



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Martina Malnar

**MEHANIZAM DJELOVANJA KOLESTEROLA NA
CIJEPANJE I TRANSPORT PROTEINA APP**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2012.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju
Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu,
pod vodstvom dr. sc. Silve Katusić Hećimović, znanstvene suradnice,
u sklopu Sveučilišnoga poslijediplomskog studija Biologija pri Biološkom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Najiskrenije se želim zahvaliti svojoj mentorici dr. sc. Silvi Katušić Hećimović na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju, te svoj potpori tijekom izrade ove doktorske disertacije. Bez vaše vizije i neiscrpne energije ovaj rad ne bi nikada zaživio.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Domagoju Đikiću i dr. sc. Oliveru Vugreku što su izdvojili vrijeme za čitanje ovog rada.

Hvala Marku što je bio kolega i prijatelj od prvih dana u labosu, kao i mnogi drugi „Ruđerovci“ ...Marko, Matea, Tonko, Jelena, Damir, Melanija, Ane, Stjepko...

Veliko hvala Luciji na tehničkoj pomoći, diskusiji, ali i odličnom društvu u satima provedenim na konfokalcu. Hvala i Vedrani što mi je omogućila korištenje fluorescencijskog mikroskopa na PMF-u. Hvala Zlatici, zaista cijenim vašu pomoć.

Zahvaljujem se svim suradnicima, a posebno članovima laboratorija dr. sc. Christiana Haassa, na nesebičnoj podršci u reagensima te velikom znanju koje su dijelili sa mnom prilikom mojih boravaka u Münchenu.

Ovaj rad posvećujem svojoj obitelji ...

... Mami i tati, koji si mi omogućili školovanje i uvijek mi pružali veliku podršku, te mi svojim primjerom pokazali da se isplati biti vrijedan i pošten. Nadam se da je ovaj trenutak samo jedan u nizu na koji ćete biti ponosni.

... Damjanu, koji mi svakim danom stavlja osmijeh na lice. Bez tebe sve bi bilo puno teže.

... Sanji, Rosi, Emici - vječnim prijateljicama.

MEHANIZAM DJELOVANJA KOLESTEROLA NA CIJEPANJE I TRANSPORT PROTEINA APP

MARTINA MALNAR

Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10002 Zagreb, Hrvatska

Peptid amiloid- β ($A\beta$), središnja molekula u patogenezi Alzheimerove bolesti, nastaje amiloidogenim cijepanjem proteina APP β -sekretazom u endosomima, dok cijepanje proteina APP na staničnoj membrani α -sekretazom sprečava nastanak ovog patološkog peptida. Nakupljanje peptida $A\beta$ u mozgu otkriveno je ne samo u Alzheimerovoj bolesti nego i u bolesti Niemann-Pick tipa C (NPC), nasljednoj neurodegenerativnoj bolesti nakupljanja lipida.

U ovom radu smo pokazali da je povećana razina peptida $A\beta$ u stanicama NPC posljedica povećanog cijepanja proteina APP enzimom β -sekretaza uzrokovanog nakupljanjem kolesterola. Nadalje, pokazali smo da je internalizacija proteina APP nužna za nastanak peptida $A\beta$, te da u stanicama NPC zbog nakupljanja kolesterola u kasnim endosomima / lizosomima dolazi do poremećaja u transportu proteina APP u endocitoznom putu. Naime, u stanicama NPC smo detektirali ubranu internalizaciju i usporeno recikliranje proteina APP na površinu stanice što uzrokuje njegovo nakupljanje u ranim / reciklirajućim endosomima, centralnom mjestu stvaranja peptida $A\beta$. Ovim istraživanjem smo pokazali da povišena razina kolesterola može biti pokretač patoloških procesa u Alzheimerovoj bolesti jer potiče smještaj proteina APP u endosomima što rezultira njegovim povećanim amiloidogenim cijepanjem i nastankom peptida $A\beta$.

(106 stranica, 29 slika, 4 tablice, 144 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: Alzheimerova bolest / amiloid- β ($A\beta$) / APP / endocitoza / kolesterol / Niemann-Pick tip C (NPC) / NPC1

Mentor: dr. sc. Silva Katušić Hećimović, znanstvena suradnica

Ocjenjivači: doc. dr. sc. Domagoj Đikić

dr. sc. Oliver Vugrek, znanstveni suradnik

THE MECHANISM(S) OF CHOLESTEROL-EFFECT ON PROCESSING AND TRANSPORT OF APP PROTEIN

MARTINA MALNAR

Ruđer Bošković Institute, Bijenička 54, 10002 Zagreb, Croatia

Processing of APP protein by β -secretase in endosomes results in formation of amyloid- β (A β) peptide, the central molecule in Alzheimer's disease (AD) pathogenesis, while its processing by α -secretase on the cell surface precludes formation of this pathogenic peptide. Accumulation of A β peptide in the brain has also been observed in Niemann-Pick Type C disease (NPC), an inherited neurodegenerative disorder of lipid accumulation.

In this study we demonstrate that cholesterol accumulation in late endosomes / lysosomes of NPC cells leads to cholesterol-dependent increased APP processing by β -secretase and increased A β levels. Our results indicate that increased formation of A β in NPC disease is due to cholesterol-mediated altered endocytic trafficking of APP. We show that APP endocytosis is prerequisite for enhanced A β levels in NPC cells. Moreover, we observed that NPC cells show cholesterol dependent sequestration of APP within enlarged early / recycling endosomes which can lead to increased β -secretase processing of APP. We demonstrated that increased endocytic localization of APP in NPC cells is likely due to both its increased internalization and its decreased recycling to the cell surface. Our findings suggest that increased cholesterol levels, such as in NPC disease and sporadic AD, may be the upstream effector that drives amyloidogenic APP processing characteristic for Alzheimer's disease by altering endocytic trafficking of APP.

(106 pages, 29 figures, 4 tables, 144 references, original in Croatian)

Keywords: Alzheimer's disease / amyloid- β (A β) / APP / cholesterol / endocytosis / Niemann-Pick Type C (NPC) / NPC1

Supervisor: Silva Katušić Hećimović, PhD, research associate

Reviewers: Domagoj Đikić, PhD, docent

Oliver Vugrek, PhD, research associate

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	3
3. LITERATURNI PREGLED	4
3.1. Alzheimerova bolest i protein APP	4
3.2. Biologija proteina APP i nastanak peptida A β	6
3.3. Kolesterol i Alzheimerova bolest	12
3.4. Veza Alzheimerove bolesti i bolesti Niemann-Pick tipa C	16
4. MATERIJALI I METODE.....	19
4.1. Kultura stanica.....	19
4.2. Transfekcija stanica.....	19
4.3. Snižavanje i nakupljanje kolesterola	23
4.4. Protutijela.....	26
4.5. Analiza razine proteina metodom Western blot	26
4.6. Određivanje koncentracije peptida A β 40 u staničnom lizatu i mediju.....	31
4.7. Analiza katalitičke aktivnosti enzima α -, β - i γ -sekretaze	32
4.8. Određivanje ekspresije proteina APP na površini stanice biotinizacijom proteina	34
4.9. Analiza smještaja proteina APP imunofluorescencijom.....	35
5. REZULTATI.....	38
5.1. U stanicama CHO-NPC1 ^{-/-} dolazi do nakupljanja slobodnog kolesterola	38
5.2. Utjecaj nakupljanja kolesterola na cijepanje proteina APP u stanicama	40
CHO-NPC1 ^{-/-}	40
5.3. Utjecaj nakupljanja kolesterola na transport i smještaj proteina APP u stanicama CHO-NPC1 ^{-/-}	50
6. RASPRAVA.....	79
6.1. Stanični model.....	79
6.2. Nakupljanje peptida A β u stanicama CHO-NPC1 ^{-/-} uzrokovano je povećanim amiloidogenim cijepanjem proteina APP β -sekretazom.....	80
6.3. Povećano amiloidogeno cijepanje proteina APP u stanicama CHO-NPC1 ^{-/-} je posljedica promjenjenog smještaja / transporta proteina APP.....	84
6.4. Nakupljanje kolesterola u stanicama CHO-NPC1 ^{-/-} uzrokuje promjene u cijepanju i staničnom transportu proteina APP	87
7. ZAKLJUČAK	91
8. POPIS LITERATURE	92
9. ŽIVOTOPIS	105
10. POPIS RADOVA	106

1. UVOD

Alzheimerova bolest (AB) je najučestaliji oblik demencije. Procijenjeno je kako trenutno u svijetu oko 26 milijuna ljudi ima AB. Pretpostavlja se da će se broj oboljelih od AB, zbog sve dužeg životnog vijeka, udvostručavati svakih 20 godina te da će 2040. godine doseći 81 milijun oboljelih (Ferri i sur., 2005.). S obzirom na sve veći broj oboljelih osoba od AB, za koju još uvijek ne postoji adekvatno liječenje već se terapija svodi na smanjenje simptoma bolesti, istraživanja Alzheimerove bolesti su od izuzetne važnosti, jer imaju za cilj razvoj novih oblika liječenja, usporavanje progresije i/ili sprečavanje nastanka ove bolesti.

Pojava izvanstaničnih senilnih plakova u mozgu predstavlja glavno patološko obilježje Alzheimerove bolesti. Osnovni sastojak senilnih plakova su nakupine peptida amiloid- β ($A\beta$) koji nastaju proteolitičkim cijepanjem proteina prekursora amiloida- β (eng. *Amyloid Precursor Protein*; APP). Pretpostavlja se da peptid $A\beta$ ima središnju ulogu u patogenezi AB, odnosno da je promijenjen metabolizam / razina ovog peptida začetnik kaskade događaja koja u konačnici rezultira neurodegeneracijom i Alzheimerovom bolešću (Hardy & Selkoe, 2002.). S obzirom da se smatra da promijenjen metabolizam proteina APP i promijenjena razina peptida $A\beta$ predstavljaju glavni uzrok nastanka Alzheimerove bolesti, razumijevanje njihovog mehanizma nastanka i razgradnje važno je za razvoj novih oblika liječenja AB. Opsežna istraživanja mehanizma cijepanja proteina APP i nastanka peptida $A\beta$ zadnjih su 20-ak godina rezultirala mnoštvom spoznaja, no ne i djelotvornom terapijom. Pokazalo se da se transmembranski protein APP na površini stanice cijepa neamiloidogenim putem, dok se nakon internalizacije u endosomima cijepa amiloidogenim putem, kojim nastaje peptid $A\beta$. Dakle, molekularni mehanizmi koji reguliraju stanični transport proteina APP tj. njegov smještaj u endosomima imaju važnu ulogu u nastanku peptida $A\beta$.

Postalo je također jasno da je amiloid- β dio složenog procesa te da na nastanak Alzheimerove bolesti mogu utjecati mnogi drugi stanični i molekularni čimbenici. Nedavna istraživanja su ukazala da bi kolesterol mogao utjecati na nastanak Alzheimerove bolesti. Utvrđeno je da razina kolesterola utječe na cijepanje proteina APP i nastanak $A\beta$. Veza između kolesterola i peptida $A\beta$ ustanovljena je i u bolesti Niemann-Pick tipa C (NPC). Kod ove bolesti dolazi do nakupljanja kolesterola u jetri, slezeni i mozgu uslijed nedostatka funkcionalnog proteina NPC1 ili NPC2. Mutirani proteini NPC1/2 ne mogu obavljati svoju funkciju prijenosa kolesterola iz kasnih endosoma / lizosoma do endoplazmatskog retikuluma ili plazmatske membrane što uzrokuje njegovo nakupljanje u ovim organelima, te poremećaj

endocitoze. Interesantno je da nedostatak proteina NPC1 uzrokuje značajno povećanje razine peptida A β te progresivnu neurodegeneraciju, kao i u Alzheimerovoj bolesti.

Razumijevanje mehanizma djelovanja kolesterola na nakupljanje peptida A β može doprinijeti otkrivanju novih ciljnih puteva i/ili molekula za razvoj djelotvorne terapije protiv Alzheimerove bolesti.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je istražiti mehanizam djelovanja kolesterola na cijepanje i transport proteina APP, te nakupljanje peptida A β . U tu svrhu smo koristili stanični model bolesti Niemann-Pick tipa C (NPC) u kojoj je uz nakupljanje kolesterola utvrđeno i nakupljanje peptida A β .

Prvo smo ispitali hipotezu da do nakupljanja peptida A β u stanicama *NPCI*^{-/-} dolazi zbog njegove povećane proizvodnje tj. zbog povećanog amiloidogenog cijepanja proteina APP. Zatim smo provjerili je li povećano amiloidogeno cijepanje proteina APP posljedica promjenjene aktivnosti enzima koji sudjeluju u izrezivanju peptida A β iz proteina APP. Nadalje smo, snižavanjem razine kolesterola u stanicama, provjerili je li povećano amiloidogeno cijepanje proteina APP, te nakupljanje peptida A β ovisno o nakupljanju kolesterola u stanicama *NPCI*^{-/-}.

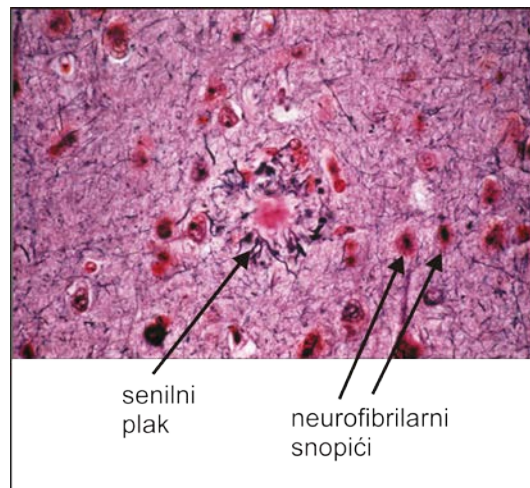
Kako cijepanje proteina APP amiloidogenim ili neamiloidogenim putem ovisi o njegovom transportu tj. endocitozi s površine stanice, pratili smo uzrokuje li nakupljanje kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima stanica *NPCI*^{-/-} promjene u smještaju proteina APP. Analizirali smo smještaj proteina APP na staničnoj membrani i u endocitoznom putu, te njegovu internalizaciju i recikliranje s/na površinu stanice. Također smo provjerili popravljiva li snižavanje razine kolesterola u stanicama *NPCI*^{-/-} transport proteina APP, te izaziva li nakupljanje kolesterola u stanicama *wt* promjene u transportu proteina APP slične onima u stanicama *NPCI*^{-/-}. Time smo željeli pokazati da povećana razina kolesterola, neovisno o proteinu NPC1, može uzrokovati promjene u smještaju proteina APP u endocitoznom putu te dovesti do njegovog povećanog amiloidogenog cijepanja, te nastanka peptida A β .

Ovom disertacijom želimo doprinijeti razumijevanju uloge kolesterola u nastanku peptida A β , te veze između kolesterola, bolesti Niemann-Pick tipa C i Alzheimerove bolesti.

3. LITERATURNI PREGLED

3.1. Alzheimerova bolest i protein APP

Alzheimerova bolest (AB) je najčešća neurodegenerativna bolest te na nju otpada 60% svih oblika demencije. Karakterizira je tipična neuropatološka slika koja uključuje vanstanične senilne plakove i unutarstanične neurofibrilarne snopiće u moždanom tkivu oboljelih (Slika 3.1.). Dok neurofibrilarni snopići nastaju nakupljanjem hiperfosforiliranog proteina tau, osnovni sastojak senilnih plakova su nakupine peptida amiloid- β ($A\beta$) koji nastaju proteolitičkim cijepanjem proteina prekursora amiloida- β (eng. *Amyloid Precursor Protein*; APP).



Slika 3.1. Prikaz patoloških lezija karakterističnih za Alzheimerovu bolest: senilnih plakova – izvanstaničnih nakupina peptida amiloid- β i neurofibrilarnih snopića – unutarstaničnih nakupina hiperfosforiliranog proteina tau. Slika je dijelom preuzeta iz članka Burns A. (2009.).

Hipoteza amiloidne kaskade smatra se vrlo vjerojatnim mehanizmom nastanka Alzheimerove bolesti (Hardy & Selkoe, 2002.). Ova hipoteza pretpostavlja da je promijenjen metabolizam / razina peptida $A\beta$ začetnik kaskade događaja koji uključuju i hiperfosforilaciju proteina tau. Dakle smatra se da peptid $A\beta$ ima centralnu ulogu u patogenezi AB, te da njegovo nakupljanje u konačnici rezultira neurodegeneracijom i Alzheimerovom bolesti. Naime, dok je nakupljanje peptida $A\beta$ i stvaranje senilnih plakova specifično za AB, nakupljanje i porast fosforiliranog oblika proteina tau prisutno je i u drugim oblicima demencija kao i u drugim neurodegenerativnim bolestima. No novija istraživanja ukazuju i na

moгуćnost da su patološki putevi proteina tau i peptida A β , iako paralelni, međusobno neovisni (eng. *dual pathway model*), te da mogu biti potaknuti zajedničkim pokretačkim čimbenikom (Small & Duff, 2008.).

3.1.1. Genetička osnova Alzheimerove bolesti

Alzheimerova bolest uključuje nasljedne i sporadične oblike bolesti. Nasljedna AB (FAD, od eng. *Familial Alzheimer's Disease*) se prenosi na autosomno dominantan način, a prvi simptomi se javljaju prije 65. godine starosti (nazvana i EOAD, od eng. *Early-Onset Alzheimer's Disease*). Za razliku od nasljednog oblika Alzheimerove bolesti koji je vrlo rijedak (<0.1% oboljelih), sporadični oblik AB je najčešći i javlja se u pravilu nakon 65. godine života (LOAD, od eng. *Late-Onset Alzheimer's Disease*). Iako se ovaj oblik AB naziva sporadičnim, novija genetska istraživanja ukazuju kako on vrlo vjerojatno nije sporadičan, te da ima značajnu genetičku pozadinu tj. da postoji genetska predisponiranost za nastanak ovog oblika AB. Velika populacijska studija provedena na blizancima pokazala je kako nasljednost sporadičnog oblika AB može biti i do 80% (Gatz i sur., 2006.). Brojne asocijacijske studije kao i analize povezanosti (eng. *linkage analysis*) utvrdile su postojanje velikog broja gena koji bi mogli biti uključeni u nastanak ovog oblika AB. Danas se smatra da je Alzheimerova bolest kompleksna bolest te se javlja kao posljedica zajedničkog djelovanja nekoliko gena i više čimbenika rizika okoliša.

Mutacije u genu za protein APP koji se nalazi na kromosomu 21 prve su otkrivene mutacije koje uzrokuju nasljedni oblik Alzheimerove bolesti (Goate i sur., 1991.). No, mutacije u genu *APP* odgovorne su za nasljedni oblik AB u svega nekoliko obitelji. Većinu slučajeva nasljednog oblika AB uzrokuju mutacije u genima za presenilin 1 (*PS1*) i presenilin 2 (*PS2*) (Sherrington i sur., 1995.; Levy-Lahad i sur., 1995.). Ti geni kodiraju katalitičke podjedinice enzimskog kompleksa γ -sekretaze, ključnog u izrezivanju peptida A β iz proteina APP. Otkriće mutacija u genima *APP*, *PS1* i *PS2* pridonijelo je, razumijevanju molekularnog mehanizma nastanka Alzheimerove bolesti.

Iako se spominju i drugi lokusi vezani uz sporadični oblik Alzheimerove bolesti, polimorfizam gena *APOE* (alel $\epsilon 4$) je jedini do sada sa sigurnošću utvrđen rizični čimbenik za nastanak sporadičnog oblika ove bolesti (Corder i sur., 1993.; Poirier i sur., 1993.). Dok je ovaj polimorfizam prisutan u 15% zdrave populacije, u grupi AB prisutan je u čak 65% bolesnika. Heterozigoti za *APOE* alel $\epsilon 4$ imaju tri puta veći rizik nastanka AB, dok se u homozigota taj rizik povećava 15 puta (Farrer i sur., 1997.). Osim toga, *APOE* alel $\epsilon 4$ utječe

na raniju pojavu simptoma bolesti i to svaka kopija alela za 10-ak godina (Corder i sur., 1993.; Meyer i sur., 1998.). Zanimljivo, apolipoprotein E (ApoE) je glavni prijenosnik kolesterola u mozgu.

Nedavne GWAS studije (od eng. *Genome-Wide Association Study*) su ukazale da stanični putevi metabolizma kolesterola i lipida, kao i imunološkog sustava sudjeluju u nastanku Alzheimerove bolesti (Jones i sur., 2010.) te da njihove promjene predstavljaju uzrok, a ne posljedicu patoloških procesa ove bolesti.

3.2. Biologija proteina APP i nastanak peptida A β

Amiloidnu hipotezu podupiru činjenice da se mutacije koje uzrokuju nasljedni oblik Alzheimerove bolesti nalaze upravo u genima za prekursor peptida A β (protein APP) i ključne enzime (preseniline) za njegov nastanak. Također, ljudi s Down-ovim sindromom, koji imaju tri kopije kromosoma 21 (trisomija 21) na kojem se nalazi gen *APP*, u pravilu obolijevaju od Alzheimerove bolesti. Suprotno tome, mutacije u genu koji kodira protein tau, iako mogu dovesti do njegove hiperfosforilacije, ne uzrokuju Alzheimerovu bolest. Te mutacije uzrokuju drugi tip demencije, tzv. frontotemporalnu demenciju (Hutton i sur., 1998.).

Sredinom 80-ih godina 20. stoljeća znanstvenici su uspjeli otkriti sekvencu aminokiselina peptida A β kojeg su izolirali iz plakova (Masters i sur., 1985.). Ubrzo nakon tog otkrića je kloniran i gen za prekursor protein amiloida- β koji kodira transmembranski protein APP od kojeg peptid A β nastaje (Kang i sur., 1987.). Prvotno su prevladavala mišljenja da je peptid A β protein koji ne nastaje u “normalnoj” stanici, no istraživanja su pokazala kako je on produkt uobičajenog metabolizma svake stanice (Haass, Schlossmacher, i sur., 1992.).

3.2.1. Struktura i funkcija proteina APP

Protein APP jest transmembranski protein tipa I. Njegova primarna struktura otkriva veliku izvanstaničnu N-terminalnu regiju, jednu transmembransku domenu i svega 47 aminokiselina dugačak C-terminalni citoplazmatski rep. U ljudskim stanicama je eksprimirano 10 različitih izoformi proteina APP koje su posljedica alternativnog izrezivanja introna univerzalne mRNA (Entrez Gene ID: 351). Sve izoforme sadrže sekvencu peptida A β .

Dominantne izoforme su proteini dugački 695, 751 odnosno 770 aminokiselina. Izoforma APP₆₉₅ je najzastupljenija i nalazimo ju isključivo u neuronima, dok su izoforme APP₇₅₁ i APP₇₇₀ eksprimirane u stanicama neuronalnog porijekla, ali i ubikvitarno u drugim stanicama. Protein APP ima ortologe u različitim vrstama, uključujući tipične eksperimentalne modele poput miša, štakora, ribe zebrice, vinske mušice i crva *Caenorhabditis elegans*.

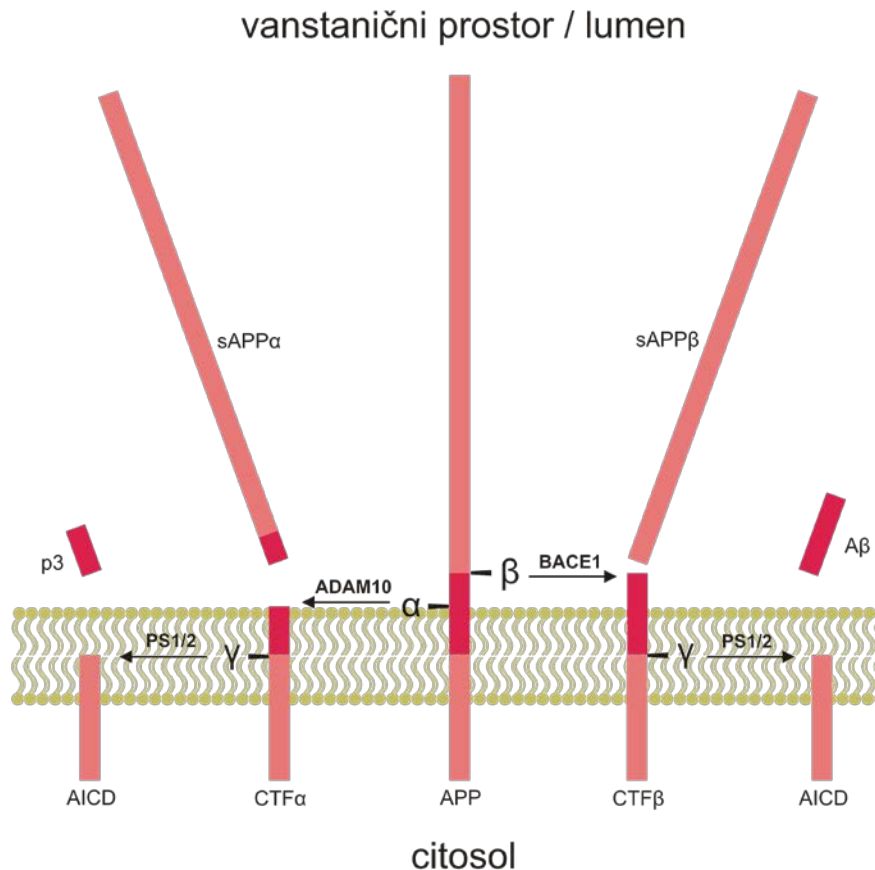
Struktura proteina APP najviše podsjeća na strukturu membranskih receptora, no *bona fide* ligand koji bi potvrdio takvu funkciju proteina APP još uvijek nije pronađen (Zheng & Koo, 2011.). Dosadašnja istraživanja uloge tog proteina u stanici pripisivala su mu razne funkcije poput uloge u razvoju i adheziji neurona, razvoju aksona, vezanju komponenti izvanstaničnog matriksa, smatra se da bi mogao biti uključen u neke signalne puteve, prijenos željeza (ferooksidaza), no istinska funkcija tog proteina i danas ostaje nepoznanicom. Istraživanja prave funkcije proteina APP dodatno su otežana postojanjem dva paraloga: APLP1 i APLP2. Naime, tek delecija gena *APLP2* skupa s delecijom ili gena *APP* ili *APLP1* uzrokuje ranu postnatalnu letalnost u miševa, što ukazuje na funkcionalnu suvišnost između proteina APLP2 i ostala dva proteina u obitelji (Heber i sur., 2000.). Za razliku od proteina APP, proteini APLP1 i APLP2 ne sadrže peptid A β (Zheng & Koo, 2011.).

3.2.2. Cijepanje proteina APP

Peptidi A β nastaju sekvencijalnim proteolitičkim cijepanjem proteina APP. Protein APP se može cijepati dvama različitim proteolitičkim putevima: α -sekretaznim (tzv. neamiloidogenim) ili β -sekretaznim (tzv. amiloidogenim) putem (Slika 3.2.). U oba ova puta APP se cijepa kaskadom događaja koji uključuju proteolitičko cijepanje enzimom α -, odnosno β -sekretaza te zatim proteolitičko cijepanje enzimskim kompleksom γ -sekretaze. Nedavno istraživanje je otkrilo da fiziološku funkciju α -sekretaze obavlja enzim ADAM-10 (od eng. *A Disintegrin And Metalloprotease Domain protein*) (Kuhn i sur., 2010.), dok je već dulje vrijeme poznato da aspartil proteaza nazvana BACE1 (od eng. *β -site APP Cleaving Enzyme*) ima ulogu β -sekretaze (Vassar i sur., 1999.). Kompleks γ -sekretaze čine 4 podjedinice: protein presenilin 1 ili 2 (PS1/2) koji ima ulogu katalitičke podjedinice, te nikastrin, PEN-2 i APH-1 (Takasugi i sur., 2003.; Edbauer i sur., 2003.; Kimberly i sur., 2003.).

Cijepanjem proteina APP α - ili β -sekretazom nastaju veći topljivi odsječci sAPP α , odnosno sAPP β (od eng. *soluble APP*) i manji transmembranski C-terminalni odsječci CTF α /C83, odnosno CTF β /C99 (od eng. *C-Terminal Fragment*). Odsječci CTF su supstrati

enzima γ -sekretaze koji cijepanjem odsječka CTF β oslobađa peptid amiloid- β , dok se cijepanjem odsječka CTF α oslobađa neamiloidogeni peptid p3. Cijepanjem odsječaka CTF α / β γ -sekretazom nastaje i C-terminalni peptid AICD (od eng. *APP-IntraCellular Domain*). Dakle, cijepanje proteina APP β -sekretaznim putem predstavlja ključni događaj u nastanku peptida A β , dok cijepanje proteina APP α -sekretazom sprečava njegov nastanak (Esch i sur., 1990.).



Slika 3.2. Shematski prikaz cijepanja proteina APP α -, β - i γ -sekretazom.

Peptid A β je normalni metabolički produkt svake stanice, te se u normalnim uvjetima izlučuje i uklanja iz neurona. Upravo neravnoteža između proizvodnje i razgradnje peptida A β se smatra primarnim događajem koji dovodi do nastanka Alzheimerove bolesti. U prilog ovoj hipotezi stoji činjenica da mutacije koje uzrokuju nasljedne oblike AB najčešće rezultiraju povišenom proizvodnjom peptida A β . Npr. mutacija *Swedish* (*sw*) u genu *APP*, nazvana po švedskoj obitelji u kojoj je pronađena, uzrokuje izmjenu aminokiselina KM \rightarrow NL u proteinu APP koje se nalaze odmah N-terminalno do mjesta cijepanja β -sekretaze (Mullan i

sur., 1992.). S ovom mutacijom protein APP postaje bolji supstrat β -sekretaze, što dovodi do dramatičnog porasta efikasnosti cijepanja proteina APP na tom mjestu i povišene proizvodnje peptida $A\beta$.

Iako su detalji proteolitičkog cijepanja proteina APP dobro razjašnjeni još uvijek nije potpuno poznato kako se regulira i što uzrokuje, odnosno pokreće cijepanje proteina APP α -, odnosno β -sekretaznim putem. Povećanje razgradnje proteina APP α -sekretaznim putem te paralelno smanjenje njegove razgradnje β -sekretaznim putem smatra se jednim od potencijalnih načina za razvoj novih oblika liječenja AB.

3.2.3. Peptidi $A\beta$

Amiloid- β jest peptid koji nastaje amiloidogenim putem cijepanja proteina APP. Pri cijepanju C-terminalnog odsječka, CTF β /C99, γ -sekretazom nastaju izrazito hidrofobni peptidi veličine 37-43 aminokiseline (~4 kDa) skloni agregaciji. Najzastupljeniji peptid jest $A\beta$ 40 (oko 85%), dok se $A\beta$ 42(43) smatra začetnikom agregacije amiloida i nastanka patoloških plakova zbog njegove veće hidrofobnosti u odnosu na kraće peptide (Jarrett i sur., 1993.). Zanimljivo je kako više od 200 otkrivenih mutacija u genima *PS1/2* koje uzrokuju nasljedni oblik AB ima jednak učinak na povećanje omjera peptida $A\beta$ 42/ $A\beta$ 40 (Hardy & Selkoe, 2002.).

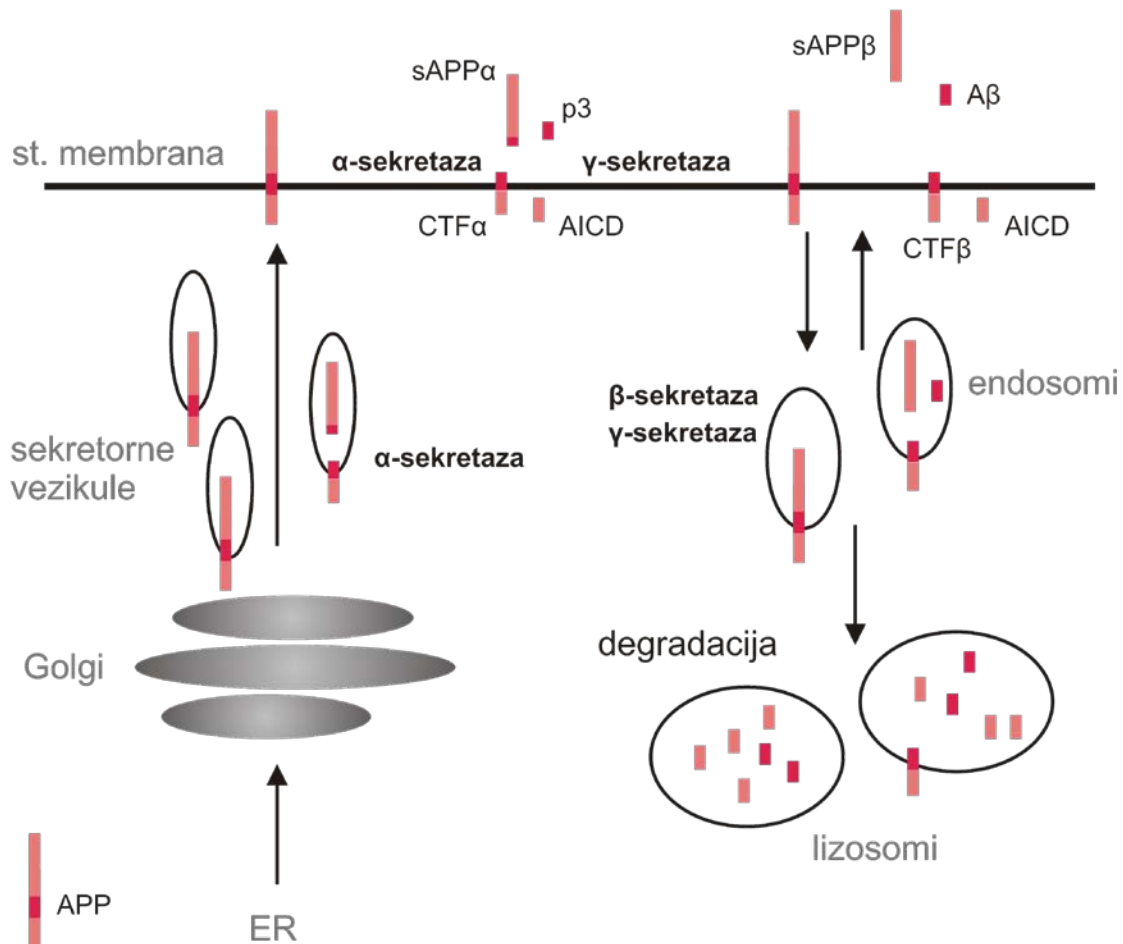
Iako su amiloidni plakovi karakteristične lezije Alzheimerove bolesti, danas se smatra da su zapravo pre-amiloidne strukture ovog peptida, oligomeri $A\beta$, najtoksičniji te prvi uzrokuju neuronalna oštećenja i gubitak sinapsi što dovodi do demencije. Naime, pokazalo se da monomeri peptida $A\beta$ vrlo brzo agregiraju te stvaraju oligomere različitih veličina. Za razliku od monomera, oligomeri peptida $A\beta$ mogu biti otporni na detergent SDS (od eng. *Sodium Dodecyl Sulfate*) te ih je potrebno otopiti u mravljoj kiselini kako bi se mogli detektirati npr. ELISA-om (od eng. *Enzyme-Linked Immunosorbant Assay*) (Skovronsky i sur., 1998.). Ekstrakcijom u mravljoj kiselini mogu se osloboditi i monomeri $A\beta$ vezani za strukture poput drugih proteina, lipida ili membrana. Također, pokazano je da oligomerizacija peptida $A\beta$ počinje već u samim stanicama, a ne nakon sekrecije monomera u vanstanični prostor (Walsh i sur., 2000.).

Niz istraživanja pokazuje korelaciju oligomera $A\beta$ s jačinom neurodegeneracije (Lue i sur., 1999.; McLean i sur., 1999.), iako prava biokemijska struktura i uloga u *in vivo* patogenezi Alzheimerove bolesti treba biti dalje istražena.

3.2.4. Stanični transport proteina APP

Protein APP je transmembranski glikoprotein. Poput ostalih tipičnih transmembranskih proteina tipa I, protein APP se kotranslacijski translocira preko membrane endoplazmatskog retikuluma (ER) gdje ostaje vezan tako da mu se samo mali C-terminalni rep nalazi u citosolu, a velika ekstracelularna N-terminalna domena u lumenu ER-a. Dalje se protein APP transportira iz ER-a u Golgijev aparat gdje dolazi do posttranslacijskih modifikacija koje uključuju N- i O-glikozilaciju. Protein APP koji još nije prošao glikozilaciju se naziva nezrelim (eng. *immature*), dok se potpuno posttranslacijski modificirani protein APP smatra zreli (eng. *mature*). Nakon što prođe sortiranje u Golgijevom aparatu, protein APP se sekrecijskim vezikulama transportira na površinu stanice. Za vrijeme transporta proteina na staničnu membranu i na samoj membrani, protein APP dominantno cijepa α -sekretaza oslobađajući pritom veliku izvanstaničnu domenu tog proteina ($sAPP\alpha$), dok C-terminalni odsječak ($CTF\alpha$) ostaje vezan za membranu (Sisodia i sur., 1990.; Parvathy i sur., 1999.). Ovaj fragment dalje može cijepati γ -sekretaza, pri čemu nastaje neamiloidogeni peptid p3 (Slika 3.3.).

Protein APP u svom citoplazmatskom C-terminalnom repu sadrži konzensusnu domenu -NPXY- koja posreduje u internalizaciji nekih membranskih receptora. Dokazano je da se protein APP internalizira klatrin-ovisnom endocitozom s površine stanice (Yamazaki i sur., 1996.). Dio internaliziranih proteina APP završava endocitoznim putem u lizosomima gdje se razgrađuje (Haass, Koo, i sur., 1992.), no dio se može vrlo brzo reciklirati natrag na površinu stanice (Yamazaki i sur., 1996.). Za razliku od α -sekretaze, β -sekretaza (BACE1) ima najveću aktivnost u blago kiselim odjeljcima, tj. endosomima (Vassar i sur., 1999.). Dakle nakon internalizacije, protein APP u ranim endosomima može cijepati β -sekretaza (Koo & Squazzo, 1994.). $CTF\beta$ koji ostaje vezan za membranu endosoma može još u endosomima cijepati γ -sekretaza pri čemu nastaje peptid $A\beta$ u unutrašnjosti stanice (u lumenu vezikula) ili može biti recikliran na površinu stanice gdje se nakon cijepanja γ -sekretazom oslobađa peptid $A\beta$, tj. izlučuje u vanstanični prostor (Higaki i sur., 1995.). Peptidi $A\beta$ nastali u endocitoznom putu mogu se ili izlučiti iz stanice ili razgraditi u lizosomima (Slika 3.3.). Istraživanja pokazuju da je zapravo unutarstanični $A\beta$ taj koji je najtoksičniji i inicira oštećenja koja dovode do razvoja Alzheimerove bolesti (Walsh i sur., 2002.).



Slika 3.2. Shematski prikaz staničnog transporta i cijepanja proteina APP.

Smatra se da se cijepanje proteina APP α -sekretazom odvija na površini stanice (Sisodia i sur., 1990.; Parvathy i sur., 1999.), dok se cijepanje β -sekretazom primarno odvija u endosomima (Koo & Squazzo, 1994.). Dakle, molekularni mehanizmi koji reguliraju stanični transport proteina APP imaju važnu ulogu u reguliranju njegovog cijepanja amiloidogenim ili neamiloidogenim putem te nastanku peptida A β . Štoviše, pokazano je da su promjene u endosomima i endocitoznom transportu proteina APP dio ranih procesa u patogenezi Alzheimerove bolesti (Cataldo i sur., 2000.; Cataldo i sur., 2004.; Ginsberg i sur., 2010.). Povećani endosomi u neuronima su također primjećeni u Down-ovom sindromu gdje prethode simptomima demencije (Cataldo i sur., 2000.). Dodatno, nedavnim *GWAS* studijama (od eng. *Genome-Wide Association Studies*) dva gena, *PICALM* i *BINI*, čiji produkti sudjeluju u klatrin-ovisnoj internalizaciji odnosno recikliranju su povezana s rizikom za sporadični oblik Alzheimerove bolesti (Harold i sur., 2009.; Hu i sur., 2011.; Kauwe i sur., 2011.; Lambert i sur., 2011.).

3.3. Kolesterol i Alzheimerova bolest

Mozak je kolesterolom najbogatiji organ u tijelu i sadrži oko 25% ukupnog tjelesnog kolesterola (Dietschy & Turley, 2004.). Priča o ulozi lipida u patogenezi Alzheimerove bolesti je stara više od 100 godina. Naime, uz amiloidne plakove i neurofibrilarne snopiće, upravo je dr. Alois Alzheimer na početku 20. stoljeća opisao i treću patološku karakteristiku Alzheimerove bolesti – lipidne inkluzije u moždanim preparatima svoje pacijentice Auguste. Iako je taj nalaz upućivao na poremećaj u metabolizmu lipida, znanstvenici su ga do nedavno zanemarivali (Foley, 2010.).

3.3.1. Genetički i epidemiološki čimbenici

1993. godine Corder i suradnici pronalaze da polimorfizam $\epsilon 4$ apolipoproteina E (*APOE*) predstavlja najsnažniji genetski rizik nastanka sporadičnog oblika Alzheimerove bolesti. Molekularni mehanizmi djelovanja apolipoproteina E (ApoE) u nastanku AB još uvijek nisu potpuno jasni. ApoE ima bitnu funkciju u prijenosu kolesterola u mozgu, te je pronađen u senilnim plakovima što ukazuje na direktnu interakciju ApoE s A β u mozgu (Rebeck i sur., 1993.). Varijanta $\epsilon 4$ proteina ApoE ima slabiji afinitet za peptide A β od ostalih nepatoloških varijanti proteina ApoE što rezultira smanjenim uklanjanjem peptida A β iz stanica (LaDu i sur., 1994.). Također, ApoE $\epsilon 4$ potiče nakupljanje A β peptida te njegovu agregaciju i stvaranje plakova (Holtzman i sur., 2000.; Ye i sur., 2005.). Najnovija istraživanja su ukazala da bi poticanje ekspresije APOE agonistom retinoidnog X receptora (RXR) moglo biti djelotvorno u uklanjanju peptida A β iz mozga i liječenju AB (Cramer i sur., 2012.).

Nedavno je u dvije paralelne GWAS analize otkriven i polimorfizam gena *CLU* kao drugi najjači genetski rizični čimbenik nastanka sporadičnog oblika Alzheimerove bolesti, odmah iza polimorfizma $\epsilon 4$ apolipoproteina E (Harold i sur., 2009.; Lambert i sur., 2009.). Zanimljivo, gen *CLU* kodira protein klusterin, poznat i kao apolipoprotein J (ApoJ) koji poput ApoE ima ulogu u prijenosu i metabolizmu kolesterola u mozgu. Postojanje više komplementarnih molekula odgovornih za prijenos kolesterola u mozgu objašnjava činjenicu da KO (od eng. *KnockOut*) gena *APOE* u miševima ne dovodi do ozbiljnijih neuroloških poremećaja. Za razliku od KO, DKO (od eng. *Double KnockOut*) gena *APOE*^{-/-}/*CLU*^{-/-} u miševima dovodi do povećanog nakupljanja peptida A β te stvaranja amiloidnih plakova (DeMattos i sur., 2004.). Naime, ApoJ sprečava polimerizaciju i agregaciju peptida A β

(Matsubara i sur., 1996.) te pospješuje njegovo uklanjanje (Zlokovic i sur., 1996.; Hammad i sur., 1997.).

Nakon važnog otkrića genetičkog rizika polimorfizma gena *APOE*, kolesterol se našao u fokusu istraživanja patogeneze Alzheimerove bolesti. Pokazano je da nivoi ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola (eng. *Low Density Lipoproteins*), ali ne i HDL-kolesterola (eng. *High Density Lipoproteins*) u serumu koreliraju s količinom A β 42 u mozgu pacijenata s AB (Kuo i sur., 1998.). Čini se da hiperkolesterolemija u srednjim godinama doprinosi većem riziku oboljenja od Alzheimerove bolesti u starosti (Kivipelto i sur., 2001.; Pappolla i sur., 2003.). No, Mielke i suradnici (2005) su također povezali povišenu razinu kolesterola u plazmi u starijoj dobi (70-79 godina) sa smanjenim rizikom od demencije u dubokoj starosti (79-88 godina). Nadalje, pokazano je da je razina kolesterola u mozgu pacijenata oboljelih od AB viša od one u zdravih kontrola slične dobi (Cutler i sur., 2004.; Xiong i sur., 2008.).

Dvije retrospektivne epidemiološke studije su otkrile smanjenu prevalenciju Alzheimerove bolesti u osoba koje su primale terapiju statinima, lijekovima za snižavanje kolesterola (Wolozin i sur., 2000.; Jick i sur., 2000.). Statini su inhibitori 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzimA reduktaze (HMG-CoAR), ključnog enzima u *de novo* sintezi kolesterola. Također, uzimanje statina može sniziti razinu A β u serumu (Friedhoff i sur., 2001.) te sAPP β , ali i sAPP α u likvoru (Sjögren i sur., 2003.). No kasnije prospektivne epidemiološke studije, kao i klinička ispitivanja nisu uspjela pokazati pozitivne učinke statina kod Alzheimer pacijenata (Li i sur., 2004.; Zandi i sur., 2005.; Rea i sur., 2005.; Sparks i sur., 2008.).

3.3.2. *In vivo* i *in vitro* dokazi

S druge strane, dokazi o vezi kolesterola s nastankom Alzheimerove bolesti dolaze iz *in vivo* i *in vitro* istraživanja koja pokazuju da promjene u homeostazi kolesterola utječu na procesiranje proteina APP i nastanak peptida A β . Sparks i suradnici (1994) prvi su primjetili da kolesterolom bogata prehrana vodi ka nakupljanju peptida A β u mozgu zečeva. Slijedili su pokusi koji su potvrdili da povećan unos kolesterola uzrokuje povećano nakupljanje peptida A β i odsječaka CTF, te smanjenje razine fragmenta sAPP α u mozgu transgeničnih miševa (Refolo i sur., 2000.; Shie i sur., 2002.). Uloga cirkulirajućeg kolesterola na rizik nastanka AB je pomalo kontroverzna, pogotovo u svjetlu činjenice da većina kolesterola u mozgu dolazi od *de novo* sinteze u središnjem živčanom sustavu, te kolesterol u pravilu ne prelazi intaktnu krvno-moždanu barijeru (Edmond i sur., 1991.). Ova činjenica stavlja upitnik na mehanizam

kojim prehrana bogata kolesterolom utječe na peptid A β u mozgu. Odgovor možda nudi pronalazak da je permeabilnost krvno-moždane barijere narušena u transgeničnih modela Alzheimerove bolesti (Ujiie i sur., 2003.). Ipak, više istraživanja je pokazalo da lijekovi koji spuštaju kolesterol, snižavaju razinu i nakupljanje peptida A β u mozgu transgeničnih miševa, miševa divljeg tipa i zamoraca (Fassbender i sur., 2001.; Refolo i sur., 2001.; Burns i sur., 2006.). U ovim istraživanjima korišteni su lipofilni statini poput lovastatina, simvastatina i atorvastatina koji mogu prijeći krvno-moždanu barijeru.

Povećanje i smanjenje razine kolesterola u staničnim modelima također utječe na stvaranje peptida A β . Tretman stanica statinima smanjuje proizvodnju peptida A β (Simons i sur., 1998.; Buxbaum i sur., 2001.; Fassbender i sur., 2001.; Guardia-Laguarta i sur., 2009.) i stimulira cijepanje proteina APP neamiloidogenim putem (Kojro i sur., 2001.). Začudo, relativno malo podataka je dostupno o utjecaju povišene razine kolesterola na cijepanje proteina APP u staničnim modelima. Istraživanja su pokazala smanjenu sekreciju sAPP α (Kojro i sur., 2001.; von Arnim i sur., 2008.), te povišenu aktivnost β -sekretaze i proizvodnju peptida A β (von Arnim i sur., 2008.; Xiong i sur., 2008.; Liu i sur., 2009.; Cossec i sur., 2010.) u stanicama tretiranim slobodnim kolesterolom u obliku LDL čestica ili kompleksom metil- β -ciklodekstrina i kolesterola (M β C-kolesterol). Dok slobodni kolesterol posredstvom LDL čestica ulazi preko receptora u stanicu endocitozom, kompleks s M β C omogućava direktnu ugradnju kolesterola u stanične membrane.

Iako većina istraživanja ide u prilog teoriji da povišena razina kolesterola potiče stvaranje i nakupljanje peptida A β , postoje i radovi čiji rezultati pokazuju suprotne efekte. Naime, Howland i suradnici (1998) su pokazali da prehrana bogata kolesterolom vodi ka smanjenju sekrecije peptida A β u mozgu transgeničnih miševa, dok su Abad-Rodriguez i suradnici (2004) pokazali da smanjenje kolesterola može potaknuti proizvodnju peptida A β . Dakle, pitanje pravog učinka kolesterola na metabolizam proteina APP i nakupljanje peptida A β nije sasvim razjašnjeno.

3.3.3. Stanični i molekularni mehanizmi

Protein APP, te enzimi uključeni u njegovo cijepanje su membranski proteini, a kolesterol ima vitalnu ulogu u građi i funkciji staničnih membrana. Štoviše, smatra se da protein APP, β - i γ -sekretaza, dakle enzimi ključni za nastanak peptida A β , mogu biti smješteni u membranskim domenama bogatim kolesterolom i sfingolipidima, tzv. lipidnim splavima (eng. *lipid rafts*) (Ehehalt i sur., 2003.; Vetrivel i sur., 2005.). Pojedina istraživanja

sugeriraju da izvan raftova protein APP dominantno cijepa α -sekretaza, dok se amiloidogeno cijepanje proteina APP događa upravo u lipidnim splavima (Vetrivel & Thinakaran, 2010.). Snižavanje kolesterola u staničnoj membrani utječe na smještaj proteina APP u raftovima, te uzrokuje smanjenu proizvodnju peptida A β (Simons i sur., 1998.). Dapače, naši rezultati pokazuju da nakupljanje kolesterola može dovesti do povećanog smještaja proteina APP u lipidnim splavima što može rezultirati povišenom razinom peptida A β (Košiček i sur., 2010.). No von Arnim i suradnici (2008) su pokazali da APP i BACE1, iako oboje mogu biti prisutni na staničnoj membrani, dolaze u neposrednu blizinu tek unutar stanice u endosomima. Nedavno, Marquer i suradnici (2011) su pokazali da povišena razina kolesterola u staničnoj membrani uzrokuje brzu internalizaciju proteina APP i BACE1 čemu ipak prethodi premještanje proteina APP u raftove i približavanje proteina APP i BACE1 na staničnoj membrani.

Protein APP se sa stanične membrane internalizira klatrin-ovisnom endocitozom, a njegova prisutnost u endosomima ovisi o regulaciji endocitoze proteina APP s površine stanice. Poznato je da kolesterol može utjecati na endocitozu. Naime, povišene koncentracije kolesterola uzrokuju smanjenje fluidnosti membrane te povećanu endocitozu (Weber i sur., 2006.). Istraživanja su pokazala da inhibicija ili aktivacija endocitoznog puta smanjuje odnosno povećava produkciju peptida A β (Grbović i sur., 2003.; Carey i sur., 2005.; Cirrito i sur., 2008.). Istraživanja koja su otkrila promjene u endosomima u ranoj fazi Alzheimerove bolesti, sugeriraju da je u mozgu pacijenata endocitoza vjerovatno povećana (Nixon, 2004.).

Uz ove indirektne efekte kolesterola na cijepanje proteina APP, pokazano je da kolesterol može i direktno modulirati aktivnost sekretaza. Bodovitz i Klein (1996) su prvi pokazali da povišena razina kolesterola može utjecati na aktivnost α -sekretaze uzrokujući smanjenu proizvodnju sAPP. Kolesterol može stimulirati proteolitičku aktivnost β -sekretaze (Kalvodova i sur., 2005.), dok su rezultati vezani za utjecaj kolesterola na aktivnost γ -sekretaze kontradiktorni (Wahrle i sur., 2002.; Wada i sur., 2003.; Osenkowski i sur., 2008.). Štoviše, nedavna studija je pokazala da je homeostaza kolesterola poremećena u mozgu oboljelih od AB što rezultira povećanom aktivnošću β - i γ -sekretaze (Xiong i sur., 2008.).

Osim što kolesterol može utjecati na cijepanje proteina APP i aktivnost enzima koji sudjeluju u tom procesu, Grimm i suradnici (2005) su pokazali da APP i produkti njegovog cijepanja također utječu na metabolizam kolesterola te su predložili model povratne sprege između kolesterola i nastanka peptida A β . Naime, primjetili su da kod transgeničnih miševa kojima nedostaje protein APP dolazi do promjena u homeostazi lipida, te su pokazali da peptid A β može djelovati kao inhibitor enzima HMG-CoAR te time smanjiti *de novo* sintezu kolesterola (Grimm i sur., 2005.).

3.4. Veza Alzheimerove bolesti i bolesti Niemann-Pick tipa C

Veza između kolesterola i peptida A β otkrivena je ne samo u Alzheimerovoj bolesti nego i u bolesti Niemann-Pick tipa C (NPC). Kod ljudi oboljelih od bolesti Niemann-Pick tipa C dolazi do nakupljanja kolesterola u jetri, slezeni i mozgu, te progresivne neurodegeneracije. Zadnjih 10-ak godina, sličnost histopatologija bolesti Niemann-Pick tipa C i Alzheimerove bolesti je pobudila interes znanstvenika (Nixon, 2004.). Naime, nedostatak proteina NPC1 može uzrokovati hiperfosforilaciju proteina tau i značajno povećanje razine A β , kao i u Alzheimerovoj bolesti. Kako istraživanja sve više ukazuju na utjecaj lipida na cijepanje proteina APP i nastanak peptida A β , bolest NPC je postala važnim modelom za proučavanje veze između kolesterola, proteina APP i nastanka peptida A β . Dapače, pomoću staničnih i animalnih modela ove bolesti pokazano je da nakupljanje kolesterola kao i njegov poremećen transport mogu imati značajan utjecaj na cijepanje proteina APP.

3.4.1. Bolest Niemann-Pick tipa C

Bolest Niemann-Pick tipa C je nasljedna lizosomska bolest nakupljanja lipida koja nastaje zbog mutacija u genima *NPC1* ili *HE1*, poznatog i kao *NPC2*. NPC1 je veliki membranski protein s 13 transmembranskih domena smješten u kasnim endosomima i lizosomima (Carstea i sur., 1997.), dok je NPC2 manji protein koji se nalazi u lumenu lizosoma (Naureckiene i sur., 2000.). Oba ova proteina imaju domene za vezanje kolesterola, te se smatra da djeluju u tandemu prilikom transporta kolesterola iz lizosoma (Infante i sur., 2008.). To objašnjava kako mutacije u bilo kojem od ova dva gena uzrokuju isti fenotip tj. bolest NPC, iako svega je 5% slučajeva uzrokovano mutacijom u genu *NPC2* (Vanier, 2010.).

Kolesterol može nastati u stanici *de novo* sintezom ili ga stanica može unijeti klatrinovisnom endocitozom. Naime, kolesterol se u obliku estera prenosi LDL česticama koje se vežu na receptore iz obitelji LDL-receptora. Kolesterol-esteri unešeni endocitozom se hidrolizom prevode u slobodni kolesterol koji dolazi do kasnih endosoma i lizosoma odakle se transportira u endoplazmatski retikulum (ER) i plazma membranu. U ER-u se regulira homeostaza staničnog kolesterola. Naime, kada je udio kolesterola manji od 5% ukupne količine lipida u ER-u dolazi do aktivacije *de novo* sinteze kolesterola. U slučaju viška kolesterola u ER-u, on se tamo esterificira uz pomoć enzima acil-kolesterol-aciltransferaze (ACAT), a kolesterol-esteri se skladište u lipidnim kapljicama u citosolu. Nedostatak funkcionalnog oblika proteina NPC1 ili NPC2 uzrokuje zastoje i nakupljanje slobodnog ne-

esterificiranog kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima. Taj zastoj uzrokovan nedostatkom funkcionalnog proteina NPC1/2 dovodi do snižavanja razine kolesterola u ER-u što pak stimulira njegov povećan unos posredovan LDL-receptorima i *de novo* sintezu u stanici, te zaustavlja esterifikaciju (Pentchev i sur., 1985.; Pentchev i sur., 1986.; Pentchev i sur., 1987.; Liscum & Faust, 1987.). Osim kolesterola, u stanicama s nefunkcionalnim proteinom NPC1/2 dolazi i do nakupljanja drugih lipida poput glikosfingolipida, sfingomijelina te BMP-a (od eng. *Bis (Monoacylglycero) Phosphate*) u kasnim endosomima/lizosomima (Kobayashi i sur., 1999.; Zervas i sur., 2001.; Zhang i sur., 2001.; te Vrucite i sur., 2004.; Lloyd-Evans i sur., 2008.).

3.4.2. Promjene metabolizma proteina APP u bolesti NPC

Iako amiloidni plakovi uglavnom nisu primjećeni kod ljudi oboljelih od bolesti NPC, nedavna *in vitro* i *in vivo* istraživanja su pokazala da nedostatak funkcionalnog proteina NPC1 uzrokuje značajno nakupljanje odsječka CTF β i peptida A β (Yamazaki i sur., 2001.; Burns i sur., 2003.; Jin i sur., 2004.; Kodam i sur., 2010.). Dapače, Mattsson i suradnici (2010) su pronašli povišenu razinu peptida A β u likvoru NPC pacijenata. Većina ovih istraživača smatra da je povećana razina peptida A β kod pacijenata, te staničnih i animalnih modela bolesti NPC uzrokovana povećanom aktivnošću β -, odnosno γ -sekretaze (Burns i sur., 2003.; Kodam i sur., 2010.; Mattsson i sur., 2010.).

Zanimljivo, Saito i suradnici (2002) su primjetili amiloidne plakove kod pacijenata oboljelih od bolesti NPC, a koji su ujedno bili i homozigoti za *APOE* alel $\epsilon 4$. Dakle, čini se da alel $\epsilon 4$ ApoE potiče nakupljanje peptida A β u plakove u bolesti Niemann-Pick tipa C, kao i u Alzheimerovoj bolesti.

Kod bolesti NPC primjećen je i poremećaj u endocitoznom putu koji uključuje i vezikule koje nisu glavna mjesta nakupljanja lipida. Tako istraživanja pokazuju smanjeno recikliranje receptora transferina na površinu stanice, te općenito promijenjen stanični transport membranskih proteina poput CI-MPR (od eng. *Cation-Independent Mannose-6-Phosphate Receptor*) i Rab4 (Puri i sur., 1999.; Choudhury i sur., 2004.; Pipalia i sur., 2007.). Pokazano je da se uslijed nedostatka funkcionalnog proteina NPC1, odsječci CTF β i peptidi A β nakupljaju u kasnim, kolesterolom bogatim, endosomima (Yamazaki i sur., 2001.; Runz i sur., 2002.; Jin i sur., 2004.), ali i u ranim endosomima (Jin i sur., 2004.). Dodatno, u preparatima moždanog tkiva NPC pacijenata, Jin i suradnici (2004) su primjetili da se A β i

CTF β nakupljaju u abnormalno povećanim endosomima kakvi su također primjećeni i kod Alzheimerove bolesti.

3.4.3. Promjene funkcije proteina NPC1 u Alzheimerovoj bolesti

Osim sličnosti NPC patologije s onom Alzheimerove bolesti, novija istraživanja ukazuju na dvosmjernu povezanost te dvije bolesti. Naime, nedavno su otkrivene promjene u ekspresiji tj. u razini mRNA i proteina NPC1 u mozgu pacijenata oboljelih od Alzheimerove bolesti. Analizom sveukupne ekspresije gena pomoću oligonukleotidnih mikročipova (eng. *microarray analysis*) otkrivena je snižena ekspresija gena NPC1 (Ginsberg i sur., 2010.), dok je drugo istraživanje pak pokazalo povišenu ekspresiju NPC1 i na razini mRNA i na razini proteina. Oba su istraživanja rađena na *postmortem* hipokampalnim uzorcima osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti. Iako su ova istraživanja naizgled dala oprečne rezultate, oba su otkrila promjene vezane za NPC1 i metabolizam kolesterola u dijelu mozga koji je najviše zahvaćen patologijom Alzheimerove bolesti. Naime, osim što nedostatak funkcionalnog proteina NPC1 uzrokuje nakupljanje kolesterola u bolesti NPC, pokazano je da u poremećajima u kojima dolazi do sekundarnog nakupljanja kolesterola dolazi i do povišene ekspresije proteina NPC1, što se tumači kao stanični odgovor na poremećenu homeostazu kolesterola (Puri i sur., 1999.).

Dodatno, pokusi križanja NPC1^{+/-} miša i transgeničnog mišjeg modela AB pokazali su da smanjena ekspresija NPC1 (NPC1^{+/-}) uzrokuje povećano nakupljanje peptida A β i povećano stvaranje plakova u križanim transgeničnih miševa (Borbon & Erickson, 2010.). Ovi rezultati ukazuju na važnu ulogu promijenjenog metabolizma kolesterola, koji može uključivati i promjenu funkcije proteina NPC1, u patogenezi Alzheimerove bolesti. Dakle, bolest NPC predstavlja inovativan model za istraživanja molekularnih mehanizama djelovanja kolesterola na nastanak peptida A β , ključne molekule u patogenezi Alzheimerove bolesti.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Kultura stanica

U istraživanjima smo koristili staničnu liniju CHO (eng. *Chinese Hamster Ovary*) kojoj je deletiran gen za protein NPC1 (CHO-*NPC1*^{-/-}), te parentalnu staničnu liniju CHO divljeg tipa (CHO^{wt}). Kako bismo potvrdili da su rezultati dobiveni na stanicama *NPC1*^{-/-} uistinu vezani za nedostatak proteina NPC1, u analize smo dodatno uključili i staničnu liniju CHO-*NPC1*^{-/-} koja stabilno eksprimira gen *NPC1* (CHO-*NPC1*^{-/-}+NPC1). Stanice CHO-*NPC1*^{-/-}+NPC1 bi trebale davati rezultate slične onima u stanicama divljeg tipa. Sva tri tipa stanica su dobivena ljubaznošću dr. Daniel S. Oryja (Washington University School of Medicine, St. Louis, SAD).

4.1.1. Uzgoj stanica u kulturi

Stanice CHO smo uzgajali u uvjetima *in vitro* u hranjivom mediju DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, SAD) s dodatkom 10% seruma goveđeg fetusa (eng. *Foetal Bovine Serum*, FBS; Sigma-Aldrich, SAD), 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, SAD) te otopine antibiotika i antimikotika koja sadrži 100 jedinica/ml penicilina, 100 µg/ml streptomocina i 0.25 µg/ml amfotericina B (Sigma-Aldrich, SAD). Stanice su rasle u sterilnim plastičnim T-bocama (Sarstedt, Njemačka) u inkubatoru s vlažnom atmosferom pri 37°C i 5% CO₂. Stanice smo održavali u kulturi redovitim presađivanjem nakon odvajanja od podloge pomoću otopine 0.05% tripsina s dodatkom 0.02% EDTA (Sigma-Aldrich, SAD). Broj stanica i njihovu vijabilnost određivali smo s 0.03% otopinom tripanskog modrila (Sigma-Aldrich, SAD) koja mrtve stanice boja u plavo. Za brojanje stanica koristili smo Neubauerovu komoricu te invertni svjetlosni mikroskop (Zeiss Axiovert 25).

4.2. Transfekcija stanica

Za potrebe ovog istraživanja u stanicama smo prolazno ili stabilno ekspimirali pojedine rekombinantne proteine. U tu svrhu stanice smo transfecirali pomoću transfekcijskog reagensa Lipofectamine LTX (Invitrogen, SAD). Transfekcijska smjesa se sastojala od medija DMEM/F12 koji nije sadržavao FBS niti antibiotike, transfekcijskog reagensa i DNA

(plazmidnog vektora koji kodira određeni protein). Sam volumen transfekcijske smjese i pojedinih komponenti u njoj prilagođavani su formatu pokusa prema uputama proizvođača. Nakon 30 minuta inkubacije transfekcijske smjese pri sobnoj temperaturi, smjesu smo nakapali na stanice koje su bile ~70% konfluentne.

4.2.1. Prolazna transfekcija stanica

U svrhu prolazne ekspresije proteina, stanice smo transfecirali s odgovarajućim plazmidnim vektorom koji kodira željeni protein. Stanice smo nakon toga održavali u kulturi 24-48 sati kako bismo dozvolili ekspresiju unešenog proteina, te bi zatim analizirali ekspresiju, cijepanje ili smještaj tog proteina u stanicama.

Kod analize ekspresije i cijepanja prolazno ekspimiranog proteina APP metodama *Western blot* i ELISA (od eng. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) u analizu smo uključili kontrolu uspješnosti transfekcije u stanicama CHO^{wt}, CHO-*NPCI*^{-/-} i CHO-*NPCI*^{-/-}+NPC1. Uz prolaznu transfekciju konstruktom koji kodira protein APP, pojedinu staničnu liniju CHO smo u svakom eksperimentu paralelno u zasebnim bunarićima, odnosno pločama, prolazno transfecirali plazmidnim vektorom koji sadrži cDNA za alkalnu fosfatazu SEAP (od eng. *SEcreted Alkaline Phosphatase*). Razina aktivnosti izlučene alkalne fosfataze u mediju stanica ovisi samo o uspješnosti njene transfekcije te smo tu aktivnost upotrijebili za mjeru uspješnosti transfekcije između pojedinih staničnih linija. Uspješnost transfekcije pojedine stanične linije CHO smo uzeli u obzir prilikom određivanja količine prolazno transfeciranog proteina APP i produkata njegovog cijepanja u stanicama CHO^{wt}, CHO-*NPCI*^{-/-} i CHO-*NPCI*^{-/-}+NPC1 pri svakom pokusu.

4.2.1.1. Mjerenje aktivnosti alkalne fosfataze SEAP

Aktivnost alkalne fosfataze SEAP izmjerili smo u mediju stanica CHO^{wt}, CHO-*NPCI*^{-/-} i CHO-*NPCI*^{-/-}+NPC1 prolazno transfeciranih s konstruktom *SEAP*. U ploči s 96 bunarića pomiješali smo 20 µl medija sakupljenog s transfeciranih stanica sa 180 µl otopine supstrata alkalne fosfataze: 1 mg/ml p-nitrofenilfosfata (pNPP; Sigma-Aldrich, SAD) u puferu za alkalnu fosfatazu (0.1 M glicin, 1 mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂, pH 10.4). U reakciji cijepanja spoja pNPP alkalnom fosfatazom dolazi do nastanka žutog produkta čiju smo apsorbanciju očitavali 30 minuta nakon dodavanja supstrata pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini 405 nm (Multiskan EX; ThermoLabsystems, SAD). Aktivnost fosfataze SEAP smo na taj način

izmjerili za svaku staničnu liniju u tehničkom duplikatu, a srednju vrijednost očitane apsorbancije smo podijelili s koncentracijom proteina u odgovarajućem staničnom lizatu. Tako izračunatu aktivnost fosfataze SEAP smo uzeli kao mjeru uspješnosti transfekcije pojedinih stanica u pokusu.

4.2.2. Stabilna transfekcija stanica

Kod stabilne ekspresije željenog proteina, stanice smo transfecirali s plazmidnim vektorom koji kodira odgovarajući protein te sadrži gen za rezistenciju na određeni eukariotski antibiotik poput puromicina ili G418. 24-48 sati nakon transfekcije, stanicama smo promijenili medij dodajući im isti medij za održavanje u kulturi koji sada sadrži selekcijski antibiotik. U slučaju stanica CHO koje stabilno ekspimiraju protein HA-SEAP-APPwt dodali smo 10 µg/ml puromicina (Sigma-Aldrich, SAD) odnosno 1.5 mg/ml G418 (Sigma-Aldrich, SAD) za selekciju stanica CHO koje stabilno ekspimiraju protein BACE1-GFP. Sljedećih dana smo promatrali rast / odumiranje stanica, a medij sa selekcijskim antibiotikom smo mijenjali po potrebi, svaka 2-3 dana. Netransfecirane stanice su brzo odumirale, a počele su se pojavljivati izolirane kolonije transfeciranih stanica koje su sve više rasle. Nakon što su postigle konfluentnost, presadili smo ih te smrznuli na odgovarajući način do daljnje upotrebe. Na ovaj način je dobivena mješovita kultura stabilnih staničnih linija.

4.2.3. Plazmidni vektori

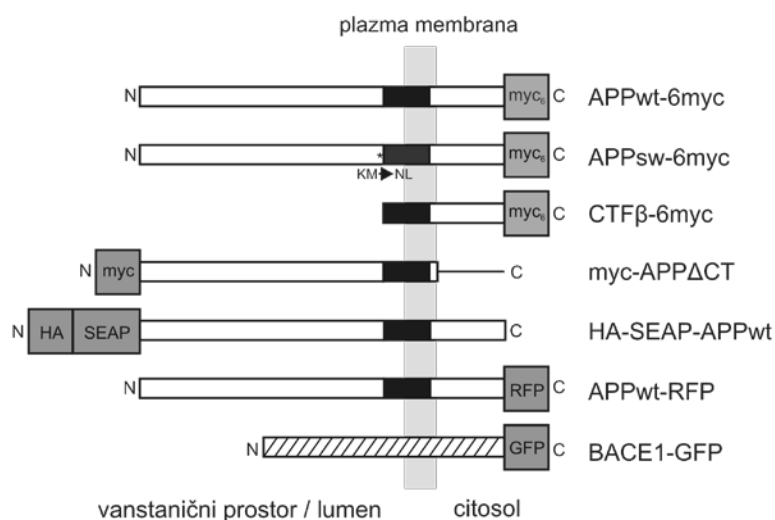
U ovom smo istraživanju koristili različite plazmidne vektore koji kodiraju razne rekombinantne proteine, a koje smo željeli prolazno ili stabilno ekspimirati u stanicama CHO. Vektori su navedeni u Tablici 4.1., a sheme ekspimiranih rekombinantnih proteina su prikazane na Slici 4.1. U slučaju ekspresije egzogenog proteina APP, uvijek smo ekspimirali izoformu APP₆₉₅.

Tablica 4.1. Popis plazmidnih vektora korištenih u istraživanju s referencama

Protein	Vektor	Referenca
SEAP	pCS2	Dar dr. Kopana (Washington University, SAD)
APPwt-6myc	pCS2+6MT	Hecimovic i sur., 2004.
APPsw-6myc	pCS2+6MT	Hecimovic i sur., 2004.
CTF β -6myc	pCS2+6MT	Hecimovic i sur., 2004.
myc-APP Δ CT	pSP65	Tienari i sur., 1996. ; dar dr. Lichtenthalera (DZNE, Njemačka)
HA-SEAP-APPwt	P12 Ki1A	Dar dr. Lichtenthalera (DZNE, Njemačka)
APP-RFP	pmRFP-N1	von Arnim i sur., 2008.; dar dr. von Arnim (Ulm, Njemačka)
BACE1-GFP	pEGFP-N1	von Arnim i sur., 2008.; dar dr. von Arnim (Ulm, Njemačka)

Biljezi: myc (epitop c-myc peptida, sekvenca N-EQKLISEEDL-C); HA (epitop proteina virusa ljudske gripe – hemaglutinin, sekvenca N-YPYDVPDYA-C)

Ostalo: Δ CT (delecija citoplazmatskog repa, od eng. *Citoplasmic Tail*); RFP (od eng. *Red Fluorescent Protein*); GFP (od eng. *Green Fluorescent Protein*)



Slika 4.1. Shematski prikaz rekombinantnih proteina korištenih u istraživanju. Na shemi je označena sekvenca peptida A β (crno), mjesto i promjena *Swedish* mutacije (*KM \rightarrow NL), N- ili C-terminalni biljezi (sivo), te smještaj proteina u odnosu na plazma membranu.

4.3. Snižavanje i nakupljanje kolesterola

U svrhu snižavanja razine kolesterola u stanicama CHO primjenili smo više različitih strategija: uzgoj stanica u mediju bez egzogenih lipida, te tretman stanica statinima ili spojem metil- β -ciklodekstrin.

Pri uzgoju stanica bez egzogenih lipida, stanice su rasle u mediju za rast stanica u koji smo umjesto uobičajenog seruma FBS koji sadrži lipide dodali 10% seruma bez lipida (od eng. *LiPid Deficient Serum*, LPDS; Cocalico Biologicals, SAD). Stanice smo prvo nasadili u odgovarajućim sterilnim plastičnim pločama (TPP, Švicarska) u mediju DMEM/F12 s dodatkom 10% seruma FBS. Drugi dan smo stanice isprali tri puta sa sterilnim fosfatnim puferom (eng. *Phosphate Buffered Saline*, PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) kako bismo uklonili tragove seruma FBS. Stanicama smo zatim dodali medij DMEM/F12 s dodatkom 10% seruma LPDS te ih u tim uvjetima bez egzogenih lipida (tretman LPDS) uzgajali iduća 48 sata.

Tretman statinima u prisustvu niske koncentracije mevalonata inhibira biosintezu kolesterola i uzrokuje snižavanje ukupnog kolesterola u stanicama. U pojedinim smo pokusima u medij s 10% seruma LPDS dodali 4 μ M lovastatin (Sigma-Aldrich, SAD) s dodatkom 0.25 mM mevalonata (Sigma-Aldrich, SAD) te stanice inkubirali 48 sati.

Spoj metil- β -ciklodekstrin (M β C) specifično uklanja stanični kolesterol (Christian i sur., 1997.). Stanicama smo snizili razinu kolesterola korištenjem M β C (Sigma-Aldrich, SAD) provodeći akutni ili kronični tretman. Pri akutnom tretmanu, stanice smo inkubirali 1 sat s 10 mM otopinom spoja M β C u mediju s 10% seruma LPDS. Stanicama smo zatim promijenili medij, te ih inkubirali sljedeća 24 sata u mediju s 10% serumom LPDS bez dodatka spoja M β C. Kod kroničnog tretmana, stanice smo inkubirali 24 sata s 1 mM otopinom spoja M β C u mediju s 10% seruma LPDS.

Kako bismo uzrokovali nakupljanje kolesterola u stanicama CHO_{wt}, stanice smo tretirali sa spojem U18666A ili s kolesterolom konjugiranim sa spojem M β C (kompleksom M β C-kolesterola).

Amfifilni spoj U18666A (3- β -[2-(dietilamino)etoksi]androst-5-en-17-on) se u literaturi koristi za oponašanje fenotipa NPC (Lange i sur., 2000.). Stanice CHO_{wt} smo nasadili u mediju DMEM/F12 s dodatkom 10% seruma FBS. Drugi dan smo stanicama dodali isti medij DMEM/F12 koji sadrži 10% serum FBS uz dodatak 3 μ g/ml spoja U18666A (Sigma-Aldrich, SAD) te ih u tim uvjetima uzgajali iduća 48 sata.

Kolesterol konjugiran sa spojem M β C je topljiv u vodi, te nesmetano ulazi u stanicu gdje uzrokuje povećanje razine kolesterola. Stanice CHO wt smo nasadili u mediju DMEM/F12 s dodatkom 10% seruma FBS. Drugi dan smo stanice isprali tri puta sa sterilnim puferom PBS kako bismo uklonili tragove seruma FBS. Stanicama smo zatim dodali medij DMEM/F12 s 10% seruma LPDS te ih uzgajali iduća 24 sata kako bismo stanice izgladnili i time potaknuli bolji unos kolesterola u slijedećem tretmanu. Stanice smo zatim inkubirali 4 sata sa 100 μ M otopinom kompleksa M β C-kolesterol (Sigma-Aldrich, SAD) u mediju DMEM/F12 koji sadrži 10% seruma LPDS.

4.3.1. Mjerenje razine ukupnog kolesterola u staničnom lizatu

Koncentraciju ukupnog kolesterola u stanicama smo izmjerili komercijalnim kompletom „Amplex Red Cholesterol Assay“ (Invitrogen, SAD). Ovim kompletom mogu se detektirati kako slobodni kolesterol, tako i kolesterol-estri jer u reakciji sudjeluje kolesterol esteraza koja hidrolizira kolesterol-estere do slobodnog kolesterola. Slobodni kolesterol se zatim oksidira kolesterol oksidazom pri čemu se oslobađa H₂O₂. Vodik peroksid reagira stehiometrijski 1:1 s reagensom „Amplex Red“ pomoću enzima peroksidaze pri čemu nastaje fluorescentni spoj resofurin koji pobuđujemo i čiju emisiju očitavamo uz pomoć fluorimetra (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific, SAD). Komplet sadrži liofilizirani kolesterol kao standard kojeg smo otopili u rasponu koncentracija 0-10 μ g/ml te pomoću njih dobili standardnu krivulju iz čije smo jednadžbe izračunali koncentraciju ukupnog kolesterola u uzorcima.

Kako bismo izmjerili stanični kolesterol, stanice smo lizirali u puferu CoIP (od eng. *CoImmunoPrecipitation buffer*; 50 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% NP40) s dodatkom koktela inhibitora proteaza (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka). U crnoj pločici s 96 bunarića, 50 μ l staničnog lizata (~10 μ g proteina) odnosno standarda smo pomiješali s 50 μ l reakcijske smjese prema uputama proizvođača. Pločicu smo inkubirali 30 min pri 37°C te očitali u fluorimetru. Koncentraciju ukupnog kolesterola u staničnom lizatu u μ g/ml smo izračunali uz pomoć standardne krivulje. Količinu kolesterola u staničnom lizatu smo odredili tako što smo koncentraciju kolesterola podijelili s koncentracijom proteina u odgovarajućem staničnom lizatu te je konačna vrijednost izražena u μ g-ima kolesterola po mg-u proteina za pojedini lizat.

4.3.2. Bojanje slobodnog neesterificiranog kolesterola u stanicama

Kako bismo odredili smještaj slobodnog kolesterola, bojali smo stanice filipinom (Sigma-Aldrich, SAD). Filipin je antibiotik izoliran iz aktinomiceta *Streptomyces filipiensis*, ima svojstvo fluorescencije te se snažno veže na slobodni kolesterol. Stanice, uzgajane na okruglim pokrovnim stakalcima promjera 12 mm (Thermo Fisher Scientific, SAD) u pločicama s 24 bunarića, smo isprali tri puta u puferu PBS, fiksirali 15 min u 4% otopini paraformaldehida u puferu PBS pri sobnoj temperaturi te ponovo isprali tri puta u puferu PBS. Stanice smo bojali 1 sat u otopini filipina (50 µg/ml) u puferu PBS uz dodatak 10% seruma FBS. Stanice smo nakon bojanja ponovo dva puta isprali u puferu PBS i jedan put u kvarenoj (mQ) vodi kako bismo spriječili nastanak kristalića soli iz pufera PBS na preparatu. Pokrovnice sa stanicama smo uklopili u mediju za uklapanje (Fluka, Švicarska). Filipinom obojane stanice smo promatrali epifluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51) pri ekscitaciji 360 nm i emisiji 465 nm.

4.4. Protutijela

Tablica 4.2. Popis specifičnih protutijela korištenih u istraživanju.

Protutijelo	Antigen / Organel	Western blot	Imunocitokemija	Proizvođač
22C11	N-terminus proteina APP	1:1000	/	Chemicon
5313	N-terminus proteina APP	/	1:250	dar dr. Lictenthalera
192wt	sAPP β	1:1000	/	Elan
14D6	sAPP α	1:10	/	dar dr. Lictenthalera
WO2	sAPP α	1:1000	/	dar dr. Beyreuthera
6687	C-terminus proteina APP	1:500	1:250	dar dr. Lictenthalera
9E10	C-myc	1:1000	1:150	Sigma-Aldrich
Anti-HA	hemaglutinin	/	1:500	dar dipl. ing. Mikecin
EEA1	rani endosomi	/	1:250	BD Transduction
TfR	reciklirajući endosomi	/	1:100	Zymed
BMP	kasni endosomi	/	1:50	dar dr. Gruenberg
LAMP1	lizosomi	/	1:100	Sigma-Aldrich
NPC1	NPC1	1:1000		Abcam
aktin	β -aktin	1:1000		Sigma-Aldrich

Markeri organela: EEA1 (od eng. *Early Endosome Antigen 1*); TfR, receptor transferina; BMP (od eng. *Bis (Monoacylglycero) Phosphate*); LAMP1 (od eng. *Lysosomal-Associated Membrane Protein 1*)

4.5. Analiza razine proteina metodom Western blot

Za analizu produkata cijepanja endogenog proteina APP, stanice smo nasadili u sterilne plastične ploče promjera 10 cm (TPP, Švicarska) u 10 ml medija DMEM/F12 koji sadrži 10% seruma FBS. Nasadili smo 1×10^6 stanica po ploči. Nakon što su stanice rasle 48h, zamijenili smo im medij te dodali 5 ml medija DMEM/F12 koji sadrži 10% seruma FBS te ih inkubirali još 24h. Cilj nam je bio, tih zadnjih 24 sata pokusa, sakupiti produkte cijepanja proteina APP u mediju (fragmenti sAPP α/β , izlučeni peptidi A β) u što manjem volumenu kako bismo ih ukoncentrirali. U slučaju inhibicije enzima γ -sekretaze, zadnjih 24 sata smo u medij dodali 1 μ M spoja DAPT (Sigma-Aldrich, SAD).

U svrhu analize produkata cijepanja prolazno eksprimiranih rekombinantnih oblika proteina APP, stanice smo nasadili u sterilne plastične ploče promjera 10 cm u 10 ml medija DMEM/F12 koji sadrži 10% seruma FBS. Nasadili smo $1,2 \times 10^6$ stanica po ploči. Drugi dan

smo stanice transfecirali s odgovarajućim konstruktom pomoću transfekcijskog reagensa Lipofectamine LTX (Invitrogen, SAD), te inkubirali 6 sati. Zatim smo stanicama zamijenili medij kako bismo spriječili predugo izlaganje stanica transfekcijskom reagensu koji može biti toksičan. Idući dan smo stanicama ponovo zamijenili medij i dodali 5 ml medija DMEM/F12 koji sadrži 10% seruma FBS te ih inkubirali još 24h kako bismo sakupili produkte cijepanja proteina APP u mediju.

U slučaju tretmana snižavanja razine kolesterola, stanicama smo prije transfekcije zamijenili medij s DMEM/F12 medijem koji sadrži 10% seruma LPDS (tretman LPDS) te smo sve daljnje izmjene medija vršili s tim medijem kako bismo ostvarili potrebnu inkubaciju od 48 sati u uvjetima bez egzogenih lipida unutar pokusa.

4.5.1. Priprema staničnog lizata

Stanice su na kraju pokusa bile 90-100% konfluentne. Svi sljedeći koraci izvođeni su na ledu. Sakupili smo medij sa stanica u plastične tube volumena 15 ml (tzv. „falkonice“; TPP, Švicarska) te ga centrifugirali pri 720 x g, 10 min u ohlađenoj centrifugi pri 4°C (Eppendorf 5408R) kako bismo istaložili eventualne mrtve stanice i njihove ostatke koji se nalaze u mediju. Supernatant smo dekantirali u nove tube. Tako sakupljeni medij smo smrznuli pri -80°C ili smo odmah pristupili analizi.

Stanice smo ispirali tri puta u hladnom puferu PBS. Pazili smo da pri posljednjem ispiranju uklonimo sav pufer. Zatim smo stanice odvojili od plastične površine ploče na kojoj su rasle pomoću gumene strugalice (eng. *Policeman, cell scraper*; Sarstedt, Njemačka) u 800 µl pufera CoIP (50 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% NP40) s dodatkom koktela inhibitora proteaza (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka). Lizate smo prebacili u mikrotubice volumena 1.5 ml (Sarstedt, Njemačka) te inkubirali 20 min na ledu. Zatim smo ih centrifugirali pri maksimalnoj brzini mikrocentrifuge Eppendorf 5415R (16 000 x g), 10 min pri 4°C kako bismo istaložili stanični debris. Supernatant smo prebacili u nove mikrotubice, te odredili koncentraciju proteina i pristupili analizi. Lizate smo čuvali pri -80°C.

4.5.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentraciju proteina u staničnim lizatima smo odredili uz pomoć komercijalno dostupnog kompleta reagensa baziranom na metodi prema Lowry-ju (DC Protein Assay; BioRad, SAD). Ukratko, proteini reagiraju s lužnatom otopinom bakrenog tartarata koji potom

reducira Folinov reagens što dovodi do razvijanja plavog obojenja s maksimalnom apsorbanzijom pri valnoj duljini 750 nm. Kao standard poznate koncentracije proteina uz pomoć koje smo pripravili standardnu krivulju poslužila nam je komercijalno dostupna otopina albumina goveđeg seruma (BSA od eng. *Bovine Serum Albumin*) koncentracije 2 mg/ml (BioRad, SAD). Napravili smo razrijeđenja standarda koncentracija: 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 i 0 mg/ml s puferom u kojem su lizirani uzorci kojima smo željeli odrediti koncentraciju proteina. Koncentracije proteina u uzorcima smo izračunali iz jednadžbe pravca koji opisuje standardnu krivulju.

Koncentraciju proteina smo određivali u mikrotitarskim plastičnim pločicama s 96 bunarića (Sarstedt, Njemačka). Prvo smo u jažice nanijeli po 5 μ l standarda, odnosno uzorka, dodali 25 μ l reagensa A' (u 1 ml reagensu A se doda 20 μ l reagensu S) i zatim smo dodali 200 μ l reagensu B te promiješali i inkubirali 15 min pri sobnoj temperaturi. Apsorbanciju pri 750 nm smo očitali na spektrofotometru (ThermoLabsystems Multiskan EX, SAD).

4.5.3. Imunoprecipitacija i SDS-poliakrilamid gel elektroforeza

Kako bismo mogli detektirati endogene odsječke CTF, morali smo ih imunoprecipitirati iz staničnog lizata. U uzorke staničnog lizata, normalizirane prema koncentraciji proteina, dodali smo 35 μ l Protein A Sefaroze (Sigma-Aldrich, SAD) te specifično protutijelo za C-terminus proteina APP (6687) u koncentraciji 1:300 v/v. Tako pripremljene uzorke smo inkubirali pri 4°C preko noći uz stalno miješanje. Zatim smo uzorke centrifugirali pri brzini od 2300 x g, 5 min pri 4°C (Eppendorf 5415R) kako bismo spustili kuglice sefaroze. Supernatant smo pokupili, te spremili pri -80°C za druge potencijalne analize. Na kuglice sefaroze na koje se prilikom imunoprecipitacije vezalo protutijelo s odgovarajućim antigenom (odsječci CTF) smo dodali 1 ml pufera CoIP, te ponovo spustili centrifugiranjem. Sefarozu smo na ovaj način isprali dva puta i jedan puta u PBS-u kako bismo uklonili nespecifično vezane proteine. Nakon zadnjeg ispiranja, sav pufer sa sefaroze smo odsisali pomoću igle 30G (BD, SAD) i vakuum pumpe. Na posušene kuglice sefaroze smo dodali 2x koncentrirani pufer za nanošenje uzoraka – PLD (od eng. *Protein Loading Dye*; 6xPLD: 6 ml glicerola, 1.2 g SDS-a, 0.31 g DTT-a, 1.25 ml 0.5 M pufera Tris pH 6.8, boja bromfenol modro, dH₂O do ukupnog volumena 10 ml). Tako pripremljene uzorke smo denturirali pri 70°C, 10 min te razdvojili elektroforezom pomoću sustava Mini-PROTEAN za vertikalnu elektroforezu (BioRad, SAD) u peptidnom Tris-tricin gelu u denaturirajućim uvjetima (Tablica 4.3.) pri konstantnom naponu 120V (Schägger, 2006.).

Tablica 4.3. Sastav peptidnog Tris-tricin gela (volumen za dva 1.5 mm gela) te katodnog i anodnog pufera za elektroforezu.

	Gel za sabijanje	Diskontinuirani gradijentni gel za razdvajanje	
	4% gel	10% gel	16.5% gel
dH₂O	4.2 ml	3.5 ml	/
Peptidni pufer (3 M Tris-HCl pH 8.45, 0.3% SDS)	1.55 ml	2.5 ml	3.5 ml
32% glicerol	/	/	3.5 ml
49.5% otopina akrilamida i bisakrilamida (48.5 : 1.5)	0.5 ml	1.5 ml	3.5 ml
10% APS	50 µl	35 µl	32.5 µl
TEMED	5 µl	4 µl	4 µl
Katodni pufer: 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M Tricin, 0.1% SDS Anodni pufer: 0.2 M Tris-HCl, pH 8.9			

Ostale produkte cijepanja proteina APP smo analizirali direktnim nanošenjem u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima. Uzorke koje smo nanijeli na gel smo normalizirali prema koncentraciji proteina te prema uspješnosti transfekcije za određenu staničnu liniju u pokusu. Elektroforezom smo razdvojili proteine na temelju razlike u njihovoj molekularnoj masi. Koristili smo Mini-PROTEAN sustav za vertikalnu elektroforezu (BioRad, SAD). Svaki gel se sastojao od gela za sabijanje s 5% mješavine akrilamida i gela za razdvajanje proteina. Za razdvajanje endogenog proteina APP, te N-terminalnih fragmenata sAPP α/β koristili smo gel za razdvajanje s 8% mješavinom akrilamida. Egzogeni protein APP i C-terminalne produkte njegovog cijepanja razdvojili smo u gelu za razdvajanje s 12% mješavinom akrilamida. Detaljan opis komponenti gelova i pufera za elektroforezu se nalazi u tablici 4.4. Stanične lizate smo prije nanošenja pomiješali s puferom za nanošenje uzoraka 6xPLD, te denaturirali pri 70°C, 10 min. Proteine smo razdvojili pri konstantnom naponu 150V.

Tablica 4.4. Sastav Tris-glicin poliakrilamidnih gelova (5 ml) te pufera za elektroforezu.

	5% gel	8% gel	12% gel
dH₂O	3.45	2.35	1.65
30% otopina akrilamida i bisakrilamida (29:1)	0.83	1.3	2.0
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	/	1.3	1.3
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.63	/	/
10% APS	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.005	0.03	0.002
Pufer za elektroforezu: 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0.1% SDS, pH 8.3			

4.5.4. Prijenos proteina na membranu

Nakon elektroforeze, razdvojene proteine smo prenijeli na polivinilnu membranu (PVDF, Roche Diagnostics GmbH, Njemačka) također pomoću Mini-PROTEAN sustava. Transfer se odvijao pri konstantnoj jakosti struje 400 mA, 60 minuta u puferu za transfer (25 mM Tris, 192 mM glicin, 20% metanol, pH 8.4).

4.5.5. Detekcija proteina

Prije inkubacije s protutijelima, membranu s proteinima smo blokirali kako bi došlo do zasićenja svih veznih mjesta na membrani i kako bi spriječili nespecifično vezanje protutijela za membranu. Zato smo membranu nakon transfera inkubirali 45 min u 5% otopini reagensa I-Block (Tropix, SAD) u puferu za ispiranje TBST (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1% Tween-20). Zatim smo membranu inkubirali u primarnom protutijelu razrijeđenom u otopini za blokiranje preko noći pri 4°C uz stalno zibanje. Korištena protutijela su navedena u tablici 4.2., kao i na slikama rezultata. Sljedeći dan smo membrane isprali 3 puta po 10 min u puferu za ispiranje TBST, te zatim inkubirali 90 min pri sobnoj temperaturi uz stalno zibanje u otopini sekundarnog kozjeg protutijela konjugiranog s peroksidazom hrena (1:5000 v/v). Koristili smo protumišja i protuzečja IgG (BioRad, SAD) te protuštatorska sekundarna protutijela (Sigma-Aldrich, SAD). Membrane smo isprali 3 puta po 10 min u puferu za ispiranje TBST.

Proteinske vrpce na koje su se vezala protutijela detektirali smo kemiluminescencijom uz pomoć komercijalno dostupnog kompleta koji sadrži supstrat peroksidaze hrena prema

uputama proizvođača (BM Chemiluminescence Western Blotting Substrate; Roche Diagnostics GmbH, Njemačka). Signal smo vizualizirali na fotosenzitivnom filmu (Lumi-film chemiluminescent detection film; Roche Diagnostics GmbH, Njemačka). Ekspozirane filmove smo razvili u aparatu za razvijanje filmova Curix 60 (Agfa, Belgija). Dobivene razvijene filmove smo digitalizirali pomoću aparata za skeniranje (HP LaserJet M1522nf). Dio membrana smo vizualizirali u aparatu za detekciju kemiluminescencije pomoću CCD kamere (UviTec, Velika Britanija). Dobivene slike smo uredili u računalnom programu Photoshop CS2 (verzija 9.0.; Adobe, SAD). Detektirane proteinske vrpce smo kvantificirali u računalnom programu ImageJ (NIH).

4.6. Određivanje koncentracije peptida A β 40 u staničnom lizatu i mediju

Peptide A β 40 smo detektirali u stanicama nasađenim u plastičnim pločama promjera 10 cm te prolazno transfeciranim s odgovarajućim konstruktom. Tijek pokusa odgovara gore opisanim pokusima u svrhu *Western* analize produkata cijepanja prolazno eksprimiranog proteina APP (Materijali i metode, poglavlje 4.5.).

Stanice su na kraju pokusa bile 90-100% konfluentne. Svi sljedeći koraci izvođeni su na ledu. Sakupili smo medij sa stanica u plastične tube volumena 15 ml (TPP, Švicarska) te ga centrifugirali pri 720 x g, 10 min u ohlađenoj centrifugi pri 4°C (Eppendorf 5804R) kako bismo istaložili eventualne mrtve stanice i njihov debris koji se nalazio u mediju. Supernatant smo dekantirali u nove tube.

Stanice smo isprali tri puta u hladnom puferu PBS. Zatim smo stanice odvojili od plastične površine ploče na kojoj su rastle pomoću gumene strugalice (Sarstedt, Njemačka) u 1 ml hladnog pufera PBS. Stanice u puferu PBS smo prebacili u mikrotubice volumena 1.5 ml (Sarstedt, Njemačka) te spustili centrifugiranjem pri brzini od 2300 x g, 5 min pri 4°C (centrifuga Eppendorf 5415R). Zatim smo pažljivo odsisali sav supernatant, a na talog stanica dodali 400 μ l pufera za lizu RIPA (0.5% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, 1% NP40, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) za detekciju topljivog oblika unutarstaničnog peptida A β ili 100 μ l 70% mravlje kiseline (Fluka, Njemačka) za detekciju netopljivog (agregiranog) oblika unutarstaničnog peptida A β . Stanice smo dobro resuspendirali pipetiranjem i inkubirali 20 min na ledu. Zatim smo stanice još dodatno mehanički homogenizirali provlačeći lizate 10 puta kroz iglu 23G (BD, SAD). Nakon homogenizacije, lizate smo centrifugirali pri maksimalnoj brzini mikrocentrifuge Eppendorf

5415R (16,000 x g), 30 min pri 4°C kako bismo istaložili stanični debris. Supernatant smo prebacili u nove mikrotubice. Lizat dobiven homogenizacijom stanica u 70% mravljoj kiselini smo neutralizirali s 1M otopinom Tris-a (Sigma-Aldrich, SAD) u omjeru 1:20 v/v. U RIPA lizatu smo odredili koncentraciju proteina i te vrijednosti primjenili i na odgovarajuće uzorke lizirane u mravljoj kiselini.

Peptide A β 40 smo detektirali komercijalno dostupnim kolorimetrijskim kompletom (Invitrogen, SAD) baziranim na metodi ELISA (od eng. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) prema uputama proizvođača. Izlučene peptide smo detektirali u sakupljenom mediju, a unutarstanične u lizatima i to topljive u puferu RIPA i agregirane u 70% mravljoj kiselini neutraliziranoj s otopinom Tris-a. Komplet sadrži liofilizirani peptid A β 40 kao standard kojeg smo otopili u rasponu koncentracija 0-500 pg/ml te pomoću njih dobili standardnu krivulju iz čije smo jednadžbe izračunali koncentracije peptida u uzorcima. Standarde, odnosno uzorke smo nanijeli na pločice s 96 bunarića koji su presvučeni s monoklonalnim primarnim protutijelom specifičnim za N-terminus peptida A β . Na uzorke smo zatim dodali poliklonalno zečje primarno protutijelo specifično za C-terminus peptida A β , te inkubirali preko noći pri 4°C. Jažice smo zatim dobro isprali četiri puta s puferom za ispiranje dobivenim u kompletu, te dodali otopinu sekundarnog protuzečjeg antitijela konjugiranog s peroksidazom hrena. Nakon inkubacije 30 min pri sobnoj temperaturi, ponovo smo jažice isprali i dodali otopinu supstrata peroksidaze (tetrametilbenzidin). U toj reakciji dolazi do razvitka boje čiji je intenzitet proporcionalan količini peptida A β 40 u uzorku. Reakciju smo zaustavili nakon 30 min, te očitali apsorbanciju pri 450 nm na spektrofotometru (Multiskan EX; ThermoLabsystems, SAD). Dobivenu koncentraciju peptida A β 40 u uzorku u pg/ml smo normalizirali prema koncentraciji proteina u uzorku te prema uspješnosti transfekcije za pojedinu staničnu liniju u pokusu.

4.7. Analiza katalitičke aktivnosti enzima α -, β - i γ -sekretaze

Katalitičku aktivnost enzima α -, β - i γ -sekretaze u stanicama CHO wt i CHO-NPCI $^{-/-}$ izmjerili smo komercijalno dostupnim kompletima (R&D Systems, SAD) baziranim na FRET (od eng. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) tehnologiji. Naime, staničnom lizatu u kojem želimo izmjeriti aktivnost pojedinog enzima dodaje se peptid baziran na sekvenci proteina APP koji sadrži specifično mjesto cijepanja pojedine sekretaze. Na peptid su konjugirane dvije reporterske molekule EDANS i DABCYL. Prije cijepanja peptida,

fluorescentna emisija molekule EDANS je spriječena bliskim prisustvom molekule DABCYL koja ima maksimalnu apsorpciju pri valnoj duljini 495 nm što odgovara emisiji molekule EDANS. Cijepanje peptida sekretazom dovodi do odvajanja te dvije molekule i dopušta oslobađanje fluorescencije. Razina aktivnosti sekretaze u uzorku je proporcionalna oslobođenom signalu.

Pri mjerenju aktivnosti α - i β -sekretaze pridržavali smo se uputa proizvođača, dok smo pri mjerenju aktivnosti γ -sekretaze protokol dodatno optimizirali. U svrhu mjerenja aktivnosti α - i β -sekretaze stanice smo lizirali u isporučenom puferu. Stanične lizate, normalizirane prema koncentraciji proteina, smo pomiješali s reakcijskim puferom i supstratom sekretaze (gore opisani peptid) u crnim pločicama s 96 bunarića. Reakciju smo inkubirali 2 sata pri 37°C, te očitali oslobođeni fluorescentni signal pomoću fluorimetra (Fluoroskan Ascent FL; Thermo Fisher Scientific, SAD).

Za mjerenje aktivnosti γ -sekretaze priredili smo postnuklearni supernatant iz kojeg smo izolirali ukupne stanične membrane. Stanice smo sakupili u hipotoničnom puferu (10 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA) uz dodatak koktela inhibitora proteaza (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka) i homogenizirali provlačeći deset puta kroz iglu 23G (BD, SAD). Homogenat smo centrifugirali pri brzini 1000 x g, 15 min pri 4°C (Eppendorf 5415R) te sakupili postnuklearni supernatant. Iz supernatanta, normaliziranih prema koncentraciji proteina, izolirali smo stanične membrane ultracentrifugiranjem pri 20,000 x g, 45 min pri 4°C (ultracentrifuga Beckman Coulter Optima XL-100K). Membrane smo isprali s 200 μ l hipotoničnog pufera i ponovno spustili ultracentrifugiranjem pri 20,000 x g, 30 min pri 4°C. Talog membrana smo zatim resuspendirali u Tris-CHAPSO puferu (50 mM Tris, pH 6.5, 2 mM EDTA i 0.25% CHAPSO), a alikvoti su pomiješani s reakcijskim puferom i supstratom sekretaze (gore opisani peptid). Nakon 2 sata reakcije, uzorke smo centrifugirali pri 16,000 x g, 15 min pri 4°C (Eppendorf 5415R), a zatim smo supernatante prebacili u crne pločice s 96 bunarića i očitali fluorescentni signal pomoću fluorimetra (Fluoroskan Ascent FL; Thermo Fisher Scientific, SAD).

4.7.1. Analiza katalitičke aktivnosti γ -sekretaze reakcijom in vitro

Osim određivanja aktivnosti γ -sekretaze pomoću komercijalnog dostupnog kompleta (B&D Systems, SAD) gdje dolazi do cijepanja sintetskog peptida baziranog na sekvenci proteina APP, mi smo aktivnost tog enzima u stanicama CHO^{wt} i CHO-*NPCI*^{-/-} usporedili i u reakciji s izoliranim membranama stanica koje su prolazno eksprimirale odsječak CTF β ,

fiziološki supstrat γ -sekretaze. Naime, stanice smo prolazno transfecirali s konstruktom koji kodira odsječak CTF β . Nakon 48 sati, iz stanica smo izolirali ukupne stanične membrane gore opisanim protokolom. Talog membrana dobiven ultracentrifugiranjem smo resuspendirali u 200 μ l citratnog pufera (150 mM natrijev citrat, pH 6.4) te alikvotirali u 4 jednaka dijela. Tako pripremljene uzorke smo inkubirali: 1) 4 sata na ledu inhibirajući tako rad enzima γ -sekretaze; 2) i 3) membrane smo inkubirali 1 sat odnosno 4 sata pri 37°C kako bismo analizirali kinetiku nastanka peptida A β 40 i AICD; 4) membrane smo inkubirali 4 sata pri 37°C uz prisustvo 10 μ M WPE-III-31C, inhibitora γ -sekretaze (Calbiochem). Membrane smo zatim centrifugirali pri 20,000 x g, 30 min, pri 4°C (ultracentrifuga Beckman Coulter Optima XL-100K), a u supernatantima smo analizirali nastale produkte: AICD, *Western* analizom i A β 40, komercijalnim ELISA kompletom.

4.8. Određivanje ekspresije proteina APP na površini stanice biotinizacijom proteina

Za analizu proteina na površini stanica biotinizacijom, koristili smo EZ-LinkTM Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo Fisher Scientific, SAD) i NeutrAvidinTM (Thermo Fisher Scientific, SAD) koji se specifično veže za biotin. Stanice smo nasadili u sterilne plastične ploče promjera 10-cm (TPP, Švicarska) i uzgajali ih do konfluentnosti od 90%. Za vrijeme biotinizacije, stanice i reagensi su držani na ledu. Stanice smo isprali tri puta u puferu PBS (pH 8.5) i inkubirali u otopini 1 mg/ml biotina u puferu PBS (pH 8.5) na ledu, 30 min uz kontinuirano lagano zibanje. Zatim smo uklonili otopinu biotina i stanice tri puta isprali u otopini 100 mM glicina u PBS-u. Stanice smo lizirali u 800 μ l pufera za lizu (1% NP40, 0.1% SDS u PBS-u pH 8.5) uz dodatak koktela inhibitora proteaza (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka). Lizate smo inkubirali 20 min na ledu te centrifugirali pri maksimalnoj brzini mikrocentrifuge Eppendorf 5415R (15,600 x g), 10 min pri 4°C. Volumene supernatanta smo normalizirali prema koncentraciji proteina te precipitirali s 50 μ l po uzorku kuglica NeutrAvidinTM-a preko noći uz stalno zibanje. Na kuglice NeutrAvidinTM-a su se prilikom precipitacije vezali biotinom obilježeni proteini. Zatim smo kuglice NeutrAvidinTM-a centrifugirali pri brzini od 2300 x g, 5 min pri 4°C (Eppendorf 5415R). Pažljivo smo posisali supernatant, na kuglice smo dodali 1 ml pufera PBS, te ih ponovo spustili centrifugiranjem. NeutrAvidinTM smo na ovaj način isprali tri puta kako bismo uklonili nespecifično vezane proteine. Nakon zadnjeg ispiranja, sav pufer s kuglica smo odsisali pomoću igle 30G (BD, SAD) i vakuum pumpe. Na posušene kuglice smo dodali 2x koncentrirani pufer za nanošenje

uzoraka PLD. Iz tako precipitiranih proteinskih uzoraka, *Western* analizom smo detektirali protein APP na površini stanice dok smo ukupnu količinu proteina APP u stanicama detektirali iz odgovarajućeg neprecipitiranog staničnog lizata.

4.9. Analiza smještaja proteina APP imunofluorescencijom

Smještaj proteina APP u stanicama smo detektirali imunofluorescencijom i analizirali konfokalnim mikroskopom u odgovarajućem računalnom programu (Leica, Njemačka). Stanice CHO smo nasadili na okrugle pokrovnice promjera 12 mm (Thermo Fisher Scientific, SAD) u sterilnim plastičnim pločama s 24 bunarića (TPP, Švicarska) u mediju za uzgoj stanica. Sve otopine reagensa korištenih u protokolu obilježavanja stanica protutijelima su pripremljene u puferu PBS.

Za analizu smještaja endogenog proteina APP na površini stanice, nepermeabilizirane stanice smo inkubirali s protutijelom specifičnim za vanstanični N-terminus proteina APP (5313) razrijeđenim 1:50 v/v u hladnom mediju DMEM/F12 bez seruma FBS, par minuta na ledu kako bismo spriječili internalizaciju. Tako obilježene stanice isprali smo tri puta u hladnom puferu PBS, te ih fiksirali otopinom 4% paraformaldehida (Sigma-Aldrich, SAD), 15 minuta na ledu. Stanice smo ponovo isprali tri puta u puferu PBS, te permeabilizirali otopinom 0.02% saponina (Sigma-Aldrich, SAD), 10 minuta na sobnoj temperaturi. Stanice smo zatim, inkubirali 45 min pri sobnoj temperaturi u otopini za blokiranje koja sadrži 5% kozjeg seruma (Sigma-Aldrich, SAD). Ovaj korak u protokolu služi kako bismo zasitili vezna mjesta na koja bi se sekundarno protutijelo moglo nespecifično vezati. Proteine obilježene specifičnim primarnim protutijelom smo detektirali vezanjem sekundarnog kozjeg protuzećeg antitijela konjugiranog s fluorokromom Alexa488 (eng. *goat anti-rabbit-Alexa488*; Invitrogen, SAD). Stanice smo inkubirali 1 sat pri sobnoj temperaturi u sekundarnom protutijelu razrijeđenom u otopini za blokiranje (1:400 v/v). Stanice smo zatim isprali dva puta u puferu PBS te jedan put u kvarcnoj (mQ) vodi, te pokrovnice sa stanicama uklopili u mediju za uklapanje (Fluka, Švicarska).

Za analizu smještaja endogenog odnosno stabilno eksprimiranog proteina APP u stanicama CHO, fiksirane i permeabilizirane stanice smo obilježili odgovarajućim protutijelom specifičnim za njegov N- ili C-terminus (vidi Tablicu 4.2.). Kako bismo mogli analizirati smještaj proteina APP u endocitoznom putu, stanice smo paralelno obilježili i s različitim specifičnim primarnim protutijelima za markere endocitoznih vezikula (vidi Tablicu

4.2.). Prije obilježavanja primarnim protutijelima stanice smo inkubirali 45 min pri sobnoj temperaturi u otopini za blokiranje. Zatim smo stanice inkubirali preko noći pri 4°C s primarnim protutijelima razrijeđenim u otopini za blokiranje. Drugi dan, stanice smo isprali tri puta u puferu PBS te obilježili sekundarnim protutijelom 1 sat pri sobnoj temperaturi. Koristili smo sekundarno kozje protužeće odnosno protumišje antitijelo konjugirano s fluorokromom Alexa488 odnosno Alexa594 (eng. *goat anti-rabbit-Alexa488 / anti-mouse-Alexa594*; Invitrogen, SAD). Stanice smo isprali dva puta u puferu PBS i jedan put u kvarcnoj (mQ) vodi, te pokrovce sa stanicama uklopili u mediju za uklapanje (Fluka, Švicarska).

U stanicama CHO^{wt} i CHO-*NPCI*^{-/-} koje stabilno eksprimiraju protein BACE1-GFP smo prolazno eksprimirali protein APP-RFP kako bismo analizirali kolokalizaciju proteina APP s enzimom β-sekretaza. Stanice smo zatim fiksirali u otopini 4% paraformaldehida 15 minuta pri sobnoj temperaturi, te ih isprali dva puta u puferu PBS i jedan put u kvarcnoj (mQ) vodi. Pokrovce sa stanicama smo zatim uklopili u mediju za uklapanje (Fluka, Švicarska).

4.9.1. Analiza internalizacije i recikliranja proteina APP

Internalizaciju proteina APP s površine stanice smo pratili u živim, nepermeabiliziranim stanicama CHO^{wt} i CHO-*NPCI*^{-/-}, koje stabilno eksprimiraju protein HA-SEAP-APP^{wt}. Stanice smo prvo isprali tri puta u puferu PBS, a zatim inkubirali pri 37°C u vremenskim periodima od 1, 10 odnosno 20 min s primarnim protutijelom koje se specifično veže na vanstanični N-terminus proteina APP (5313). Protutijelo smo razrijedili 1:50 v/v u zagrijanom mediju DMEM/F12 bez seruma. Period od 1 min je dovoljan da se protutijelo veže na proteine APP koji se nalaze na staničnoj membrani, no vremenski onemogućava njegovu internalizaciju. U periodima od 10 i 20 min, dolazi do internalizacije obilježenih membranskih proteina. Nakon 1, 10 odnosno 20 min inkubacije s anti-APP protutijelom, stanice smo isprali tri puta s puferom PBS. Zatim smo ih fiksirali, permeabilizirali i inkubirali preko noći pri 4°C s primarnim protutijelom za protein EEA1 kako bismo obilježili rane endosome. Obilježene proteine smo detektirali sekundarnim protutijelima konjugiranim s fluorokromom Alexa488 odnosno Alexa594 (Invitrogen, SAD), te analizirali konfokalnim mikroskopom. Internalizaciju smo kvantificirali brojeći APP/EEA1 pozitivne vezikule po stanici (n=22).

Recikliranje proteina APP na površinu stanice pratili smo u živim, nepermeabiliziranim stanicama CHO^{wt} i CHO-*NPCI*^{-/-} koje eksprimiraju samo endogeni protein APP. Stanice smo prvo isprali tri puta u puferu PBS, a zatim inkubirali pri 37°C 20 min s primarnim protutijelom

koje se specifično veže na vanstanični N-terminus proteina APP (5313). Protutijelo smo razrijedili 1:50 v/v u zagrijanom mediju DMEM/F12 bez seruma. U tom vremenskom periodu došlo je do internalizacije obilježenih proteina APP. Stanice smo zatim isprali u puferu PBS, te inkubirali u uobičajenom mediju za rast 30 odnosno 60 min pri 37°C kako bismo i pratili recikliranje internaliziranog obilježenog proteina APP na površinu stanice. Nakon 30 odnosno 60 minuta inkubacije, stanice smo isprali u puferu PBS, fiksirali, permeabilizirali te obilježili sa sekundarnim protutijelom konjugiranim s fluorokromom Alexa488 (Invitrogen, SAD). Konfokalnom mikroskopijom smo analizirali smještaj proteina APP.

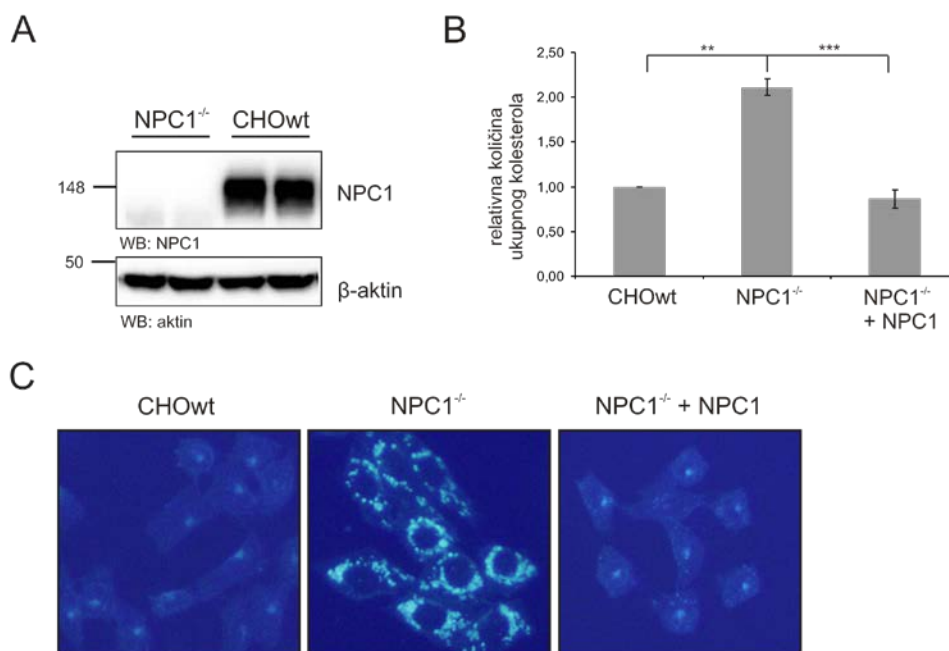
4.9.2. Vizualizacija glikosfingolipida u stanici

Smještaj glikosfingolipida u stanicama CHO^{wt} i CHO-*NPCI*^{-/-} smo analizirali pomoću komercijalno dostupnog sintetskog analoga laktozilceramida konjugiranog s fluorokromom Bodipy[®] (*Bodipy[®] FL C5-Lactosylceramide complexed to BSA*, Bodipy[®]-LacCer-BSA; Invitrogen, SAD). Ovaj kompleks je spojen s albuminom iz goveđeg seruma (BSA od eng. *Bovine Serum Albumin*) i zato je topiv u vodi, što omogućava lako obilježavanje stanica bez otapanja tog lipofilnog kompleksa u organskim otapalima. Protokol za obilježavanje stanica ovim sintetskim analogom smo preuzeli iz članka Puri i suradnika (Puri i sur. 1999) uz dodatnu optimizaciju. Stanice uzgojene na okruglim pokrovnicaama smo isprali u hladnom mediju HMEM (od eng. 10 mM *Hepes-buffered Minimal Essential Medium*, pH 7.4). Zatim smo stanice inkubirali na ledu 30 minuta s 5 µM otopinom Bodipy[®]-LacCer-BSA kako bi se analog lipida vezao na plazma membranu. Nakon obilježavanja stanične membrane, stanice smo isprali u hladnom mediju HMEM i zatim inkubirali 30 minuta u zagrijanom mediju HMEM pri 37°C kako bismo omogućili endocitozu vezanog analoga. Stanice smo nakon 30 minuta isprali u hladnom mediju HMEM bez glukoze i 6 x 10 min s 5% otopinom BSA u mediju HMEM bez glukoze. Ovim ispiranjem s otopinom BSA smo uklonili višak molekula Bodipy[®]-LacCer-BSA sa stanične površine. Stanice smo zatim fiksirali, permeabilizirali te obilježili s protutijelom anti-HA koje se vezalo za N-terminus stabilno eksprimiranog proteina HA-SEAP-APP^{wt} u stanicama CHO^{wt} i CHO-*NPCI*^{-/-}. Obilježene proteine APP smo detektirali sekundarnim protutijelom konjugiranim s fluorokromom Alexa594 (Invitrogen, SAD), te analizirali konfokalnim mikroskopom.

5. REZULTATI

5.1. U stanicama CHO-NPC1^{-/-} dolazi do nakupljanja slobodnog kolesterola

Nedostatak funkcionalnog proteina NPC1 (od eng. *Niemann-Pick type C*) koji ima ključnu ulogu u prijenosu kolesterola iz lizosoma u druge stanične odjeljke (endoplazmatski retikulum, plazma membranu i Golgi), dovodi do nakupljanja slobodnog neesterificiranog kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima (Roff i sur., 1992.; Carstea i sur., 1997.). Pokazali smo da u stanicama CHO-NPC1^{-/-} nema ekspresije proteina NPC1 (Slika 5.1. A). Mjerenjem količine ukupnog kolesterola pomoću komercijalno dostupnog kompleta “Amplex Red Cholesterol Assay” (Invitrogen, SAD) u stanicama CHO^{wt} (od eng. *Chinese Hamster Ovary*), CHO-NPC1^{-/-} (stanice CHO kojima je deletiran gen *NPC1*), te stanicama CHO-NPC1^{-/-} koje stabilno ekspimiraju gen *NPC1* (CHO-NPC1^{-/-}+*NPC1*) pokazali smo da je količina kolesterola u stanicama CHO-NPC1^{-/-} povećana otprilike 2x u odnosu na stanice CHO^{wt} (Slika 5.1. B, $p < 0.01$). Očekivano, stabilna ekspresija proteina NPC1 u stanicama CHO-NPC1^{-/-} vraća količinu ukupnog staničnog kolesterola na razinu kao u *wt* stanicama (Slika 5.1. B). Bojanjem stanica filipinom, fluorescentnim antibiotikom koji se specifično veže na slobodni kolesterol, te analizom pomoću epifluorescentnog mikroskopa pokazali smo da u stanicama CHO-NPC1^{-/-} dolazi do vezikularnog nakupljanja slobodnog kolesterola (Slika 5.1. C). Takvo nakupljanje slobodnog kolesterola nije prisutno u stanicama CHO^{wt} kao ni u stanicama CHO-NPC1^{-/-}+*NPC1* (Slika 5.1. C).



Slika 5.1. Analiza ekspresije proteina NPC1 i kolesterola u stanicama CHOwt, CHO-NPC1^{-/-} i CHO-NPC1^{-/-}+NPC1. (A) Analiza ekspresije proteina NPC1 metodom *Western blot* (WB). (B) Ukupnu količinu kolesterola u staničnom lizatu izmjerili smo komercijalnim kompletom „Amplex Red Cholesterol Assay“ (Invitrogen, SAD). Prikazane su relativne srednje vrijednosti iz 3 neovisna pokusa u odnosu na CHOwt, a statistička značajnost je izračunata Student *t*-testom: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (C) Slobodni neesterificirani kolesterol smo obilježili filipinom (Sigma-Aldrich, SAD) u fiksiranim stanicama i analizirali epifluorescentnim mikroskopom.

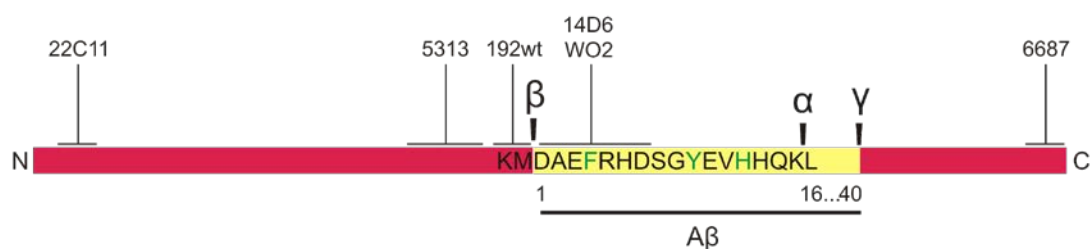
5.2. Utjecaj nakupljanja kolesterola na cijepanje proteina APP u stanicama

CHO-NPC1^{-/-}

U različitim modelima bolesti NPC, uz nakupljanje slobodnog kolesterola, opisane su i povišene razine produkata cijepanja proteina APP (od eng. *Amyloid Precursor Protein*): odsječaka CTF (od eng. *C-Terminal Fragment*) i amiloidogenog peptida A β (od eng. *Amyloid- β*) *in vitro* i *in vivo* (Yamazaki i sur., 2001.; Burns i sur., 2003.; Jin i sur., 2004.; Kodam i sur., 2010.).

5.2.1. Nedostatak proteina NPC1 dovodi do nakupljanja produkata amiloidogenog cijepanja proteina APP: sAPP β i CTF β

Usporednom analizom cijepanja proteina APP u stanicama CHO^{wt} i CHO-NPC1^{-/-} željeli smo ispitati hipotezu da su povišene razine peptida CTF i A β u bolesti NPC posljedica njihove povećane proizvodnje amiloidogenim putem proteolitičke razgradnje proteina APP. Na slici 5.2. nalazi se shema sekvence proteina APP na kojoj su označena mjesta cijepanja enzima (α -, β - i γ -sekretaze), te epitopi vezanja specifičnih protutijela korištenih u ovom istraživanju. Također su označene razlike u sekvenci proteina APP kod ljudi i glodavaca (hrčka) koje su važne za kontekst analize rezultata.

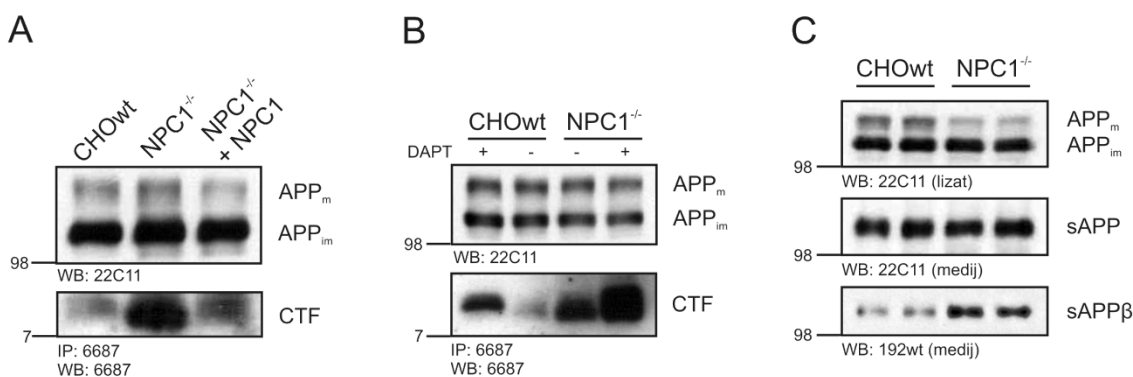


Slika 5.2. Shematski prikaz proteina APP. Na shemi su označena mjesta cijepanja α -, β - i γ -sekretaze, epitopi protutijela, sekvenca peptida A β 40 (žuto), te razlike u aminokiselinskoj sekvenci proteina APP u čovjeka i glodavaca (zeleno).

Western blot analizom pokazali smo da stanice CHO-NPC1^{-/-} imaju povišenu razinu endogenih odsječaka CTF u odnosu na stanice CHO^{wt} (Slika 5.3. A) što je sukladno prijašnjim studijama na različitim modelima bolesti NPC (Burns i sur., 2003.; Jin i sur., 2004.). Stabilna ekspresija proteina NPC1 u stanicama CHO-NPC1^{-/-} (CHO-NPC1^{-/-}+NPC1)

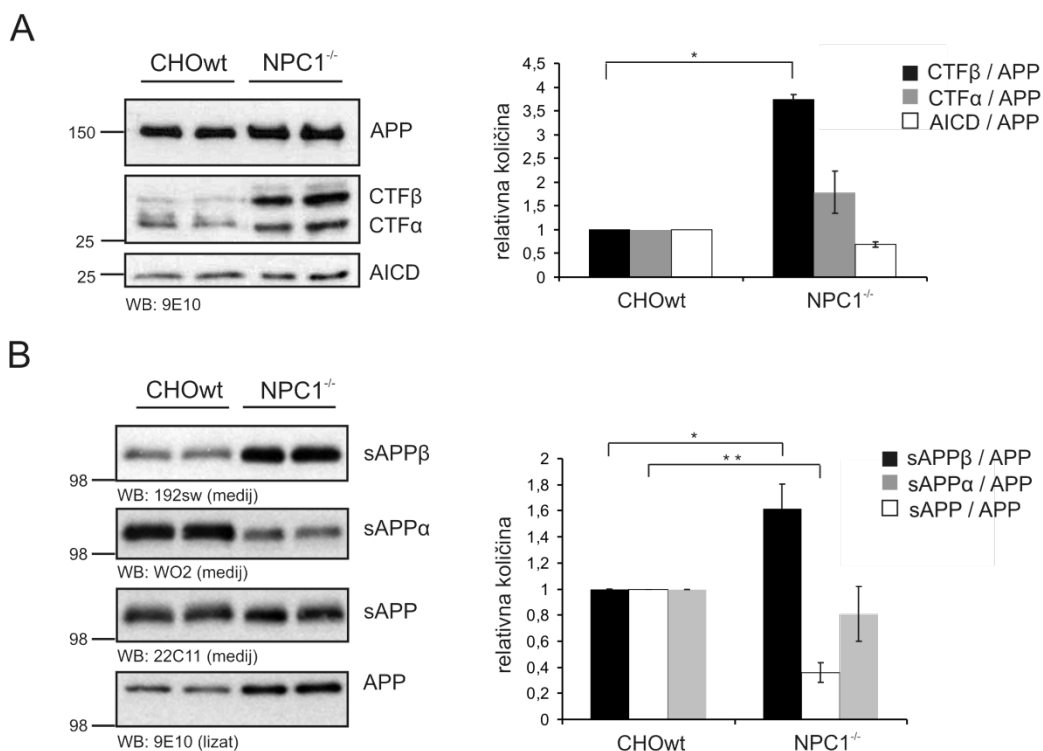
vraća razinu odsječaka CTF na onu kakva je i u *wt* stanicama što dokazuje da je nakupljanje odsječaka CTF u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-} zaista posljedica nedostatka proteina NPC1, a ne nespecifičan učinak nekog sekundarnog čimbenika (Slika 5.3. A). Pokazali smo da tretman stanica spojem DAPT (Sigma-Aldrich, SAD) koji inhibira enzim γ -sekretazu i tako sprečava daljnje cijepanje fragmenata CTF uzrokuje nakupljanje odsječaka CTF u stanicama CHO^{wt} i CHO-*NPCI*^{-/-} čime smo dodatno potvrdili identitet analiziranih proteina (Slika 5.3. B). Trebalo bi naglasiti da smo ovdje analizirali ukupnu količinu odsječaka CTF, koji se sastoje od fragmenata nastalih cijepanjem proteina APP α -sekretazom (CTF α) i β -sekretazom (CTF β), tj. C-terminalne fragmente nastale i neamiloidogenom i amiloidogenom razgradnjom proteina APP (CTF = CTF α + CTF β). Detaljnija specifična analiza pojedinih vrsta C-terminalnih odsječaka koji nastaju cijepanjem proteina APP nije bila moguća na endogenoj razini zbog nedovoljne razlučivosti korištene gel elektroforeze u području veličina promatranih peptida (~10kDA).

Kako smo na endogenoj razini mogli analizirati samo ukupnu količinu peptida CTF, no ne i pojedinu podvrstu CTF α , odnosno CTF β i tako odvojeno promatrati cijepanje proteina APP α -, odnosno β -sekretazom, pristupili smo analizi N-terminalnih produkata cijepanja proteina APP u mediju, sAPP (od eng. *soluble Amyloid Precursor Protein*; sAPP = sAPP α + sAPP β). Iznenadujuće, *Western blot* analiza proteina u mediju pokazala je da razina ukupnih N-terminalnih produkata cijepanja proteina APP u mediju, sAPP, nije promijenjena u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-} u odnosu na CHO^{wt} (Slika 5.3. C). No, daljnja analiza otkrila je da je razina fragmenta sAPP β u mediju stanica CHO-*NPCI*^{-/-} povišena u odnosu na stanice CHO^{wt} (Slika 5.3. C). Time smo po prvi puta pokazali da je u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-} povećano amiloidogeno cijepanje proteina APP β -sekretazom. Endogenu razinu odsječaka sAPP α nismo bili u mogućnosti analizirati zbog nedostupnosti protutijela koje bi detektiralo specifičan sAPP α epitop u hrčka. Naime, dostupno primarno protutijelo koje prepoznaje sAPP α je specifično za humanu sekvencu proteina APP koja se u tom dijelu razlikuje od sekvence u glodavcima, dok protutijela za ukupni sAPP i sAPP β prepoznaju specifične epitope koji su neizmijenjeni u sekvenci proteina APP kod ljudi i glodavaca (shema na slici 5.2.).



Slika 5.3. Western blot analiza produkata cijepanja endogenog proteina APP u stanicama CHOwt, CHO-NPC1^{-/-} i CHO-NPC1^{-/-}+NPC1. (A) Analiza odsječaka CTF; **(B)** analiza odsječaka CTF u uvjetima bez i s inhibitorom enzima γ -sekretaze spojem DAPT; **(C)** analiza fragmenata sAPP, te pojedine vrste sAPP β . Proteine smo analizirali u staničnom lizatu i mediju metodama imunoprecipitacije (IP) i *Western blot* (WB) pomoću specifičnih protutijela navedenih na slici. APP_m – zreli tj. posttranslacijski modificirani oblik proteina APP (eng. *mature APP*); APP_{im} – nezreli oblik proteina APP (eng. *immature APP*).

Prolazna ekspresija rekombinantnog oblika humanog proteina APP_{sw}-6myc omogućila nam je detaljniju analizu produkata cijepanja proteina APP u stanicama CHO. Ova varijanta proteina APP s mutacijom *Swedish* (*sw*) uzrokuje povišenu produkciju peptida A β u stanicama te nam je omogućila detekciju unutarstaničnog A β koji se inače u stanici nalazi u vrlo malim količinama. Analiza stanica koje prolazno ekspimiraju protein APP_{sw}-6myc otkrila je povišenu razinu fragmenta CTF β ($p < 0.05$) i nepromijenjenu razinu fragmenta CTF α u stanicama CHO-NPC1^{-/-} u odnosu na CHOwt (Slika 5.4. A). Moguće objašnjenje nepromijenjene razine fragmenta CTF α leži u činjenici da daljnjim cijepanjem odsječaka CTF β može nastati i odsječak CTF α . Daljna analiza produkata cijepanja proteina APP pokazala je povišenu razinu sAPP β ($p < 0.05$) te smanjenu razinu sAPP α ($p < 0.01$) u mediju stanica CHO-NPC1^{-/-}, dok je ukupna razina sAPP ostala nepromijenjena u odnosu na stanice CHOwt (Slika 5.4. B). Ovi rezultati analize cijepanja egzogenog proteina APP potvrđuju rezultate analize produkata cijepanja proteina APP na endogenoj razini te potvrđuju da nedostatak proteina NPC1 uzrokuje povećano cijepanje proteina APP β -sekretazom.

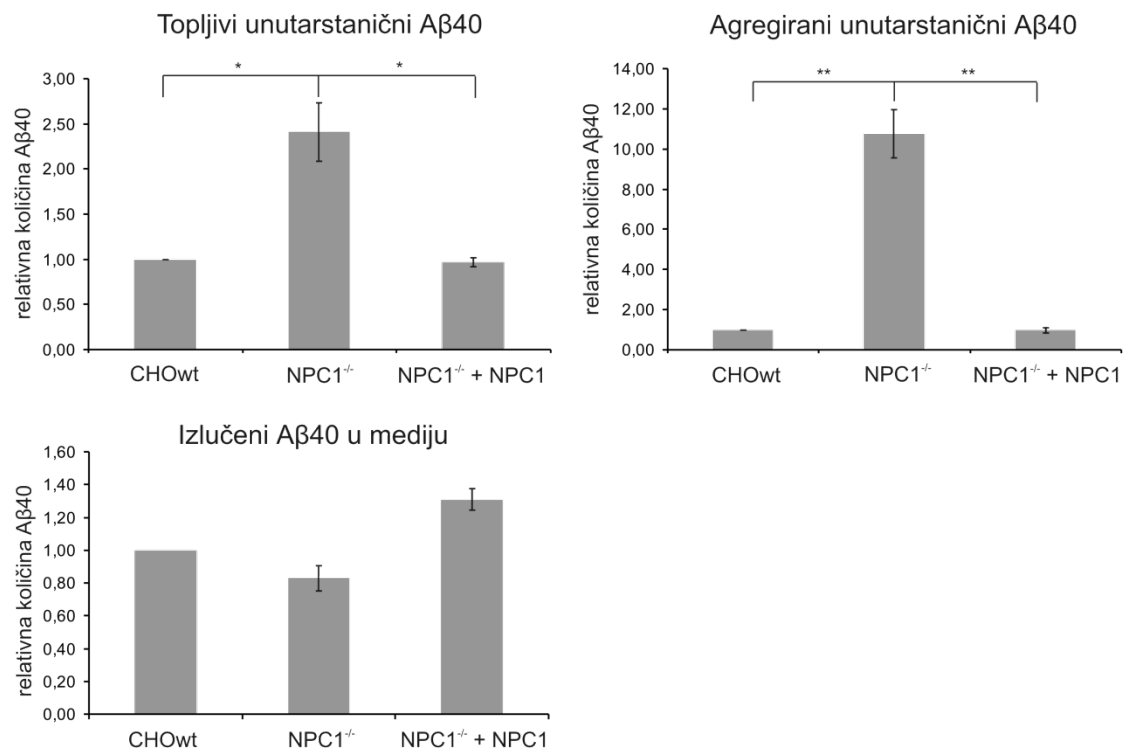


Slika 5.4. Western blot analiza produkata cijepanja egzogenog proteina APP u stanicama CHOwt i CHO-NPC1^{-/-} koje prolazno eksprimiraju protein APPsw-6myc. (A) Analiza odsječaka CTFα, CTFβ i AICD; (B) analiza N-terminalnih fragmenata sAPP, te pojedine vrste sAPPα i sAPPβ. Proteine smo analizirali u staničnom lizatu i mediju metodom Western blot (WB) pomoću specifičnih protutijela navedenih na slici. Rezultate Western analize smo kvantificirali programom ImageJ (NIH). Prikazane su relativne vrijednosti u odnosu na CHOwt, a statistička značajnost je izračunata Student *t*-testom: **p*<0.05; *p*<0.01.**

5.2.2. U stanicama CHO-NPC1^{-/-} dolazi do unutarstaničnog nakupljanja peptida Aβ40

Cijepanjem odsječaka CTFβ γ -sekretazom u stanici nastaju dva produkta: N-terminalni amiloidogeni peptidi A β , te C-terminalni fragmenti AICD (od eng. *APP Intracellular Domain*). Razinu unutarstaničnog peptida A β 40 (topljivog i agregiranog oblika), te onog izlučenog u mediju analizirali smo metodom ELISA (od eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) pomoću komercijalno dostupnog kompleta (Invitrogen, SAD) u stanicama koje prolazno eksprimiraju protein APPsw-6myc. Razina unutarstaničnog peptida A β 42 bila je ispod praga detekcije dostupnog kompleta, te ju nismo bili u mogućnosti analizirati. Topljivi unutarstanični oblik peptida A β 40 (topiv u puferu RIPA) je bio povišen dva puta (*p*<0.05), a agregirani oblik (topiv u mravljoj kiselini) je bio povišen deset puta (*p*<0.01) u stanicama CHO-NPC1^{-/-}, dok je razina izlučenog peptida A β 40 u mediju bila gotovo nepromijenjena u

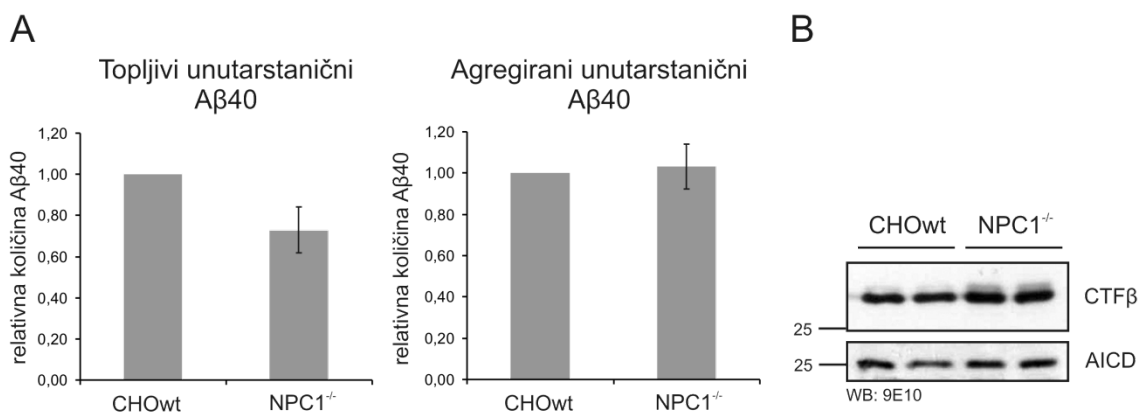
odnosu na stanice CHO_{wt} (Slika 5.5.). Nepromijenjena razina unutarstaničnog peptida Aβ40 u stanicama CHO-NPC1^{-/-}+NPC1 u odnosu na stanice CHO_{wt} (Slika 5.5.) dokazuje da je nakupljanje peptida Aβ40 u stanici zaista posljedica nedostatka proteina NPC1, kao što smo uočili i u slučaju nakupljanja kolesterola (Slika 5.1. A i B) i nakupljanja odsječaka CTF (Slika 5.3. A). Za razliku od peptida Aβ40, razina peptida AICD nije bila promjenjena u stanicama CHO-NPC1^{-/-} u odnosu na CHO_{wt} (Slika 5.4. A).



Slika 5.5. Analiza unutarstaničnog i izlučenog peptida Aβ40 u stanicama CHO_{wt}, CHO-NPC1^{-/-} i CHO-NPC1^{-/-}+NPC1 koje prolazno eksprimiraju protein APP_{sw-6myc}. Peptide smo analizirali u staničnom lizatu i mediju metodom ELISA pomoću komercijalnog kompleta (Invitrogen, SAD). Prikazane su relativne srednje vrijednosti iz 3 neovisna pokusa u odnosu na CHO_{wt}, a statistička značajnost je izračunata Student *t*-testom: **p*<0.05; ***p*<0.01.

5.2.3. Povišena razina peptida A β 40 u stanicama CHO-NPC1^{-/-} nije posljedica povećanog cijepanja odsječka CTF β γ -sekretazom

Kako bismo dokazali da nakupljanje peptida A β 40 nije posljedica povećanog cijepanja CTF β γ -sekretazom, stanice CHO smo prolazno transfecirali s konstruktom CTF β -6myc koji kodira fragment CTF β čija će razgradnja, i nastanak peptida A β 40, ovisiti isključivo o aktivnosti γ -sekretaze. Paralelno smo analizirali produkte cijepanja tog egzogenog fragmenta u stanicama CHO^{wt} i CHO-NPC1^{-/-}. Pokazali smo da je razina topivog i agregiranog oblika unutarstaničnog peptida A β 40 (Slika 5.6. A), kao i fragmenta AICD (Slika 5.6. B), slična između stanica CHO^{wt} i CHO-NPC1^{-/-} koje prolazno ekspimiraju odsječak CTF β . Kako smo nakupljanje peptida A β 40 uočili u stanicama koje prolazno ekspimiraju protein APP (Slika 5.5.), no ne i u stanicama koje prolazno ekspimiraju direktni supstrat enzima γ -sekretaze - fragment CTF β (Slika 5.6.) zaključili smo da povišena razina peptida A β 40 u stanicama CHO-NPC1^{-/-} nije posljedica povećanog cijepanja proteina APP γ -sekretazom, već da je najvjerojatnije posljedica povišenog cijepanja β -sekretazom. Ovi rezultati, uz one prethodne u kojima smo pokazali povišene razine odsječka CTF β (Slika 5.4. A) i sAPP β (Slike 5.3. C i 5.4. B) u stanicama CHO-NPC1^{-/-} u odnosu na CHO^{wt} dokazuju da disfunkcija proteina NPC1 vodi ka povećanom amiloidogenom cijepanju proteina APP tzv. β -sekretaznim putem.

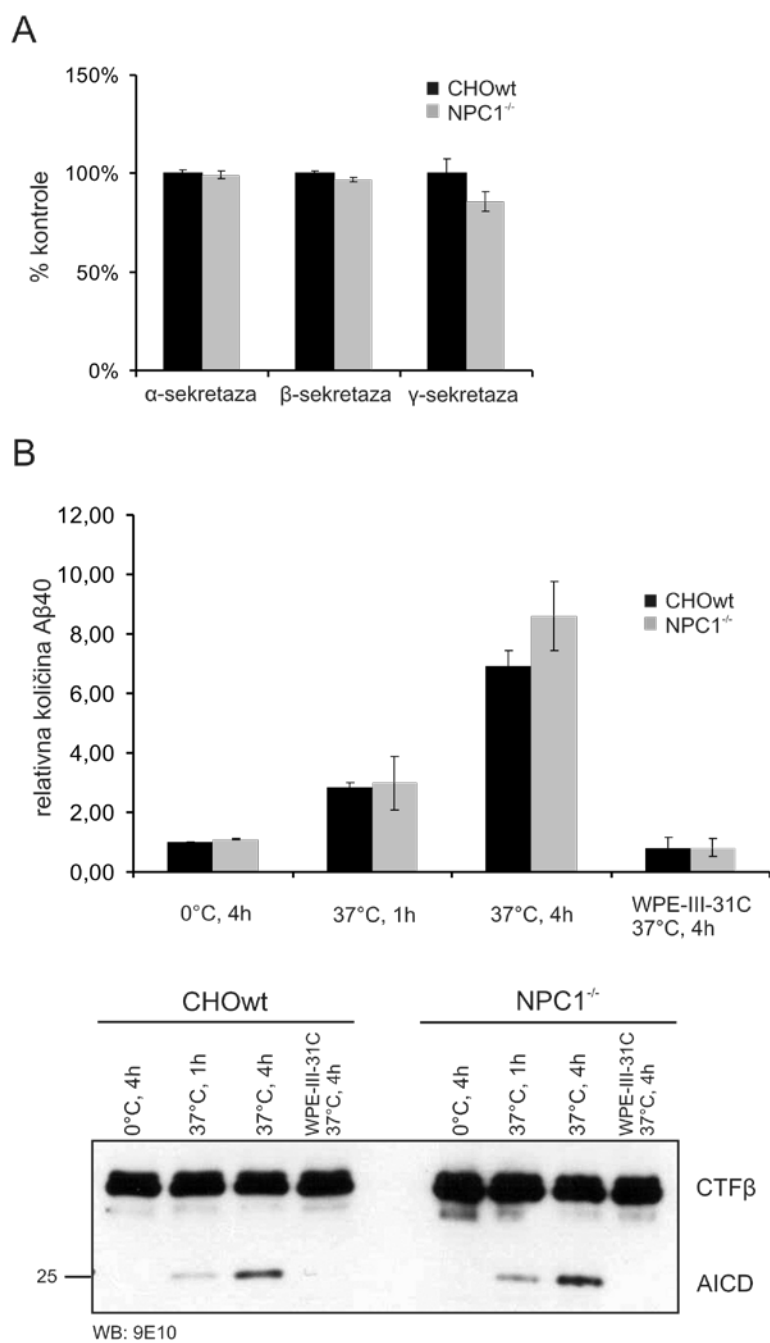


Slika 5.6. Analiza produkata cijepanja γ -sekretazom u stanicama CHO^{wt} i CHO-NPC1^{-/-} koje prolazno ekspimiraju odsječak CTF β -6myc. (A) Peptide A β 40 smo analizirali metodom ELISA pomoću komercijalnog kompleta (Invitrogen, SAD) u staničnom lizatu. Prikazane su relativne srednje vrijednosti iz 3 neovisna pokusa u odnosu na CHO^{wt}. **(B)** Western blot (WB) analiza razine fragmenata AICD u staničnom lizatu pomoću specifičnog protutijela navedenog na slici.

5.2.4. Aktivnost enzima α -, β - i γ -sekretaze nije promijenjena u stanicama CHO-NPCI^{-/-}

Kako bismo istražili jesu li promijenjene razine produkata cijepanja proteina APP u stanicama CHO-NPCI^{-/-} posljedica promjena u katalitičkoj aktivnosti pojedine sekretaze izmjerili smo njihovu aktivnost u staničnim lizatima pomoću komercijalnih kompleta (R&D Systems, SAD) baziranih na FRET (od eng. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) tehnologiji. Princip testova je detaljnije opisan u poglavlju 4.7. Materijala i metoda. Testovima smo mjerili konačnu razinu enzimske aktivnosti pojedine sekretaze nakon 2 sata reakcije. S obzirom da su α -, β - i γ -sekretaza enzimi koji sadrže jednu (α - i β -) ili više (γ -) transmembranskih domena, pretpostavili smo da bi promijenjeni metabolizam kolesterola i drugih lipida u stanicama CHO-NPCI^{-/-} mogao utjecati na lipidni sastav membrana pa tako i na konformaciju te aktivnost ovih enzima. Međutim, ovi testovi su pokazali da u stanicama CHO-NPCI^{-/-} nije izmijenjena katalitička aktivnost pojedine sekretaze (Slika 5.7. A).

Aktivnost γ -sekretaze smo dodatno ispitali reakcijom u *in vitro* uvjetima (Slika 5.7. B). Izolirali smo membrane stanica koje prolazno eksprimiraju protein CTF β -6myc (direktni supstrat γ -sekretaze) te smo ih koristili u četiri različite *in vitro* reakcije u kojima smo pratili nastanak peptida A β 40 i AICD: 1) membrane smo inkubirali 4 sata na ledu sprječavajući tako rad enzima γ -sekretaze; 2) i 3) membrane smo inkubirali 1 sat odnosno 4 sata pri 37°C kako bismo analizirali kinetiku nastanka peptida A β 40 i AICD; 4) membrane smo inkubirali 4 sata pri 37°C uz prisustvo inhibitora γ -sekretaze (WPE-III-31C, Calbiochem). Dok je u *in vitro* reakciji na ledu i u prisustvu inhibitora potpuno spriječeno cijepanje odsječka CTF β i nastanak peptida A β 40 i AICD, inkubacija membrana pri 37°C pokazala je jednaku količinu nastalog peptida A β 40 i AICD nakon 1 sat, odnosno nakon 4 sata u stanicama CHO^{wt} i CHO-NPCI^{-/-} (Slika 5.7. B). Ovom *in vitro* analizom aktivnosti enzima smo dodatno pokazali da γ -sekretaza ima podjednaku aktivnost u ispitanim stanicama, te da povišena razina peptida A β 40 u stanicama CHO-NPCI^{-/-} u odnosu na stanice CHO^{wt} nije posljedica povećane katalitičke aktivnosti γ -sekretaze.



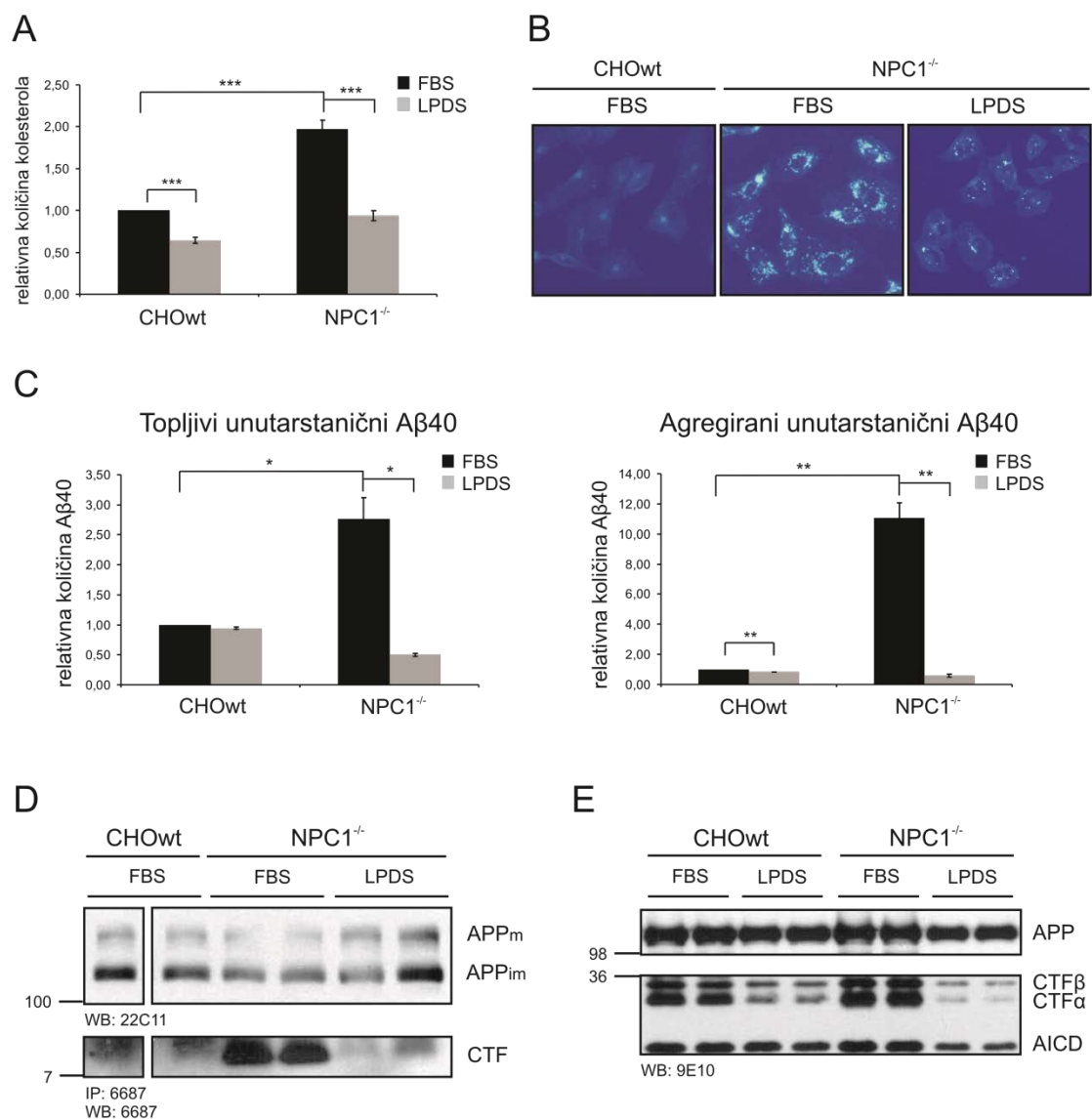
Slika 5.7. Analiza aktivnosti enzima α -, β - i γ -sekretaze u stanicama CHOwt i CHO-NPC1^{-/-}. (A) Razinu enzimatske aktivnosti pojedine sekretaze nakon 2 sata reakcije izmjerili smo u staničnom lizatu komercijalnim kompletima (R&D Systems, SAD). Prikazane su relativne srednje vrijednosti iz 3 neovisna pokusa u odnosu na CHOwt. (B) Analiza katalitičke aktivnosti γ -sekretaze cijepanjem egzogenog odsječka CTF β *in vitro*. Pratili smo nastanak peptida A β 40 metodom ELISA, te AICD metodom *Western blot* (WB).

5.2.5. Nakupljanje unutarstaničnog peptida A β 40 i odsječka CTF β ovisi o nakupljanju kolesterola u stanicama CHO-NPC1^{-/-}

Kako bismo provjerili ovisi li nakupljanje unutarstaničnog peptida A β 40 i odsječka CTF β o razini kolesterola u stanicama CHO-NPC1^{-/-}, koja je posljedica nedostatka proteina NPC1, stanice CHOwt i CHO-NPC1^{-/-} smo uzgajali u uvjetima siromašnim lipidima s ciljem smanjenja količine kolesterola u stanici. Stanice smo uzgajali 48 sati u mediju u kojeg smo, umjesto uobičajenog seruma FBS (od eng. *Foetal Bovine Serum*) koji sadrži lipide, dodali 10% seruma LPDS (od eng. *LiPid Deficient Serum*, Cocalico Biologicals, SAD) koji ne sadrži lipide, te smo usporedili cijepanje proteina APP u stanicama uzgajanim u uvjetima sa (serum FBS) i bez (serum LPDS) egzogenih lipida.

U stanicama CHOwt i u stanicama CHO-NPC1^{-/-} uzgajanim u mediju sa serumom LPDS koji ne sadrži lipide došlo je do smanjenja razine ukupnog staničnog kolesterola (Slika 5.8. A). Dapače, razina kolesterola u stanicama CHO-NPC1^{-/-} snizila se na razinu usporedivu s onom u „netretiranim“ (uzgojenim u mediju sa serumom FBS) stanicama CHOwt (Slika 5.8. A), te smo zaključili da uzgoj stanica CHO-NPC1^{-/-} u mediju sa serumom LPDS spušta razinu kolesterola na onu kakva je u stanicama koje imaju funkcionalni protein NPC1. Bojanje filipinom potvrdilo je da u stanicama CHO-NPC1^{-/-} uzgajanim u mediju sa serumom LPDS dolazi do značajnog smanjenja vezikularnih nakupina slobodnog kolesterola u odnosu na iste stanice uzgajane u mediju sa serumom FBS (Slika 5.8. B).

Sniženje razine kolesterola u stanicama CHO-NPC1^{-/-} rezultiralo je također sniženjem razine unutarstaničnog peptida A β 40 (i topivog i agregiranog oblika) na razine usporedive s onima u „netretiranim“ stanicama CHOwt (Slika 5.8. C). Usporedo, i u stanicama CHOwt smo mogli primjetiti sniženje razine unutarstaničnog peptida A β 40 nakon uzgoja u uvjetima siromašnim lipidima (LPDS) (Slika 5.8. C). Sniženje razine kolesterola u stanicama CHO-NPC1^{-/-} dovelo je i do značajnog sniženja razine kako endogenih (Slika 5.8. D), tako i egzogenih fragmenata CTF (Slika 5.8. E). Ovim smo rezultatima pokazali da sniženje razine kolesterola u stanicama CHO-NPC1^{-/-} na razinu usporedivu s onom u stanicama CHOwt uzrokuje smanjenu proizvodnju produkata amiloidogene razgradnje proteina APP, peptida A β i odsječka CTF β . Činjenica da u stanicama CHO-NPC1^{-/-} sniženje razine kolesterola daje isti efekt na nakupljanje produkata cijepanja proteina APP β -sekretazom kao i ekspresija proteina NPC1 (Slike 5.3. A i 5.5.), dovodi nas do zaključka da je povećana amiloidogena razgradnja proteina APP ovisna upravo o nakupljanju kolesterola kao posljedici nedostatka proteina NPC1.



Slika 5.8. Analiza cijepanja proteina APP u stanicama CHOwt i CHO-NPC1^{-/-} uzgajanim u uvjetima sa (serum FBS) i bez (serum LPDS) egzogenih lipida. (A) Ukupnu količinu kolesterola u staničnom lizatu izmjerili smo komercijalnim kompletom „Amplex Red Cholesterol Assay“ (Invitrogen, SAD). Prikazane su relativne srednje vrijednosti iz 3 neovisna pokusa u odnosu na CHOwt. **(B)** Slobodni neesterificirani kolesterol u stanicama smo obilježili filipinom (Sigma-Aldrich, SAD) i analizirali epifluorescentnim mikroskopom. **(C)** Razinu unutarstaničnog peptida Aβ40 izmjerili smo metodom ELISA u lizatu stanica koje prolazno eksprimiraju protein APPsw-6myc. Prikazane su relativne vrijednosti iz 3 neovisna pokusa u odnosu na CHOwt. **(D)** Western analiza endogenih odsječaka CTF i **(E)** odsječaka CTFα, CTFβ i AICD u stanicama koje prolazno eksprimiraju protein APPsw-6myc. Statistička značajnost je izračunata Student *t*-testom: **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001.

5.3. Utjecaj nakupljanja kolesterola na transport i smještaj proteina APP u stanicama CHO-NPCI^{-/-}

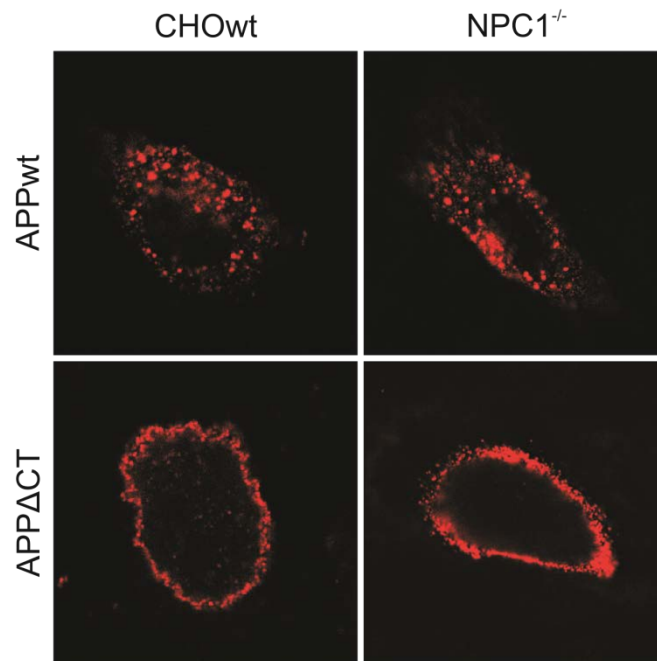
Smatra se da se cijepanje proteina APP α -sekretazom odvija na površini stanice (Sisodia i sur., 1990.; Parvathy i sur., 1999.), dok se cijepanje proteina APP β -sekretazom primarno odvija u endosomima (Koo & Squazzo, 1994.). Kako bismo istražili mehanizam učinka nakupljanja kolesterola na cijepanje proteina APP u stanicama CHO-NPCI^{-/-} analizirali smo smještaj proteina APP u stanici. Naša je hipoteza da su promjene u cijepanju proteina APP uslijed nakupljanja kolesterola posljedica promjena u njegovom unutarstaničnom transportu tj. smještaju. Točnije, smatramo da bi povišena amiloidogena razgradnja proteina APP u stanicama CHO-NPCI^{-/-} mogla biti posljedica njegovog smanjenog smještaja na površini stanice, odnosno njegovog nakupljanja u endosomima.

5.3.1. Internalizacija proteina APP je ključna za njegovu povećanu amiloidogenu razgradnju u stanicama CHO-NPCI^{-/-}

Preduvjet cijepanja proteina APP β -sekretazom u endosomima jest njegova internalizacija s površine stanice. Da bi dokazali da je internalizacija proteina APP nužna za njegovo povećano amiloidogeno cijepanje u stanicama CHO-NPCI^{-/-}, u stanicama CHO smo prolazno eksprimirali rekombinantni protein myc-APP Δ CT. Takav oblik proteina APP ne sadrži signal nužan za internalizaciju koji se nalazi u deletiranoj citoplazmatskoj domeni (shema konstrukata se nalazi u poglavlju 4.2. Materijala i metoda).

Internalizaciju proteina APP analizirali smo u stanicama CHO^{wt} i CHO-NPCI^{-/-} koje prolazno eksprimiraju protein APP^{wt} N-terminalno obilježen s biljekom HA (HA-SEAP-APP^{wt}) ili protein APP Δ CT N-terminalno obilježen s biljekom myc (myc-APP Δ CT). Žive, nepermeabilizirane stanice smo inkubirali 20 min pri 37°C s odgovarajućim primarnim protutijelom koje prepoznaje antigen HA odnosno myc na vanstaničnom N-terminalnom dijelu egzogenog proteina APP^{wt} odnosno APP Δ CT kako bi omogućili njihovu internalizaciju. Obilježene proteine u stanicama smo nakon fiksacije detektirali sekundarnim protutijelom konjugiranim s fluorokromom Alexa594 (Invitrogen, SAD), te analizirali konfokalnim mikroskopom. Analiza stanica koje eksprimiraju egzogeni protein APP^{wt} pokazala je da se on nakon 20 min nalazi u vezikulama u unutrašnjosti stanice i u stanicama CHO^{wt} i u CHO-NPCI^{-/-} što ukazuje na njegovu internalizaciju. Suprotno tome, i stanice CHO^{wt} i stanice CHO-NPCI^{-/-} koje eksprimiraju egzogeni protein APP Δ CT pokazuju njegov

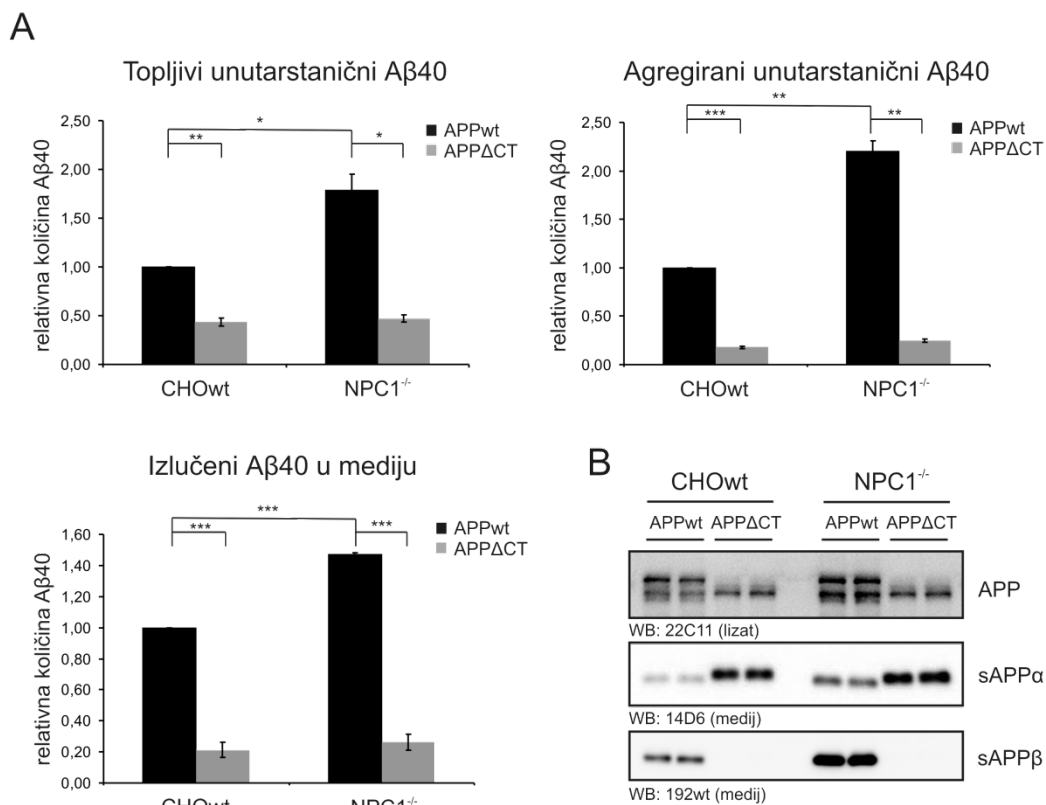
dominantno membranski smještaj što dokazuje da se takav krnji oblik proteina APP nije u mogućnosti internalizirati (Slika 5.9.).



Slika 5.9. Analiza internalizacije egzogenog proteina APP u stanicama CHOwt i CHO-NPC1^{-/-} koje prolazno ekspimiraju protein APPwt ili APPΔCT. Žive, nepermeabilizirane stanice smo inkubirali 20 min pri 37°C s odgovarajućim protutijelima specifičnim za biljeg na N-terminusu prolazno ekspimiranih proteina: anti-HA za APPwt i anti-myc (9E10) za APPΔCT. Internalizaciju tako obilježenih proteina smo analizirali konfokalnim mikroskopom.

Nakon što smo dokazali da se protein APPΔCT zaista ne može internalizirati za razliku od proteina APPwt, analizirali smo produkte njegovog cijepanja kako bismo pokazali da se takav oblik proteina APP ne može cijepati enzimom β-sekretaza te da je cijepanje ovim enzimom preduvjet za povećano stvaranje peptida Aβ u stanicama CHO-NPC1^{-/-}. Stanice smo prolazno transfecirali s konstruktom APPwt-6myc ili myc-APPΔCT te usporedo pratili metabolizam tih egzogeno ekspimiranih proteina u stanicama. Pokazali smo da stanice CHO-NPC1^{-/-}, kao i stanice CHOwt, koje ekspimiraju egzogeni protein APPΔCT imaju vrlo sniženu razinu peptida Aβ, kako njegovog izlučenog oblika tako i topljivog i agregiranog unutarstaničnog oblika, u odnosu na stanice koje ekspimiraju protein APPwt (Slika 5.10. A). Ovaj rezultat dokazuje da je internalizacija proteina APP zaista nužna za povećani nastanak peptida Aβ u stanicama CHO-NPC1^{-/-}.

Nadalje, analizom N-terminalnih fragmenata proteina APP, sAPP α i sAPP β , dodatno smo pokazali da zaista ne dolazi do cijepanja proteina APP Δ CT β -sekretazom (u stanicama CHO wt i CHO-NPC1 $^{-/-}$ nismo detektirali produkt sAPP β), dok je njegovo cijepanje α -sekretazom povećano u odnosu na cijepanje proteina APP wt u stanicama CHO-NPC1 $^{-/-}$, kao i u stanicama CHO wt (detektirali smo povećanu razinu odsječka sAPP α u stanicama koje eksprimiraju konstrukt APP Δ CT u odnosu na APP wt) (Slika 5.10. B). Ovakav rezultat je u skladu s već uvriježenim mišljenjem da se cijepanje proteina APP α -sekretazom odvija na površini stanice, dok se cijepanje β -sekretazom primarno odvija u endosomima, te potvrđuje našu hipotezu da je internalizacija proteina APP nužna za njegovo povećano amiloidogeno cijepanje uslijed nakupljanja kolesterola u stanicama CHO-NPC1 $^{-/-}$.

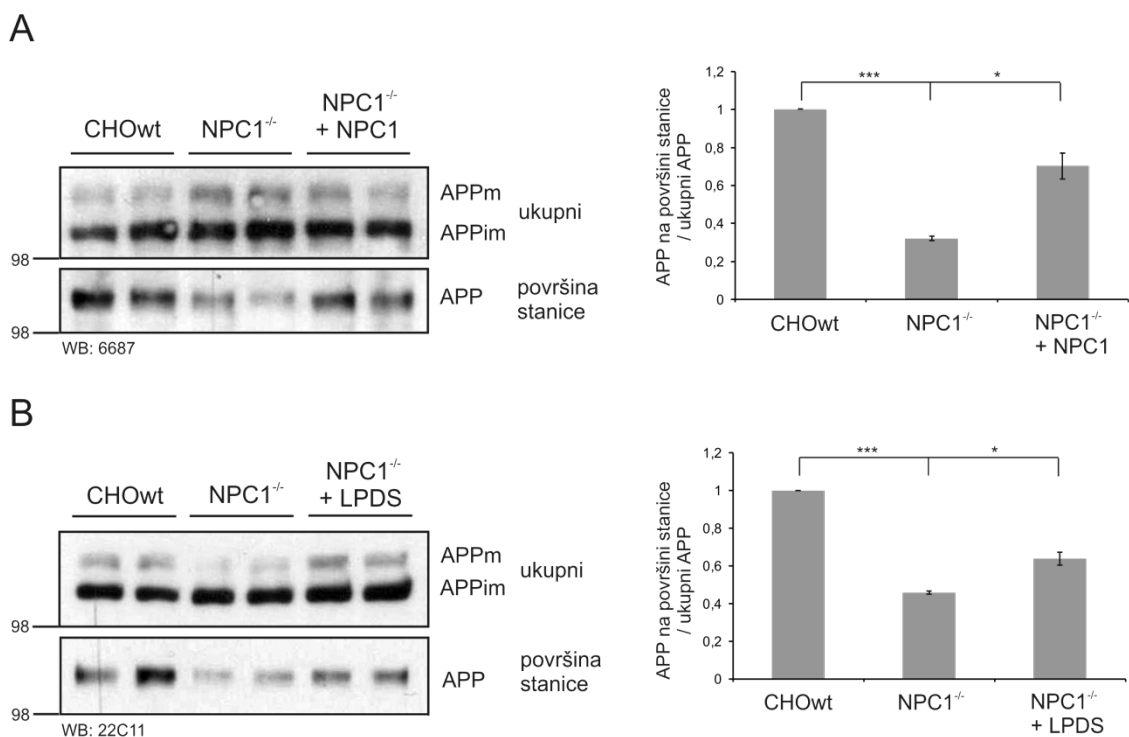


Slika 5.10. Analiza produkata cijepanja proteina APP u stanicama CHO wt i CHO-NPC1 $^{-/-}$ koje prolazno eksprimiraju protein APP wt ili APP Δ CT. (A) Razinu peptida A β 40 izmjerili smo metodom ELISA u lizatu i mediju. Prikazane su relativne srednje vrijednosti iz 3 neovisna pokusa u odnosu na CHO wt , a statistička značajnost je izračunata Student t -testom: * p <0.05; ** p <0.01; * p <0.001. (B) Western blot (WB) analiza razine sAPP α i sAPP β u mediju pomoću specifičnih protutijela navedenih na slici.**

5.3.2. Ekspresija proteina APP na površini stanice je značajno smanjena u stanicama CHO-NPCI^{-/-}

Pošto smo dokazali da je internalizacija proteina APP presudna za njegovu amiloidogenu razgradnju β -sekretaznim putem i nastanak peptida A β analizirali smo ekspresiju proteina APP na površini stanica CHO-NPCI^{-/-} u odnosu na stanice CHO^{wt}. Prepostavili smo da je povišena proteolitička razgradnja proteina APP amiloidogenim β -sekretaznim putem posljedica njegove smanjenje razine na površini stanice, tj. povećanog smještaja u endosomima.

Ekspresiju endogenog proteina APP na površini stanice u stanicama CHO^{wt} i CHO-NPCI^{-/-} smo analizirali metodom biotinizacije proteina. Proteine na površini stanica tj. staničnoj membrani smo obilježili biotinom (Thermo Fisher Scientific, SAD) na ledu kako bismo spriječili njegovu internalizaciju i obilježavanje unutarstaničnih proteina. Proteine na staničnoj membrani obilježene biotinom smo imunoprecipitali pomoću NeutrAvidinTM-a koji se specifično veže na biotin (Thermo Fisher Scientific, SAD), te precipitirane proteine analizirali *Westen blot*-om specifičnim protutijelom za protein APP. Paralelno smo analizirali ukupnu razinu proteina APP u lizatu, a rezultate smo prikazali kao omjer obilježenog proteina na površini stanice u odnosu na ukupnu razinu proteina APP. Analiza je pokazala da se na površini stanica CHO-NPCI^{-/-} nalazi značajno manje proteina APP u odnosu na stanice CHO^{wt} ($p < 0.001$, Slika 5.11. A i B). Zanimljivo, stabilna ekspresija proteina NPC1 u stanicama CHO-NPCI^{-/-} (Slika 5.11. A) kao i snižavanje razine kolesterola uzgojem stanica CHO-NPCI^{-/-} u mediju sa serumom LPDS (Slika 5.11. B), rezultiralo je vraćanjem ekspresije proteina APP na površini stanica CHO-NPCI^{-/-} na razine usporedive s onima u stanicama CHO^{wt}. Ovaj rezultat je pokazao da je smanjena ekspresija proteina APP na površini stanica CHO-NPCI^{-/-} direktno ovisna o nakupljanju kolesterola kao posljedici nedostatka proteina NPC1.

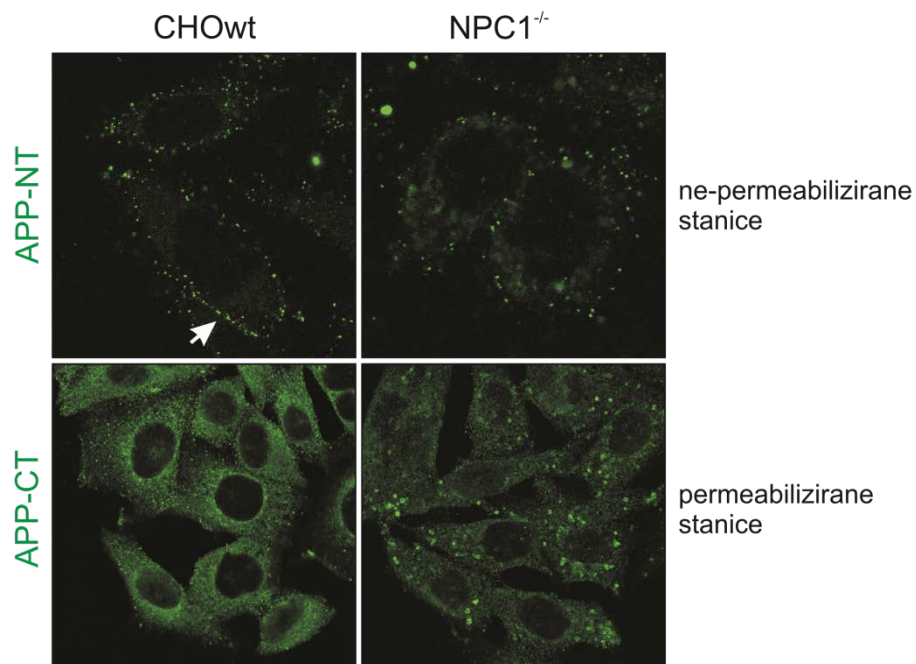


Slika 5.11. Analiza ekspresije proteina APP na površini stanica obilježavanjem proteina biotinom (Thermo Fisher Scientific, SAD). (A) Biotinom obilježene proteine na staničnoj membrani smo analizirali metodom *Western blot* (WB) u stanicama CHOwt, CHO-NPC1^{-/-} i CHO-NPC1^{-/-}+NPC1. **(B)** Biotinom obilježene proteine na staničnoj membrani smo analizirali metodom *Western blot* u stanicama CHOwt, te CHO-NPC1^{-/-} uzgajanim u uvjetima sa i bez egzogenih lipida (serum LPDS). Rezultati *Western* analize su kvantificirani programom ImageJ, a statistička značajnost je izračunata Student *t*-testom: **p*<0.05; ****p*<0.001.

Smanjenu lokalizaciju proteina APP na površini stanica CHO-NPC1^{-/-} u odnosu na stanice CHOwt dokazali smo i imunocitokemijom. Žive, nepermeabilizirane stanice smo obilježili sa specifičnim protutijelom za vanstanični N-terminus proteina APP na ledu kako bismo spriječili internalizaciju membranskih proteina. Obilježene proteine APP na površini stanice smo detektirali sekundarnim protutijelom konjugiranim s fluorokromom Alexa488 (Invitrogen, SAD), te analizirali konfokalnim mikroskopom. Na tako obilježenim stanicama primjetili smo da je ekspresija proteina APP na površini stanice izraženija u stanicama CHOwt u odnosu na stanice CHO-NPC1^{-/-} (Slika 5.12.).

Zanimljivo, kada smo fiksirane i permeabilizirane stanice obilježili specifičnim protutijelom za protein APP želeći tako analizirati njegov smještaj unutar stanice primjetili smo vezikularne nakupine u stanicama CHO-NPC1^{-/-} dok je u stanicama CHOwt signal bio homogen te dominantno perinuklearan bez izraženih nakupina (Slika 5.12.). Ova analiza je pokazala da u stanicama CHO-NPC1^{-/-} doista dolazi do nakupljanja proteina APP unutar

stanice, najvjerojatnije u endosomima, te nas je navela na detaljnu analizu smještaja proteina APP u vezikulama endocitoznog puta.

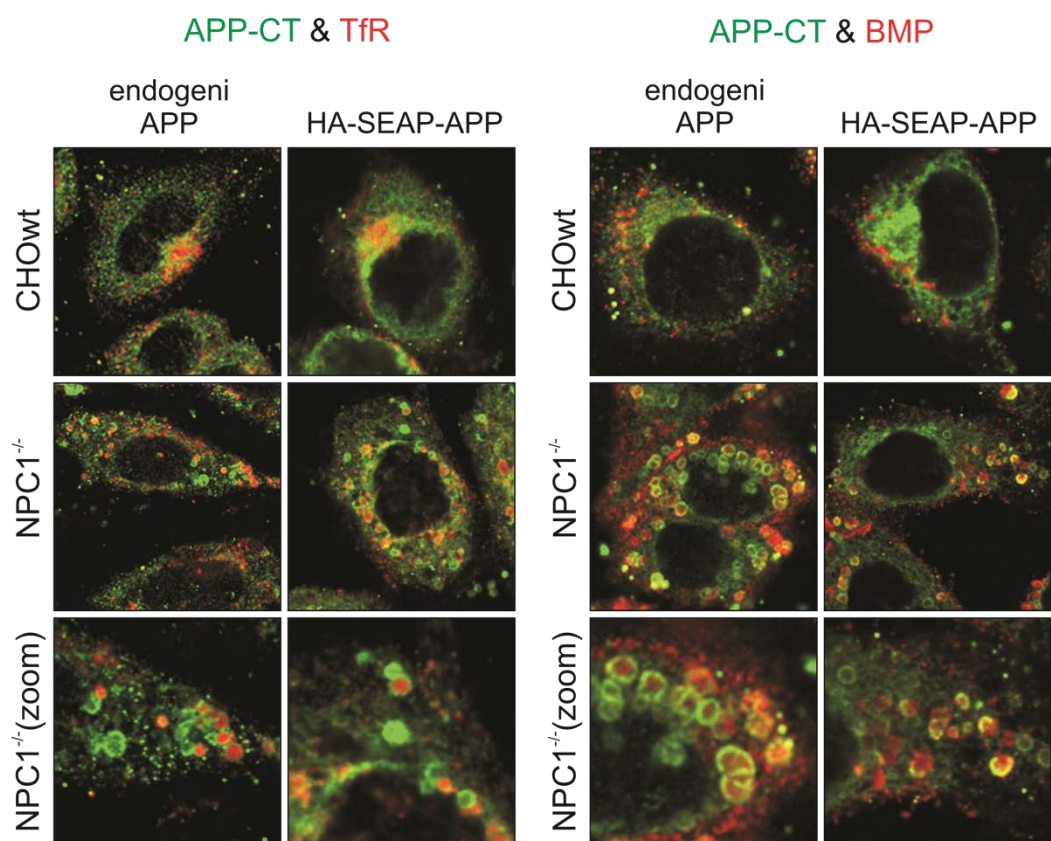


Slika 5.12. Analiza smještaja proteina APP u stanicama CHOwt i CHO-NPC1^{-/-}. Žive, nepermeabilizirane stanice smo obilježili sa specifičnim protutijelom za vanstanični N-terminus proteina APP (APP-NT: 5313) na ledu kako bismo spriječili internalizaciju membranskih proteina. Fiksirane i permeabilizirane stanice smo obilježili protutijelom specifičnim za C-terminus proteina APP (APP-CT: 6687) kako bismo analizirali njegov smještaj unutar stanice. Tako obilježene stanice smo analizirali konfokalnim mikroskopom.

5.3.3. U stanicama *CHO-NPCI^{-/-}* dolazi do nakupljanja proteina APP u ranim / reciklirajućim endosomima

Kako bismo analizirali smještaj proteina APP u endocitoznom putu, koristili smo stanice *CHO^{wt}* i *CHO-NPCI^{-/-}* stabilno transfecirane s konstruktom *HA-SEAP-APP^{wt}*. Stabilna ekspresija proteina *HA-SEAP-APP^{wt}* u stanicama omogućila nam je analizu smještaja proteina APP protutijelima specifičnim za N-terminus odnosno C-terminus proteina APP, ali i protutijelom specifičnim za biljeg HA koji se nalazi na N-terminalnom kraju tog rekombinantnog proteina. Tako smo bili u mogućnosti koristiti razne kombinacije protutijela za obilježavanje i praćenje kolokalizacije proteina APP s proteinima markerima različitih vezikula endocitoznog puta. Također stabilna ekspresija proteina APP rezultirala je povećanom razinom proteina APP u stanicama u odnosu na njegovu endogenu ekspresiju što nam je olakšalo detekciju proteina APP imunofluorescencijom.

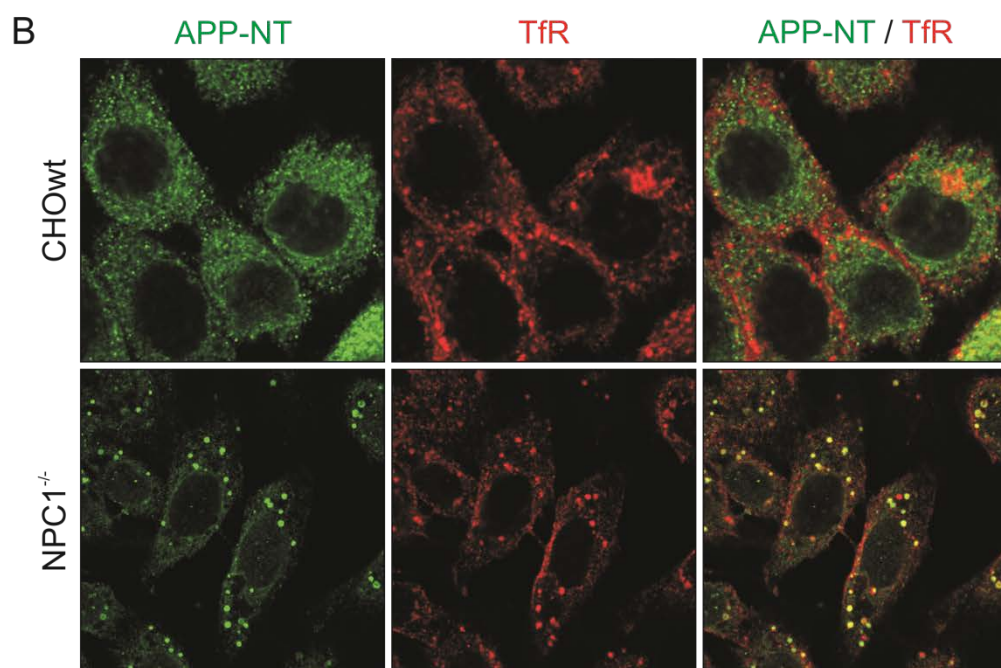
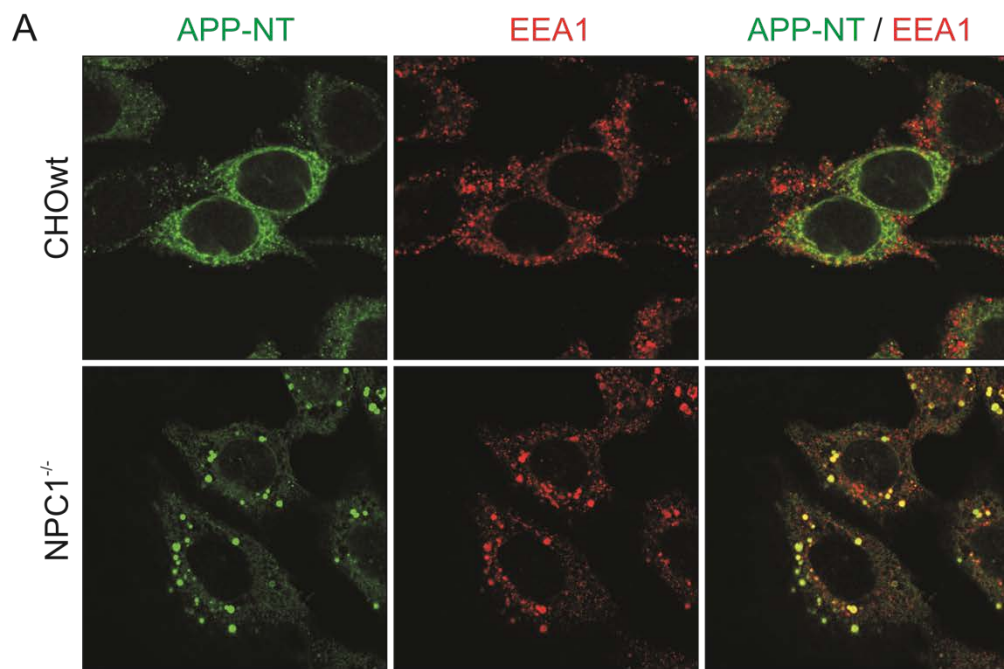
No, prije korištenja stanica koje stabilno ekspimiraju protein *HA-SEAP-APP^{wt}* u narednim pokusima analize lokalizacije proteina APP, morali smo provjeriti da smještaj takvog egzogenog proteina s N-terminalnim biljezima nije promjenjen u odnosu na endogeni protein APP. Zato smo protutijelom specifičnim za protein APP paralelno obilježili stanice koje stabilno ekspimiraju protein *HA-SEAP-APP^{wt}*, te one koje nisu stabilno transfecirane tj. one koje ekspimiraju samo endogeni protein APP. Pratili smo kolokalizaciju egzogenog odnosno endogenog proteina APP s dva različita markera za endocitozne vezikule u stanicama *CHO^{wt}* i *CHO-NPCI^{-/-}*: receptorom transferina (TfR) koji je marker reciklirajućih endosoma i lipidom bis (monoacilglicero) fosfatom (eng. *Bis (Monoacylglycero) Phosphate*, BMP) markerom kasnih endosoma. Pokazali smo da se smještaj egzogenog proteina *HA-SEAP-APP^{wt}* kao i njegova kolokalizacija s endosomalnim markerima ne razlikuje od endogeno ekspimiranog proteina APP (Slika 5.13.) te time dokazali da stabilna ekspresija i N-terminalni biljezi ne mijenjaju stanični smještaj tog egzogenog proteina.

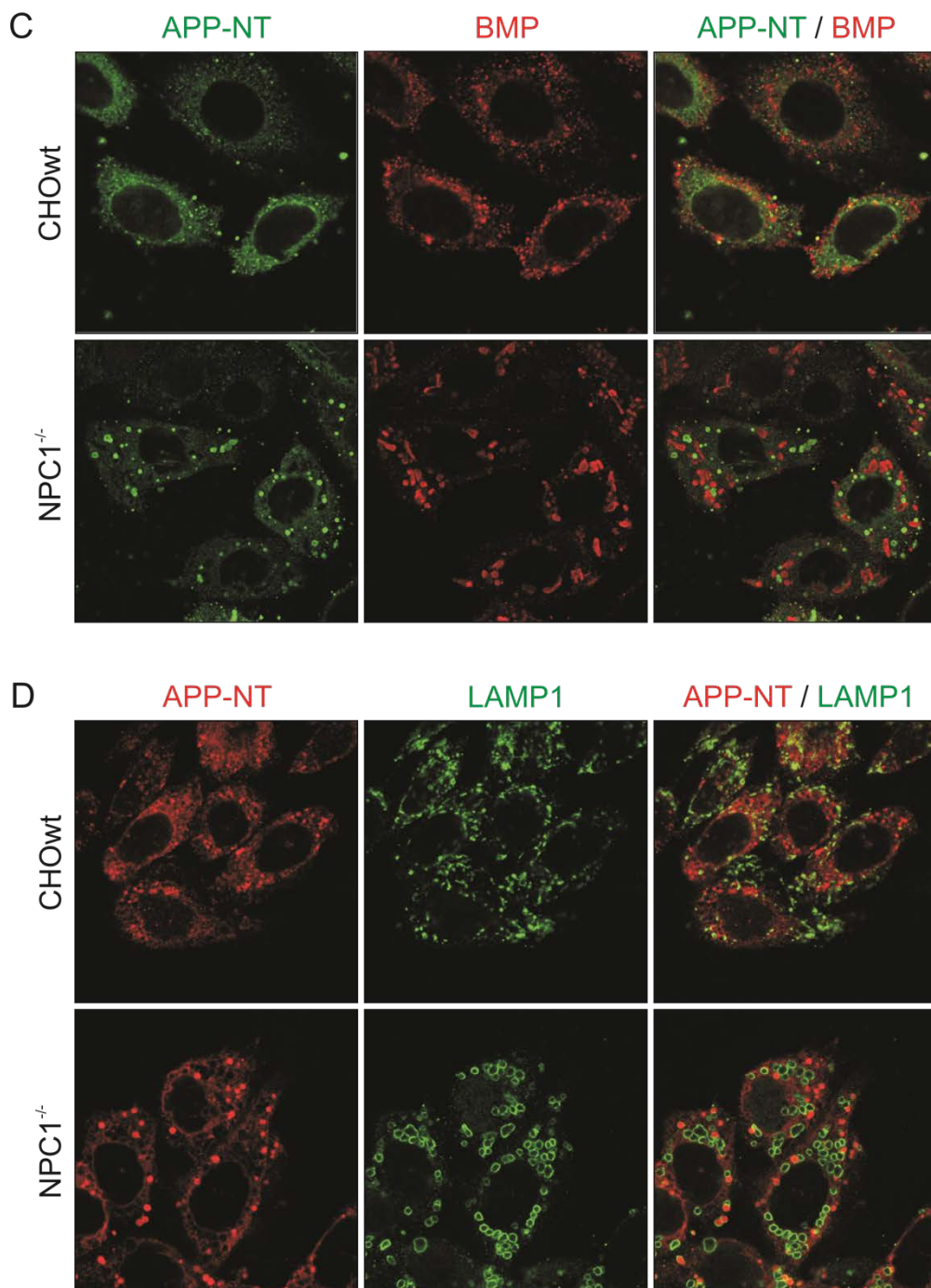


Slika 5.13. Usporedna analiza smještaja endogenog proteina APP u netransfeciranim stanicama i stabilno eksprimiranog proteina HA-SEAP-APPwt u endocitoznom putu stanica CHOwt i CHO-NPC1^{-/-}. Fiksirane i permeabilizirane stanice smo obilježili protutijelom specifičnim za C-terminus proteina APP (APP-CT: 6687), te protutijelom specifičnim za receptor transferina (TfR, marker reciklirajućih endosoma) odnosno lipid BMP (marker kasnih endosoma). Tako obilježene stanice smo analizirali konfokalnim mikroskopom.

Tada smo pristupili analizi smještaja proteina APP u stanicama CHO wt i CHO- $NPCI^{-/-}$ koje stabilno ekspimiraju protein HA-SEAP-APP wt . Imunofluorescencijom i konfokalnom mikroskopijom smo analizirali smještaj proteina APP i njegovu kolokalizaciju s različitim markerima vezikula endocitoznog puta: proteinom EEA1, markerom ranih endosoma; receptorom transferina (TfR), markerom reciklirajućih endosoma; lipidom BMP, markerom kasnih endosoma: te proteinom LAMP1, markerom lizosoma. Protein APP obilježili smo protutijelom specifičnim za N-terminus proteina APP ili anti-HA protutijelom koje također obilježava N-terminalni dio egzogenog proteina HA-SEAP-APP wt . Analiza konfokalnom mikroskopijom tako obilježenih stanica otkrila je izražen vezikularni smještaj proteina APP u stanicama CHO- $NPCI^{-/-}$ u odnosu na stanice CHO wt u kojima je signal bio homogen te dominantno perinuklearan bez izraženih nakupina (Slika 5.14. A-D). Ovi rezultati su u skladu s rezultatima analize gdje smo pratili unutarstanični smještaj proteina APP u netransfeciranim stanicama CHO wt i CHO- $NPCI^{-/-}$ (Slika 5.12.) te dodatno dokazuju da ovaj egzogeni protein ima nepromijenjen smještaj u odnosu na endogeni protein APP.

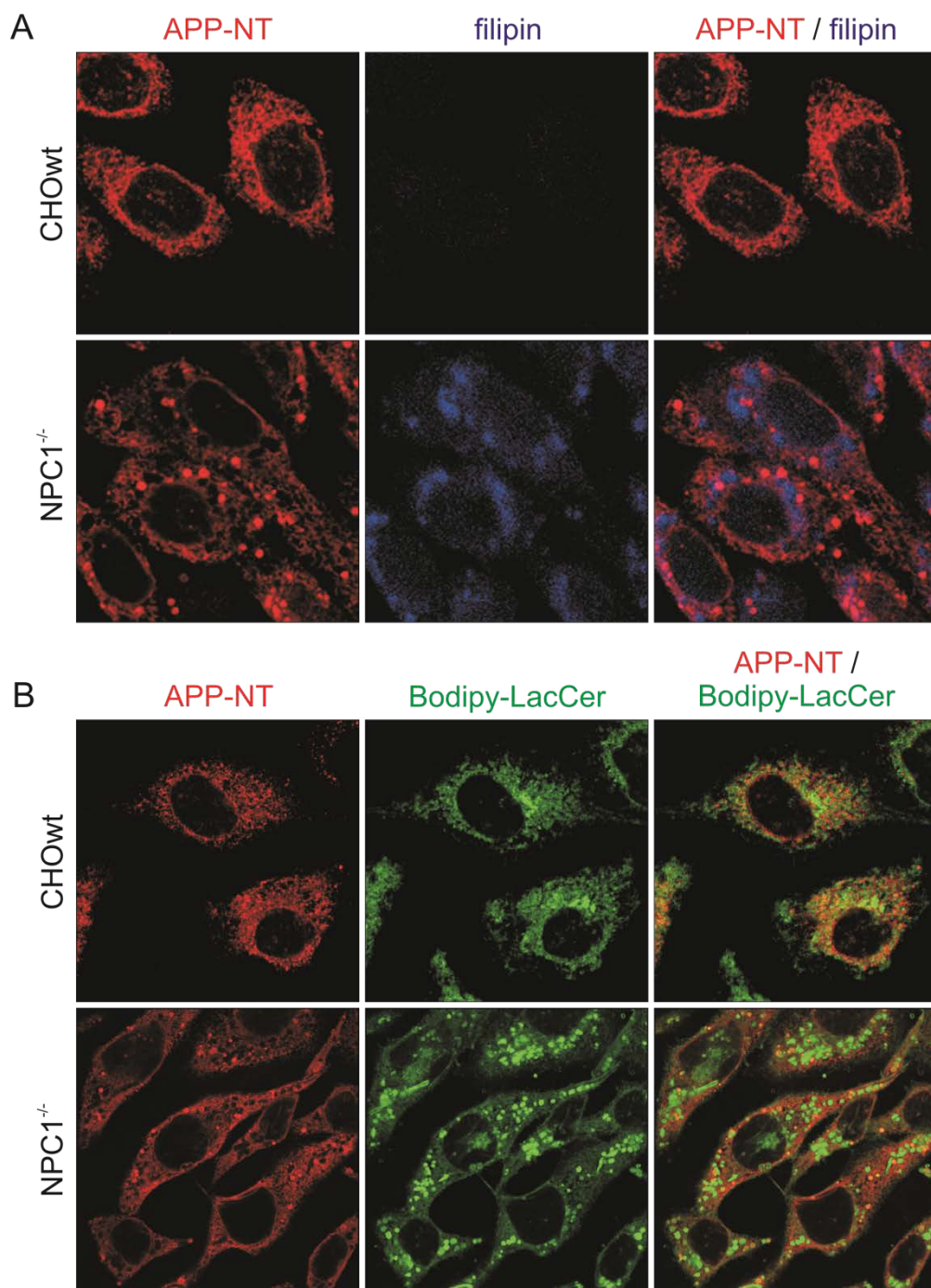
Najizraženiju promjenu u vezikulama endocitoznog puta smo primjetili u veličini kasnih endosoma / lizosoma koji su bili značajno veći u stanicama CHO- $NPCI^{-/-}$ u odnosu na stanice CHO wt (Slika 5.14. C i D). Također smo pokazali da u stanicama CHO- $NPCI^{-/-}$ uz nakupljanje kolesterola dolazi i do izrazitog nakupljanja lipida BMP (Slika 5.14. C) što je u skladu s literaturom (Kobayashi i sur., 1999.). Primjetili smo da stanice CHO- $NPCI^{-/-}$ imaju povećane kako lipidima bogate kasne endosome / lizosome, tako i rane te reciklirajuće endosome u odnosu na stanice CHO wt (Slika 5.14. A i B). To ukazuje da nakupljanje kolesterola u kasnim endosomima / lizosomima uslijed disfunkcije proteina NPC1 može uzrokovati promjene u cijelom endocitoznom putu, a ne samo u vezikulama u kojima se kolesterol nakuplja. Naposljetku, pokazali smo da protein APP ima dominantno vezikularnu kolokalizaciju s markerima EEA1 i TfR u stanicama CHO- $NPCI^{-/-}$ u odnosu na stanice CHO wt (Slika 5.14. A i B), dok s markerima BMP i LAMP1 ne pokazuje kolokalizaciju (Slika 5.14. C i D). Ovi rezultati upućuju da se protein APP nakuplja u ranim odnosno reciklirajućim endosomima, a ne u vezikulama u kojima se nakuplja kolesterol - kasnim endosomima / lizosomima stanica CHO- $NPCI^{-/-}$.





Slika 5.14. Analiza smještaja proteina APP u endocitoznom putu stanica CHOwt i CHO-NPC1^{-/-} koje stabilno ekspimiraju protein HA-SEAP-APPwt. Fiksirane i permeabilizirane stanice smo obilježili protutijelima specifičnim za N-terminus proteina HA-SEAP-APPwt (APP-NT: 5313 ili anti-HA) i protutijelima za različite markere vezikula endocitoznog puta: **(A)** EEA1 (rani endosomi), **(B)** receptor transferina (TfR, reciklirajući endosomi), **(C)** BMP (kasni endosomi/lizosomi) i **(D)** LAMP1 (lizosomi).

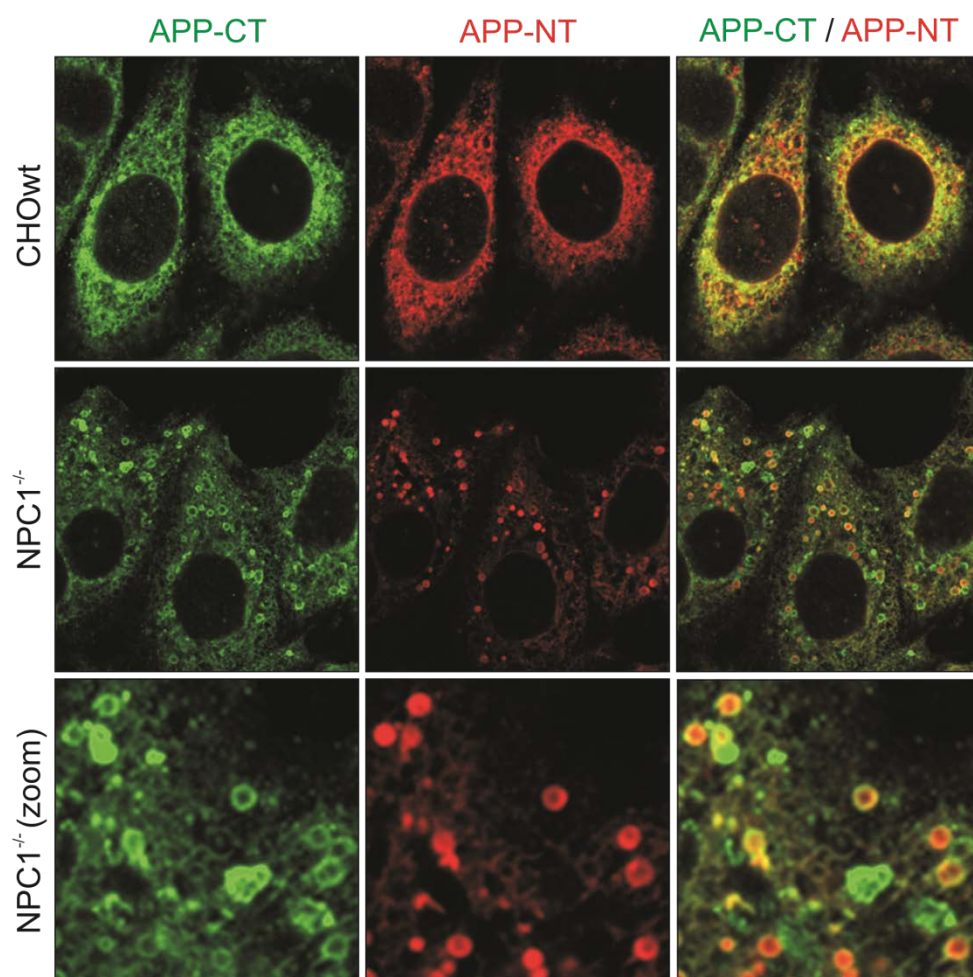
Kako bismo dodatno potvrdili da se protein APP ne nakuplja u kasnim endosomima/lizosomima u kojima se nakupljaju kolesterol i drugi lipidi poput glikosfingolipida, uslijed disfunkcije proteina NPC1, ispitali smo kolokalizaciju proteina APP i slobodnog kolesterola kao i sintetskog analoga glikosfingolipida konjugiranog s fluorokromom Bodipy[®] i albuminom iz goveđeg seruma (Bodipy[®]-LacCer-BSA, Invitrogen, SAD). Ovom analizom smo pokazali da ne dolazi do kolokalizacije N-terminalno obilježenog proteina APP sa slobodnim kolesterolom niti s analogom glikosfingolipida Bodipy[®]-LacCer (Slika 5.15. A i B) te smo dodatno potvrdili da se protein APP u stanicama CHO-NPC1^{-/-} ne nakuplja u vezikulama u kojima se nakupljaju lipidi.



Slika 5.15. Analiza kolokalizacije proteina APP s nakupljenim lipidima u stanicama CHOwt i CHO-NPC1^{-/-} koje stabilno eksprimiraju protein HA-SEAP-APPwt. Fiksirane i permeabilizirane stanice smo obilježili protutijelom specifičnim za N-terminus proteina HA-SEAP-APPwt (APP-NT: anti-HA). **(A)** Slobodni neesterificirani kolesterol u stanicama smo obilježili filipinom (Sigma-Aldrich, SAD). **(B)** Nakupljanje glikosfingolipida smo pratili internalizacijom sintetskog fluorescentno obilježenog analoga Bodipy[®]-LacCer (Invitrogen, SAD).

5.3.4. C-terminalni odsječci proteina APP (CTF) se nakupljaju u kasnim endosomima/lizosomima stanica CHO-NPCI^{-/-}

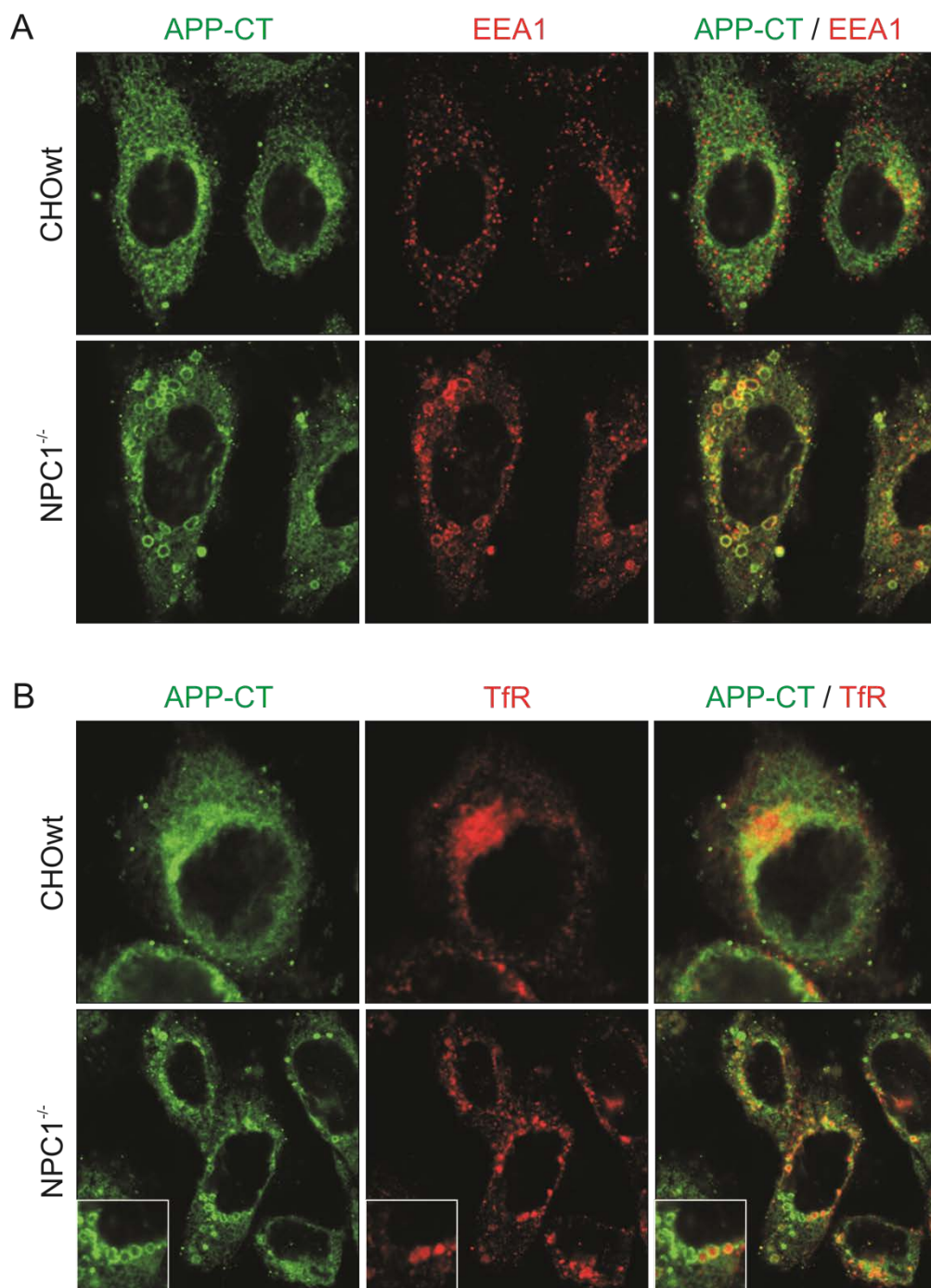
Dok protutijelo specifično za N-terminus proteina APP može detektirati nepocijepani protein APP, no i N-terminalne fragmente (sAPP), protutijelo specifično za C-terminus proteina APP također može detektirati nepocijepani protein APP, ali i C-terminalne fragmente (CTF). To smo pokazali tako što smo stanice koje stabilno eksprimiraju protein HA-SEAP-APPwt obilježili i s protutijelom koje prepoznaje N-terminus egzogenog proteina APP i s protutijelom koje prepoznaje njegov C-terminus. U stanicama CHO-NPCI^{-/-} se posebno lijepo može razlikovati obilježavanje C- i N-terminusa proteina APP specifičnim protutijelom zbog veličine vezikula u tim stanicama. Takvo obilježavanje proteina APP u stanicama otkrilo je vezikule koje su bile obilježene i N-terminalnim (crveno) i C-terminalnim (zeleno) anti-APP protutijelom (Slika 5.16., uvećani dio prikaza u stanicama CHO-NPCI^{-/-}). Primjetili smo da C-terminalno protutijelo dominantno „boja“ većinom membranu vezikula, dok N-terminalno „boja“ njihov lumen što odgovara prostornom smještaju tih odsječaka proteina APP unutar endosoma (C-terminus sadrži transmembransku domenu proteina APP, dok je N-terminalni dio „topljiv“ i izlučuje se izvan stanice op.a.). No također smo zamijetili da su pojedine vezikule obilježene samo jednim od protutijela, što ukazuje da su u tim vezikulama prisutni samo N- ili C-terminalni produkti cijepanja proteina APP.

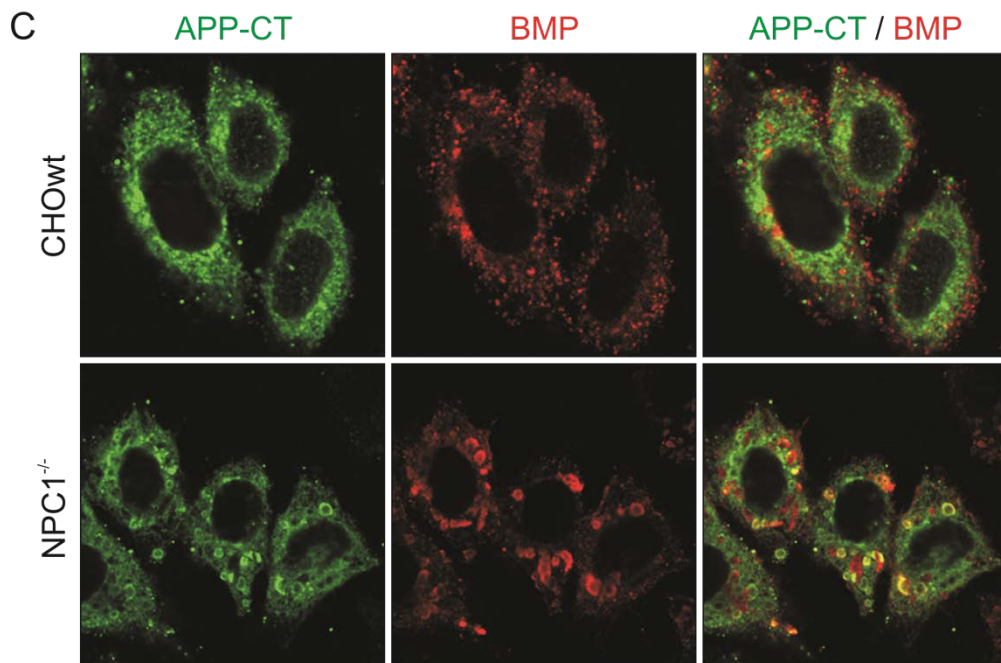


Slika 5.16. Analiza kolokalizacije N- i C-terminalno obilježenog proteina APP u stanicama CHOwt i CHO-NPCI^{-/-} koje stabilno ekspimiraju protein HA-SEAP-APPwt. Fiksirane i permeabilizirane stanice smo obilježili protutijelima specifičnim za N-terminus proteina HA-SEAP-APPwt (APP-NT: anti-HA) i za C-terminus proteina HA-SEAP-APPwt (APP-CT: 6687). Tako obilježene stanice smo analizirali konfokalnim mikroskopom.

Zato smo željeli provjeriti hoće li analiza smještaja proteina APP s protutijelom specifičnim za njegov C-terminus potvrditi rezultate analize dobivene s protutijelom specifičnim za N-terminus proteina APP. Imunocitokemija s protutijelom specifičnim za C-terminus proteina APP potvrdila je kolokalizaciju proteina APP s markerima EEA1 (rani endosomi) i TfR (reciklirajući endosomi) potvrđujući da se protein APP, a vjerovatno i djelomice fragmenti CTF nakupljaju u ovim vezikulama endocitoznog puta u stanicama CHO-NPCI^{-/-} (Slika 5.17. A i B). No za razliku od prijašnje analize s N-terminalnim anti-APP protutijelom, ova analiza je otkrila parcijalnu kolokalizaciju C-terminalno obilježenog proteina APP s kasnim endosomima/lizosomima u stanicama CHO-NPCI^{-/-} (Slika 5.17. C).

Kako smo takvu kolokalizaciju primjetili samo prilikom obilježavanja proteina APP protutijelom specifičnim za njegov C-terminus, ali ne i za njegov N-terminus, takav smo rezultat protumačili kao nakupljanje dominantno odsječaka CTF u kasnim endosomima / lizosomima stanica *CHO-NPC1^{-/-}*.

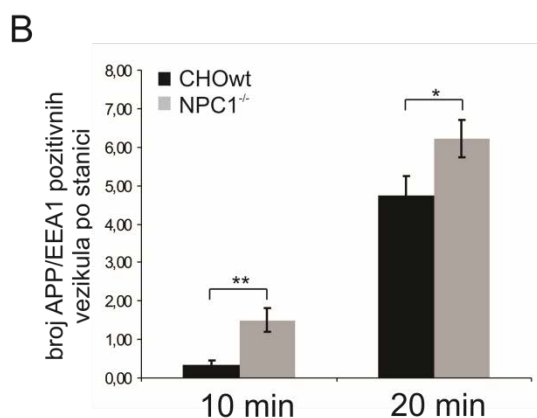
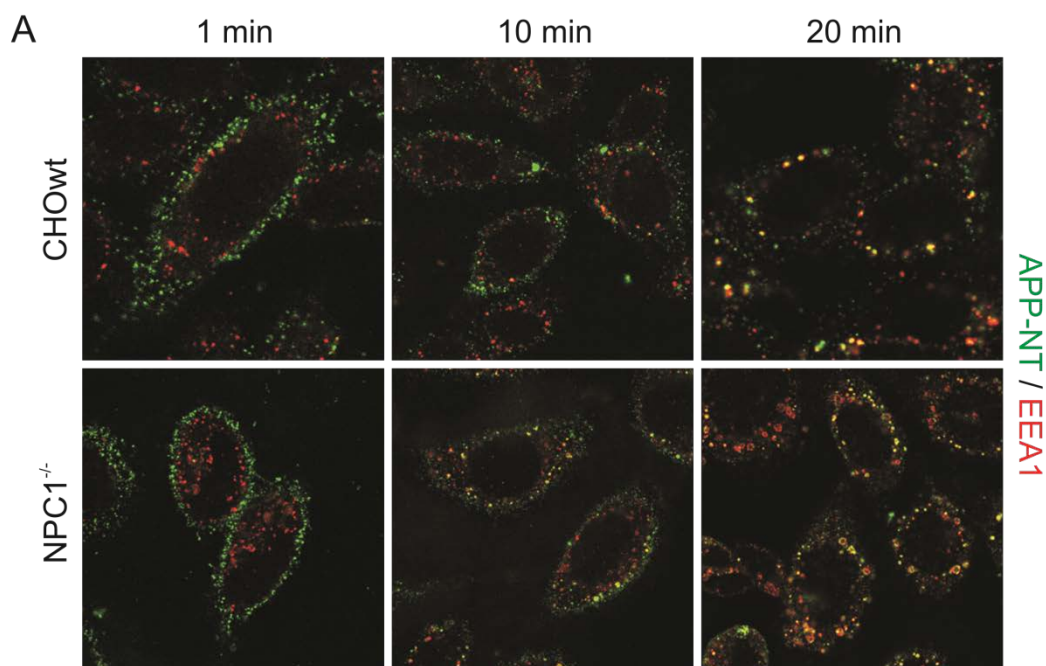




Slika 5.17. Analiza smještaja proteina APP/CTF u endocitoznom putu stanica CHOwt i CHO-NPC1^{-/-} koje stabilno eksprimiraju protein HA-SEAP-APPwt. Fiksirane i permeabilizirane stanice smo obilježili protutijelom specifičnim za C-terminus proteina HA-SEAP-APPwt (APP-CT: 6687) i protutijelima za različite markere vezikula endocitoznog puta: (A) EEA1 (rani endosomi), (B) receptor transferina (TfR, reciklirajući endosomi) i (C) BMP (kasni endosomi/lizosomi).

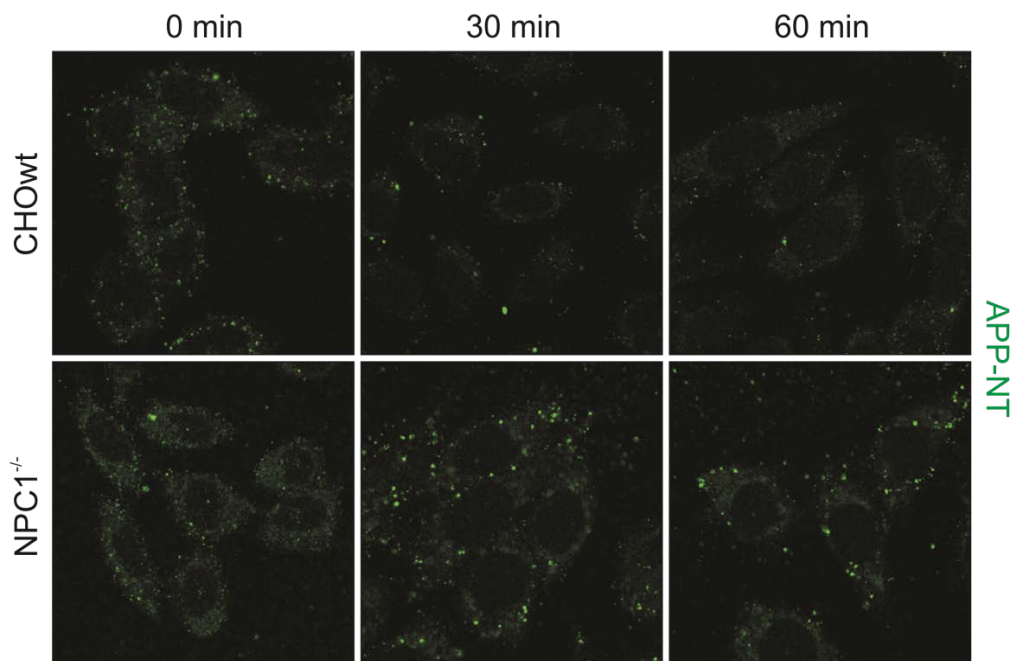
5.3.5. Nakupljanje kolesterola u stanicama *CHO-NPCI^{-/-}* uzrokuje bržu internalizaciju i smanjeno recikliranje proteina APP

Smanjena ekspresija proteina APP na površini stanice i njegovo nakupljanje u ranim vezikulama endocitoznog puta u stanicama *CHO-NPCI^{-/-}* može biti posljedica brže internalizacije s površine stanice i/ili smanjenog recikliranja proteina APP na staničnu membranu, ili pak sinergije oba učinka uslijed nakupljanja kolesterola u stanicama *CHO-NPCI^{-/-}* u odnosu na *CHO^{wt}*. Internalizaciju proteina APP s površine stanice smo pratili tako da smo žive, nepermeabilizirane stanice *CHO^{wt}* i *CHO-NPCI^{-/-}*, koje stabilno eksprimiraju protein HA-SEAP-APP^{wt}, inkubirali pri 37°C u određenim vremenskim periodima (1, 10 odnosno 20 min) s primarnim protutijelom koje se specifično veže na vanstanični N-terminus proteina APP. Period od 1 min je dovoljan da se protutijelo veže na proteine APP koji se nalaze na staničnoj membrani, no vremenski onemogućava njegovu internalizaciju te zato primarno anti-APP antitijelo (zeleno) obilježava dominantno površinu stanice što se može vidjeti na slici 18A. U periodima od 10 i 20 min, dolazi do internalizacije membranskih proteina te smo tada pratili internalizaciju proteina APP u stanicama *CHO-NPCI^{-/-}* u odnosu na stanice *CHO^{wt}*. Nakon 1, 10 odnosno 20 min inkubacije s anti-APP protutijelom stanice smo fiksirali, permeabilizirali te inkubirali s protutijelom za protein EEA1 (crveno) da bi obilježili rane endosome. Obilježene proteine smo detektirali sekundarnim protutijelom konjugiranim s fluorokromom Alexa488 ili Alexa594 (Invitrogen, SAD), te analizirali konfokalnim mikroskopom. Analiza EEA1/APP pozitivnih vezikula (žuto) nakon 10 i 20 min otkrila je da u stanicama *CHO-NPCI^{-/-}* dolazi do pojačane (brže) internalizacije proteina APP u rane endosome (Slika 18 A i B) u odnosu na stanice *CHO^{wt}*. Naime primjetili smo da nakon 10 i 20 min u stanicama *CHO-NPCI^{-/-}* ima više EEA1/APP pozitivnih vezikula (žuto) u odnosu na stanice *CHO^{wt}* (Slika 5.18. A), što smo potvrdili kvantifikacijom na 22 stanice po preparatu (Slika 5.18. B). Ovaj rezultat ukazuje da bi povišena razina kolesterola i njegovo nakupljanje u stanicama *CHO-NPCI^{-/-}* moglo uzrokovati pojačanu internalizaciju proteina APP i njegovu smanjenu ekspresiju na površini stanica *CHO-NPCI^{-/-}* u odnosu na stanice *CHO^{wt}* (Slike 5.11. A i B; 5.12).



Slika 5.18. Analiza internalizacije proteina APP u stanicama CHOwt i CHO-NPC1^{-/-} koje stabilno eksprimiraju protein HA-SEAP-APPwt. (A) Žive, nepermeabilizirane stanice inkubirali smo pri 37°C u navedenim vremenskim periodima (1, 10 odnosno 20 min) s primarnim protutijelom koje se specifično veže na vanstanični N-terminus proteina APP (APP-NT: 5313, zeleno). Stanice smo zatim fiksirali, permeabilizirali te inkubirali s protutijelom za protein EEA1 (crveno) da bi obilježili rane endosome. **(B)** Internalizaciju proteina APP smo kvantificirali brojanjem APP/EEA1 pozitivnih vezikula (žuto) po stanici (n=22). Statistička značajnost je izračunata Student *t*-testom: **p*<0.05; ***p*<0.01.

Recikliranje proteina APP na površinu stanice pratili smo u stanicama CHO $_{wt}$ i CHO- $NPCI^{-/-}$ koje eksprimiraju samo endogeni protein APP. Žive, nepermeabilizirane stanice smo inkubirali s primarnim protutijelom koje se specifično veže na vanstanični N-terminus proteina APP na površini stanice pri 37°C, 20 min kako bismo omogućili njihovu internalizaciju. Stanice smo zatim isprali, te inkubirali u uobičajenom mediju za rast 30 odnosno 60 min na 37°C kako bismo pratili recikliranje internaliziranog, protutijelom obilježenog proteina APP na površinu stanice. Stanice smo zatim fiksirali, permeabilizirali te obilježili sa sekundarnim protutijelom konjugiranim s fluorokromom Alexa488 (Invitrogen, SAD). Konfokalnom mikroskopijom smo analizirali kako se obilježeni proteini APP recikliraju na staničnu membranu. Primjetili smo da dok u stanicama CHO $_{wt}$ postupno nestaje „signal“ obilježenog proteina APP, u stanicama CHO- $NPCI^{-/-}$ dolazi do njegovog vezikularnog nakupljanja u unutrašnjosti stanice (Slika 5.19.). Kako smo protein APP obilježili specifičnim protutijelom za njegov N-terminalni kraj, „gašenje signala“ u stanicama CHO $_{wt}$ je vjerojatno rezultat recikliranja proteina APP na staničnu membranu gdje se oni cijepaju α -sekretazom, te se time oslobađaju N-terminalni fragmenti (sAPP) u medij. Nasuprot tome u stanicama CHO- $NPCI^{-/-}$ dolazi do unutarstaničnog vezikularnog nakupljanja proteina APP što smo protumačili njegovim usporenim tj. neučinkovitim recikliranjem na staničnu membranu. Ovaj rezultat, kao i onaj gdje smo prikazali povećanu kolokalizaciju proteina APP s markerom reciklirajućih endosoma (receptorom transferina, TfR) u stanicama CHO- $NPCI^{-/-}$ u odnosu na stanice CHO $_{wt}$ (Slika 5.14. B) pokazuje da nakupljanje kolesterola uslijed disfunkcije proteina NPC1 uzrokuje poremećaj u recikliranju proteina na površinu stanice te dovodi do nakupljanja proteina APP u TfR-pozitivnim vezikulama endocitoznog puta.

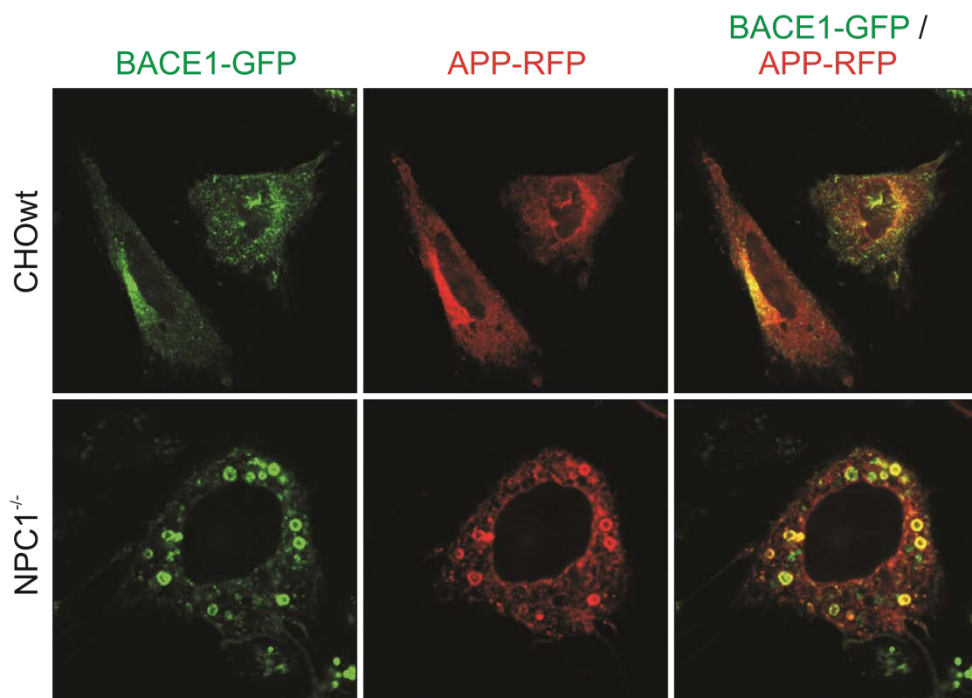


Slika 5.19. Analiza recikliranja proteina APP na staničnu membranu u stanicama CHO_{wt} i CHO-NPC1^{-/-}. Žive, nepermeabilizirane stanice smo inkubirali s primarnim protutijelom koje se specifično veže na vanstanični N-terminus proteina APP (APP-NT: 5313) na površini stanice pri 37°C, 20 min kako bismo omogućili njihovu internalizaciju. Stanice smo zatim isprali, te inkubirali u uobičajenom mediju za rast 30 odnosno 60 min pri 37°C kako bismo pratili recikliranje internaliziranog obilježenog proteina APP na površinu stanice.

5.3.6. U stanicama CHO-NPC1^{-/-} dolazi do kolokalizacije proteina APP s enzimom β -sekretaza (BACE1) u velikim vezikulama

Amiloidgeno cijepanje proteina APP β -sekretazom (BACE1, eng. *β -site APP Cleaving Enzyme*) se dominantno odvija u endosomima nakon internalizacije proteina APP s površine stanice (Koo & Squazzo, 1994.). Nakupljanje proteina APP u ranim i reciklirajućim endosomima stanica CHO-NPC1^{-/-} kao posljedica njegove pojačane internalizacije i smanjenog recikliranja na površinu stanice može rezultirati većom dostupnošću supstrata, proteina APP, enzimu β -sekretazi te uzrokovati njegovu povećanu amiloidogenu razgradnju i nastanak peptida A β . Zato smo analizirali kolokalizaciju proteina APP i BACE1 u stanicama CHO_{wt} i CHO-NPC1^{-/-} (Slika 5.20.). Stanice CHO_{wt} i CHO-NPC1^{-/-} koje stabilno eksprimiraju rekombinantni protein BACE1-GFP smo prolazno transfecirali s konstruktom koji kodira rekombinantni protein APP_{wt}-RFP. Protein BACE1 je fuzioniran s zelenim fluorescentnim proteinom GFP (od eng. *Green Fluorescent Protein*), a APP_{wt} s crvenim

fluorescentnim proteinom RFP (od eng. *Red Fluorescent Protein*) što nam je omogućilo analizu kolokalizacije tih fluorokromima obilježenih proteina u stanici konfokalnom mikroskopijom. U stanicama *CHO-NPCI^{-/-}* smo odmah uočili velike vezikule pozitivne na oba proteina, što je potvrdilo našu pretpostavku da se protein APP nakuplja u vezikulama u kojima se nalazi BACE1 i u kojima dolazi do njegovog amiloidnog cijepanja (Slika 5.20.). Kako i u stanicama *CHO^{wt}* dolazi do kolokalizacije proteina APP i BACE1 (Slika 5.20.), zaključili smo da upravo nakupljanje proteina APP u endosomima ima presudnu ulogu u povećanom amiloidogenom cijepanju i nastanku peptida A β u stanicama *CHO-NPCI^{-/-}*.

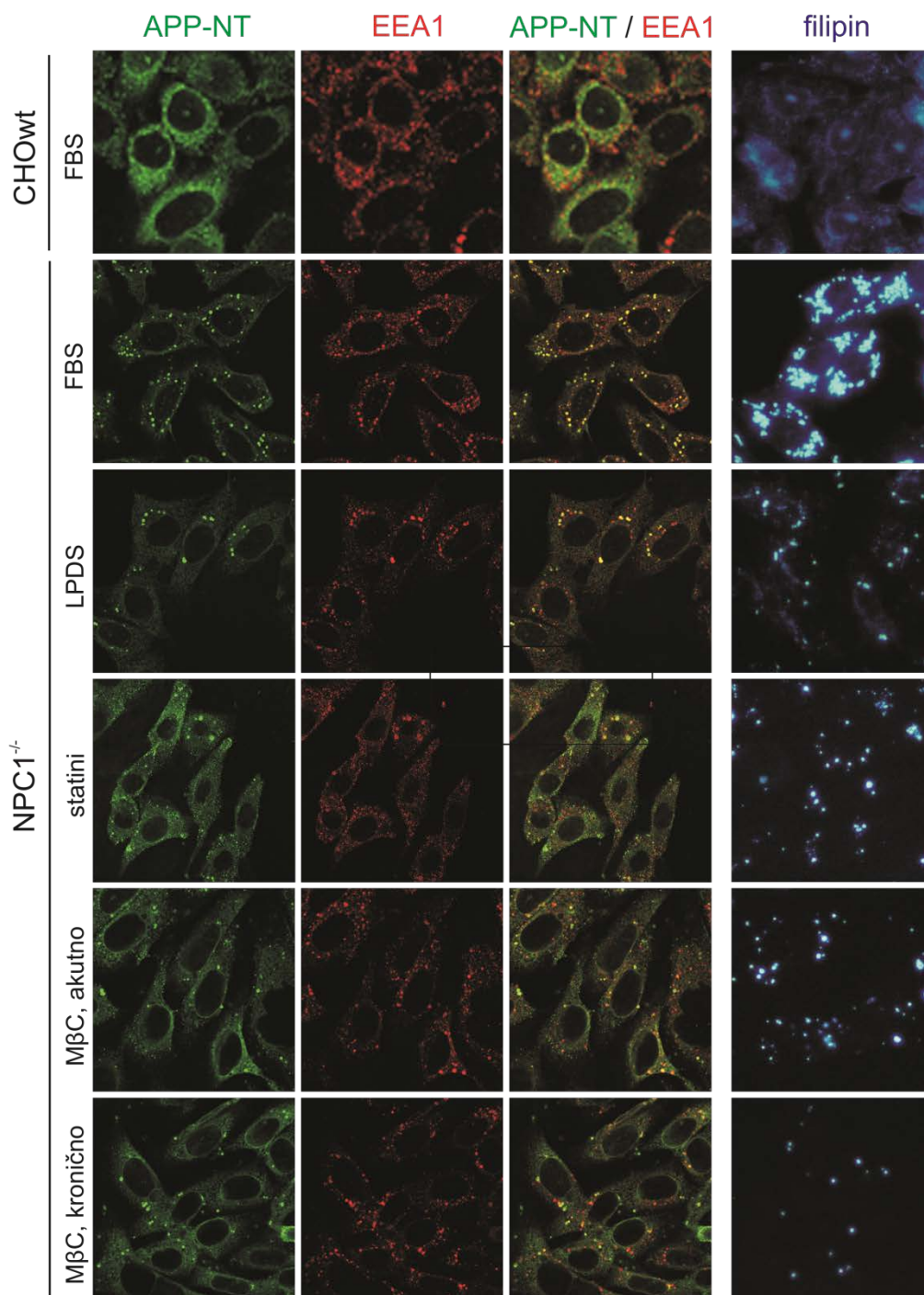


Slika 5.20. Analiza kolokalizacije proteina APP i BACE1 (β -sekretaze) u stanicama *CHO^{wt}* i *CHO-NPCI^{-/-}* koje stabilno ekspimiraju protein BACE1-GFP. Stanice smo prolazno transfecirali s konstruktom *APP-RFP* te smo pratili kolokalizaciju ta dva fluorokromima obilježena proteina u stanici.

5.3.7. Promjene u transportu i smještaju proteina APP su posljedica nakupljanja kolesterola u stanicama CHO-NPCI^{-/-}

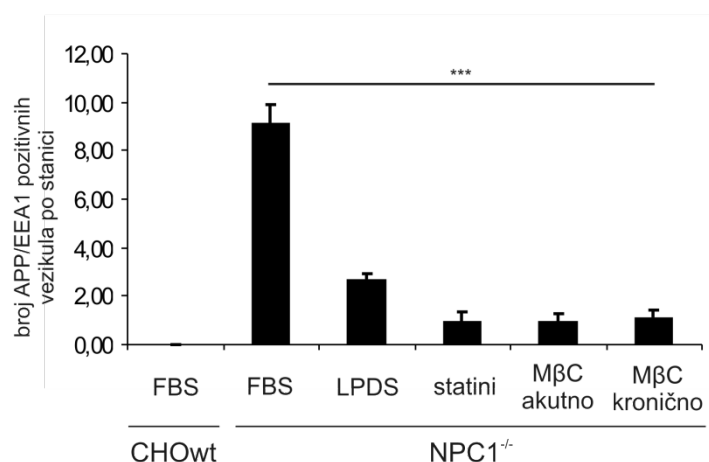
Pokazali smo da su povećano amiloidogeno cijepanje proteina APP i njegova smanjena ekspresija na staničnoj membrani u stanicama CHO-NPCI^{-/-} ovisne upravo o nakupljanju kolesterola u tim stanicama. Zato smo pretpostavili da je nakupljanje proteina APP u endosomima stanica CHO-NPCI^{-/-} također posljedica nakupljanja kolesterola. Kako bismo ispitali tu hipotezu, analizirali smo smještaj proteina APP u ranim endosomima u netretiranim stanicama i nakon različitih tretmana s ciljem snižavanja razine kolesterola u stanicama CHO-NPCI^{-/-}.

Uz prije korištenu strategiju deplecije kolesterola uzgojem stanica CHO-NPCI^{-/-} bez egzogenih lipida u mediju sa serumom LPDS, stanice smo još dodatno tretirali statinima, inhibitorima endogene sinteze kolesterola ili spojem metil- β -ciklodekstrin (M β C, Sigma-Aldrich, SAD) koji „izvlači“ kolesterol iz stanica. Ovi različiti tretmani deplecije kolesterola su detaljno opisani u poglavlju 4.3. Materijala i metoda. Ukratko, stanice CHO-NPCI^{-/-} smo uzgajali 48 sati u mediju sa serumom LPDS („LPDS“ tretman) ili u istom LPDS mediju uz dodatak statina („statin“ tretman). Također, stanice CHO-NPCI^{-/-} smo tretirali spojem M β C: 10 mM, 1 h („akutno“) ili 1 mM, 24 h („kronično“) u mediju sa serumom LPDS. Učinkovitost spuštavanja razine kolesterola svakog pojedinog tretmana smo pratili bojanjem stanica filipinom (Sigma-Aldrich, SAD). Dok je uzgoj stanica CHO-NPCI^{-/-} u mediju bez egzogenih lipida (LPDS), očekivano uzrokovao depleciju kolesterola u kasnim endosomima/lizosomima stanica CHO-NPCI^{-/-} kao i u prijašnjim pokusima (Slika 5.8.), primjetili smo da dodatni tretman statinima ili spojem M β C, bilo akutno bilo kronično, isto ima značajan efekt na snižavanje razine kolesterola u stanicama CHO-NPCI^{-/-} (Slika 5.21.).



Slika 5.21. Analiza utjecaja snižavanja količine kolesterola na smještaj proteina APP u stanicama CHO-*NPC1*^{-/-} koje stabilno ekspimiraju protein HA-SEAP-APPwt. Nakupljanje kolesterola u stanicama CHO-*NPC1*^{-/-} snizili smo uzgojem stanica bez egzogenih lipida (serum LPDS) ili tretmanom statinima odnosno metil-β-ciklodekstrinom. Stanice smo zatim fiksirali i obilježili protutijelima specifičnim za N-terminus proteina APP (APP-NT: 5313) i za marker ranih endosoma, EEA1. Uspješnost sniženja količine kolesterola u stanicama smo pratili filipinom (Sigma-Aldrich, SAD).

Analiza APP/EEA1 pozitivnih vezikula u stanicama CHO $_{wt}$, te stanicama CHO- $NPC1^{-/-}$ sa i bez tretmana otkrila je da svi tretmani snižavanja kolesterola u stanicama CHO- $NPC1^{-/-}$ uzrokuju smanjenje broja odnosno gotovo potpuni nestanak takvih vezikula (Slika 5.22.). Dapače, tretman statinima ili spojem M β C, doveli su i do gotovo potpunog nestanka APP/EEA1 pozitivnih vezikula, za razliku od uzgoja stanica CHO- $NPC1^{-/-}$ samo u mediju bez egzogenih lipida (LPDS) koji je uzrokovao značajno smanjenje broja, no ne i potpun nestanak tih vezikula (Slike 5.21. i 5.22.). Osim toga, tretman stanica CHO- $NPC1^{-/-}$ statinima ili spojem M β C dao je APP/EEA1 obojanje slično onom u stanicama CHO $_{wt}$. Ovim smo pokusom dokazali da je nakupljanje proteina APP u ranim endosomima u stanicama CHO- $NPC1^{-/-}$ posljedica nakupljanja kolesterola u kasnim endosomima/lizosomima te da smo u uvjetima nedostatka proteina NPC1 i deplecije kolesterola uspjeli „popraviti“ smještaj proteina APP u stanicama CHO- $NPC1^{-/-}$ na razinu smještaja u stanicama CHO $_{wt}$. Ovaj rezultat također ukazuje da je povećano amiloidogeno cijepanje proteina APP u stanicama CHO- $NPC1^{-/-}$ posljedica promjena u njegovom unutarstaničnom transportu tj. smještaju.

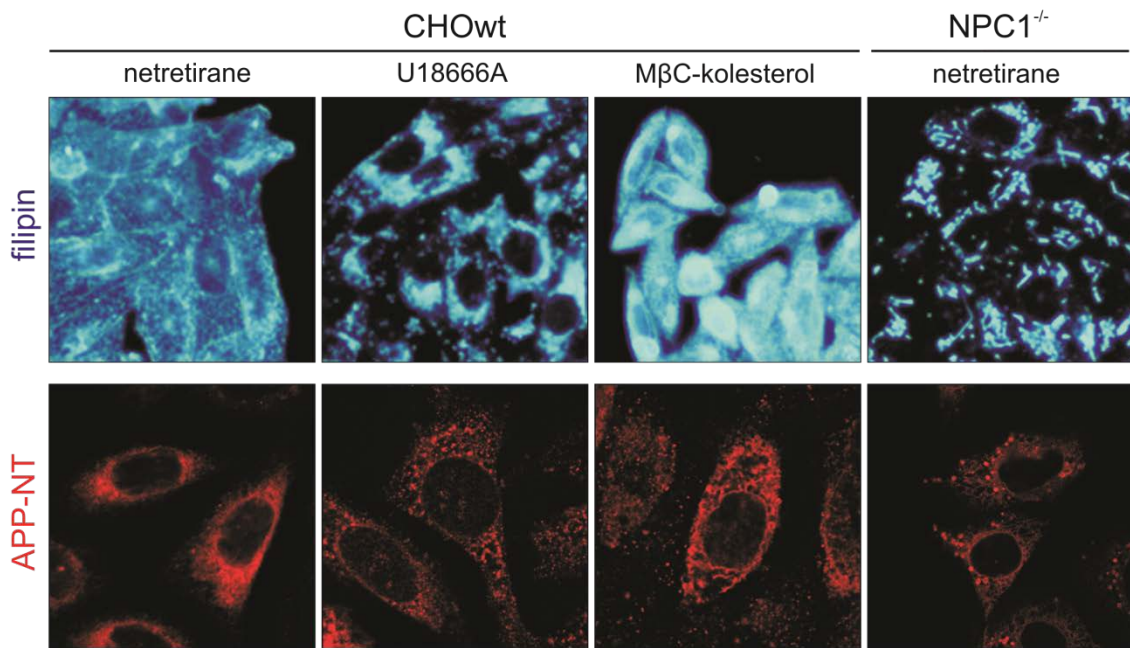


Slika 5.22. Kvantifikacija rezultata imunocitokemijske analize sniženja razine kolesterola na smještaj proteina APP u ranim endosomima. Utjecaj sniženja kolesterola na smještaj proteina APP u ranim endosomima u stanicama CHO- $NPC1^{-/-}$ smo kvantificirali brojanjem APP/EEA1 pozitivnih vezikula po stanici (n=20) nakon navedenih tretmana.

5.3.8. Nakupljanje kolesterola u stanicama CHO_{wt} uzrokuje promjene u smještaju proteina APP

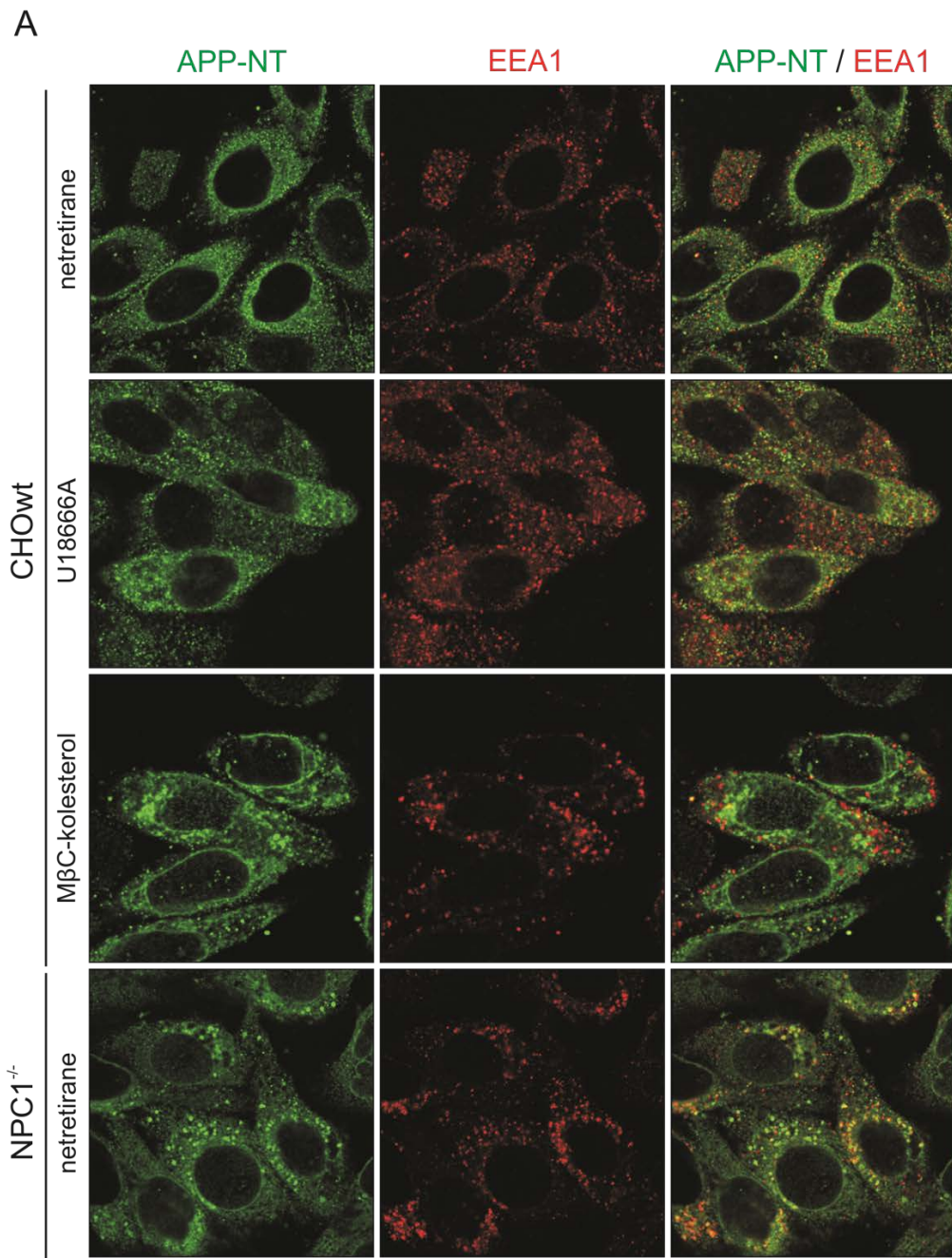
Tretmanima stanica CHO_{wt} koji uzrokuju povišenu razinu unutarstaničnog kolesterola željeli smo dokazati da nakupljanje kolesterola može uzrokovati promjene u smještaju proteina APP i u stanicama divljeg tipa (*wt*), tj. u prisustvu proteina NPC1. Kako bismo povisili razinu kolesterola u stanicama CHO_{wt} upotrijebili smo dvije strategije: stanice CHO_{wt} smo tretirali sa spojem U18666A (Sigma-Aldrich, SAD) koji se koristi za oponašanje fenotipa NPC ili smo stanice CHO_{wt} tretirali s kolesterolom konjugiranim sa spojem MβC (MβC-kolesterol, Sigma-Aldrich, SAD) koji nesmetano ulazi u stanicu gdje uzrokuje povećanje razine kolesterola. Detaljni opisi navedenih tretmana su navedeni u poglavlju 4.3. Materijala i metoda. Učinkovitost oba tretmana smo pratili bojanjem stanica filipinom (Sigma-Aldrich, SAD). Dok je U-tretman u stanicama CHO_{wt} uzrokovao vezikularno unutarstanično nakupljanje kolesterola nalik onome u stanicama CHO-NPC1^{-/-}, tretman stanica s kompleksom MβC-kolesterola uzrokovao je izraženo povećanje signala filipina po cijeloj stanici (Slika 5.23.). Ovakav rezultat je očekivan, jer se smatra da spoj U18666A inhibira funkciju proteina NPC1 te time uzrokuje nakupljanje slobodnog kolesterola u kasnim endosomima/lizosomima dok tretman stanica s MβC-kolesterolom, koje imaju funkcionalan protein NPC1, uzrokuje povećanje razine kolesterola u cijeloj stanici.

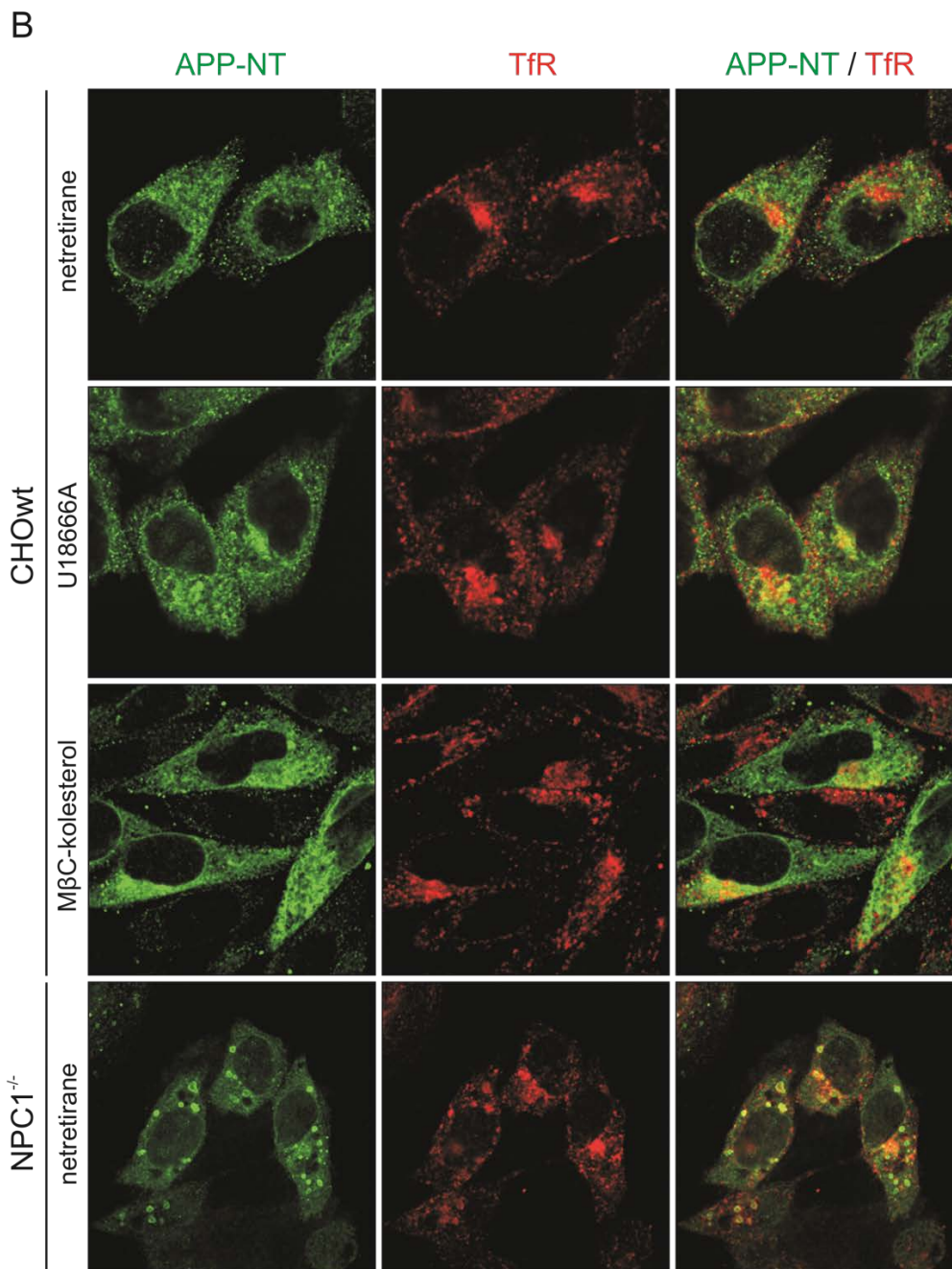
Smještaj proteina APP u tretiranim stanicama CHO_{wt} i netretiranim stanicama CHO_{wt} i CHO-NPC1^{-/-} koje stabilno eksprimiraju protein HA-SEAP-APP_{wt} pratili smo kao i dosada imunocitokemijom i analizirali konfokalnom mikroskopijom. Nakupljanje kolesterola u kasnim endosomima / lizosomima stanica CHO_{wt} uzrokovano U-tretmanom, kao i povećanje razine unutarstaničnog kolesterola MβC-kolesterolom dovelo je do promjene u smještaju proteina APP u stanicama CHO_{wt} u odnosu na netretirane stanice. Naime, dok je obilježavanje proteina APP u netretiranim stanicama CHO_{wt} očekivano dalo dominantno perinuklearan homogen signal bez izraženih nakupina, u tretiranim stanicama smo mogli primjetiti da dolazi do vezikularnog nakupljanja proteina APP, koje je bilo slično onome u stanicama CHO-NPC1^{-/-} (Slika 5.23.).



Slika 5.23. Analiza nakupljanja slobodnog kolesterola i smještaja proteina APP u stanicama CHO^{wt} nakon tretmana sa spojem U18666A i kompleksom MβC-kolesterol. Slobodni neesterificirani kolesterol u stanicama smo obilježili filipinom (Sigma-Aldrich, SAD) i analizirali epifluorescentnim mikroskopom. Stanice koje stabilno eksprimiraju protein HA-SEAP-APP^{wt} smo obilježili protutijelom specifičnim za N-terminus proteina APP (APP-NT: anti-HA) i analizirali konfokalnim mikroskopom.

Dodatno, analizirali smo kolokalizaciju proteina APP s proteinom EEA1 i receptorom transferina (TfR) te uočili pojačanu vezikularnu kolokalizaciju proteina APP s tim markerima ranih i reciklirajućih endosoma nakon U18666A-, odnosno MbC-kolesterol-tretmana stanica CHO^{wt} (Slika 5.24. A i B). Ovaj rezultat pokazuje da nakupljanje kolesterola u stanicama CHO^{wt} može uzrokovati promjene u smještaju proteina APP u endocitoznom putu slične onima koje smo pokazali u stanicama CHO-NPC1^{-/-}. To dokazuje da povišene razine kolesterola, uzrokovane bilo disfunkcijom proteina NPC1 bilo dizanjem razine unutarstaničnog kolesterola tretmanom s MβC-kolesterolom mogu utjecati na smještaj tj. endocitozu proteina APP.





Slika 5.24. Analiza utjecaja povišene razine kolesterola u stanicama CHOwt na smještaj proteina APP u endocitoznom putu. Stanice CHOwt smo tretirali spojem U18666A i kompleksom MβC-kolesterol kako bismo potaknuli nakupljanje tj. povišenje razine kolesterola u njima. Zatim smo fiksirane i permeabilizirane stanice obilježili protutijelom specifičnim za N-terminus proteina HA-SEAP-APPwt (APP-NT: 5313) i protutijelom za: (A) EEA1 (marker ranih endosoma) i (B) receptor transferina (TfR, marker reciklirajućih endosoma).

6. RASPRAVA

Nakupljanje peptida amiloid- β ($A\beta$) predstavlja središnji događaj u patogenezi Alzheimerove bolesti. Peptid $A\beta$ nastaje amiloidogenim cijepanjem proteina prekursora peptida amiloid- β (protein APP) β -sekretaznim putem koji se primarno odvija u endosomima (Koo & Squazzo, 1994.), dok se neamiloidogeni α -sekretazni put proteolitičkog cijepanja proteina APP odvija na površini stanice (Sisodia i sur., 1990.; Parvathy i sur., 1999.). Iako molekularni pokretači amiloidogenog / neamiloidogenog puta razgradnje proteina APP još uvijek nisu poznati, pretpostavlja se da regulacija staničnog transporta proteina APP može imati važnu ulogu u ovim procesima. Brojna istraživanja su ukazala na povezanost kolesterola, razine peptida $A\beta$ i nastanka Alzheimerove bolesti. Međutim, molekularni mehanizam/i ovih događaja još uvijek nisu razjašnjeni. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati mehanizam djelovanja kolesterola na nakupljanje peptida $A\beta$ i cijepanje te transport proteina APP. Pri tom smo koristili stanični model bolesti Niemann-Pick tipa C (NPC), nasljedne neurodegenerativne bolesti nakupljanja kolesterola kod koje dolazi do povećane razine peptida $A\beta$, slično kao u Alzheimerovoj bolesti. Ovim istraživanjem smo pokazali da povišena razina kolesterola na indirektan način modulira stvaranje peptida $A\beta$ uzrokujući nakupljanje proteina APP u endosomima te na taj način potičući amiloidogeni put cijepanja proteina APP enzimom β -sekretaza.

6.1. Stanični model

U ovom smo istraživanju koristili staničnu liniju CHO (od eng. *Chinese Hamster Ovary*) kojoj je deletiran gen za protein NPC1 (*CHO-NPC1^{-/-}*), te parentalnu staničnu liniju CHO divljeg tipa (*CHO^{wt}*). Stanične procese vezane uz protein APP moguće je promatrati i u stanicama koje nisu nužno neuronskog, pa niti humanog porijekla. Naime, protein APP je ubikvitarno eksprimiran, te ima ortologe u različitim vrstama, uključujući tipične eksperimentalne modele poput miša, štakora, ribe zebrice, vinske mušice i crva *C. elegans*. Štoviše, peptid $A\beta$ je produkt uobičajenog metabolizma svake stanice (Haass, Schlossmacher, i sur., 1992.). Tako je i u stanicama CHO protein APP endogeno eksprimiran, kao i sekretaze koje sudjeluju u njegovom cijepanju. Dapače, većina istraživanja cijepanja proteina APP, te njegovog staničnog smještaja je napravljena na ne-neuronskim stanicama poput HEK293 ili CHO. Razlog tome leži u činjenici da su ovakve imortalizirane stanične linije puno

jednostavnije za uzgoj i rad od neurona čije su kulture zahtjevnije i kratkotrajne. Naime, rad s neuronima podrazumijeva uvijek iznova pre/postnatalno izoliranu primarnu kulturu iz animalnih modela, najčešće miša ili štakora, što je skuplje, te iziskuje više vremena i specifičnu vještinu istraživača. Ipak, nakupljanje peptida A β vodi ka dominantno neurodegenerativnim promjenama, a neuroni su morfološki i fiziološki visoko specijalizirane stanice. Zato je ipak poželjno, ako ne i nužno, rezultate o staničnim procesima uključenim u patogenezu Alzheimerove bolesti potvrditi na primarnim kulturama neurona, te naposljetku *in vivo* da bi se potvrdila biološka i fiziološka značajnost otkrivenih promjena i mehanizama.

Niemann-Pickova bolest tip C je nasljedni autosomno recesivni poremećaj kod kojeg nedostatak funkcionalnog proteina NPC1/2 uzrokuje nakupljanje slobodnog kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima. Više od 90% slučajeva bolesti NPC uzrokovano je mutacijama u genu *NPC1* (Vanier, 2010.). Kod ljudi oboljelih od ove bolesti primjećene su različite razine ekspresije proteina NPC1, od potpunog nedostatka proteina do ekspresije slične onoj u zdravih kontrola, ovisno o tipu mutacije koju nose (Yamamoto i sur., 2000.). U stanicama CHO-*NPC1*^{-/-}, korištenim u ovom istraživanju, nema ekspresije proteina NPC1 što smo pokazali analizom staničnog lizata metodom *Western blot* (Slika 5.1. A). Nadalje, bojanjem filipinom smo utvrdili da u stanicama CHO-*NPC1*^{-/-} dolazi do vezikularnog nakupljanja slobodnog kolesterola kao što je dokumentirano u primarnim fibroblastima izoliranim biopsijom kože pacijenata oboljelih od bolesti NPC (Pentchev i sur., 1985.). Stabilna ekspresija proteina NPC1 u stanicama CHO-*NPC1*^{-/-} (stanice CHO-*NPC1*^{-/-}+*NPC1*) sprečava nakupljanje kolesterola čime smo dokazali da je ono u ovim stanicama zaista uzrokovano nedostatkom proteina NPC1 (Slika 5.1. C). Ovim preliminarnim analizama smo pokazali da stanični model CHO-*NPC1*^{-/-} posjeduje glavne karakteristike bolesti NPC.

6.2. Nakupljanje peptida A β u stanicama CHO-*NPC1*^{-/-} uzrokovano je povećanim amiloidogenim cijepanjem proteina APP β -sekretazom

U bolesti Niemann-Pick tipa C uz nakupljanje kolesterola dolazi i do izražene taupatologije, neurodegeneracije te nakupljanja peptida A β , glavnih patoloških obilježja Alzheimerove bolesti. Kako su mnoga istraživanja već prije pokazala utjecaj kolesterola na nakupljanje peptida A β , bolest Niemann-Pick tipa C postala je važnim modelom za proučavanje veze između kolesterola, proteina APP i nastanka peptida A β . U ovom radu smo pokazali da, osim što u stanicama NPC dolazi do nakupljanja kolesterola uslijed nedostatka funkcionalnog proteina NPC1, dolazi i do nakupljanja peptida A β , te odsječaka CTF β u

odnosu na stanice CHO_{wt}. Time smo potvrdili nalaze prijašnjih istraživanja u različitim *in vitro* i *in vivo* modelima bolesti NPC koja su također pokazala povećanu razinu peptida A β i odsječka CTF β (Yamazaki i sur., 2001.; Burns i sur., 2003.; Jin i sur. 2004.; Kodam i sur., 2010.). Međutim, razlog povećane razine peptida A β kao i odsječka CTF β u uvjetima nakupljanja kolesterola uslijed nedostatka funkcionalnog proteina NPC1 do sada nije bio poznat. Stoga smo detaljnom analizom produkata proteolitičke razgradnje proteina APP u stanicama CHO-NPC1^{-/-} u odnosu na stanice CHO_{wt} u ovom radu željeli utvrditi koji je od procesa cijepanja proteina APP α -, β - i/ili γ -sekretazom promijenjen uslijed nakupljanja kolesterola.

Naime prije desetak godina, Yamazaki i suradnici (2001) su postavili hipotezu da nakupljanje kolesterola u stanicama NPC može dovesti do promjena u metabolizmu peptida A β . Tretirali su stanice CHO i HEK293 amfifilnim spojem U18666A, koji uzrokuje fenotip NPC (Lange i sur., 2000.), te su također koristili stanice CHO koje imaju mutirani oblik proteina NPC1. U takvim su stanicama, te dodatno u mozgu mišjeg modela bolesti NPC, prvi pokazali da nakupljanje kolesterola uslijed nedostatka funkcionalnog proteina NPC1 dovodi do nakupljanja unutarstaničnog peptida A β , i to dominantno peptida A β 42 u agregiranom obliku (ekstrahiranom u mravljoj kiselini). Nedugo nakon tog otkrića, Burns i suradnici (2003) su potvrdili da kod mišjeg modela bolesti NPC dolazi do nakupljanja peptida A β u mozgu, ali njegove topljive forme i to kako peptida A β 42, tako i A β 40. Dodatno su utvrdili da uz nakupljanje peptida A β , dolazi i do nakupljanja odsječaka CTF β . U primarnoj kulturi neurona tretiranoj spojem U18666A također dolazi do nakupljanja produkata amiloidogenog cijepanja proteina APP, CTF β i A β (Jin i sur., 2004.). Značajno, Jin i suradnici (2004) su uočili nakupljanje peptida A β i odsječaka CTF u mozgu pacijenata oboljelih od bolesti NPC te time potvrdili patološku relevantnost pronađenih promjena u bolesti NPC.

Za razliku od prijašnjih istraživanja koja su koristila stanice tretirane spojem U18666A ili koje su imale mutirani oblik proteina NPC1, odnosno mišje modele s *null* mutacijom, mi smo u ovom istraživanju koristili staničnu liniju CHO u kojoj je deletiran gen NPC1. Pokazali smo da u stanicama CHO-NPC1^{-/-} nedostatak proteina NPC1 uzrokuje nakupljanje peptida A β 40 unutar stanice, i to njegovog topljivog (otopljenog u puferu RIPA koji sadrži SDS), kao i agregiranog oblika (ekstrahiranog u mravljoj kiselini). Razina unutarstaničnog peptida A β 42 je bila ispod praga detekcije korištenog komercijalnog kompleta za ELISA-u. Naši rezultati pokazuju da je u stanicama CHO-NPC1^{-/-} nakupljanje agregiranog oblika A β 40 izraženije nego nakupljanje njegovog topljivog oblika (Slika 5.5.). Za razliku od unutarstaničnog A β , razina izlučenog peptida A β 40 u mediju stanica CHO-NPC1^{-/-} nije bila promjenjena u odnosu

na stanice CHO^{wt} (Slika 5.5.), što je u skladu s rezultatima Yamazaki i suradnika (2001). Kao i u prije opisanim modelima bolesti NPC, pokazali smo da u stanicama CHO-NPC1^{-/-}, osim A β , dolazi i do nakupljanja odsječaka CTF β (Slike 5.3. A; 5.4. A). Sva ova istraživanja, uključujući i naše, pokazuju da nedostatak funkcionalnog proteina NPC1 uzrokuje nakupljanje peptida A β i odsječka CTF β unutar stanice, a navedene razlike u vrsti (A β 40/42) i agregiranosti nakupljenog peptida A β mogu biti posljedica različitosti korištenih modela bolesti NPC.

Nakupljanje peptida A β u bolesti NPC može biti posljedica njegove povećane proizvodnje i/ili smanjenog uklanjanja. Cijepanje proteina APP β -sekretaznim putem predstavlja ključni događaj u nastanku peptida A β koji se ili izlučuju iz stanice ili razgrađuju u lizosomima (Haass, Koo i sur., 1992.). Upravo neravnoteža između proizvodnje i uklanjanja peptida A β se smatra primarnim događajem koji dovodi do njegovog nakupljanja u mozgu i do nastanka Alzheimerove bolesti. Uz nakupljanje odsječka CTF β , u ovom smo istraživanju pokazali i povišenu razinu N-terminalnog fragmenta sAPP β u mediju stanica CHO-NPC1^{-/-} u odnosu na stanice CHO^{wt} (Slika 5.3. C; 5.4. B). CTF β i sAPP β su neposredni produkti cijepanja proteina APP β -sekretazom, te ovaj rezultat upućuje da u stanicama CHO-NPC1^{-/-} dolazi do povećanog cijepanja proteina APP β -sekretazom.

Peptid A β nastaje izrezivanjem iz odsječka CTF β γ -sekretazom (Slika 3.2.). Pokazano je da kolesterol može utjecati na aktivnost sekretaza (Bodovitz & Klein, 1996.; Wahrle i sur., 2002.; Wada i sur., 2003.; Kalvodova i sur., 2005.; Osenkowski i sur., 2008.). Dapače, Runz i suradnici (2002) su pokazali da u stanicama CHO s mutiranim proteinom NPC1 ili neuronima tretiranim sa spojem U18666A dolazi do promjena u aktivnosti β - i γ -sekretaze koje mogu utjecati na razinu peptida A β u tim stanicama. Nedavno su Mattsson i suradnici (2010) pronašli povišenu razinu peptida A β , no ne i sAPP β , u likvoru osoba oboljelih od bolesti Niemann-Pick tipa C te pretpostavili da je povišena razina peptida A β u bolesti NPC posljedica povišene aktivnosti γ -sekretaze. Štoviše, čini se da je aktivnost γ -sekretaze povišena u mozgu mišjeg modela bolesti NPC (Burns i sur., 2003.). Kako bismo provjerili je li nakupljanje peptida A β 40 posljedica povećanog cijepanja odsječka CTF β γ -sekretazom, stanice CHO smo prolazno transfecirali s konstruktom CTF β -6myc koji kodira fragment CTF β – direktni supstrat γ -sekretaze. Kako smo nakupljanje peptida A β 40 uočili u stanicama koje prolazno eksprimiraju protein APP (Slika 5.5.), no ne i u stanicama koje prolazno eksprimiraju fragment CTF β (Slika 5.6.), zaključili smo da povišena razina peptida A β 40 u stanicama CHO-NPC1^{-/-} nije posljedica povećanog cijepanja proteina APP γ -sekretazom. Dodatno, mjerenjem aktivnosti γ -sekretaze u staničnim lizatima pomoću komercijalnog

kompleta (R&D Systems, SAD) pokazali smo da u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-} nije izmijenjena katalitička aktivnost γ -sekretaze u odnosu na stanice CHO^{wt} (Slika 5.7. A). Naprečac, mogli bi zaključiti da promjene u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-} nisu u skladu s nalazom povišene aktivnosti γ -sekretaze u *in vivo* modelu bolesti NPC (Burns i sur., 2003.). No, povišena aktivnost enzima γ -sekretaze uslijed nedostatka funkcionalnog proteina NPC1 donekle je u sukobu s činjenicom da je u modelima bolesti NPC pokazano nakupljanje njenog supstrata - odsječka CTF β . Burns i suradnici (Burns i sur., 2003.) su u tom istraživanju koristili pufer za lizu koji sadrži detergent CHAPSO, a za koji je kasnije pokazano da može narušiti lipidni profil okruženja i tako utjecati na aktivnost γ -sekretaze (Osenkowski i sur., 2008.) što može objasniti njihov nalaz o promijenjenoj aktivnosti γ -sekretaze. Kako pufer koji smo mi koristili prilikom određivanja aktivnosti γ -sekretaze kompletima R&D također sadrži CHAPSO, mi smo aktivnost γ -sekretaze u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-} dodatno provjerili određivanjem *in vitro* proizvodnje produkata γ -sekretaze u suspenziji staničnih membrana (Slika 5.7. B) gdje smo koristili citratni pufer (150 mM natrijev citrat, pH 6.4) koji ne sadrži detergent CHAPSO (detaljnije opisano u poglavlju 4.8.1. Materijala i metoda). Ovim pokusom smo potvrdili da u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-} aktivnost γ -sekretaze nije povišena.

Nedostatak nakupljanja peptida A β u stanicama koje prolazno eksprimiraju odsječak CTF β (Slika 5.6.), za razliku od stanica koje prolazno eksprimiraju protein APP (Slika 5.5.) također ukazuje da povišena razina peptida A β u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-} nije posljedica njegove smanjene razgradnje. Naime, prijašnja istraživanja su pokazala da u staničnim modelima bolesti NPC degradacija u lizosomima nije kompromitirana nakupljanjem lipida (Liscum & Faust, 1989.; Cadigan i sur., 1990.; Cruz i sur., 2000.). Također, poznato je da hidrofobni peptidi A β mogu doći u direktnu interakciju s lipidima - u amiloidnim plakovima osim peptida A β nakupljaju se i različiti lipidi. Yamazaki i suradnici (2001) su zato pretpostavili da do nakupljanja peptida A β dolazi zbog vezanja peptida A β na nakupljene lipide u stanici. Isto to može vrijediti i za odsječke CTF β . No ovim smo pokusom također pokazali da nakupljanje kolesterola *per se* nije odgovorno za nakupljanje peptida A β i/ili odsječka CTF β u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-}. Iako naši rezultati ukazuju da je povišena razina unutarstaničnog A β /CTF u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-} prvenstveno posljedica njihove povećane proizvodnje cijepanjem proteina APP β -sekretazom, ne možemo, međutim, potpuno isključiti mogućnost da je nakupljanje A β / CTF u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-} posljedica njihove smanjene degradacije u lizosomima. Dodatna istraživanja su nužna da se potpuno razjasni ova mogućnost. Nedavno su Tamboli i suradnici (2011) pokazali da do nakupljanja odsječaka CTF u različitim lizosomskim bolestima nakupljanja lipida, uključujući bolest NPC,

vjerojatno dolazi zbog usporednog učinka njihove povećane proizvodnje i smanjene razgradnje u autofagosomima.

Povišena razina odsječka CTF β i N-terminalnog fragmenta sAPP β može biti posljedica povećane aktivnosti enzima β -sekretaze. Štoviše, u ovom smo istraživanju također pokazali sniženu razinu sAPP α u stanicama CHO-NPCI^{-/-} u odnosu na stanice CHO^{wt} (Slika 5.4. B) koja može biti uzrokovana sniženom aktivnošću α -sekretaze. Naime, povišena razina kolesterola može utjecati na aktivnost α -sekretaze uzrokujući smanjenu proizvodnju sAPP (Bodovitz & Klein, 1996.), te može stimulirati proteolitičku aktivnost β -sekretaze (Kalvodova i sur., 2005.). No, mjerenjem aktivnosti α - i β -sekretaze u staničnim lizatima pomoću komercijalnog kompleta (R&D Systems, SAD), pokazali smo da u stanicama CHO-NPCI^{-/-} nije izmijenjena njihova katalitička aktivnost u odnosu na stanice CHO^{wt} (Slika 5.7. A). Dakle promjene u cijepanju proteina APP u stanicama CHO-NPCI^{-/-} u odnosu na stanice CHO^{wt} nisu posljedica povišenih katalitičkih aktivnosti β - i/ili γ -sekretaze, niti snižene aktivnosti α -sekretaze.

Ovim smo analizama pokazali da nakupljanje peptida A β u stanicama CHO-NPCI^{-/-} nije uzrokovano njegovim smanjenim uklanjanjem, niti promjenama u aktivnosti sekretaza, već je posljedica njegove povećane proizvodnje zbog povećanog amiloidogenog cijepanja proteina APP β -sekretazom.

6.3. Povećano amiloidogeno cijepanje proteina APP u stanicama CHO-NPC1^{-/-} je posljedica promjenjenog smještaja / transporta proteina APP

Povećano amiloidogeno cijepanje proteina APP može biti posljedica promjena u njegovom staničnom smještaju tj. transportu. Naime, pojedina istraživanja predlažu da se amiloidogeno cijepanje proteina APP događa u kolesterolom bogatim membranskim domenama, lipidnim splavima (Vetrivel & Thinakaran, 2010.). Također, čini se da razina kolesterola može utjecati na smještaj proteina APP u tim domenama (Simons i sur., 1998.). Našim ranijim rezultatima smo pokazali da u stanicama CHO-NPCI^{-/-} dolazi do povećanog smještaja proteina APP u lipidnim splavima (Košiček i sur., 2010.). No von Arnim i suradnici (2008) su pokazali da APP i BACE1 (β -sekretaza), iako oboje mogu biti prisutni na staničnoj membrani, dolaze u neposrednu blizinu tek unutar stanice u endosomima. Također, BACE1 ima najveću aktivnost u blago kiselim odjeljcima, tj. endosomima (Vassar i sur., 1999.) gdje je pokazano da se primarno odvija cijepanje proteina APP β -sekretazom (Koo & Squazzo,

1994.). Dakle, internalizacija proteina APP sa stanične površine je ključna za njegovo cijepanje β -sekretazom i nastanak peptida A β .

No, Yamazaki i suradnici (2001) su pokazali da internalizacija proteina APP nije potrebna za nakupljanje peptida A β u stanicama tretiranim spojem U18666A. Za razliku od tog rezultata, mi smo u ovom istraživanju pokazali da je internalizacija proteina APP presudna, kako za nastanak peptida A β u stanicama CHO $_{wt}$, tako i za njegovo nakupljanje u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-} (Slika 5.10. A). Štoviše, analizom N-terminalnih fragmenata proteina APP, sAPP β , dodatno smo pokazali da u stanicama koje su prolazno eksprimirale protein APP Δ CT, a koji se ne može internalizirati, ne dolazi do cijepanja proteina APP Δ CT β -sekretazom (u stanicama CHO $_{wt}$ i CHO-*NPCI*^{-/-} nismo detektirali produkt sAPP β – Slika 5.10. B). Ovaj rezultat dodatno potvrđuje da je internalizacija proteina APP nužna za njegovo povećano amiloidogeno cijepanje u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-}. Također smo pokazali da je cijepanje proteina APP Δ CT α -sekretazom povećano u odnosu na cijepanje proteina APP $_{wt}$ u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-}, kao i u stanicama CHO $_{wt}$ (detektirali smo povećanu razinu odsječka sAPP α u stanicama koje eksprimiraju konstrukt APP Δ CT u odnosu na APP $_{wt}$ - Slika 5.10. B). Dakle, naši rezultati su u skladu s već uvriježenim mišljenjem da se cijepanje proteina APP α -sekretazom uglavnom odvija na površini stanice (Sisodia i sur., 1990.; Parvathy i sur., 1999.), dok se cijepanje β -sekretazom primarno odvija u endosomima (Koo & Squazzo, 1994.).

Pošto smo dokazali da je internalizacija proteina APP nužna za nastanak i nakupljanje peptida A β u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-}, pretpostavili smo da je povećano cijepanje proteina APP β -sekretazom u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-} posljedica promjena u njegovom transportu. Naime, protein APP se sa stanične membrane internalizira klatrin-ovisnom endocitozom, a njegova prisutnost u endosomima ovisi o regulaciji endocitoze proteina APP s površine stanice. Cossec i suradnici (2010) su pokazali da razina kolesterola može utjecati na endocitozu proteina APP i time na sekreciju peptida A β . U ovom smo istraživanju pokazali da se na površini stanica CHO-*NPCI*^{-/-} nalazi značajno manje proteina APP u odnosu na stanice CHO $_{wt}$ (Slike 5.11. A i B; 5.12.), te da u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-} dolazi do nakupljanja proteina APP unutar stanice (Slika 5.12.). Dapače, u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-} protein APP se nakuplja u ranim / reciklirajućim endosomima (Slika 5.14. A i B) gdje je kolokaliziran s BACE1 (Slika 5.20.) što je pokazalo da se protein APP nakuplja u vezikulama u kojima se nalazi β -sekretaza i u kojima dolazi do njegovog amiloidnog cijepanja. Kako i u stanicama CHO $_{wt}$ dolazi do kolokalizacije proteina APP i BACE1 (Slika 5.20.), zaključili smo da upravo nakupljanje proteina APP u endosomima ima presudnu ulogu u povećanom amiloidogenom cijepanju i nastanku peptida A β u stanicama CHO-*NPCI*^{-/-}. Zanimljivo,

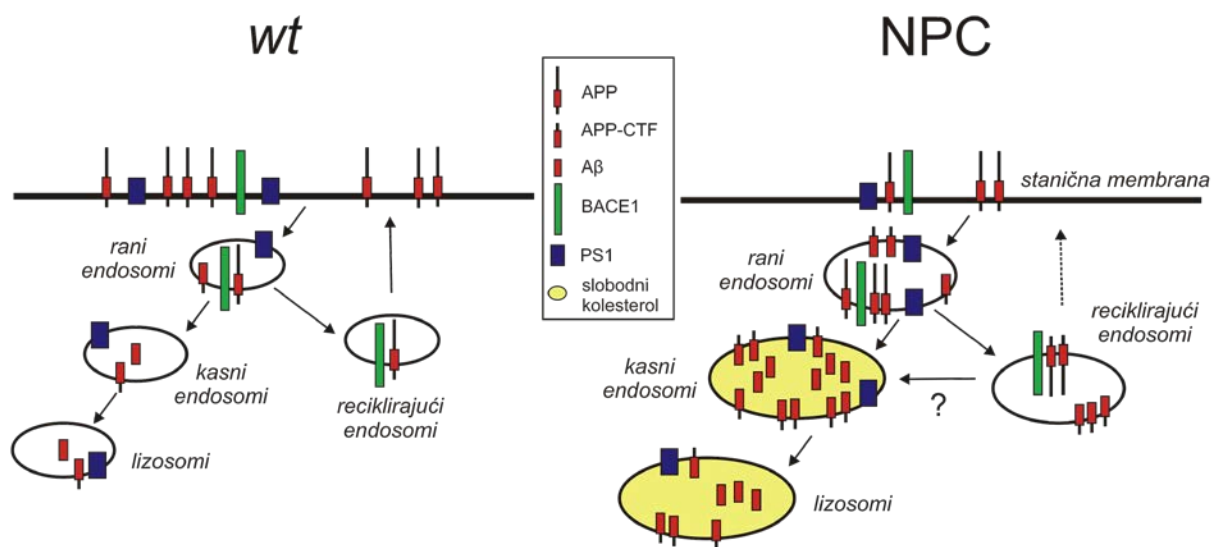
protein APP se ne nakuplja u vezikulama u kojima se nakuplja kolesterol - kasnim endosomima / lizosomima stanica CHO-NPCI^{-/-} (Slike 5.14. C i D; 5.15. A i B).

Nakupljanje proteina APP u ranim / reciklirajućim endosomima može biti posljedica njegove ubrzane internalizacije i/ili smanjenog recikliranja na površinu stanice u stanicama CHO-NPCI^{-/-}. Cossec i suradnici (2010) su pokazali da povišena razina kolesterola uzrokuje povećanu internalizaciju proteina APP. Kod bolesti NPC primjećen je i poremećaj u endocitoznom putu koji uključuje i vezikule koje nisu glavna mjesta nakupljanja lipida, te općenito promijenjen stanični transport membranskih proteina poput CI-MPR (od eng. *Cation-Independent Mannose-6-Phosphate Receptor*) i Rab4 (Puri i sur., 1999.; Choudhury i sur., 2004.). Štoviše, Pipalia i suradnici (2007) su pokazali u staničnom modelu bolesti NPC smanjeno recikliranje receptora transferina na površinu stanice. U skladu s ovim rezultatima, mi smo pokazali da u stanicama CHO-NPCI^{-/-} dolazi do pojačane internalizacije i smanjenog recikliranja proteina APP na površinu stanice koji mogu biti uzrokom njegove smanjene lokalizacije na površini stanice i nakupljanja u ranim / reciklirajućim endosomima stanica CHO-NPCI^{-/-}.

Poremećaj u endocitoznom putu proteina APP u stanicama CHO-NPCI^{-/-} uzrokuje njegovo nakupljanje u ranim / reciklirajućim endosomima, vezikulama optimalne aktivnosti β-sekretaze. Dodatno, pokazali smo da u stanicama CHO-NPCI^{-/-} dolazi do nakupljanja odsječaka CTF u ranim / reciklirajućim endosomima (Slika 5.17. A i B). No za razliku od proteina APP, odsječci CTF se također nakupljaju i u kolesterolom bogatim kasnim endosomima / lizosomima (Slika 5.17 C). Runz i suradnici (2002) su pokazali da u stanicama tretiranim spojem U18666A dolazi do nakupljanja presenilina1 (katalitičke podjedinice γ-sekretaze) u odjeljcima bogatim kolesterolom – kasnim endosomima. Dapače, istraživanja na različitim modelima bolesti NPC su pokazala da se peptidi Aβ, koji nastaju cijepanjem odsječaka CTFβ, nakupljaju u kasnim endosomima (Yamazaki i sur., 2001.; Jin i sur., 2004.). Dakle, naši rezultati analize smještaja proteina APP ukazuju da se cijepanje proteina APP β-sekretazom najvjerojatnije odvija u ranim / reciklirajućim endosomima gdje nastaju fragmenti CTF, koji zatim bivaju prenešeni u kasnije odjeljke tj. kasne endosome/lizosome gdje se dalje razgrađuju γ-sekretazom do peptida Aβ.

Shema na slici 6.1. sumarno prikazuje promjene u transportu proteina APP i sekretaza koje sudjeluju u njegovom cijepanju opisane u ovom i prijašnjim istraživanjima u različitim modelima bolesti NPC (Yamazaki i sur., 2001.; Runz i sur., 2002.; Burns i sur., 2003.; Jin i sur., 2004.). U normalnim uvjetima (*wt*), protein APP je više smješten na površini stanice, a manje u endosomima. Uslijed nedostatka funkcionalnog proteina NPC1, protein APP se brže

internalizira te sporije reciklira natrag na staničnu membranu što uzrokuje njegovo nakupljanje u endosomima i povećano amiloidogeno cijepanje β -sekretazom. Paralelno u stanicama NPC dolazi do smanjene lokalizacije proteina APP na površini stanice, te smanjenog cijepanja α -sekretazom. Nedostatak funkcionalnog proteina NPC1 također uzrokuje nakupljanje presenilina1 (γ -sekretaze) u kasnim endosomima (Runz i sur., 2002.). Fragmente CTF prenešene iz ranih / reciklirajućih endosoma u kasnije odjeljke tj. kasne endosome/lizosome cijepa γ -sekretaza oslobađajući peptide $A\beta$.



Slika 6.1. Shematski prikaz promjena u transportu proteina APP i sekretaza koje sudjeluju u njegovom cijepanju opisanih u ovom i prijašnjim istraživanjima u modelima bolesti NPC (Yamazaki i sur., 2001.; Runz i sur., 2002.; Burns i sur., 2003.; Jin i sur., 2004.).

6.4. Nakupljanje kolesterola u stanicama CHO-NPC1^{-/-} uzrokuje promjene u cijepanju i staničnom transportu proteina APP

Mi smo u ovom istraživanju pokazali da je nakupljanje peptida $A\beta$ u stanicama CHO-NPC1^{-/-} posljedica povećanog amiloidogenog cijepanja proteina APP β -sekretazom (BACE1). Također smo pokazali da u tim stanicama dolazi do nakupljanja proteina APP u ranim / reciklirajućim endosomima, vezikulama optimalne aktivnosti β -sekretaze. Za razliku od prijašnjih istraživanja koja su također uočila poremećaj u cijepanju i transportu proteina APP

u različitim modelima bolesti NPC, mi smo dokazali da je povišena razina kolesterola uslijed nedostatka funkcionalnog proteina NPC1 pokretač navedenih promjena.

Od otkrića da polimorfizam gena *APOE* (koji kodira glavni transporter kolesterola u mozgu – apolipoprotein E) predstavlja naj snažniji genetski rizik nastanka sporadičnog oblika Alzheimerove bolesti (Corder i sur., 1993.), mnoga su istraživanja pokazala da kolesterol može utjecati na stanični transport i cijepanje proteina APP, te nastanak peptida A β . Dapače, većina istraživanja je pokazala da povišena razina kolesterola vodi ka povećanoj razini peptida A β i obrnuto da njegovo sniženje, najčešće statinima, uzrokuje sniženje razine ovog peptida. Dodatno, povišena razina kolesterola može stimulirati endocitozu (Weber i sur., 2006.), te dovesti do povećanja endosoma (Cossec i sur., 2010.). U ovom smo istraživanju pokazali da stanice *CHO-NPCI*^{-/-} imaju povećane, kako lipidima bogate kasne endosome/lizosome, tako i rane te reciklirajuće endosome u odnosu na stanice *CHO*^{wt} (Slika 5.14. A i B), što potvrđuje da nakupljanje kolesterola u kasnim endosomima / lizosomima uslijed nedostatka funkcionalnog proteina NPC1 uzrokuje zastoj u endocitoznom putu te promjene i u vezikulama endocitoznog puta koje nisu glavna mjesta nakupljanja lipida (rani / reciklirajući endosomi).

Kako bismo provjerili ovisi li nakupljanje unutarstaničnog peptida A β ₄₀ i odsječka CTF β o razini kolesterola u stanicama *CHO-NPCI*^{-/-}, stanice *CHO*^{wt} i *CHO-NPCI*^{-/-} smo uzgajali u uvjetima siromašnim lipidima s ciljem smanjenja količine kolesterola u stanici. Mnoga istraživanja u svrhu snižavanja kolesterola koriste statine ili/i spoj metil- β -ciklodekstrin (M β C). Statini su inhibitori ključnog enzima u sintezi kolesterola 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzimA reduktaze (HMG-CoAR) koja regulira korak prevođenja HMG-CoA u mevalonat. No statini uz inhibiciju sinteze kolesterola u stanicama, mogu imati i druge učinke jer sprečavaju sintezu, ne samo kolesterola, već i drugih nizvodnih produkata, poput mevalonata koji je važan za izoprenilaciju proteina. Izoprenilacija je kovalentno vezanje izoprenoida koje omogućava sidrenje proteina s unutrašnje strane membrana stanica u sisavaca. Važna je za funkciju malih GTPaza poput onih iz obitelji Rho, Ras i Rab koje su ključne u signalnim putevima i staničnom transportu. Naime, pokazano je da statinima snižena razina izoprenoida, neovisno o razini kolesterola, uzrokuje promjene u transportu proteina APP i dovodi do nakupljanja odsječaka CTF β i unutarstaničnog peptida A β (Cole i sur., 2005.). Zato je pri upotrebi statina u svrhu snižavanja kolesterola i analiziranja procesa vezanih uz cijepanje i transport proteina APP važno poduprijeti izoprenilaciju dodajući stanicama mevalonat u manjoj količini. Metil- β -ciklodekstrin je spoj koji izvlači kolesterol iz membrana, iako mehanizam njegovog djelovanja nije u potpunosti razjašnjen. Mi smo u

ovom istraživanju odlučili stanice uzgajati u uvjetima siromašnim lipidima, pošto smo prilikom tretmana statinima uz dodatak mevalonata ili dodavanjem spoja M β C primjetili da mogu imati toksičan učinak na stanice. Umjesto u mediju koji sadrži serum FBS, stanice smo uzgajali u mediju s dodatkom seruma LPDS koji ne sadrži lipide s ciljem smanjenja količine kolesterola u stanici. Pokazali smo da sniženje razine kolesterola u stanicama CHO-NPC1^{-/-} na razinu usporedivu s onom u stanicama CHO^{wt} (Slika 5.8. A i B) uzrokuje smanjenu proizvodnju produkata amiloidogene razgradnje proteina APP, peptida A β i odječka CTF β (Slika 5.8. C i D). Štoviše, pokazali smo da je snižena lokalizacija proteina APP na staničnoj površini (Slika 5.11. B), kao i njegovo nakupljanje u ranim endosomima (Slike 5.21.; 5.22.) također ovisno o nakupljanju kolesterola uzrokovanog nedostatkom proteina NPC1. Dodatno smo ove rezultate potvrdili snižavanjem kolesterola statinima uz dodatak mevalonata ili spojem M β C (Slike 5.21.; 5.22.) s obzirom da je većina prijašnjih istraživanja koristila ove tretmane, a statini su, štoviše, predloženi kao terapija za Alzheimerovu bolest. Ovi rezultati koji pokazuju da su nakupljanje peptida A β i odsječaka CTF, jednako kao i promjene u transportu proteina APP ovisne o nakupljanju kolesterola, potvrđuju da je povećano amiloidogeno cijepanje proteina APP u stanicama CHO-NPC1^{-/-} posljedica promjena u razini kolesterola, a ne direktno nedostatka proteina NPC1.

Prijašnja su istraživanja pokazala da u bolesti NPC, osim primarnog nakupljanja kolesterola, dolazi i do sekundarnog nakupljanja drugih lipida (Kobayashi i sur., 1999.; Zervas i sur., 2001.; Zhang i sur., 2001.; te Vrucite i sur., 2004.; Lloyd-Evans i sur., 2008.). To smo potvrdili i u ovom istraživanju pokazavši da u stanicama CHO-NPC1^{-/-} dolazi i do nakupljanja glikosfingolipida (Slika 5.15. B), te BMP-a (od eng. *bis (monoacylglycero) phosphate*), lipidnog markera kasnih lizosoma (Slika 5.14. C). Čini se da je nakupljanje kolesterola u bolesti NPC, usko povezano s nakupljanjem ostalih lipida. Naime, pokazano je da snižavanje razine kolesterola uzrokuje i snižavanje razine glikosfingolipida u mozgu mišjeg modela bolesti NPC (Davidson i sur., 2009.). Aktivacija sfingomijelinaze smanjuje razinu nakupljenog sfingomijelina u staničnom modelu bolesti NPC, te uzrokuje dramatično snižavanje razine kolesterola i popravak u transportu lipida i proteina (Devlin i sur., 2010.). Kako smo u ovom istraživanju stanice uzgajali u mediju s dodatkom seruma LPDS koji ne sadrži lipide s ciljem smanjenja količine kolesterola, ne možemo isključiti da opisane promjene u cijepanju i transportu proteina APP u stanicama CHO-NPC1^{-/-} nisu samo posljedica nakupljanja kolesterola, već i drugih lipida. Također, zastoj kolesterola u kasnim endosomima / lizosomima uslijed nedostatka funkcionalnog proteina NPC1 uzrokuje značajno snižavanje esterifikacije kolesterola u stanici. Puglielli i suradnici (Puglielli i sur.,

2001.) su pokazali da sama količina ukupnog kolesterola možda nije ključni čimbenik u moduliranju cijepanja proteina APP i nastanka peptida A β , već bi to mogao biti omjer slobodnog kolesterola i kolesterol-estera. Kako bismo dodatno potvrdili da povišena razina kolesterola specifično može utjecati na transport proteina APP, a time i na njegovo cijepanje, u stanicama CHO $_{wt}$ smo povišili razinu kolesterola (Slika 5.23.). Pri tom smo koristili dvije strategije: stanice CHO $_{wt}$ smo tretirali spojem U18666A, koji se koristi za oponašanje fenotipa NPC, te smo stanice CHO $_{wt}$ tretirali s kolesterolom konjugiranim sa spojem M β C (M β C-kolesterol) koji takav nesmetano ulazi u stanicu gdje uzrokuje povećanje razine kolesterola. Smatra se da spoj U18666A inhibira funkciju proteina NPC1 ili nekog drugog čimbenika u istom putu te time uzrokuje nakupljanje slobodnog kolesterola u kasnim endosomima/lizosomima dok tretman stanica s M β C-kolesterolom, koje imaju funkcionalan protein NPC1, uzrokuje povećanje razine kolesterola u cijeloj stanici. Pokazali smo da nakupljanje kolesterola u stanicama CHO $_{wt}$ može uzrokovati promjene u smještaju proteina APP u endocitoznom putu slične onima koje smo pokazali u stanicama CHO-NPC1 $^{-/-}$ (Slika 5.24.). Ovaj rezultat dokazuje da povišene razine kolesterola, neovisno o statusu proteina NPC1, mogu utjecati na smještaj tj. endocitozu proteina APP.

Dakle, rezultati ove disertacije ukazuju da bi povišena razina kolesterola mogla biti pokretač patoloških procesa koji dovode do nastanka Alzheimerove bolesti. Naime, pokazali smo da promjene u metabolizmu kolesterola u stanicama uzrokuju promjene transporta i smještaja proteina APP potičući tako njegovu amiloidogenu razgradnju. Rasvjetljavanje mehanizma utjecaja kolesterola na nakupljanje peptida A β može doprinijeti otkrivanju novih ciljnih puteva i molekula za razvoj terapije protiv Alzheimerove bolesti. Naime, brojna klinička istraživanja usmjerena ka direktnom moduliranju aktivnosti sekretaza koje sudjeluju u razgradnji proteina APP su se pokazala neuspješnima. Stoga je cilj naći alternativne strategije liječenja AB te istraživanja usmjeriti ka uzvodnim procesima i čimbenicima koji potiču nastanak bolesti.

Štoviše, s obzirom da je promijenjen metabolizam lipida pronađen i kod drugih neurodegenerativnih bolesti, kao npr. Parkinsonove bolesti (Mazzulli i sur., 2011.), rezultati ove disertacije mogu dati veliki doprinos razumijevanju molekularnog mehanizma utjecaja lipida na nastanak ne samo Alzheimerove bolesti već i drugih neurodegenerativnih bolesti.

7. ZAKLJUČAK

U ovom smo istraživanju otkrili više dokaza da nakupljanje kolesterola uslijed nedostatka funkcionalnog proteina NPC1 uzrokuje promjene u transportu proteina APP koje rezultiraju njegovim povećanim amiloidogenim cijepanjem i nastankom peptida A β .

Nedostatak proteina NPC1 u stanicama CHO-NPC1^{-/-} uzrokuje povišenu razinu produkata amiloidogenog cijepanja proteina APP, CTF β i sAPP β , te nakupljanje topivog i agregiranog oblika peptida amiloid- β (A β) unutar stanice. Nakupljanje peptida A β nije posljedica povećanog cijepanja odsječka CTF β γ -sekretazom, niti je uzrokovana povišenim aktivnostima enzima β - i γ -sekretaze u stanicama CHO-NPC1^{-/-}. Dakle, nakupljanje peptida A β u stanicama CHO-NPC1^{-/-} je posljedica njegove povećane proizvodnje tj. povećanog amiloidogenog cijepanja proteina APP β -sekretazom. Povećana amiloidogena razgradnja proteina APP u stanicama CHO-NPC1^{-/-} ovisna je o nakupljanju kolesterola, jer snižavanje razine kolesterola u ovim stanicama uzrokuje snižavanje razine odsječaka CTF i peptida A β .

Internalizacija proteina APP je nužna za nastanak i nakupljanje peptida A β u stanicama CHO-NPC1^{-/-}, a nakupljanje kolesterola kao posljedica nedostatka proteina NPC1 uzrokuje promjene u staničnom transportu proteina APP. U stanicama CHO-NPC1^{-/-} dolazi do pojačane internalizacije i smanjenog recikliranja proteina APP s/na površinu stanice što uzrokuje smanjenu lokalizaciju proteina APP na površini stanice i njegovo nakupljanje u povećanim ranim / reciklirajućim endosomima, vezikulama optimalne aktivnosti β -sekretaze (BACE1). Dapače, protein APP je kolokaliziran s enzimom BACE1 u velikim vezikulama stanica CHO-NPC1^{-/-}.

Nakupljanje kolesterola u stanicama CHO^{wt} uzrokuje pojačanu vezikularnu kolokalizaciju proteina APP s ranim i reciklirajućim endosomima. Dakle, nakupljanje kolesterola u stanicama CHO^{wt} može uzrokovati promjene u smještaju proteina APP u endocitoznom putu slične onima koje smo pokazali u stanicama CHO-NPC1^{-/-}.

Ovim istraživanjem smo pokazali da povišena razina kolesterola može biti pokretač patoloških procesa u Alzheimerovoj bolesti jer potiče promjene u transportu proteina APP u endosomima koje rezultiraju njegovim povećanim amiloidogenim cijepanjem i nastankom peptida A β .

8. POPIS LITERATURE

- Abad-Rodriguez J, Ledesma MD, Craessaerts K, Perga S, Medina M, Delacourte A, Dingwall C, Strooper B De, Dotti CG (2004) Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. *The Journal of Cell Biology* 167:953–960
- von Arnim CA, Einem B, Weber P, Wagner M, Schwanzar D, Spoelgen R, Strauss WL, Schneckenburger H (2008) Impact of cholesterol level upon APP and BACE proximity and APP cleavage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 370:207–212
- Bodovitz S, Klein WL (1996) Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry* 271:4436–4440
- Borbon IA, Erickson RP (2010) Interactions of Npc1 and amyloid accumulation/deposition in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's. *Journal of Applied Genetics* 52:213–218
- Burns A (2009) Alzheimer's disease: on the verges of treatment and prevention. *The Lancet Neurology* 8:4–5
- Burns M, Gaynor K, Olm V, Mercken M, LaFrancois J, Wang L, Mathews PM, Noble W, Matsuoka Y, Duff K (2003) Presenilin redistribution associated with aberrant cholesterol transport enhances beta-amyloid production in vivo. *The Journal of Neuroscience* 23:5645–5649
- Burns MP, Igbavboa U, Wang L, Wood WG, Duff K (2006) Cholesterol distribution, not total levels, correlate with altered amyloid precursor protein processing in statin-treated mice. *Neuromolecular Medicine* 8:319–328
- Buxbaum JD, Geoghagen NSM, Friedhoff LT (2001) Cholesterol depletion with physiological concentrations of a statin decreases the formation of the Alzheimer amyloid A β peptide. *Journal of Alzheimer's Disease* 3:221–229
- Cadigan KM, Spillane DM, Chang TY (1990) Isolation and characterization of Chinese hamster ovary cell mutants defective in intracellular low density lipoprotein-cholesterol trafficking. *The Journal of Cell Biology* 110:295–308
- Carey RM, Balcz BA, Lopez-Coviella I, Slack BE (2005) Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid beta protein. *BMC Cell Biology* 6:30
- Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, Gu J, Rosenfeld MA, Pavan WJ, Krizman DB, Nagle J, Polymeropoulos MH, Sturley SL, Ioannou YA, Higgins ME, Comly M, Cooney A, Brown A, Kaneski CR, Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Neufeld EB, Chang TY, Liscum L, Strauss JF 3rd, Ohno K, Zeigler M, Carmi R, Sokol J, Markie D, O'Neill RR, Diggelen OP van, Elleder M, Patterson MC, Brady RO, Vanier MT, Pentchev PG, Tagle DA (1997) Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277:228–231

- Cataldo AM, Petanceska S, Terio NB, Peterhoff CM, Durham R, Mercken M, Mehta PD, Buxbaum J, Haroutunian V, Nixon RA (2004) Abeta localization in abnormal endosomes: association with earliest Abeta elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiology of Aging* 25:1263–1272
- Cataldo AM, Peterhoff CM, Troncoso JC, Gomez-Isla T, Hyman BT, Nixon RA (2000) Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *American Journal of Pathology* 157:277–286
- Choudhury A, Sharma DK, Marks DL, Pagano RE (2004) Elevated endosomal cholesterol levels in Niemann-Pick cells inhibit rab4 and perturb membrane recycling. *Molecular Biology of the Cell* 15:4500–4511
- Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH (1997) Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of Lipid Research* 38:2264–2272
- Cirrito JR, Kang J-E, Lee J, Stewart FR, Verges DK, Silverio LM, Bu G, Mennerick S, Holtzman DM (2008) Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid- β in vivo. *Neuron* 58:42–51
- Cole SL, Grudzien A, Manhart IO, Kelly BL, Oakley H, Vassar R (2005) Statins cause intracellular accumulation of amyloid precursor protein, beta-secretase-cleaved fragments, and amyloid beta-peptide via an isoprenoid-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 280:18755–18770
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921–923
- Cossec J-C, Simon A, Marquer C, Moldrich RX, Leterrier C, Rossier J, Duyckaerts C, Lenkei Z, Potier M-C (2010) Clathrin-dependent APP endocytosis and Abeta secretion are highly sensitive to the level of plasma membrane cholesterol. *Biochimica Biophysica Acta* 1801:846–852
- Cramer PE, Cirrito JR, Wesson DW, Lee CYD, Karlo JC, Zinn AE, Casali BT, Restivo JL, Goebel WD, James MJ, Brunden KR, Wilson DA, Landreth GE (2012) ApoE-directed therapeutics rapidly clear β -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science* 335:1503–1506
- Cruz JC, Sugii S, Yu C, Chang TY (2000) Role of Niemann-Pick type C1 protein in intracellular trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol. *The Journal of Biological Chemistry* 275:4013–4021
- Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, Troncoso JC, Mattson MP (2004) Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101:2070–2075
- Davidson CD, Ali NF, Micsenyi MC, Stephney G, Renault S, Dobrenis K, Ory DS, Vanier MT, Walkley SU (2009) Chronic cyclodextrin treatment of murine Niemann-Pick C

- disease ameliorates neuronal cholesterol and glycosphingolipid storage and disease progression. *PLoS ONE* 4:e6951
- DeMattos RB, Cirrito JR, Parsadanian M, May PC, O'Dell MA, Taylor JW, Harmony JAK, Aronow BJ, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM (2004) ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo. *Neuron* 41:193–202
- Devlin C, Pipalia NH, Liao X, Schuchman EH, Maxfield FR, Tabas I (2010) Improvement in lipid and protein trafficking in Niemann-Pick C1 cells by correction of a secondary enzyme defect. *Traffic* 11:601–615
- Dietschy JM, Turley SD (2004) Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *The Journal of Lipid Research* 45:1375–1397
- Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C (2003) Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nature Cell Biology* 5:486–488
- Edmond J, Korsak RA, Morrow JW, Torok-Both G, Catlin DH (1991) Dietary cholesterol and the origin of cholesterol in the brain of developing rats. *Journal of Nutrition* 121:1323–1330
- Eehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *The Journal of Cell Biology* 160:113–123
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ (1990) Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248:1122–1124
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *The Journal of the American Medical Association* 278:1349–1356
- Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, Runz H, Kuhl S, Bertsch T, Bergmann K von, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T (2001) Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98:5856–5861
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczuzfca M (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet* 366:2112–2117
- Foley P (2010) Lipids in Alzheimer's disease: A century-old story. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1801:750–753

- Friedhoff LT, Cullen EI, Geoghagen NS, Buxbaum JD (2001) Treatment with controlled-release lovastatin decreases serum concentrations of human beta-amyloid peptide. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 4:127–130
- Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A, Pedersen NL (2006) Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Archives of General Psychiatry* 63:168–174
- Ginsberg SD, Alldred MJ, Counts SE, Cataldo AM, Neve RL, Jiang Y, Wu J, Chao MV, Mufson EJ, Nixon RA, Che S (2010) Microarray analysis of hippocampal CA1 neurons implicates early endosomal dysfunction during Alzheimer's disease progression. *Biological Psychiatry* 68:885–893
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704–706
- Grbović OM, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Dinakar R, Summers-Terio NB, Ceresa BP, Nixon RA, Cataldo AM (2003) Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular beta-cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and Aβ production. *The Journal of Biological Chemistry* 278:31261–31268
- Grimm MOW, Grimm HS, Pätzold AJ, Zinser EG, Halonen R, Duering M, Tschäpe JA, De Strooper B, Müller U, Shen J, Hartmann T (2005) Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nature Cell Biology* 7:1118–1123
- Guardia-Laguarta C, Coma M, Pera M, Clarimón J, Sereno L, Agulló JM, Molina-Porcel L, Gallardo E, Deng A, Berezovska O, others (2009) Mild cholesterol depletion reduces amyloid-beta production by impairing APP trafficking to the cell surface. *Journal of Neurochemistry* 110:220–230
- Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ (1992) Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 357:500–503
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359:322–325
- Hammad SM, Ranganathan S, Loukinova E, Twal WO, Argraves WS (1997) Interaction of apolipoprotein J-amyloid beta-peptide complex with low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin. A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid beta-peptide. *The Journal of Biological Chemistry* 272:18644–18649
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* 297:353–356
- Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, et al. (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics* 41:1088–1093

- Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rüllicke T, Kretzschmar H von, Koch C von, Sisodia S, Tremml P, Lipp HP, Wolfer DP, Müller U (2000) Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *The Journal of Neuroscience* 20:7951–7963
- Hećimović S, Wang J, Dolios G, Martinez M, Wang R, Goate AM (2004) Mutations in APP have independent effects on Abeta and CTFgamma generation. *Neurobiology of Disease* 17:205–218
- Higaki J, Quon D, Zhong Z, Cordell B (1995) Inhibition of beta-amyloid formation identifies proteolytic precursors and subcellular site of catabolism. *Neuron* 14:651–659
- Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D, Paul SM (2000) Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97:2892–2897
- Howland DS, Trusko SP, Savage MJ, Reaume AG, Lang DM, Hirsch JD, Maeda N, Siman R, Greenberg BD, Scott RW, Flood DG (1998) Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in brain by cholesterol. *The Journal of Biological Chemistry* 273:16576–16582
- Hu X, Pickering E, Liu YC, Hall S, Fournier H, Katz E, Dechairo B, John S, Eerdewegh P Van, Soares H (2011) Meta-analysis for genome-wide association study identifies multiple variants at the BIN1 locus associated with late-onset Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 6:e16616
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393:702–705
- Infante RE, Wang ML, Radhakrishnan A, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL (2008) NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 105:15287–15292
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32:4693–4697
- Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA (2000) Statins and the risk of dementia. *The Lancet* 356:1627–1631
- Jin L-W, Shie F-S, Maezawa I, Vincent I, Bird T (2004) Intracellular accumulation of amyloidogenic fragments of amyloid-beta precursor protein in neurons with Niemann-Pick type C defects is associated with endosomal abnormalities. *The American Journal of Pathology* 164:975–985
- Jones L, Holmans PA, Hamshere ML, Harold D, Moskvina V (2010) Genetic evidence implicates the immune system and cholesterol metabolism in the aetiology of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 5:e13950

- Kalvodova L, Kahya N, Schwille P, Eehalt R, Verkade P, Drechsel D, Simons K. (2005) Lipids as Modulators of Proteolytic Activity of BACE: Involvement of cholesterol, glycosphingolipids and anionic phospholipids in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 280:36815–36823
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733–736
- Kauwe JSK, Cruchaga C, Karch CM, Sadler B, Lee M, Mayo K, Latu W, Su'a M, Fagan AM, Holtzman DM, Morris JC, Goate AM (2011) Fine mapping of genetic variants in BIN1, CLU, CR1 and PICALM for association with cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 6:e15918
- Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003) 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 USA* 100:6382–6387
- Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A (2001) Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *British Medical Journal* 322:1447–1451
- Kobayashi T, Beuchat MH, Lindsay M, Frias S, Palmiter RD, Sakuraba H, Parton RG, Gruenberg J (1999) Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nature Cell Biology* 1:113–118
- Kodam A, Maulik M, Peake K, Amritraj A, Vetrivel KS, Thinakaran G, Vance JE, Kar S (2010) Altered levels and distribution of amyloid precursor protein and its processing enzymes in Niemann-Pick type C1-deficient mouse brains. *Glia* 58:1267–1281
- Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F (2001) Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98:5815–5820
- Koo EH, Squazzo SL (1994) Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 269:17386–17389
- Košiček M, Malnar M, Goate A, Hećimović S (2010) Cholesterol accumulation in Niemann Pick type C (NPC) model cells causes a shift in APP localization to lipid rafts. *Biochemical Biophysical Research Communication* 393:404–409
- Kuhn P-H, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *The EMBO Journal* 29:3020–3032
- Kuo YM, Emmerling MR, Bisgaier CL, Essenburg AD, Lampert HC, Drumm D, Roher AE (1998) Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochemical Biophysical Research Communication* 252:711–715

- LaDu MJ, Falduto MT, Manelli AM, Reardon CA, Getz GS, Frail DE (1994) Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *The Journal of Biological Chemistry* 269:23403–23406
- Lambert J-C, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, Letenneur L, Bettens K, Berr C, Pasquier F, Fiévet N, Barberger-Gateau P, Engelborghs S, Deyn P De, Mateo I, Franck A, Helisalmi S, Porcellini E, Hanon O, Pancorbo MM de, Lendon C, Dufouil C, Jaillard C, Leveillard T, Alvarez V, Bosco P, Mancuso M, Panza F, Nacmias B, Bossù P, Piccardi P, Annoni G, Seripa D, Galimberti D, Hannequin D, Licastro F, Soininen H, Ritchie K, Blanché H, Dartigues J-F, Tzourio C, Gut I, Broeckhoven C Van, Alperovitch A, Lathrop M, Amouyel P (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics* 41:1094–1099
- Lambert J-C, Zelenika D, Hiltunen M, Chouraki V, Combarros O, Bullido MJ, Tognoni G, Fiévet N, Boland A, Arosio B, Coto E, Zompo M Del, Mateo I, Frank-Garcia A, Helisalmi S, Porcellini E, Pilotto A, Forti P, Ferri R, Delepine M, Scarpini E, Siciliano G, Solfrizzi V, Sorbi S, Spalletta G, Ravaglia G, Valdivieso F, Alvarez V, Bosco P, Mancuso M, Panza F, Nacmias B, Bossù P, Piccardi P, Annoni G, Seripa D, Galimberti D, Licastro F, Lathrop M, Soininen H, Amouyel P (2011) Evidence of the association of BIN1 and PICALM with the AD risk in contrasting European populations. *Neurobiology of Aging* 32:756.e11–15
- Lange Y, Ye J, Rigney M, Steck T (2000) Cholesterol movement in Niemann-Pick type C cells and in cells treated with amphiphiles. *The Journal of Biological Chemistry* 275:17468–17475
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269:973–977
- Li G, Higdon R, Kukull WA, Peskind E, Valen Moore K Van, Tsuang D, Belle G van, McCormick W, Bowen JD, Teri L, Schellenberg GD, Larson EB (2004) Statin therapy and risk of dementia in the elderly: a community-based prospective cohort study. *Neurology* 63:1624–1628
- Liscum L, Faust JR (1987) Low density lipoprotein (LDL)-mediated suppression of cholesterol synthesis and LDL uptake is defective in Niemann-Pick type C fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 262:17002–17008
- Liscum L, Faust JR (1989) The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino) ethoxy] androst-5-en-17-one. *The Journal of Biological Chemistry* 264:11796–11806
- Liu WW, Todd S, Coulson DT., Brent Irvine G, Peter Passmore A, McGuinness B, McConville M, Craig D, Johnston JA (2009) A novel reciprocal and biphasic relationship between membrane cholesterol and betasecretase activity in SH-SY5Y cells and in human platelets. *Journal of Neurochemistry* 108:341–349

- Lloyd-Evans E, Morgan AJ, He X, Smith DA, Elliot-Smith E, Sillence DJ, Churchill GC, Schuchman EH, Galione A, Platt FM (2008) Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nature Medicine* 14:1247–1255
- Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J (1999) Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology* 155:853–862
- Marquer C, Devauges V, Cossec J-C, Liot G, Lécart S, Saudou F, Duyckaerts C, Lévêque-Fort S, Potier M-C (2011) Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis. *FASEB Journal* 25:1295–1305
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 82:4245–4249
- Matsubara E, Soto C, Governale S, Frangione B, Ghiso J (1996) Apolipoprotein J and Alzheimer's amyloid beta solubility. *Biochemical Journal* 316 (Pt 2):671–679
- Mattsson N, Zetterberg H, Bianconi S, Yanjanin NM, Fu R, Mansson J-E, Porter FD, Blennow K (2010) γ -Secretase-dependent amyloid- β is increased in Niemann-Pick type C: A cross-sectional study. *Neurology* 76:366–372
- Mazzulli JR, Xu Y-H, Sun Y, Knight AL, McLean PJ, Caldwell GA, Sidransky E, Grabowski GA, Krainc D (2011) Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell* 146:37–52
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL (1999) Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 46:860–866
- Meyer MR, Tschanz JT, Norton MC, Welsh-Bohmer KA, Steffens DC, Wyse BW, Breitner JC (1998) APOE genotype predicts when--not whether--one is predisposed to develop Alzheimer disease. *Nature Genetics* 19:321–322
- Mielke MM, Zandi PP, Sjögren M, Gustafson D, Ostling S, Steen B, Skoog I (2005) High total cholesterol levels in late life associated with a reduced risk of dementia. *Neurology* 64:1689–1695
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nature Genetics* 1:345–347
- Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H, Fensom A, Vanier MT, Wattiaux R, Jadot M, Lobel P (2000) Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science* 290:2298–2301
- Nixon RA (2004) Niemann-Pick Type C disease and Alzheimer's disease: the APP-endosome connection fattens up. *The American Journal of Pathology* 164:757

- Osenkowski P, Ye W, Wang R, Wolfe MS, Selkoe DJ (2008) Direct and Potent Regulation of γ -Secretase by Its Lipid Microenvironment. *The Journal of Biological Chemistry* 283:22529–22540
- Pappolla MA, Bryant-Thomas TK, Herbert D, Pacheco J, Fabra Garcia M, Manjon M, Girones X, Henry TL, Matsubara E, Zambon D, Wolozin B, Sano M, Cruz-Sanchez FF, Thal LJ, Petanceska SS, Refolo LM (2003) Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology* 61:199–205
- Parvathy S, Hussain I, Karran EH, Turner AJ, Hooper NM (1999) Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochemistry* 38:9728–9734
- Pentchev PG, Comly ME, Kruth HS, Tokoro T, Butler J, Sokol J, Filling-Katz M, Quirk JM, Marshall DC, Patel S (1987) Group C Niemann-Pick disease: faulty regulation of low-density lipoprotein uptake and cholesterol storage in cultured fibroblasts. *FASEB Journal* 1:40–45
- Pentchev PG, Comly ME, Kruth HS, Vanier MT, Wenger DA, Patel S, Brady RO (1985) A defect in cholesterol esterification in Niemann-Pick disease (type C) patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 82:8247–8251
- Pentchev PG, Kruth HS, Comly ME, Butler JD, Vanier MT, Wenger DA, Patel S (1986) Type C Niemann-Pick disease. A parallel loss of regulatory responses in both the uptake and esterification of low density lipoprotein-derived cholesterol in cultured fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 261:16775–16780
- Pipalia NH, Hao M, Mukherjee S, Maxfield FR (2007) Sterol, Protein and Lipid Trafficking in Chinese Hamster Ovary Cells with Niemann-Pick Type C1 Defect. *Traffic* 8:130–141
- Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S (1993) Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *The Lancet* 342:697–699
- Puglielli L, Konopka G, Pack-Chung E, Ingano LA, Berezovska O, Hyman BT, Chang TY, Tanzi RE, Kovacs DM (2001) Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase modulates the generation of the amyloid beta-peptide. *Nature Cell Biology* 3:905–912
- Puri V, Watanabe R, Dominguez M, Sun X, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE (1999) Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases. *Nature Cell Biology* 1:386–388
- Rea TD, Breitner JC, Psaty BM, Fitzpatrick AL, Lopez OL, Newman AB, Hazzard WR, Zandi PP, Burke GL, Lyketsos CG, Bernick C, Kuller LH (2005) Statin use and the risk of incident dementia: the Cardiovascular Health Study. *Archives of Neurology* 62:1047–1051
- Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT (1993) Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 11:575–580

- Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA (2000) Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiology of Disease* 7:321–331
- Refolo LM, Pappolla MA, LaFrancois J, Malester B, Schmidt SD, Thomas-Bryant T, Tint GS, Wang R, Mercken M, Petanceska SS, Duff KE (2001) A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 8:890–899
- Roff CF, Goldin E, Comly ME, Blanchette-Mackie J, Cooney A, Brady RO, Pentchev PG (1992) Niemann-Pick type-C disease: deficient intracellular transport of exogenously derived cholesterol. *American Journal of Medical Genetics* 42:593–598
- Runz H, Rietdorf J, Tomic I, Bernard M de, Beyreuther K, Pepperkok R, Hartmann T (2002) Inhibition of intracellular cholesterol transport alters presenilin localization and amyloid precursor protein processing in neuronal cells. *The Journal of Neuroscience* 22:1679–1689
- Saito Y, Suzuki K, Nanba E, Yamamoto T, Ohno K, Murayama S (2002) Niemann-Pick type C disease: accelerated neurofibrillary tangle formation and amyloid beta deposition associated with apolipoprotein E epsilon 4 homozygosity. *Annals of Neurology* 52:351–355
- Schägger H (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* 1:16–22
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Silva HA Da, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754–760
- Shie FS, Jin LW, Cook DG, Leverenz JB, LeBoeuf RC (2002) Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A [beta] accumulation in transgenic mice. *Neuroreport* 13:455
- Simons M, Keller P, Strooper B De, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K (1998) Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95:6460
- Sisodia SS, Koo EH, Beyreuther K, Unterbeck A, Price DL (1990) Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* 248:492–495
- Sjögren M, Gustafsson K, Syversen S, Olsson A, Edman A, Davidsson P, Wallin A, Blennow K (2003) Treatment with simvastatin in patients with Alzheimer's disease lowers both alpha- and beta-cleaved amyloid precursor protein. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 16:25–30
- Skovronsky DM, Doms RW, Lee VM (1998) Detection of a novel intraneuronal pool of insoluble amyloid beta protein that accumulates with time in culture. *The Journal of Cell Biology* 141:1031–1039

- Small SA, Duff K (2008) Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron* 60:534–542
- Sparks DL, Lemieux SK, Haut MW, Baxter LC, Johnson SC, Sparks LM, Sampath H, Lopez JE, Sabbagh MH, Connor DJ (2008) Hippocampal volume change in the Alzheimer Disease Cholesterol-Lowering Treatment trial. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 75 Suppl 2:S87–93
- Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC 3rd, Liu H, Landers T, Gross DR (1994) Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Experimental Neurology* 126:88–94
- Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran G, Iwatsubo T (2003) The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 422:438–441
- Tamboli IY, Prager K, Barth E, Heneka M, Sandhoff K, Walter J (2005) Inhibition of glycosphingolipid biosynthesis reduces secretion of the beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide. *The Journal of Biological chemistry* 280:28110–28117
- Tienari PJ, Strooper B De, Ikonen E, Simons M, Weidemann A, Czech C, Hartmann T, Ida N, Multhaup G, Masters CL (1996) The beta-amyloid domain is essential for axonal sorting of amyloid precursor protein. *The EMBO Journal* 15:5218
- Ujiie M, Dickstein DL, Carlow DA, Jefferies WA (2003) Blood-brain barrier permeability precedes senile plaque formation in an Alzheimer disease model. *Microcirculation* 10:463–470
- Vanier MT (2010) Niemann-Pick disease type C. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 5:16
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735–741
- Vetrivel KS, Cheng H, Kim S-H, Chen Y, Barnes NY, Parent AT, Sisodia SS, Thinakaran G (2005) Spatial segregation of gamma-secretase and substrates in distinct membrane domains. *The Journal of Biological Chemistry* 280:25892–25900
- Vetrivel KS, Thinakaran G (2010) Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. *Biochimica Biophysica Acta* 1801:860–867
- Vruchte D te, Lloyd-Evans E, Veldman RJ, Neville DCA, Dwek RA, Platt FM, Blitterswijk WJ van, Sillence DJ (2004) Accumulation of glycosphingolipids in Niemann-Pick C disease disrupts endosomal transport. *The Journal of Biological Chemistry* 279:26167–26175
- Wada S, Morishima-Kawashima M, Qi Y, Misono H, Shimada Y, Ohno-Iwashita Y, Ihara Y (2003) Gamma-secretase activity is present in rafts but is not cholesterol-dependent. *Biochemistry* 42:13977–13986

- Wahrle S, Das P, Nyborg AC, McLendon C, Shoji M, Kawarabayashi T, Younkin LH, Younkin SG, Golde TE (2002) Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiology of Disease* 9:11–23
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochemical Society Transactions* 30:552–557
- Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, Podlisny MB, Selkoe DJ (2000) The Oligomerization of Amyloid β -Protein Begins Intracellularly in Cells Derived from Human Brain. *Biochemistry* 39:10831–10839
- Weber P, Wagner M, Schneckenburger H (2006) Microfluorometry of cell membrane dynamics. *Cytometry A* 69:185–188
- Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G (2000) Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Archives of Neurology* 57:1439–1443
- Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue L-F, Beach TG, Sue LI, Woulfe J, Xu H, Stanimirovic DB, Zhang W (2008) Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and A β production. *Neurobiology of Disease* 29:422–437
- Yamamoto T, Ninomiya H, Matsumoto M, Ohta Y, Nanba E, Tsutsumi Y, Yamakawa K, Millat G, Vanier MT, Pentchev PG, Ohno K (2000) Genotype-phenotype relationship of Niemann-Pick disease type C: a possible correlation between clinical onset and levels of NPC1 protein in isolated skin fibroblasts. *Journal of Medical Genetics* 37:707–712
- Yamazaki T, Chang TY, Haass C, Ihara Y (2001) Accumulation and Aggregation of Amyloid beta -Protein in Late Endosomes of Niemann-Pick Type C Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 276:4454–4460
- Yamazaki T, Koo EH, Selkoe DJ (1996) Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization. *Journal of Cell Science* 109 (Pt 5):999–1008
- Ye S, Huang Y, Müllendorff K, Dong L, Giedt G, Meng EC, Cohen FE, Kuntz ID, Weisgraber KH, Mahley RW (2005) Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid beta peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102:18700–18705
- Zandi PP, Sparks DL, Khachaturian AS, Tschanz J, Norton M, Steinberg M, Welsh-Bohmer KA, Breitner JCS (2005) Do statins reduce risk of incident dementia and Alzheimer disease? The Cache County Study. *Archives of General Psychiatry* 62:217–224
- Zervas M, Dobrenis K, Walkley SU (2001) Neurons in Niemann-Pick disease type C accumulate gangliosides as well as unesterified cholesterol and undergo dendritic and axonal alterations. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 60:49–64

- Zhang M, Dwyer NK, Neufeld EB, Love DC, Cooney A, Comly M, Patel S, Watari H, Strauss JF 3rd, Pentchev PG, Hanover JA, Blanchette-Mackie EJ (2001) Sterol-modulated glycolipid sorting occurs in niemann-pick C1 late endosomes. *The Journal of Biological Chemistry* 276:3417–3425
- Zheng H, Koo EH (2011) Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Molecular Neurodegeneration* 6:27
- Zlokovic BV, Martel CL, Matsubara E, McComb JG, Zheng G, McCluskey RT, Frangione B, Ghiso J (1996) Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93:4229–4234

9. ŽIVOTOPIS

Martina Malnar je rođena 27. rujna 1980. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu i srednju školu. 1998. godine maturirala je u II. Općoj gimnaziji u Zagrebu, te upisala studij molekularne biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (PMF) Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad izradila je na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Diplomirala je 2005. godine s odličnim uspjehom (prosječna ocjena uspjeha na studiju 4.78) što ju je uvrstilo među 5 najuspješnijih studenata molekularne biologije diplomiranih te godine.

2006. godine je zaposlena na Institutu Ruđer Bošković kao stručni suradnik, te je iste godine upisala poslijediplomski doktorski studij biologije na PMF-u. 2007. godine je postala znanstveni novak pod mentorstvom dr. sc. Silve Katušić Hećimović u Grupi za istraživanje neurodegenerativnih bolesti Laboratorija za molekularnu neurofarmakologiju na Zavodu za molekularnu medicinu. Svoj doktorat je izradila u sklopu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta „Mehanizam djelovanja kolesterola u nastanku Alzheimerove bolesti“. U međuvremenu je aktivno sudjelovala na 5 međunarodnih kongresa i 3 praktične radionice odnosno ljetne škole. Također je za vrijeme svog znanstvenog rada više puta imala priliku otići na usavršavanje u *Laboratory for Neurodegenerative Disease Research, DZNE & Adolf Butenandt-Institute, Biochemistry, Ludwig-Maximilians-University, München, Njemačka*. Objavila je 5 izvornih znanstvenih članaka indeksiranih u bazi *Current Contents (CC)* od kojih je na tri prvi autor i 6 kongresnih sažetaka citiranih u bazi CC. U sklopu rada u Laboratoriju, također sudjeluje u provođenju molekularne dijagnostike nasljednih bolesti.

Sudjeluje kao asistent predavač u izvođenju „Metodoloških tečajeva u biologiji i medicini“ na Institutu Ruđer Bošković, a 2008. godine je bila voditelj projekta u sklopu ljetne škole znanosti S3 u Višnjanu.

Dobitnica je nacionalne stipendije „Za žene u znanosti“ u 2012. godini, pod pokroviteljstvom L'Oreal-a Adria i Hrvatskog povjerenstva za UNESCO.

10. POPIS RADOVA

1. Malnar, M; Košiček, M; Lisica, A; Posavec, M; Krolo, A; Njavro, J; Omerbašić, D; Tahirović, S; Hećimović, S.

Cholesterol-depletion corrects APP and BACE1 mistrafficking in NPC1-deficient cells. // *Biochimica et biophysica acta - Molecular basis of disease*. 1822 (2012); 1270-1283

2. Malnar, M; Košiček, M; Bene, R; Petek Tarnik, I; Pavelin, S; Babić, I; Brajenović-Milić, B; Hećimović, H; Titlić, M; Trkanjec, Z; Demarin, V; Hećimović, S.

Use of cerebrospinal fluid biomarker analysis for improving Alzheimer's disease diagnosis in a non-specialized setting. // *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. (2012) – rad je prihvaćen za objavljivanje

3. Ringman, JM; Gylys, KH; Medina, LD; Fox, M; Kepe, V; Flores, DL; Apostolova, LG; Barrio, JR; Small, G; Silverman, DH; Siu, E; Cederbaum, S; Hećimović, S; **Malnar, M;** Chakraverty, S; Goate, AM; Bird, TD; Leverenz, JB.

Biochemical, neuropathological, and neuroimaging characteristics of early-onset Alzheimer's disease due to a novel *PSEN1* mutation // *Neuroscience Letters*. 487 (2011); 287-292

4. Malnar, M; Košiček, M; Mitterreiter, S; Omerbašić, D; Lichtenthaler, SF; Goate, A; Hećimović, S.

Niemann–Pick type C cells show cholesterol dependent decrease of APP expression at the cell surface and its increased processing through the β -secretase pathway // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular basis of disease*. 1802 (2010); 682-691

5. Košiček, M; **Malnar, M;** Goate, A; Hećimović, S.

Cholesterol accumulation in Niemann Pick type C (NPC) model cells causes a shift in APP localization to lipid rafts // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 393 (2010); 404-409