastito stvaranje (306). Peptid $A\beta$ ima suprotan učinak, smanjuje ekspresiju APP-a u primarnim kulturama neurona smanjujući nastanak AICD i njegov transport u jezgru (307). Rezultati ovog istraživanja u skladu su s drugima, te uz već poznate uloge AICD i $A\beta$ u regulaciji homeostaze kolesterola, potvrđuju i utjecaj CTF-APP-a, ali i dodatnih mehanizama, na razini transkripcije ili smještaja koji povezuju procesiranje APP-a i metabolizam kolesterola.

Osim razine kolesterola, cilj je bio analizirati i utjecaj nakupljanja CTF-APP-a na proteine uključene u metabolizam kolesterola prateći proteinsku razinu ili ekspresiju gena uključenih u sintezu te unos i iznos kolesterola iz stanice. Razina proteina NPC1 povećala se u stanicama SHSY5Y-APP tretiranim s DAPT (10 μ M), TAPI+DAPT, U18666A i NH_4Cl što pokazuje da ovi tretmani izazivaju poremećaje u lizosomalnoj funkciji i prijenosu kolesterola. Nakupljanje proteina NPC1 u korteksu i regiji CA1 u hipokampusu jedno je od karakterističnih obilježja u pacijentima, kao i u mišjem transgeničnom modelu AB. S obzirom da ove promjene nisu uočene u malom mozgu miševa, smatraju se povezane s patološkim procesima u AB (308). Moguće je da ovim promjenama doprinosi nakupljanje CTF-APP-a, posebno CTF β /C99, u vezikulama endosomalno-lizosomalnog puta u ranoj fazi AB (300,301).

Za analizu utjecaja CTF-APP-a na ekspresiju gena uključenih u metabolizam kolesterola štakorske neuroblastoma stanice divljeg tipa B103wt (slaba ekspresija APP-a) te stanice B103-APP i tretirane spojevima koji uzrokuju nakupljanje odsječaka CTF-APP-a neizravnim mehanizmima, poput U18666A i $\text{Leu}/\text{NH}_4\text{Cl}$ te inhibitorom γ -sekretaze (DAPT) koji uzrokuje izravno nakupljanje CTF-APP-a. Nakupljanje CTF-APP-a potiče ekspresiju gena uključenih u sintezu, HMGCR, glavnog enzima uključenog u sintezu kolesterola te SREBF1, regulatornog proteina u sintezi kolesterola te LDLR, gena za receptor kojim kolesterol ulazi u stanicu.

Rezultati ovog rada djelomično su u skladu s poznatim podacima. Peptid A β snižava *de novo* sintezu kolesterola inhibirajući aktivnost HMGCR (228), stoga povećana ekspresija gena HMGCR uslijed inhibicije γ -sekretaze može biti zbog nedostatka peptida A β . Međutim, korištenje inhibitora DAPT (309) koji inducira nakupljanje CTF-APP-a i inhibira nastanak AICD pokazalo je da promjena u ekspresiji gena HMGCR nije pod utjecajem samo AICD nego postoje i neki drugi molekularni mehanizmi (113).

Suprotno dobivenim rezultatima, pokazano je i da nadeksprimirani APP i A β povećavaju razinu mRNA LDLR i razinu proteina LDLR, smanjuju njegovu razinu na staničnoj membrani, povećavaju endocitozu i nakupljanje u perinuklearnoj regiji u stanici (310). Nepromijenjena ekspresija gena LRP1 uslijed nakupljanja CTF-APP-a u skladu je s istraživanjima jer je time inhibiran nastanak AICD, koji smanjuje ekspresiju LRP1, direktno se vežući na promotor i time smanjuje uzimanje kolesterola (311).

Ovo istraživanje, kao i mnoga druga, potvrđuje međudjelovanje kolesterola i APP-a, odnosno njegovih odsječaka. S obzirom na suprotne rezultate u mnogim istraživanjima, koji mogu ovisiti o mnogo faktora (izbor staničnog modela, vrsta i duljina tretmana itd), potrebna su

daljnja istraživanja za pronalaženje točnog mehanizma povezanosti metabolizma kolesterola i APP-a.

Zanimljivo, inhibicija HMGCR, ključnog enzima u *de novo* sintezi kolesterola, smanjuje razine unutarstaničnog i izvanstaničnog peptida A β (222). Također, smanjenje razine kolesterola smanjuje aktivnost β -sekretaze, ali djeluje i na γ -sekretazu (312). Dakle, ako nastaje u fiziološkim koncentracijama, uloga peptida A β je negativna regulacija sinteze kolesterola smanjujući biosintezu kolesterola i unos kolesterola u stanicu (115), a smanjenje razine kolesterola dodatno smanjuje amiloidogeno procesiranje APP-a (312).

S obzirom na nove podatke o vezanju kolesterola na CTF β /C99, moguće je da uslijed povećanog membranskog kolesterola, CTF β /C99 (ili APP) i kolesterol stvaranju kompleks koji potiče smještaj APP-a u lipidne splavi na membranama i povećava amiloidogeno procesiranje što doprinosi patološkim promjenama u bolesti NPC, AB, ali i drugim neurodegenerativnim bolestima.

7. ZAKLJUČCI

7.1. Opći zaključak

Disfunkcija retromera predstavlja dodatno patološko obilježje bolesti Niemann-Pick tipa C (NPC). S obzirom da je disfunkcija retromera uključena i u patološke procese čestih neurodegenerativnih bolesti, Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, poremećaj retromera može predstavljati zajednički mehanizam neurodegeneracije u ovim bolestima. Stoga bi popravljanje funkcije retromera potencijalno moglo biti dio novog pristupa liječenju još uvijek neizlječive bolesti NPC kao i drugih neurodegenerativnih poremećaja.

7.2. Specifični zaključci

- I. Nakupljanje kolesterola uslijed nedostatka proteina NPC1 u staničnim modelima bolesti NPC (stanice CHO *NPC1*-null i neuroni *NPC1 knockout* miševa) uzrokuje disfunkciju retromera.
- II. Tretmani za modulaciju razine kolesterola u staničnim modelima bolesti NPC pokazuju da je nakupljanje retromera i APP-a u endosomima ovisno o razini unutarstaničnog kolesterola.
- III. Retromerni proteini nakupljaju se u aksonalnim zadebljanima u primarnim hipokampalnim neuronima *NPC1 knockout* miševa što upućuje na ulogu retromera u degeneraciji aksona i propadanju neurona u bolesti NPC.
- IV. Promjene u unutarstaničnom smještaju retromera i retromernog receptora sorLA u mozgu miševa u različitim stadijima bolesti NPC (4, 7 i 10 tjedana) ukazuju da bi smanjenje razine receptora sorLA moglo biti jedno od najranijih čimbenika u razvoju bolesti NPC.
- V. Nakupljanje C-terminalnih odsječaka APP-a uzrokuje disfunkciju retromera unutar endosomalno-lizosomalnog puta što upućuje na povezanost retromera i amiloidogenog cijepanja APP-a.
- VI. Nakupljanje C-terminalnih odsječaka APP-a uzrokuje povećanu ekspresiju gena uključenih u unutarstanični metabolizam kolesterola što potvrđuje dvosmjernu povezanost procesiranja APP-a i metabolizma kolesterola.

8. SAŽETAK

Naslov: Utjecaj unutarstaničnoga kolesterola i C-terminalnoga odsječka proteina prekursora amiloida β na funkciju retromera u modelima Alzheimerove bolesti

Student: Kristina Dominko, mag. biol. mol.

Godina: 2020.

Bolest Niemann-Pick tipa C (NPC), rijetka nasljedna bolest u kojoj se nakuplja kolesterol u kasnim endosomima i lizosomima, dijeli mnoga patološka obilježja s Alzheimerovom bolesti. Hipoteza ovog rada je da unutarstanično nakupljanje kolesterola ili C-terminalnog odsječka proteina prekursora amiloida β (CTF β /C99) u bolesti NPC dovodi do poremećaja funkcije retromera, ključnog proteinskog kompleksa endosomalno-lizosomalnog puta uključenog u prijenos proteina APP i BACE1. Ispitana je funkcija retromera *in vitro* i *ex vivo* u različitim regijama mozga mišjeg modela bolesti NPC. Istražen je i utjecaj nakupljanja ili smanjenja unutarstaničnog kolesterola i CTF β /C99 na funkciju retromera. U ovom doktorskom radu pokazano je nakupljanje proteina retromera u povećanim endosomima stanica kojima nedostaje protein NPC1 (stanice CHO *NPC1*-null i neuroni *NPC1 knockout* miševa) te da je funkcija retromera ovisna o razini kolesterola. U mozgu *NPC1 knockout* miševa razina i smještaj retromera i retromernog receptora sorLA promijenjeni su već u najranijim stadijima bolesti. Disfunkcija retromera uključena je u promijenjeni aksonalni transport u neuronima *NPC1 knockout* miševa. Nakupljanje CTF-APP-a uzrokuje nakupljanje retromera unutar endosomalno-lizosomalnog puta te mijenja ekspresiju gena uključenih u metabolizam kolesterola. Rezultati ove doktorske disertacije potvrđuju da je disfunkcija retromera uključena u neurodegenerativne procese u bolesti NPC. Stoga bi popravljnje funkcije retromera potencijalno moglo biti dio novog pristupa liječenja ovog neizlječivog neurodegenerativnog poremećaja.

9. SUMMARY

Title: The effect of intracellular cholesterol and C-terminal fragment of amyloid β precursor protein on retromer function in Alzheimer's disease models

PhD Student: Kristina Dominko, MSc in Molecular Biology

Year: 2020

Niemann-Pick type C (NPC), a rare inherited disease in which cholesterol accumulates in late endosomes and lysosomes, shares several pathological features with Alzheimer's disease. We tested the hypothesis that intracellular accumulation of cholesterol or CTF β /C99 in NPC disease causes dysfunction of retromer, the key protein complex within the endosomal-lysosomal pathway involved in the transport of APP and BACE1. The function of retromer was analysed *in vitro* and *ex vivo*. The role of cholesterol or CTF β /C99 accumulation and depletion on retromer function was also tested. This doctoral dissertation shows retromer accumulation in enlarged endosomes in cells that lack NPC1 protein (CHO *NPC1*-null cells and neurons from *NPC1 knockout* mice) and that retromer function is dependent on cholesterol levels. In the brains of *NPC1 knockout* mice, levels and distribution of retromer proteins and retromer receptor sorLA were altered even in the earliest stages of the disease. Retromer dysfunction is involved in altered axonal transport in neurons from *NPC1 knockout* mice. The accumulation of CTFs causes accumulation of retromer in the endosomal-lysosomal pathway and affects the expression of genes involved in cholesterol metabolism. These results show that retromer dysfunction is involved in neurodegenerative processes in NPC disease. Thus, retrieval of retromer function may potentially represent a novel therapeutic approach against this untreatable neurodegenerative disorder.

10. LITERATURA

1. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2006;368:387–403.
2. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2011;377:1019–31.
3. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, i sur. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005;366:2112–7.
4. Damasio AR. Aphasia. *N Engl J Med*. 1992;326:531–9.
5. Goldmann Gross R, Grossman M. Update on Apraxia. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2008;8:490–6.
6. Greene JDW. Apraxia, agnosias, and higher visual function abnormalities. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76:25–34.
7. Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*. 2012;148:1204–22.
8. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;120:885–90.
9. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaupt G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82:4245–9.
10. Brion JP, Flament-Durand J, Dustin P. Alzheimer's disease and tau proteins. *Lancet*. 1986;2:1098.
11. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Y-C, Quinlan M, Wisniewski HM, Bindert LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein τ (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:4913–7.
12. Deckert M, Reifenberger G, Riede U-N, Schlote W, Thal DR, Wiestler O. *Nervensystem. Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart: Thieme; 2004.
13. Beyreuther K, Masters CL. Amyloid precursor protein (APP) and BZA4 amyloid in the etiology of Alzheimer's disease: precursor-product relationships in the derangement of neuronal function. *Brain Pathol*. 1991;1:241–51.
14. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 1991;12:383–8.
15. Selkoe DJ. Amyloid protein and Alzheimer's disease. *Sci Am*. 1991;265:68–71, 74–6, 78.
16. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992;256:184–5.
17. Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. 2018;12:25.
18. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, i sur. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. 1998;393:702–5.
19. Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, i sur. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet*. 1999;65:664–70.
20. Ancolio K, Dumanchin C, Barelli H, Warter JM, Brice A, Campion D, i sur. Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 \rightarrow Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:4119–24.

21. Chartier-Harlin M-C, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, i sur. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature*. 1991;353:844–6.
22. Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-tur J, Prihar G, Pfeiffer E, i sur. A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A β 42(43). *Hum Mol Genet*. 1997;6:2087–9.
23. Goate A, Chartier-Harlin M-C, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, i sur. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1991;349:704–6.
24. Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, Cruts M, Van Hul W, van Harskamp F, i sur. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nat Genet*. 1992;1:218–21.
25. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, i sur. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid. *Nat Genet*. 1992;1:345–7.
26. Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, i sur. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*. 1995;376:775–8.
27. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, i sur. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995;375:754–60.
28. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, i sur. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*. 1996;17:1005–13.
29. Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, i sur. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med*. 1997;3:67–72.
30. Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada C-M, Perez-tur J, i sur. Increased amyloid- β 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*. 1996;383:710–3.
31. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, i sur. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*. 1996;2:864–70.
32. Lansbury PT. Inhibition of amyloid formation: a strategy to delay the onset of Alzheimer's disease. *Curr Opin Chem Biol*. 1997;1:260–7.
33. Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, i sur. Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature*. 1992;360:672–4.
34. Haass C, Hung AY, Selkoe DJ, Teplow DB. Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem*. 1994;269:17741–8.
35. Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Eckman C, i sur. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants.

- Science. 1994;264:1336–40.
36. Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, i sur. The „Arctic“ APP mutation (E693G) causes Alzheimer’s disease by enhanced A β protofibril formation. *Nat Neurosci*. 2001;4:887–93.
 37. Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, i sur. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*. 2006;38:24–6.
 38. Pottier C, Hannequin D, Coutant S, Wallon D, Rousseau S, Legallic S. High frequency of potentially pathogenic SORL1 mutations in autosomal dominant early-onset Alzheimer disease. 2012;875–9.
 39. Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, i sur. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry*. 2006;63:168.
 40. Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, i sur. A mutation in APP protects against Alzheimer’s disease and age-related cognitive decline. *Nature*. 2012;488:96–9.
 41. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, i sur. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer’s disease in late onset families. *Science*. 1993;261:921–3.
 42. Talbot C, Lendon C, Craddock N, Shears S, Morris JC, Goate A. Protection against Alzheimer’s disease with apoE epsilon 2. *Lancet*. 1994;343:1432–3.
 43. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, i sur. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. *JAMA*. 1997;278:1349.
 44. Hauser PS, Ryan RO. Impact of apolipoprotein E on Alzheimer’s disease. *Curr Alzheimer Res*. 2013;10:809–17.
 45. Meyer MR, Tschanz JT, Norton MC, Welsh-Bohmer KA, Steffens DC, Wyse BW, i sur. APOE genotype predicts when — not whether — one is predisposed to develop Alzheimer disease. *Nat Genet*. 1998;19:321–2.
 46. Hollingworth P, Abraham R, Hamsheer ML, Singh Pahwa J, Moskvina V, Dowzell K, i sur. Common variants in ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer’s disease. *Nat Genet*. 2011;43:429–35.
 47. Lambert J-C, Heath S, Even G, Champion D, Sleegers K, Hiltunen M, i sur. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer’s disease. *Nat Genet*. 2009;41:1094–9.
 48. Bertram L, Lange C, Mullin K, Parkinson M, Hsiao M, Hogan MF, i sur. Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer’s disease susceptibility loci in addition to APOE. *Am J Hum Genet*. 2008;83:623–32.
 49. Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogava E, Majounie E, i sur. TREM2 variants in Alzheimer’s disease. *N Engl J Med*. 2013;368:117–27.
 50. Lucin KM, O’Brien CE, Bieri G, Czirr E, Mosher KI, Abbey RJ, i sur. Microglial beclin 1 regulates retromer trafficking and phagocytosis and is impaired in Alzheimer’s disease. *Neuron*. 2013;79:873–6.
 51. Rogava E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, i sur. The neuronal sortilin-related receptor

- SORL1 is genetically associated with Alzheimer's Disease. *Nat Genet.* 2007;39:168–77.
52. Lambert J-C, Zelenika D, Hiltunen M, Chouraki V, Combarros O, Bullido MJ, i sur. Evidence of the association of BIN1 and PICALM with the AD risk in contrasting European populations. *Neurobiol Aging.* 2011;32:756.e11–5.
 53. Zhao Z, Sagare AP, Ma Q, Halliday MR, Kong P, Kisler K, i sur. Central role for PICALM in amyloid- β blood-brain barrier transcytosis and clearance. *Nat Neurosci.* 2015;18:978–87.
 54. Dodson SE, Gearing M, Lippa CF, Montine TJ, Levey AI, Lah JJ. LR11/SorLA expression is reduced in sporadic Alzheimer disease but not in familial Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65:866–72.
 55. Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, i sur. Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:13461-6.
 56. Kanatsu K, Morohashi Y, Suzuki M, Kuroda H, Watanabe T, Tomita T, i sur. Decreased CALM expression reduces A β 42 to total A β ratio through clathrin-mediated endocytosis of γ -secretase. *Nat Commun.* 2014;5:3386.
 57. Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. Alzheimer's disease in the US Population. *Arch Neurol.* 2003;60:1119.
 58. Kang J, Lemaire H-G, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik K-H, i sur. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 1987;325:733–6.
 59. Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y. Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene.* 1990;87:257–63.
 60. Bayer TA, Cappai R, Masters CL, Beyreuther K, Multhaup G. It all sticks together--the APP-related family of proteins and Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry.* 1999;4:524–8.
 61. Tanzi RE, McClatchey AI, Lamperti ED, Villa-Komaroff L, Gusella JF, Neve RL. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature.* 1988;331:528–30.
 62. Rohan de Silva H, Jen A, Wickenden C, Jen L-S, Wilkinson SL, Patel AJ. Cell-specific expression of β -amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Mol Brain Res.* 1997;47:147–56.
 63. Wang B, Wang Z, Sun L, Yang L, Li H, Cole AL, i sur. The amyloid precursor protein controls adult hippocampal neurogenesis through GABAergic interneurons. *J Neurosci.* 2014;34:13314–25.
 64. Luo L, Tully T, White K. Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for *Appl* gene. *Neuron.* 1992;9:595–605.
 65. Daigle I, Li C. *api-i*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:12045–9.
 66. Okado H, Okamoto H. A *Xenopus* homologue of the human β -amyloid precursor protein: Development regulation of its gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;189:1561–8.
 67. Lee J, Retamal C, Cuitiñ L, Caruano-Yzermans A, Shin J-E, Van Kerkhof P, i sur. Adaptor protein sorting nexin 17 regulates amyloid precursor protein trafficking and processing in the early endosomes. *J Biol Chem.* 2008;283:11501–8.

68. Sisodia SS. Beta-Amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:6075–9.
69. Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, i sur. Constitutive and regulated-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:3922–7.
70. Koike H, Tomioka S, Sorimachi H, Saido TC, Maruyama K, Okuyamar A, i sur. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an α -secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J*. 1999;343:371–5.
71. De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, i sur. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*. 1998;391:387–90.
72. Yu G, Nishimura M, Arawaka S, Levitan D, Zhang L, Tandon A, i sur. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and β APP processing. *Nature*. 2000;407:48–54.
73. Francis R, McGrath G, Zhang J, Ruddy DA, Sym M, Apfeld J, i sur. aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell*. 2002;3:85–97.
74. Kimberly WT, Lavoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ. Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1, and pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:6382–7.
75. Lichtenthaler SF, Haass C, Steiner H. Regulated intramembrane proteolysis - lessons from amyloid precursor protein processing. *J Neurochem*. 2011;117:779–96.
76. Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, i sur. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β -secretase. *Mol Cell Neurosci*. 1999;14:419–27.
77. Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, i sur. Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature*. 1999;402:537–40.
78. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, i sur. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. 1999;286:735–41.
79. Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, i sur. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity. *Nature*. 1999;402:533–7.
80. Dimitrov M, Alattia J-R, Lemmin T, Lehal R, Fligier A, Houacine J, i sur. Alzheimer's disease mutations in APP but not γ -secretase modulators affect epsilon-cleavage-dependent AICD production. *Nat Commun*. 2013;4:2246.
81. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva J V, Rowan MJ, Selkoe DJ. Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochem Soc Trans*. 2002;30:552–7.
82. <https://www.irb.hr/Zavodi/Zavod-za-molekularnu-medicinu/Laboratorij-za-istrazivanje-neurodegenerativnih-bolesti/Projekti/Molekularni-mehanizam-neurodegeneracije-u-Niemann-Pickovoj-bolesti-tip-C>
83. Willem M, Tahirovic S, Busche MA, Ovsepian S V., Chafai M, Kootar S, i sur. η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature*. 2015;526:443–7.
84. Zhang Z, Song M, Liu X, Kang SS, Duong DM, Seyfried NT, i sur. Delta-secretase cleaves amyloid

- precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nat Commun.* 2015;6:8762.
85. Bien J, Jefferson T, Causevic M, Jumpertz T, Munter L, Multhaup G, i sur. The metalloprotease Meprin generates amino terminal-truncated amyloid peptide species. *J Biol Chem.* 2012;287:33304–13.
 86. Dawson G, Seabrook G, Zheng H, Smith D, Graham S, O'Dowd G, i sur. Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the β -amyloid precursor protein. *Neuroscience.* 1999;90:1–13.
 87. Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJS, Hopkins R, Smith DW, i sur. β -amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell.* 1995;81:525–31.
 88. Müller U, Cristina N, Li Z-W, Wolfer DP, Lipp H-P, Rülcke T, i sur. Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified β -amyloid precursor protein gene. *Cell.* 1994;79:755–65.
 89. Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, i sur. The secreted-amyloid precursor protein ectodomain APP α is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci.* 2007;27:7817–26.
 90. Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretschmar H, i sur. Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J.* 2004;23:4106–15.
 91. Wang P, Yang G, Mosier DR, Chang P, Zaidi T, Gong Y-D, i sur. Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-like protein 2. *J Neurosci.* 2005;25:1219–25.
 92. von Koch CS, Zheng H, Chen H, Trumbauer M, Thinakaran G, van der Ploeg LHT, i sur. Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging.* 1997;18:661–9.
 93. Oh ES, Savonenko AV, King JF, Fangmark Tucker SM, Rudow GL, Xu G, i sur. Amyloid precursor protein increases cortical neuron size in transgenic mice. *Neurobiol Aging.* 2009;30:1238–44.
 94. Del Turco D, Paul MH, Schlaudraff J, Hick M, Endres K, Müller UC, i sur. Region-specific differences in amyloid precursor protein expression in the mouse hippocampus. *Front Mol Neurosci.* 2016;9:134.
 95. Ludewig S, Korte M. Novel insights into the physiological function of the APP (Gene) family and its proteolytic fragments in synaptic plasticity. *Front Mol Neurosci.* 2017;9:161.
 96. Montagna E, Dorostkar MM, Herms J, Deller T, Vogt J, Vlachos A. The role of APP in structural spine plasticity. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:136.
 97. Meziane H, Dodart J-C, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, i sur. Memory-enhancing effects of secreted forms of the-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:12683–8.
 98. Ho A, Südhof TC. Binding of F-spondin to amyloid- β precursor protein: A candidate amyloid- β precursor protein ligand that modulates amyloid- β precursor protein cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:2548.
 99. Young-Pearse TL, Bai J, Chang R, Zheng JB, Loturco JJ, Selkoe DJ. Development/plasticity/repair a critical function for-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J Neurosci.* 2007;27:14459–69.
 100. Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DDM, Tessier-Lavigne M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature.* 2009;457:981–9.

101. Puzzo D, Privitera L, Fa' M, Staniszewski A, Hashimoto G, Aziz F, i sur. Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann Neurol.* 2011;69:819–30.
102. Kögel D, Deller T, Behl C. Roles of amyloid precursor protein family members in neuroprotection, stress signaling and aging. *Exp Brain Res.* 2012;217:471–9.
103. Taylor CJ, Ireland DR, Ballagh I, Bourne K, Marechal NM, Turner PR, i sur. Endogenous secreted amyloid precursor protein- α regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiol Dis.* 2008;31:250–60.
104. Audrain M, Fol R, Dutar P, Potier B, Billard J-M, Flament J, i sur. Alzheimer's disease-like APP processing in wild-type mice identifies synaptic defects as initial steps of disease progression. *Mol Neurodegener.* 2016;11:5.
105. Claasen AM, Guévremont D, Mason-Parker SE, Bourne K, Tate WP, Abraham WC, i sur. Secreted amyloid precursor protein- α upregulates synaptic protein synthesis by a protein kinase G-dependent mechanism. *Neurosci Lett.* 2009;460:92–6.
106. Moreno L, Rose C, Mohanraj A, Allinquant B, Billard J-M, Dutar P. sA β PP α improves hippocampal NMDA-dependent functional alterations linked to healthy aging. *J Alzheimer's Dis.* 2015;48:927–35.
107. Anderson JJ, Holtz G, Baskin PP, Wang R, Mazzarelli L, Wagner SL, i sur. Reduced cerebrospinal fluid levels of α -secretase-cleaved amyloid precursor protein in aged rats: correlation with spatial memory deficits. *Neuroscience.* 1999;93:1409–20.
108. Xiong M, Jones OD, Peppercorn K, Ohline SM, Tate WP, Abraham WC. Secreted amyloid precursor protein-alpha can restore novel object location memory and hippocampal LTP in aged rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2017;138:291–9.
109. Bailey DJ, Ma C, Soma KK, Saldanha CJ. Inhibition of hippocampal aromatization impairs spatial memory performance in a male songbird. *Endocrinology.* 2013;154:4707–14.
110. Plummer S, Van Den Heuvel C, Thornton E, Corrigan F, Cappai R. The neuroprotective properties of the amyloid precursor protein following traumatic brain injury. *Aging Dis.* 2016;7:163–79.
111. Gralle M, Botelho MG, Wouters FS. Neuroprotective secreted amyloid precursor protein acts by disrupting amyloid precursor protein dimers. *J Biol Chem.* 2009;284:15016–25.
112. Greenberg SM, Kosik KS. Secreted β -APP stimulates MAP kinase and phosphorylation of tau in neurons. *Neurobiol Aging.* 1995;16:403–7.
113. Pierrot N, Tyteca D, Ludovic D, Dewachter I, Gailly P, Tasiaux B, i sur. Amyloid precursor protein controls cholesterol turnover needed for neuronal activity. 2013;608–25.
114. Barrett PJ, Song Y, Van Horn WD, Hustedt EJ, Schafer JM, Hadziselimovic A, i sur. The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science.* 2012;336:1168–71.
115. Beel AJ, Sakakura M, Barrett PJ, Sanders CR. Direct binding of cholesterol to the amyloid precursor protein: An important interaction in lipid-Alzheimer's disease relationships? *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801:975–82.
116. Perez RG, Soriano S, Hayes JD, Ostaszewski B, Xia W, Selkoe DJ, i sur. Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including A β 42. *J Biol Chem.* 1999;274:18851–6.

117. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, i sur. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*. 1992;359:322–5.
118. Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, i sur. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. *Nature*. 1992;359:325–7.
119. Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, i sur. APP processing and synaptic function. *Neuron*. 2003;37:925–37.
120. Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I. Amyloid- β as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci*. 2009;12:1567–76.
121. Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, i sur. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*. 1989;57:115–26.
122. Selkoe DJ. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid β -protein. *J Alzheimer's Dis*. 2001;3:75–80.
123. Koo EH, Sisodia SS, Archert DR, Martin LJ, Weidemann A, Beyreuther K, i sur. Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:1561–5.
124. Vieira SI, Rebelo S, Esselmann H, Wiltfang J, Lah J, Lane R, i sur. Retrieval of the Alzheimer's amyloid precursor protein from the endosome to the TGN is S655 phosphorylation state-dependent and retromer-mediated. *Mol Neurodegener*. 2010;5:40.
125. Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ. Targeting of cell-surface β -amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*. 1992;357:500–3.
126. Parvathy S, Hussain I, Karran EH, Turner AJ, Hooper NM. Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by α -secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochemistry*. 1999;38:9728–34.
127. De Strooper B, Umans L, Leuven F Van, Van H. Study of the synthesis and secretion of normal and artificial mutants of murine amyloid precursor protein (APP): cleavage of APP occurs in a late compartment of the default secretion pathway. *J Cell Biol*. 1993;121:295–304.
128. Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, i sur. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med*. 1995;1:1291–6.
129. Kuentzel SL, Ali SM, Altman RA, Greenberg BD, Raub TJ. The Alzheimer fl-amyloid protein precursor/protease nexin-II is cleaved by secretase in a trans-Golgi secretory compartment in human neuroglioma cells. *Biochem J*. 1993;295:367–78.
130. Sambamurti K, Refolo LM, Shioi J, Pappolla MA, Robakis NK. The Alzheimer's amyloid precursor is cleaved intracellularly in the trans-Golgi network or in a post-Golgi compartment. *Ann NY Acad Sci*. 1992;674:118–28.
131. Koo EH, Squazzo SL. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem*. 1994;269:17386–9.
132. Kinoshita A, Fukumoto H, Shah T, Whelan CM, Irizarry MC, Hyman BT. Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *J Cell Sci*. 2003;116:3339–46.
133. Chyung JH, Selkoe DJ. Inhibition of receptor-mediated endocytosis demonstrates generation of amyloid

- beta-protein at the cell surface. *J Biol Chem*. 2003;278:51035–43.
134. Chyung JH, Raper DM, Selkoe DJ. γ -Secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage. *J Biol Chem*. 2005;280:4383–92.
 135. Kaether C, Schmitt S, Willem M, Haass C. Amyloid precursor protein and Notch intracellular domains are generated after transport of their precursors to the cell surface. *Traffic*. 2006;7:408–15.
 136. Sastre M, Steiner H, Fuchs K, Capell A, Multhaup G, Condron MM, i sur. Presenilin-dependent γ -secretase processing of β -amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep*. 2001;2:835.
 137. Weidemann A, Eggert S, Reinhard FB, Vogel M, Paliga K, Baier G, i sur. A novel ϵ -cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry*. 2002;41:2825–35.
 138. Higaki J, Quon D, Zhong Z, Cordell B. Inhibition of β -amyloid formation identifies proteolytic precursors and subcellular site of catabolism. *Neuron*. 1995;14:651–9.
 139. Fukumori A, Okochi M, Tagami S, Jiang J, Itoh N, Nakayama T, i sur. Presenilin-dependent γ -secretase on plasma membrane and endosomes is functionally distinct. *Biochemistry*. 2006;45:4907–14.
 140. Cataldo AM, Barnett JL, Pieroni C, Nixon RA. Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis. *J Neurosci*. 1997;17:6142–51.
 141. Cataldo AM, Petanceska S, Terio NB, Peterhoff CM, Durham R, Mercken M, i sur. A β localization in abnormal endosomes: Association with earliest A β elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiol Aging*. 2004;25:1263–72.
 142. Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bourgeois A, Pagnotta S, Biferi MG, Barkats M, i sur. Intraneuronal aggregation of the β -CTF fragment of APP (C99) induces A β -independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathol*. 2016;132:257–76.
 143. Nixon RA, Cataldo AM, Mathews PM. The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. *Neurochem Res*. 2000;25:1161–72.
 144. Seaman MN, McCaffery JM, Emr SD. A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *J Cell Biol*. 1998;142:665–81.
 145. Seaman MNJ. Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol*. 2004;165:111–22.
 146. Arighi CN, Hartnell LM, Aguilar RC, Haft CR, Bonifacino JS. Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Cell Biol*. 2004;165:123–33.
 147. Burd C, Cullen PJ. Retromer: A master conductor of endosome sorting. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;1:6.
 148. Feinstein TN, Wehbi VL, Ardura J, Wheeler DS, Ferrandon S, Gardella TJ, i sur. Retromer terminates the generation of cAMP by internalized PTH-receptors. *Nat Chem Biol*. 2011;7:278–84.
 149. Steinberg F, Gallon M, Winfield M, Thomas EC, Bell AJ, Heesom KJ, i sur. A global analysis of SNX27-retromer assembly and cargo specificity reveals a function in glucose and metal ion transport. *Nat Cell Biol*. 2013;15:461–71.
 150. Temkin P, Lauffer B, Jäger S, Cimermancic P, Krogan NJ, von Zastrow M. SNX27 mediates retromer

- tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. *Nat Cell Biol.* 2011;13:715–21.
151. Choy RWY, Park M, Temkin P, Herring BE, Marley A, Nicoll RA, i sur. Retromer mediates a discrete route of local membrane delivery to dendrites. *Neuron.* 2014;82:55–62.
 152. Hussain NK, Diering GH, Sole J, Anggono V, Haganir RL. Sorting Nexin 27 regulates basal and activity-dependent trafficking of AMPARs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:11840–5.
 153. Zhang D, Isack NR, Glodowski DR, Liu J, Chen CC-H, Xu XZS, i sur. RAB-6.2 and the retromer regulate glutamate receptor recycling through a retrograde pathway. *J Cell Biol.* 2012;196:85.
 154. Haft CR, De La M, Sierra L, Bafford R, Lesniak MA, Barr VA, i sur. Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: Assembly into multimeric complexes. *Mol Biol Cell.* 2000;11:4105–16.
 155. Rojas R, Van Vlijmen T, Mardones GA, Prabhu Y, Rojas L, Mohammed S, i sur. Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol.* 2008;183:513–26.
 156. Wassmer T, Attar N, Bujny MV, Oakley J, Traer CJ, Cullen PJ. A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer. *J Cell Sci.* 2006;120:45–54.
 157. van Weering JRT, Cullen PJ. Membrane-associated cargo recycling by tubule-based endosomal sorting. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;31:40–7.
 158. Cullen PJ. Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:574–82.
 159. Gallon M, Cullen PJ. Retromer and sorting nexins in endosomal sorting. *Biochem Soc Trans.* 2015;43:33–47.
 160. Seaman MNJ, Harbour ME, Tattersall D, Read E, Bright N. Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. 2009;122:2371–82.
 161. Morel E, Chamoun Z, Lasiecka ZM, Chan RB, Williamson RL, Vetanovetz C, i sur. Phosphatidylinositol-3-phosphate regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system. *Nat Commun.* 2013;4:2250.
 162. Harbour ME, Breusegem SYA, Antrobus R, Freeman C, Reid E, Seaman MNJ. The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics. *J Cell Sci.* 2010;123:3703–17.
 163. Derivery E, Gautreau A. Evolutionary conservation of the WASH complex, an actin polymerization machine involved in endosomal fission. *Commun Integr Biol.* 2010;3:227–30.
 164. Gomez TS, Billadeau DD. A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev Cell.* 2009;17:699–711.
 165. Small SA, Kent K, Pierce A, Leung C, Kang MS, Okada H, i sur. Model-guided microarray implicates the retromer complex in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2005;58:909–19.
 166. Muhammad A, Flores I, Zhang H, Yu R, Staniszewski A, Planel E, i sur. Retromer deficiency observed in Alzheimer's disease causes hippocampal dysfunction, neurodegeneration, and A β accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:7327–32.
 167. Seaman MNJ. The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond. *J Cell Sci.*

- 2012;125:4693–702.
168. Small SA, Petsko GA. Retromer in Alzheimer disease, Parkinson disease and other neurological disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16:126–32.
 169. Follett J, Norwood SJ, Hamilton NA, Mohan M, Kovtun O, Tay S, i sur. The Vps35 D620N mutation linked to Parkinson's disease disrupts the cargo sorting function of retromer. *Traffic*. 2014;15:230–44.
 170. Moreno H, Wu WE, Lee T, Brickman A, Mayeux R, Brown TR, i sur. Imaging the A β -related neurotoxicity of Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2007;64:1467.
 171. Vardarajan BN, Bruesegem SY, Harbour ME, Inzelberg R, Friedland R, St George-Hyslop P, i sur. Identification of Alzheimer disease-associated variants in genes that regulate retromer function. *Neurobiol Aging*. 2012;33:2231.
 172. Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang L, Narayan B, Buross J, i sur. Common variants in MS4A4/MS4A6E, CD2uAP, CD33, and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2011;43:436–41.
 173. Reitz C. The role of intracellular trafficking and the VPS10d receptors in Alzheimer's disease. *Future Neurol*. 2012;7:423–31.
 174. Tian Y, Tang FL, Sun XD, Wen L, Mei L, Tang BS, i sur. VPS35-deficiency results in an impaired AMPA receptor trafficking and decreased dendritic spine maturation. *Mol Brain*. 2015;8:70.
 175. Bhalla A, Vetanovetz CP, Morel E, Chamoun Z, Di Paolo G, Small SA. The location and trafficking routes of the neuronal retromer and its role in amyloid precursor protein transport. *Neurobiol Dis*. 2012;47:126–34.
 176. Wang C-L, Tang F-L, Peng Y, Shen C-Y, Mei L, Xiong W-C. VPS35 regulates developing mouse hippocampal neuronal morphogenesis by promoting retrograde trafficking of BACE1. *Biol Open*. 2012;1:1248–57.
 177. Mosher KI, Wyss-Coray T. Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*. 2014;88:594–604.
 178. Canuel M, Lefrancois S, Zeng J, Morales CR. AP-1 and retromer play opposite roles in the trafficking of sortilin between the Golgi apparatus and the lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;366:724–30.
 179. Wu JW, Herman M, Liu L, Simoes S, Acker CM, Figueroa H, i sur. Small misfolded Tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons. *J Biol Chem*. 2013;288:1856–70.
 180. Michel CH, Kumar S, Pinotsi D, Tunnacliffe A, St George-Hyslop P, Mandelkow E, i sur. Extracellular monomeric tau protein is sufficient to initiate the spread of tau protein pathology. *J Biol Chem*. 2014;289:956–67.
 181. Khurana V, Elson-Schwab I, Fulga TA, Sharp KA, Loewen CA. Lysosomal dysfunction promotes cleavage and neurotoxicity of Tau in vivo. *PLoS Genet*. 2010;6:1001026.
 182. Fjorback AW, Seaman M, Gustafsen C, Mehmedbasic A, Gokool S, Wu C, i sur. Retromer binds the FANSHY sorting motif in SorLA to regulate amyloid precursor protein sorting and processing. *J Neurosci*. 2012;32:1467–80.
 183. Offe K. The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein

- traffic in endosomal compartments. *J Neurosci*. 2006;26:1596–603.
184. Schmidt V, Sporbert A, Rohe M, Reimer T, Rehm A, Andersen OM, i sur. SorLA/LR11 regulates processing of amyloid precursor protein via interaction with adaptors GGA and PACS-1. *J Biol Chem*. 2007;282:32956–64.
 185. Scherzer CR, Offe K, Gearing M, Rees HD, Fang G, Heilman CJ, i sur. Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2004;61:1200–5.
 186. Spoelgen R. Interaction of the cytosolic domains of sorLA/LR11 with the amyloid precursor protein (APP) and beta-secretase beta-site APP-cleaving enzyme. *J Neurosci*. 2006;26:418–28.
 187. Caglayan S, Takagi-Niidome S, Liao F, Carlo AS, Schmidt V, Burgert T, i sur. Lysosomal sorting of amyloid- β by the SORLA receptor is impaired by a familial Alzheimer's disease mutation. *Sci Transl Med*. 2014;6:223.
 188. Knobloch M, Konietzko U, Krebs DC, Nitsch RM. Intracellular A β and cognitive deficits precede β -amyloid deposition in transgenic arcA β mice. *Neurobiol Aging*. 2007;28:1297–306.
 189. Taira K, Bujo H, Hirayama S, Yamazaki H, Kanaki T, Takahashi K, i sur. LR11, a mosaic LDL receptor family member, mediates the uptake of ApoE-rich lipoproteins in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1501–6.
 190. Yajima R, Tokutake T, Koyama A, Kasuga K, Tezuka T, Nishizawa M, i sur. ApoE-isoform-dependent cellular uptake of amyloid- β is mediated by lipoprotein receptor LR11/SorLA. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;456:482–8.
 191. Böhm C, Seibel NM, Henkel B, Steiner H, Haass C, Hampe W. SorLA signaling by regulated intramembrane proteolysis. *J Biol Chem*. 2006;281:14547–53.
 192. Nyborg AC, Ladd TB, Zwizinski CW, Lah JJ, Golde TE. Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps 10p sorting receptors, are novel γ -secretase substrates. *Mol Neurodegener*. 2006;1:1–11.
 193. Mecozzi VJ, Berman DE, Simoes S, Vetanovetz C, Awal MR, Patel VM, i sur. Pharmacological chaperones stabilize retromer to limit APP processing. *Nat Chem Biol*. 2014;10:443–9.
 194. Chauhan NB. Membrane dynamics, cholesterol homeostasis, and Alzheimer's disease. *J Lipid Res*. 2003;44:2019–29.
 195. Björkhem I. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J Intern Med*. 2006;260:493–508.
 196. Hayashi H, Campenot RB, Vance DE, Vance JE. Glial lipoproteins stimulate axon growth of central nervous system neurons in compartmented cultures. *J Biol Chem*. 2004;279:14009–15.
 197. Orth M, Bellosta S. Cholesterol: its regulation and role in central nervous system disorders. *Cholesterol*. 2012;2012:292598.
 198. Björkhem I, Meaney S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:806–15.
 199. Ikonen E. Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. *Physiol Rev*. 2006;86:1237–61.
 200. Ye J, Debose-Boyd RA. Regulation of cholesterol and fatty acid synthesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3:a004754.
 201. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*.

- 1986;232:34–47.
202. Schmitz G, Langmann T. Structure, function and regulation of the ABC1 gene product. *Curr Opin Lipidol.* 2001;12:129–40.
 203. Jurevics H, Morell P. Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain. *J Neurochem.* 2002;64:895–901.
 204. Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron.* 1993;11:575–80.
 205. Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, Demattos RB, Patterson BW, i sur. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci Transl Med.* 2011;3:89–57.
 206. LaDu MJ, Falduto MT, Manelli AM, Reardon CA, Getz GS, Frail DE. Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J Biol Chem.* 1994;269:23403–6.
 207. Riddell DR, Zhou H, Atchison K, Warwick HK, Atkinson PJ, Jefferson J, i sur. Impact of apolipoprotein E (ApoE) polymorphism on brain ApoE levels. *J Neurosci.* 2008;28:11445–53.
 208. Rapp A, Gmeiner B, Hüttinger M. Implication of apoE isoforms in cholesterol metabolism by primary rat hippocampal neurons and astrocytes. *Biochimie.* 2006;88:473–83.
 209. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, Hartman RE, Bales KR, Paul SM, i sur. Deletion of Abca1 increases Abeta deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2005;280:43236–42.
 210. Sun Y, Yao J, Kim T-W, Tall AR. Expression of liver X receptor target genes decreases cellular amyloid peptide secretion. *J Biol Chem.* 2003;278:27688–94.
 211. Canepa E, Borghi R, Viña J, Traverso N, Gambini J, Domenicotti C, i sur. Cholesterol and amyloid- β : evidence for a cross-talk between astrocytes and neuronal cells. *J Alzheimers Dis.* 2011;25:645–53.
 212. Matsubara E, Soto C, Governale S, Frangione B, Ghiso J. Apolipoprotein J and Alzheimer's amyloid beta solubility. *Biochem J.* 1996;316:671–9.
 213. Zlokovic BV, Martel CL, Matsubara E, McComb JG, Zheng G, McCluskey RT, i sur. Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:4229–34.
 214. Hammad SM, Ranganathan S, Loukinova E, Twal WO, Argraves WS. Interaction of apolipoprotein J-amyloid-peptide complex with Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein-2/Megalin A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid-peptide. *J Biol Chem.* 1995;272:18644–9.
 215. Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, i sur. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:2070–5.
 216. Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue L-F, Beach TG, i sur. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high β - and γ -secretase activities and A β production. *Neurobiol Dis.* 2008;29:422–37.
 217. Rea TD, Breitner JC, Psaty BM, Fitzpatrick AL, Lopez OL, Newman AB, i sur. Statin use and the risk of incident dementia. *Arch Neurol.* 2005;62:1047.
 218. Sparks D, Kryscio R, Sabbagh M, Connor D, Sparks L, Liebsack C. Reduced risk of incident AD with

- elective statin use in a clinical trial cohort. *Curr Alzheimer Res.* 2008;5:416–21.
219. Refolo LM, Pappolla MA, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, i sur. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis.* 2000;7:321–31.
 220. Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:6460–4.
 221. Buxbaum JD, Geoghagen NSM, Friedhoff LT. Cholesterol depletion with physiological concentrations of a statin decreases the formation of the Alzheimer amyloid A β peptide. *J Alzheimers Dis.* 2001;3:221–9.
 222. Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, i sur. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides A β 42 and A β 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:5856–61.
 223. Guardia-Laguarta C, Coma M, Pera M, Clarimón J, Sereno L, Agulló JM, i sur. Mild cholesterol depletion reduces amyloid-beta production by impairing APP trafficking to the cell surface. *J Neurochem.* 2009;110:220–30.
 224. Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha-secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:5815–20.
 225. Eehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol.* 2003;160:113–23.
 226. Marquer C, Tian H, Yi J, Bastien J, Dall'Armi C, Yang-Klingler YJ, i sur. Arf6 controls retromer traffic and intracellular cholesterol distribution via a phosphoinositide-based mechanism. *Nat Commun.* 2016;7:11919.
 227. Weber P, Wagner M, Schneckenburger H. Microfluorometry of cell membrane dynamics. *Cytom Part A.* 2006;69:185–8.
 228. Grimm MOW, Grimm HS, Pätzold AJ, Zinser EG, Halonen R, Duering M, i sur. Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid- β and presenilin. *Nat Cell Biol.* 2005;7:1118–23.
 229. Malnar M, Hecimovic S, Mattsson N, Zetterberg H. Bidirectional links between Alzheimer's disease and Niemann-Pick type C disease. *Neurobiology of Disease.* 2014;72:37–47.
 230. Yamazaki T, Chang T-Y, Haass C, Ihara Y. Accumulation and aggregation of amyloid β -protein in late endosomes of Niemann-Pick type C cells. *J Biol Chem.* 2001;276:4454–60.
 231. Burns M, Gaynor K, Olm V, Mercken M, LaFrancois J, Wang L, i sur. Presenilin redistribution associated with aberrant cholesterol transport enhances beta-amyloid production in vivo. *J Neurosci.* 2003;23:5645–9.
 232. Patterson MC. A riddle wrapped in a mystery: understanding Niemann-Pick Disease, type C. *Neurologist.* 2003;9:301–10.
 233. Millat G, Marçais C, Rafi MA, Yamamoto T, Morris JA, Pentchev PG, i sur. Niemann-Pick C1 disease: The I1061T substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype. *Am J Hum Genet.* 1999;65:1321–9.
 234. Solomon D, Winkelman AC, Zee DS, Gray L, Büttner-Ennever J. Niemann-Pick type C disease in two

- affected sisters: ocular motor recordings and brain-stem neuropathology. *Ann NY Acad Sci.* 2005;1039:436–45.
235. Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, i sur. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science.* 1997;277:228–31.
 236. Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H, Fensom A, Vanier MT, Wattiaux R, i sur. Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science.* 2000;290:2298–301.
 237. Pentchev PG, Comly ME, Kruth HS, Vanier MT, Wenger DA, Patel S, i sur. A defect in cholesterol esterification in Niemann-Pick disease (type C) patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:8247–51.
 238. Pentchev PG, Comly ME, Kruth HS, Tokoro T, Butler J, Sokol J, i sur. Group C Niemann-Pick disease: faulty regulation of low-density lipoprotein uptake and cholesterol storage in cultured fibroblasts. *FASEB J.* 1987;1:40–5.
 239. Liscum L, Ruggiero RM, Faust JR. The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is defective in Niemann-Pick type C fibroblasts. *J Cell Biol.* 1989;108:1625–36.
 240. Kobayashi T, Beuchat M-H, Lindsay M, Frias S, Palmiter RD, Sakuraba H, i sur. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat Cell Biol.* 1999;1:113–8.
 241. Zervas M, Somers KL, Thrall MA, Walkley SU. Critical role for glycosphingolipids in Niemann-Pick disease type C. *Curr Biol.* 2001;11:1283–7.
 242. Lloyd-Evans E, Morgan AJ, He X, Smith DA, Elliot-Smith E, Sillence DJ, i sur. Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat Med.* 2008;14:1247–55.
 243. Infante RE, Radhakrishnan A, Abi-Mosleh L, Kinch LN, Wang ML, Grishin N V, i sur. Purified NPC1 protein: II. Localization of sterol binding to a 240-amino acid soluble luminal loop. *J Biol Chem.* 2008;283:1064–75.
 244. Jin L-W, Shie F-S, Maezawa I, Vincent I, Bird T. Intracellular accumulation of amyloidogenic fragments of amyloid-beta precursor protein in neurons with Niemann-Pick type C defects is associated with endosomal abnormalities. *Am J Pathol.* 2004;164:975–85.
 245. Kodam A, Maulik M, Peake K, Amritraj A, Vetrivel KS, Thinakaran G, i sur. Altered levels and distribution of amyloid precursor protein and its processing enzymes in Niemann-Pick type C1-deficient mouse brains. *Glia.* 2010;58:1267–81.
 246. Malnar M, Kosicek M, Mitterreiter S, Omerbasic D, Lichtenthaler SF, Goate A, i sur. Niemann-Pick type C cells show cholesterol dependent decrease of APP expression at the cell surface and its increased processing through the β -secretase pathway. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2010;1802:682–91.
 247. Saito Y, Suzuki K, Nanba E, Yamamoto T, Ohno K, Murayama S. Niemann-Pick type C disease: Accelerated neurofibrillary tangle formation and amyloid β deposition associated with apolipoprotein E ϵ 4 homozygosity. *Ann Neurol.* 2002;52:351–5.
 248. Fu R, Yanjanin NM, Elrick MJ, Ware C, Lieberman AP, Porter FD. Apolipoprotein E genotype and neurological disease onset in Niemann-Pick disease, type C1. *Am J Med Genet A.* 2012;158A:2775–80.
 249. Mattsson N, Olsson M, Gustavsson MK, Kosicek M, Malnar M, Månsson JE, i sur. Amyloid- β metabolism in Niemann-Pick C disease models and patients. *Metab Brain Dis.* 2012;27:573–85.
 250. Auer IA, Schmidt ML, Lee VM, Curry B, Suzuki K, Shin RW, i sur. Paired helical filament tau

- (PHFtau) in Niemann-Pick type C disease is similar to PHFtau in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 1995;90:547–51.
251. Ginsberg SD, Alldred MJ, Counts SE, Cataldo AM, Neve RL, Jiang Y, i sur. Microarray analysis of hippocampal CA1 neurons implicates early endosomal dysfunction during Alzheimer's disease progression. *Biol Psychiatry.* 2010;68:885–93.
 252. Maulik M, Vergote D, Phukan G, Chung J, Thinakaran G, Kar S. The effects of extracellular serum concentration on APP processing in *Npc1*-deficient APP-overexpressing N2a cells. *Mol Neurobiol.* 2018;55:5757–66.
 253. Nunes A, Pressey SNR, Cooper JD, Soriano S. Loss of amyloid precursor protein in a mouse model of Niemann-Pick type C disease exacerbates its phenotype and disrupts tau homeostasis. *Neurobiol Dis.* 2011;42:349–59.
 254. Platt N, Speak AO, Colaco A, Gray J, Smith DA, Williams IM, i sur. Immune dysfunction in Niemann-Pick disease type C. *J Neurochem.* 2016;136:74–80.
 255. Ko DC, Milenkovic L, Beier SM, Manuel H, Buchanan J, Scott MP. Cell-autonomous death of cerebellar Purkinje neurons with autophagy in Niemann-Pick type C disease. *PLoS Genet.* 2005;1:e7.
 256. Kosicek M, Malnar M, Goate A, Hecimovic S. Cholesterol accumulation in Niemann Pick type C (NPC) model cells causes a shift in APP localization to lipid rafts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;393:404–9.
 257. Malnar M, Kosicek M, Lisica A, Posavec M, Krolo A, Njavro J, i sur. Cholesterol-depletion corrects APP and BACE1 misstrafficking in NPC1-deficient cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2012;1822:1270–83.
 258. Beaudoin GMJ, Lee S-H, Singh D, Yuan Y, Ng Y-G, Reichardt LF, i sur. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nat Protoc.* 2012;7:1741–51.
 259. Tabata T, Sawada S, Araki K, Bono Y, Furuya S, Kano M. A reliable method for culture of dissociated mouse cerebellar cells enriched for Purkinje neurons. *J Neurosci Methods.* 2000;104:45–53.
 260. Cole SL, Grudzien A, Manhart IO, Kelly BL, Oakley H, Vassar R. Statins cause intracellular accumulation of amyloid precursor protein, β -secretase-cleaved fragments, and amyloid β -peptide via an isoprenoid-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2005;280:18755–70.
 261. Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res.* 1997;38:2264–72.
 262. Lange Y, Ye J, Rigney M, Steck T. Cholesterol movement in Niemann-Pick Type C cells and in cells treated with amphiphiles. *J Biol Chem.* 2000;275:17468–75.
 263. Zidovetzki R, Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768:1311–24.
 264. Park SA, Shaked GM, Bredesen DE, Koo EH. Mechanism of cytotoxicity mediated by the C31 fragment of the amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;388:450–5.
 265. Ferrari-Toninelli G, Bonini SA, Uberti D, Buizza L, Bettinsoli P, Poliani PL, i sur. Targeting Notch pathway induces growth inhibition and differentiation of neuroblastoma cells. *Neuro Oncol.* 2010;12:1231–43.
 266. Cermak S, Kosicek M, Mladenovic-Djordjevic A, Smiljanic K, Kanazir S, Hecimovic S. Loss of

- cathepsin B and L leads to lysosomal dysfunction, NPC-like cholesterol sequestration and accumulation of the key Alzheimer's proteins. *PLoS One*. 2016;e0167428.
267. Hecimovic S, Wang J, Dolios G, Martinez M, Wang R, Goate AM. Mutations in APP have independent effects on A β and CTF γ generation. *Neurobiol Dis*. 2004;17:205–18.
268. www.brain-map.org
269. Neufeld EB, Wastney M, Patel S, Suresh S, Cooney AM, Dwyer NK, i sur. The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *J Biol Chem*. 1999;274:9627–35.
270. Perovic M, Mladenovic Djordjevic A, Smiljanic K, Tanic N, Rakic L, Ruzdijic S, i sur. Expression of cholesterol homeostasis genes in the brain of the male rat is affected by age and dietary restriction. *Biogerontology*. 2009;10:735–45.
271. Smiljanic K, Vanmierlo T, Mladenovic Djordjevic A, Perovic M, Ivkovic S, Lütjohann D, i sur. Cholesterol metabolism changes under long-term dietary restrictions while the cholesterol homeostasis remains unaffected in the cortex and hippocampus of aging rats. *Age (Dordr)*. 2014;36:9654.
272. Cataldo AM, Peterhoff CM, Troncoso JC, Gomez-ista T, Hyman BT, Nixon RA. Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome differential effects of APOE genotype and presenilin. 2000;157:277–86.
273. Small SA. Retromer sorting: A pathogenic pathway in late-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2008;65:323–8.
274. Cuartero Y, Mellado M, Capell A, Álvarez-Dolado M, Verges M. Retromer regulates postendocytic sorting of β -secretase in polarized madin-darby canine kidney cells. *Traffic*. 2012;13:1393–410.
275. Small SA, Gandy S. Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: intracellular pathways to pathogenesis. *Neuron*. 2006;52:15–31.
276. Sullivan CP, Jay AG, Stack EC, Pakaluk M, Wadlinger E, Fine RE, i sur. Retromer disruption promotes amyloidogenic APP processing. *Neurobiol Dis*. 2011;43:338–45.
277. Berman DE, Ringe D, Petsko GA, Small SA. The use of pharmacological retromer chaperones in Alzheimer's disease and other endosomal-related disorders. *Neurotherapeutics*. 2015;12:12–8.
278. German DC, Quintero EM, Liang CL, Ng B, Punia S, Xie C, i sur. Selective neurodegeneration, without neurofibrillary tangles, in a mouse model of Niemann-Pick C disease. *J Comp Neurol*. 2001;433:415–25.
279. Dodson SE, Andersen OM, Karmali V, Fritz JJ, Cheng D, Peng J, i sur. Loss of LR11/SORLA enhances early pathology in a mouse model of amyloidosis: evidence for a proximal role in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2008;28:12877–86.
280. Chu J, Praticò D. The retromer complex system in a transgenic mouse model of AD: influence of age. *Neurobiol Aging*. 2017;52:32–8.
281. Sager KL, Wu J, Herskowitz JH, Mufson EJ, Levey AI, Lah JJ. Neuronal LR11 expression does not differentiate between clinically-defined Alzheimer's disease and control brains. *PLoS One*. 2012;7:e40527.
282. Salgado IK, Serrano M, García JO, Martínez NA, Maldonado HM, Báez-Pagán CA, i sur. SorLA in glia: shared subcellular distribution patterns with caveolin-1. *Cell Mol Neurobiol*. 2012;32:409–21.
283. Tammineni P, Jeong YY, Feng T, Aikal D, Cai Q. Impaired axonal retrograde trafficking of the retromer

- complex augments lysosomal deficits in Alzheimer's disease neurons. *Hum Mol Genet.* 2017;26:4352–66.
284. Wen L, Tang FL, Hong Y, Luo SW, Wang CL, He W, i sur. VPS35 haploinsufficiency increases Alzheimer's disease neuropathology. *J Cell Biol.* 2011;195:765–79.
285. Liu W, Tang FL, Erion J, Xiao H, Ye J, Xiong WC. Vps35 haploinsufficiency results in degenerative-like deficit in mouse retinal ganglion neurons and impairment of optic nerve injury-induced gliosis. *Mol Brain.* 2014;7:10.
286. Burns MP, Rebeck GW. Intracellular cholesterol homeostasis and amyloid precursor protein processing. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801:853–9.
287. www.proteinatlas.org
288. Dumanis SB, Burgert T, Caglayan S, Fuchtbauer A, Fuchtbauer E-M, Schmidt V, i sur. Distinct functions for anterograde and retrograde sorting of SORLA in amyloidogenic processes in the brain. *J Neurosci.* 2015;35:12703–13.
289. Munsie LN, Milnerwood AJ, Seibler P, Beccano-Kelly DA, Tatarnikov I, Khinda J, i sur. Retromer-dependent neurotransmitter receptor trafficking to synapses is altered by the Parkinson's disease VPS35 mutation p.D620N. *Hum Mol Genet.* 2015;24:1691–703.
290. Bonifacino JS, Hurley JH. Retromer. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20:427–36.
291. Seaman MNJ. Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol.* 2005;15:68–75.
292. Babij R, Lee M, Cortés E, Vonsattel J-PG, Faust PL, Louis ED. Purkinje cell axonal anatomy: quantifying morphometric changes in essential tremor versus control brains. *Brain.* 2013;136:3051–61.
293. Medana IM, Esiri MM. Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. *Brain.* 2003;126:515–30.
294. Lauria G, Morbin M, Lombardi R, Borgna M, Mazzoleni G, Sghirlanzoni A, i sur. Axonal swellings predict the degeneration of epidermal nerve fibers in painful neuropathies. *Neurology.* 2003;61:631–6.
295. Bozzali M, Falini A, Franceschi M, Cercignani M, Zuffi M, Scotti G, i sur. White matter damage in Alzheimer's disease assessed in vivo using diffusion tensor magnetic resonance imaging. 2002;742–6.
296. Masliah E, Mallory M, Ge N, Alford M, Veinbergs I, Roses AD. Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. *Exp Neurol.* 1995;136:107–22.
297. Brodin L, Shupliakov O. Retromer in synaptic function and pathology. 2018;10:1–9.
298. Cataldi S, Follett J, Fox JD, Tatarnikov I, Kadgien C, Gustavsson EK, i sur. Altered dopamine release and monoamine transporters in Vps35 p.D620N knock-in mice. *NPJ Park Dis.* 2018;4:27.
299. Ko M, Zou K, Minagawa H, Yu W, Gong J-S, Yanagisawa K, i sur. Cholesterol-mediated neurite outgrowth is differently regulated between cortical and hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 2005;280:42759–65.
300. Grbovic OM, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Dinakar R, Summers-Terio NB, i sur. Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular β -cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and A β production. *J Biol Chem.* 2003;278:31264–8.
301. Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bauer C, Brigham E, Abraham J-D, Ranaldi S, i sur. The β -secretase-derived C-terminal fragment of APP, C99, but not A β , is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. *J Neurosci.* 2012;32:16243–55.

302. Okada H, Zhang W, Peterhoff C, Hwang JC, Nixon RA, Ryu SH, i sur. Proteomic identification of sorting nexin 6 as a negative regulator of BACE1-mediated APP processing. *FASEB J.* 2010;24:2783–94.
303. Liu WW, Todd S, Coulson DTR, Brent Irvine G, Peter Passmore A, McGuinness B, i sur. A novel reciprocal and biphasic relationship between membrane cholesterol and β -secretase activity in SH-SY5Y cells and in human platelets. *J Neurochem.* 2009;108:341–9.
304. Grimm MOW, Kuchenbecker J, Gro S, Burg VK, Hundsdorfer B, Rothhaar TL, i sur. Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple pleiotropic mechanisms. *J Biol Chem.* 2011;286:14028–39.
305. Belyaev ND, Kellett KAB, Beckett C, Makova NZ, Revett TJ, Nalivaeva NN, i sur. The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a beta-secretase-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2010;285:41443–54.
306. Rotz RC Von, Kohli BM, Bosset J, Meier M, Suzuki T, Roger M. The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci.* 2004;117:4435–48.
307. Henriques AG, Vieira SI, Cruz EF. A β hinders nuclear targeting of AICD and Fe65 in primary neuronal cultures. 2009;60:248–55.
308. Kågedal K, Kim WS, Appelqvist H, Chan S, Cheng D, Agholme L, i sur. Increased expression of the lysosomal cholesterol transporter NPC1 in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2010;1801:831–8.
309. Dovey HF, John V, Anderson JP, Chen LZ, de Saint Andrieu P, Fang LY, i sur. Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J Neurochem.* 2001;76:173–81.
310. Abisambra JF, Fiorelli T, Padmanabhan J, Neame P, Wefes I, Potter H. LDLR expression and localization are altered in mouse and human cell culture models of Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2010;5:e8556.
311. Gliemann J, Hermey G, Nykjær A, Petersen CM, Jacobsen C, Andreasen PA. The mosaic receptor sorLA/LR11 binds components of the plasminogen-activating system and platelet-derived growth factor-BB similarly to LRP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein), but mediates slow internalization of bound ligand. *Biochem J.* 2004;381:203–12.
312. Grimm MOW, Grimm HS, Tomic I, Beyreuther K, Hartmann T, Bergmann C. Independent inhibition of Alzheimer disease β - and γ -secretase cleavage by lowered cholesterol levels. *J Biol Chem.* 2008;283:11302–11.

11. ŽIVOTOPIS

Kristina Dominko rođena je u Virovitici 20. lipnja 1989. gdje je završila osnovnu školu i prirodoslovno-matematički smjer gimnazije. Tijekom školovanja osvojila je mnoge nagrade na državnim natjecanjima. Diplomirala je na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2014. godine i stekla titulu magistre molekularne biologije (prosjek ocjena 4,92). Tijekom studiranja dobitnica je posebne Rektorove nagrade te državne stipendije A kategorije (za nadarene učenike) i stipendije Virovitičko-podravске županije. Od 2015. je zaposlena kao asistent u Laboratoriju za istraživanje neurodegenerativnih bolesti Zavoda za molekularnu medicinu na Institutu Ruđer Bošković. Svoju doktorsku disertaciju izradila je pod mentorstvom dr.sc. Silve Katušić Hećimović. Tijekom zaposlenja bila je istraživač na četiri projekta i usavršavala se u nekoliko inozemnih institucija – German Center for Neurodegenerative Diseases u Munchenu; Cell and System Biology of Neurodegeneration, Psychiatry Research, University of Zurich u Zurichu; Research Institute for Medicines, University of Lisbon u Lisabonu te na Institutu za biološka istraživanja “Siniša Stanković” u Beogradu. Dobitnica je dviju stipendija u organizaciji COST akcije BM1402 (MouseAGE). Publicirala je tri rada kao prvi autor u časopisima s međunarodnom recenzijom. Kao koautorica sudjelovala je i izlagala na osam međunarodnih ili hrvatskih kongresa s međunarodnom recenzijom. Članica je nekoliko međunarodnih i domaćih znanstvenih organizacija.