

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Katarina Ilić

**Povezanost sastava gangliozida i
izražaja neuroplastina s
neurodegenerativnim promjenama**

DISERTACIJA



Zagreb, 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Katarina Ilić

**Povezanost sastava gangliozida i
izražaja neuroplastina s
neurodegenerativnim promjenama**

DISERTACIJA

Zagreb, 2018.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za molekularnu neurobiologiju i neurokemiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga i Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Svjetlana Kalanj Bognar

Zahvale

Jupiter je na izlasku iz Škorpiona u vrijeme dovršavanja ove disertacije.

Prvo i najveće hvala za vodstvo, podučavanje, nevjerovatnu podršku uz neizostavnu dozu humora ide prof. dr. sc. Svjetlani Kalanj Bognar. Hvala za svaki trenutak u ovoj našoj zajedničkoj dekadi u kojoj sam od izgubljene studentice došla do zadnjeg koraka u akademskom obrazovanju, za svaki savjet i pomoć i navođenje kroz moja lutanja, te za svaku kavu i ručak.

Mojoj malo starijoj, mnogo sposobnijoj i pametnijoj „velikoj laboratorijskoj sestri“ doc. dr. sc. Kristini Mlinac Jerković hvala za transformaciju u samostalnu doktorandicu. Hvala na podučavanju, pomaganju i tesanju prave laboratorijske prakse. Hvala za sve pokuse koje smo zajednički izvele, i zato što si i u Americi mislila na mene. I za excel tablice.

Bratu i sestri po laboratorijskom oružju, dr. sc. Nikoli Habeku i Marti Balog. Bez vas bi ovaj doktorat vjerojatno došao do kraja, ali bi proces bio daleko dosadniji i usamljeniji.

Našim suradnicima iz Njemačke, prof. dr. sc. Dirku Montagu i dr. sc. Rodrigu Herreri-Molini zahvaljujem na materijalima za ovu disertaciju, nevjerovatnom gostoprimstvu i znanju koje ste mi prenijeli za vrijeme mog boravka u Magdeburgu.

Prof. dr. sc. Ronaldu L. Schnaaru, dobrom duhu svih nas koji ne odustajemo od gangliozida, hvala na protutijelima, tkivima i kemikalijama, ali najviše na savjetima i strpljenju.

Prof. dr. sc. Goranu Šimiću, hvala na materijalima, ali i što ste dozvolili korištenje Vaših podataka za ovu disertaciju.

Prof. dr. sc. Mariji Heffer i prof. dr. sc. Željki Vukelić hvala na svim savjetima, bezrezervnoj pomoći i dugogodišnjoj, iznimno sadržajnoj, prijateljskoj i stručnoj suradnji.

Sadržaj:

POPIS KRATICA	III
1. UVOD	1
1.1. USTROJ BIOLOŠKIH MEMBRANA I LIPIDNE SPLAVI	2
1.2. LIPIDNE SPLAVI U STARENJU I NEURODEGENERACIJI	5
1.3. GANGLIOZIDI	9
1.4. GANGLIOZIDI U NEURODEGENERACIJI	13
1.5. ALZHEIMEROVA BOLEST	15
1.6. NEUROPLASTIN	18
1.7. INTERAKCIJE LIPIDA (GANGLIOZIDA) I PROTEINA (NEUROPLASTINA) U NEURONSKOJ MEMBRANI PROMIENJENOJ PROCESOM NEURODEGENERACIJE	21
2. HIPOTEZA	24
3. CILJEVI RADA	26
3.1. OPĆI CILJ	27
3.2. SPECIFIČNI CILJEVI	27
4. MATERIJALI I METODE	28
4.1. MATERIJALI	29
4.1.1. UZORCI MOŽDANOG TKIVA	29
4.1.2. KEMIJE, OTOPINE, PROTUTIJELA I LABORATORIJSKI POTROŠNI MATERIJAL	38
4.2. METODE	42
5. REZULTATI	52
5.1. IMUNOHISTOKEMIJSKI IZRAŽAJ PROTEINA NEUROPLASTINA PROMIENJEN JE U HIPOKAMPALNOJ FORMACIJI OSOBA SA SPORADIČNOM ALZHEIMEROVOM BOLEŠĆU U USPOREDBI S KONTROLAMA	53
5.2. U MOZGU MIŠJEG MODELA ZA OBITELJSKU ALZHEIMEROVU BOLEST, U USPOREDBI S DIVLJIM TIPOM MIŠA, MIJENJA SE IMUNOREAKTIVNOST OBJE IZOFORME NEUROPLASTINA DOK IZRAŽAJ GANGLIOZIDA OSTAJE ISTI	62
5.3. IMUNOFLUORESCENTNIM BOJENJEM TKIVNIH REZOVA MOZGA POKAZAN JE SMANJEN IZRAŽAJ NEUROPLASTINSKIH IZOFORMI I MEMBRANSKE KALCIJSKE ATP-AZE U HIPOKAMPUSU MIŠJEG MODELA OBITELJSKE ALZHEIMEROVE BOLESTI	68
5.4. SASTAV GANGLIOZIDA U REGIJAMA MOZGA MIŠJEG MODELA ZA OBITELJSKU ALZHEIMEROVU BOLEST NE RAZLIKUJE SE OD KONTROLA	71

5.5. SASTAV I KOLIČINA GANGLIOZIDA U MOZGU MIŠEVA BEZ MOGUĆNOSTI SINTEZE NEUROPLASTINA NE RAZLIKUJE SE OD KONTROLA	73
5.6. IZRAŽAJ NEUROPLASTINSKIH IZOFORMI I MEMBRANSKE KALCIJSKE ATP-AZE MIJENJA SE U HIPOKAMPUSU I KORI VELIKOG MOZGA MIŠJEG MODELA ZA OBITELJSKU ALZHEIMEROVU BOLEST U USPOREDBI S KONTROLAMA, ALI NE I U MALOME MOZGU	74
5.7. PROTEINSKA ANALIZA SUBMEMBRANSKIH FRAKCIJA U MIŠJIH MODELA S PROMIJENJENIM SASTAVOM GANGLIOZIDA POKAZUJE OVISNOST POZICIONIRANJA NEUROPLASTINA O GANGLIOZIDNOM SASTAVU MEMBRANE	79
5.8. IMUNOCITOKEMIJSKA ANALIZA PRIMARNIH KORTIKALNIH I HIPOKAMPALNIH NEURONALNIH KULTURA POKAZUJE PREKLAPANJE IMUNOREAKTIVNOSTI NEUROPLASTINA I GM1	83
6. RASPRAVA	87
6.1. NEUROPLASTIN U NEURODEGENERACIJI – PROMJENE IZRAŽAJA I FUNKCIJE	89
6.2. PROMJENE NEUROPLASTINA U NEURODEGENERACIJI VJEROJATNO SU POVEZANE S REGULACIJOM UNUTARSTANIČNE KONCENTRACIJE KALCIJEVIH IONA	93
6.3. NEUROPLASTIN U RAZLIČITOM GANGLIOZIDNOM OKOLIŠU	94
6.4. PROMJENE IZRAŽAJA NEUROPLASTINA NISU PRAĆENE ZNAČAJNOM PROMJENOM SASTAVA GANGLIOZIDA	95
6.5. PRVI REZULTATI ANALIZE GANGLIOZIDNOG SASTAVA KORTEKSA, HIPOKAMPUSA I MALOG MOZGA U MIŠJEM MODELU ZA OBITELJSKU ALZHEIMEROVU BOLEST NE POKAZUJU VEĆE RAZLIKE U ODNOSU NA KONTROLNA TKIVA	95
6.6. DETEKTIRANJE KOMPLEKSNOG GANGLIOZIDA ODGOVORNOG ZA POZICIONIRANJE NEUROPLASTINA U MEMBRANI	97
6.7. GANGLIOZIDI I NEUROPLASTIN SUDJELUJU U ORGANIZACIJI SINAPTIČKE MEMBRANE KOJA SE MIJENJA U NEURODEGENERACIJI	97
7. ZAKLJUČCI	100
8. SAŽETAK	103
9. SUMMARY	105
10. LITERATURA	107
11. ŽIVOTOPIS	118

Popis kratica

AD	Alzheimerova bolest, od engl. <i>Alzheimer's disease</i>
ADAM	disintegrin i metaloproteaza, od engl. <i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
AICD	unutarstanična domena APP-a, od engl. <i>APP intracellular domain</i>
ApoE	apolipoprotein E
APP	proteinski preteča amiloida, od engl. <i>Amyloid precursor protein</i>
ATP	adenozin-trifosfat, od engl. <i>Adenosine triphosphate</i>
A β	amiloid β
<i>B4galnt1 null</i>	miš kojem je isključen gen za GM2/GD2 sintazu
BACE1	aspartatna proteaza beta mjesta APP-a, od engl. <i>Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1</i>
BDNF	moždani neurotrofni faktor, od engl. <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	albumin iz goveđeg seruma, od engl. <i>Bovine serum albumine</i>
CA	Amonov rog, od lat. <i>Cornu Ammonis</i>
CAM	molekula stanične adhezije, od engl. <i>Cell adhesion molecule</i>
CMV	citomegalovirus
CNS	središnji živčani sustav, od engl. <i>Central nervous system</i>
DAB	diaminobenzidin, od engl. <i>Diaminobenzidine</i>
DAG	diacilglicerol, od engl. <i>Diacylglycerol</i>
DAPI	boja za jezgre stanica, od engl. <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DG	nazubljena vijuga, girus dentatus od lat. <i>Gyrus dentatus</i>
DKO	miš kojem su isključena dva gena, od engl. <i>Double knock-out</i>
DMEM	medij za uzgoj primarnih kulture, od engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DT	divlji tip miša
FAD	obiteljski oblik Alzheimerove bolesti, od engl. <i>Familial Alzheimer's disease</i> (u ovoj disertaciji 5xFAD označava životinje s mutacijama koje su pronađene u FAD)
FGFR	receptor faktora rasta fibroblasta, od engl. <i>Fibroblast growth factor receptor</i>
Gal	galaktoza
GA β	kompleks GM1 i A β
Glc	glukoza

GlcCer	glukožilceramid
GlcT	glukožiltransferaza
GPI	glikožilfosfatidilinozitol, od engl. <i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
HBSS	pufer HBSS, od engl. <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HIV	virus humane imunodeficijencije, od engl. <i>Human immunodeficiency virus</i>
HPA	hipotalamus, hipofiza i nadbubrežna žlijezda, od engl. <i>Hypothalamus-pituitary-adrenal</i>
HPTLC	tankoslojna kromatografija visoke razlučivosti, od engl. <i>High performance thin layer chromatography</i>
HRP	peroksidaza porijeklom iz hrena, od engl. <i>Horse radish peroxidase</i>
IDE	enzim koji razgrađuje inzulin, od engl. <i>Insulin-degrading enzyme</i>
Ig	imunoglobulin, od engl. <i>Immunoglobulin</i>
IHC	imunohistokemija, od engl. <i>Immunohistochemistry</i>
IUPAC	od engl. <i>International union of pure and applied chemistry</i>
KO	miš kojem je isključen jedan gen, od engl. <i>Knock-out</i>
LacCer	laktožilceramid
LDL	lipoprotein male gustoće, od engl. <i>Low-density lipoprotein</i>
LRP1	protein 1 povezan s receptorom za lipoprotein male gustoće, od engl. <i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
LTP	dugoročna sinaptička potencijacija, od engl. <i>Long-term potentiation</i>
MAG	glikoprotein povezan s mijelinom, od engl. <i>Myelin-associated glycoprotein</i>
MAPK	protein-kinaza aktivirana mitogenom, od engl. <i>Mitogen activated protein kinase</i>
MMP	metaloproteaza matriksa, od engl. <i>Matrix metalloproteinase</i>
NANA	<i>N</i> -acetilneuraminska kiselina, od engl. <i>N-acetyl-neuraminic acid</i>
NEP	neprolizin, od engl. <i>Neprolysin</i>
NGF	neuronski faktor rasta, od engl. <i>Nerve growth factor</i>
NFT	neurofibrilarni snopić, od engl. <i>Neurofibrillary tangle</i>
Np55	neuroplastin 55
Np65	neuroplastin 65
Np ^{-/-} KO	miš koji ne sintetizira neuroplastin, od engl. <i>Neuroplastin knock-out</i>
PA	fosfatidna kiselina, od engl. <i>Phosphatidic acid</i>
PBS	fosfatni pufer, od engl. <i>Phosphate buffered saline</i>

PBST	fosfatni pufer s dodatkom detergenta Tweena, od engl. <i>Phosphate buffered saline-Tween</i>
PC	fosfatidilkolin, od engl. <i>Phosphatidylcholine</i>
PE	fosfatidiletanolamin, od engl. <i>Phosphatidylethanolamine</i>
PEN-2	pojačivač presenilina 2, od engl. <i>Presenilin enhancer 2</i>
PFA	paraformaldehid, od engl. <i>Paraformaldehyde</i>
PI	fosfatidilinozitol, od engl. <i>Phosphatidylinositol</i>
PIP	fosfatidilinozitol-fosfat, od engl. <i>Phosphatidylinositol phosphate</i>
PMCA	membranska kalcijaska ATP-aza, od engl. <i>Plasma Membrane Calcium ATP-ase</i>
PNS	periferni živčani sustav, od engl. <i>Peripheral nervous system</i>
PSA-NCAM	polisijalilirana neuralna molekula stanične adhezije, od engl. <i>Polysialylated neural cell adhesion molecule</i>
PS	fosfatidilserin, od engl. <i>Phosphatidylserine</i>
PSEN	presenilin
PVDF	polivinilidenfluorid, od engl. <i>Polyvinylidene fluoride</i>
SD	standardna devijacija, od engl. <i>Standard deviation</i>
SDS	natrijev dodecil-sulfat, od engl. <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	poliakrilamidna gel-elektroforeza koja koristi natrij dodecil-sulfat, od engl. <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SM	sfingomijelin, od engl. <i>Sphingomyelin</i>
SNP	polimorfizam jednog nukleotida, od engl. <i>Single nucleotide polymorphism</i>
SP	senilni plak, od engl. <i>Senile plaque</i>
ST	sijaliltransferaza
<i>St3gal2/3</i>	miš kojem su isključeni geni <i>St3gal2</i> i <i>St3gal3</i> za ST3Gal-II i ST3Gal-III <i>double-null</i> sijaliltransferaze
TrkA	kinaza A receptora za tropomiozin, od engl. <i>Tropomyosin receptor kinase A</i>

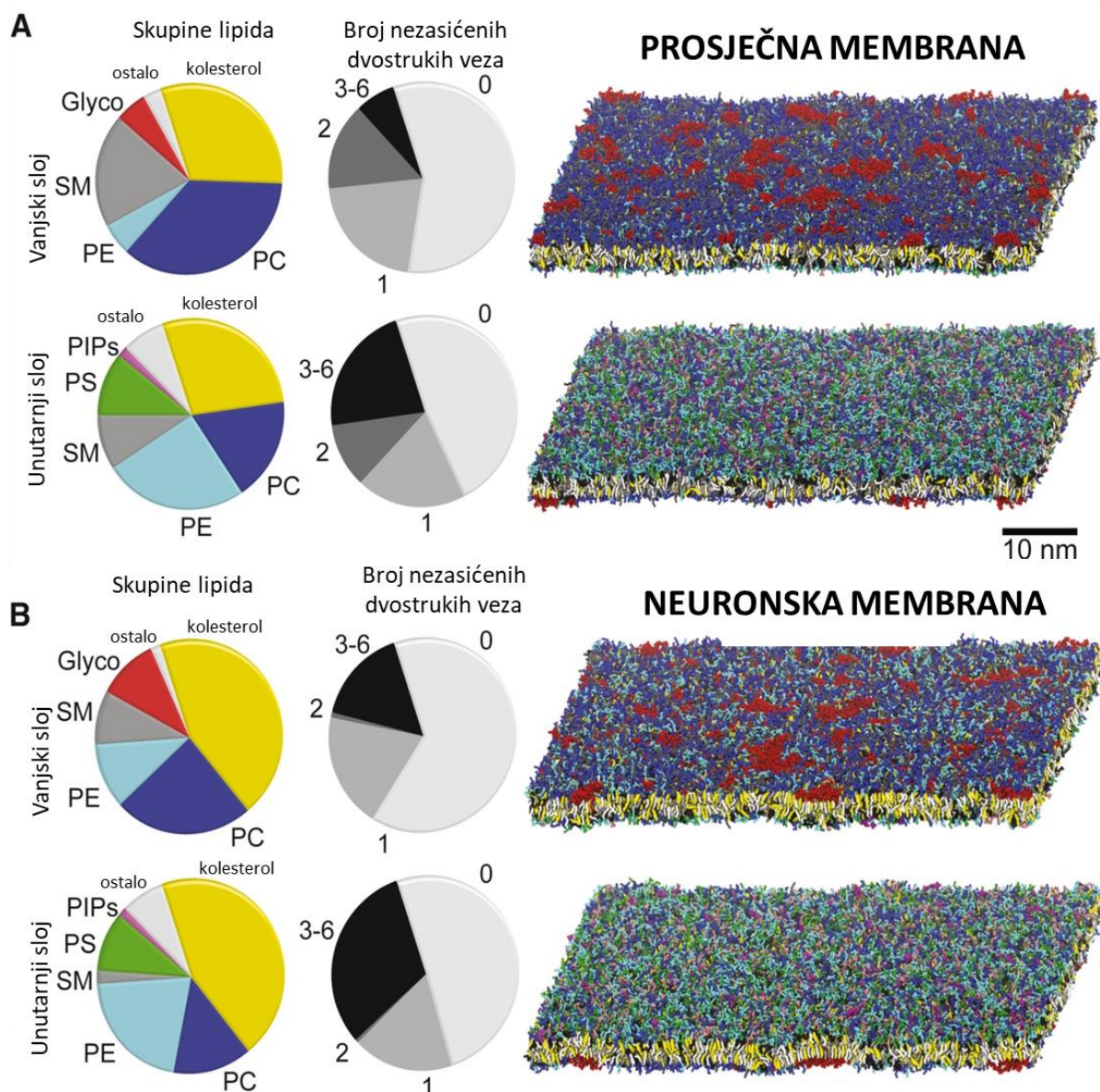
1. UVOD

1.1. Ustroj bioloških membrana i lipidne splavi

Stanična membrana je selektivno propusna barijera koja održava osmotsku ravnotežu između izvanstaničnog prostora i unutrašnjosti stanice te odvaja stanični sadržaj od izvanstanične tekućine. Stanična membrana daje strukturni temelj svakoj stanici te doprinosi funkciji i fiziologiji stanice (1). Višegodišnja istraživanja su pokazala da se membrana ne može smatrati samo fizičkom barijerom stanice od vanjskog svijeta, nego platformom na kojoj se odigravaju i o kojoj ovise različite funkcije stanice. Primjerice, komunikacija među neuronima i preživljenje samih neurona izravno ovise o sastavu neuronske membrane. Funkcije membrane se ukratko mogu opisati kao: (I) matrica za kompleksne dinamične multimolekularne interakcije u vremenu i prostoru, (II) prijenos molekula i informacija, (III) koordiniranje i/ili združivanje molekularnih interakcija i promjena na cijeloj površini membrane i (IV) olakšavanje stvaranja različitih prostornih organizacija u samoj stanici, uključujući stvaranje mikrodomena (2).

Brojna istraživanja koja se tiču membranske dinamike provedena su pomoću računalnih simulacija membrana različitog sastava i kompleksnosti (Slika 1.1.1.). Ingolfsson i suradnici napravili su opći model membrana (nazvan prosječna membrana) i membrana koje su specifično prisutne samo u moždanom tkivu (3, 4). Usporedbom lipida prosječne i neuronske membrane došlo se do zaključka da su modeli slični, ali je najveća razlika veći udio kolesterola u neuronskoj membrani, 44,5% u odnosu na 30% u drugim membranama te je u neuronskoj membrani povećan udio višenezasićenih masnih kiselina (prosječno 1,27 dvostrukih veza u svakom acilnom ostatku u sastavu neuronske membrane u usporedbi s 1,05 u prosječnoj membrani) (4).

Sveukupna difuzija lipida u mozgu je oko 40% sporija u odnosu na prosječnu membranu. Osim lateralne difuzije, sporije je i premještanje lipida iz jednog u drugi sloj dvosloja, tzv. *flip-flop* (4, 5). *Flip-flop* pomak kolesterola u neuređenoj fazi je brz, dok je u uređenoj fazi sporiji (6, 7). Kolesterol ima visoku preferenciju prema uređenijem i rigidnom okolišu što može biti fizikalno-kemijski preduvjet za formiranje splavi (6).



Slika 1.1.1. Raspodjela lipida u prosječnoj (A) i neuronskoj (B) membrani. U grafovima je prikazana distribucija različitih skupina lipida i broj dvostrukih veza u nezasićenim masnim kiselinama prema postotcima zastupljenosti u vanjskom i unutarnjem sloju dvosloja. Desni dio slike prikazuje simulacije dinamike vanjskog i unutarnjeg sloja dvosloja nakon $80 \mu\text{s}$ od početka simulacije. Lipidi su u slikama označeni bojama kako slijedi: PC (fosfatidilkolin) - *plavo*; PE (fosfatidiletanolamin) - *svijetloplavo*; SM (sfingomijelin) - *sivo*; PS (fosfatidilserin) - *zeleno*; Glyco (glikolipidi) - *crveno*; PI (fosfatidilinozitol) - *ružičasto*; PA (fosfatidna kiselina) - *bijelo*; PIPs (fosfatidilinozitol-fosfat) - *ljubičasto*; CER (ceramid) - *ledeno plavo*; Lyso (lizofosfolipidi) - *narančasto*; DAG (diacilglicerol) - *smeđe*; i kolesterol - *žuto*. Preuzeto iz (4).

Osim sastava i raspodjele lipida unutar membranskog dvosloja računalnim simulacijama je istraživano i stvaranje membranskih domena te je pokazano da neuronska membrana ima manje i prolazne domene s kolesterolom, dok su one u prosječnoj membrani veće i trajnije (4). U pročišćenim lipidnim sustavima dolazi do fizičkog odjeljivanja membrane u tekuće-

uređeno i tekuće-neuređeno stanje (8). Lipidne splavi u biološkim membranama su posljedica samoorganizacije lipida i proteina i ekvivalent su domenama koje su u računalnom modelu u tzv. tekućem-uređenom stanju.

Teorija postojanja lipidnih splavi objavljena je 1997. godine (9). Hipoteza se bazira na postojanju heterogenosti unutar membrane koje su nanometarske veličine i mogu se stabilizirati i sjediniti u veće domene splavi zbog specifičnih lipidno-lipidnih, lipidno-proteinskih i proteinsko-proteinskih interakcija (9, 10). Molekularna osnova modela splavi leži u preferencijalnoj lateralnoj asocijaciji dugih lanaca zasićenih sfingolipida i kolesterola u vanjskom sloju membrane gdje kolesterol ispunjava praznine između molekula sfingolipida (9).

Lipidne splavi su definirane kao fluktuirajuće nanodomene sfingolipida, kolesterola i proteina koje se stabiliziraju i ujedinjuju. Važne su za transport lipida od Golgijevog tjelešca do membrane i pozicioniranje proteina prilikom prijenosa signala na samoj membrani, odnosno za organiziranje bioaktivnosti stanične membrane (11). Ovo lateralno organiziranje molekula ovisi o kolesterolu pri čemu se zbog planarnosti njegovog rigidnog sterolnog prstena preferiraju interakcije s ravnijim, rigidnijim lancima zasićenih lipida umjesto s ostalim lipidnim vrstama s nezasićenim masnim kiselinama (12). Drugo objašnjenje organizacije lipida i proteina oko kolesterola uključuje takozvani efekt kišobrana u kojem se hidrofobnost kolesterola štiti jako hidriranim grupama sfingolipida (13) ili stehiometrijski, ali reverzibilno, interakcijama između kolesterola i sfingolipida ili zasićenih glicerofosfolipida (14).

Opisan je i sastav lipidnih splavi čiju jezgru čine kolesterol i sfingolipidi (glikosfingolipidi i sfingomijelin), a u njih su uključeni i razni transmembranski proteini. Stvaranje samih splavi se događa tek u Golgijevom kompleksu nakon sinteze sfingomijelina (9). Proteini koji su asocirani s lipidnim splavima su: proteini s GPI-sidrom (glikozilfosfatidilinozitol, od engl. *Glycosylphosphatidylinositol*) i transmembranski proteini (15-17). Promjene u sastavu lipida membrane utječu na važna fizikalno-kemijska svojstva što najviše utječe na lateralnu organizaciju lipida u membrani, odnosno na stvaranje mikrodomena (18).

Okoliš i sastav membrane može imati direktni utjecaj na funkciju i lokalizaciju integralnih proteina membrane (19, 20). Smatra se da lateralna organizacija membrane omogućava proteinima uključenima u staničnu signalizaciju uključivanje u različite lipidne mikrodomene.

Glavna funkcija lipidnih splavi u signalizaciji bi bila koncentracija receptora u splavi za interakciju s ligandom i efektorima kao što su receptor TrkA (kinaza A receptora za tropomiozin, od engl. *Tropomyosin receptor kinase A*) za neuronski čimbenik rasta (NGF, od engl. *Nerve growth factor*) ili receptor TrkB za moždani neurotrofni čimbenik (BDNF, od engl. *Brain-derived neurotrophic factor*). Time se ubrzava proces vezanja i povećava specifičnost vezanja liganda i receptora (11, 21-23). Zbog toga se splavi nekada opisuju kao signalosomi, odnosno platforme za okupljanje i interakciju receptora koji su aktivirani vezanjem liganda (24, 25).

U specifičnim okolnostima male splavi se mogu stabilizirati i oblikovati veće platforme. Rast ovih platformi je najvjerojatnije uvjetovan proteinsko-proteinskim i proteinsko-lipidnim interakcijama što dovodi do lateralne segregacije molekularnih komponenti u membrani (26). Dosad je opisano 250 proteina povezanih sa splavima (27). Proteini specifični za splavi kao što su flotilini ili kaveolini vjerojatno promoviraju stabilnost mikrodomena (28). Flotilini potiču združivanje aktiviranih i specifičnih GPI-usidrenih proteina u mikrodomenama stanične membrane, te interakcije signalnih molekula (29-31). Pokazano je da membranski okoliš i lipidni sastav membrane utječu na aktivnost ionskih kanala i transportera (32).

1.2. Lipidne splavi u starenju i neurodegeneraciji

Membrana neurona pokazuje različite biofizikalne promjene sa starenjem, što je uvjetovano smanjenjem koncentracije kolesterola, gangliozida i fosfoinozitida te promjenama u sastavu višenezasićenih masnih kiselina (33), ali i poremećajima u sintezi kolesterola i transportu lipoproteina (34). Sve to dovodi do promjena molekularnog sastava sinaptičke membrane (35). Promijenjeni sastav lipida u membrani je povezan s različitim bolestima, kao što su rak, HIV, dijabetes, ateroskleroza, kardiovaskularne bolesti i Alzheimerova bolest (AD, od engl. *Alzheimer's disease*) (36-38).

Sinteza kolesterola u mozgu je najveća tijekom razvoja i nakon ozljede, a dominantan izvor kolesterola u mozgu su glijalne stanice (39). Neuron internaliziraju kolesterol preko LDL receptora na koji se vežu lipoproteini koje sadrže Apo-E. Glija luči apolipoproteine E i J, s tim da je apo-E glavni podtip, a sintetiziraju ga i neki hipokampalni i kortikalni neuroni. Apo E postoji u 3 izoforme: E2, E3 te E4, a alel $\epsilon 4$ nosi 12 puta veći rizik za razvoj AD (39). Nakon

ozljede povećava se sinteza ApoE, a manjak tog proteina dovodi do većeg rizika od ishemije. Stoga je zaključeno da lipoproteini koji sadrže Apo E služe dostavi kolesterola neuronima za rast aksona, popravak i sinaptogenezu (1).

Opisan je progresivni gubitak količine moždanih membranskih lipida nakon 20. godine, a dramatičan pad nakon 80. godine (18, 40). U pojedinaca iznad 20 godina dolazi do pada koncentracije fosfolipida, kolesterola, cerebrozida i sulfatida ovisno o godinama života. Mijenjaju se i omjeri gangliozida, s padom razina GM1 i povećanjem razine GM3 (40). Pad koncentracija moždanih sfingomijelina i gangliozida vodi do progresivnog smanjenja zakrivljenosti i sposobnosti fuzije sinaptičke membrane (41).

Značajno smanjenje koncentracije membranskog kolesterola povezano sa starenjem, pokazano je posebno u ljudskom hipokampusu i sinaptosomima starih glodavaca (42-44). Ovo smanjenje koncentracije kolesterola u hipokampusu najvjerojatnije nastaje zbog manje sinteze i povećanog katabolizma kolesterola, te djelovanja 24-hidroksilaze što dovodi do povećanih razina 24-hidroksikolesterola u plazmi u starijih pojedinaca (45-47). U starenju se u hipokampusu mijenja i količina sfingomijelina i gangliozida (41, 48), a povećava se i koncentracija ceramida koji je završni produkt katabolizma sfingomijelina i glikosfingolipida (49, 50).

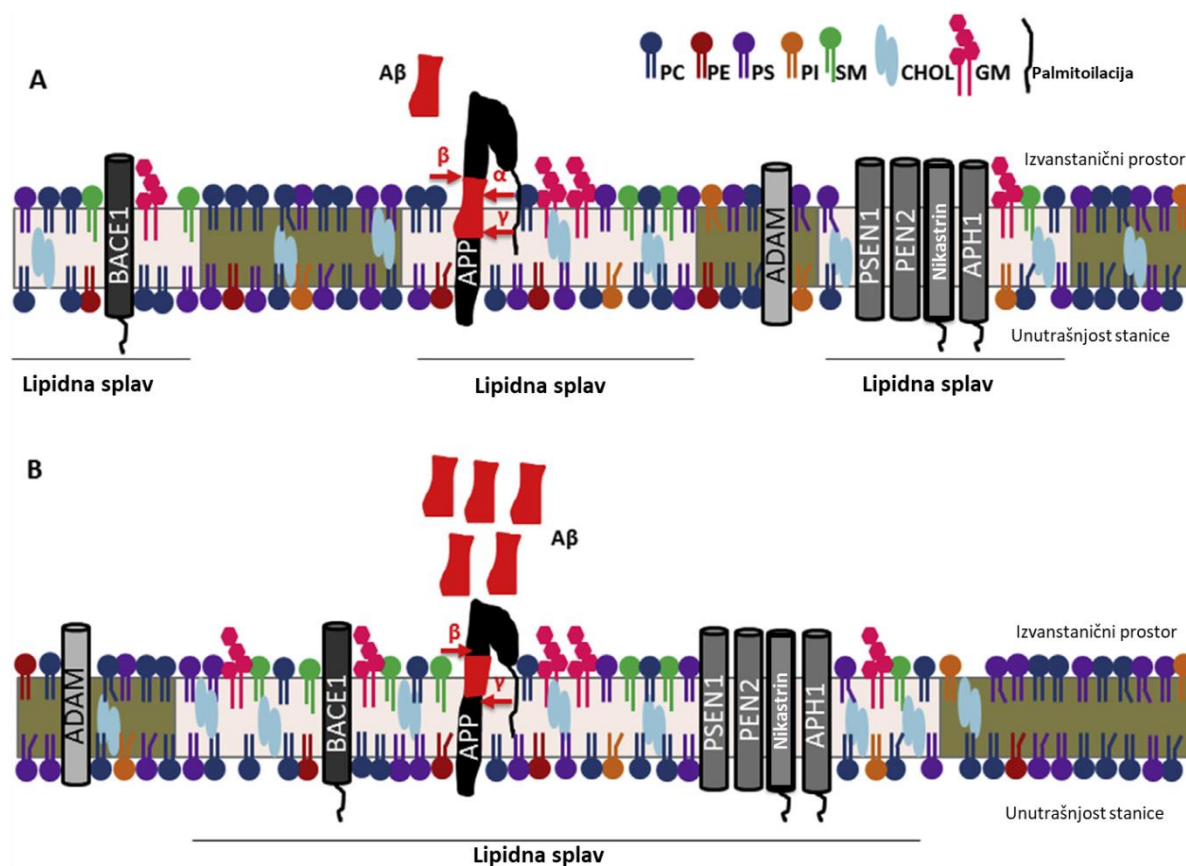
Starenjem se ne mijenja samo koncentracija gangliozida, već i njihova lokalizacija u lipidnim splavima zbog promjena sastava ceramidne okosnice unutar gangliozida (51) što sve podupire tvrdnju o značajnom utjecaju starenja na lipidni sastav i funkciju lipidnih splavi (48, 52, 53). Osim zabilježenih promjena količine, sastava i submembranske distribucije lipida, tijekom starenja se mijenja i koncentracija proteina u splavima (53).

Proteinski preteča amiloida (APP, od engl. *Amyloid precursor protein*) je transmembranski protein normalno prisutan u membrani (54). Njegova precizna biološka uloga nije poznata, ali u staničnim linijama APP modulira rast stanica, pokretljivost, rast neurita i preživljenje stanica (55). U odraslih životinja intracerebralno injiciranje ektodomene APP-a može poboljšati kognitivne funkcije i sinaptičku gustoću (56, 57). Procesiranje APP-a se odvija na membrani na dva moguća načina. Neamiloidogeni put podrazumijeva cijepanje α -sekretazom, nakon čega slijedi aktivnost γ -sekretaze. Ovim putem ne nastaje amiloid- β (A β). Amiloidogeni put kojim nastaje A β uključuje procesiranje APP-a aspartatnom proteazom

beta mjesta APP-a (BACE1, od engl. *Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*) te γ -sekretazom (55). APP je smješten u splavima, kao i ostale komponente uključene u amiloidogeni put, BACE1 i presenilini (PSEN) koji oba pripadaju kompleksu gama-sekretaze (24, 58, 59). Nejasno je zašto se APP nekada procesira amiloidogenim, a nekada neamiloidogenim putem, iako postoji teza da su lipidne splavi ključni element u odgovoru zašto dolazi do skretanja prema amiloidogenom putu u procesu neurodegeneracije (60).

U fiziološkom stanju u neuronima su prostorno odvojeni APP i amiloidogeni put, u odvojenim domenama membrane (61). Produkcija A β u splavima sugerira da je amiloidogeni put također zahvaćen promjenama lipidnog sastava i organizacije splavi preko promjene dinamike membrane i recikliranja vezikula (62). S-palmitoilacija, posttranslacijska modifikacija cisteinskih ostataka u BACE-1 potiče asocijaciju BACE1 u splavi (63). Ista ta modifikacija je češća u mozgu starih miševa, a odgovorna je za nakupljanje APP-a u splavima (64). Kolokalizacija i povećana interakcija između APP i BACE1 u splavima olakšava beta-cijepanje i preferira stvaranje A β u mišjim embrionalnim kortikalnim neuronima i u ljudskom mozgu (Slika 1.2.1.) (18, 59, 65).

Podjedinice gama-sekretaznog kompleksa – nikastrin i APH1 također mogu biti palmitoilirane preko cisteinskih ostataka što doprinosi njihovoj stabilnosti i pozicioniranju u splavi kao i njihovo združivanje s PSEN i pojačivačem presenilina 2 (PEN-2, od engl. *Presenilin enhancer 2*) da se stvori funkcionalni gama-sekretazni kompleks (63, 66), ali to ne utječe na kapacitet procesiranja APP-a (67). Zauzvrat cijepanje APP-a može utjecati na lipidni sastav preko otpuštanja intracelularne domene APP-a – AICD (od engl. *APP intracellular domain*). Ova domena može modificirati sastav splavi preko regulacije lipidnog metabolizma, odnosno preko plazmalogena koji reguliraju dinamiku kolesterola. U mozgu zahvaćenom patologijom Alzheimerove bolesti postoji manjak etanolamin-plazmalogena što je povezano s povećanim razinama membranskog kolesterola i povećanom produkcijom A β (68, 69).



Slika 1.2.1. Prikaz uloge lipidnih splavi u procesiranju proteinskog preteče amiloida (APP). U fiziološkom stanju (A) sve su komponente prostorno odvojene što ograničuje produkciju A β . U neurodegeneraciji (B) dolazi do preraspodjele lipidnih splavi i kolokalizacije komponenti u istim splavima što povećava stvaranje A β . CHOL-kolesterol, SM-sfingomijelin, GM-gangliozid, PC-fosfatidilkolin, PE-fosfatidiletanolamin, PS-fosfatidilserin, PI-fosfatidilinozitol, BACE1 – beta-sekretaza ili aspartatna proteaza 1 beta mjesta APP-a, gama-sekretaza (PSEN1, PEN2, nikastrin, APO1), ADAM – alfa-sekretaza iz skupine disintegrin i metaloproteaza. Alfa-sekretaza se ne nalazi u lipidnim splavima, dok se gama-sekretaza dominantno nalazi u splavima. Palmitoilacija BACE1 i gama-sekretaze (podjedinica nikastrin i APO1) dovodi do njihovog nakupljanja unutar splavi. Nakon palmitoilacije i APP se također nakuplja u lipidnim splavima što naposljetku povećava procesiranje APP-a pomoću BACE1. Preuzeto iz (18).

Nakon proizvodnje topivog A β on se veže na gangliozide, dominantno na GM1 u splavima što inducira njegovu konformacijsku promjenu i dovodi do oligomerizacije i izlaska iz splavi, s posljedičnom konverzijom u agregirane oblike i formiranjem netopivih fibrila (2, 70, 71).

1.3. Gangliozidi

Gangliozidi su membranski glikosfingolipidi koji sadrže *N*-acetilneuraminsku kiselinu (sijalinsku kiselinu). Nalaze se u membranama svih tkiva, ali prevladavaju u živčanom tkivu gdje su najzastupljeniji kompleksni gangliozidi. Funkcija gangliozida se očituje u modulaciji različitih staničnih događaja, kao što su transdukcija signala, adhezija i stanično prepoznavanje. Smatra se da su gangliozidi važni za pravilno pozicioniranje unutar membrane i funkciju različitih membranskih proteina. Gangliozidi se sastoje od ceramida na koji je vezan ugljikohidratni lanac. Ceramid je sastavljen od amino-alkohola sfingozina i amidno vezane dugolančane masne kiseline. Sfingozinski lanac je u mozgu sisavaca u pravilu dug 18 do 20 C atoma, a masna kiselina je u pravilu zasićena. To rezultira relativno rigidnom strukturom što utječe na povećanu vjerojatnost lateralne samo-organizacije (72).

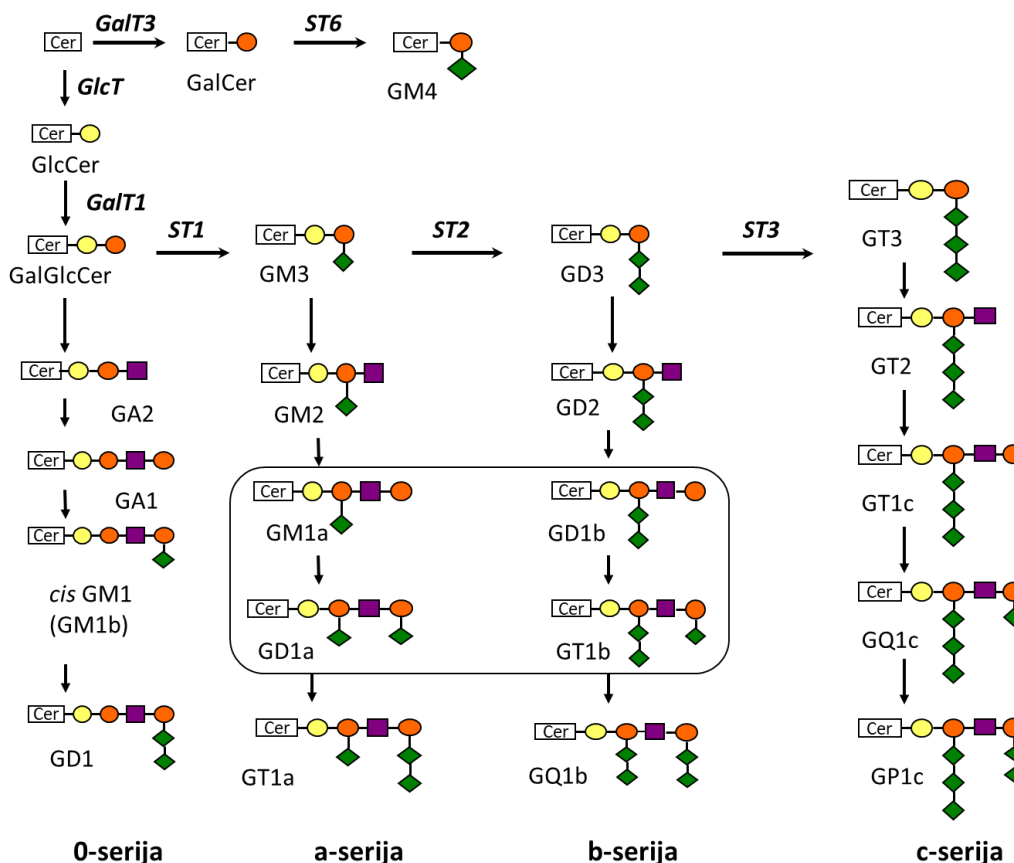
S obzirom na veliki broj različitih gangliozida i njihovu složenu molekularnu strukturu i nomenklaturu prema IUPAC-u (IUPAC, od engl. *International union of pure and applied chemistry*), radi jednostavnijeg označavanja pojedinih gangliozidnih vrsta koristi se Svennerholmova nomenklatura (73, 74) (Tablica 1.3.1.). U Svennerholmovom nazivlju slovo G označava gangliozid, sljedeće slovo (M, D, T, Q ili P) označava ukupni broj sijalinskih kiselina koje se nalaze u tom gangliozidu (M za jednu (mono), D za dvije (di), T za tri (tri), Q za četiri (quatra) i P za pet (penta)). Sljedeća oznaka je arapski broj koji označava slijed i duljinu ugljikohidratnog lanca vezanog na ceramid čime je uvjetovana kromatografska pokretljivost gangliozida. Nadalje, neki gangliozidi iza broja u nazivu mogu sadržavati i slovo a, b ili c što označava koliko je sijalinskih kiselina vezano na unutarnju galaktozu u ugljikohidratnom lancu (a – jedna, b – dvije, c – tri). Prema tim oznakama se gangliozidi dijele u serije (a-serija, b-serija, c-serija ili 0-serija koja ne sadrži sijalinsku kiselinu na unutarljivoj galaktozi) (Slika 1.3.1.).

Tablica 1.3.1. Prikaz strukture četiri kompleksna gangliozida i njihove nomenklature prema Svennerholmu i IUPAC-u

Svennerholmova nomenklatura	IUPAC nomenklatura	Struktura
GM1	$\text{II}^3\text{NeuAcGg}_4\text{Cer}$	$\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GalNAc}(\beta 1-4)[\text{NeuAc}(\alpha 2-3)]\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}(\beta 1-1')\text{Cer}$
GD1a	$\text{II}^3\text{NeuAcIV}^3\text{NeuAcGg}_4\text{Cer}$	$\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GalNAc}(\beta 1-4)[\text{NeuAc}(\alpha 2-3)]\text{Gal}(\beta 1-4)\text{R1}$
GD1b	$\text{II}^3(\text{NeuAc})_2\text{Gg}_4\text{Cer}$	$\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GalNAc}(\beta 1-4)[\text{NeuAc}(\alpha 2-8)\text{NeuAc}(\alpha 2-3)]\text{Gal}(\beta 1-4)\text{R1}$
GT1b	$\text{IV}^3\text{NeuAcII}^3(\text{NeuAc})_2\text{Gg}_4\text{Cer}$	$\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GalNAc}(\beta 1-4)\text{R2}$

Gangliozidi su vrlo raznovrsna skupina spojeva, međutim gangliozidne vrste koje su dominantne u živčanom sustavu sisavaca, odnosno čine oko 97% svih gangliozida ljudskog odraslog mozga, su četiri kompleksna gangliozida: GM1, GD1a, GD1b i GT1b. Sva četiri gangliozida nastaju postupnim dodavanjem šećernih jedinica uz pomoć različitih sijaliltransferaza (Slika 1.3.1.)

Tijekom razvoja i starenja ljudskog mozga dolazi do promjene u količini i sastavu gangliozida (75-77). U ranom embrionalnom razdoblju dominiraju jednostavnije vrste, GM3 i GD3, dok su već u trenutku rođenja manje zastupljene, a većinu čine GD1a i GT1b. Tijekom sazrijevanja povećava se izražaj GM1 i GD1b pa se u odraslome mozgu nalazi najveća količina upravo ta četiri kompleksna gangliozida. Osim promjene sastava, mijenja se i ukupna koncentracija gangliozida, koja se također povećava tijekom sazrijevanja mozga. Zastupljenost pojedinih gangliozida je različita po regijama mozga. U odraslom mišjem mozgu, GM1 se uglavnom nalazi u bijeloj tvari, a GD1a u sivoj. S druge strane GT1b i GD1b se podjednako nalaze i u sivoj i u bijeloj tvari (78). Neki gangliozidi a-serije koji imaju dodatnu sijalinsku kiselinu vezanu na *N*-acetilgalaktozaminski ostatak su u manjoj mjeri zastupljeni, i pronađeni isključivo u kolinergičkim neuronima (78, 79).



Slika 1.3.1. Biosintetski put gangliozida. Prikazani su gangliozidi 0-, a-, b- i c-serije te njihovi prekursori. Cer-ceramid, Glc-glukoza, Gal-galaktoza, GlcT-glukoziltransferaza, ST1-sijaliltransferaza I (GM3-sintaza), ST2-sijaliltransferaza II (GD3-sintaza), ST3-sijaliltransferaza III (GT3-sintaza), ST6-sijaliltransferaza VI (GM4-sintaza). Žuti krug – glukoza, narančasti krug – galaktoza, ljubičasti kvadrat – GalNAc, zeleni dijament – sijalinska kiselina. Četiri gangliozida u okviru su najzastupljeniji u ljudskom mozgu. Oznake prema Svennerholmu (73). Preuzeto iz (77).

Gangliozidi nisu nužni za diferencijaciju neurona ili anatomske razvoj živčanog sustava, ali je njihova ekspresija važna za održavanje normalnih interakcija neophodnih za stabilnost i funkcioniranje živčanog sustava, posebno aksonsko-mijelinskih interakcija (72).

Uloga gangliozida u mozgu najbolje je istražena korištenjem različitih mišjih modela s poremećenom sintezom gangliozida zbog isključivanja različitih gena koji kodiraju enzime sinteze gangliozida i posljedičnim različitim sastavom gangliozida. Sintezu gangliozida je moguće prekinuti na samome početku pa uopće nema sinteze gangliozida (*Ugcg null*, *B4galnt1/St3gal5 double null*) ili u kasnijim koracima, kada dolazi do povećavanja koncentracije svih gangliozida koji su sintetizirani prije bloka/prekida tako da je ukupna količina sijalinskih kiselina vezanih za gangliozide jednaka kao u divljem tipu miša (72).

Jedan od primjera biokemijskih i fizioloških posljedica prekida sinteze svih kompleksnih gangliozida je fenotip miša *B4galnt1 null*. Zbog nedostatka GM2-GD2 sintaze ne nastaju gangliozidi koji su produkti tog enzima, ali se nakupljaju jednostavni gangliozidi koji su njihovi preteče – GM3 i GD3. Ovi miševi se razvijaju normalno, imaju normalnu morfologiju stanica, dužinu i kompleksnost dendrita te normalnu gustoću spina (80). Kako miševi stare sve se više primjećuju problemi s vodljivošću te demijelinizacija. Ovo pokazuje da kompleksni gangliozidi nisu važni za temeljnu diferencijaciju, migraciju i stvaranje sinapsi nego za kasniju potporu neuronalnoj ekscitabilnosti, odnosno za optimalno formiranje mijelina, aksonsko-mijelinske interakcije i stabilnost centralnih i perifernih neurona (81-84). S vremenom *B4galnt1 null* miševi pokazuju progresivnu centralnu i perifernu aksonsku degeneraciju zbog neadekvatne potpore mijelina te pokazuju veliki broj nemijeliniziranih vlakana u središnjem živčanom sustavu (CNS, od engl. *Central nervous system*) (81, 83). Progresivna neuropatija rezultira motornim deficitima, gubitkom refleksa koordinacije i hoda (engl., *Gait*). Također miševi imaju tremor cijelog tijela i pokazuju značajnu hiperaktivnost (82).

U tkivima miševa *B4galnt1/St3gal5 double null* nema gangliozida, ali je nađen povećan udio laktozilceramida (LacCer). Ovi miševi žive kratko, imaju male mozgove, pokazuju vakuolizaciju spinalne i cerebelarne bijele tvari, degeneraciju mijeliniziranih aksona, malformaciju Ranvierovih čvorova i slabost udova (85).

Ukoliko se isključi gen čiji je produkt enzim odgovoran za sintezu glukozilceramida (*Ugcc-null*), dolazi do zastoja embrionalnog razvoja na razini gastrulacije (86). To pokazuje da mutacija koja uzrokuje manjak glukozilceramida (GlcCer) i posljedično glikosfingolipida čija je strukturna okosnica GlcCer nije spojiva sa životom.

Miševi *ST3gal2/3 double null* imaju nedostatak dviju sijaliltransferaza i posljedično ne stvaraju gangliozide sijalilirane na terminalnom ostatku galaktoze – GD1a i GT1b, dok nakupljaju druga dva kompleksna gangliozida GM1 i GD1b. Ovi miševi kratko žive, do dva mjeseca i rano pokazuju disrefleksiju (87).

Gangliozidi se *cis*-interakcijama lateralno organiziraju međusobno i s drugim komponentama membrane – lipidima i proteinima u lipidnim splavima. Unutar ili izvan splavi gangliozidi se mogu udruživati sa signalnim molekulama i regulirati njihovu lateralnu distribuciju i asocijaciju s drugim molekulama te regulirati njihov signalni kapacitet (88). U CNS-u je

opisano da GM1 može pojačati aktivnost TrkA, receptora za NGF (89). GM1 dodatno aktivira tirozin-kinaznu aktivnost Trk1 (90). GM1 facilitira udruživanje laminina, beta1-integrina, TrkA i intracelularnog člana Src obitelji Lyn za aktivaciju rasta neurita (91), a dodavanje specifične količine gangliozida neuronima poboljšava rast neurita, izrastanje aksona i neuronalnu diferencijaciju *in vivo* i *in vitro* (92). Gangliozidi pokazuju direktni afinitet za neurotransmitere, olakšavaju njihovo vezivanje za postsinaptičku membranu i pojačavaju otpuštanje neurotransmitera te tako potiču sinaptičku transmisiju (1).

Gangliozidi su receptori u aksonsko-mijelinskim interakcijama. Glikoprotein vezan uz mijelin (MAG, od engl. *Myelin-associated glycoprotein*) je transmembranski protein koji je isključivo eksprimiran u stanicama koje su odgovorne za mijelinizaciju u centralnom i perifernom živčanom sustavu (PNS, od engl. *Peripheral nervous system*), oligodendrocitima i Schwannovim stanicama (93). MAG se s velikom specifičnošću veže za strukture koje sadrže sijalinsku kiselinu u trisaharidnoj sekvenci koja se nalazi u gangliozidima GD1a i GT1b (94). Miševi bez kompleksnih gangliozida pokazuju slični fenotip kao i miševi bez MAG-a (*Mag-null* miševi) u vidu anomalija mijelina, progresivne degeneracije aksona u centralnom i perifernom živčanom sustavu i poremećene Ranvierove čvorove (82-84, 95).

1.4. Gangliozidi u neurodegeneraciji

Tijekom razvoja i starenja dolazi do kvantitativnih i kvalitativnih promjena gangliozida u mozgu. Osim već opisane zamjene jednostavnih gangliozida tijekom razvoja živčanog sustava kompleksnim gangliozidima koji dominiraju u odraslome mozgu, tijekom normalnog starenja dolazi do promjene količine i sastava gangliozida (96). Značajne promjene se događaju i u neurodegeneraciji. Opisan je pad ukupne koncentracije gangliozida u oboljelih od Alzheimerove bolesti (AD, od engl. *Alzheimer's disease*) u usporedbi s kontrolama iste dobi. Osim toga ponovno se pojavljuju jednostavni gangliozidi (GM2, GM3, GM4) na račun smanjene koncentracije kompleksnih gangliozida (GM1, GD1a, GD1a, GT1b) (97-100). U obiteljskom tipu AD pokazano je dramatično smanjenje koncentracije gangliozida u frontalnom korteksu (101), a u sporadičnom obliku smanjenje je pokazano samo u temporalnom korteksu, hipokampusu i bijeloj tvari frontalnog režnja. Osim promjene koncentracije dolazi i do promjene udjela različitih gangliozida posebice b-serije (GD1b i

GT1b) u frontalnom i parijetalnom korteksu oboljelih od AD u usporedbi s kontrolama (97-99, 102-104). S druge strane, u temporalnom korteksu AD mozgovia dolazi do povećanja udjela b-serije, a smanjenja udjela a-serije (76). Na razini pojedinih gangliozida povećana je koncentracija gangliozida GM1 i GM2 u frontalnom korteksu pacijenata s AD (105). Razine GM1 i GM2 pozitivno koreliraju s ubrzanjem stvaranja amiloidnih (senilnih) plakova u AD (58, 106, 107).

U Alzheimerovoj bolesti i transgencičnim mišjim modelima te bolesti u moždanom tkivu dolazi do nakupljanja amiloidnih plakova u kojima glavnu komponentu čine agregirane varijante A β duljine 39 do 42 aminokiseline koje nastaju nakon cijepanja APP-a β - i γ -sekretazom. Nekoliko radova je pokazalo da su gangliozidi nužni za inicijaciju agregiranja A β te da oni utječu na konformacijsku promjenu peptida (108-110).

Mišji modeli s mutacijama u genu za APP, mišji PSEN1 modeli i dvostruki transgeni mišji model s mutacijama u APP i PSEN1 su pokazali umjeren pad udjela GQ1b, GD1b, GD3 i GT1a gangliozida u usporedbi s odgovarajućim kontrolama (111). Gubitak kompleksnih gangliozida GT1a, GD1a i GM1 je opisan u APP/PSEN1 *knock-in* mišu (miš kojemu je gen od interesa ubačen na točno određeno mjesto u genomu), ali ne u APP/PSEN1 dvostruko transgenom mišu. S druge strane jednostavni gangliozidi GM2 i GM3 su bili značajno povišeni u APP^{SL} transgenom mišu i dvostruko transgenom APP/PSEN1 mišu, dok su u transgenom PSEN1 mišu bili sniženi. Koncentracija skupine gangliozida koji su specifični za kolinergične neurone GT1a α i GQ1b α je također povišena u dvostruko transgenom mišu (112, 113).

Postoji i trostruko transgeni miš APP/PSEN1 s delecijom GD3 sintaze (APP/PSEN1/GD3S^{-/-}). Ovim miševima u potpunosti nedostaje b-serija gangliozida, a imaju kompenzatoran porast a-serije u usporedbi s divljim tipom. Također imaju eksprimiran samo GT1a α , ali ne i GQ1b α . Ovi miševi imaju manju razinu topljivog i agregiranog A β u serumu i smanjeno nakupljanje A β i u hipokampusu i u korteksu. Svi depoziti A β koji su primijećeni u dvostruko transgenom mišu su gotovo u potpunosti eliminirani u trostruko transgenom mišu (113, 114). Miševi s mutiranim APP^{SL} transgenom s ili bez PSEN1 mutacije, ali ne i miševi koji nose samo PSEN1 mutaciju, imaju slične promjene gangliozidnog sastava kakav je opisan u pacijenata s AD (115). Miševi s mutacijama u APP i PSEN1 pokazuju deficite pamćenja, ali bez značajnih promjena u sastavu gangliozida dok GD3S^{-/-} miševi imaju značajnu promjenu sastava gangliozida, ali bez deficita pamćenja. Ovo pokazuje da sama promjena gangliozida nije odgovorna za kognitivne efekte (115), odnosno uloga gangliozida je u olakšanoj

oligomerizaciji A β koji su odgovorni za kognitivne deficite, a njihov manjak u GD3S^{-/-} modelu uzrokuje manju oligomerizaciju A β .

Vežanje A β na GM1 rezultira promjenama u sekundarnoj strukturi A β (113, 116). A β nakon vežanja na GM1 prolazi konformacijsku promjenu od strukture uzvojnice do strukture β -nabrane ploče. Ova je interakcija specifična za gangliozide, odnosno do ovakve promjene strukture ne dolazi u prisutnosti različitih fosfolipida ili sfingomijelina (115). Agregiranje A β u fibrile je olakšano u prisutnosti gangliozida GM1 (108, 117). Imunohistokemijski je pronađena prisutnost GM1 vezanog za A β u senilnim plakovima (GM1/A β kompleks – GA β). GA β može služiti kao klica za daljnju fibrilogenezu u mozgu zahvaćenom Alzheimerovom bolešću (70). I drugi gangliozidi kao što su GM3, GD3 i fukozil-GM1 mogu također biti uključeni u proces amiloidogeneze (118, 119).

Obje komponente, A β nakon cijepanja APP-a i GM1, se nalaze u lipidnim splavima (115). Iz ljudskih uzoraka s AD izolirane su lipidne splavi iz frontalnog i temporalnog režnja te su pronađene veće koncentracije GM1 i GM2. Iako je opisan gubitak gangliozida u AD-u, on nije opisan u lipidnim splavima, u kojima je pronađeno povećanje GM1 i GM2 (120). Koncentracije GM1 u lipidnim splavima sinaptosoma se povećavaju s dobi, a povećanje je značajno ukoliko su miševi homozigoti za ljudski apoE ϵ 4 gen. Starenje i izražaj ApoE4 kooperativno ubrzavaju agregaciju A β posredstvom GM1 u mikrodomenama neuronalnih membrana (117). GM1 povećava i aktivnost α -sekretaze i stvaranje njenih produkata (121). Povećanje koncentracije kolesterola u neuronskim membranama također ubrzava agregiranje A β (122, 123).

1.5. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest progresivni je neurodegenerativni poremećaj poznatih patohistoloških posljedica, nepoznate etiologije i tek djelomično poznate patofiziološke kaskade. Klinički se očituje gubitkom pamćenja, kognitivnim nazadovanjem te promjenama u ponašanju i osobnosti. Najveću korelaciju s AD-om pokazuje starenje, što u kombinaciji s općim starenjem populacije dovodi do AD-a kao najčešćeg uzroka demencije u starijih osoba. U većini slučajeva se pojavljuje sporadično, ali postoji i genetska osnova za obiteljsku pojavnost bolesti koja se u tim slučajevima javlja prije 65. godine života. Alzheimerova bolest zahvaća žene češće od muškaraca (124). Uzrok ili uzroci Alzheimerove bolesti nisu poznati, ali se

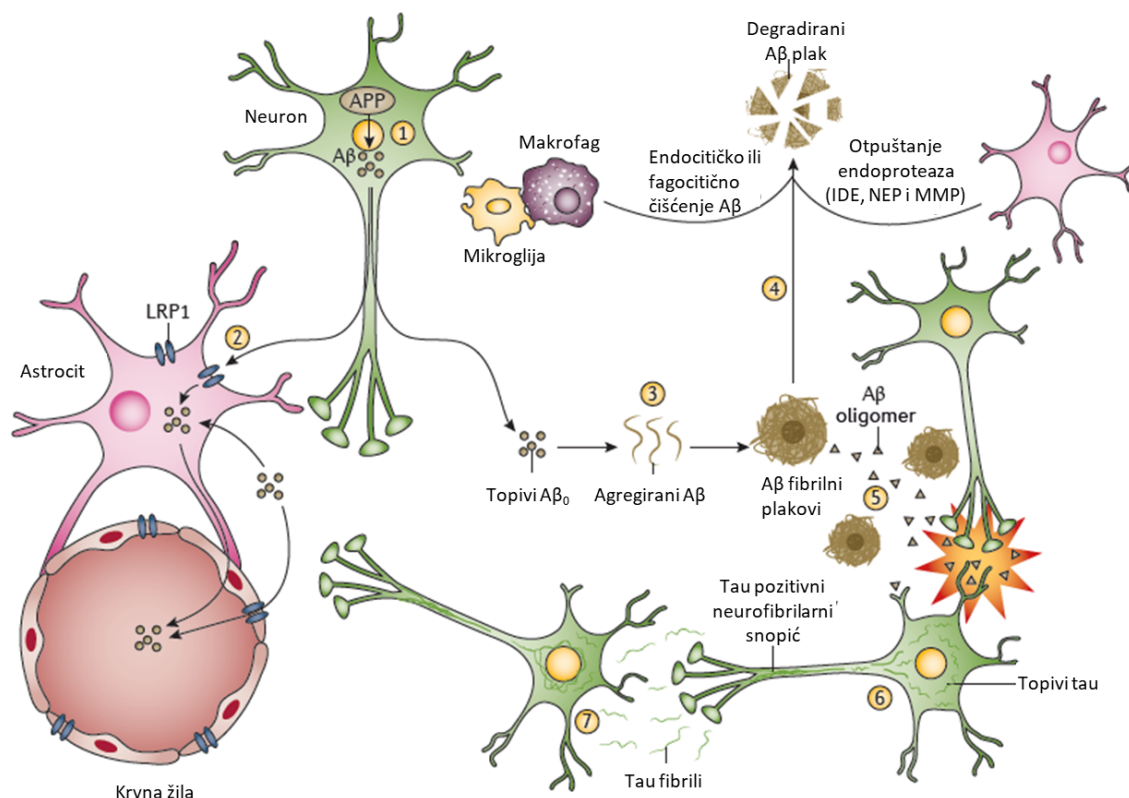
smatra da su simptomi bolesti povezani s gubitkom neurona i sinapsi zbog nakupljanja senilnih (amiloidnih) plakova (SP, od engl. *Senile plaque*) i neurofibrilarnih snopića (NFT, od engl. *Neurofibrillary tangle*) (125, 126). Upravo ove histopatološke promjene predstavljaju tipični nalaz koji potvrđuje neurodegeneraciju specifičnu za AD.

Neurodegenerativne promjene u Alzheimerovoj bolesti selektivno zahvaćaju vulnerabilne regije mozga te progrediraju s duljinom trajanja bolesti. Stadiji širenja opisane neurodegeneracije uključuju zahvaćanje prvenstveno entorinalne regije, zatim limbičko i naposljetku neokortikalno područje (127-129).

Histološka obilježja koja postmortalno potvrđuju dijagnozu, a smatraju se važnima za mehanizme koji dovode do gubitka sinapsi i selektivne neuronalne smrti te pada razine određenih neurotransmitera su depoziti proteina amiloida i tau (Slika 1.5.1.). Senilni plakovi su nakupine netopivog A β u izvanstaničnom prostoru, ali i u stijenkama krvnih žila, dok su neurofibrilarni snopići unutarstanične nakupine dvostrukih helikalnih filamenata prekomjerno fosforiliranog proteina tau koji je normalno vezan uz mikrotubule (130). A β je protein koji u svom lancu sadrži 39 do 42 aminokiseline (131, 132), a kako je ranije opisano nastaje cijepanjem APP-a kompleksom enzima γ - i β -sekretaze. U kompleksu β -sekretaze se nalaze presenilin1 (PSEN1, kodiran genom *PSEN1*) te PSEN2 (kodiran s *PSEN2*). Treći element koji nedvojbeno doprinosi bolesti je *APOE* (126). Polimorfizmi u regiji koja regulira transkripciju *APOE* su povezani s rizikom za razvoj sporadične Alzheimerova bolesti (133). Postoje tri izoforme koje se međusobno razlikuju u jednoj ili dvije aminokiseline: ApoE2, ApoE3 i ApoE4. Različit slijed aminokiselina mijenja vezanje ApoE na stanične receptore i lipoproteinske komponente. *APOE4* alel se pojavljuje u oko 50% slučajeva sporadične AD (134). S druge strane ApoE3 smanjuje odlaganje A β u mišjim modelima nasljedne (obiteljske) Alzheimerove bolesti (135).

Mehanizmi proteinske fosforilacije i defosforilacije normalno su uključeni u regulaciju stanične plastičnosti (136, 137), a u AD-u dolazi do poremećaja procesa fosforilacije (138, 139). Stanična plastičnost najviše je izražena u vrijeme rasta i razvoja, a normalno je potisnuta u odraslome mozgu. Zanimljivo je da su u dijelovima mozga bitnima za pamćenje, kao što su hipokampus i entorinalni korteks, plastičnost i molekularni biljezi plastičnosti (npr. neuromodulin, polisijalilirana neuralna molekula stanične adhezije, spektrin) prisutni i u odrasloj dobi (140). Ako dođe do ozljede tkiva, izražaj je biljega plastičnosti pojačan što

ukazuje na pokušaj samoobnove tkiva zahvaćenog ozljedom. Istraživanja pokazuju da su u AD-u pojačano izraženi biljezi stanične plastičnosti koji su po svojoj strukturi i funkciji molekule stanične adhezije. Njihova uloga u AD-u tumači se dvojako: kao pokušaj obnavljanja degeneracijom zahvaćenoga tkiva ili kao sastavni dio patogeneze AD-a (141).



Slika 1.5.1. Putovi nakupljanja senilnih plakova i neurofibrilarnih snopića. Aβ nastaje procesiranjem APP-a (korak 1) te se otpušta izvan stanice kao topivi Aβ₀ koji se uklanja mehanizmima koji uključuju ApoE ili ga preuzimaju astrociti preko proteina 1 povezanih s receptorom za lipoprotein male gustoće (LRP1, od engl. *Low-density lipoprotein receptor-related protein 1*; korak 2). Aβ₀ se može agregirati do plakova (korak 3). „Čišćenje“ Aβ plakova je moguće djelovanjem endocita ili fagocita (u makrofazima ili mikrogliji) ili endoproteazama iz astrocita (IDE – od engl. *insulin-degrading enzyme*, NEP – *neprilysin* i MMP – *matrix metalloproteinase*; korak 4). Neki oligomeri koji se odvajaju od Aβ fibrila i plakova ne mogu biti očišćeni te ostaju kao toksični agensi u blizini sinapsi (korak 5) te induciraju agregaciju tau. Oštećenje proteina tau se odvija u neuronima te se stvaraju tau-pozitivni neurofibrilarni snopići koji se protežu do dendrita (korak 6). Moguć je unos fibrilarnog tau u zdrave neurone što uzrokuje daljnje oštećenje tau i smrt nove stanice (korak 7). Preuzeto iz (126).

Za istraživanje mehanizama neurodegeneracije koriste se različiti mišji modeli. Razvoj modela s genetičkim mutacijama koje su pronađene u obiteljskim oblicima bolesti ima tri uloge: (I) razjašnjenje normalne fiziološke uloge genskog produkta u životinji kojoj je isključen gen – KO (od engl. *knock-out*) ili u transgeničnim životinjama koje eksprimiraju

produkt u suvišku u odnosu na divlji tip životinje; (II) razumijevanje kako genetička mutacija dovodi do degeneracije neurona, bilo u životinja koje ne ekspimiraju gen od interesa (KO), u životinja s ubačenim genom (engl. *knock-in*) ili u transgeničnim životinjama koji pretjerano ekspimiraju mutirani produkt gena; i (III) razvoj modela s relevantnim fenotipom za bolest koji se može koristiti za pretklinička testiranja lijekova (142).

Kod mišjih modela za Alzheimerovu bolest uglavnom se uvode promjene tri gena čije su mutacije odgovorne za 30 – 50% svih familijarnih oblika AD. Ovi geni kodiraju za APP (AD1) (143), presenilin 1 (PSEN1, PS1, AD3) (144) i presenilin 2 (PSEN2, PS2, AD4) (145, 146). Razvijeni su modeli koji mogu imati jednu, dvije ili više mutacija u različitim genima te izražavaju različite mutirane forme proteina koji su povezani s bolešću.

2006. godine Oakley i suradnici su razvili dvostruko transgenični APP/PS1 mišji model s pet mutacija koje su pronađene u obiteljskom obliku AD s ciljem ubrzanja stvaranja plakova, takozvani miš 5xFAD. Plakovi se u ovom transgeničnom modelu stvaraju već u dobi od dva mjeseca (147).

1.6. Neuroplastin

Neuroplastin (Np) je transmembranski glikozilirani protein iz porodice imunoglobulina koji ekstracelularnim domenama sudjeluje u međumolekularnim i međustaničnim interakcijama te se zato ubraja u veliku skupinu molekula stanične adhezije (CAM, prema engl. *cell adhesion molecule*) (140). Zbog alternativnoga izrezivanja glasničke RNA (mRNA, od engl. *messenger RNA*) pojavljuje se u dvije izoforme, neuroplastin-65 (Np65) koji je specifičan za živčano tkivo i sadrži tri imunoglobulinske (Ig, od engl. *Immunoglobulin*) domene (148) i neuroplastin-55 (Np55) koji se nalazi i u drugim tkivima, a sadrži dvije Ig domene (149). Obrazac glikozilacije neuroplastina ovisi o vrsti stanice u kojoj je ekspimiran neuroplastinski gen (148). Izoforme su ranije bile poznate kao gp65 i gp55, prema glikoprotein-65 i -55 (150).

Opisane funkcije neuroplastina su sudjelovanje u rastu neurita (151), regulacija sinaptičke plastičnosti (152), molekularni mehanizmi dugoročne sinaptičke potencijacije (153, 154), održavanje ravnoteže između ekscitacijskih i inhibicijskih sinapsi (155) te formiranje asocijativnih sjećanja (156). Izvor većine podataka o neuroplastinu su istraživanja na mišjem i

štakorskom mozgu (157, 158), a postoji vrlo mali broj istraživanja neuroplastina u ljudskome mozgu (157, 159).

Dosadašnja istraživanja funkcija neuroplastina u ljudskome mozgu su pokazala povezanost genskog polimorfizma neuroplastina s debljinom korteksa i kvocijentom inteligencije u adolescenata (160) te povezanost polimorfizama nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) u promotorskoj regiji neuroplastina s većim rizikom za shizofreniju (161).

Na staničnoj je razini neuroplastin prisutan na ektomembranama dendrita i tijela neurona, na samim živčanim vlaknima te u sinapsi (157). Nasuprot tome u jezgri i citoplazmi nije utvrđena prisutnost neuroplastina. Za razliku od Np55, Np65 zbog prisutnosti tri ekstracelularne Ig domene osim heterofilnih može stupiti i u homofilne interakcije. Ova interakcija neuroplastinskih molekula je značajna za staničnu adheziju (151, 162). Neuroplastin je bitan i u razvoju i održavanju normalnih sinaptičkih veza u malome mozgu miša (158).

Nakon utvrđivanja prisutnosti Np65 u hipokampalnoj regiji provedena su elektrofiziološka istraživanja na rezovima štakorskoga hipokampusu kako bi se odredila moguća uloga neuroplastina u procesima učenja i pamćenja. Autori su pokazali izostajanje dugoročne sinaptičke potencijacije (LTP, prema engl. *long-term potentiation*) nakon visokofrekventne stimulacije ako se protutijelima spriječi vezanje Np65 s drugim molekulama (154). Drugi istraživači su pokušali razjasniti mehanizam kojim neuroplastin sudjeluje u LTP-u te su pokazali proturječne rezultate, odnosno da neuroplastin posreduje prilikom aktivacije protein-kinaze aktivirane mitogenom (MAPK, od engl. *mitogen activated protein kinase*) i onemogućuje indukciju LTP-a u hipokampusu (153).

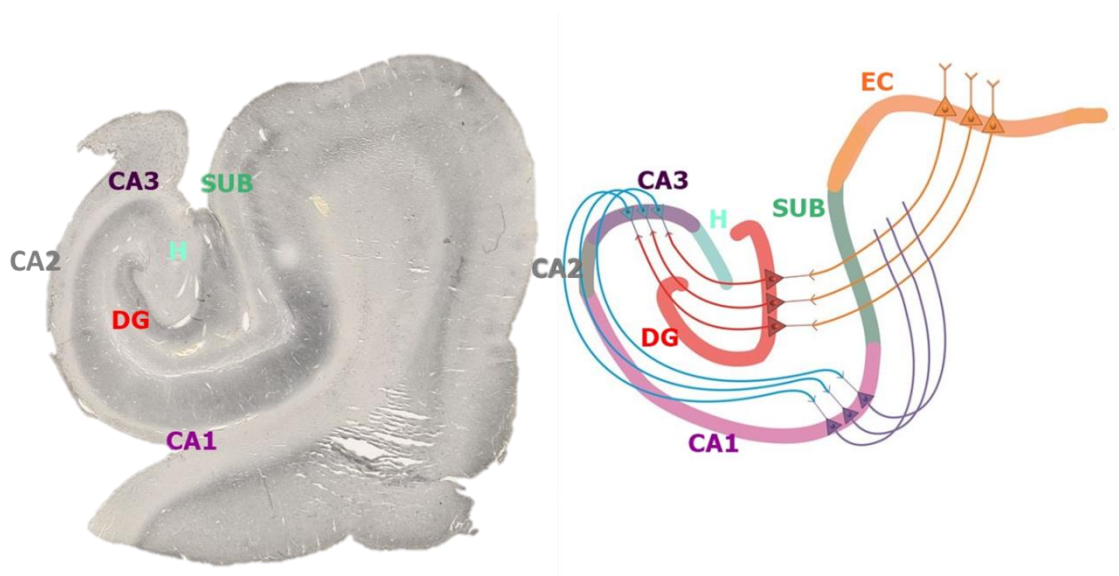
Novija istraživanja izražaja neuroplastina provedena su i na mišjem modelu s nemogućnošću sinteze neuroplastina. Osim klasičnog modela koji konstitutivno ne sintetizira protein, uzgojeni su i modeli kod kojih je moguće isključiti sintezu proteina u neuronima u odrasloj dobi, tzv. inducibilni *knock-out* miš. Klasični *knock-out* miševi kraće žive, manji su te su mužjaci infertilni. Gruba anatomija živčanog sustava nije promijenjena. Ovi miševi pokazuju promjene u osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HPA, od engl. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*), odnosno povećanu razinu kortikosterona, smanjenu razinu mRNA za oslobađajući faktor kortikotropina i povećanu razinu mRNA za glukokortikoidne receptore u

mozgu. Ovi miševi pokazuju smanjene motoričke sposobnosti na rotarod testu i neobično ponašanje u Morrisovom vodenom tunelu (miševi uranjaju u vodu, što nije tipično ponašanje za divlji tip miša). Također miševi pokazuju problem s kontekstualnim pamćenjem (156).

Upravo je inducibilni *knock-out* miš korišten u istraživanjima radi razjašnjavanja opisanih problema s pamćenjem i uloge neuroplastina. Nakon indukcije gašenja sinteze proteina tamoksifenom, razina neuroplastina se smanjuje za 65% nakon četiri tjedna, a gotovo u potpunosti nije detektabilan nakon dva mjeseca. Miševi tijekom treninga u komori (engl., *shuttle box*) moraju naučiti u kojem će se dijelu komore nakon podražaja koji nije štetan (svjetlo ili zvuk) pojaviti štetni podražaj. Dva mjeseca nakon indukcije tamoksifenom, miševi kojima je isključen neuroplastin su se u komori ponašali kao i miševi koji nikada nisu bili trenirani. Njihove kontrole kojima nije bio isključen neuroplastin su se točno sjećali štetnog podražaja u oko 50% slučajeva. S druge strane inducibilni neuroplastinski *knock-out* miševi ne pokazuju promjene pamćenja u vodenom tunelu ili testu izbjegavanja svjetlo/tama (engl., *light-dark avoiding paradigms*). Ovime je pokazano da je neuroplastin važan za stvaranje i zadržavanje ili prisjećanje naučenih ponašanja koja su povezana s drugim podražajem (asocijativno pamćenje) (156).

Daljnje razjašnjavanje uloge neuroplastina u neuronalnim krugovima koji su odgovorni za procese učenja i pamćenja je dovelo do dizajniranja novog *knock-out* miša kojima se može isključiti sinteza neuroplastina samo u glutamatergičnim neuronima. U ovom mišjem modelu pokazano je da je ekspresija neuroplastina važna za regulaciju ekspresije kalcijске pumpe na staničnoj membrani (PMCA, od engl. *Plasma Membrane Calcium ATP-ase*) i posljedičnu regulaciju unutarstaničnih kalcijevih iona (iCa^{2+}). Promijenjena aktivnost glutamatergičkih kortikalnih i hipokampalnih neurona nakon ablacije neuroplastina je posljedica povećanja unutarstanične razine Ca^{2+} (159).

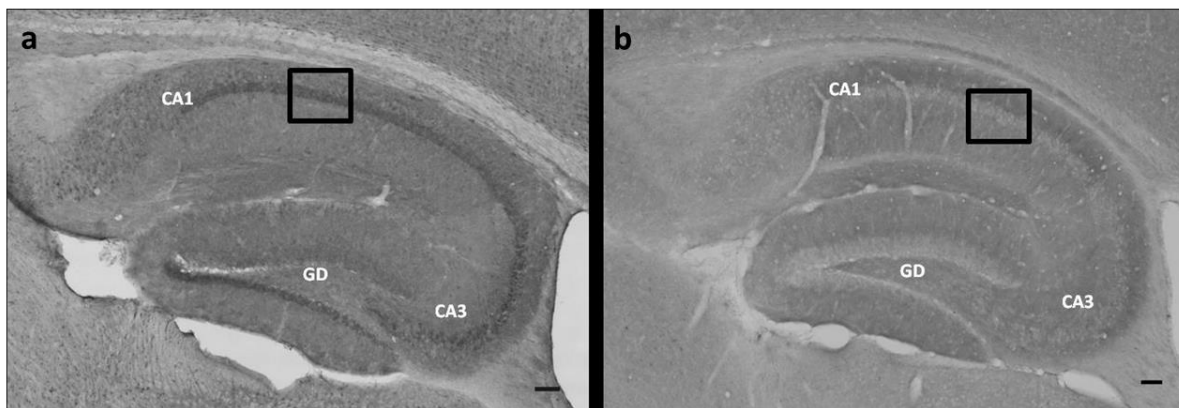
Osim navedenog, istražen je i uzorak ekspresije Np65 u tkivu hipokampalne formacije u odraslom ljudskome mozgu. U skladu s opisanim funkcijama neuroplastina u asocijativnom pamćenju, uzorak ekspresije prati jedan od glavnih putova informacija u hipokampusu: trisinaptički put. Neuroplastin je prisutan u granularnim stanicama i piramidnim neuronima u slojevima hipokampalnih regija koje su povezane u ekscitatornom glutamatergičnom putu informacija (159) (Slika 1.6.1.).



Slika 1.6.1. Lijevo – izražaj Np65 u ljudskoj hipokampalnoj formaciji i entorinalnom korteksu i desno – shematski prikaz regija uključenih u trisinaptički put i njihovih veza. DG – dentatni girus, H – hilus, CA – Cornu Ammonis 3, 2 i 1, SUB – subikulum, EC – entorinalni korteks. Preuzeto iz (159).

1.7. Interakcije lipida (gangliozida) i proteina (neuroplastina) u neuronskoj membrani promijenjenoj procesom neurodegeneracije

Lipidni okoliš utječe na izražaj i funkciju različitih membranskih proteina. Primjerice, mišji model s promijenjenim sastavom gangliozida, odnosno bez mogućnosti sinteze kompleksnih gangliozida, pokazuje promjene ekspresije različitih proteina, između ostalog i neuroplastina (163, 164). Promjene izražaja neuroplastina su ustanovljene na genskoj i proteinskoj razini u korteksu i hipokampusu. Osim izražaja, u tkivu su pokazane i promjene u pozicioniranju Np unutar hipokampusa, odnosno invertna reaktivnost po podslojevima (Slika 1.7.1.) (163, 164).



Slika 1.7.1. Izražaj neuroplastina u hipokampalnoj formaciji u divljeg tipa miša (a) u usporedbi s *B4galnt1 null* mišem (b). Sloj piramidnih stanica u CA1 i CA3 pokazuje smanjenu imunoreaktivnost u *B4galnt1 null* mišu u usporedbi s jakim bojenjem u divljem tipu. Np imunoreaktivnost u granularnom sloju DG divljeg tipa je intenzivnije u usporedbi s *B4galnt1 null* mišem. CA1 – Cornu Ammonis 1, CA3 – Cornu Ammonis 3, GD – dentatni girus. Oznaka veličine 100 μm . Preuzeto iz (163).

Neuronska membrana je mjesto interakcija različitih molekula i procesa koji su neophodni za normalno funkcioniranje membrane te komunikaciju među stanicama. Iako nisu jasni točni molekularni mehanizmi koji održavaju normalnu funkciju membrane, pokazan je utjecaj različitih lipidnih skupina na mikrostrukturna svojstva membrane te na ponašanje i združivanje proteina unutar lipidnih domena (165). Komponente membrane podliježu različitim promjenama sa starenjem i u neurodegeneraciji, a to može objasniti fizikalno-kemijsku podlogu promjena svojstava membrane. Ove promjene, pogotovo u lipidnim splanima sinaptičkih membrana mogu potencijalno doprinijeti različitim neuropatološkim procesima (166).

Analiza mišjih modela s promijenjenom sintezom i sastavom gangliozida pokazuje da većina njih ima normalnu morfologiju i histologiju živčanog sustava prilikom rođenja, ali kasnije pokazuju različite degenerativne promjene što podržava ulogu gangliozida u održavanju struktura i funkcija živčanog tkiva (167). Kod različitih mišjih modela s poremećenim sastavom gangliozida pokazano je da stupanj i progresija neuroinflamacije ovise o manjku pojedinih gangliozidnih struktura (168). Osim uloge u neuroinflamaciji, gangliozidi su neophodni za održavanje strukture i funkcioniranja lipidnih splavi te pozicioniranje proteina unutar membrane što je pokazano analizom miša koji sintetizira gangliozide samo do GM3. Analiza proteina normalno prisutnih u lipidnim splanima u tim miševima pokazuju

distribuciju izvan splavi, među ostalima i proteina s GPI-sidrom (167). Ovi podaci naglašavaju važnost normalnog lipidnog sastava za funkcioniranje proteina u različitim sustavima.

S obzirom na opisane uloge lipida u izražaju, pozicioniranju i funkcioniranju različitih proteina, promjene ekspresije membranskih proteina bi se trebale sagledati u kontekstu eventualnih promjena njihovog membranskog okoliša.

2. HIPOTEZA

Hipoteza ovog rada je da se izražaj neuroplastina mijenja u neurodegenerativnim procesima, a promijenjeni izražaj i pozicioniranje neuroplastina ovise o specifičnom ganglioziidnom sastavu membrane.

Hipoteza se temelji na ranijim spoznajama o interakcijama membranskih lipida i proteina kao i ulozi membranskih lipida u patogenezi neurodegeneracije, i sudjelovanju različitih molekula stanične adhezije u kompenzatornom odgovoru tkiva na neurodegenerativni proces.

3. CILJEVI RADA

3.1. OPĆI CILJ

Opći cilj rada je utvrditi mijenja li se izražaj membranskog proteina neuroplastina u neurodegeneraciji, te ispitati povezanost izražaja neuroplastina i sastava gangliozida u regijama mišjeg mozga, i u primarnim neuronalnim kulturama.

3.2. SPECIFIČNI CILJEVI

- analizirati imunohistokemijsku lokalizaciju i izražaj neuroplastina u uzorcima ljudskog hipokampusa zahvaćenog sporadičnom Alzheimerovom bolešću u usporedbi s kontrolnim tkivnim uzorcima;
- analizirati imunohistokemijsku lokalizaciju i proteinski izražaj neuroplastina u moždanim uzorcima miševa 5xFAD, modela za obiteljsku Alzheimerovu bolest u usporedbi s uzorcima miševa divljeg tipa;
- analizirati sadržaj i sastav gangliozida u moždanim uzorcima miševa 5xFAD i miševa divljeg tipa;
- analizirati sastav moždanih gangliozida u uzorcima mišjeg modela koji nema mogućnost sinteze neuroplastina;
- analizirati membransku raspodjelu neuroplastina unutar i izvan lipidnih splavi u uzorcima kortikalnog tkiva miševa *B4galnt1 null* i *St3gal2/3 double-null* s promijenjenom sintezom gangliozida;
- odrediti kolokalizaciju neuroplastina i gangliozida u primarnim štakorskim neuronalnim kulturama *in vitro*.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. MATERIJALI

Kao materijal za istraživanje korišteni su:

- 1) postmortalni tkivni uzorci ljudske hipokampalne formacije zahvaćeni sporadičnom Alzheimerovom bolešću i tkivni uzorci ljudske hipokampalne formacije bez znakova neurodegeneracije;
- 2) uzorci moždanog tkiva mišjeg modela obiteljske Alzheimerove neurodegeneracije (5xFAD miševi) i kontrolnih miševa (divlji tip);
- 3) uzorci moždanog tkiva mišjih modela s promijenjenim sastavom gangliozida, (*B4galnt1 null* i *St3gal2/3 double-null*) i kontrolnih miševa (divlji tip);
- 4) uzorci moždanog tkiva mišjeg modela bez mogućnosti sinteze proteina neuroplastina i kontrolnih miševa (divlji tip);
- 5) primarne kulture štakorskih hipokampalnih i kortikalnih neurona.

4.1.1. Uzorci moždanog tkiva

4.1.1.1. Postmortalni tkivni uzorci ljudske hipokampalne formacije zahvaćeni sporadičnom Alzheimerovom bolešću i tkivni uzorci ljudske hipokampalne formacije bez znakova neurodegeneracije

Korišteno je ukupno dvanaest tkivnih uzoraka ljudske hipokampalne formacije: šest uzoraka odraslih osoba starije dobi oba spola, prosječne dobi 74 godine čiji uzrok smrti nije povezan s poremećajem živčanog sustava i šest uzoraka odraslih osoba starije dobi oba spola, prosječne dobi 78 godina kojima je za života klinički dijagnosticiran, a postmortalno neuropatološki potvrđen sporadični oblik Alzheimerove bolesti (Tablica 4.1.1.1.1.). Podaci o uzimanju terapije za osobe oboljele od AD nisu poznati. Uzorci starijih zdravih odraslih osoba i osoba s dijagnosticiranom Alzheimerovom bolešću dobiveni su iz zbirke Huddinge Brain Bank, Karolinska Institute, Švedska.

Tablica 4.1.1.1.1. Podaci o pojedincima čiji su hipokampalni uzorci korišteni za postmortalnu analizu.

KONTROLE				ALZHEIMEROVA BOLEST				
#	godine	spol	uzrok smrti	#	godine	spol	trajanje bolesti (godine)	uzrok smrti
1	62	Ž	Prometna nesreća	1	73	Ž	4	Bronhopneumonija
2	68	M	Prometna nesreća	2	73	M	7	Bronhopneumonija
3	75	M	Prometna nesreća	3	77	M	3,5	Bronhopneumonija
4	71	Ž	Infarkt miokarda	4	80	Ž	5	Bronhopneumonija
5	81	Ž	Infarkt miokarda	5	80	Ž	6	Infarkt miokarda
6	84	Ž	Plućna embolija	6	84	Ž	3,5	Zatajenje srca

M-muškarci; Ž-žene.

Uspoređivani su rezovi na razinama 3, 4 i 5, prema podjeli iz rada Westa i Gundersena West and Gundersen (169). Frontalni rezovi hipokampalnoga tkiva debljine 3 mm osoba iz kontrolne skupine i osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti nakon pažljive neuroanatomske disekcije u rostrokaudalnom smjeru, uklopljeni su u parafinske blokove, kako je opisano u radu Westa i Gundersena (169). Za analizu su od hipokampalnoga tkiva uklopljenoga u parafinske blokove napravljeni rezovi debljine 12 μ m. Za ovo istraživanje korišteni su paralelni rezovi različitih razina hipokampalne formacije i uspoređivani na istoj ili približno istoj razini reza patološkoga i kontrolnoga tkiva.

Osim tkivnih uzoraka za daljnju analizu, ljubaznošću prof. dr. sc. Gorana Šimića dostupni su bili i podaci o volumenima regija i broju neurona u svakoj regiji hipokampalne formacije ovih tkivnih uzoraka: girus dentatus (GD), *Cornu Ammonis 2/3* (CA2/3), *Cornu Ammonis 1* (CA1), subikulum (SUB) (Tablica 4.1.1.1.2.). Osim podataka o broju neurona i volumenu regija, ljubaznošću prof. Šimića bili su dostupni i podaci o broju senilnih plakova i neurofibrilarnih snopića u regijama hipokampalne formacije.

Tablica 4.1.1.1.2. Uprosječeni rezultati volumena regija i broja neurona po regiji hipokampalne formacije kontrolnih uzoraka (N=6) i uzoraka zahvaćenih Alzheimerovom bolešću (N=6)

KONTROLE			ALZHEIMEROVA BOLEST		
Girus dentatus					
volumen sloja zrnatih stanica na Nissl preparatima (mm³)	ukupni broj zrnatih stanica (10 ⁶)	Broj neurona (10 ³) po mm ³	volumeni sloja zrnatih stanica na Nissl preparatima (mm ³)	ukupni broj zrnatih stanica (10 ⁶)	Broj neurona (10 ³) po mm ³
49.64 ± 17.52	9.92 ± 2.81	207.50 ± 45.94	41.59 ± 8.33	7.64 ± 2.07	185.17 ± 45.06
CA2/3					
volumen sloja na Nissl preparatima (mm³)	ukupni broj neurona (10 ⁶)	Broj neurona (10 ³) po mm ³	volumen sloja na Nissl preparatima (mm ³)	ukupni broj neurona (10 ⁶)	Broj neurona (10 ³) po mm ³
99.40 ± 21.02	1.97 ± 0.61	19.80 ± 4.45	81.93 ± 9.43	1.36 ± 0.36	16.58 ± 3.44
CA1					
volumen sloja na Nissl preparatima (mm³)	ukupni broj neurona (10 ⁶)	Broj neurona (10 ³) po mm ³	volumen sloja na Nissl preparatima (mm ³)	ukupni broj neurona (10 ⁶)	Broj neurona (10 ³) po mm ³
418.72 ± 199.83	5.99 ± 2.57	14.90 ± 2.37	424.51 ± 104.76	6.39 ± 2.48	14.80 ± 2.43
Subikulum					
volumen sloja na Nissl preparatima (mm³)	ukupni broj neurona (10 ⁶)	Broj neurona (10 ³) po mm ³	volumen sloja na Nissl preparatima (mm ³)	ukupni broj neurona (10 ⁶)	Broj neurona (10 ³) po mm ³
218.17 ± 71.41	3.30 ± 1.55	14.52 ± 2.86	264.81 ± 89.74	2.47 ± 1.13	9.30 ± 3.16

4.1.1.2. Uzorci moždanog tkiva miševa 5xFAD, mišjeg modela obiteljske Alzheimerove neurodegeneracije, i kontrolnih miševa

Moždano tkivo mišjeg modela za obiteljsku Alzheimerovu bolest ustupljeno je za istraživanje ljubaznošću prof. dr. Dirka Montaga iz Leibniz Institute for Neurobiology iz Magdeburga, Njemačka. Miševi 5xFAD (B6SJL-Tg(APP^{Sw}FILon,PSEN1*^{M146L}*^{286V})6799Vas/J) su nabavljeni od *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, SAD, broj 006554). Transgeni miševi 5xFAD su spareni sa ženkama C57BL6 za dobivanje sljedećih generacija. Generacija F2 potomaka je korištena za eksperimente. Svaka jedinka iz legla je genotipizirana. Svi eksperimenti su rađeni u skladu s direktivama za dobrobit eksperimentalnih životinja i odobreni od strane lokalnih vlasti Sachsen-Anhalt Njemačka (br. 42502/2-382 i -945) te provedeni u skladu s Direktivom Europskog vijeća od 24.11.1986. (86/609/EEC)

Miševi 5xFAD su transgenični miševi s mutacijama u genima za APP i PSEN1 (APP KM670/671NL (Swedish), APP I716V (Florida), APP V717I (London), PSEN1 M146L (A>C), PSEN1 L286V) (<http://www.alzforum.org/research-models/5xfad>). Model se uobičajeno koristi za istraživanja patofiziologije Alzheimerove bolesti jer miševi u ranoj dobi zbog intenzivne akumulacije toksičnog oligomera A β 42 i nakupljanja amiloidnih plakova pokazuju promjene povezane s AD-om. Model je razvijen 2006. godine (147) s ciljem ubrzanja stvaranja plakova i povećanja razine toksičnog A β 42. Dvostruki transgeni miševi koji istovremeno izražavaju pet mutacija pokazuju izrazito visoke razine A β 42 te se odlaganje amiloida i gliosa primjećuju već u dobi od 2 mjeseca.

Za analizu je korištena ukupno 51 životinja miševa 5xFAD i miševa divljeg tipa (34 za imunohistokemijsku analizu i 17 za biokemijsku analizu) oba spola različite starosti (3-15 mjeseci) (Tablica 4.1.1.2.1. i Tablica 4.1.1.2.2.). Životinje su grupirane u dvije skupine, skupinu u dobi od tri do šest mjeseci s ranim neurodegenerativnim promjenama i skupinu od deset do 15 mjeseci s izraženim neurodegenerativnim promjenama.

Za imunohistokemijsku analizu miševi 5xFAD i miševi divljeg tipa usklađeni po spolu i dobi anestetizirani su s izofluranom. Nakon toga je uslijedila transkardijalna perfuzija fosfatnim puferom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*) te 4% PFA (paraformaldehid) u PBS-u (2mL/min). Mozgovi su potom izvađeni i stavljeni u fiksativ (4% PFA u PBS-u) preko noći. Nakon toga je uslijedila krioprotekcija u otopinama saharoze u PBS-u: u 10%-tnoj saharozi

kroz 24h, 20%-tnoj saharozi kroz 24h pa 30%-tnoj saharozi kroz 24h. Potom su mozgovi smrznuti. Analizirani su koronarni rezovi debljine 40 μm različite udaljenosti od bregme, te sagitalni rezovi debljine 20 μm .

Tablica 4.1.1.2.1. s popisom miševa korištenih za imunohistokemijsku analizu

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

Miševi 5xFAD i divlji tip miševa (DT)

Za biokemijsku analizu ženke miševa 5xFAD i odgovarajuće kontrole različite starosti (3, 6, 10, 12 i 14 mjeseci) su anestetizirane izofluranom te potom dekapitirane. Mозgovi su izvađeni i podijeljeni na regije: korteks, hipokampus, mali mozak i preostalo tkivo. Nakon toga su uzorci brzo zamrznuti u tekućem dušiku te pohranjeni na -80°C prije daljnje analize. Regije jedne hemisfere su korištene za proteinsku, a druge za lipidomsku analizu.

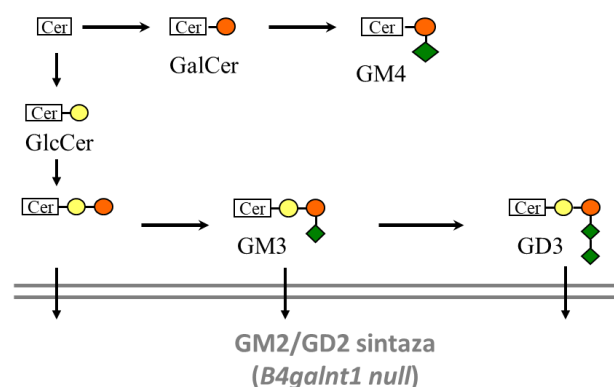
Tablica 4.1.1.2.2. s popisom miševa korištenih za biokemijsku analizu

5xFAD	DOB (mjeseci)	SPOL	DT	DOB (mjeseci)	SPOL
1	14	Ž	10	14	Ž
2	12	Ž			
3	10	Ž	11	10	Ž
4	6	Ž	12	6	Ž
5	6	Ž	13	6	Ž
6	6	Ž	14	6	Ž
7	3	Ž	15	3	Ž
8	3	Ž	16	3	Ž
9	3	Ž	17	3	Ž

5xFAD miševi i divlji tip miševa (DT)

4.1.1.3. Uzorci moždanog tkiva mišjih modela *B4galnt1 null* i *St3gal2/3 double null* s promijenjenim sastavom gangliozida i kontrolnih miševa

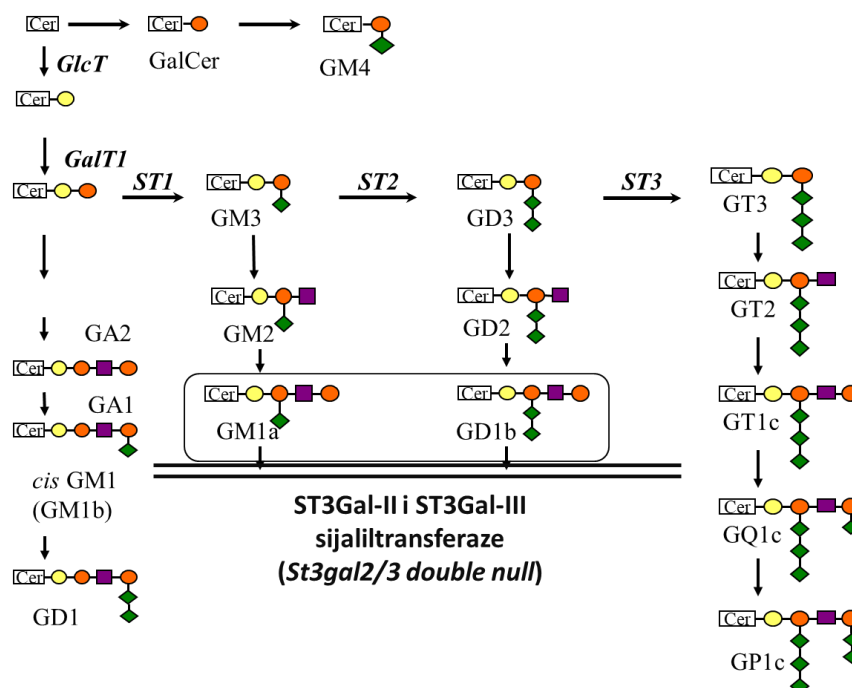
Moždano tkivo mišjih modela *B4galnt1 null* (KO) i *St3gal2/3 double null* (DKO) s poremećenom sintezom i posljedično promijenjenim sastavom gangliozida kao i njihovih odgovarajućih kontrola usklađenih po spolu i dobi ustupljeno je ljubaznošću prof. dr. Ronalda L. Schnaara iz Johns Hopkins University School of Medicine iz Baltimorea, Sjedinjene Američke Države. Miševima s nefunkcionalnim *B4galnt1* genom nedostaje enzim GM2/GD2-sintaza te zbog toga nemaju mogućnost sinteze kompleksnih gangliozida (Slika 4.1.1.3.1.), ali kod njih ukupna koncentracija sijalinskih kiselina vezanih za gangliozide ostaje nepromijenjena u usporedbi s miševima divljeg tipa radi nakupljanja jednostavnijih gangliozida (GM3 i GD3). Fenotipski ovi miševi starenjem pokazuju različite bihevioralne smetnje, degeneraciju aksona, neuropatije i deficite u refleksima, snazi, koordinaciji i ravnoteži. Također, mužjaci *B4galnt1 null* su infertilni (83, 170, 171).



Slika 4.1.1.3.1. Shematski prikaz prekida sinteze kompleksnih gangliozida zbog nedostatka GM2/GD2 sintaze.

Miševima *St3gal2/3 double null* nedostaju dvije α -2,3-sijaliltransferaze: ST3gal-II i ST3gal-III (Slika 4.1.1.3.2.) koje su odgovorne za terminalnu sijalilaciju, odnosno dodavanje sijalinske kiseline na vanjsku galaktozu. Posljedično, ovim miševima nedostaju gangliozidi GT1b i GQ1b, dok je GD1a prisutan u zanemarivim količinama. Kao kompenzaciju ovi miševi imaju povećanu količinu gangliozida GM1 i GD1b, tako da je i u ovih životinja ukupna količina gangliozida (odnosno sijalinskih kiselina vezanih za gangliozide) ista kao i u miševima divljeg tipa, ali je sastav bitno različit u usporedbi s miševima i divljeg tipa i miševima *B4galnt1 null*. Zbog toga su ovi sojevi izrazito pogodni za analizu utjecaja gangliozida na proteine od interesa. Fenotipski, *St3gal2/3 double null* miševi su znatno manji od miševa divljeg tipa,

imaju kratak životni vijek (do maksimalno 2 mjeseca starosti), infertilni su, te vrlo rano pokazuju različite motoričke deficite (87).



Slika 4.1.1.3.2. Shematski prikaz prekida sijalilacije terminalne galaktoze zbog nedostatka ST3Gal-II i ST3Gal-III sijaliltransferaza.

Za analizu proteina mužjaci *B4galnt1 null* i *St3gal2/3 double null* miševa i odgovarajuće kontrole različite starosti (2 i 6 mjeseci) (Tablica 4.1.1.3.1.) su anestetizirani izofluranom te potom dekapitirani. Mozgovi su izvađeni i podijeljeni na regije: korteks, hipokampus, mali mozak i preostalo tkivo. Nakon toga su uzorci brzo zamrznuti u tekućem dušiku te pohranjeni na -80°C za daljnju analizu. Korteksi i mali mozgovi su korišteni za proteinsku analizu.

Tablica 4.1.1.3.1. s popisom miševa korištenih za proteinsku analizu

#	GENOTIP	DOB (mjeseci)	SPOL
1	DT	2	M
2	DT	2	M
3	KO	2	M
4	KO	2	M
5	DKO	2	M
6	DKO	2	M
7	DT	5,5	M
8	DT	7	M
9	KO	6	M
10	KO	6	M

Divlji tip miševa (DT), *B4galnt1 null* (KO) i *St3gal2/3 double null* (DKO) miševi

4.1.1.4. Uzorci moždanog tkiva mišjeg modela bez mogućnosti sinteze proteina neuroplastina

Moždano tkivo miševa s nemogućnošću sinteze proteina neuroplastina i njihove odgovarajuće kontrole, odnosno miševi divljeg tipa ustupljeni su ljubaznošću prof. dr. Dirka Montaga iz Leibniz Institute for Neurobiology iz Magdeburga, Njemačka. Ukratko, postupak dobivanja miševa s nemogućnošću sinteze neuroplastina uključuje umetanje dva *lox* mjesta oko egzona gena neuroplastina koji kodira početak prepisivanja glasničke RNA u embrionalnim matičnim stanicama. Kimerični miševi su stvoreni injekcijom označenih embrionalnih matičnih stanica u blastocistu. Potomci koji su bili nosioci neuroplastinskog gena s *lox* mjestima su spareni s transgeničnim miševima koji ekspimiraju Cre rekombinantni gen pod kontrolom CMV promotora. Njihovi potomci nisu prevodili glasničku RNA kodiranu neuroplastinskim genom, koja je bila pod kontrolom Cre rekombinaze, odnosno nisu izražavali protein neuroplastin. Ti su potomci bez izražaja neuroplastina koji je bio pod kontrolom Cre rekombinaze križani s miševima koji nemaju transgen za Cre rekombinazu da bi se stvorili neuroplastinski heterozigoti (Np^{+/-}). Ti neuroplastinski heterozigoti (sa samo jednim alelom za sintezu neuroplastina) su međusobno križani da bi se dobili miševi bez ikakve sinteze neuroplastina (Np KO) i divlji tipovi (DT) (155).

Mišji mozgovi s nemogućnošću sinteze neuroplastina i odgovarajuće kontrole korištene su za lipidomsku i imunohistokemijsku analizu (Tablica 4.1.1.4.1.). Mozgovi za lipidomsku analizu su razdijeljeni na regije: korteks, mali mozak, hipokampus i preostalo tkivo.

Tablica 4.1.1.4.1. s popisom miševa korištenih za analizu

#	GENOTIP	DOB (mjeseci)	SPOL
1	DT	6	M
2	DT	6	M
3	DT	6	M
4	Np KO	6	M
5	Np KO	6	M
6	Np KO	6	M

Divlji tip miševa (DT) i miševi koji ne sintetiziraju neuroplastin (Np KO)

4.1.1.5. Primarne kulture štakorskih hipokampalnih i kortikalnih neurona

Priprema i uzgoj primarnih kultura provedena je u Leibniz Institute for Neurobiology u Magdeburgu u Njemačkoj pod mentorstvom prof. dr. Dirka Montaga i dr. sc. Rodriga Herrere-Moline. Štakorice soja Wistar su u vlasništvu LIN Magdeburg te su uzgajane u nastambi pod vodstvom prof. dr. Dirka Montaga. Za pripremu primarnih hipokampalnih i kortikalnih kultura neurona žrtvovane su štakorice trudne od 17 do 19 dana. Štakorice su anestetizirane izofluranom. Nakon dezinfekcije trbušne stijenke etanolom, rezom se pristupa u abdominalnu šupljinu do maternice. Štakorice su usmrćene zarezivanjem dijafragme i pluća. Maternica s fetusima se odvaja, a fetusi se izljušte iz stijenke maternice u posudu s pripremljenim puferom za disekciju (engl. *Hank's Balanced Salt Solution*, HBSS, bez dodatka Ca^{2+} i Mg^{2+}). Nakon toga, štakorski fetusi se dekapitiraju. Nakon dekapitacije, mozgovi se izljušte iz lubanje u novu posudu s puferom (HBSS, bez dodatka Ca^{2+} i Mg^{2+}). Pod mikroskopom se mozgovi diseciraju te se odvajaju hipokampus i korteks od ostalih regija mozga. Hipokampusi se prebacuju u medij HBSS s dodatkom 0,25 mg/mL tripsina te se inkubiraju 8 min na 37°C. Nakon toga se odlijeva pufer s tripsinom i dodaje medij (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's medium*, DMEM s dodatkom 10% konjskog seruma, 1% glutamina i 1% penicilin/streptomicina), a hipokampusi se usitnjavanju provlačenjem kroz staklenu pipetu prethodno spaljenom na plamenu (engl., *tip flame*). Nakon usitnjavanja iz homogenata se uzima mali volumen koji se miješa s bojiлом (5 μL tripanskog modrila s 20 μL stanica) te se stanice broje pod mikroskopom. Ovisno o željenoj gustoći rasta, određeni volumen homogenata se naseljava u jažice. Stanice se potom inkubiraju 1h na 37°C, a nakon toga se mijenja medij u Neurobasal s 1% glutaminom i 1% penicilin/streptomicinom. Sutradan se ponovno mijenja medij (istog sastava). Peti dan se mijenja samo 50% medija. Korteks se usitnjava rezanjem te se dodaje tripsin u medij HBSS (kao gore) i ostavlja se 10 min na 37°C. Nakon toga se zaustavlja djelovanje tripsina, a korteksi se usitnjavaju provlačenjem kroz staklenu pipetu. Nakon usitnjavanja iz homogenata se uzima mali volumen koji se miješa s bojiлом (kao gore) te se stanice broje pod mikroskopom. Ovisno o željenoj gustoći rasta, određeni volumen homogenata se naseljava u jažice ili u posude. Stanice se potom inkubiraju na 37°C, a mediji se mijenjaju kako je gore opisano.

Za analizu izražaja kompleksnih gangliozida i obje izoforme neuroplastina korištene su kortikalne i hipokampalne kulture starosti od šest do 42 dana.

4.1.2. Kemikalije, otopine, protutijela i laboratorijski potrošni materijal

Za imunohistokemijska i imunofluorescentna bojenja te za analizu proteina metodom *Western blot* korištena su različita primarna i sekundarna protutijela koja su navedena u Tablici 4.1.2.1.

Tablica 4.1.2.1. Popis svih korištenih protutijela

	Protutijelo	Proizvođač	Porijeklo:	
PRIMARNA	Np65	R&D Systems, goat anti-Np65, #AF5360	Koza	
	pNp	R&D Systems, sheep anti-hNp, #AF5174	Ovca	
	pPMCA	Abcam, mouse anti-pPMCA, #ab2825	Miš	
	GM1	Johns Hopkins, ustupljeno ljubaznošću prof. Schnaara	Miš	
	GD1a	Johns Hopkins, ustupljeno ljubaznošću prof. Schnaara	Miš	
	GD1b	Johns Hopkins, ustupljeno ljubaznošću prof. Schnaara	Miš	
	GT1b	Johns Hopkins, ustupljeno ljubaznošću prof. Schnaara	Miš	
	Flotilin	BD, mouse anti-Flot1, #610821	Miš	
	Transferin	Invitrogen, mouse anti-TfR, #13-6800	Miš	
Konjugirano s:				
SEKUNDARNA	Anti-goat	Jackson Immunoresearch, #705-065-003	Biotin	Magarac
	Anti-goat	Jackson Immunoresearch, #305-035-003	HRP	Zec
	Anti-sheep	Jackson Immunoresearch, #713-035-147	HRP	Magarac
	Anti-mouse	Jackson Immunoresearch, #715-035-150	HRP	Magarac
	Anti-goat	Jackson Immunoresearch, #705-175-147	Cy5	Magarac
	Anti-sheep	Jackson Immunoresearch, #713-165-003	Cy3	Magarac
	Anti-mouse	Jackson Immunoresearch, #715-545-150	488	Magarac
	Anti-mouse	Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, #AK-5002	Biotin	Konj
Tercijarni kompleks				
Tercijarni kompleks	Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, #AK-5002			

Za sve molekularne i biokemijske protokole korišteni su različiti puferi pripremljeni prema receptu ili kupovni puferi te potrošni materijal. Navedeni su u Tablici 4.1.2.2. i u Tablici 4.1.2.3.

Tablica 4.1.2.2. Popis otopina i pufera pripremljenih za imunohistokemijske, imunoblot i biokemijske analize

Naziv	Kratica	Sastav
Fosfatni pufer	PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Fosfatni pufer s dodatkom deterdženta	PBST	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 0,1% Tween-20
Homogenizacijski pufer za izolaciju proteina	<i>Raft</i> -pufer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , 1 mM PMSF, 5 mM NaF, 1mM NaVO ₄ , 1% otopina proteaznih inhibitora
Otopina za blokiranje	<i>Za Western blot</i>	5% mlijeko u prahu u 1x PBST
	<i>Za IHC gangliozida</i>	10% konjski serum, 1% BSA u 1x PBS
	<i>Za IHC proteina</i>	10% konjski serum u 0,5% Triton 1x PBS
Otopina za inhibiciju endogene peroksidazne aktivnosti tkiva	Predtretman	1% H ₂ O ₂ , 25 % (v/v) metanol
Otopina za krioprotekciju rezova	SOP-19 (de Olmos)	100 mM fosfatni pufer (pH 7,2), 30% w/v saharoza, 1% w/v PVP-40, 30% v/v etilen-glikol
Otopina za protokol određivanja koncentracije proteina prema Bradfordu	Bradfordov reagens	1% Coomassie plava boja, 5% (v/v) metanol, 8,5% (v/v) H ₃ PO ₄
Otopina za protokol određivanja koncentracije proteina prema Lowryju	Lowryjev reagens	0,005% CuSO ₄ , 0,02% K,Na-tartarat 2% Na ₂ CO ₃ u 0,1 M NaOH
Otopina za protokol određivanja koncentracije sijalinske kiseline prema Svennerholmu	Svennerholmov reagens	0,2% rezorcinol, 0,25 mM CuSO ₄ , 30% HCl
Pufer za demaskiranje antigena	Citratni pufer	9,5 mM limunska kiselina, pH = 6,0
Pufer za prenošenje proteina s gela na membranu	<i>Transfer</i> -pufer	25 mM Tris, 192 mM glicin, 20% (v/v) metanol
Pufer za razdvajanje proteina u električnom polju	<i>Running</i> -pufer	25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS

Tablica 4.1.2.3. Popis kemikalija, otopina i potrošnog materijala korištenog za biokemijske i molekularne metode i njihovi proizvođači

Naziv	Naziv proizvoda	Proizvođač
Albumin iz goveđeg seruma	BSA	Sigma Aldrich, #A7906
Anestetik	Isofluran CP	CP-Pharma, #798-932
Antibiotici za kulturu stanica	Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, #15140122
Boja za stanice	Tryptane Blue	Thermo Fisher Scientific, #15250061
Coomassie plava boja	Coomassie Brilliant Blue G-250,	United States Biochemical Corporation, FW 854.02, #32812
Detergent	Tween-20	Sigma, #P1379
Detergent	Triton x-100	Sigma, #9002-93-1
Detergent	Brij O20	Sigma, #A436240
Detergent	SDS	Sigma, #GE17-1313-01
Elektroforetski medij (gel)	TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 12%	Bio Rad, #1610185
Epruvete za ultracentrifugiranje	Za rotor 50.4 T _i	Beckman Coulter, #344088
	Za rotor SW 28.1 T _i	Beckman Coulter, #344061
Folinov reagens	Folin-Ciocalteu reagens, pro analysi	Kemika #0632504
Glutamin	L-glutamine	Thermo Fisher Scientific, # 25030081
Hidrofobna olovka	Pap pen	Vector Laboratories, #H-4000
Kit za vizualizaciju imunohistokemijskih rezova	Sigmafast DAB with metal enhancer	Sigma, #D0426-50
Kit za vizualizaciju imunohistokemijskih rezova	BCIP/NBT Substrate kit	Vector Laboratories, #SK-5400
Kit za vizualizaciju proteina	SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, #34095
Konjski serum	Horse serum	Gibco, Life Technologies, #16050-130
Medij (pločice) za tankoslojnu kromatografiju	HPTLC pločice	Merck, Silica gel 60, #1.05631.0001
Medij za pročišćavanje gangliozida	Sephadex G-25 fine	Sigma-Aldrich, #G2580
Medij za uzgoj primarnih kultura	DMEM	Thermo Fisher Scientific, #41966029
Medij za uzgoj primarnih neuronalnih kultura	Neurobasal	Gibco, Life Technologies, #21103-049

Membrana za prijenos proteina	PVDF membrana	Macherey-Nagel, Porablot PVDF, 0,20 µm, #741260
N-acetilneuraminska kiselina	NANA	Sigma-Aldrich, #01398
Polimer	PVP-40	Sigma, #234257
Proteazni inhibitori	cOplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche, #11836170001
Proteinski standard	Page Ruler	Thermo Fisher Scientific, #26616
Pufer za disekciju	HBSS	Thermo Fisher Scientific, #14170112
Pufer za pripremu proteina prije elektroforeze	Sample buffer	Invitrogen NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X), #NP0007
Pufer za pripremu proteina prije elektroforeze	Reducing buffer	Invitrogen NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X), #NP0009
Reagens za određivanje proteina metodom prema Lowryju	Folin-Ciocalteu reagens	Kemika, #0632504
Trypsin	Trypsin	Sigma, #59427C

4.2. METODE

- 1) Imunohistokemijska analiza preparata ljudske hipokampalne formacije
- 2) Histološko bojenje preparata ljudske hipokampalne formacije i rezova mišjeg mozga
- 3) Imunohistokemijsko bojenje rezova mišjeg mozga
- 4) Imunofluorescentno bojenje rezova mišjeg mozga
- 5) Svjetlosna mikroskopija, fotografiranje i skeniranje na skeneru visoke razlučivosti
- 6) Vizualizacija imunofluorescencije na konfokalnom mikroskopu
- 7) Analiza i interpretacija imunoreaktivnosti primjenom programa *ImageJ*
- 8) Izolacija membranskih proteina iz moždanog tkiva mišjih modela
- 9) Izolacija lipidnih splavi iz moždanog tkiva mišjih modela
- 10) Izolacija i kvalitativna analiza gangliozida iz moždanog tkiva mišjih modela
- 11) Mjerenje koncentracije proteina metodom prema Bradfordu i Lowryju
- 12) Analiza proteina metodom *Western blot* iz moždanog tkiva mišjih modela
- 13) Analiza i interpretacija proteinskog izražaja primjenom programa *Image Lab*
- 14) Imunofluorescentno bojenje primarnih neuronalnih kultura
- 15) Statistička analiza

4.2.1. Imunohistokemijska analiza preparata ljudske hipokampalne formacije

Prvi korak u imunohistokemijskoj analizi parafinskih rezova je deparafinizacija preparata serijom ispiranja preparata ksilolom i etanolom (apsolutni alkohol - dva ispiranja, 96%-tni, 70%-tni po jedno ispiranje) te kuhanjem u citratnom puferu (pH=6,0) radi demaskiranja antigena. Nakon deparafinizacije slijedi predtretman rezova s 1%-tnom otopinom vodikova peroksida kako bi se uklonila aktivnost tkivnih endogenih peroksidaza. Nespecifično vezanje protutijela sprječava se primjenom otopine za blokiranje koja sadrži 10%-tnu otopinu konjskog seruma i 0,5%-tni Triton u PBS-u. Primarno protutijelo na neuroplastin-65 koristilo se u razrijeđenju 1:100 u otopini za blokiranje te se inkubiralo preko noći na +4°C. Zatim je uslijedila inkubacija sa sekundarnim protutijelom konjugiranim s peroksidazom dobivenom iz hrena (HRP; od engl. *horse radish peroxidase*; 1:1000) 2h na sobnoj temperaturi. Slijedila je vizualizacija otopinom koja sadrži diaminobenzidin (DAB) prema uputama proizvođača te sušenje i pokrivanje preparata.

4.2.2. Histološko bojenje preparata ljudske hipokampalne formacije i rezova mišjeg mozga

Uzorci ljudske hipokampalne formacije i rezovi mozгова mišjih modela obojeni su metodom prema Nisslu koja se koristi za prikazivanje staničnih tijela neurona. Bojanje po Nisslu radi se s 0,5% otopinom krezil-violeta kroz nekoliko minuta. Nakon toga slijedi ispiranje u 70%-tnom etanolu s dodatkom octene kiseline, pa dehidracija u 70%-tnom, 96%-tnom i apsolutnom alkoholu te na kraju u ksilolu. Ovom metodom obojeni su rezovi paralelni s rezovima koji su korišteni za imunohistokemijsko bojanje kako bi se odredile citoarhitektonske granice pojedinih regija ljudske hipokampalne formacije te regija mišjeg mozga.

4.2.3. Imunohistokemijsko bojenje rezova mišjeg mozga

Sagitalni rezovi debljine 20 μm i koronarni rezovi debljine 40 μm su podvrgnuti imunohistokemijskom bojenju na stakalcima ili metodom slobodno-plivajućih (engl. *free-floating*) rezova, odnosno metodom u kojoj se rezovi inkubiraju s protutijelima u jažicama. Nakon ispiranja rezova u PBS-u, rezovi su inkubirani s 1% otopinom vodikova peroksida kako bi se uklonila aktivnost endogenih peroksidaza ukoliko je vizualizacija bila napravljena s DAB-om. Potom su blokirani u 10% konjskom serumu i 1% BSA 3h na +4°C za bojenje s protutijelima na gangliozide ili u 10% konjskom serumu, 0,1% Triton u PBS-u 1h na sobnoj temperaturi za bojenje s protutijelima na proteine. Primarna protutijela na gangliozide razrijeđena su u otopini za blokiranje (anti-GM1, 1:3000; anti-GD1a, 1:20 000; anti-GD1b 1:20 000 i GT1b 1:3000) te su rezovi inkubirani na +4°C preko noći. Protutijela na proteine (anti-pNp i anti-Np65) razrijeđena su u 10% konjskom serumu u PBS-u s 0,1% Tritonom u omjeru 1:100 te rezovi inkubirani preko noći na +4°C u vlažnoj komori. Nakon ispiranja rezovi su inkubirani u sekundarnom protutijelu (konjugiranim s biotinom) 3h na +4°C za primarna protutijela na gangliozide i Np65 ili 2h u sekundarnom protutijelu (konjugiranom s peroksidazom iz hrena) na sobnoj temperaturi za primarno protutijelo koje prepoznaje obje neuroplastinske izoforme. Sekundarna protutijela su razrijeđena u istim otopinama kao i primarna. Rezovi na kojima je provedena imunohistokemijska analiza gangliozida i Np65 su nakon sekundarnog protutijela inkubirani s tercijarnim kompleksom 2h na +4°C za gangliozide ili na sobnoj temperaturi za Np65. Nakon ispiranja vizualizacija je napravljena otopinom koja sadrži diaminobenzidin (DAB) prema uputama proizvođača (Sigma) ako je

sekundarno protutijelo sadržavalo peroksidazu iz hrena ili s kitom koji sadrži alkalnu fosfatazu ako je sekundarno protutijelo bilo vezano s biotinom. Rezovi su nakon toga isprani, navučeni na stakla, ukoliko se radilo o metodi slobodno-plutajućih rezova, i poklopljeni pokrovnica.

4.2.4. Imunofluorescentno bojenje rezova mozgovog mišjeg mozga

Koronarni rezovi debljine 40 μm su podvrgnuti imunofluorescentnom bojenju. Nakon kratke rehidracije rezova, rezovi su blokirani u 10% konjskom serumu 3h na sobnoj temperaturi. Protutijela na proteine (anti-pNp, 1:500; anti-Np65, 1:500 i anti-pPMCA 1:1000) razrijeđena su u 10% konjskom serumu u PBS-u s 0,1% Tritonom te su rezovi inkubirani tijekom dvije noći na $+4^{\circ}\text{C}$ u vlažnoj komori. Nakon ispiranja rezovi su inkubirani u odgovarajućim sekundarnim protutijelima razrijeđenima u istim otopinama kao i primarna. Sekundarna protutijela su konjugirana s različitim fluorescentnim bojama (Cy3, Cy5, 488). Nakon inkubacije u tamnoj komori tijekom 2 – 4 h rezovi su isprani u PBS-u, te inkubirani u tamnoj komori s PBS-om koji sadrži DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) da bi se obojile jezgre. Nakon 10 minuta rezovi su ponovno isprani u PBS-u te u dH_2O . Nakon ispiranja na rezove je nanesen medij za pokrivanje Mowiol te su rezovi pokriveni.

4.2.5. Svjetlosna mikroskopija, fotografiranje i skeniranje na skeneru visoke razlučivosti

Uzorci mišjeg mozga vizualizirani DAB-om analizirani su pod svjetlosnim mikroskopom Olympus AX70 Provis te fotografirani digitalnom kamerom Nikon DXM 1200 u programu Nikon ACT-1. Za fotografiranje rezova s malim povećanjem korištena je lupa Zeiss Discovery.V8 Stereo i kamera Zeiss AxioCam MRc 5, a slike su obrađene u javno dostupnom programu ZEN 2 lite. Uzorci ljudskog hipokampusa vizualizirani DAB-om skenirani su na skeneru visoke rezolucije (Hamamatsu NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan).

4.2.6. Vizualizacija imunofluorescencije na konfokalnom mikroskopu i kvantifikacija imunofluorescentne reaktivnosti rezova mišjeg mozga i primarnih kultura

Za potrebe vizualizacije imunofluorescencije na rezovima mozgova mišjih modela i njihovih kontrola te u kulturi primarnih neurona korišten je laserski konfokalni mikroskop Leica TCS SP5 Confocal dostupan u Leibniz Institute for Neurobiology.

Kvantifikacija imunofluorescencije rezova mišjeg mozga napravljena je u programu *ImageJ* za obradu digitalnih slika i fotografija (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Analiza kolokalizacije proteina i gangliozida u primarnim kulturama je napravljena računalno koristeći program *Imaris* (Bitplane) za analizu fotografija. Korištenje programa je bilo omogućeno u Leibniz Institute for Neurobiology.

4.2.7. Analiza i interpretacija imunohistokemijske reaktivnosti primjenom programa *ImageJ*

Semikvantitativna vizualna procjena imunoreaktivnosti ljudskih preparata pod svjetlosnim mikroskopom napravljena je od strane tri neovisna istraživača. Svi preparati su podijeljeni u regije: dentatni girus (DG, od engl. *dentate gyrus*), CA1, CA2/3 (od lat. *Cornu Ammonis*) i subikulum (SUB) te u njihove podslojeve uz orijentaciju prema paralelnim rezovima obojanim Nisslovim bojenjem.

Dodatna analiza imunoreaktivnosti napravljena je korištenjem programa *ImageJ* za obradu digitalnih slika i fotografija koji je javno dostupan program (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Ukratko, svi preparati su podijeljeni u regije: DG, CA1, CA2/3 i SUB. Nakon kalibracije slika uz pomoć *step tablet* predložka prema uputama *ImageJ* programa, u svim regijama je mjerena integrirana optička gustoća imunoreaktivnosti, minimalno 20 mjerenja po regiji koje je kasnije uprosječeno. Sva mjerenja su korigirana za integriranu optičku gustoću negativnog bojenja (npr. regija fimbrije u svakom preparatu). Nakon toga preparati su grupirani u kontrolnu skupinu i skupinu oboljelih od Alzheimerove bolesti te su međusobno uspoređivane hipokampalne regije.

Semikvantitativna vizualna procjena imunoreaktivnosti preparata mozgova mišjih modela i odgovarajućih kontrola napravljena je pod svjetlosnim mikroskopom.

4.2.8. Izolacija membranskih proteina iz moždanog tkiva mišjih modela i kontrolnih divljih tipova

Svi koraci su provedeni na ledu ili u hladnoj komori. Svi uzorci su izvagani te nakon toga homogenizirani s 30 potisaka u Potter-Elvehjem staklenom homogenizatoru s teflonskim tučkom u homogenizacijskom puferu s 0,32M saharozom i proteaznim inhibitorima (1%-tni koktel proteaznih inhibitora, 5mM NaF, 1mM PMSF, 1mM NaVO₄). Nakon toga uzorci su centrifugirani na 1000 g u centrifugi Hettich Universal 32R na +4°C. Supernatant je korišten za daljnju analizu, dok je talog bačen. Supernatant je prebačen u epruvete za ultracentrifugu. Uzorci su ultracentrifugirani na 100 000 g u ultracentrifugi Beckman Optima XL-80 K u rotoru 50.4 Ti, 40 minuta na +4°C. Tim postupkom se u supernatantu odvajaju citosolni proteini koji se uskladište na -20°C. Talogu koji sadržava membranske proteine dodan je homogenizacijski pufer s 1%-tnim detergentom Brij O20 i svim proteaznim inhibitorima u koncentracijama kako je gore opisano. Talog je ponovno homogeniziran u Potter-Elvehjem staklenom homogenizatoru s teflonskim tučkom, s 15 potisaka. Uzorci su potom pohranjeni na -20°C.

4.2.9. Izolacija lipidnih splavi iz moždanog tkiva mišjih modela i miševa divljeg tipa

Nakon izolacije membranskih proteina kako je opisano u gornjem odjeljku i resuspendiranja taloga u homogenizacijskom puferu s detergentom i proteaznim inhibitorima, talog je pomiješan s istim volumenom 85% saharoze u homogenizacijskom puferu koji sadržava 1%-tni Brij O20 i prebačen u epruvete za ultracentrifugiranje. Taj sloj je nadliven 35% otopinom saharoze u homogenizacijskom puferu koji sadržava 1%-tni Brij O20. Zadnji sloj je sadržavao 3% otopinu saharoze u homogenizacijskom puferu koji sadržava 1%-tni Brij O20. Nakon toga uzorci su ultracentrifugirani na 141000 g u ultracentrifugi Beckman Optima XL-80 K u rotoru SW 28 18 sati na +4°C. Nakon ultracentrifugiranja skupljeno je 11 frakcija, odozgo prema dolje te su specifični proteinski biljezi frakcija splavi i ne-splavi potvrđeni metodom *Western blot*.

4.2.10. Izolacija i kvalitativna analiza gangliozida iz moždanog tkiva mišjih modela i kontrolnih divljih tipova

Izolacija gangliozida i kvalitativna analiza gangliozida provedena je na tkivnim uzorcima mišjeg mozga prema uvriježenom protokolu (172). Izolacija se provodi dodavanjem različitih

omjera organskih otapala (kloroforma i metanola) vodenom homogenatu uzorka, a potom se gangliozidi odjeljuju faznom particijom. Ukratko, svi tkivni uzorci su izvagani te prebačeni u Potter-Elvehjem homogenizator. Napravljen je 10%-tni vodeni homogenat s 20 potisaka teflonskim tučkom. Na homogenat su dodani dvostruko destilirani metanol i kloroform, do konačnog volumnog omjera kloroform:metanol:voda=1:2:0,75. Uzorci su ostavljeni preko noći na sobnoj temperaturi. Drugi dan uzorci su centrifugirani u centrifugi Kontron Centrikon T-42 K 20 min na +4°C na 3500 rpm te je supernatant odvojen u čiste staklene epruvete. Na supernatantu je provedena fazna particija dodavanjem vode i kloroforma prema pravilu: za svakih dodanih 6 mL kloroforma i metanola u omjeru 1:2 dodaje se 2,5 mL vode i 2 mL kloroforma. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi preko noći odvojen je gornji sloj koji sadrži gangliozide u čiste staklene epruvete. Da bi se provela reparticija na talog su dodani kloroform, metanol i voda po pravilu: za svakih 6 mL dodanih kloroforma i metanola u omjeru 1:2 u prvom koraku, sada je dodano 1 mL kloroforma, 1 mL metanola i 0,7 mL vode. Nakon inkubacije preko noći gornji sloj s gangliozidima je dodan onome koji je odvojen dan ranije. Uslijedio je postupak pročišćavanja izoliranih gangliozida gel-filtracijskom kromatografijom. Ukratko, upareni uzorci su otopljeni u 100 µL otopine koja je sadržavala kloroform, metanol i vodu u omjeru 60:30:4,5. Za gel-filtracijsku kromatografiju je korištena kolona volumena 1 mL pripremljena s gelom Sephadex G-25 fine. Uzorci su nakon nanošenja na kolonu eluirani s 5 mL otapala (kloroform:metanol:voda u omjeru 60:30:4,5). Tako pročišćeni uzorci su konačno upareni u struji zraka, i uparci korišteni za daljnje analize. Kvalitativna analiza gangliozida provedena je primjenom tankoslojne kromatografije visoke razlučivosti (HPTLC, engl. *High performance thin layer chromatography*). Udio pojedinih gangliozidnih frakcija razdvojenih kromatografijom je dodatno kvantificiran primjenom računalnog programa *ImageJ*.

4.2.10.1. Određivanje koncentracije sijalinskih kiselina vezanih za gangliozide metodom prema Svennerholmu

Koncentracija sijalinske kiseline u uzorku određuje se spektrofotometrijski metodom prema Svennerholmu (173), korištenjem Svennerholmovog reagensa (rezorcinol-HCl). Za baždarni pravac, u 200 µL otopine različite koncentracije sijalinske kiseline (10-100 µg/mL) dodano je po 200 µL Svennerholmovog reagensa. Suhi ekstrakt pročišćenih ukupnih gangliozida je

otopljen u smjesi otapala (kloroform:metanol:voda = 60:30:4,5). Od toga je uzet ekvivalent ukupnih gangliozida sadržanih u 10 mg mase svježeg tkiva u duplikatu. Nakon isparavanja otapala, uparak je otopljen u 200 mL dH₂O te je na to dodano 200 µL Svennerholmovog reagensa. Uzorci i standardi su potom kuhani u vodenoj kupelji (100°C) 20 min. Nakon hlađenja dodan je po 1 mL butanol/butilacetata (u omjeru 15:85). Nakon kratkog miješanja uzorci su centrifugirani 2 min na 2500 rpm. Za određivanje koncentracije sijalinske kiseline u uzorcima gornji sloj je odvojen u kvarcne kivete te je izmjerena apsorbancija na 580 nm. Nakon uprosječenja rezultata apsorbancije, koncentracija sijalinske kiseline u svakom uzorku je određena iz jednadžbe baždarnog pravca.

4.2.10.2. Tankoslojna kromatografija visoke razlučivosti (HPTLC)

Tankoslojna kromatografija visoke razlučivosti koristi se za kvalitativnu analizu gangliozidnog sastava u uzorku. Pločica za HPTLC se označi i ispere u smjesi otapala kloroform:metanol:voda=50:40:10. Nakon sušenja pločica se aktivira na 120°C 15 min. Uzorci gangliozida su otopljeni u smjesi otapala kloroform:metanol:voda=60:30:4,5 da se postigne koncentracija koja bi odgovarala masi svježeg moždanog tkiva 0,5 mg/µL. Na pločicu je potom nanesen volumen koji bi odgovarao 10 mg moždanog tkiva ili 2 µg sijalinske kiseline. Pločica se nakon sušenja razvija u smjesi otapala kloroform:metanol:0,2% CaCl₂ = 10:8:2. Nakon sušenja pločica se prska Svennerholmovim reagensom koji u reakciji sa sijalinskom kiselinom na temperaturi oko 120°C razvija ljubičasto obojenje.

4.2.11. Određivanje koncentracije proteina metodom prema Bradfordu i Lowryju

Za određivanje koncentracije proteina metodom prema Bradfordu (174) koristi se Bradfordov reagens. 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 otopljeno je u 50 mL metanola, nakon čega se dodaje 100 mL fosfatne kiseline. Ta je otopina dodana u 850 mL destilirane vode i ukupni volumen tako pripremljene otopine filtriran je prije upotrebe. Ta je otopina dodana u 850 mL destilirane vode te je sve filtrirano prije upotrebe. Za baždarni pravac, u 25 µL otopine različite koncentracije proteina BSA (0-1000 µg/mL) dodano je po 1,25 mL Bradfordovog reagensa i smjesa je inkubirana na sobnoj temperaturi 15 – 60 min. Za određivanje koncentracije proteina u uzorku po 5 µL svakog uzorka je pomiješano s 20 µL dH₂O, a na to je dodano 1,25 mL Bradfordovog reagensa. Nakon inkubacije od 15 – 60 min

izmjerena je apsorbancija na 595 nm. Nakon uprosječenja rezultata apsorbancije, koncentracija proteina u svakom uzorku je određena iz jednadžbe baždarnog pravca.

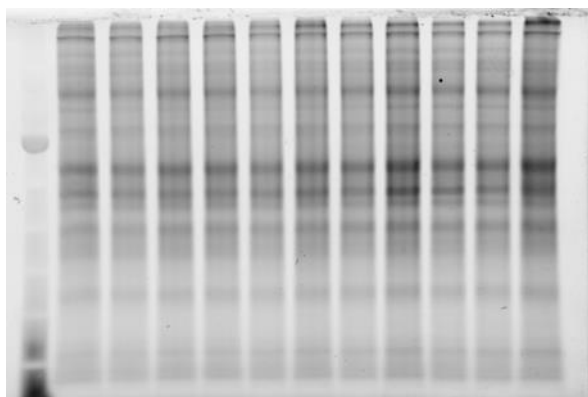
Za određivanje koncentracije proteina metodom prema Lowryju (175), pripremljen je Lowryjev reagens miješanjem 2%-tnog Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH, s 0,5%-tnim CuSO_4 i 2%-tnim K,Na-tartarat u omjeru 100:1:1. Za baždarni pravac u 200 μL otopine različite koncentracije proteina BSA (0-1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dodano je po 2 mL Lowryjevog reagensa i smjesa je inkubirana na sobnoj temperaturi 15 min. Za određivanje koncentracije uzoraka po 10 μL svakog uzorka je pomiješano s 190 μL dH_2O , a na to je dodano 2 mL Lowryjevog reagensa i smjesa je inkubirana na sobnoj temperaturi 15 min. Nakon toga na sve standarde i uzorke je dodano po 200 μL Folinovog reagensa razrijeđenog s vodom u omjeru 1:2. Nakon inkubacije 30 min na sobnoj temperaturi mjerena je apsorbancija na 515 ili 750 nm ovisno o očekivanoj koncentraciji proteina. Nakon uprosječenja rezultata apsorbancije, koncentracija proteina u svakom uzorku je određena iz jednadžbe baždarnog pravca.

4.2.12. Analiza proteina iz moždanog tkiva mišjih modela metodom *Western blot*

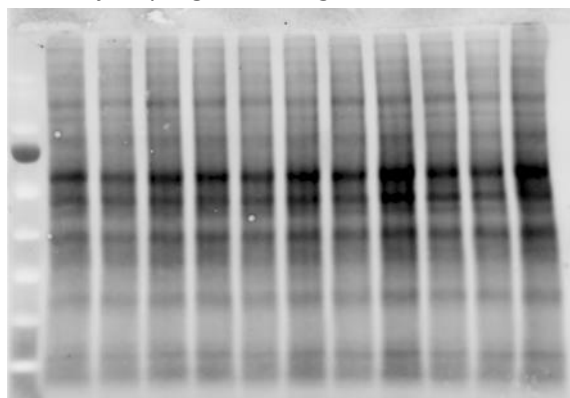
Nakon mjerenja koncentracije membranskih proteina u svaku jažicu medija (gela) za elektroforezu nanosena je jednaka masa proteina (20 – 30 μg , ovisno o tkivu) kao i marker veličine proteina. Nakon provedene SDS-PAGE elektroforeze (engl., *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) u puferu za razdvajanje proteina u električnom polju na 120 V u trajanju od 1 h i 10 minuta na sobnoj temperaturi, razdvojeni proteini su preneseni na PVDF (engl., *polyvinylidene difluoride*) membranu aktiviranu metanolom koja se nalazila između slojeva spužvi i filter papira. Prijenos na membranu je proveden u puferu za transfer tijekom 1 h na 30 V. Nakon prijenosa na membranu uslijedio je postupak imunodetekcije. Nespecifične reakcije blokirane su otopinom 5% mlijeka u prahu u PBST-u, nakon čega je slijedila inkubacija s primarnim protutijelom (neuroplastinske izoforme, pPMCA, transferinski receptor, flotilin) preko noći na $+4^\circ\text{C}$. Nakon ispiranja uslijedila je inkubacija s odgovarajućim sekundarnim protutijelom konjugiranim s peroksidazom iz hrena. Vizualizacija je provedena korištenjem seta kemikalija za kemiluminiscentnu detekciju prema uputama proizvođača, a produkt reakcije je vizualiziran korištenjem Biorad Chemidoc sustava i slike su sačuvane u digitalnom obliku.

4.2.13. Analiza i interpretacija proteinskog izražaja primjenom programa *Image Lab*

Gelovi BioRad TGX Stain-Free FastCast zbog svog jedinstvenog sastava ne zahtijevaju dodatnu detekciju proteina koji ne mijenjaju svoj izražaj (tzv. *housekeeping* proteini, npr. aktin, tubulin), odnosno kontrolu nanošenja količine proteina u jažice gela. Ovi gelovi se nakon elektroforeze proteina aktiviraju na Biorad Chemidoc sustavu, odnosno fluorescentno se detektiraju triptofanski ostaci svih proteina u gelu na koje su vezane trihalo-komponente iz gela (176) (Slika 4.2.13.1.). Nakon transfera, svi proteini preneseni na membranu se vizualiziraju na Biorad Chemidoc sustavu (Slika 4.2.13.2.). Ova fotografija membrane se kasnije koristi za normalizaciju i kvantifikaciju proteina od interesa.



Slika 4.2.13.1. Reprezentativni prikaz gela TGX Stain-Free FastCast nakon aktivacije. Vizualizirano u sustavu BioRad Chemidoc korištenjem programa *Image Lab*.



Slika 4.2.13.2. Reprezentativni prikaz membrane PVDF nakon transfera proteina. Vizualizirano u sustavu BioRad Chemidoc korištenjem programa *Image Lab*.

Analiza izražaja proteina napravljena je u programu *Image Lab* 6.0 koji je javno dostupan (<http://www.bio-rad.com/en-hr/product/image-lab-software?ID=KRE6P5E8Z>).

Program *Image Lab* je kompatibilan sa sustavom Biorad Chemidoc za vizualizaciju proteina.

4.2.14. Imunofluorescentno bojenje primarnih neuronalnih kultura

Imunofluorescencija živih (nefiksiranih) neurona moguća je ukoliko protutijela za proteine ili gangliozide od interesa prepoznaju izvanstaničnu membransku domenu proteina. Protokol započinje dodavanjem primarnih protutijela u medij u kojem se nalaze neuroni, a koji također služi kao otopina za blokiranje (sadrži 1% konjski serum i 1% glutamin u Neurobasal mediju). Protutijela za neuroplastine su dodana u razrjeđenju 1:200, a za gangliozide 1:200 – 1:1000. Nakon inkubacije od 20 min na 37°C neuroni su isprani u mediju te inkubirani sa sekundarnim protutijelom konjugiranim s različitim fluorescentnim bojama tijekom 20 min na 37°C. Nakon toga slijedilo je ispiranje sekundarnog protutijela te fiksacija neurona s 4% PFA 8 min na 37°C. Nakon ispiranja u PBS-u, neuroni su inkubirani s PBS-DAPI 10 min radi bojenja jezgri. Nakon ponovnog ispiranja u PBS-u, pokrovnice s neuronima su uz pomoć Mowiol-a prebačene na predmetna stakla prije sušenja i vizualizacije.

4.2.15. Statistička analiza

Prikupljeni podatci prikazani su opisnom statistikom, grafički i tabelarno. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD, od engl., *Standard deviation*). Vrijednost $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom.

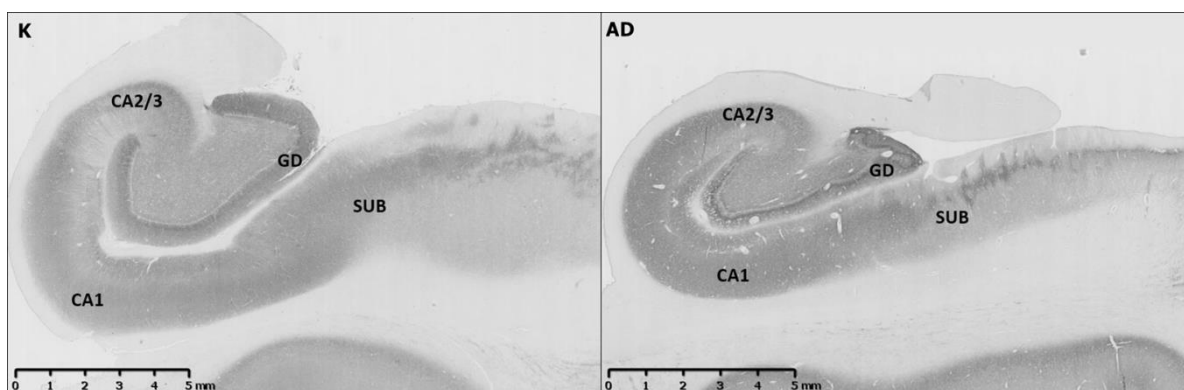
Normalnost distribucije podataka provjerena je Shapiro–Wilkovim testom. Za analizu promjene izražaja neuroplastina u mišjim modelima te u ljudskim uzorcima korišten je Studentov t-test. Kod usporedbe izražaja imunoreaktivnosti neuroplastina između kontrolne skupine i AD s različitim trajanjem bolesti (manje od četiri i više od pet godina) korišten je test One-Way ANOVA s Tukey post-hoc analizom. Kod provjere povezanosti varijabli korištena je Pearsonova korelacija.

Cijela statistička obrada rađena je u statističkom programu IBM SPSS (IBM Analytics, New York, NY, SAD).

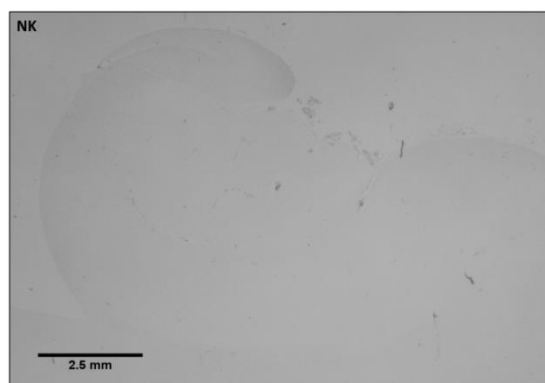
5. REZULTATI

5.1. Imunohistokemijski izražaj proteina neuroplastina promijenjen je u hipokampalnoj formaciji osoba sa sporadičnom Alzheimerovom bolešću u usporedbi s kontrolama

Imunoreaktivnost neuroplastinske izoforme specifične za moždano tkivo (Np65) analizirana je u regijama hipokampalne formacije (GD, CA1, CA2/3, SUB) zahvaćene Alzheimerovom patologijom i odgovarajućim kontrolnim uzorcima (Slika 5.1.1.). Tablica 5.1.1. prikazuje rezultate semikvantitativne analize intenziteta imunoreaktivnosti Np65 u regijama i podslojevima hipokampusu. Reprezentativni prikaz ekvivalenta integrirane optičke gustoće oznakama intenziteta signala prikazan je u Tablici 5.1.2. Sveukupni izražaj neuroplastina je jači u svim regijama hipokampalne formacije zahvaćene neuropatološkim promjenama specifičnim za AD. Prilikom analize podslojeva primijećena je najveća razlika u molekularnom sloju dentatnog girusa. Jača imunoreaktivnost je izražena u piramidnom sloju CA1 regije AD uzoraka u odnosu na kontrole. Reaktivnost po regijama je najslabija u subikulumu, ali je u AD uzorcima u piramidnom sloju SUB jače izražena nego u kontrolnim uzorcima.



Slika 5.1.1. Reprezentativni prikaz imunohistokemijskog izražaja neuroplastina u hipokampalnom tkivu bez znakova Alzheimerove patologije (K) i hipokampalnom tkivu zahvaćenom Alzheimerovom patologijom (AD). GD – girus dentatus, CA – *Cornu Ammonis*, SUB – subikulum. Oznaka veličine: 5 mm.







Slika 5.1.2. Reprezentativni prikaz negativne kontrole (NK). Imunohistokemijsko bojenje bez dodavanja primarnog protutijela koje prepoznaje neuroplastin. Oznaka veličine: 2,5 mm.

Tablica 5.1.1. Semikvantitativna analiza imunoreaktivnosti neuroplastina u hipokampalnoj formaciji u Alzheimerovoj bolesti i kontrolnom tkivu

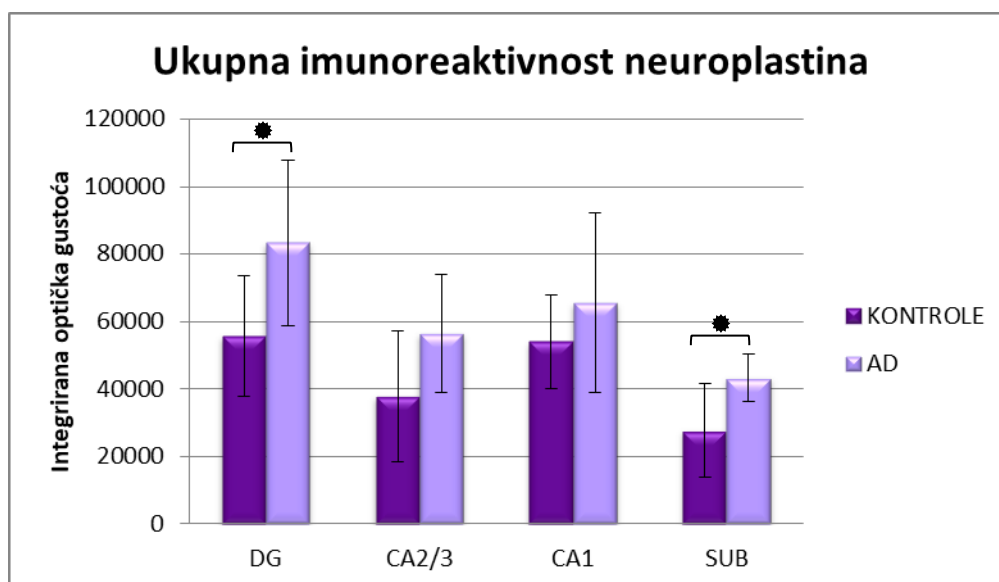
Hipokampalna regija	Podsoj	Kontrole	Alzheimerova bolest
Girus dentatus	I stratum moleculare	++	++/+++
	II stratum granulosum	++	++
	III stratum plexiforme	+	++
CA2/3	Ia stratum moleculare	0/+	0/+
	Ib stratum lacunosum	+	+ / ++
	Ic stratum radiatum	+	++
	II stratum pyramidale	+ / ++	++
	III stratum oriens	0/+	0/+
CA1	Ia stratum moleculare	0/+	0/+
	Ib stratum lacunosum	+	+ / ++
	Ic stratum radiatum	+ / ++	++
	II stratum pyramidale	++	++ / +++
	III stratum oriens	0/+	0/+
Subikulum	I stratum plexiforme	0	0
	II stratum pyramidale parvocellulare	+	++
	III stratum pyramidale magnocellulare	+	+
	IV stratum pyramidale profundum	0/+	+
	V stratum polymorfe	0/+	0/+

Intenzitet signala: 0 – nema imunoreaktivnosti; + slaba imunoreaktivnost; ++ srednja imunoreaktivnost; +++ jaka imunoreaktivnost.

Tablica 5.1.2. Prikaz ekvivalenta integrirane optičke gustoće i oznake intenziteta signala

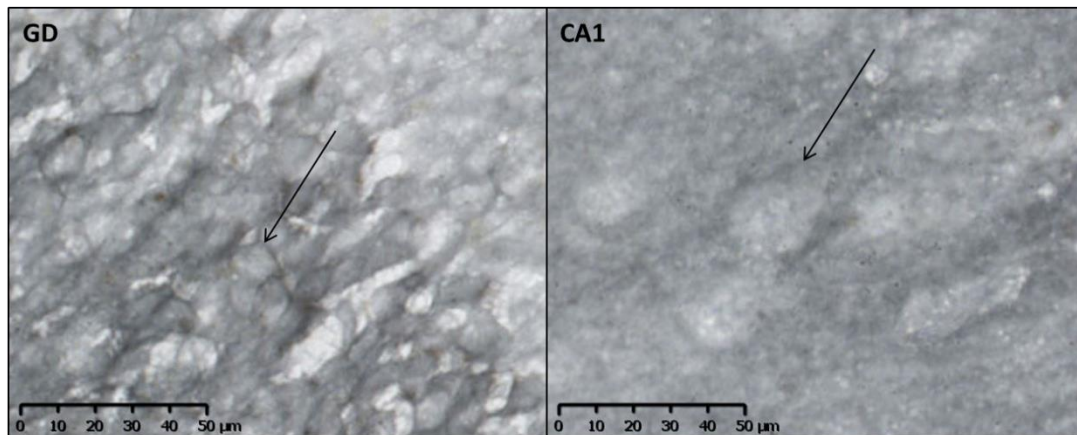
Gradijent integrirane optičke gustoće	Intenzitet signala	Opis
	0	nema imunoreaktivnosti
	+	slaba imunoreaktivnost
	++	srednja imunoreaktivnost
	+++	jaka imunoreaktivnost

Dodatna računalna kvantifikacija ukupne imunoreaktivnosti neuroplastina potvrdila je semikvantitativnu analizu. Mjerena je optička gustoća imunoreaktivnosti svih uzoraka te su uspoređivane regije hipokampalne formacije. Izražaj neuroplastina je veći u svim regijama zahvaćenima AD patologijom, a razlika je statistički značajna u regiji girusa dentatusa i subikuluma (Studentov t -test, $p < 0,05$) (Slika 5.1.3.).



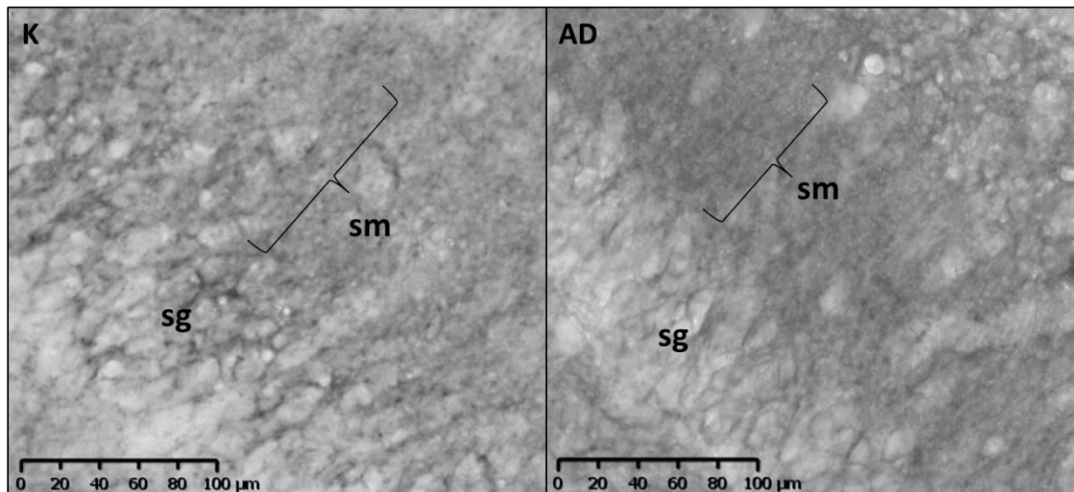
Slika 5.1.3 Grafički prikaz optičke gustoće imunoreaktivnosti neuroplastina po hipokampalnim regijama u kontrolnim uzorcima (N=6) i uzorcima zahvaćenim Alzheimerovom patologijom (AD) (N=6). Zvezdica označava statistički značajnu razliku utvrđenu t -testom ($p < 0,05$); DG = dentatni girus, CA = *Cornu Ammonis*, SUB = subikulum

Lokalizacija neuroplastina, prema ovom imunohistokemijskom bojenju, je dominantno na membranama neurona i u neuropilu. Zbog toga je imunoreaktivnost najizraženija u podslojevima regija u kojima se nalaze tijela piramidnih neurona i granularnih stanica (*stratum pyramidale* CA1, CA2/3 i subikuluma te *stratum granulare* girusa dentatusa), ali i u podsloju GD u kojem su dendriti granularnih stanica (*stratum moleculare*) (Tablica 5.1.1. i Slika 5.1.4).



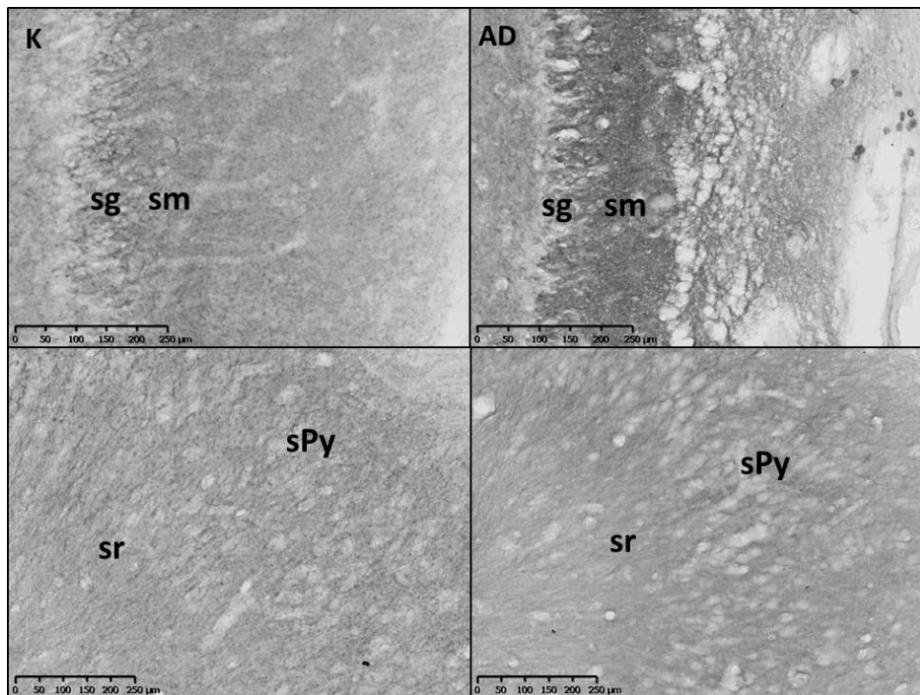
Slika 5.1.4. Membranska lokalizacija neuroplastina (prikazana strelicama) u granularnom sloju girusa dentatusa, (GD-lijeva) i piramidnom sloju CA1 regije (desno). Kontrolni uzorak. Uvećanje 40x. Oznaka veličine: 50 μm .

Nakon analize podslojeva primijećeno je da je pojačanje imunoreaktivnosti neuroplastina u girusu dentatusu u AD dominantno na račun molekularnog sloja (*stratum moleculare*) u kojem se nalaze dendriti neurona granularnog sloja, odnosno podsloj u kojem sinaptički završavaju aksoni prvog neurona trisinaptičkog puta (Slika 5.1.5.).

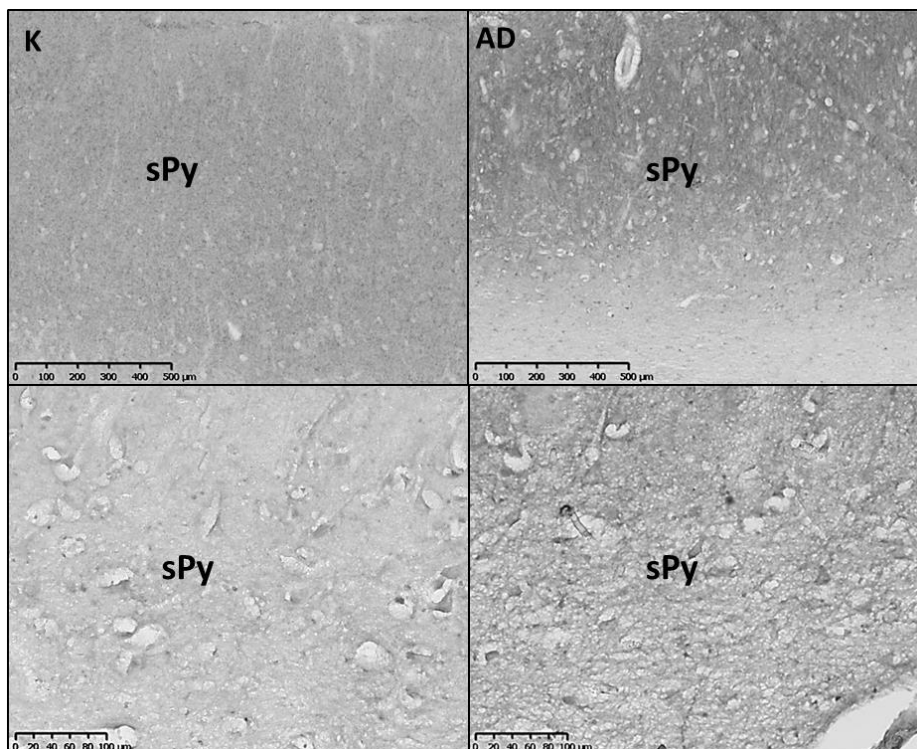


Slika 5.1.5. Prikaz imunoreaktivnosti neuroplastina u podslojevima dentatnog girusa, usporedba kontrolnog uzorka (K) i uzorka zahvaćenog Alzheimerovom patologijom (AD). Sg – *stratum granulare*; sm – *stratum moleculare*. Uvećanje 20x. Oznaka veličine: 100 μm .

Pojačana imunoreaktivnost u regijama *Cornu Ammonisa* i subikuluma u Alzheimerovoj bolesti primijećena je upravo u podslojevima u kojima se nalaze tijela neurona (*stratum pyramidale*) (Slike 5.1.6. i 5.1.7.).



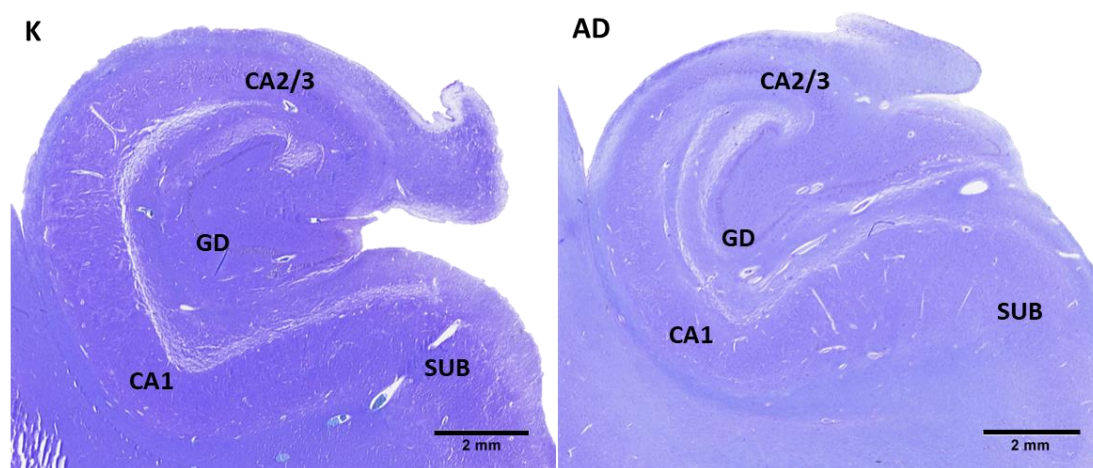
Slika 5.1.6. Uvećani prikaz imunoreaktivnosti neuroplastina u hipokampalnom tkivu bez znakova Alzheimerove patologije (K) i hipokampalnom tkivu zahvaćenom Alzheimerovom patologijom (AD). Područje girusa dentatusa (gore) i CA2/3 regije (dolje). Oznaka veličine: 250 μm , sg = *stratum granulare*; sm = *stratum moleculare*; sr = *stratum radiatum*; sPy = *stratum pyramidale*.



Slika 5.1.7. Uvećani prikaz imunoreaktivnosti neuroplastina u hipokampalnom tkivu bez znakova Alzheimerove patologije (K) i hipokampalnom tkivu zahvaćenom Alzheimerovom patologijom (AD). Područje CA1 (gore) i subikuluma (dolje). Oznaka veličine: 500 μm (gore); 100 μm (dolje). sPy = *stratum pyramidale*.

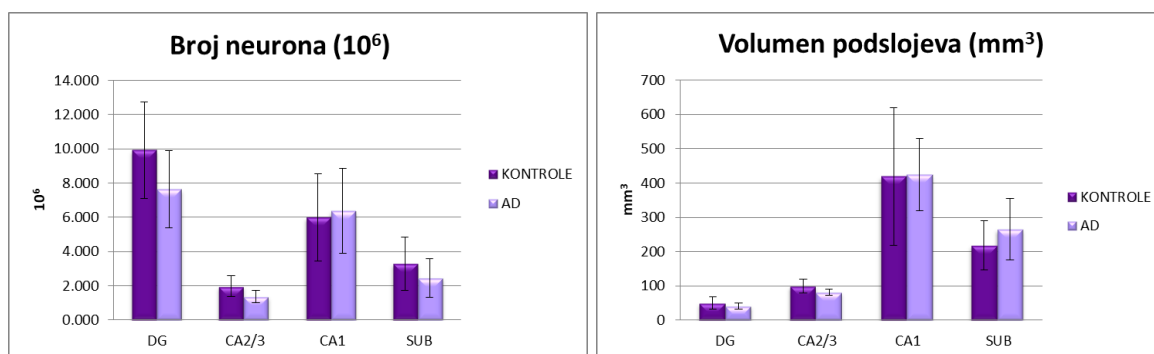
Obrazac intenziteta imunoreaktivnosti neuroplastina u normalnom ljudskom hipokampusu opisan u literaturi (159) od najjače izraženosti u CA1 regiji, zatim GD pa CA2/3 te SUB u Alzheimerovoj je bolesti djelomično izmijenjen: $GD > CA1 > CA2/3 > SUB$ zbog povećane imunoreaktivnosti neuroplastina u dentatnom girusu.

Histološko bojenje metodom prema Nisslu rezova paralelnih rezovima bojenih imunohistokemijskim bojenjem (Slika 5.1.8.) korišteno je radi prikaza citoarhitektonike hipokampalne formacije. Ovi rezovi su korišteni za određivanje i razlikovanje regija hipokampalne formacije.



Slika 5.1.8. Reprezentativni prikaz citoarhitektonike hipokampalnog tkiva bez znakova Alzheimerove patologije (K) i hipokampalnog tkiva zahvaćenog Alzheimerovom patologijom (AD) metodom bojenja po Nisslu. GD – girus dentatus, CA – *Cornu Ammonis*, SUB – subikulum. Oznaka veličine: 2 mm.

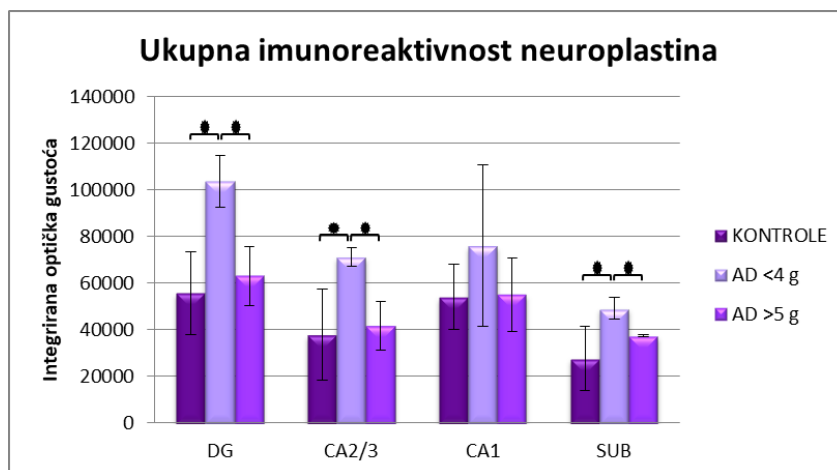
Usporedbom podataka o broju neurona po regijama i volumenu regija koji su koji su bili dostupni ljubaznošću prof. dr. sc. Gorana Šimića (Tablica 4.1.1.1.2.) nije pokazana statistički značajna razlika između broja neurona i volumena regija između uzoraka hipokampusa zahvaćenih Alzheimerovom patologijom i kontrolnih uzoraka (Slika 5.1.9.). Ovime se posredno pokazuje da promjena izražaja neuroplastina nije posljedica promjene broja ili volumena regija hipokampusa, već najvjerojatnije posljedica njegove povećane sinteze u Alzheimerovoj bolesti.



Slika 5.1.9. Grafički prikaz broja neurona (lijevo) i volumena podslojeva (desno), usporedba kontrolnih uzoraka i uzoraka zahvaćenih Alzheimerovom bolešću (AD). Podaci iz Tablice 4.1.1.1.2.

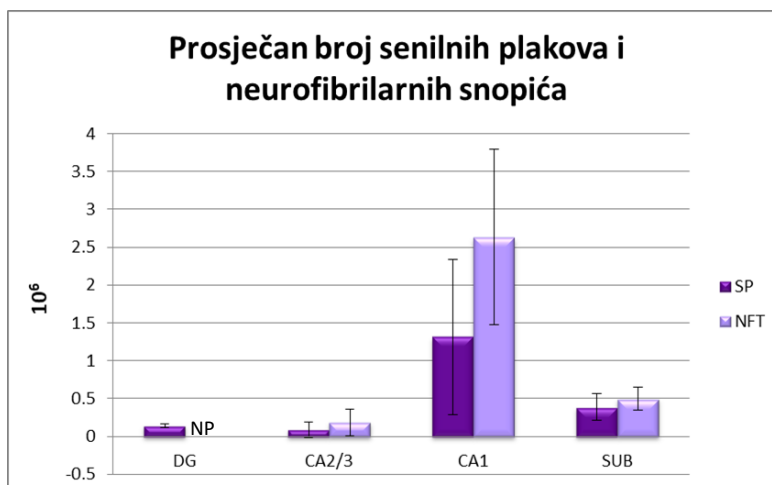
Drugo moguće objašnjenje promijenjenog izražaja neuroplastina je otvaranje proteinskog epitopa ili izmještanja proteina iz uobičajenog lipidnog okoliša ili proteinskih kompleksa zbog procesa koji se odvijaju tijekom neurodegeneracije.

Kada je imunoreaktivnost neuroplastina u skupini zahvaćenoj sporadičnom Alzheimerovom bolešću podijeljena u skupine s kraćim trajanjem bolesti (manje od četiri godine) prema kliničkoj dijagnozi, uspoređena s imunoreaktivnošću u skupini s duljim trajanjem bolesti (više od pet godina), osim u regiji girusa dentatusa i subikuluma, pokazana je značajna razlika u izražaju neuroplastina između kontrolne skupine i tkiva s kraćim trajanjem neurodegenerativnih procesa i u CA2/3 regiji. Također, s trajanjem bolesti imunoreaktivnost neuroplastina pokazuje trend pada u svim hipokampalnim regijama, a do statistički značajnog pada imunoreaktivnosti u usporedbi s kraćim trajanjem bolesti dolazi u regijama DG, CA2/3 i SUB (Slika 5.1.10.).



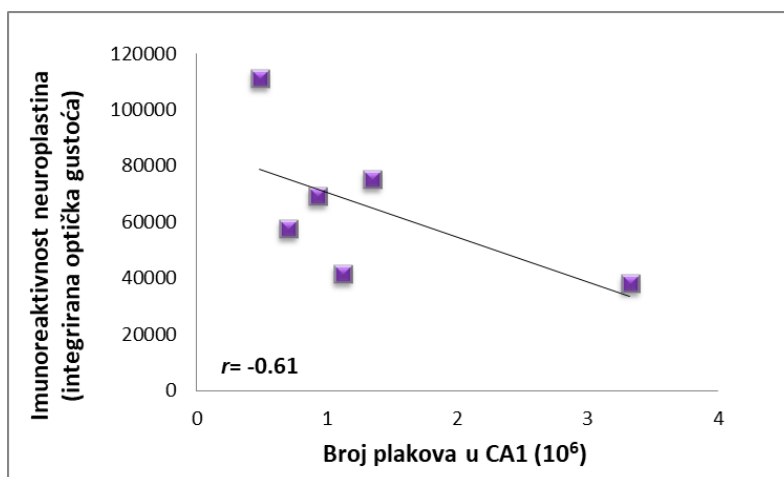
Slika 5.1.10. Usporedba intenziteta imunoreaktivnosti neuroplastina u hipokampalnim regijama kontrolnih uzoraka i uzoraka zahvaćenih Alzheimerovom bolešću (AD) s različitim trajanjem bolesti (<4 godine i >5 godina). Zvezdica označava statistički značajnu razliku utvrđenu testom One-Way ANOVA i Tukey post-hoc analizom ($p < 0,05$); DG = dentatni girus, CA = Cornu Ammonis, SUB = subikulum.

Osim podataka o broju neurona i volumenu regija hipokampusu, ljubaznošću prof. Šimića bili su dostupni i podaci o broju senilnih plakova i neurofibrilarnih snopića u regijama hipokampalnog tkiva zahvaćenima neurodegeneracijom (Slika 5.1.11.).



Slika 5.1.11. Grafički prikaz prosječnog broja senilnih plakova (SP) i neurofibrilarnih snopića (NFT) u hipokampalnim regijama. NP – nema podataka.

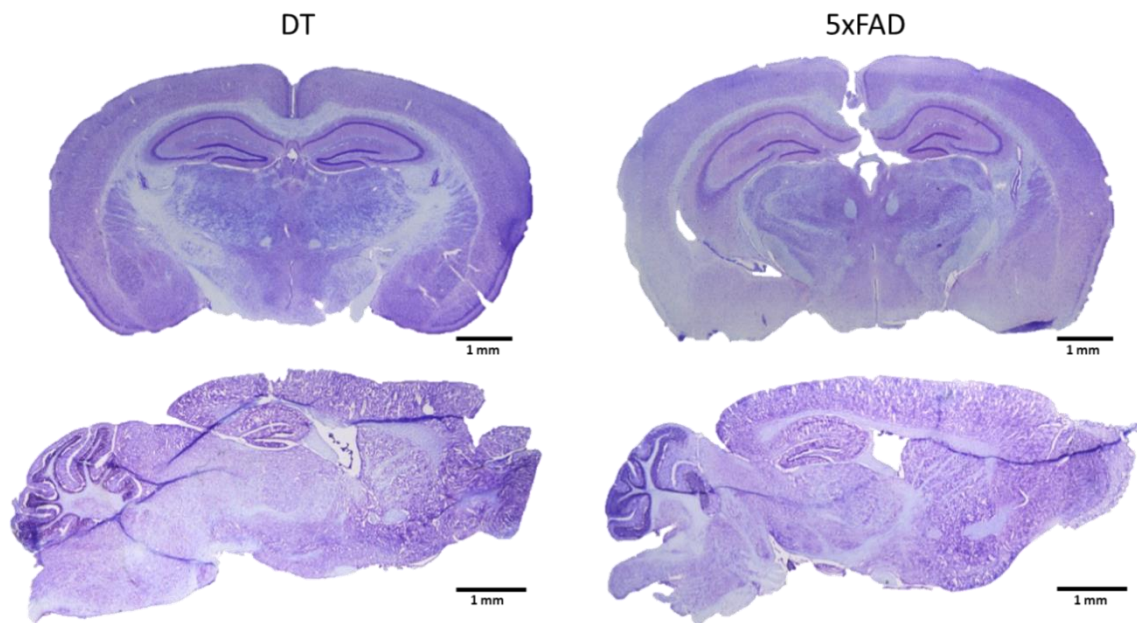
Uspoređena je imunoreaktivnost neuroplastina s oba parametra (broj SP i broj NFT) u svim hipokampalnim regijama. Negativna korelacija primijećena je između imunoreaktivnosti neuroplastina i SP u svim regijama, a u CA1 je primijećena izrazito negativna korelacija ($r = -0,61$) (Slika 5.1.12.). Korelacija između NFT i imunoreaktivnosti neuroplastina nije utvrđena.



Slika 5.1.12. Korelacija između imunoreaktivnosti neuroplastina i broja senilnih plakova u CA1 regiji u hipokampalnom tkivu zahvaćenom Alzheimerovom patologijom. $r = -0,61$.

5.2. U mozgu mišjeg modela za obiteljsku Alzheimerovu bolest, u usporedbi s divljim tipom miša, mijenja se imunoreaktivnost obje izoforme neuroplastina dok izražaj gangliozida ostaje isti

Zbog orijentacije i razlučivanja regija mišjeg mozga, rezovi paralelni imunohistokemijskim bojenjima obojeni su metodom prema Nisslu (Slika 5.2.1.).

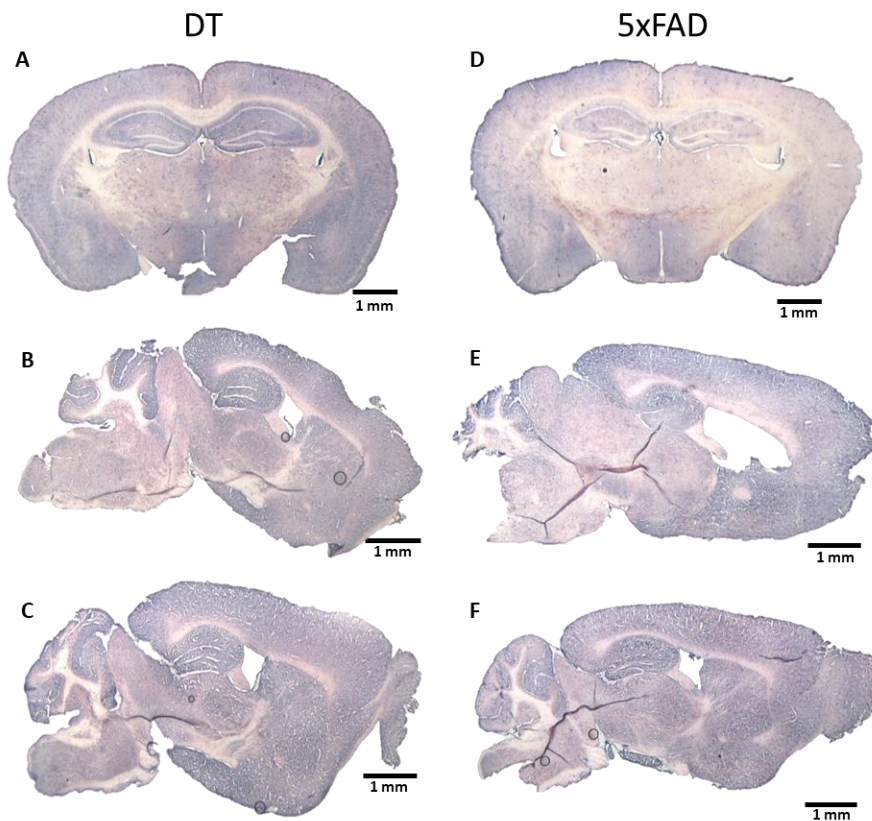


Slika 5.2.1. Reprezentativni prikaz bojenja metodom po Nisslu moždanih rezova divljih tipova miša (lijevo) i 5xFAD miševa (desno). Oznaka veličine: 1 mm.

Tkivni rezovi mozga 5xFAD miševa i divljih tipova podijeljeni su u dvije starosne skupine: skupina od tri do šest mjeseci s ranim neurodegenerativnim promjenama i skupina od deset do 15 mjeseci s uznapredovalim neurodegenerativnim promjenama.

Imunohistokemijskim bojenjem mozga divljeg tipa miša i 5xFAD miševa Np65 izoformom specifičnom za moždano tkivo pokazana je imunoreaktivnost u kori velikog mozga, hipokampusu, strijatumu i malome mozgu. Bijela tvar nije pozitivna na Np65 bojenje.

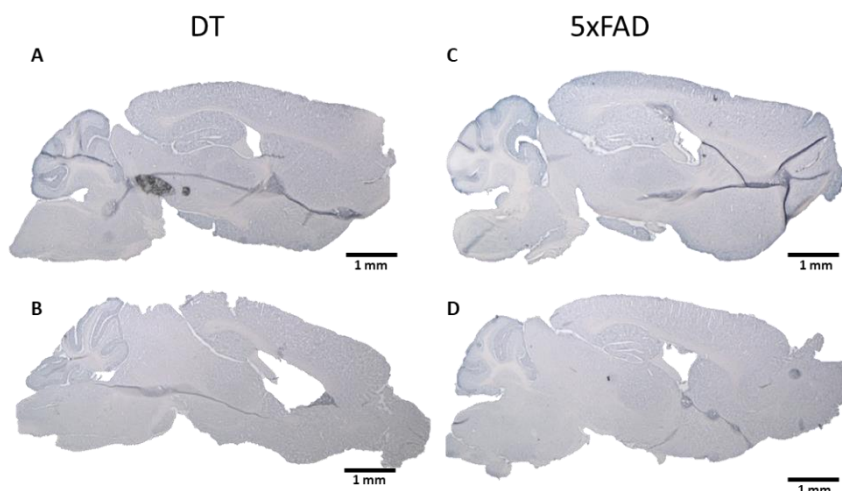
Semikvantitativnom analizom kvantificiran je izražaj obje izoforme neuroplastina (Tablica 5.2.1.). Uzorak imunoreaktivnosti, odnosno izražaj Np65 po regijama mozga, nije promijenjen u 5xFAD miševa u odnosu na divlji tip, ali je ukupna imunoreaktivnost u kori velikog mozga i hipokampusu manja u mišjem modelu neurodegeneracije. Razlika je značajna u skupini s uznapredovalim neurodegenerativnim promjenama (Slika 5.2.2.; Tablica 5.2.1.).



Slika 5.2.2. Reprezentativni prikaz imunohistokemijskog bojenja s protutijelom koje prepoznaje Np65 moždanih rezova divljih tipova (DT) (lijevo) i 5xFAD miševa (desno). A, B, D i E skupina starosti 10-15 mjeseci; C i F skupina starosti 3-6 mjeseci. Oznaka veličine: 1 mm.

Protutijelo korišteno za bojenje Np55 izoforme pokazuje veću specifičnost za Np55, ali i djelomičnu križnu reaktivnost s Np65 izoformom. Zbog toga se nakon bojenja tkiva ovim protutijelom najjača imunoreaktivnost primjećuje u kori malog mozga, gdje je Np55 u najvećoj mjeri prisutan, a zatim u kori velikog mozga i u hipokampusu, dok imunoreaktivnosti nema u bijeloj tvari. S obzirom na strukturno preklapanje dviju izoformi i djelomičnu križnu reaktivnost, nije moguće sa sigurnošću tvrditi da je pozitivno bojenje Np55 u tkivu zbog prisutnosti Np55, a ne i Np65 izoforme. Usporedbom imunoreaktivnosti između 5xFAD i divljeg tipa životinja razlika je manja u odnosu na protutijelo koje je specifično za moždanu izoformu, ali se također primjećuje manja imunoreaktivnost u hipokampusu i kori velikog mozga u skupini s izraženim neurodegenerativnim promjenama u odnosu na divlji tip miša (Slika 5.2.3. i Tablica 5.2.1.).

Imunoreaktivnost neuroplastina se u malome mozgu detektirana s oba protutijela ne razlikuje u dvije ispitivane skupine miševa (divlji tip i 5xFAD).



Slika 5.2.3. Repräsentativni prikaz imunohistokemijskog bojenja s protutijelom koje prepoznaje obje neuroplastinske izoforme moždanih rezova divljih tipova (DT) (lijevo) i 5xFAD miševa (desno). A i C skupina starosti 10-15 mjeseci; B i D skupina starosti 3-6 mjeseci. Oznaka veličine: 1 mm.

U mozgu 5xFAD miševa i miševa divljeg tipa imunohistokemijski su analizirana i kvantificirana i četiri najzastupljenija gangliozida moždanog tkiva (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) (Slika 5.2.4. i Tablica 5.2.1.).

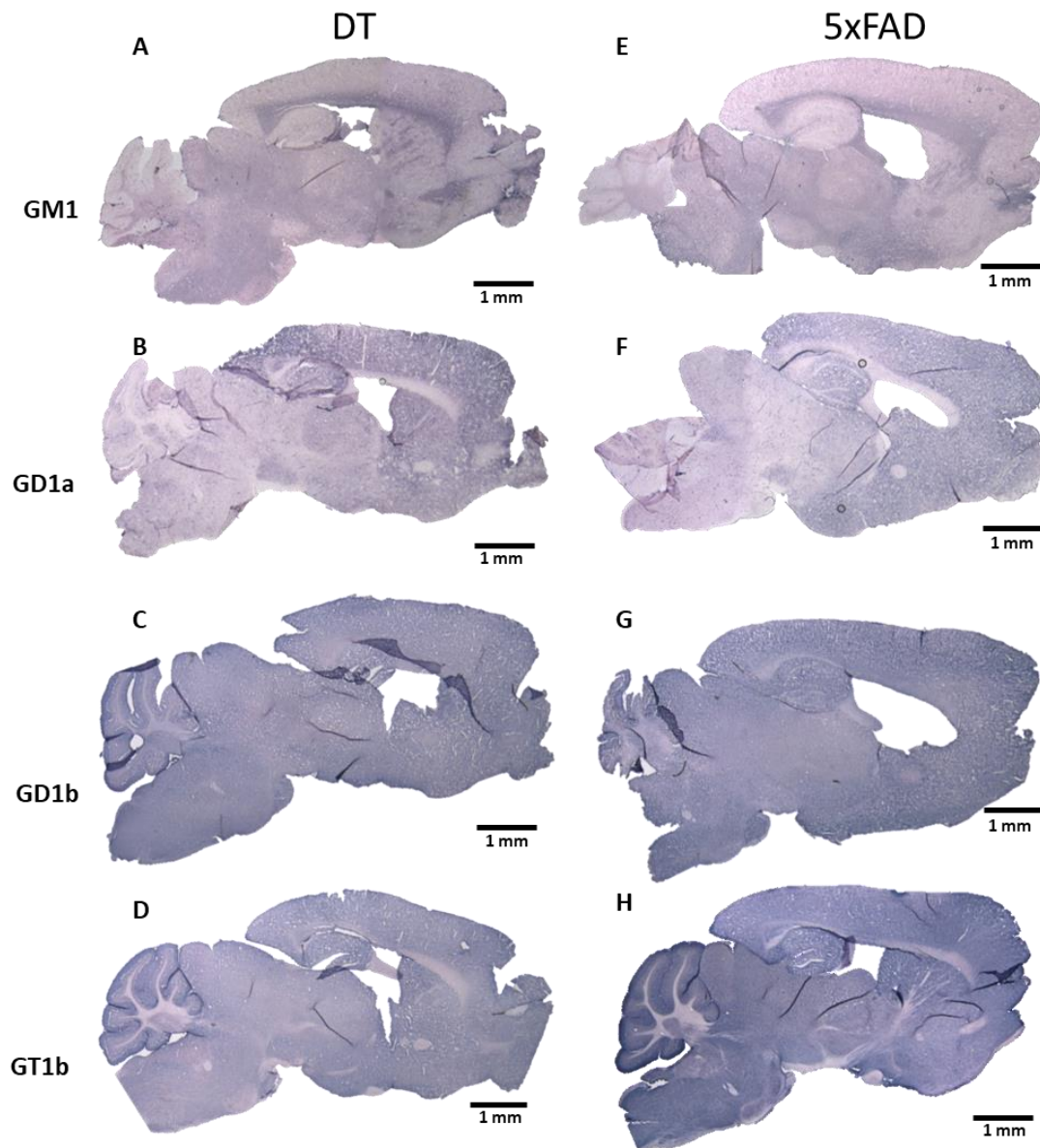
Uzorak imunoreaktivnosti GM1 pokazuje njegovu prisutnost dominantno u bijeloj tvari velikog i malog mozga te slabiju reaktivnost u kori velikog mozga i hipokampusu. Usporedbom divljeg tipa i 5xFAD miševa nije primijećena značajna razlika u imunohistokemijskoj lokalizaciji ili izražaju GM1.

GD1a se pretežno nalazi u kori velikog mozga i hipokampusu uz manju zastupljenost u malome mozgu i bijeloj tvari. Analizom imunoreaktivnosti nije primijećena razlika između miševa divljeg tipa i 5xFAD miševa.

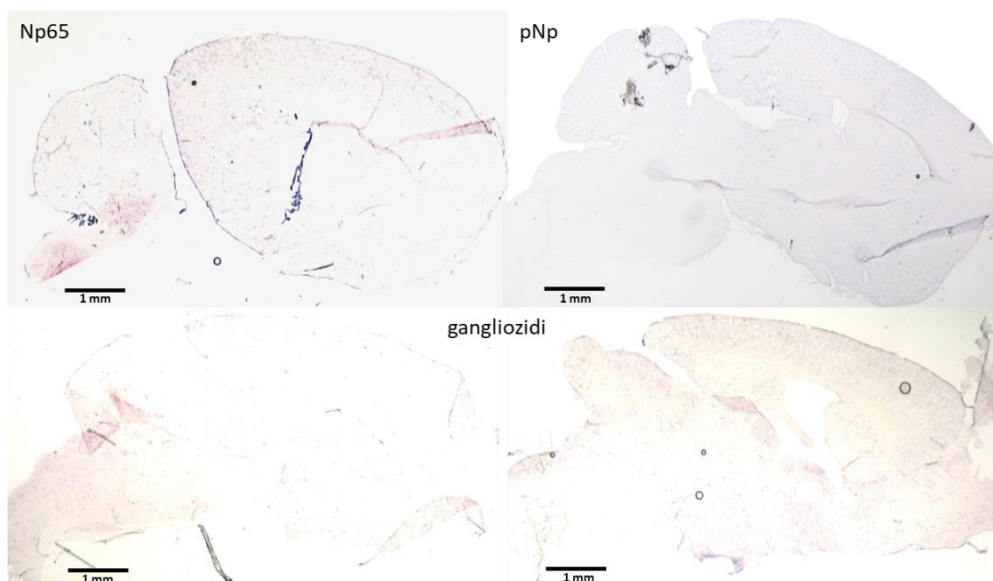
Gangliozid GD1b pokazuje reaktivnost u svim regijama mozga i u bijeloj tvari. Usporedbom imunoreaktivnosti između 5xFAD miševa i miševa divljeg tipa nije uočena razlika u izražaju.

GT1b je, kao i gangliozid GD1a, receptor za MAG (engl. *Myelin associated glycoprotein*). Oba gangliozida interakcijama s MAG-om stabiliziraju mijelinsku ovojnicu (177). Njihova prividna nereaktivnost u području bijele tvari se objašnjava skrivenim epitopima, odnosno potrebno je otopiti mijelinsku ovojnicu da bi se epitop pokazao na aksonima. U ovakvim, nativnim

preparatima GT1b zbog toga pokazuje imunoreaktivnost u kori velikog mozga, hipokampusu i dominantno u kori maloga mozga. Usporedbom imunoreaktivnosti između 5xFAD miševa i miševa divljeg tipa nije primijećena značajna razlika među skupinama.



Slika 5.2.4. Reprezentativni prikaz imunohistokemijskog bojenja s protutijelima koja prepoznaju ganglioziđe moždanih rezova divljih tipova (DT) (lijevo) i 5xFAD miševa (desno). A i E – GM1; B i F – GD1a; C i G – GD1b; D i H – GT1b. Oznaka veličine: 1 mm.



Slika 5.2.5. Reprezentativni prikaz negativnih kontrola. Imunohistokemijsko bojenje bez dodavanja primarnog protutijela na neuroplastin-65 (Np65), protutijela koje prepoznaje obje izoforme neuroplastina (pNp) i protutijela na gangliozide. Oznaka veličine: 1 mm.

Tablica 5.2.1. Semikvantitativna analiza imunohistokemijskog bojenja 5xFAD mišjih moždanih rezova i moždanih rezova miševa divljeg tipa

		Protutijelo						
		Regija	Np65	pNp	GM1	GD1a	GD1b	GT1b
Dob: 3 do 6 mjeseci	Divlji tip	Kora velikog mozga	+++	++	+	+++	++	++
		Hipokampus	+++	++	0	+++	++	++
		Mali mozak	++	+++	0	+	++	+++
		Bijela tvar	0	0	++	0	++	0
	5xFAD	Kora velikog mozga	++/+++	++	+	+++	++	++
		Hipokampus	++/+++	++	0	+++	++	++
		Mali mozak	++	+++	0	+	++	+++
		Bijela tvar	0	0	++	0	++	0
Dob: 10 do 15 mjeseci	Divlji tip	Kora velikog mozga	++	++	+	+++	++	++
		Hipokampus	++	++	0	+++	++	++
		Mali mozak	++	+++	0	+	++	++/+++
		Bijela tvar	0	0	++	0	++	0
	5xFAD	Kora velikog mozga	+	+/++	+	+++	++	++
		Hipokampus	+	+/++	0	+++	++	++
		Mali mozak	++	+++	0	+	++	+++
		Bijela tvar	0	0	++	0	++	0

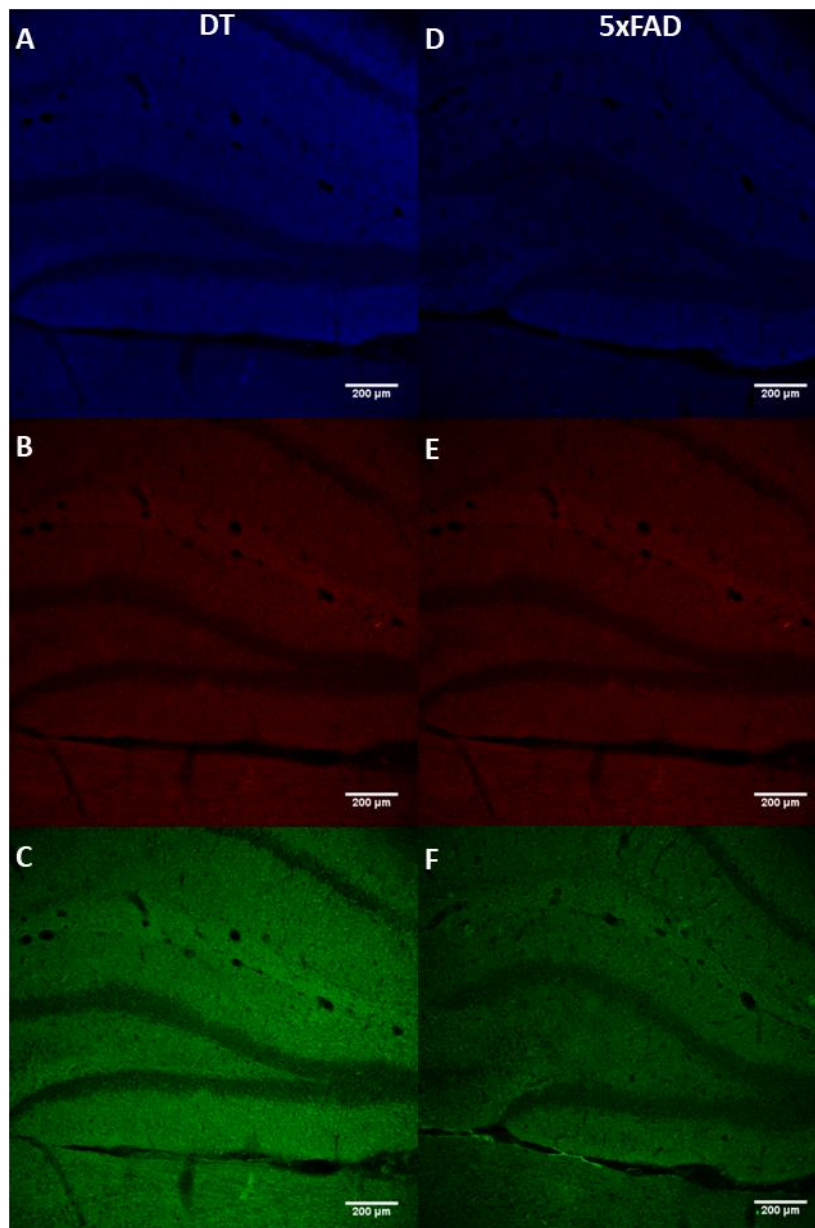
Intenzitet signala: 0 – nema imunoreaktivnosti; + slaba imunoreaktivnost; ++ srednja imunoreaktivnost; +++ jaka imunoreaktivnost.

Zbirnim prikazom (Tablica 5.2.1.) pokazujemo da se na razini imunohistokemijskog bojenja u najvećoj mjeri mijenja izražaj Np65, odnosno dolazi do smanjenja izražaja Np65 u kori velikog

mozga i hipokampusu u 5xFAD životinja u odnosu na kontrolni divlji tip. Razlika je prisutna u obje skupine: s ranim i kasnim neurodegenerativnim promjenama. Razlika postoji i ovisno o dobi miševa. U starijih životinja se izražaj neuroplastina smanjuje, ali se i dalje primjećuje razlika između modela i kontrolnih životinja. Ova razlika je primjetna, ali manje izražena kada je korišteno protutijelo za Np55. Izabrani gangliozidi koji su najčešće zastupljeni u ljudskome mozgu na razini imunohistokemije ne pokazuju značajne razlike između 5xFAD miševa i kontrolnih divljih tipova.

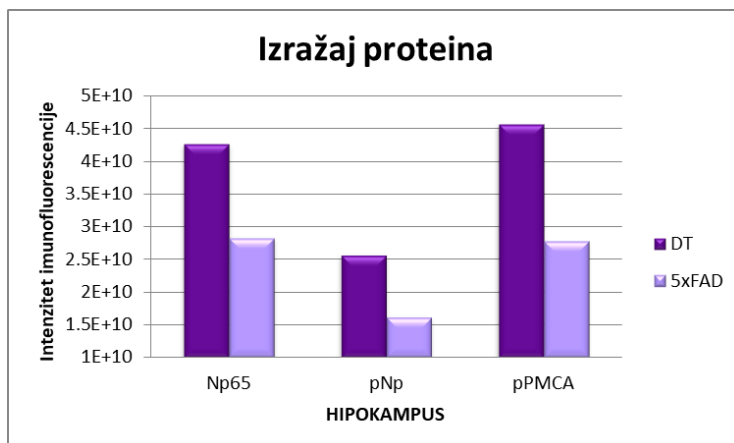
5.3. Imunofluorescentnim bojenjem tkivnih rezova mozga pokazan je smanjen izražaj neuroplastinskih izoformi i membranske kalcijske ATP-aze u hipokampusu mišjeg modela obiteljske Alzheimerove bolesti

Izražaj proteina neuroplastina i membranske kalcijske ATP-aze (PMCA) u tkivu prikazan je i imunofluorescentnom metodom. Analizirani su koronarni rezovi 5xFAD miševa i odgovarajućih kontrola oba spola dobi od 10 i 12 mjeseci (Slika 5.3.1.). Imunofluorescencija je kvantificirana u *ImageJ* programu.



Slika 5.3.1. Reprezentativni prikaz imunofluorescentnog bojenja hipokampusu 5xFAD miša i divljeg tipa. A i D – Np65 (plavo); B i E – pNp (crveno); C i F – pPMCA (zeleno); A-C – divlji tip; D-F – 5xFAD. Oznaka veličine: 200 µm.

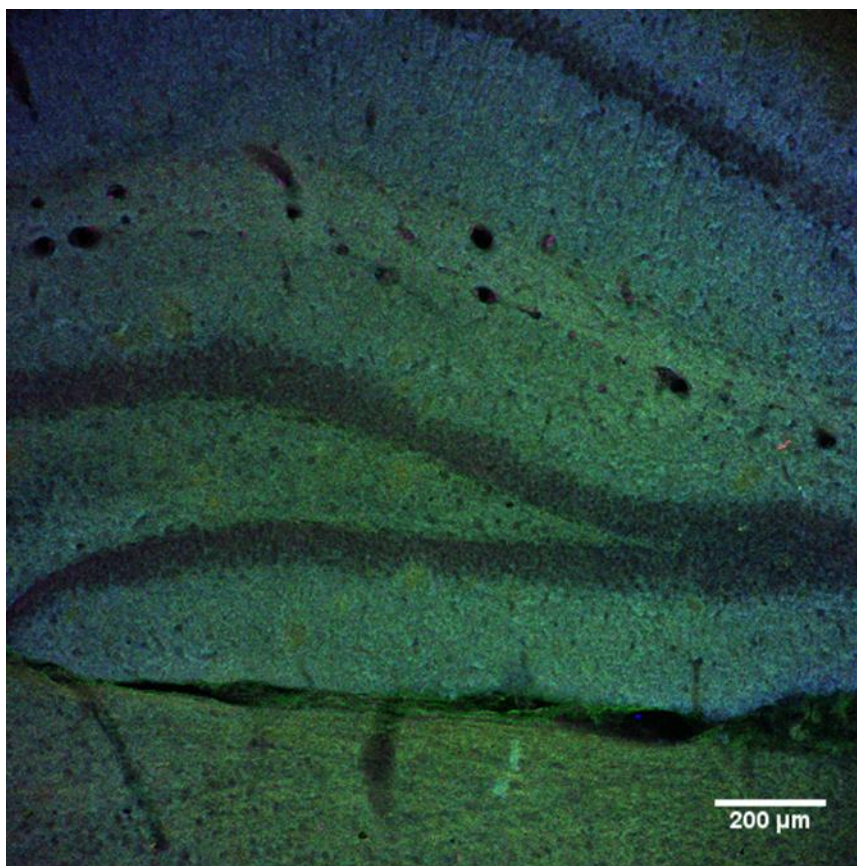
Kvantifikacija imunofluorescentnog signala pokazuje trend smanjenja intenziteta za sva promatrana protutijela: Np65, pNp i pPMCA (Slika 5.3.2.). Zbog malog broja uzoraka koji su analizirani imunofluorescencijom, nije bilo moguće napraviti adekvatnu statističku analizu. Ipak, trend smanjenja izražaja proteina u 5xFAD životinja je u skladu s gore opisanim imunohistokemijskim bojenjem.



Slika 5.3.2. Grafički prikaz intenziteta imunofluorescence Np65, pNp i pPMCA u hipokampusu 5xFAD miševa i divljeg tipa (DT) starih 10-12 mjeseci.

Izražaj neuroplastina i PMCA je pokazan u kori velikog mozga i hipokampusu. Analiza imunoreaktivnosti po podslojevima na velikom povećanju pokazuje slabiju imunoreaktivnost u piramidnom sloju CA1 i granularnom sloju GD. Međutim, to se može objasniti velikim brojem stanica u tim podslojevima. Kako je neuroplastin membranski protein, njegovo bojenje se na membrani primjećuje tek na velikim povećanjima. U ovim podslojevima dominiraju tijela neurona te se taj podsloj zbog toga doima praznim. S druge strane, *stratum moleculare* girusa dentatusa pokazuje jaku imunoreaktivnost, kao i slojevi *stratum radiatum* i *stratum lacunosum-moleculare* CA1 regije u kojima nema tijela neurona.

Slika 5.3.3. prikazuje preklapanje imunosignala svih analiziranih epitopa, a uočeni uzorak imunoreaktivnosti pokazuje preklapanje između neuroplastinskih izoformi i pPMCA. Poklapanje među neuroplastinskim izoformama se objašnjava djelomičnom križnom reaktivnošću protutijela koje prepoznaje obje izoforme neuroplastina. Preklapanje PMCA u tkivu u skladu je s do sada objavljenim rezultatima da izražaj i membransko pozicioniranje PMCA ovise o izražaju neuroplastina (159, 178).



5.3.3. Reprezentativni prikaz imunoreaktivnosti neuroplastinskih izoformi i pPMCA u hipokampusu divljeg tipa miša. Np65 – plavo, pNp – crveno, pPMCA – zeleno, DAPI – magenta. Oznaka veličine: 200 μm .

5.4. Sastav gangliozida u regijama mozga mišjeg modela za obiteljsku Alzheimerovu bolest ne razlikuje se od kontrola

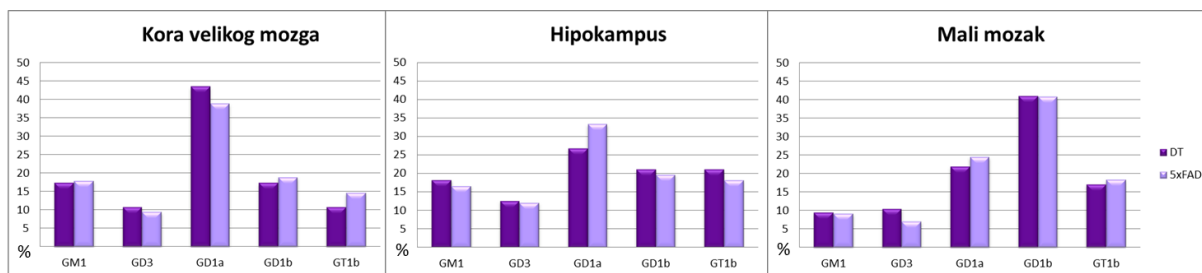
Nakon izolacije gangliozida iz moždanih regija (korteksa, hipokampusa i malog mozga) 5xFAD miševa i miševa divljeg tipa provedena je kvalitativna analiza gangliozida.

Kvalitativni sastav ukupnih gangliozida tkivnih uzoraka analiziran je tankoslojnom kromatografijom visoke razlučivosti (HPTLC). Prisutnost i relativna zastupljenost pojedinačnih frakcija gangliozida u ukupnom uzorku tkivnih gangliozida uspoređivani su prema ekvivalentu mase svježeg tkiva (engl. *wet weight equivalent*) iz kojeg su izolirani.

Analiziran je gangliozidni sastav korteksa, hipokampusa i malog mozga 5xFAD i kontrolnih životinja različite starosti: 3, 6, 10 i 14 mjeseci (Slika 5.4.1.). Regije mozga životinja starih 3 i 6 mjeseci te hipokampusi životinja starih 10 i 14 mjeseci su objedinjeni u jedan uzorak.



Slika 5.4.1. Prikaz sastava ukupnih gangliozida izoliranih iz kore velikog mozga, hipokampusa i maloga mozga 5xFAD miševa i miševa divljeg tipa (DT) starosti 6 mjeseci dobiven kromatografskim odjeljivanjem pojedinačnih frakcija gangliozida na HPTLC pločici kada je nanesen alikvot uzorka koji odgovara količini gangliozida izoliranih iz 10 mg svježeg tkiva. ST-standard.



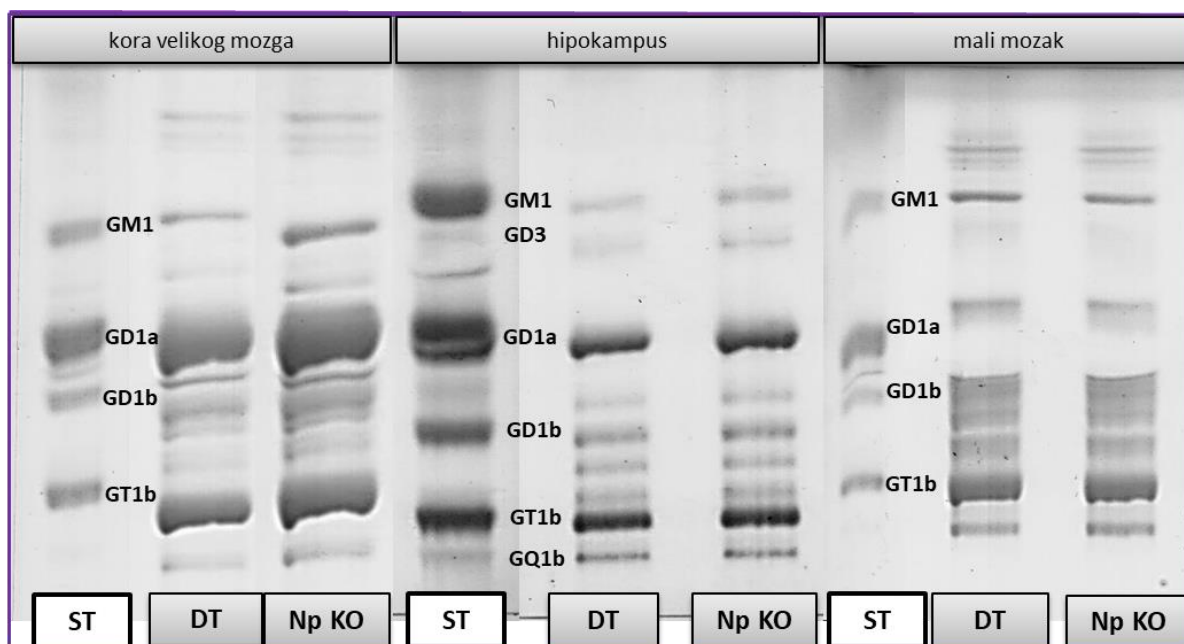
Slika 5.4.2. Udio pojedinih gangliozidnih frakcija u kori velikog mozga, hipokampusu i malome mozgu divljeg tipa (DT) i 5xFAD miševa.

Analizom i usporedbom svih uzoraka 5xFAD miševa i divljeg tipa nisu pronađene značajne razlike u gangliozidnom sastavu, kao ni u pojedinačnom udjelu gangliozida u ispitivanim regijama (Slika 5.4.1. i Slika 5.4.2.). Zbog objedinjavanja uzoraka prije izolacije i posljedično manjeg broja uzoraka, adekvatna statistička analiza nije bila moguća.

Također, metoda HPTLC nije dovoljno osjetljiva za analiziranje manje zastupljenih gangliozidnih frakcija.

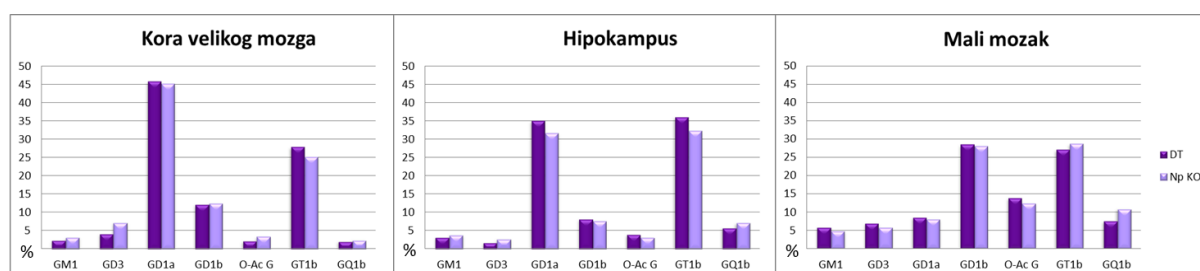
5.5. Sastav i količina gangliozida u mozgu miševa bez mogućnosti sinteze neuroplastina ne razlikuje se od kontrola

Analiziran je sastav gangliozida mišjeg mozga po regijama (kora velikog mozga, hipokampus i mali mozak) u divljeg tipa miša (DT) i miša s nemogućnošću sinteze neuroplastina (Np KO) metodom HPTLC (Slika 5.5.1.).



Slika 5.5.1. Prikaz sastava ukupnih gangliozida izoliranih iz kore velikog mozga, hipokampusa i maloga mozga divljeg tipa miša (DT) i miša bez mogućnosti sinteze neuroplastina (Np KO) starosti 6 mjeseci dobiven kromatografskim odjeljivanjem pojedinačnih frakcija gangliozida na HPTLC pločici kada je nanesen alikvot uzorka koji odgovara količini gangliozida izoliranih iz 10 mg svježeg tkiva. ST-standard.

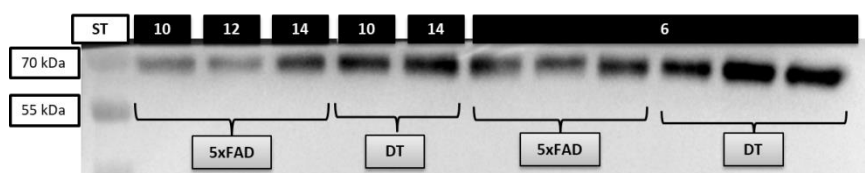
Analizom sastava gangliozida i zastupljenosti pojedinih frakcija gangliozida u kori velikog mozga, hipokampusu i malome mozgu nisu pronađene značajne razlike u gangliozidnom sastavu, kao ni u pojedinačnom udjelu gangliozida u ispitivanim regijama između miševa divljeg tipa i miševa bez mogućnosti sinteze neuroplastina (Slika 5.5.1. i Slika 5.5.2.).



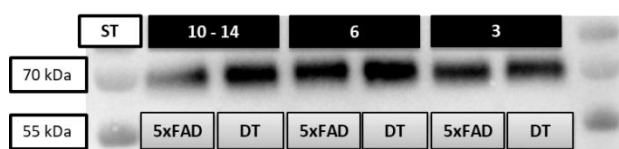
Slika 5.5.2. Udio pojedinih gangliozidnih frakcija u kori velikog mozga, hipokampusu i malome mozgu divljeg tipa miša (DT) i miša bez mogućnosti sinteze neuroplastina (Np KO).

5.6. Izražaj neuroplastinskih izoformi i membranske kalcijske ATP-aze mijenja se u hipokampusu i kori velikog mozga mišjeg modela za obiteljsku Alzheimerovu bolest u usporedbi s kontrolama, ali ne i u malome mozgu

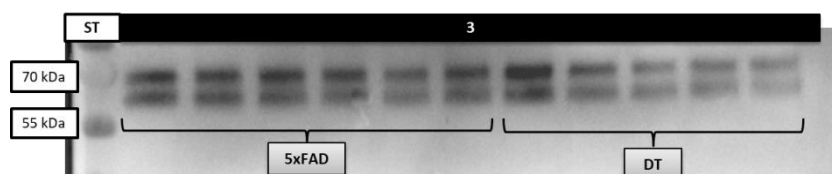
Membranski proteini izolirani iz različitih regija mišjeg mozga 5xFAD miševa i divljih tipova analizirani su metodom *Western blot*. Jednaka količina proteina je nanosena u jažice gela za elektroforezu te su proteini razdvojeni u električnom polju. Nakon prijenosa na membranu, proteini su detektirani protutijelom koje prepoznaje obje neuroplastinske izoforme (Slika 5.6.3. i 5.6.4.), protutijelom koje prepoznaje izoformu specifičnu za moždano tkivo (Slika 5.6.1. i 5.6.2.) te protutijelom koje prepoznaje sve izoforme PMCA (Slika 5.6.8. i 5.6.9.).



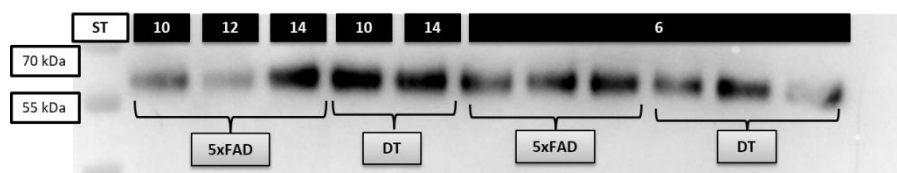
Slika 5.6.1. Reprezentativni prikaz detekcije izoforme neuroplastina specifične za moždano tkivo (Np65) u kortikalnim uzorcima, primjenom metode *Western blot*. ST – standard s oznakama veličine u kDa; 5xFAD – uzorci 5xFAD miševa; DT – divlji tip miševa; brojevi označavaju starost miševa u mjesecima.



Slika 5.6.2. Reprezentativni prikaz detekcije izoforme neuroplastina specifične za moždano tkivo (Np65) u hipokampalnim uzorcima, primjenom metode *Western blot*. ST – standard s oznakama veličine u kDa; 5xFAD – uzorci 5xFAD miševa; DT – divlji tip miševa; brojevi označavaju starost miševa u mjesecima.



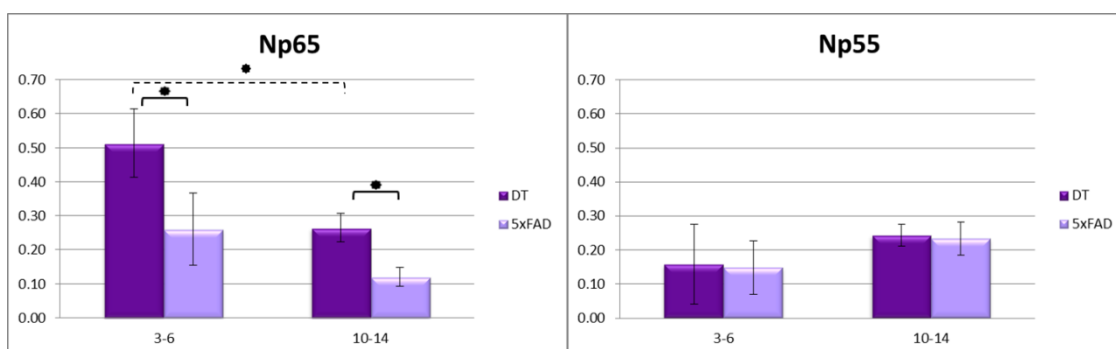
Slika 5.6.3. Reprezentativni prikaz detekcije objiju izoformi neuroplastina (Np65 i Np55) u kortikalnim uzorcima, primjenom metode *Western blot*. ST – standard s oznakama veličine u kDa; 5xFAD – uzorci 5xFAD miševa; DT – divlji tip miševa; brojevi označavaju starost miševa u mjesecima.



Slika 5.6.4. Reprezentativni prikaz detekcije Np55 izoforme neuroplastina protutijelom koje prepoznaje obje izoforme u uzorcima malog mozga, primjenom metode *Western blot*. ST – standard s oznakama veličine u kDa; 5xFAD – uzorci 5xFAD miševa; DT – divlji tip miševa; brojevi označavaju starost miševa u mjesecima.

Nakon vizualizacije proteina napravljena je kvantifikacija u programu *Image Lab*, koji omogućuje uspoređivanje signala odabranog proteina s ukupnim signalom svih proteina nanesenih u svaku jažicu.

Na taj način utvrđena je razlika u ekspresiji izoforme neuroplastina specifične za moždano tkivo (Np65) između 5xFAD miševa i odgovarajućih kontrola u kori velikog mozga. Ekspresija Np65 pada u starijih životinja u obje skupine, a pad je statistički značajan u kontrolnoj skupini. Usporedbom skupina životinja uočen je pad ekspresije Np65 u 5xFAD i u skupini s ranim neurodegenerativnim i u skupini s uznapredovalim neurodegenerativnim promjenama u usporedbi s divljim tipovima. Razlika je statistički značajna u obje dobne skupine (Studentov *t*-test, $p < 0,05$) (Slika 5.6.5. lijevo). Analiza drugim protutijelom koje prepoznaje obje izoforme neuroplastina, ali s većim afinitetom za kraću izoformu nije pokazala razlike između uspoređivanih skupina za izoformu Np55 (Slika 5.6.5. desno).

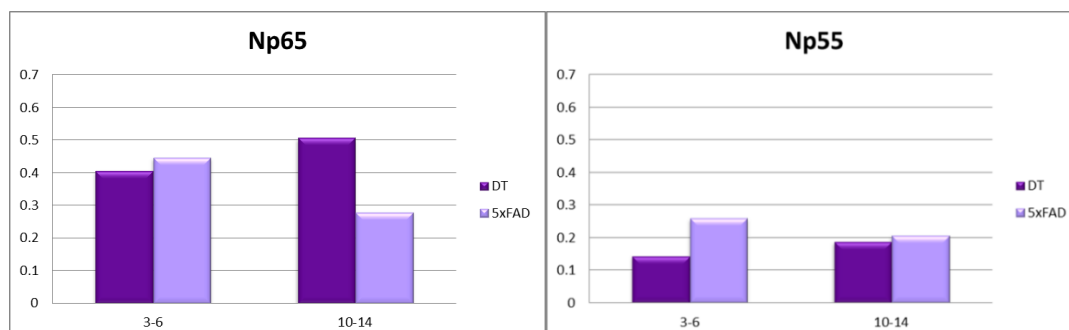


Slika 5.6.5. Grafički prikaz reaktivnosti neuroplastinskih izoformi u odnosu na ukupne membranske proteine između skupine 5xFAD miševa i divljeg tipa u različitim starosnim skupinama u kori velikog mozga. Razlika u ekspresiji Np65 (lijevo) između 5xFAD i DT je statistički značajna, *t*-test, $p < 0,05$, kao i razlika između različitih dobnih skupina DT. Razlika u ekspresiji Np55 (desno) između 5xFAD i DT nije statistički značajna.

Osim pada imunoreaktivnosti neuroplastina u 5xFAD miševa, prikazan je i pad imunoreaktivnosti Np65 sa starenjem što je u skladu s do sada objavljenim podacima (159).

U hipokampalnom tkivu vidljiv je trend pada imunoreaktivnosti Np65 u 5xFAD životinja u usporedbi s divljim tipom u skupini s uznapredovalim neurodegenerativnim promjenama (Slika 5.6.6. lijevo). Za ove uzorke nije bilo moguće napraviti adekvatnu statističku analizu jer su radi male mase uzoraka za izolaciju membranskih proteina hipokampusi životinja objedinjeni u jedan uzorak. Stoga, iako se radi o tri biološke replike životinja u uzorku se ponašaju kao jedan. Ipak, trend smanjenja izražaja Np65 u 5xFAD životinja s uznapredovalim neurodegenerativnim promjenama je u skladu s imunohistokemijskim i imunofluorescentnim bojenjem.

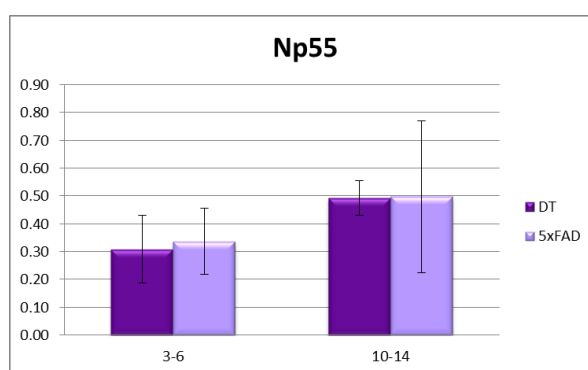
Analiza drugim protutijelom koje prepoznaje obje izoforme neuroplastina nije pokazala značajne razlike u ekspresiji Np55 u hipokampusu, kao ni u korteksu (Slika 5.6.6. desno). Ova izoforma ne pokazuje trend kao Np65. Metodom *Western blot* moguće je analizirati samo Np55, što nije slučaj prilikom imunohistokemijskog bojenja. Naime, izoforme neuroplastina se razlikuju samo u zadnjoj Ig domeni koju specifično prepoznaje Np65 protutijelo. Protutijelo koje prepoznaje obje izoforme prepoznaje ostatak strukture neuroplastina koji je identičan u obje izoforme. Zbog toga je na imunohistokemijskoj razini nemoguće odrediti koju izoformu je protutijelo prepoznalo. S druge strane, metodom *Western blot*, nakon razdvajanja proteina u električnom polju, moguće je odvojiti izoforme koje se razlikuju prema molekularnoj masi. Zbog toga je zanimljivo ustvrditi da je razlika u ekspresiji neuroplastina u 5xFAD životinja prikazana na razini imunohistokemije s oba protutijela, zapravo dominantno na račun izoforme specifične za moždano tkivo.



Slika 5.6.6. Grafički prikaz reaktivnosti neuroplastina u odnosu na ukupne membranske proteine između skupine 5xFAD miševa i divljeg tipa različite starosti u hipokampusu za izoformu Np65 (lijevo) i Np55 (desno). Izoforma Np65 pokazuje trend smanjivanja izražaja u skupini s uznapredovalim neurodegenerativnim promjenama.

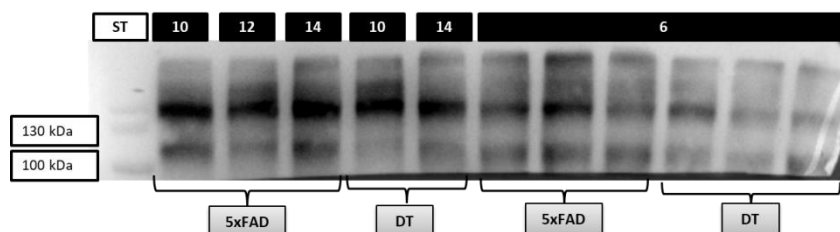
Analiziran je izražaj neuroplastina u malome mozgu protutijelom koje prepoznaje obje izoforme (Slika 5.6.4.). S obzirom na veću prisutnost kraće izoforme i manji afinitet protutijela za Np65, metodom *Western blot* se pokazuje samo jedna vrpca na visini od 55 kDa.

Usporedbom izražaja Np55 između 5xFAD i divljeg tipa miša u membranskim proteinima maloga mozga nije pokazana razlika u izražaju niti u jednoj starosnoj skupini. Također, nije pokazana statistički značajna razlika u ekspresiji između različitih dobnih skupina (Slika 5.6.7.).

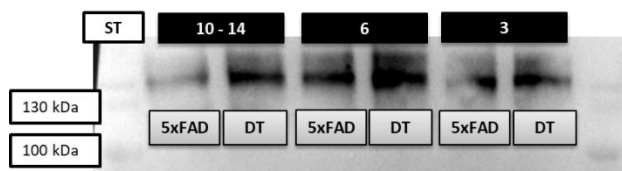


Slika 5.6.7. Grafički prikaz reaktivnosti Np55 u odnosu na ukupne membranske proteine između skupine 5xFAD miševa i divljeg tipa različite starosti u malome mozgu.

Osim neuroplastinskih izoformi analiziran je i izražaj kalcijске ATP-aze koja se nalazi na staničnoj membrani (PMCA) u kori velikog mozga i u hipokampusu protutijelom pPMCA (panPMCA) koje prepoznaje sve izoforme ovog proteina (Slika 5.6.8. i Slika 5.6.9.).

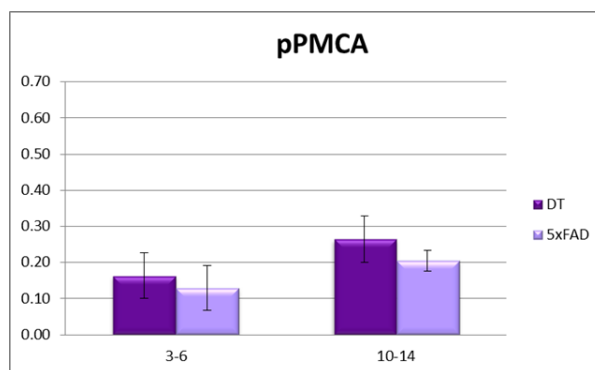


Slika 5.6.8. Reprezentativni prikaz detekcije metodom *Western blot* svih izoformi PMCA (pPMCA) u kortikalnim uzorcima. ST – standard s oznakama veličine u kDa; 5xFAD – uzorci 5xFAD miševa; DT – divlji tip miševa; brojevi označavaju starost miševa u mjesecima.



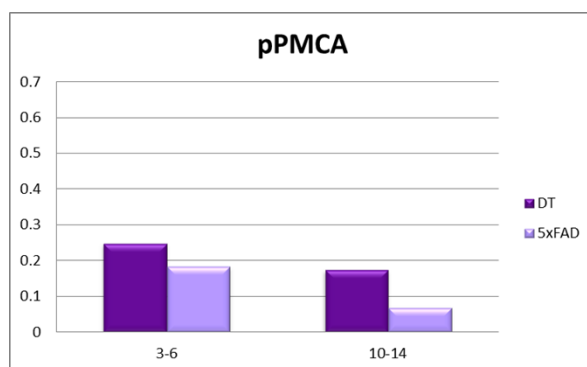
Slika 5.6.9. Reprezentativni prikaz detekcije metodom *Western blot* svih izoformi PMCA (pPMCA) u hipokampalnim uzorcima. ST – standard s oznakama veličine u kDa; 5xFAD – uzorci 5xFAD miševa; DT – divlji tip miševa; brojevi označavaju starost miševa u mjesecima.

Kvantifikacija signala je pokazala da se izražaj kalcijske pumpe također mijenja u 5xFAD miševa. U kori velikog mozga postoji trend smanjenja izražaja PMCA u obje skupine 5xFAD miševa u usporedbi s miševima divljeg tipa, ali ta razlika nije statistički značajna (Slika 5.6.10.). Također, promjena u izražaju PMCA različitih dobnih skupina ne pokazuje statistički značajne razlike.



Slika 5.6.10. Grafički prikaz reaktivnosti PMCA u odnosu na ukupne membranske proteine između skupine 5xFAD miševa i divljeg tipa različite starosti u korteksu.

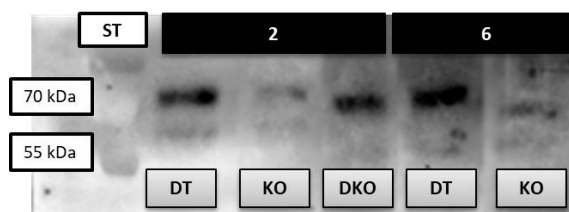
Analiza ekspresije PMCA u hipokampalnom tkivu pokazuje trend smanjenja u 5xFAD životinja s ranim i uznapredovalim neurodegenerativnim promjenama (Slika 5.6.11.). Pad ekspresije PMCA prati pad ekspresije Np65, ali zbog već opisanih tehničkih problema, adekvatna statistička analiza nije bila moguća. Također je zamjetan trend smanjenja ekspresije u divljih tipova miša i 5xFAD miševa sa starošću.



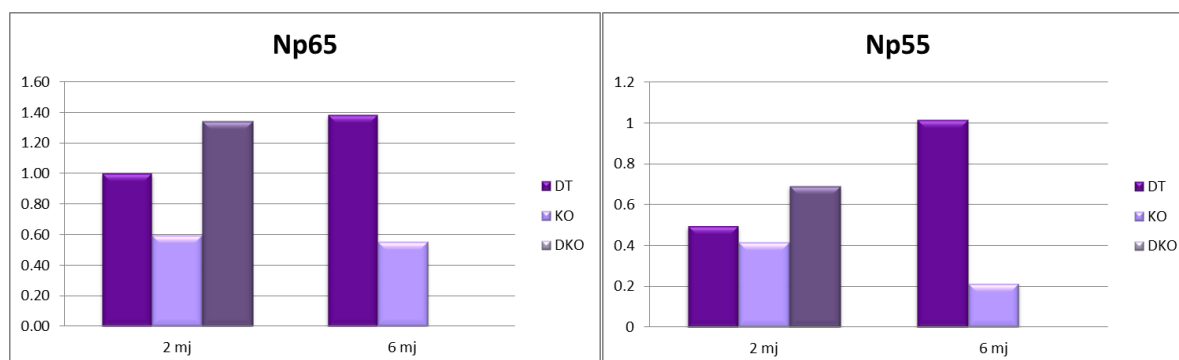
Slika 5.6.11. Grafički prikaz reaktivnosti PMCA u odnosu na ukupne membranske proteine između skupine 5xFAD miševa i divljeg tipa različite starosti u hipokampusu.

5.7. Proteinska analiza submembranskih frakcija u mišjih modela s promijenjenim sastavom gangliozida pokazuje ovisnost pozicioniranja neuroplastina o gangliozidnom sastavu membrane

Analiziran je izražaj obje izoforme neuroplastina u membranskim frakcijama kore velikog mozga mišjih modela s promijenjenim sastavom gangliozida *B4galnt1 null* (KO) i *St3gal2/3 double null* (DKO) miševa i odgovarajućih kontrola (DT) starosti dva i šest mjeseci (Slika 5.7.1.). Metodom *Western blot* je potvrđeno da je Np65 dominantna neuroplastinska izoforma u korteksima životinja, dok je Np55 jedina detektirana izoforma u malom mozgu životinja. Izražaj obje izoforme neuroplastina raste s vremenom u divljeg tipa miševa. Također, izražaj neuroplastina je različit između životinja divljeg tipa i modela miševa s poremećenom sintezom gangliozida. U kori velikog mozga Np65 i Np55 izoforme su manje izražene u KO životinja u odnosu na divlji tip životinja, a taj trend je posebno uočen u životinja starih šest mjeseci. U DKO životinja u odnosu na divlji tip primijećen je veći izražaj obje izoforme u odnosu na životinje divljeg tipa. Analiza izražaja proteina napravljena je u programu *Image Lab*. Prikazani su preliminarni rezultati jer su bile dostupne samo po dvije životinje po skupini pa stoga nije bila moguća adekvatna statistička analiza (Slika 5.7.2.).

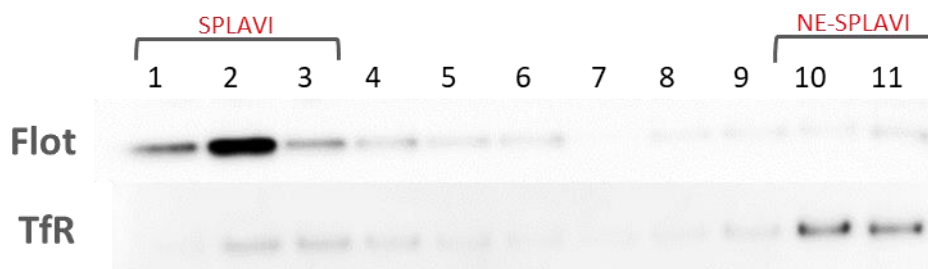


Slika 5.7.1. Reprezentativni prikaz detekcije obje izoforme neuroplastina metodom *Western blot* membranskih frakcija proteina korteksa životinja divljeg tipa (DT), *B4galnt1 null* životinja (KO) i *St3gal2/3 double null* životinja (DKO). ST – standard; brojevi označavaju starost miševa u mjesecima.



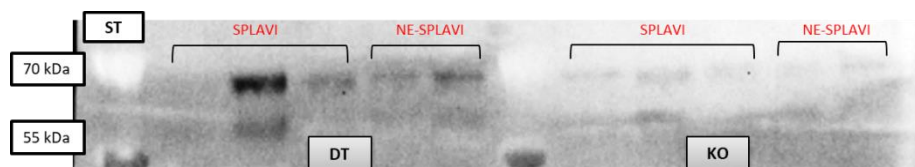
Slika 5.7.2. Grafički prikaz izražaja obje izoforme neuroplastina u korteksima životinja divljeg tipa (DT) starosti 2 i 6 mjeseci, *B4galnt1 null* životinja (KO) starosti 2 i 6 mjeseci i *St3gal2/3 double null* životinja (DKO) starosti 2 mjeseca

Pojedine submembranske frakcije odnosno lipidne splavi i ne-splavi izolirane su iz moždanog tkiva mišjih modela s promijenjenom sintezom i sastavom gangliozida te iz odgovarajućih divljih tipova usklađenih po dobi i spolu. Potvrda vrsta izoliranih membranskih frakcija se provodi metodom *Western blot*, odnosno analizom proteina koji su specifični biljezi splavi (Flotilin-Flot) i ne-splavi (Transferinski receptor-TfR) (Slika 5.7.3.). Nakon potvrde frakcija splavi i ne-splavi, daljnja analiza proteina je provedena samo na tim frakcijama.



Slika 5.7.3. Reprezentativni prikaz detekcije proteina markera splavi (Flot - flotilin) i ne-splavi (TfR – transferinski receptor) metodom *Western blot*.

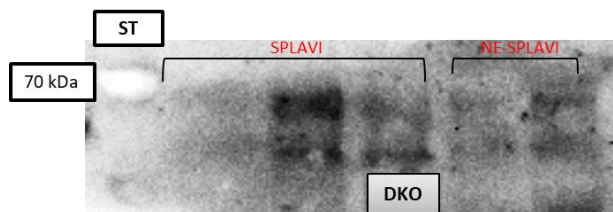
U pravilu, frakcije splavi koje su bile pozitivne na flotilin (marker splavi) su frakcije 1 – 3, a frakcije ne-splavi koje su bile pozitivne na marker ne-splavi, odnosno transferinski receptor su frakcije 10 i 11. Analiza raspodjele neuroplastinskih izoformi između membranskih frakcija napravljena je u programu *ImageJ*.



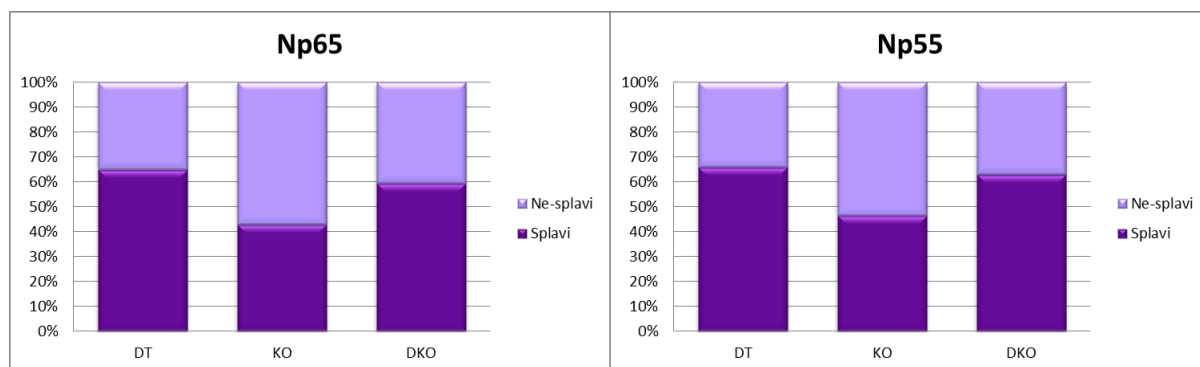
Slika 5.7.4. Reprezentativni prikaz detekcije obje izoforme neuroplastina u frakcijama splavi i ne-splavi korteksa, usporedba između divljeg tipa (DT) i *B4galnt1 null* životinja (KO) starosti 6 mjeseci.

Analizom raspodjele neuroplastinskih izoformi u frakcijama splavi i ne-splavi korteksa primijećen je različit trend raspodjele između životinja divljeg tipa i mišjih modela s promijenjenim sastavom gangliozida. U divljem tipu životinja obje izoforme neuroplastina pokazuju tendenciju pozicioniranja unutar lipidnih splavi. U mišjem modelu *B4galnt1 null*, odnosno modelu u kojem nedostaju svi kompleksni gangliozidi, neuroplastin se pozicionira dominantno izvan splavi (Slika 5.7.4., 5.7.6. i 5.7.7.). U mozgu mišjeg modela *St3gal2/3 double null*, za koji je karakterističan suvišak gangliozida GM1 i GD1b i manjak GT1b i GD1a, pozicioniranje neuroplastina je slično pozicioniranju u divljem tipu miša (Slika 5.7.5. i Slika

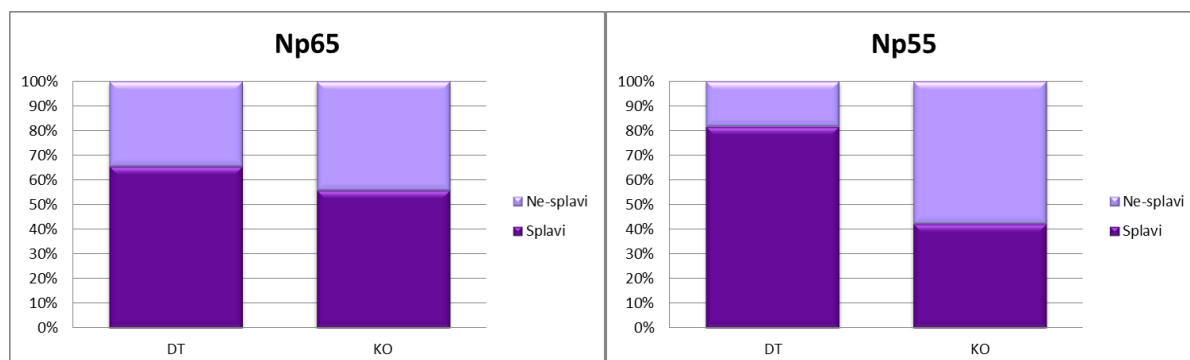
5.7.6.). Mišji model DKO je analiziran samo u dobi od 2 mjeseca jer je to njihova maksimalna dob preživljavanja.



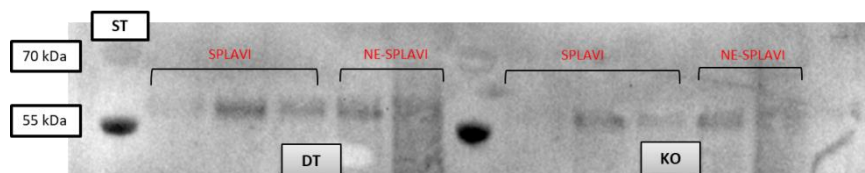
Slika 5.7.5. Reprezentativni prikaz detekcije obje izoforme neuroplastina u frakcijama splavi i ne-splavi korteksa, u *St3gal2/3 double null* životinja (DKO) starosti 2 mjeseca.



Slika 5.7.6. Grafički prikaz raspodjele obje izoforme neuroplastina između frakcija splavi i ne-splavi u korteksima divljeg tipa (DT), *B4galnt1 null* (KO) i *St3gal2/3 double null* (DKO) životinja starosti 2 mjeseca. Np65 – neuroplastin 65, Np55 – neuroplastin 55.

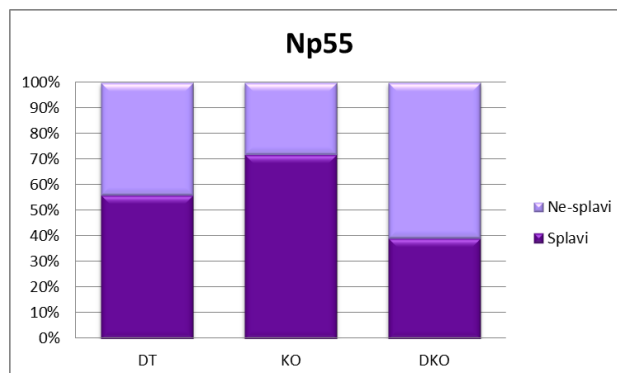


Slika 5.7.7. Grafički prikaz raspodjele obje izoforme neuroplastina u korteksima divljeg tipa (DT) i *B4galnt1 null* (KO) životinja starosti 6 mjeseci između frakcija splavi i ne-splavi. Np65 – neuroplastin 65, Np55 – neuroplastin 55.



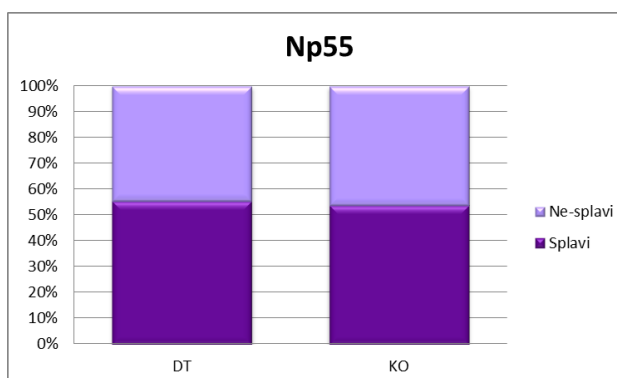
Slika 5.7.8. Reprezentativni prikaz detekcije neuroplastina 55 u frakcijama splavi i ne-splavi malog mozga, usporedba između divljeg tipa (DT) i *B4galnt1 null* životinja (KO) starosti 6 mjeseci

Analizom raspodjele neuroplastina 55 u frakcijama splavi i ne-splavi maloga mozga životinja starosti 2 mjeseca također je primijećen različit trend raspodjele između životinja divljeg tipa i mišjih modela s promijenjenim sastavom gangliozida. U divljem tipu neuroplastin se ponovno nalazi pretežno unutar lipidnih splavi, ali u mišjem modelu bez kompleksnih gangliozida je to pozicioniranje izraženije (Slika 5.7.8. i Slika 5.7.9.). U malome mozgu DKO životinja neuroplastin se nalazi izvan lipidnih splavi.



Slika 5.7.9. Grafički prikaz raspodjele neuroplastina 55 u malome mozgu divljeg tipa (DT), *B4galnt1 null* (KO) i *St3gal2/3 double null* (DKO) životinja starosti 2 mjeseca između frakcija splavi i ne-splavi. Np55 – neuroplastin 55.

U životinja starosti 6 mjeseci analiza raspodjele neuroplastina 55 u malome mozgu između frakcija splavi i ne-splavi ne pokazuje razliku kada se uspoređuje divlji tip i model bez kompleksnih gangliozida (Slika 5.7.10.).

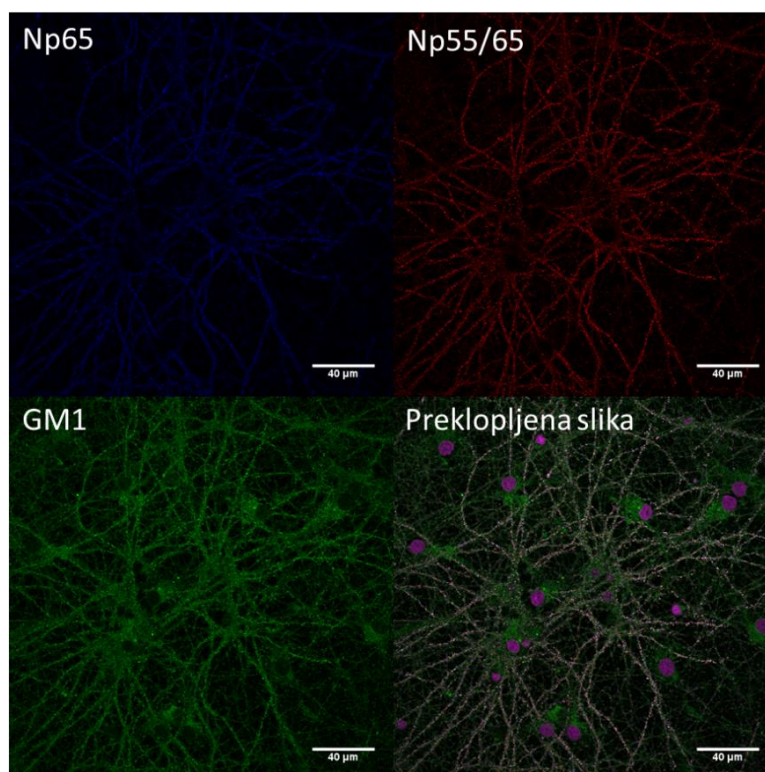


Slika 5.7.10. Grafički prikaz raspodjele neuroplastina 55 u malom mozgu divljeg tipa (DT) i *B4galnt1 null* (KO) životinja starosti 6 mjeseci između frakcija splavi i ne-splavi. Np55 – neuroplastin 55.

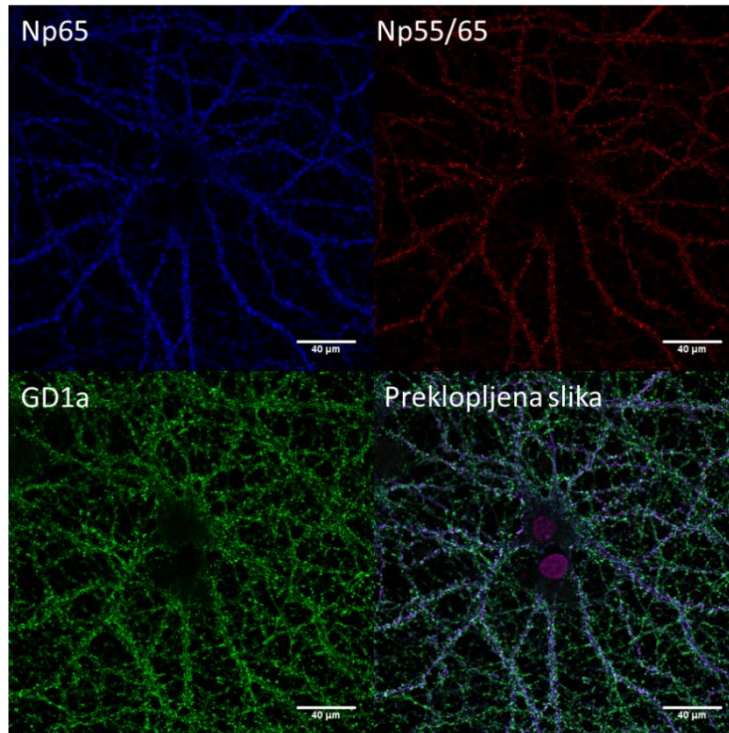
5.8. Imunocitokemijska analiza primarnih kortikalnih i hipokampalnih neuronalnih kultura pokazuje preklapanje imunoreaktivnosti neuroplastina i GM1

Nakon uzgoja primarnih štakorskih hipokampalnih i kortikalnih kultura analiziran je imunocitokemijski izražaj gangliozida GM1, GD1a, GD1b i GT1b i obje izoforme neuroplastina (Np55 i Np65) u živim kulturama različite starosti.

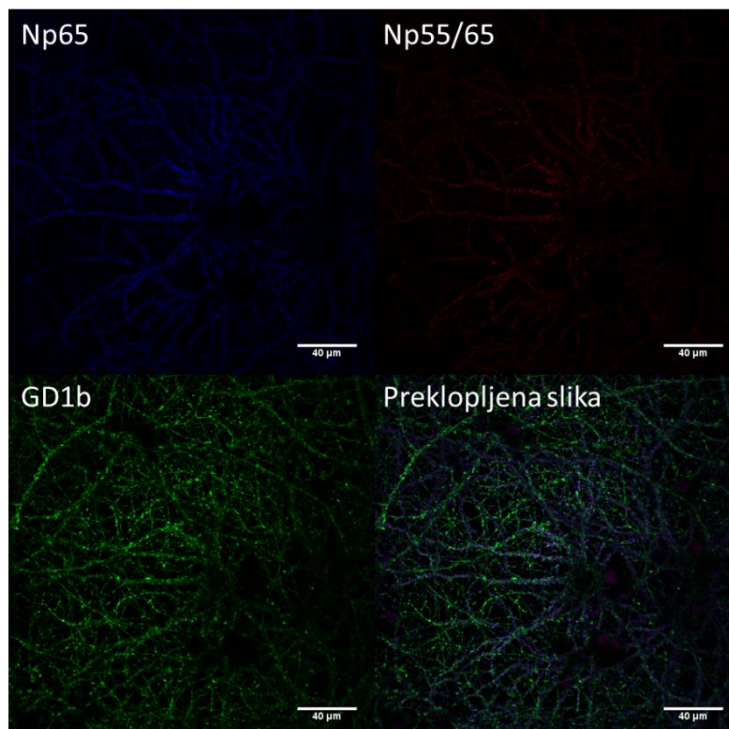
Svi gangliozidi pokazuju smještaj na membranama, kao i neuroplastinske izoforme. Analize lokalizacije gangliozida na neuronima pokazuje da se gangliozidi a-serije, GM1 i GD1a dominantno pozicioniraju na tijelima neurona i na dendritima, a gangliozidi b-serije GD1b i GT1b se većinom nalaze na aksonima neurona. Imunoreaktivnost GM1 je detektirana i unutar neurona. Neuroplastinske izoforme pokazuju imunoreaktivnost na tijelima neurona i dendritima, odnosno na postsinaptičkim membranama (Slika 5.8.1., Slika 5.8.2., Slika 5.8.3. i Slika 5.8.4.).



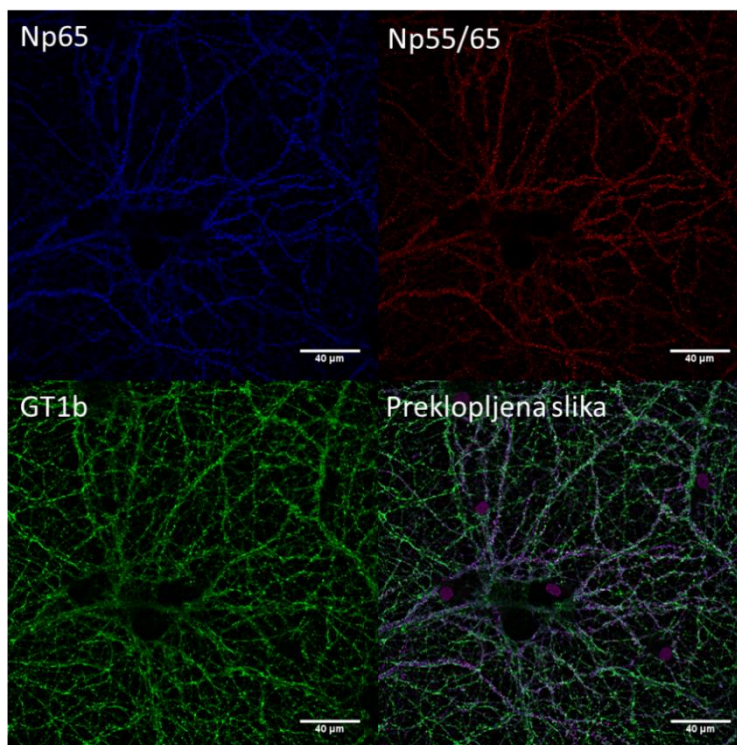
Slika 5.8.1. Prikaz imunofluorescentnog bojenja primarnih hipokampalnih kultura: plavo – Np65 (protutijelo specifično za neuroplastin 65), crveno – Np55/65 (protutijelo koje prepoznaje obje neuroplastinske izoforme), zeleno – GM1. Oznaka veličine: 40 μm.



Slika 5.8.2. Prikaz imunofluorescentnog bojenja primarnih hipokampalnih kultura: plavo – Np65 (protutijelo specifično za neoplastin 65), crveno – Np55/65 (protutijelo koje prepoznaje obje neoplastinske izoforme), zeleno – GD1a. Oznaka veličine: 40 µm.



Slika 5.8.3. Prikaz imunofluorescentnog bojenja primarnih hipokampalnih kultura: plavo – Np65 (protutijelo specifično za neoplastin 65), crveno – Np55/65 (protutijelo koje prepoznaje obje neoplastinske izoforme), zeleno – GD1b. Oznaka veličine: 40 µm.



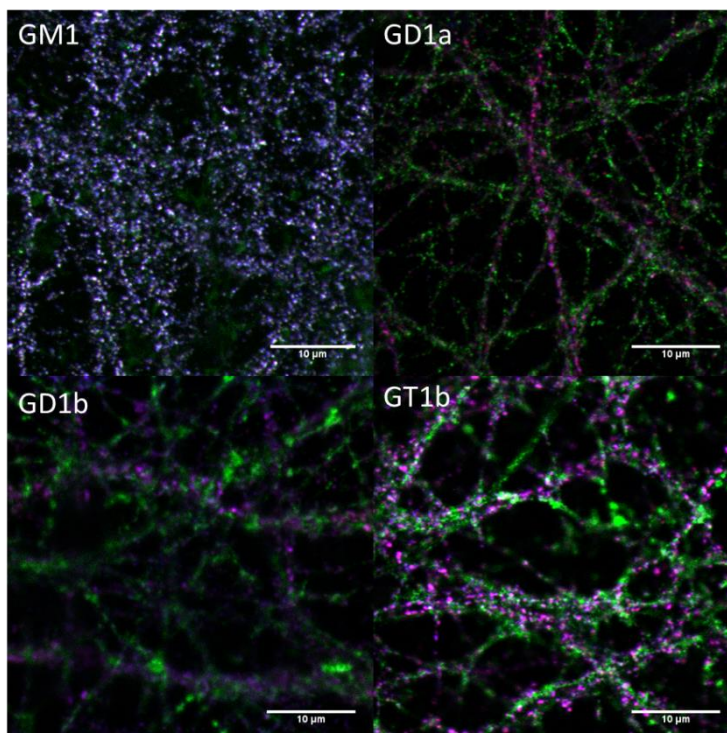
Slika 5.8.4. Prikaz imunofluorescentnog bojenja primarnih hipokampalnih kultura: plavo – Np65 (protutijelo specifično za neuroplastin 65), crveno – Np55/65 (protutijelo koje prepoznaje obje neuroplastinske izoforme), zeleno – GT1b. Oznaka veličine: 40 µm.

Radi analize membranske kolokalizacije proteina i gangliozida od interesa, analizirane su slike većeg povećanja nakon dekonvolucije (Slika 5.8.5.). Također je analizirano preklapanje imunoreaktivnosti u kulturama različite starosti.

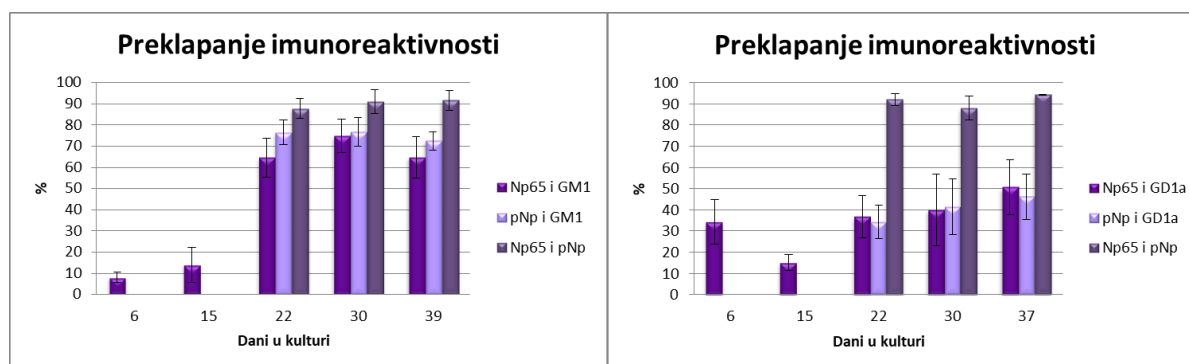
Visoki postotak preklapanja dviju izoformi neuroplastina je očekivan budući da pNp protutijelo prepoznaje obje neuroplastinske izoforme (Slika 5.8.6 i Slika 5.8.7.). Analiza preklapanja neuroplastina i gangliozida je napravljena za svaki gangliozid posebno zbog toga što su sva gangliozidna protutijela porijeklom iz iste životinje.

Trend koji je pokazan na manjim povećanjima, odnosno lokalizacija a-serije gangliozida na postsinaptičkim membranama kao i neuroplastinskih izoformi, je primijećen i na većem povećanju. Analizom kolokalizacije pokazano je da se neuroplastinske izoforme preklapaju s GD1a u oko 40 % slučajeva (Slika 5.8.6. desno). Preklapanje imunoreaktivnosti neuroplastinskih izoformi, s druge strane, s GM1 je u oko 70% slučajeva (Slika 5.8.6. lijevo). Ovo preklapanje je vidljivo tek u zrelim neuronima, odnosno kulturama starijima od 21 dan (Slika 5.8.5 i Slika 5.8.6.).

Preklapanje imunofluorescentnog signala nije primijećeno kada su uspoređivane neuroplastinske izoforme i gangliozidi b-serije (Slika 5.8.5.).



Slika 5.8.5. Uvećani prikaz preklapljene imunofluorescencije Np65, Np55/65 i gangliozida: GM1 gore lijevo, GD1a gore desno, GD1b dolje lijevo i GT1b dolje desno. Oznaka veličine: 10 µm.



Slika 5.8.6. Grafički prikaz preklapanja imunoreaktivnosti između neuroplastinskih izoformi i GM1 (lijevo) te neuroplastinskih izoformi i GD1a (desno). Prikazano je preklapanje imunoreaktivnosti u kulturama različite starosti.

6. RASPRAVA

Membranski okoliš proteina često je zanemareni čimbenik koji utječe na pozicioniranje i funkcije različitih proteina i u fiziološkim stanjima i u bolesti. Dosadašnja istraživanja su nedvojbeno potvrdila ulogu membranskih lipida u patogenezi neurodegeneracije, posebice lipidnih vrsta karakterističnih za sastav lipidnih splavi (2, 168). Za ovu disertaciju je zanimljiv aspekt istraživanja koja se odnose na dokazani utjecaj gangliozida, membranskih glikosfingolipida, na amiloidogenezu (55, 60, 115). Naime, danas je poznato da se procesiranje proteinskog preteče amiloida zbiva unutar submembranskih domena, a patološka amiloidogeneza povezuje se s pomakom procesiranja amiloidnog preteče iz nesplavi u splavi. Postoji velik broj radova koji potvrđuju da pojedine gangliozidne vrste predstavljaju neku vrstu klice amiloidogeneze upravo unutar lipidnih splavi, pa se ovaj učinak gangliozida udružuje s opisanim učincima drugih lipida (kolesterola i fosfolipida) na procesiranje amiloidnog preteče (179). Svi navedeni rezultati su zapravo dokazi ključnog utjecaja lipidnog sastava membrane na strukturnu dinamiku i specifične funkcije pojedinih tipova membrana koje ovise o ispravnom pozicioniranju i djelovanju membranskih proteinskih sustava. Završne specifične neuropatološke markere neurodegeneracije, senilne plakove i neurofibrilarne snopiće, vidimo kao posljedicu poremećenog procesiranja/modificiranja dvaju proteina – APP-a i tau. Međutim, složena patogeneza neurodegeneracije zapravo obuhvaća promjenu funkcije vrlo različitih staničnih sustava u kaskadi koja je pokrenuta do danas nepoznatim čimbenicima. Treba napomenuti da se pojedini stanični sustavi aktiviraju u neurodegeneraciji čime se stanica pokušava oduprijeti patološkom procesu. Primjerice, poznato je da se u neurodegeneraciji mijenja izražaj molekula stanične adhezije, što bi moglo dijelom predstavljati molekularnu podlogu pokušaja reorganizacije tkiva u neurodegeneraciji (180).

U ovome radu je istraživana hipoteza da se izražaj neuroplastina, transmembranskog proteina stanične adhezije, mijenja u neurodegenerativnim procesima te da njegov izražaj i pozicioniranje unutar membrane ovise o gangliozidnom sastavu membrane. Hipoteza se temelji na spomenutim ranijim spoznajama o interakcijama membranskih lipida i proteina kao i ulozi membranskih lipida u patogenezi neurodegeneracije, i sudjelovanju različitih molekula stanične adhezije u kompenzatornom odgovoru tkiva na neurodegenerativni proces.

6.1. Neuroplastin u neurodegeneraciji – promjene izražaja i funkcije

Analiza ljudskih hipokampalnih uzoraka pokazala je da se izražaj neuroplastina mijenja u sporadičnoj Alzheimerovoj bolesti, odnosno da je imunoreaktivnost neuroplastina veća u tkivu zahvaćenom neuropatološkim promjenama (Slika 5.1.2.). Ova promjena izražaja neuroplastina u hipokampusu, uz do sada opisane funkcije neuroplastina u učenju i pamćenju (156, 159), u bolesti u kojoj je jedan od glavnih kliničkih simptoma gubitak pamćenja, ne iznenađuje. Neuroplastin je neophodan za LTP (154), odnosno za mehanizam upamćivanja. Povećani izražaj stoga upućuje na mogući kompenzatorni mehanizam kojim tkivo pokušava oporaviti mehanizme nužne za stvaranje i/ili retenciju pamćenja. Kada je hipokampalno tkivo osoba oboljelih od AD podijeljeno u dvije skupine: skupinu s kraćim kliničkim trajanjem AD (manje od četiri godine) i skupinu s dužim trajanjem (više od pet godina) razlike između kontrolnog tkiva i AD skupine s kraćim trajanjem bolesti su izraženije. Osim u GD i SUB, povećan izražaj neuroplastina je pokazan i u CA2/3 regiji kada se uspoređuju kontrole i uzorci s kraćim trajanjem bolesti (Slika 5.1.10). Pokazano nakupljanje neuroplastina u ranijim fazama bolesti, ali bez adekvatnog kliničkog odgovora, može pokazivati njegovo nepravilno funkcioniranje i/ili pozicioniranje zbog promijenjenog lipidnog sastava. S progresijom bolesti, izražaj neuroplastina pada u svim hipokampalnim regijama što se može povezati sa slomom kompenzatornih mehanizama tkiva. U AD su opisane i druge molekule stanične adhezije čiji se izražaj mijenja kao mogući odgovor na funkcionalna i strukturalna oštećenja (141, 180). Jedna od molekula koja je normalno izražena tijekom razvoja, a važna je za rast neurita i sinaptogenezu je polisijalilirana neuralna molekula stanične adhezije (PSA-NCAM, od engl. *Polysialylated neural cell adhesion molecule*). Izražaj PSA-NCAM je pojačan u vanjskom i unutarnjem molekularnom sloju girusa dentatusa u AD (141), kao i u molekularnom sloju dentatnog girusa u štakorskom modelu nakon entorinalne lezije (181, 182). Također je pokazano da je u Alzheimerovoj bolesti narušena organizacija aksona koji izražavaju PSA-NCAM u CA1, subikulumu i entorinalnom korteksu (141). Entorinalna lezija u štakorskom modelu uzrokuje manji ulazak aksona do girusa dentatusa iz entorinalnog korteksa, te se povećani izražaj PSA-NCAM tumači kao znak ponovne inervacije nakon ozljede. Nakon potpune reinervacije, barem u mozgu glodavaca, izražaj PSA-NCAM se vraća na normalne razine (181, 182). U ovome radu analiza podslojeva hipokampalnih regija pokazuje najveću ekspresiju neuroplastina u podslojevima u kojima su smještena tijela piramidnih neurona i granularnih stanica. U girusu dentatusu, osim u sloju granularnih

stanica, izražena je imunoreaktivnost i u molekularnom sloju u kojem sinaptički završavaju neuroni iz entorinalnog korteksa. U AD-u je upravo u tom podsloju u najvećoj mjeri povećana ekspresija neuroplastina (Slika 5.1.5.). Molekularni sloj girusa dentatusa je mjesto prve sinapse trisinaptičkog puta između aksona glutamatergičnih neurona entorinalnog korteksa i dendrita granularnih stanica hipokampusa, odnosno mjesto gdje završava perforantni put. Trisinaptički put je veza hipokampusa s ostatkom moždane kore kojim sve informacije sakupljene iz asocijativnih osjetnih moždanih regija u entorinalni korteks ulaze u hipokampus gdje se indukcijom LTP-a stvaraju trajne sinapse kao strukturni temelj novostvorenih sjećanja (183, 184). Mijenjanje izražaja različitih molekula važnih za stvaranje i održavanje sinapsi u području molekularnog sloja girusa dentatusa upućuje na aktiviranje molekularnih mehanizama važnih za oporavak i pravilno stvaranje novih sinapsi. S obzirom na očiti neuspjeh sinaptičkih mehanizama u klinički manifestnoj Alzheimerovoj bolesti, i potencijalni kapacitet molekula stanične plastičnosti koje se aktiviraju nakon ozljede, moguće je postulirati da se reparatorni mehanizmi sinaptičke strukture javljaju prije nego kaskada neurodegenerativnih događaja dovede do sloma kompenzatornih plastičnih mehanizama hipokampusa.

Za adekvatnu analizu imunoreaktivnosti neuroplastina u hipokampusu u Alzheimerovoj bolesti bilo je potrebno uzeti u obzir da je bolest, osim nakupljanjem amiloidnih plakova i neurofibrilarnih snopića, karakterizirana i gubitkom neurona, sinapsi i volumena entorinalnog korteksa i hipokampusa (185-188) te isključiti mogući utjecaj ovih faktora. Stoga je napravljena korekcija imunoreaktivnosti neuroplastina prema broju neurona i volumenu regija hipokampalne formacije. U analiziranim uzorcima uočen je očekivani manji broj neurona i volumena regija girusa dentatusa, CA1, CA2/3 i subikuluma u uzorcima s patologijom AD u usporedbi s kontrolama usklađenim prema dobi i spolu, no nije utvrđena statistička značajna razlika. Ovi podaci mogu biti objašnjeni velikim interindividualnim razlikama u starenju i AD kada podaci o broju neurona nisu u izravnoj vezi s neuropatološkim promjenama. Zbog toga se razlika izražaja neuroplastina ne može pripisati promjeni broja neurona ili smanjenju volumena regija hipokampusa čime indirektno pokazujemo da je povećanje imunoreaktivnosti neuroplastina vjerojatno posljedica njegove povećane sinteze.

Nakon usporedbe izražaja neuroplastina po regijama hipokampalne formacije s neuropatološkim markerima tipičnima za AD, senilnim plakovima i neurofibrilarnim

snopićima (Slika 5.1.11.), nije pronađena značajna korelacija između navedenih parametara, osim u CA1 gdje je pronađena izrazita negativna korelacija između broja senilnih plakova i imunoreaktivnosti neuroplastina (Slika 5.1.12).

U ovom radu je izražaj neuroplastina u ljudskom hipokampusu u sporadičnoj Alzheimerovoj bolesti i kontrolnom tkivu analiziran primjenom imunohistokemijske metode na dostupnim parafinskim rezovima. Detaljnija analiza proteinskog izražaja dviju izoformi neuroplastina je provedena u regijama mozga miševa 5xFAD, modela za obiteljski tip Alzheimerove bolesti. Miševi 5xFAD eksprimiraju pet različitih mutacija pronađenih u obiteljskoj AD u genima za APP i PS1, a njihov fenotip uključuje prekomjerno stvaranje i nakupljanje izrazito velike količine A β ₁₋₄₂ u neuronima prije stvaranja ekstraneuronalnih amiloidnih plakova već u dobi od dva mjeseca (147). Izražaj Np55 i Np65 u regijama mozga miševa analiziran je imunohistokemijskom metodom, imunofluorescencijom i metodom *Western blot*. Pokazano je značajno smanjenje Np65 u korteksu i hipokampusu 5xFAD životinja u usporedbi s divljim tipom. Smanjenje je uočljivo već u dobnj skupini od tri do šest mjeseci, odnosno u skupini s ranim neurodegenerativnim promjenama, dok je smanjenje bilo izraženije u starijoj skupini s uznapređovalim neurodegenerativnim promjenama. Imunohistokemijski izražaj Np55 je sličan onome Np65, međutim na razini *Western blota* kada je bilo moguće analizirati samo vrpce veličine 55 kDa koja specifično odgovara samo izoformi Np55, pokazano je da ne postoji razlika u izražaju Np55 u neurodegeneraciji u kori velikog mozga, hipokampusu niti u malome mozgu. Imunohistokemijskom i imunofluorescentnom metodom opisano smanjenje Np55 stoga pripisujemo izoformi specifičnoj za moždano tkivo, jer protutijelo u manjoj mjeri prepoznaje i Np65. Np55 izoforma je dominantno eksprimirana u malome mozgu. Na IHC razini postoji pozitivno bojenje Np65 protutijelom u kori maloga mozga, međutim vjerojatni uzrok tome je križna reaktivnost protutijela. U literaturi je ranije opisano nakupljanje amiloida, ali ne i neurofibrilarnih snopića u malome mozgu oboljelih od AD (189). Novija istraživanja koja koriste slikovne metode također opisuju blažu atrofiju određenih regija maloga mozga u osoba s AD-om, zbog širenja neurodegenerativnih procesa preko mreža unutarnje povezanosti (engl. *intrinsic connectivity network*) (190). Čini se da opisane neuropatološke promjene u malome mozgu AD ne utječu na ekspresiju Np55. U malome mozgu je opisana kratkotrajna prisutnost točkastih depozita Np55 oko Purkinjeovih stanica u štakorskom malomu mozgu sedmi postnatalni dan, ali je ekspresija smanjena desetog

postnatalnog dana (158). Ovo se objašnjava prisustvom prolaznih sinapsi u malome mozgu koje su eliminirane u kasnijem razvoju (191). Np55 se osim toga može vezati za receptor faktora rasta fibroblasta (FGFR, od engl. *fibroblast growth factor receptor*) (162) te podržava rast neurita u kulturi cerebelarnih granularnih stanica i hipokampalnih neurona, ali ne preko homofilnih ili heterofilnih interakcija s drugim CAM, nego najvjerojatnije aktivacijom FGFR (162, 192).

Ovdje prikazani rezultat promjene izražaja Np65 u regijama mozga miševa s genetički uzrokovanim neuropatološkim promjenama oslikava promjenu molekularnih mehanizama za koje je neuroplastin odgovoran u procesima neurodegeneracije. Međutim, za razliku od nalaza u ljudskim uzorcima i sporadičnoj AD, izražaj Np65 je u mozgu 5xFAD životinja smanjen. Ovo prividno neslaganje rezultata je objašnjivo ako uzmemo u obzir nemogućnost potpune usporedbe mišjeg modela koji ekspimiraju mutacije pronađene u familijarnom obliku AD i sporadičnog oblika bolesti koji se pojavljuje u ljudi u više od 95% slučajeva. Moguće je da dva tipa AD-a, osim različitih uzroka imaju vjerojatno i različite mehanizme neurodegeneracije i kompenzatorni odgovor na neurodegeneraciju. Ovdje korišteni mišji model vrlo rano pokazuje posljedice velikog nakupljanja toksičnog A β i rani slom mogućih kompenzatornih mehanizama. S obzirom na rezultate ljudskih uzoraka nakon što je bolest podijeljena u skupine s kraćim i duljim trajanjem, moguće je da je u ovom modelu zbog ranog nakupljanja toksičnog amiloida, već u dobi od dva mjeseca, nemoguće pratiti rane promjene i kompenzatorni odgovor. Drugo objašnjenje bi bili različiti uzročni mehanizmi koji dovode do ljudske sporadične Alzheimerove bolesti koji nisu do kraja razjašnjeni i genetski uvjetovane neurodegeneracije koja hiperprodukcijom toksičnih produkata dovodi do ranog gubitka sinapsi i neurona, moguće i preskakanjem nekih mehanizama popravka, te posljedičnih bihevioralnih problema. Da bi se u potpunosti mogla razjasniti uloga neuroplastina u neurodegeneraciji i potvrditi da je neuroplastin molekula čiji je izražaj drugačiji ukoliko su uzroci neurodegeneracije različiti trebalo bi analizirati humane uzorke zahvaćene nasljednim oblikom AD, kao i mišji ili štakorski model sporadične AD te drugi mišji model AD koji sporije nakuplja toksični A β . Do tada neuroplastin promatramo u svjetlu njegove uloge u mehanizmima odgovornima za učenje, pamćenje i prisjećanje i čiji je normalan izražaj važan za normalno održavanje kognitivnih funkcija. Može se pretpostaviti

da različiti uzroci neurodegeneracije s posljedičnim promjenama u učenju i pamćenju mijenjaju izražaj neuroplastina na drugačiji način, ovisno o različitim uzrocima.

6.2. Promjene neuroplastina u neurodegeneraciji vjerojatno su povezane s regulacijom unutarstanične koncentracije kalcijevih iona

Održavanje intracelularne koncentracije Ca^{2+} jedno je od bitnih svojstava stanica u čiju je regulaciju uključen Np65 i to preko reguliranja izražaja, stabilnosti i pozicioniranja kalcijske ATP-aze u staničnoj membrani (PMCA) (159, 178, 193). PMCA je ATP-aza odgovorna za izbacivanje kalcijevih iona iz citosola i nužna je za normalno odvijanje signalne transdukcije posredovane kalcijevim ionima. Iz literature je poznato da se normalna aktivnost PMCA u sinapsi smanjuje sa starenjem, dok se ekspresija PMCA ne mijenja (194). Također je poznato da je specifična aktivnost PMCA veća kada je PMCA pozicionirana unutar lipidnih splavi (195). Poremećaji stanične komunikacije ovisne o kalcijevim ionima su od ranije poznati u Alzheimerovoj bolesti. Aktivnost PMCA je smanjena u korteksu osoba sa sporadičnom AD u usporedbi s kontrolama, a pokazano je i da $\text{A}\beta$ inhibira aktivnost izoforme PMCA 4 (196), koja je u ljudskome hipokampusu u najvećoj mjeri eksprimirana u girusu dentatusu i CA2 (197). Prethodno objavljeni rezultati naše skupine pokazali su da je u miševa koji ne sintetiziraju Np65 izrazito smanjen izražaj svih izoformi PMCA (159). Na temelju tih rezultata i smanjenja imunoreaktivnosti Np65 u mozgu 5xFAD životinja opaženog u ovom istraživanju, pretpostavljena je promjena izražaja PMCA u mišjem modelu za Alzheimerovu bolest. Imunofluorescentna analiza i analiza proteina metodom *Western blot* su pokazale da je izražaj PMCA u korteksu 5xFAD životinja također manji u odnosu na divlji tip životinja, ali manji izražaj PMCA nije statistički značajan kao promjena izražaja Np65. U hipokampalnom tkivu također postoji trend smanjenja i Np65 i PMCA, ali zbog objedinjavanja uzoraka nije moguće odrediti je li ta razlika statistički značajna. S obzirom na objavljene rezultate koji pokazuju smanjenje aktivnosti PMCA, ali uz donekle očuvanu ekspresiju, da bi se do kraja potvrdila eventualna promijenjena uloga PMCA, trebalo bi analizirati i njenu aktivnost. Osim toga, u literaturi je opisano da uz neuroplastin, kontrolu izražaja, stabilnosti i pozicioniranja PMCA ima i basigin, molekula slična neuroplastinu i član iste porodice molekula stanične adhezije (178). U svjetlu ovih rezultata trebalo bi analizirati mijenja li se izražaj basigina u 5xFAD životinja kao mogući dodatni mehanizam „spašavanja“ aktivnosti ove kalcijske ATP-aze i regulacije unutarstaničnog kalcija.

6.3. Neuroplastin u različitom gangliozidnom okolišu

U literaturi je opisana ovisnost izražaja i pozicioniranja neuroplastina u mišjem hipokampusu o gangliozidnom sastavu, odnosno povećani izražaj neuroplastina u mišjem modelu *B4galnt1 null* koji nema kompleksnih gangliozida (163). Zbog toga je u ovoj disertaciji detaljnije analiziran izražaj i pozicioniranje neuroplastina u membrani kore velikog mozga i maloga mozga u dva mišja modela s poremećenom sintezom gangliozida i posljedično promijenjenim sastavom gangliozida. U mišjem modelu *B4galnt1 null* kojem nedostaju svi kompleksni gangliozidi (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) (171) u korteksu dolazi do smanjenog izražaja obje izoforme neuroplastina u dobi od dva i u dobi od šest mjeseci. S obzirom na objavljene podatke koji pokazuju veći izražaj neuroplastina u hipokampusima ovih životinja (163), možemo reći da gangliozidni sastav, ali i druge molekularne, metaboličke i funkcionalne karakteristike moždanih regija utječu na izražaj neuroplastina. Kada su iz membranskih frakcija miševa divljeg tipa izolirane lipidne splavi te je analizirano pozicioniranje neuroplastina unutar membranskih domena, pokazano je da se u korteksu obje izoforme neuroplastina u dobi od dva i šest mjeseci dominantno pozicioniraju unutar lipidnih splavi. Splavi izolirane iz *B4galnt1 null* miševa bez kompleksnih gangliozida, u kojih je sijalinska kiselina vezana za jednostavne gangliozide, imaju drugačiji sastav lipidnih splavi. U tih miševa, neuroplastinske izoforme su dominantno pozicionirane izvan lipidnih splavi. Ovi podaci govore da je pozicioniranje neuroplastina unutar lipidnih splavi uvjetovano barem jednim od četiri kompleksna gangliozida koji nedostaju u *B4galnt1 null* miševima.

St3gal2/3 double-null miševi imaju različit sastav moždanih gangliozida od miševa divljeg tipa i od *B4galnt1 null* miševa. Ukupna količina sijalinske kiseline je u ovih miševa jednaka kao i u DT, ali im nedostaju gangliozidi sa sijalinskom kiselinom vezanom na terminalnoj galaktozi - GD1a i GT1b, dok gangliozide GM1 i GD1b imaju u suvišku (87). Izražaj neuroplastinskih izoformi u ovom mišu je nešto veći u odnosu na divlji tip u dobi od dva mjeseca. Analiza pozicioniranja neuroplastina unutar membrane otkriva da se izoforme većinom nalaze unutar splavi, kao i u divljem tipu miša. Ovi podaci govore u prilog tome da su čimbenici koji su odgovorni za pozicioniranje neuroplastina u splavima prisutni u ovome mišu.

Pozicioniranje Np55 u membranskim domenama maloga mozga divljeg tipa miša pokazuje veću prisutnost u splavima, kao i u korteksu. S druge strane u *B4galnt1 null* mišu se u dobi od dva mjeseca, za razliku od kortikalne distribucije, gotovo tri četvrtine neuroplastina u

malome mozgu nalazi u splavima. Analiza submembranske raspodjele neuroplastina u malome mozgu *St3gal2/3 double-null* miša pokazuje da se u mišu sa suviškom GM1 i GD1b gangliozida Np55 uglavnom nalazi izvan splavi. Ovi rezultati pokazuju da se lipidni okoliš mora gledati uzimajući u obzir i druge karakteristike regije koja je zahvaćena promjenama jer se konstitutivni sastav gangliozida po regijama kore velikog mozga, hipokampusu i maloga mozga razlikuje i u divljeg tipa i u različitim mišjim modelima. Naime, poznate su regionalne razlike konstitutivnog sastava gangliozida koje su posebno izražene u ljudskome mozgu - primjerice u kori velikog mozga i hipokampusu prevladavaju gangliozidi a-serije, a za mali mozak je karakteristična veća zastupljenost b-serije gangliozida (103).

Svi ovi podaci doprinose hipotezi da izražaj i membransko pozicioniranje neuroplastina u velikoj mjeri ovisi o lipidnom (gangliozidnom) okolišu.

6.4. Promjene izražaja neuroplastina nisu praćene značajnom promjenom sastava gangliozida

Da bi se ispitalo postoji li i obrnuti odnos, odnosno postoji li ovisnost lipida o izražaju neuroplastina, analiziran je gangliozidni sastav regija mozga miševa kojima je isključena sinteza neuroplastina i odgovarajućih divljih tipova. Kvalitativna analiza primjenom tankoslojne kromatografije visoke razlučivosti nije otkrila nikakve razlike u gangliozidnom sastavu kore velikog mozga, hipokampusu ili maloga mozga miša koji ne sintetizira neuroplastin u usporedbi s divljim tipom miša (Slika 5.5.2.). Ovi podaci pokazuju da izražaj i sastav gangliozida ne ovise o izražaju neuroplastina, odnosno da promjena ili isključivanje sinteze jednog proteina nije dovoljna za promjenu lipidnog sastava membrane. S druge strane, promjena sinteze gangliozida mijenja njihovu koncentraciju i sastav u membrani te vjerojatno djeluje na izražaj i pozicioniranje više različitih proteina.

6.5. Prvi rezultati analize gangliozidnog sastava korteksa, hipokampusu i malog mozga u mišjem modelu za obiteljsku Alzheimerovu bolest ne pokazuju veće razlike u odnosu na kontrolna tkiva

Starija istraživanja pokazala su da se u ljudskome mozgu mijenja koncentracija i sastav gangliozida starenjem i u Alzheimerovoj bolesti (76, 99, 101-103, 117). Razvoj mišjih modela za nasljedni oblik Alzheimerove bolesti omogućio je istraživanja sastava gangliozida u različitim mišjim modelima neurodegeneracije. Pokazano je da sastav moždanih gangliozida

ovisi o ispitivanom mišjem modelu (111). Također treba napomenuti da se sva dosadašnja istraživanja gangliozidnog obrasca u mišjim modelima neurodegeneracije temelje na rezultatima analize i usporedbe velikog i malog mozga, dok ne postoje podaci o gangliozidnom sastavu hipokampusa u tim modelima (111). Iako među pojedinim mišjim modelima za Alzheimerovu bolest postoje razlike u sastavu i količini moždanih gangliozida, svima je zajednička promjena koja se odnosi na porast jednostavnijih gangliozida (GM2 i GM3) i smanjenje a- ili b-serije gangliozida. Budući da je ovaj nalaz koji se može povezati s promjenama gangliozidnog metabolizma prisutan i u ljudskom mozgu u Alzheimerovoj bolesti, zaključeno je da su istraživani mišji modeli pogodni za studije uloge lipida/gangliozida u mehanizmu neurodegeneracije.

Iako je biokemijski fenotip različitih mišjih modela za obiteljsku Alzheimerovu bolest prilično detaljno opisan u literaturi, ne postoje podaci o analizi gangliozidnog sastava moždanog tkiva 5xFAD miševa. Stoga je u ovom radu provedena imunohistokemijska i biokemijska analiza gangliozida u različitim regijama mozga ovog mišjeg modela u usporedbi s kontrolnim miševima. Prvo je imunohistokemijski analizirana imunoreaktivnost četiri najzastupljenija gangliozida (GM1, GD1a, GD1b i GT1b), a rezultati su pokazali da su gangliozidi b-serije zastupljeniji u regiji maloga mozga u odnosu na gangliozide a-serije, dok se gangliozidi a-serije, a u najvećoj mjeri GD1a prisutni u kori velikog mozga i u hipokampusu. Imunoreaktivnost u bijeloj tvari pokazuje samo GM1. GT1b i GD1a su receptori za MAG te služe stabiliziranju mijelinske ovojnice (177). Na imunohistokemijskoj razini ovi gangliozidi ne pokazuju reaktivnost u bijeloj tvari. Uzrok tome su skriveni epitopi ovih gangliozida koji se nalaze na aksonima ispod mijelinske ovojnice. Na imunohistokemijskoj razini nije primijećena razlika u ekspresiji GM1, GD1a, GD1b i GT1b u 5xFAD miševa u usporedbi s divljim tipovima.

Kvalitativna analiza primjenom kromatografskog razdvajanja gangliozidnih frakcija također nije pokazala značajne razlike između uspoređivanih skupina. Međutim, zbog malih početnih masa tkiva korištenog za izolaciju gangliozida, kao i selektivnog gubitka gangliozida u pojedinim koracima izolacije, nije bilo moguće provesti temeljitiju kvalitativnu analizu gangliozida. Također, kod analize gangliozidnog sastava mozga mišjih modela za neurodegeneraciju većina autora ne disecira hipokampus kao posebnu regiju, pa adekvatna usporedba s tim modelima nije u potpunosti moguća. Potrebno je detaljnije analizirati i

strukturno karakterizirati sastav gangliozida u moždanim regijama miševa 5xFAD, primjenom osjetljivijih metoda detekcije (spektrometrijom masa).

6.6. Detektiranje kompleksnog gangliozida odgovornog za pozicioniranje neuroplastina u membrani

Nakon podataka o važnosti kompleksnih gangliozida za pravilno pozicioniranje neuroplastina unutar membrane napravljena su imunofluorescentna bojenja primarnih kortikalnih i hipokampalnih kultura štakorskih neurona. Analizirana je kolokalizacija neuroplastinskih izoformi i četiri kompleksna gangliozida – GM1, GD1a, GD1b i GT1b (Slika 5.8.5). Očekivano, i neuroplastin i gangliozidi pokazuju membransku lokalizaciju. Gangliozidi a-serije GM1 i GD1a se u većoj mjeri nalaze na membranama dendrita i tijela neurona kao i neuroplastinske izoforme, odnosno na postsinaptičkim membranama. Gangliozidi b-serije GD1b i GT1b pokazuju bojenje na aksonima i presinaptičkoj membrani.

Analizom preklapanja imunoreaktivnosti pokazano je da je kompleksni gangliozid koji u najvećoj mjeri kolokalizira s neuroplastinom GM1. Ipak, kolokalizacija se prati tek iza 21. dana u kulturi kada neuroni počinju stvarati sinapse. Ovi podaci govore u prilog tome da GM1 nije važan za dostavljanje neuroplastina u membranu nakon sinteze, nego za njegovo pozicioniranje unutar splavi kada se javlja potreba za njegovom funkcijom u sinapsi.

Sveukupni rezultati iz ove disertacije podržavaju hipotezu da su gangliozidi, u najvećoj mjeri GM1, važni za izražaj i pravilno pozicioniranje neuroplastina unutar lipidnih splavi, a posljedično i za njegovu odgovarajuću funkciju.

6.7. Gangliozidi i neuroplastin sudjeluju u organizaciji sinaptičke membrane koja se mijenja u neurodegeneraciji

Pokazano je da se izražaj izoforme neuroplastina specifične za moždano tkivo koja ima neizostavnu ulogu u procesima učenja i pamćenja mijenja u tkivu zahvaćenim neurodegenerativnim promjenama neovisno o uzroku neurodegeneracije. U sporadičnom obliku AD dolazi do povećanja ekspresije neuroplastina, i to u ranijim fazama bolesti, a u mišjem modelu genetski inducirane neurodegeneracije dolazi do smanjenja neuroplastina i PMCA.

S obzirom na opisanu ovisnost izražaja i pozicioniranja neuroplastina o gangliozidima, i poznate podatke o promjeni lipidnog sastava membrane u neurodegeneraciji, potvrđena je hipoteza da se neuroplastin djelomično mijenja zbog promijenjenog lipidnog sastava. Ipak, zbog promjene izražaja neuroplastina u modelu neurodegeneracije koju ne prate značajne promjene gangliozidnog sastava, vjerojatno na obje komponente neovisno utječu procesi neurodegeneracije, a promjene gangliozidnog sastava dodatno mijenjaju pozicioniranje i pravilno funkcioniranje neuroplastina i komponenti koje ovise o neuroplastinu.

Gangliozidi su temeljne sastavnice lipidnih splavi, ali vjerojatno postoje različite vrste splavi ovisno o tome koji od kompleksnih gangliozida dominira njihovim sastavom. Neuroplastin se najvjerojatnije nalazi u splavima u kojima je dominantna komponenta GM1. U Alzheimerovoj bolesti i u mišjem modelu neurodegeneracije amiloidno procesiranje APP-a zahtijeva pozicioniranje svih komponenti uključenih u amiloidogeni put, APP-a, β - i γ -sekretaze unutar iste lipidne splavi. Unutar splavi, GM1 omogućuje konformacijsku promjenu $A\beta$ te usmjerava procesiranje APP-a prema stvaranju toksičnog $A\beta$ i kasnije stvaranje netopivih fibrila (2, 70, 71). Moguće je da toksično djelovanje $A\beta$ uzrokuje smrt sinapsi, a neuroplastin je jedna od komponenata koja promjenom svog izražaja pokušava kompenzirati navedena oštećenja.

Zbirni prikaz nalaza ove i drugih studija koji se odnose na promjene izražaja neuroplastina i njegovo pozicioniranje u membrani, ovisno o mišjem modelu ili uzroku neurodegeneracije pokazan je u Tablici 6.7.1. Također je prikazana i promjena izražaja PMCA u različitim mišjim modelima.

Nakon svih prikazanih rezultata i u skladu s objavljenom literaturom predlažemo da je neuroplastin molekula stanične adhezije koja svojim normalnim izražajem, pravilnim pozicioniranjem unutar lipidnih splavi posredstvom GM1 te funkcijom regulacije unutarstaničnih kalcijevih iona preko utjecaja na PMCA jedan od sudionika u patofiziologiji Alzheimerove bolesti zbog čijeg se poremećenog izražaja očituju simptomi vezani uz poremećaje pamćenja. Iako su poremećaji pamćenja dominantan klinički simptom Alzheimerove bolesti, oni su samo dio složene kliničke slike u kojoj se između ostalog javljaju i poremećaji spavanja, promjene osobnosti i kognitivno nazadovanje. Rasvjetljavanje molekularnih mehanizama patogeneze Alzheimerove bolesti stoga zahtijeva da se umjesto otkrivanja i analize pojedinačnih komponenti važnih za svaki aspekt ove kompleksne bolesti,

u kompoziciji konačne uzročno-posljedične patološke kaskade sagledaju udružena međudjelovanja različitih patogenetskih faktora.

Tablica 6.7.1. Zbirni prikaz promjene izražaja i pozicioniranja neuroplastina u membrani u različitim mišjim modelima te u sporadičnoj ljudskoj AD, kao i promjene sastava i izražaja gangliozida i PMCA u različitim modelima i u sporadičnoj ljudskoj AD

Model	Regija mozga	Gangliozidi	Neuroplastin	Udio Np* splavi/ ne-splavi (%)	PMCA
Divlji tip miša i štakora	Kora velikog mozga	GM1; GD1a; GD1b; GT1b ⁽⁷²⁾	Np65; Np55 ⁽¹⁵²⁾	Np65 65/35	PMCA (198)
	Mali mozak		Np55 ⁽¹⁵⁸⁾	Np55 56/44	PMCA ⁽¹⁹⁸⁾
B4galnt1 null miš	Kora velikog mozga	x GM1; x GD1b; x GD1a; x GT1b;	↓ Np65; ↓ Np55 (WB)	Np65 43/57	N/A
	Hipokampus	↑ GM3; ↑ GD3 ⁽⁷²⁾	↑ Np55 ^(163, 164)	N/A	N/A
	Mali mozak		↑ Np55 ⁽¹⁶⁴⁾	Np55 72/28	N/A
ST3gal2/3 double null miš	Kora velikog mozga	↑ GM1; ↑ GD1b; x GD1a; x GT1b ⁽⁷²⁾	↑ Np65; ↑ Np55 (WB)	Np65 59/41	N/A
	Mali mozak		N/A	Np55 40/60	N/A
Sporadična AD u ljudi	Hipokampus	↓ GM1; ↓ GD1b; ↓ GD1a; ↓ GT1b; ↑ GM2; ↑ GM3; ↑ GM4 ^(98, 99, 102, 115)	↑ Np65 (IHC)	N/A	↓ ^(196, 198)
5xFAD miš	Sve regije	Bez promjene	↓ Np65 (WB, IHC)	N/A	↓ (WB, IHC)
Neuroplastin null miš	Sve regije	Bez promjene	x ^(159, 178)	N/A	↓ ⁽¹⁵⁹⁾

x – nema izražaja; ↑ - povećani izražaj; ↓ - smanjeni izražaj; način detekcije promjene izražaja: WB – metoda *Western blot*; IHC – imunohistokemijska metoda; *podaci se odnose na dob od 2 mjeseca; N/A – nije analizirano.

7. ZAKLJUČCI

- 1) U sporadičnom obliku Alzheimerove bolesti dolazi do povećane ekspresije neuroplastina u hipokampalnoj regiji, i to u ranijim fazama bolesti, a uzorak ekspresije u tkivu ocrta podslujeve neurona uključene u trisinaptički put informacija iz entorinalnog korteksa prema hipokampusu. Iako je uzorak imunoreaktivnosti ostao isti, u sporadičnoj Alzheimerovoj bolesti zbog povećanja ekspresije neuroplastina u molekularnom sloju, girus dentatus postaje regija s najvećom ekspresijom neuroplastina.
- 2) Za razliku od ljudskog hipokampusa zahvaćenog sporadičnom Alzheimerovom bolešću, u kori velikog mozga i u hipokampusu mišjeg modela obiteljske Alzheimerove bolesti (5xFAD) dolazi do smanjenja izražaja izoforme Np65 u usporedbi s divljim tipom miša. Ovaj nalaz je najvjerojatnije posljedica ograničenja kompenzatornih mehanizama u kojima sudjeluje neuroplastin uslijed genetički uzrokovanih ranih i opsežnih neuropatoloških promjena u 5xFAD mišjem modelu te razlike u etiopatogenezi bolesti u ljudi i miševa.
- 3) U kori velikog mozga i u hipokampusu miševa 5xFAD u usporedbi s miševima divljeg tipa uočen je također manji izražaj kalcijske ATP-aze PMCA, što potvrđuje ne samo prije dokazanu funkcionalnu povezanost izražaja neuroplastina i PMCA u mišjem mozgu, već i moguću ulogu oba membranska proteina u neuropatološkoj kaskadi neurodegeneracije.
- 4) U korteksu, hipokampusu i malom mozgu mišjeg modela neurodegeneracije 5xFAD ne dolazi do značajnijih promjena sastava složenih gangliozida u usporedbi s mišem divljeg tipa. Također, gangliozidni sastav regija mišjeg mozga ne ovisi o ekspresiji neuroplastina što je pokazano usporedbom tkiva mozga mišjeg modela koji ne sintetizira neuroplastin i divljeg tipa.
- 5) S druge strane, izražaj obiju neuroplastinskih izoformi, neuroplastina 55 i neuroplastina 65, ovisi o gangliozidnom sastavu membrane u kori velikog mozga i u malome mozgu što je potvrđeno analizom ekspresije membranskih proteina u miševa *B4galnt1 null* i *St3gal2/3 double-null* s različitim sastavom gangliozida u odnosu na divlji tip miša.

- 6) Pozicioniranje neuroplastina u membranskim domenama ovisi o gangliozidnom sastavu što je potvrđeno analizom submembranske distribucije neuroplastina u membranama *B4galnt1 null* i *St3gal2/3 double-null* miševa s različitim sastavom gangliozida u odnosu na divlji tip miša.
- 7) Gangliozid a-serije GM1 je najvjerojatnije uključen u pozicioniranje neuroplastina unutar lipidnih splavi tijekom sinaptogeneze, što dokazuje nalaz specifičnog preklapanja imunofluorescentnog izražaja neuroplastina i gangliozida GM1 u živim štakorskim neuronalnim kulturama. Kolokalizacija GM1 i neuroplastina je opisana u neuronalnim kulturama tek nakon stvaranja prvih sinapsi, što dokazuje njihovo istovremeno sudjelovanje u procesu sinaptogeneze *in vitro*.
- 8) Sveukupno rezultati rada navode na zaključak da izražaj i membransko pozicioniranje neuroplastina ovise o gangliozidu GM1 i da su obje komponente uključene u neurodegenerativnu kaskadu. Potrebna su daljnja istraživanja da bi se odredilo u kojoj mjeri neurodegeneracija utječe na svaku pojedinu komponentu, a u kojoj mjeri su njihove međusobne interakcije odgovorne za promjene vezane uz neurodegeneraciju.

8. SAŽETAK

Naslov: "Povezanost sastava gangliozida i izražaja neuroplastina s neurodegenerativnim promjenama"

Student: Katarina Ilić, dr. med.

Godina: 2018.

Neuroplastin je glikozilirani transmembranski protein čije pozicioniranje u membrani ovisi o njezinom gangliozidnom sastavu. U ovoj disertaciji istražene su promjene neuroplastina u neurodegeneraciji.

U uzorcima ljudskog hipokampusa zahvaćenima sporadičnom Alzheimerovom patologijom pokazano je da je uzorak ekspresije neuroplastina jednak kontrolnome, odnosno da se nalazi u membranama i dendritima glutamatergičnih neurona trisinaptičkog puta, ali je izražaj značajno povećan, pogotovo u regijama girusa dentatusa i subikuluma u ranoj fazi bolesti.

U mišjem transgeničnom modelu nasljedne Alzheimerove bolesti izražaj neuroplastina, i s njim povezane kalcijske ATP-aze, je manji u kori velikog mozga i hipokampusu u odnosu na divlji tip, što može predstavljati molekularnu podlogu poremećaja mehanizama pamćenja. Izražaj neuroplastina i njegovo pozicioniranje unutar membranskih domena izravno ovisi o promijenjenom gangliozidnom sastavu membrane što pokazuju rezultati analize izoliranih membranskih frakcija moždanog tkiva različitih mišjih modela s poremećenom sintezom i sastavom gangliozida. Istraživanje *in vitro* je pokazalo da GM1, kompleksni gangliozid a-serije, u najvećoj mjeri kolokalizira s neuroplastinom i najvjerojatnije je odgovoran za njegovo pozicioniranje unutar lipidnih splavi.

Zbog do sada opisanih promjena membranskih domena u neurodegeneraciji, te u ovoj disertaciji razjašnjenog uvjetovanja izražaja i membranske pozicije neuroplastina o gangliozidima, zaključujemo da neuropatološka kaskada Alzheimerove bolesti zahvaća i molekulu stanične adhezije neuroplastin. Promjene ekspresije neuroplastina dovode do poremećene stanične signalizacije ovisne o kalcijevim ionima i nemogućnosti održavanja molekularnih mehanizama odgovornih za učenje i pamćenje.

9. SUMMARY

Title: "Association of ganglioside composition and neuroplastin expression with neurodegenerative changes"

PhD student: Katarina Ilić, MD

Year: 2018

Neuroplastin is a highly glycosylated transmembrane protein whose membrane positioning is dependent on membrane ganglioside composition. In this thesis, we investigated changes of neuroplastin expression in neurodegeneration.

In human hippocampal tissue affected by sporadic Alzheimer's disease (AD), we show that neuroplastin immunoreactivity pattern is similar to control pattern, namely in cell bodies and dendrites of glutamatergic neurons of the trisynaptic pathway. Neuroplastin immunoreactivity is highly increased in AD, particularly in the dentate gyrus and subiculum in early stages of the disease.

In a transgenic mouse model of familial AD, neuroplastin and plasma membrane calcium ATP-ase expression are decreased in cortex and hippocampus when compared to wild-type mice. This finding may be attributed to changed molecular mechanisms of learning and memory disorder. Neuroplastin expression and its positioning within membrane domains is highly dependent on ganglioside composition and thus directly affected when membrane ganglioside composition is altered, as shown by analysis of isolated membrane fractions derived from brain tissue of different mice models with aberrant ganglioside synthesis. *In vitro* studies showed that GM1, a complex a-series ganglioside, predominantly co-localizes with neuroplastin and is probably responsible for its positioning within lipid rafts.

Based on joined data of already described alterations of membrane domains in neurodegeneration and here presented association of expression and membrane positioning of neuroplastin with ganglioside composition, we conclude that neuropathological cascade in Alzheimer's disease affects cell-adhesion molecule neuroplastin. Changed neuroplastin expression leads to altered cell calcium signaling and inability to maintain learning and memory molecular mechanisms.

10. LITERATURA

1. Egawa J, Pearn ML, Lemkuil BP, Patel PM, Head BP. Membrane lipid rafts and neurobiology: age-related changes in membrane lipids and loss of neuronal function. *J Physiol*. 2016;594(16):4565-79.
2. Sonnino S, Aureli M, Grassi S, Mauri L, Prioni S, Prinetti A. Lipid rafts in neurodegeneration and neuroprotection. *Mol Neurobiol*. 2014;50(1):130-48.
3. Ingolfsson HI, Melo MN, van Eerden FJ, Arnarez C, Lopez CA, Wassenaar TA, et al. Lipid organization of the plasma membrane. *J Am Chem Soc*. 2014;136(41):14554-9.
4. Ingolfsson HI, Carpenter TS, Bhatia H, Bremer PT, Marrink SJ, Lightstone FC. Computational Lipidomics of the Neuronal Plasma Membrane. *Biophys J*. 2017;113(10):2271-80.
5. Apajalahti T, Niemela P, Govindan PN, Miettinen MS, Salonen E, Marrink SJ, et al. Concerted diffusion of lipids in raft-like membranes. *Faraday Discuss*. 2010;144:411-30; discussion 45-81.
6. Bennett WF, MacCallum JL, Hinner MJ, Marrink SJ, Tieleman DP. Molecular view of cholesterol flip-flop and chemical potential in different membrane environments. *J Am Chem Soc*. 2009;131(35):12714-20.
7. Bennett WF, Tieleman DP. Computer simulations of lipid membrane domains. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828(8):1765-76.
8. Veatch SL, Keller SL. Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin. *Phys Rev Lett*. 2005;94(14):148101.
9. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997;387(6633):569-72.
10. Friedrichson T, Kurzchalia TV. Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature*. 1998;394(6695):802-5.
11. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*. 2010;327(5961):46-50.
12. Simons K, Vaz WL. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2004;33:269-95.
13. Huang J, Feigenson GW. A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. *Biophys J*. 1999;76(4):2142-57.
14. McConnell HM, Vrljic M. Liquid-liquid immiscibility in membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2003;32:469-92.
15. Skibbens JE, Roth MG, Matlin KS. Differential extractability of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and nonpolar fibroblasts. *J Cell Biol*. 1989;108(3):821-32.
16. Sargiacomo M, Sudol M, Tang Z, Lisanti MP. Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol*. 1993;122(4):789-807.
17. Danielsen EM, van Deurs B. A transferrin-like GPI-linked iron-binding protein in detergent-insoluble noncaveolar microdomains at the apical surface of fetal intestinal epithelial cells. *J Cell Biol*. 1995;131(4):939-50.
18. Colin J, Gregory-Pauron L, Lanhers MC, Claudepierre T, Corbier C, Yen FT, et al. Membrane raft domains and remodeling in aging brain. *Biochimie*. 2016;130:178-87.
19. Ostrom RS, Insel PA. The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *Br J Pharmacol*. 2004;143(2):235-45.
20. Maguy A, Hebert TE, Nattel S. Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function. *Cardiovasc Res*. 2006;69(4):798-807.
21. Suzuki S, Numakawa T, Shimazu K, Koshimizu H, Hara T, Hatanaka H, et al. BDNF-induced recruitment of TrkB receptor into neuronal lipid rafts: roles in synaptic modulation. *J Cell Biol*. 2004;167(6):1205-15.
22. Pryor S, McCaffrey G, Young LR, Grimes ML. NGF causes TrkA to specifically attract microtubules to lipid rafts. *PloS one*. 2012;7(4):e35163.
23. Pereira DB, Chao MV. The tyrosine kinase Fyn determines the localization of TrkB receptors in lipid rafts. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(18):4859-69.

24. Sebastiao AM, Colino-Oliveira M, Assaife-Lopes N, Dias RB, Ribeiro JA. Lipid rafts, synaptic transmission and plasticity: impact in age-related neurodegenerative diseases. *Neuropharmacology*. 2013;64:97-107.
25. Lorent JH, Levental I. Structural determinants of protein partitioning into ordered membrane domains and lipid rafts. *Chem Phys Lipids*. 2015;192:23-32.
26. Pike LJ. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res*. 2006;47(7):1597-8.
27. Santos AL, Preta G. Lipids in the cell: organisation regulates function. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(11):1909-27.
28. Hanzal-Bayer MF, Hancock JF. Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Lett*. 2007;581(11):2098-104.
29. Stuermer CA. The reggie/flotillin connection to growth. *Trends Cell Biol*. 2010;20(1):6-13.
30. Stuermer CA. Reggie/flotillin and the targeted delivery of cargo. *Journal of neurochemistry*. 2011;116(5):708-13.
31. Babuke T, Tikkanen R. Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *Eur J Cell Biol*. 2007;86(9):525-32.
32. Phillips R, Ursell T, Wiggins P, Sens P. Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature*. 2009;459(7245):379-85.
33. Ledesma MD, Martin MG, Dotti CG. Lipid changes in the aged brain: effect on synaptic function and neuronal survival. *Prog Lipid Res*. 2012;51(1):23-35.
34. Martin M, Dotti CG, Ledesma MD. Brain cholesterol in normal and pathological aging. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801(8):934-44.
35. Henley JM, Wilkinson KA. AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging. *Dialogues Clin Neurosci*. 2013;15(1):11-27.
36. van Meer G. Cellular lipidomics. *EMBO J*. 2005;24(18):3159-65.
37. Fernandez C, Sandin M, Sampaio JL, Almgren P, Narkiewicz K, Hoffmann M, et al. Plasma lipid composition and risk of developing cardiovascular disease. *PloS one*. 2013;8(8):e71846.
38. Holthuis JC, Menon AK. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature*. 2014;510(7503):48-57.
39. Vance JE, Hayashi H. Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801(8):806-18.
40. Svennerholm L. Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids. *Prog Brain Res*. 1994;101:XI-XIV.
41. Posse de Chaves E, Sipione S. Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction. *FEBS Lett*. 2010;584(9):1748-59.
42. Soderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G. Lipid compositions of different regions of the human brain during aging. *Journal of neurochemistry*. 1990;54(2):415-23.
43. Yamamoto N, Matsubara T, Sato T, Yanagisawa K. Age-dependent high-density clustering of GM1 ganglioside at presynaptic neuritic terminals promotes amyloid beta-protein fibrillogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(12):2717-26.
44. Sodero AO, Trovo L, Iannilli F, Van Veldhoven P, Dotti CG, Martin MG. Regulation of tyrosine kinase B activity by the Cyp46/cholesterol loss pathway in mature hippocampal neurons: relevance for neuronal survival under stress and in aging. *Journal of neurochemistry*. 2011;116(5):747-55.
45. Lutjohann D, Breuer O, Ahlborg G, Nennesmo I, Siden A, Diczfalusy U, et al. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(18):9799-804.
46. Lund EG, Guileyardo JM, Russell DW. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(13):7238-43.
47. Thelen KM, Falkai P, Bayer TA, Lutjohann D. Cholesterol synthesis rate in human hippocampus declines with aging. *Neuroscience letters*. 2006;403(1-2):15-9.

48. Trovo L, Van Veldhoven PP, Martin MG, Dotti CG. Sphingomyelin upregulation in mature neurons contributes to TrkB activity by Rac1 endocytosis. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 8):1308-15.
49. Valaperta R, Chigorno V, Basso L, Prinetti A, Bresciani R, Preti A, et al. Plasma membrane production of ceramide from ganglioside GM3 in human fibroblasts. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2006;20(8):1227-9.
50. Sackett SJ, Chung HY, Okajima F, Im DS. Increase in sphingolipid catabolic enzyme activity during aging. *Acta Pharmacol Sin.* 2009;30(10):1454-61.
51. Wolf AA, Jobling MG, Wimer-Mackin S, Ferguson-Maltzman M, Madara JL, Holmes RK, et al. Ganglioside structure dictates signal transduction by cholera toxin and association with caveolae-like membrane domains in polarized epithelia. *J Cell Biol.* 1998;141(4):917-27.
52. Prinetti A, Chigorno V, Prioni S, Loberto N, Marano N, Tettamanti G, et al. Changes in the lipid turnover, composition, and organization, as sphingolipid-enriched membrane domains, in rat cerebellar granule cells developing in vitro. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276(24):21136-45.
53. Jiang L, Fang J, Moore DS, Gogichaeva NV, Galeva NA, Michaelis ML, et al. Age-associated changes in synaptic lipid raft proteins revealed by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis. *Neurobiol Aging.* 2010;31(12):2146-59.
54. Arendt T. Disturbance of neuronal plasticity is a critical pathogenetic event in Alzheimer's disease. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience.* 2001;19(3):231-45.
55. O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci.* 2011;34:185-204.
56. Roch JM, Masliah E, Roch-Levecq AC, Sundsmo MP, Otero DA, Veinbergs I, et al. Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1994;91(16):7450-4.
57. Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, et al. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1998;95(21):12683-8.
58. Marin R, Rojo JA, Fabelo N, Fernandez CE, Diaz M. Lipid raft disarrangement as a result of neuropathological progresses: a novel strategy for early diagnosis? *Neuroscience.* 2013;245:26-39.
59. Fabelo N, Martin V, Marin R, Moreno D, Ferrer I, Diaz M. Altered lipid composition in cortical lipid rafts occurs at early stages of sporadic Alzheimer's disease and facilitates APP/BACE1 interactions. *Neurobiol Aging.* 2014;35(8):1801-12.
60. Ehehalt 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(1):113-23.
61. Das U, Scott DA, Ganguly A, Koo EH, Tang Y, Roy S. Activity-induced convergence of APP and BACE-1 in acidic microdomains via an endocytosis-dependent pathway. *Neuron.* 2013;79(3):447-60.
62. Rajendran L, Masilamani M, Solomon S, Tikkanen R, Stuermer CA, Plattner H, et al. Asymmetric localization of flotillins/reggies in preassembled platforms confers inherent polarity to hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003;100(14):8241-6.
63. Vetrivel KS, Thinakaran G. Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801(8):860-7.
64. Bhattacharyya R, Barren C, Kovacs DM. Palmitoylation of amyloid precursor protein regulates amyloidogenic processing in lipid rafts. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2013;33(27):11169-83.
65. Sakurai T, Kaneko K, Okuno M, Wada K, Kashiyama T, Shimizu H, et al. Membrane microdomain switching: a regulatory mechanism of amyloid precursor protein processing. *J Cell Biol.* 2008;183(2):339-52.

66. Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ. Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(11):6382-7.
67. Cheng H, Vetrivel KS, Drisdell RC, Meckler X, Gong P, Leem JY, et al. S-palmitoylation of gamma-secretase subunits nicastrin and APH-1. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(3):1373-84.
68. Grimm MO, Grosgen S, Rothhaar TL, Burg VK, Hundsdorfer B, Hauptenthal VJ, et al. Intracellular APP Domain Regulates Serine-Palmitoyl-CoA Transferase Expression and Is Affected in Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis*. 2011;2011:695413.
69. Grimm MO, Kuchenbecker J, Rothhaar TL, Grosgen S, Hundsdorfer B, Burg VK, et al. Plasmalogen synthesis is regulated via alkyl-dihydroxyacetonephosphate-synthase by amyloid precursor protein processing and is affected in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*. 2011;116(5):916-25.
70. Yanagisawa K, Odaka A, Suzuki N, Ihara Y. GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (A beta): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease. *Nat Med*. 1995;1(10):1062-6.
71. Kakio A, Nishimoto SI, Yanagisawa K, Kozutsumi Y, Matsuzaki K. Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(27):24985-90.
72. Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol Rev*. 2014;94(2):461-518.
73. Svennerholm L. Chromatographic Separation of Human Brain Gangliosides. *Journal of neurochemistry*. 1963;10:613-23.
74. Svennerholm L. Ganglioside designation. *Adv Exp Med Biol*. 1980;125:11.
75. Svennerholm L, Bostrom K, Jungbjer B, Olsson L. Membrane lipids of adult human brain: lipid composition of frontal and temporal lobe in subjects of age 20 to 100 years. *Journal of neurochemistry*. 1994;63(5):1802-11.
76. Kracun I, Rosner H, Drnovsek V, Vukelic Z, Cosovic C, Trbojevic-Cepe M, et al. Gangliosides in the human brain development and aging. *Neurochem Int*. 1992;20(3):421-31.
77. Mlinac K, Bogner SK. Role of gangliosides in brain aging and neurodegeneration. *Translational Neuroscience*. 2010;1(4):300-7.
78. Takashima S, Matsumoto T, Tsujimoto M, Tsuji S. Effects of amino acid substitutions in the sialyl motifs on molecular expression and enzymatic activities of alpha2,8-sialyltransferases ST8Sia-I and ST8Sia-VI. *Glycobiology*. 2013;23(5):603-12.
79. Derrington EA, Masco D, Whittaker VP. Confirmation of the cholinergic specificity of the Chol-1 gangliosides in mammalian brain using affinity-purified antisera and lesions affecting the cholinergic input to the hippocampus. *Journal of neurochemistry*. 1989;53(6):1686-92.
80. Dobrovic B, Curic G, Petanjek Z, Heffer M. Dendritic morphology and spine density is not altered in motor cortex and dentate granular cells in mice lacking the ganglioside biosynthetic gene B4galnt1 - A quantitative Golgi cox study. *Coll Antropol*. 2011;35 Suppl 1:25-30.
81. Ma Q, Kobayashi M, Sugiura M, Ozaki N, Nishio K, Shiraishi Y, et al. Morphological study of disordered myelination and the degeneration of nerve fibers in the spinal cord of mice lacking complex gangliosides. *Arch Histol Cytol*. 2003;66(1):37-44.
82. Pan B, Fromholt SE, Hess EJ, Crawford TO, Griffin JW, Sheikh KA, et al. Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and PNS: neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice. *Exp Neurol*. 2005;195(1):208-17.
83. Sheikh KA, Sun J, Liu Y, Kawai H, Crawford TO, Proia RL, et al. Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(13):7532-7.

84. Susuki K, Baba H, Tohyama K, Kanai K, Kuwabara S, Hirata K, et al. Gangliosides contribute to stability of paranodal junctions and ion channel clusters in myelinated nerve fibers. *Glia*. 2007;55(7):746-57.
85. Yamashita T, Wu YP, Sandhoff R, Werth N, Mizukami H, Ellis JM, et al. Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glia interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(8):2725-30.
86. Yamashita T, Wada R, Sasaki T, Deng C, Bierfreund U, Sandhoff K, et al. A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(16):9142-7.
87. Sturgill ER, Aoki K, Lopez PH, Colacurcio D, Vajn K, Lorenzini I, et al. Biosynthesis of the major brain gangliosides GD1a and GT1b. *Glycobiology*. 2012;22(10):1289-301.
88. Regina Todeschini A, Hakomori SI. Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(3):421-33.
89. Doherty P, Dickson JG, Flanigan TP, Walsh FS. Ganglioside GM1 does not initiate, but enhances neurite regeneration of nerve growth factor-dependent sensory neurones. *Journal of neurochemistry*. 1985;44(4):1259-65.
90. Mutoh T, Tokuda A, Miyadai T, Hamaguchi M, Fujiki N. Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(11):5087-91.
91. Ichikawa N, Iwabuchi K, Kurihara H, Ishii K, Kobayashi T, Sasaki T, et al. Binding of laminin-1 to monosialoganglioside GM1 in lipid rafts is crucial for neurite outgrowth. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 2):289-99.
92. Gorio A. Ganglioside enhancement of neuronal differentiation, plasticity, and repair. *CRC Crit Rev Clin Neurobiol*. 1986;2(3):241-96.
93. Quarles RH. Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *Journal of neurochemistry*. 2007;100(6):1431-48.
94. Kelm S, Pelz A, Schauer R, Filbin MT, Tang S, de Bellard ME, et al. Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Curr Biol*. 1994;4(11):965-72.
95. Schnaar RL. Brain gangliosides in axon-myelin stability and axon regeneration. *FEBS Lett*. 2010;584(9):1741-7.
96. Svennerholm L, Bostrom K, Fredman P, Mansson JE, Rosengren B, Rynmark BM. Human brain gangliosides: developmental changes from early fetal stage to advanced age. *Biochim Biophys Acta*. 1989;1005(2):109-17.
97. Crino PB, Ullman MD, Vogt BA, Bird ED, Volicer L. Brain gangliosides in dementia of the Alzheimer type. *Arch Neurol*. 1989;46(4):398-401.
98. Kracun I, Kalanj S, Talan-Hranilovic J, Cosovic C. Cortical distribution of gangliosides in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 1992;20(3):433-8.
99. Kalanj S, Kracun I, Rosner H, Cosovic C. Regional distribution of brain gangliosides in Alzheimer's disease. *Neurol Croat*. 1991;40(4):269-81.
100. Svennerholm L. Ganglioside loss is a primary event in Alzheimer disease type I. *Prog Brain Res*. 1994;101:391-404.
101. Svennerholm L, Gottfries CG. Membrane lipids, selectively diminished in Alzheimer brains, suggest synapse loss as a primary event in early-onset form (type I) and demyelination in late-onset form (type II). *Journal of neurochemistry*. 1994;62(3):1039-47.
102. Kracun I, Kalanj S, Cosovic C, Talan-Hranilovic J. Brain gangliosides in Alzheimer's disease. *J Hirnforsch*. 1990;31(6):789-93.
103. Kracun I, Rosner H, Drnovsek V, Heffer-Lauc M, Cosovic C, Lauc G. Human brain gangliosides in development, aging and disease. *Int J Dev Biol*. 1991;35(3):289-95.

104. Molander-Melin M, Blennow K, Bogdanovic N, Dellheden B, Mansson JE, Fredman P. Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional disease development; increased density of gangliosides GM1 and GM2 and loss of cholesterol in detergent-resistant membrane domains. *Journal of neurochemistry*. 2005;92(1):171-82.
105. Pernber Z, Blennow K, Bogdanovic N, Mansson JE, Blomqvist M. Altered distribution of the gangliosides GM1 and GM2 in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2012;33(2-3):174-88.
106. Michel V, Bakovic M. Lipid rafts in health and disease. *Biol Cell*. 2007;99(3):129-40.
107. Nicastro MC, Spigolon D, Librizzi F, Moran O, Ortore MG, Bulone D, et al. Amyloid beta-peptide insertion in liposomes containing GM1-cholesterol domains. *Biophys Chem*. 2016;208:9-16.
108. Choo-Smith LP, Garzon-Rodriguez W, Glabe CG, Surewicz WK. Acceleration of amyloid fibril formation by specific binding of Aβeta-(1-40) peptide to ganglioside-containing membrane vesicles. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(37):22987-90.
109. McLaurin J, Chakrabartty A. Membrane disruption by Alzheimer beta-amyloid peptides mediated through specific binding to either phospholipids or gangliosides. Implications for neurotoxicity. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(43):26482-9.
110. Matsuzaki K, Horikiri C. Interactions of amyloid beta-peptide (1-40) with ganglioside-containing membranes. *Biochemistry*. 1999;38(13):4137-42.
111. Barrier L, Ingrand S, Damjanac M, Rioux Bilan A, Hugon J, Page G. Genotype-related changes of ganglioside composition in brain regions of transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2007;28(12):1863-72.
112. Ariga T, Yanagisawa M, Wakade C, Ando S, Buccafusco JJ, McDonald MP, et al. Ganglioside metabolism in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: expression of Chol-1α antigens in the brain. *ASN Neuro*. 2010;2(4):e00044.
113. Ariga T, Itokazu Y, McDonald MP, Hirabayashi Y, Ando S, Yu RK. Brain gangliosides of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease with deficiency in GD3-synthase: expression of elevated levels of a cholinergic-specific ganglioside, GT1α. *ASN Neuro*. 2013;5(2):141-8.
114. Bernardo A, Harrison FE, McCord M, Zhao J, Bruchey A, Davies SS, et al. Elimination of GD3 synthase improves memory and reduces amyloid-beta plaque load in transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2009;30(11):1777-91.
115. Ariga T, McDonald MP, Yu RK. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease--a review. *J Lipid Res*. 2008;49(6):1157-75.
116. Keilani S, Lun Y, Stevens AC, Williams HN, Sjoberg ER, Khanna R, et al. Lysosomal dysfunction in a mouse model of Sandhoff disease leads to accumulation of ganglioside-bound amyloid-beta peptide. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(15):5223-36.
117. Blennow K, Davidsson P, Wallin A, Fredman P, Gottfries CG, Mansson JE, et al. Differences in cerebrospinal fluid gangliosides between "probable Alzheimer's disease" and normal aging. *Aging (Milano)*. 1992;4(4):301-6.
118. Yanagisawa M, Ariga T, Yu RK. Fucosyl-GM1 expression and amyloid-beta protein accumulation in PC12 cells. *J Neurosci Res*. 2006;84(6):1343-9.
119. Yamamoto N, Matsuzaki K, Yanagisawa K. Cross-seeding of wild-type and hereditary variant-type amyloid beta-proteins in the presence of gangliosides. *Journal of neurochemistry*. 2005;95(4):1167-76.
120. Flicker C, Ferris SH, Kalkstein D, Serby M. A double-blind, placebo-controlled crossover study of ganglioside GM1 treatment for Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry*. 1994;151(1):126-9.
121. Winer JB. Guillain Barre syndrome. *Mol Pathol*. 2001;54(6):381-5.
122. Chapman J, Bachar O, Korczyn AD, Wertman E, Michaelson DM. Antibodies to cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*. 1988;51(2):479-85.
123. Miura Y, Miyaji K, Chai YL, Chen CL, Lai MK, Yuki N. Autoantibodies to GM1 and GQ1β are not biological markers of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2014;42(4):1165-9.

124. Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2003;348(14):1356-64.
125. Uboga NV, Price JL. Formation of diffuse and fibrillar tangles in aging and early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000;21(1):1-10.
126. Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15056.
127. Braak H, Braak E. Alzheimer's disease affects limbic nuclei of the thalamus. *Acta neuropathologica*. 1991;81(3):261-8.
128. Braak H, Braak E. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging*. 1995;16(3):271-8; discussion 8-84.
129. Gotz J, Schonrock N, Vissel B, Ittner LM. Alzheimer's disease selective vulnerability and modeling in transgenic mice. *J Alzheimers Dis*. 2009;18(2):243-51.
130. Bellucci A, Rosi MC, Grossi C, Fiorentini A, Luccarini I, Casamenti F. Abnormal processing of tau in the brain of aged TgCRND8 mice. *Neurobiol Dis*. 2007;27(3):328-38.
131. Terzi E, Holzemann G, Seelig J. Self-association of beta-amyloid peptide (1-40) in solution and binding to lipid membranes. *J Mol Biol*. 1995;252(5):633-42.
132. Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 2002;298(5594):789-91.
133. Artiga MJ, Bullido MJ, Sastre I, Recuero M, Garcia MA, Aldudo J, et al. Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. *FEBS Lett*. 1998;421(2):105-8.
134. Ashford JW. APOE genotype effects on Alzheimer's disease onset and epidemiology. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2004;23(3):157-65.
135. DeMattos RB, Cirrito JR, Parsadanian M, May PC, O'Dell MA, Taylor JW, et al. ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo. *Neuron*. 2004;41(2):193-202.
136. Schulman H. Protein phosphorylation in neuronal plasticity and gene expression. *Curr Opin Neurobiol*. 1995;5(3):375-81.
137. Tokuda M, Hatase O. Regulation of neuronal plasticity in the central nervous system by phosphorylation and dephosphorylation. *Mol Neurobiol*. 1998;17(1-3):137-56.
138. Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron*. 1992;8(1):159-68.
139. Saitoh T, Horsburgh K, Masliah E. Hyperactivation of signal transduction systems in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;695:34-41.
140. Benson DL, Schnapp LM, Shapiro L, Huntley GW. Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends Cell Biol*. 2000;10(11):473-82.
141. Mikkonen M, Soininen H, Tapiola T, Alafuzoff I, Miettinen R. Hippocampal plasticity in Alzheimer's disease: changes in highly polysialylated NCAM immunoreactivity in the hippocampal formation. *The European journal of neuroscience*. 1999;11(5):1754-64.
142. Trancikova A, Ramonet D, Moore DJ. Genetic mouse models of neurodegenerative diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2011;100:419-82.
143. Mullan M, Houlden H, Windelspecht M, Fidani L, Lombardi C, Diaz P, et al. A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1-antichymotrypsin gene. *Nat Genet*. 1992;2(4):340-2.
144. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995;375(6534):754-60.
145. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 1995;269(5226):973-7.
146. Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, et al. 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(6543):775-8.
147. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's

disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(40):10129-40.

148. Langnaese K, Mummery R, Gundelfinger ED, Beesley PW. Immunoglobulin superfamily members gp65 and gp55: tissue distribution of glycoforms. *FEBS Lett*. 1998;429(3):284-8.

149. Langnaese K, Seidenbecher C, Wex H, Seidel B, Hartung K, Appeltauer U, et al. Protein components of a rat brain synaptic junctional protein preparation. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996;42(1):118-22.

150. Wilson DJ, Kim DS, Clarke GA, Marshall-Clarke S, Moss DJ. A family of glycoproteins (GP55), which inhibit neurite outgrowth, are members of the Ig superfamily and are related to OBCAM, neurotrimin, LAMP and CEPU-1. *J Cell Sci*. 1996;109 (Pt 13):3129-38.

151. Owczarek S, Soroka V, Kiryushko D, Larsen MH, Yuan Q, Sandi C, et al. Neuroplastin-65 and a mimetic peptide derived from its homophilic binding site modulate neuriteogenesis and neuronal plasticity. *Journal of neurochemistry*. 2011;117(6):984-94.

152. Beesley PW, Herrera-Molina R, Smalla KH, Seidenbecher C. The Neuroplastin adhesion molecules: key regulators of neuronal plasticity and synaptic function. *Journal of neurochemistry*. 2014;131(3):268-83.

153. Empson RM, Buckby LE, Kraus M, Bates KJ, Crompton MR, Gundelfinger ED, et al. The cell adhesion molecule neuroplastin-65 inhibits hippocampal long-term potentiation via a mitogen-activated protein kinase p38-dependent reduction in surface expression of GluR1-containing glutamate receptors. *Journal of neurochemistry*. 2006;99(3):850-60.

154. Smalla KH, Matthies H, Langnaese K, Shabir S, Bockers TM, Wyneken U, et al. The synaptic glycoprotein neuroplastin is involved in long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(8):4327-32.

155. Herrera-Molina R, Sarto-Jackson I, Montenegro-Venegas C, Heine M, Smalla KH, Seidenbecher CI, et al. Structure of excitatory synapses and GABAA receptor localization at inhibitory synapses are regulated by neuroplastin-65. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(13):8973-88.

156. Bhattacharya S, Herrera-Molina R, Sabanov V, Ahmed T, Iscru E, Stober F, et al. Genetically Induced Retrograde Amnesia of Associative Memories After Neuroplastin Ablation. *Biological psychiatry*. 2017;81(2):124-35.

157. Bernstein HG, Smalla KH, Bogerts B, Gordon-Weeks PR, Beesley PW, Gundelfinger ED, et al. The immunolocalization of the synaptic glycoprotein neuroplastin differs substantially between the human and the rodent brain. *Brain research*. 2007;1134(1):107-12.

158. Marzban H, Khanzada U, Shabir S, Hawkes R, Langnaese K, Smalla KH, et al. Expression of the immunoglobulin superfamily neuroplastin adhesion molecules in adult and developing mouse cerebellum and their localisation to parasagittal stripes. *The Journal of comparative neurology*. 2003;462(3):286-301.

159. Herrera-Molina R, Mlinac-Jerkovic K, Ilic K, Stober F, Vemula SK, Sandoval M, et al. Neuroplastin deletion in glutamatergic neurons impairs selective brain functions and calcium regulation: implication for cognitive deterioration. *Sci Rep*. 2017;7(1):7273.

160. Desrivieres S, Lourdasamy A, Tao C, Toro R, Jia T, Loth E, et al. Single nucleotide polymorphism in the neuroplastin locus associates with cortical thickness and intellectual ability in adolescents. *Molecular psychiatry*. 2015;20(2):263-74.

161. Saito A, Fujikura-Ouchi Y, Kuramasu A, Shimoda K, Akiyama K, Matsuoka H, et al. Association study of putative promoter polymorphisms in the neuroplastin gene and schizophrenia. *Neuroscience letters*. 2007;411(3):168-73.

162. Owczarek S, Kiryushko D, Larsen MH, Kastrup JS, Gajhede M, Sandi C, et al. Neuroplastin-55 binds to and signals through the fibroblast growth factor receptor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010;24(4):1139-50.

163. Mlinac K, Jovanov Milosevic N, Heffer M, Smalla KH, Schnaar RL, Kalanj Bognar S. Neuroplastin expression in the hippocampus of mice lacking complex gangliosides. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2012;48(1):161-6.
164. Mlinac K. Utjecaj gangliozida na izražaj membranskih proteina u mozgu miša. Zagreb: University of Zagreb; 2012.
165. Marin R. The neuronal membrane as a key factor in neurodegeneration. *Front Physiol*. 2013;4:188.
166. Marin R, Fabelo N, Fernandez-Echevarria C, Canerina-Amaro A, Rodriguez-Barreto D, Quinto-Aleman D, et al. Lipid Raft Alterations in Aged-Associated Neuropathologies. *Curr Alzheimer Res*. 2016;13(9):973-84.
167. Ohmi Y, Tajima O, Ohkawa Y, Yamauchi Y, Sugiura Y, Furukawa K, et al. Gangliosides are essential in the protection of inflammation and neurodegeneration via maintenance of lipid rafts: elucidation by a series of ganglioside-deficient mutant mice. *Journal of neurochemistry*. 2011;116(5):926-35.
168. Furukawa K, Ohmi Y, Ji S, Zhang P, Bhuiyan RH, Ohkawa Y, et al. Glycolipids: Essential regulator of neuro-inflammation, metabolism and gliomagenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1861(10):2479-84.
169. West MJ, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *The Journal of comparative neurology*. 1990;296(1):1-22.
170. Chiavegatto S, Sun J, Nelson RJ, Schnaar RL. A functional role for complex gangliosides: motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice. *Exp Neurol*. 2000;166(2):227-34.
171. Takamiya K, Yamamoto A, Furukawa K, Yamashiro S, Shin M, Okada M, et al. Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(20):10662-7.
172. Vukelic Z, Metelmann W, Muthing J, Kos M, Peter-Katalinic J. Anencephaly: structural characterization of gangliosides in defined brain regions. *Biol Chem*. 2001;382(2):259-74.
173. Svennerholm L. Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim Biophys Acta*. 1957;24(3):604-11.
174. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
175. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.
176. Rivero-Gutierrez B, Anzola A, Martinez-Augustin O, de Medina FS. Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. *Anal Biochem*. 2014;467:1-3.
177. Vyas AA, Schnaar RL. Brain gangliosides: functional ligands for myelin stability and the control of nerve regeneration. *Biochimie*. 2001;83(7):677-82.
178. Schmidt N, Kollwe A, Constantin CE, Henrich S, Ritzau-Jost A, Bildl W, et al. Neuroplastin and Basigin Are Essential Auxiliary Subunits of Plasma Membrane Ca(2+)-ATPases and Key Regulators of Ca(2+) Clearance. *Neuron*. 2017;96(4):827-38 e9.
179. Hicks DA, Nalivaeva NN, Turner AJ. Lipid rafts and Alzheimer's disease: protein-lipid interactions and perturbation of signaling. *Front Physiol*. 2012;3:189.
180. Mikkonen M, Soininen H, Alafuzof I, Miettinen R. Hippocampal plasticity in Alzheimer's disease. *Reviews in the neurosciences*. 2001;12(4):311-25.
181. Miller PD, Styren SD, Lagenaur CF, DeKosky ST. Embryonic neural cell adhesion molecule (N-CAM) is elevated in the denervated rat dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1994;14(7):4217-25.
182. Styren SD, Lagenaur CF, Miller PD, DeKosky ST. Rapid expression and transport of embryonic N-CAM in dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: ultrastructural analysis. *The Journal of comparative neurology*. 1994;349(3):486-92.

183. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993;361(6407):31-9.
184. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 1973;232(2):331-56.
185. Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW, Jr., Morris JC, Growdon JH, Hyman BT. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996;16(14):4491-500.
186. Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC. Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2001;58(9):1395-402.
187. Scheff SW, Price DA. Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1993;33(2):190-9.
188. Scheff SW, Sparks DL, Price DA. Quantitative assessment of synaptic density in the outer molecular layer of the hippocampal dentate gyrus in Alzheimer's disease. *Dementia*. 1996;7(4):226-32.
189. Braak H, Braak E, Bohl J, Lang W. Alzheimer's disease: amyloid plaques in the cerebellum. *J Neurol Sci*. 1989;93(2-3):277-87.
190. Guo CC, Tan R, Hodges JR, Hu X, Sami S, Hornberger M. Network-selective vulnerability of the human cerebellum to Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Brain*. 2016;139(5):1527-38.
191. Mason CA, Gregory E. Postnatal maturation of cerebellar mossy and climbing fibers: transient expression of dual features on single axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1984;4(7):1715-35.
192. Owczarek S, Berezin V. Neuroplastin: cell adhesion molecule and signaling receptor. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2012;44(1):1-5.
193. Korthals M, Langnaese K, Smalla KH, Kahne T, Herrera-Molina R, Handschuh J, et al. A complex of Neuroplastin and Plasma Membrane Ca(2+) ATPase controls T cell activation. *Sci Rep*. 2017;7(1):8358.
194. Zaidi A, Gao J, Squier TC, Michaelis ML. Age-related decrease in brain synaptic membrane Ca²⁺-ATPase in F344/BNF1 rats. *Neurobiol Aging*. 1998;19(5):487-95.
195. Jiang L, Bechtel MD, Galeva NA, Williams TD, Michaelis EK, Michaelis ML. Decreases in plasma membrane Ca²⁺(+)-ATPase in brain synaptic membrane rafts from aged rats. *Journal of neurochemistry*. 2012;123(5):689-99.
196. Berrocal M, Sepulveda MR, Vazquez-Hernandez M, Mata AM. Calmodulin antagonizes amyloid-beta peptides-mediated inhibition of brain plasma membrane Ca²⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(6):961-9.
197. Zacharias DA, DeMarco SJ, Strehler EE. mRNA expression of the four isoforms of the human plasma membrane Ca²⁺-ATPase in the human hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997;45(1):173-6.
198. Zaidi A, Adewale M, McLean L, Ramlow P. The plasma membrane calcium pumps-The old and the new. *Neuroscience letters*. 2018;663:12-7.

11. ŽIVOTOPIS

Katarina Ilić, dr. med. rođena je 12. srpnja 1988. godine u Zagrebu. Nakon završetka općeg gimnazijskog obrazovanja u Dubrovniku, 2007. godine upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Odličan uspjeh tijekom studija nagrađen je 2009. godine Dekanovom nagradom. Tijekom studija se uključuje u rad Laboratorija za molekularnu neurobiologiju i neurokemiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga u sklopu kojeg izrađuje rad za čije je koautorstvo 2011. nagrađena Rektorovom nagradom. Uz to, od 2011. godine sudjeluje na Festivalu znanosti u kemijskim i neuroznanstvenim radionicama. Nakon završetka studija 2013. godine i odrađenog obaveznog staža za doktore medicine, zapošljava se u Općoj bolnici Bjelovar u Centu za hitnu medicinu, a potom 2014. u Zavodu za hitnu medicinu Bjelovarsko-bilogorske županije. 2014. godine upisuje Poslijediplomski doktorski studij iz neuroznanosti. U travnju 2016. godine postaje asistent na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga. Iste godine su joj dodijeljena sredstva za projekt „Rasvjetljavanje uloge neuroplastina u Alzheimerovoj bolesti“ od strane HEP grupe. Tijekom dokorskog studija u nekoliko navrata je boravila u Leibniz institutu za neurobiologiju u Magdeburgu gdje se usavršavala u području molekularne neurobiologije. U akademskoj godini 2017./2018. nagrađena je stipendijom za doktorande grupe Adris. Sudjelovala je na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima iz područja neuroznanosti i molekularne biologije, a 2017. godine na 6. Hrvatskom kongresu neuroznanosti nagrađena je za najbolju usmenu prezentaciju. Koautor je dvaju znanstvenih radova i osam kongresnih sažetaka.

Publikacije vezane uz temu doktorske disertacije:

Herrera-Molina R*, Mlinac-Jerkovic K*, Ilic K*, Stober F, Vemula SK, Sandoval M, et al. Neuroplastin deletion in glutamatergic neurons impairs selective brain functions and calcium regulation: implication for cognitive deterioration. Sci Rep. 2017;7(1):7273.

*jednakovrijedni doprinos

Ilic K, Mlinac-Jerkovic K, Jovanov-Milosevic N, Simic G, Habek N, Bogdanovic N, and Kalanj-Bognar S. Hippocampal expression of cell-adhesion glycoprotein neuroplastin is altered in Alzheimer's disease. J Cell Mol Med, DOI:10.1111/jcmm.13998