# Utjecaj okadaične kiseline na fosforilaciju proteina tau na epitopima Thr231 i Ser396/Ser404

**Pinjušić, Katarina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:534964

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno - matematički fakultet
Biološki odsjek

**Katarina Pinjušić**

# Utjecaj okadaične kiseline na fosforilaciju proteina tau na epitopima Thr231 i Ser396/Ser404

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za razvojnu neuropatologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Gorana Šimića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Zahvaljujem se:

Voditelju diplomskog rada prof. dr. sc. Goranu Šimiću, koji mi je omogućio njegovu izradu u Laboratoriju za razvojnu neuropatologiju, na stručnom vodstvu, podršci, strpljenju i korisnim savjetima.

Mirjani Babić Leko, mag. biol. mol., koja je uz ugodnu atmosferu, susretljivost i strpljenje svojim savjetima bila od velike pomoći tijekom eksperimentalnog dijela rada, a kasnije i pismenog te od koje sam puno naučila.

Prof. dr. sc. Domagoju Đikiću, koji je prihvatio biti suvoditelj, podršci i prenesenom znanju tijekom studija i prakse.

Veliko hvala mojim roditeljima Mati i Marici, braći i sestrama Mateji, Mateju, Marini i Teu na bezuvjetnoj ljubavi, podršci, ohrabrenjima i odricanjima kojima su omogućili moje studiranje.

Hvala svim mojim prijateljima, posebno Barbari na podršci s kojom sam dijelila sve sretne, ali i stresne trenutke studija te s kojom sam učila svih ovih godina.

Posebno hvala mom dečku Antoniju koji mi je bio oslonac sve ove godine, a osobito kada je to bilo najpotrebnije.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

## Utjecaj okadaične kiseline na fosforilaciju proteina tau na epitopima Thr231 i Ser396/Ser404

Katarina Pinjušić
Rooseveltov trg 6
10 000 Zagreb

Alzheimerova bolest najčešći je uzrok progresivne demencije koju karakterizira sporo napredujući gubitak spoznajnih sposobnosti. Rizik obolijevanja raste gotovo eksponencijalno nakon dobi od 65 godina. Sa sve duljim životnim vijekom ljudi i starenjem stanovništva, Alzheimerova bolest postaje vodeći društveni, ekonomski i medicinski problem, pogotovo kada se zna da još uvijek nema uzročne terapije. Neurofibrilarni snopići jedna su od dvije glavne neuropatološke promjene, a nastaju kao rezultat hiperfosforilacije proteina tau. Tretman kulture stanica ljudskog neuroblastoma SH-SY5Y okadaičnom kiselinom predstavlja potencijalni model za istraživanja fosforilacije proteina tau zahvaljujući mogućnosti proučavanja inhibicije protein fosfataza 1 i 2A. Cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj okadaične kiseline na fosforilaciju proteina tau na epitopima Thr231 i Ser396/404 u kulturi stanica SH-SY5Y i neuronima dobivenim njihovom diferencijacijom. Rezultati su pokazali kako okadaična kiselina nema značajan utjecaj na fosforilaciju epitopa Thr231 i Ser396/S404 u staničnoj liniji SH-SY5Y. Budući da je tretman neurona uzrokovao značajno smanjenje fosforilacije epitopa Ser396/S404, to ukazuje da je fosforilacija navedenog epitopa regulirana nekom fosfatazom koju okadaična kiselina ne inhibira. Pretpostavljeno je da se najvjerojatnije radi o protein fosfatazi 2B. U svrhu stvaranja eksperimentalnog modela za daljnja *in vitro* istraživanja neuroprotektivnih spojeva za liječenje Alzheimerove bolesti putem sprječavanja hiperfosforilacije proteina tau, pored navedene pretpostavke o fosfatazi 2B, buduća istraživanja trebala bi utvrditi utjecaj okadaične kiseline i na druge patofiziološki važne epitope proteina tau, kao što su Thr205, Thr212 i Ser409.

(48 stranice, 12 slika, 1 tablica, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici u Zagrebu.
Ključne riječi: Alzheimerova bolest, fosforilacija proteina tau, okadaična kiselina
Voditelj: dr. sc. Goran Šimić, dr. med., red. prof.
Suvoditelj: dr. sc. Domagoj Đikić, izvanred. prof.
Ocjenitelji: dr. sc. Domagoj Đikić, izvanred. prof.
dr. sc. Božena Mitić, red. prof.
dr. sc. Ivančica Ternjej, izvanred. prof.
Rad prihvaćen: 4.2.2016.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduate Thesis

## Effect of okadaic acid on tau protein phosphorylation at Thr231 and Ser396/Ser404 epitopes

Katarina Pinjušić
Rooseveltov trg 6
10 000 Zagreb, Croatia

Alzheimer's disease is the most common cause of progressive dementia characterized by a slowly progressive cognitive impairment. Over the age of 65, the risk of developing Alzheimer's disease increases almost exponentially with age. With the increase of life expectancy and number and proportion of older people in the population, Alzheimer's disease is becoming a leading social, economic and medical problem, especially in regard to lack of causal therapy. Neurofibrillary tangles are one of the two major neuropathological lesions, resulting from hyperphosphorylation of tau protein. As okadaic acid, by inhibiting protein phosphatase 1 and 2A, induces tau phosphorylation in SH-SY5Y human neuroblastoma cell culture, this system represents a potential model for study of tau protein phosphorylation. The aim of this study was to determine the effect of okadaic acid on tau protein phosphorylation at epitopes Thr231 and Ser396/404 in SH-SY5Y cell culture and neurons derived thereof. The results showed that okadaic acid had no significant effect on phosphorylation of Thr231 epitope and epitope Ser396/S404 in SH-SY5Y cell line. However, treatment of neurons induced a significant reduction in phosphorylation of epitope Ser396/S404, suggesting that phosphorylation of that epitope is regulated by some phosphatase that is not inhibited by okadaic acid, most probably protein phosphatase 2B. In order to establish an experimental model for further *in vitro* research of neuroprotective compounds for treatment of Alzheimer's disease by preventing the hyperphosphorylation of tau protein, besides the role of protein phosphatase 2B, it will be also important to determine the effect of okadaic acid on other phospho-tau epitopes, such as Thr205, Thr212 and Ser409.

(48 pages, 12 figures, 1 table, original language: Croatian)
Thesis is deposited in the Central biological library in Zagreb.
Key words: Alzheimer's disease, tau protein phosphorylation, okadaic acid
Supervisor: Prof. Goran Šimić, M.D., Ph.D.
Assistant supervisor: Assoc. Prof. Domagoj Đikić, Ph.D.
Reviewers: Assoc. Prof. Domagoj Đikić, Ph.D
Prof. Božena Mitić, Ph.D
Assoc. Prof. Ivančica Ternjej, Ph.D
Thesis accepted: 4.2.2016.

## Popis oznaka i kratica

| | |
|---|---|
| AIDS | Stečeni sindrom imunodeficijencije (od engl. *acquired immunodeficiency syndrome*) |
| *APOE* | Gen za polipoprotein E |
| APP | Prekursor amiloidnog proteina (od engl. *amyloid precursor protein*) |
| ATP | Adenozin trifosfat |
| Aβ | Amiloid β |
| BCA | Bicinkoninična kiselina (od engl. *bicinchoninic acid*) |
| BDNF | Moždani neurotrofični faktor (od engl. *brain-derived neurotrophic factor*) |
| CAA | Cerebralna amiloidna angiopatija |
| CaMKinase II | Kalcij-kalmodulinom aktivirana protein kinaza II (od engl. *calcium calmodulin-activeted protein kinase II*) |
| CBD | Kortikobazalna degeneracija (od engl. *corticobasal degeneration*) |
| CCD | Uređaj koji pretvara fotone u električni signal (od engl. *charged-coupled device*) |
| CDK-5 | Ciklin ovisna kinaza 5 (od engl. *cyclin-dependent kinase 5*) |
| CO | Citokrom-oksidaza |
| DMSO | Dimetil sulfoksid (od engl. *dimethyl sulfoxide*) |
| Dyrk1A | Dvostruko-specifična fosforiliranim tirozinom regulirana kinaza 1A (od engl. *dual-specifity tyrosine phosphorylated-regulated kinase 1A*) |
| EHT | Eikozanoil-5-hidroksitriptamid |
| ELISA | Enzimski povezana imunoapsorpcijska analiza (od engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) |
| eNFT | Izvanstanični neurofibrilarni snopići (od engl. *extracellular neurofibrillary tangles*) |
| ERK | Kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (od engl. *extracellular signal-regulated protein kinase*) |
| FBS | Fetalni goveđi serum (od engl. *fetal bovine serum*) |
| FTDP | Frontotemporalna demencija s parkinsonizmom |
| GSK-3β | Kinaza glikogen sintaze 3β (engl. *glycogen syntase kinase 3β*) |
| HRP | Peroksidaza hrena (od engl. *horse-radish peroxidase*) |
| iNFT | Unutarstanični neurofibrilarni snopići (od engl. *intracellular neurofibrillary tangles*“) |

| | |
|---|---|
| MAP | Mikrotubulima pridruženi protein (od engl. *microtubule-associated protein*) |
| MAPK | Mitogenonima aktivirana protein kinaza (od engl. *mitogen-activated protein kinases*) |
| *MAPT* | Gen za mikrotubulima-pridruženi protein tau (od engl. *microtubule-associated protein tau*) |
| MCI | Blagi spoznajni poremećaj (od engl. *mild cognitive impairment*) |
| MEM | Minimalni esencijalni medij |
| nAChR | Nikotinski acetilkolinski receptor (od engl. *nicotinic acetylcholine receptor*) |
| NFT | Neurofibrilarni snopići (od engl. *neurofibrilary tangles*) |
| *O*-GlcNAc | *O*-glikozilacija (od engl. *O-linked β-N-acetylglucosamine*) |
| OK | Okadaična kiselina |
| PBS | Fiziološka otopina puferirana fosfatom (od engl. *Phosphate Buffered Saline*) |
| PDPK | Prolinom usmjerena kinaza (od engl. *proline-directed protein kinase*) |
| PHF | Sparene uzvojite niti (od engl. *Paired helical filaments*) |
| PK | Protein kinaza (od engl. *protein kinase*) |
| PP | Protein fosfataza (od engl. *protein phosphatase*) |
| pre-NFT | Rani neurofibrilarni snopići |
| *PSEN* | gen za presenilin |
| pSer | Fosforilirani serin na proteinu tau |
| PSP | Progresivna supranuklearna paraliza |
| p-tau | Fosforilrani tau epitop |
| pThr | Fosforilirani treonin (na proteinu tau) |
| SAPK/JNK | Stresom aktivirana protein kinaza/c-Jun N-terminalna kinaza (od engl. *stress-activated protein kinase/C-jun N-terminal kinase*) |
| SD | Standardna devijacija |
| SDS-PAGE | Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu uz prisutnost natrijevog dodecil sulfata (od engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) |
| SF | Ravne niti (od engl. *straight filaments*) |
| WHO | Svjetska zdravstvena organizacija (od engl. *World Health Organization*) |

# SADRŽAJ


1 Uvod ... 1

1.1 Alzheimerova bolest ... 1

1.1.1 Oblici Alzheimerove bolesti i čimbenici rizika ... 3

1.1.2 Prevalencija i incidencija Alzheimerove bolesti ... 4

1.1.3 Molekularni mehanizmi nastanka Alzheimerove bolesti ... 6

1.2 Protein tau i utjecaj promjena proteina tau na degeneraciju živčanih stanica ... 11

1.2.1 Protein tau ... 11

1.2.2 Utjecaj promjena proteina tau na degeneraciju živčanih stanica ... 12

1.2.3 Mehanizam nastanka patoloških promjena proteina tau ... 14

1.2.4 Fosforilacija proteina tau i moguće implikacije u dijagnostici ... 15

1.3 Okadaična kiselina ... 18

1.3.1 Mehanizam djelovanja okadaične kiseline ... 19

2 Cilj istraživanja ... 21

3 Materijali i metode ... 22

3.1 Rad sa stanicama u kulturi ... 22

3.1.1 Stanična linija ... 22

3.1.2 Odmrzavanje stanica ... 22

3.1.3 Presađivanje stanica ... 23

3.1.4 Određivanje broja stanica ... 23

3.1.5 Tretiranje stanica ... 24

3.1.6 Sakupljanje proteina ... 25

3.2 Odrađivanje koncentracije proteina ... 25

3.3 ELISA metoda ... 26

3.4 Metoda „western blot“ ... 27

3.4.1 Razdvajanje proteina ... 28

3.4.2 Transfer proteina ..... 28
3.4.3 Imunodetekcija proteina na membrani ..... 29
3.5 Statistička obrada podataka ..... 30
4 Rezultati ..... 31
4.1 Utjecaj okadaične kiseline na fosforilaciju proteina tau na epitopu p-tau Thr231 ..... 31
4.2 Utjecaj okadaične kiseline na fosforilaciju proteina tau na epitopu p-tau Ser396/S404 32
5 Rasprava ..... 35
6 Zaključak ..... 38
7 Literatura ..... 39
8 Životopis ..... 48

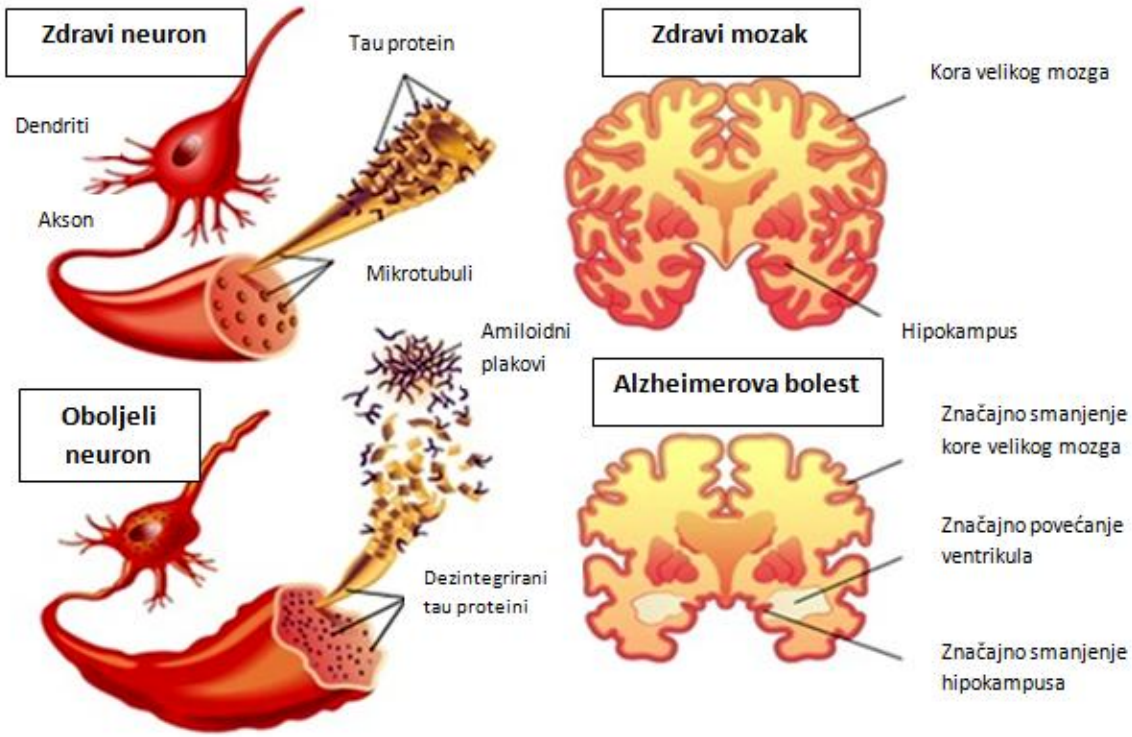
# 1 Uvod

## *1.1 Alzheimerova bolest*

Alzheimerova bolest je najčešći uzrok progresivne demencije koju karakterizira polagani gubitak spoznajnih sposobnosti, osobito pamćenja, učenja, apstraktnog mišljenja, prosudbe i orijentacije što dovodi do nesposobnosti za samostalan život (Blennow, 2004). Dvije glavne patološke promjene, senilne plakove i neurofibrilarne snopiće, prvi puta je u istom mozgu opisao Alois Alzheimer 1906. godine postmortalnom analizom mozga 51-godišnje bolesnice Auguste Deter. Detaljan opis navedenih zapažanja objavljen je 1907. godine. Prvi simptomi u navedene bolesnice uključivali su promjene osobina ličnosti sa jakim osjećajem ljubomore prema mužu, a 25. studenog 1901. godine, kada je dovedena u Bolnicu za duševne bolesti u Frankfurtu na Maini, imala je simptome poremećenog pamćenja, teškoće u čitanju i pisanju i paranoju. Kasnije su se pojavile i halucinacije, disfazija, disgnozija i dispraksija, te je naposljetku 8. travnja 1906. godine umrla. Alzheimer je uočio i povezao navedene kliničke simptome bolesti s postmortalnim neuropatološkim obilježjima: atrofijom moždane kore i gubitkom neurona, te prisutnošću plakova i neurofibrilarnih promjena prikazanim metodom srebrne impregnacije po Bielschowskom (metodu bojanja moždanog tkiva 20% otopinom $AgNO_3$ Bielschowsky je osmislio 1902. godine). Plakovi već bili otprije poznati (iako pod drugim nazivom – „milijarna skleroza“) - prvi ih je opisao Beljahow 1889. godine, a zatim su još detaljnije Marinesco i Blocq 1892. godine te Redlich 1898. godine u dva dementna bolesnika. Tek je Perusini 1910. godine Redlichov naziv 'milijarna skleroza' promijenio u „plakovi“. Neurofibrilarnu ‘proliferaciju’, kako su je onda zvali, najvjerojatnije je prvi opisao Alzheimer (iste je godine opisao i povezao sa sindromom demencije i Oskar Fischer) i to kao promjenu koju je uočio u gotovo svakom četvrtom neuronu moždane kore bolesnice Auguste Deter.

Senilni plakovi kao nakupine proteina amiloida β (Aβ) izvan, te neurofibrilarni snopići (NFT, od engl. *neurofibrilary tangles*) sačinjeni od hiperfosforiliranog tau proteina unutar neurona, zajedno s degeneracijom živčanih stanica i sinapsi i danas su neophodni za konačnu, neuropatološku dijagnozu Alzheimerove bolesti. Njihovo stvaranje u mozgu

oboljelih prema procjenama započinje 20-30 godina prije pojave prvih simptoma bolesti. Ta se rana faza bolesti nastoji dijagnosticirati što ranije na temelju subjektivnog zapažanja gubitka pamćenja (engl. *subjective cognitive impairment*), a kasnije i dostupnim objektivnim mjerenjima (uglavnom neuropsihološkim testovima) prilagođenim životnoj dobi i obrazovanju kada se naziva blagi spoznajni poremećaj (MCI, od engl. *mild cognitive impairment*). Iako oko 12% MCI slučajeva godišnje napreduje u Alzheimerovu bolest (Blennow i sur., 2006), MCI može biti dio normalnog starenja ili kliničke slike drugih poremećaja kao što su vaskularna demencija, frontotemporalna demencija, te demencija Lewyevih tjelešaca. Unatoč velikom napretku u razumijevanju nastanka bolesti, ni danas nema lijeka koji bi spriječio nastanak, usporio ili zaustavio napredak bolesti, a napredovanje kognitivnih simptoma moguće je jedino privremeno i kratkotrajno usporiti kolinomimeticima i memantinom (Imbimbo i sur., 2005). **Slika 1** shematski prikazuje glavna obilježja patoloških promjena u Alzheimerovoj bolesti.




**Slika 1.** Prikaz glavnih patoloških obilježja mozga bolesnika s Alzheimerovom bolesti.

(preuzeto i prilagođeno prema: http://www.totalhealthinstitute.com/tips-on-preventing-alzheimers-disease-naturally/)

### 1.1.1 Oblici Alzheimerove bolesti i čimbenici rizika

#### 1.1.1.1 Rani ili obiteljski oblik Alzheimerove bolesti

Alzheimerova bolest može biti uzrokovana autosomno dominantno naslijeđenim genetskim mutacijama kao obiteljski ili rani oblik Alzheimerove bolesti (engl. *early-onset Alzheimer's disease*), a do sada su poznata tri gena čije mutacije uzrokuju taj oblik (Bird, 2005). Najprije su otkrivene mutacije u genu za prekursor amiloidnog proteina (APP) na kromosomu 21q21, koje se uglavnom nalaze na ili u blizini mjesta cijepanja γ-sekretazom (Finckh i sur., 2005), a poznat je i tip mutacija na mjestu cijepanja β-sekretazom (Shi i sur., 2005). Mutacije u genu za presenilin 1 na kromosomu 14q24 (*PSEN1*) i presenilin 2 na kromosomu 1q42 (*PSEN2*) koji kodiraju proteine γ-sekretaznog kompleksa, bitne u zadnjem koraku cijepanja APP i stvaranju Aβ40 ili Aβ42 proteina (u zavisnosti od pozicije cijepanja), druga su dva tipa mutacija koje uzrokuju obiteljski oblik Alzheimerove bolesti. Najteži oblik uzrokuju mutacije u *PSEN1* te svi nosioci razvijaju simptome već prije 50. godine života. Mutacije triju navedenih gena odgovorne su za manje od 5% ukupnog broja oboljelih od Alzheimerove bolesti (Bird, 2005).

#### 1.1.1.2 Kasni ili sporadični oblik Alzheimerove bolesti

Drugi oblik Alzheimerove bolesti je sporadični ili kasni (engl. *late-onset Alzheimer's disease*). Nastaje u kasnijoj životnoj dobi, obično nakon 65. godine života i primarni je uzrok demencije u gotovo 70% slučajeva. Dob ujedno predstavlja i najznačajniji rizični čimbenik za nastanak bolesti, a rizik od nastanka raste gotovo eksponencijalno nakon dobi od 65 godina (Reitz i Mayeux, 2014). Budući da oko 25% oboljelih od sporadičnog ili kasnog oblika Alzheimerove bolesti imaju bliske srodnike koji boluju od nekog oblika demencije, misli se da i mutacije u drugim genima pridonose riziku nastanka bolesti (Bird, 2005). Polimorfizam *APOE* gena što kodira za apolipoprotein E, koji je uključen u transport i metabolizam lipida, smatra se najvažnijim genetskim čimbenikom rizika sporadične Alzheimerove bolesti. Heterozigoti *APOE*-ε4 alela imaju 3-4% veći rizik od nastanka bolesti, a homozigoti 9-10%.

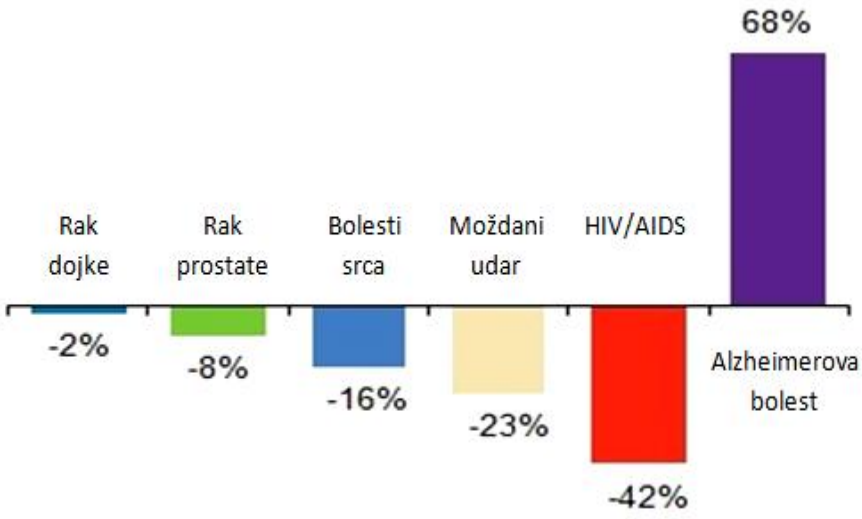
U populaciji oboljelih, 45% osoba su nositelji tog alela (Tokuda i sur., 2000). Većinom se radi o mutacijama gena koji kodiraju enzime uključene u mehanizam nastanka i degradacije Aβ koji se nalaze na kromosomima 10 i 12, genu za mikrotubulima-pridruženi protein tau (*MAPT*, engl. *microtubule-associated protein tau*) i drugima (Imbimbo i sur., 2005).

Okolišni čimbenici također mogu utjecati na rizik obolijevanja od Alzheimerove bolesti, a mehanizam djelovanja za većinu nije do kraja poznat i u istraživanjima se mogu naći oprečni rezultati. Pokazano je da traumatska ozljeda glave uzrokuje nakupljanje Aβ i hiperfosforilaciju proteina tau te povećava rizik za nastanak Alzheimerove bolesti (Fleminger i sur., 2003). Dijabetes tipa II može gotovo udvostručiti rizik (Luchsinger i sur., 2001), a cerebrovaskularne bolesti, visoki krvni tlak i razine lipida u plazmi također su rizični čimbenici. Umjerena konzumacija alkohola kao što je crno vino mogu smanjiti rizik, dok ostala pića nemaju utjecaj ili ga povećavaju (Reitz i Mayeux, 2014). Tumačenja utjecaja pušenja na nastanak bolesti također su kontroverzna. U nekolicini studija povećan rizik dovodi se u vezu sa većom koncentracijom slobodnih radikala i oksidativnim stresom ili pak utjecajem na imunološki sustav te posljedično aktivacijom fagocita i oksidativnim oštećenjem (Traber i sur., 2000). Druge studije sklonije su tumačiti djelovanje nikotina blagotvornim uslijed povećanja broja nikotinskih acetilkolinskih receptora (nAChR, od engl. *Nicotinic acetylcholine receptors*), kojih je u bolesnika s Alzheimerovom bolesti inače manji broj u odnosu na normalne vrijednosti. Mediteranska prehrana preporučuje se zbog velikog udjela povrća i ribe, a također je bogata polinezasićenim masnim kiselinama i antioksidansima, prvenstveno vitaminima E i C. Na smanjenje rizika obolijevanja utječe i fizička i intelektualna aktivnost (Reitz i Mayeux, 2014).

### 1.1.2 Prevalencija i incidencija Alzheimerove bolesti

U svijetu je 2005. godine bilo 24.2 milijuna oboljelih, a svake godine dodatno još oboli 4.6 milijuna ljudi. Kako se taj broj udvostručuje svakih 20 godina, procjenjuje se kako će 2040. godine u svijetu biti 81.1 milijun oboljelih (Ferri i sur., 2005). Prevalencija raste eksponencijalno nakon dobi od 60 godina s najvećom stopom u 70-im i 80-tim godinama života, a najveću prevalenciju i incidenciju imaju Sjeverna Amerika i zapadna Europa te, nešto manju, Južna Amerika, Kina i zapadni Pacifik. Samo u Americi je 2015. godine bilo 5.3 milijuna oboljelih od čega se 5.1 milijun odnosi na sporadični oblik Alzheimerove bolesti, a

čak dvije trećine oboljelih su žene. Do 2050. godine očekuje se da će se broj oboljelih utrostručiti, odnosno da će ih biti oko 13.8 milijuna. Alzheimerova bolest se tako nalazi među 10 najčešćih uzroka smrti u Americi, a od njih je jedini koji se ne može ni prevenirati niti liječiti. Gotovo 60% od ukupnog broja njegovatelja brine o osobama oboljelim od Alzheimerove bolesti i drugim demencijama (http://www.alz.org/facts/). Dok se smrtnost od drugih bolesti kao što su rak dojke, prostate, kardiovaskularne bolesti (napose moždani udar) i AIDS (stečeni sindrom imunodeficijencije zbog infekcije virusom HIV) smanjuje, smrtnost kao posljedica Alzheimerove bolesti je u porastu (**Slika 2**). Rizik za nastanak bolesti nakon dobi od 80 godina doseže 50% što je vrlo zabrinjavajuće s obzirom na sve dulji životni vijek ljudi. Stoga se bolje razumijevanje mehanizma nastanka bolesti i čimbenika rizika te pronalazak lijeka stavlja među prioritete za buduće znanstvene studije (Schrijvers i sur., 2012).




**Slika 2.** Promjena smrtnosti Alzheimerove bolesti u odnosu na ostale česte uzročnike u razdoblju od 2000. do 2010. godine (preuzeto i prilagođeno prema: http://act.alz.org/site/DocServer/2012_ABA_Fact_Sheet.pst.sl.?docID=1921)

### 1.1.3 Molekularni mehanizmi nastanka Alzheimerove bolesti

Do sada je predloženo nekoliko hipoteza koje nastoje objasniti nastanak patoloških promjena i degeneraciju neurona i sinapsi u Alzheimerove bolesti. Te su hipoteze povezane s hiperfosforilacijom proteina citoskeleta, oksidativnim stresom, upalnim procesima, metabolizmom Aβ, ekscitotoksičnošću glutamatom i drugim dokumentiranim abnormalnostima u Alzheimerovoj bolesti. Vodeće su amiloidna i tau hipoteza, a među zastupljenijima su još i hipoteza oksidativnog stresa, poremećaja staničnog ciklusa, funkcije mitohondrija, neurovaskularne disfunkcije te upale (Chopra i sur., 2011.). Neke od zastupljenijih hipoteza opisane su u nastavku, a „tau hipoteza" detaljnije je razrađena u sljedećem odjeljku s obzirom na njezin značaj za temu ovog rada.

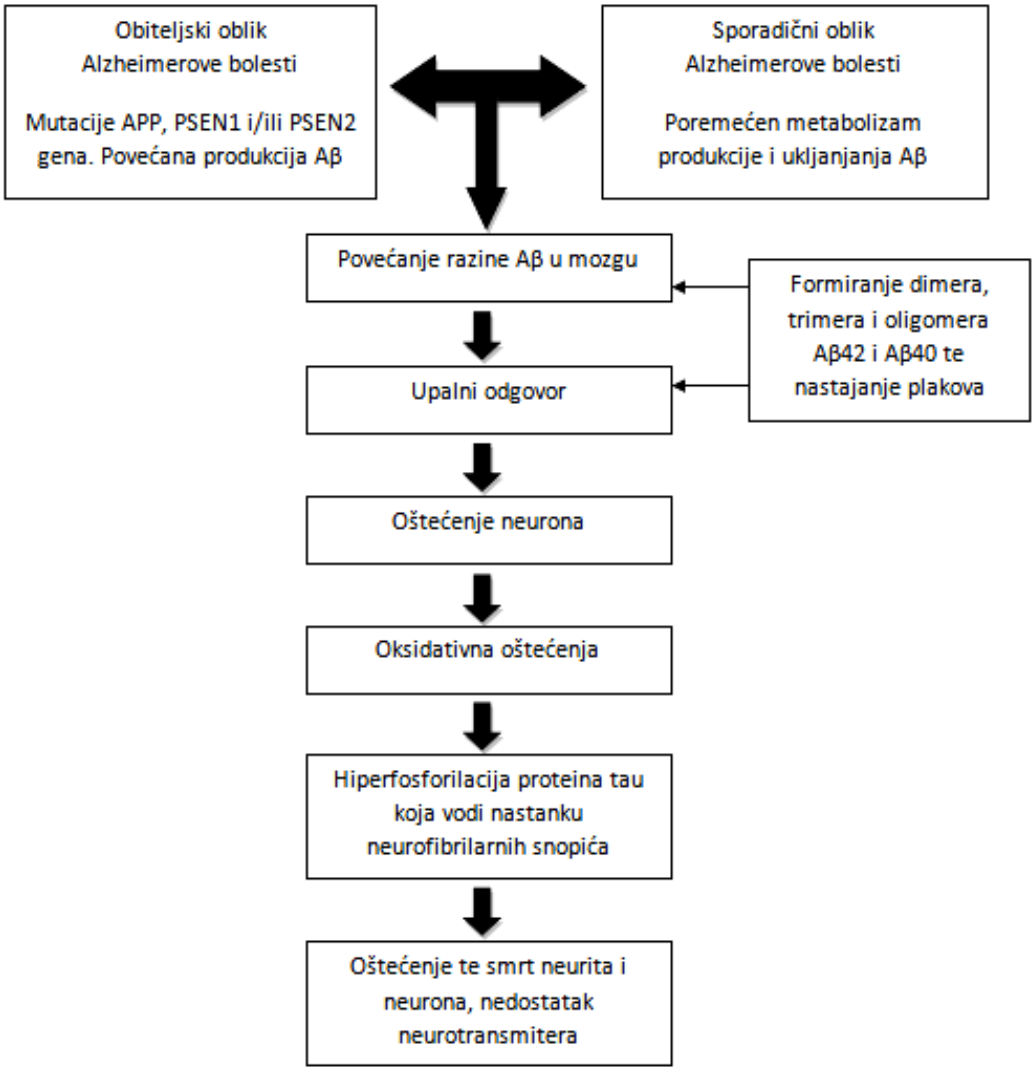
#### 1.1.3.1 Amiloid β i amiloidna hipoteza

Cijepanjem transmembranskog proteina APP α- ili β- te γ-sekretazom nastaju peptidi različite duljine. Neamiloidogeni put cijepanja uključuje cijepanje α-sekretazom unutar regije Aβ te nastaje kraći peptid p3 ($A\beta_{17-40/42}$), koji se ne nakuplja u obliku plakova (Kojro i Fahrenholz, 2005). Alternativni put je amiloidogeni put u kojem aspartil proteaza ili β-sekretaza vezana za staničnu membranu cijepa APP pri čemu u membrani ostaje fragment C99. Njegovim cijepanjem kompleksom γ-sekretaze se otpušta Aβ peptid koji je većinom dug 40 aminokiselina, dok je oko 10% izoformi dugo 42 aminokiseline. Dulji oblik lakše agregira i pretpostavlja se da lakše od kraćega inicira nastanak oligomera, fibrila i plakova. Izvanstanične nakupine Aβ mogu se sistemski naći i u drugim organima gdje su velike i amorfne, dok u mozgu tvore oligomere, formiraju β-ploče i agregiraju u manje, relativno jasno ograničene kuglaste nakupine zvane senilni (amiloidni) plakovi (Jarrett i sur., 1993).

Prema amiloidnoj hipotezi, Alzheimerova boelst je posljedica poremećenog metabolizma APP, odnosno proizvodnje, agregacije i odlaganja Aβ te nemogućnosti njegovog odstranjenja. Te patološke promjene vjerojatno prethode, a možda i uzrokuju hiperfosforilaciju proteina tau i nastanak neurofibrilarnih snopića. Ta je hipoteza predložena nakon otkrića mutacije gena za APP kod oboljelih od ranog oblika Alzheimerove bolesti. Dodatna činjenica koja govori u prilog navedenoj hipotezi jest da se kod osoba s Downovim

sindromom, koje imaju tri kopije kromosoma 21 na kojem je gen za APP, jako rano (u dvadesetim, najkasnije tridesetim godinama života) uočavaju patološke promjene povezane s nastankom suviška Aβ i oblikovanja senilnih i neuritičkih plakova te neizbježan nastanak sindroma demencije sličan onome kakav se vidi u Alzheimerovoj bolesti (Hardy i Allsop, 1991). Također, mutacije u presenilinu 1 (*PSEN1*) ili presenilinu 2 (*PSEN2*), proteinima aktivnog mjesta γ sekretaznog kompleksa koji sadrži i tri kofaktora (nikastrin, Aph1, eng. *anterior pharynx defective*, te Pen2, eng. *presenilin enhancer 2*), uzrokuju povećano cijepanje APP amiloidogenim putem i proizvodnju Aβ te nastanak ranog oblika Alzheimerove bolesti. Nadalje, istraživanja mutacija *MAPT* gena za protein tau pokazala su da do nastanka neurofibrilarnih snopića u mozgu oboljelih može doći i bez prisutnosti amiloidnih plakova, što možda ide u prilog hipotezi da neurofibrilarni snopići u AD (gdje većina bolesnika nema nikakvih promjena *MAPT* gena) nastaju nakon promjene metabolizma Aβ i njegovog odlaganja izvan stanica (Hardy i Selkoe, 2002).

Ni broj niti ukupni volumen depozita amiloida nije u korelaciji s težinom kliničke slike, odnosno težinom sindroma demencije (Hyman, 1997). Postmortalnom analizom se pokazalo da i ljudi bez simptoma demencije mogu imati nakupine topljivih depozita amiloida u mozgu, kao i senilnih (ali ne i neuritičkih) plakova, što je najčešći prigovor amiloidnoj hipotezi. Nadalje, *in vitro* istraživanjima nije jasno pokazano kojim intenzitetom pojedine mutacije *APP*, *PSEN1* i *PSEN2* gena pridonose riziku za nastanak patoloških promjena karakterističnih za Alzheimerovu bolest (Houlden i sur., 2000). Također je pokazano da toksično djelovanje mogu imati topljivi oligomeri Aβ pa se pretpostavlja kako agregati Aβ u Alzheimerovoj bolesti i drugim neurodegenerativnim bolestima predstavljaju sekvestraciju neaktivnih vrsta, tj. zaštitni odgovor (Walsh i sur., 2002). **Slika 3** shematski prikazuje hipotetski slijed događaja koji prema amiloidnoj hipotezi dovode do nastanka Alzheimerove bolesti.




**Slika 3.** Shematski prikaz kaskade nastanka Alzheimerove bolesti prema amiloidnoj hipotezi

(prilagođeno prema Chopra i sur., 2011).

### 1.1.3.2 Hipoteza oksidativnog stresa

Prema hipotezi oksidativnog stresa glavni uzrok patoloških promjena u mozgu su slobodni radikali ili oksidansi. Te visoko reaktivne kisikove i dušikove vrste visokim afinitetom, ali nespecifično, reagiraju s drugim makromolekulama u stanici što dovodi do gubitka ili promjene njihove biološke funkcije. Oksidansi nastaju tijekom normalnog metabolizma stanice, ali redoks ravnotežu održavaju različite vrste antioksidansa ili reducensa. Smatra se da starenjem dolazi do iscrpljenja antioksidativnog sustava stanica (superoksid dismutaze, katalaze, glutation peroksidaze, reduktaze i drugih), posebno one velike većine živčanih stanica koje se ne mogu obnoviti diobom. Na taj način oksidativnim oštećenjem APP i enzima koji sudjeluju u njegovom metabolizmu, te oksidativnim oštećenjem Aβ i proteina tau dolazi do njihovog nakupljanja što za posljedicu ima daljnje povećanje oksidativnog stresa i aktivaciju upalnog odgovora. To u konačnici dovodi do degeneracije sinapsi, stanične smrti i manifestacije simptoma Alzheimerove bolesti (Praticò, 2008).

Istraživanja su pokazala značajno povećano oštećenje oksidativnim stresom postmortalnom analizom mozgova ljudi oboljelih od Alzheimerove bolesti, osobito u kori mozga čeonog i sljepoočnog režnja. Povećano oštećenje oksidativnim stresom se podudara s područjima mozga u kojima se nakupljaju senilni plakovi i neurofibrilarni snopići, a u prilog toj tvrdnji govori činjenica što značajno oksidativno oštećenje nije zamijećeno u malom mozgu, gdje ne dolazi do nastanka neuropatoloških promjena karakterističnih za Alzheimerovu bolest (Lauderdack i sur., 2001). Osim toga, povećana je koncentracija biomarkera oksidativnog stresa u cerebrospinalnoj tekućini pacijenata sa Alzheimerovom bolesti i MCI, a pokazano je i povećanje hidroksilacije gvanina za kojega kisikovi radikali imaju najveći afinitet (Wang i sur., 2006). *In vivo* istraživanja pokazuju povećanu lipidnu peroksidaciju i koncentraciju dušikovih reaktivnih vrsta prije stvaranja amiloidnih plakova. Tiamin (vitamin $B_1$), α-tokoferol (vitamin E), melatonin i kurkumin neke su od antioksidativnih molekula koje su u tom istraživanju pokazale učinak odgode nastanka karakterističnih promjena. Ipak, klinička istraživanja istih spojeva kod ljudi su dala oprečne rezultate (Praticò, 2008).

#### 1.1.3.3 Hipoteza mitohondrijske kaskade

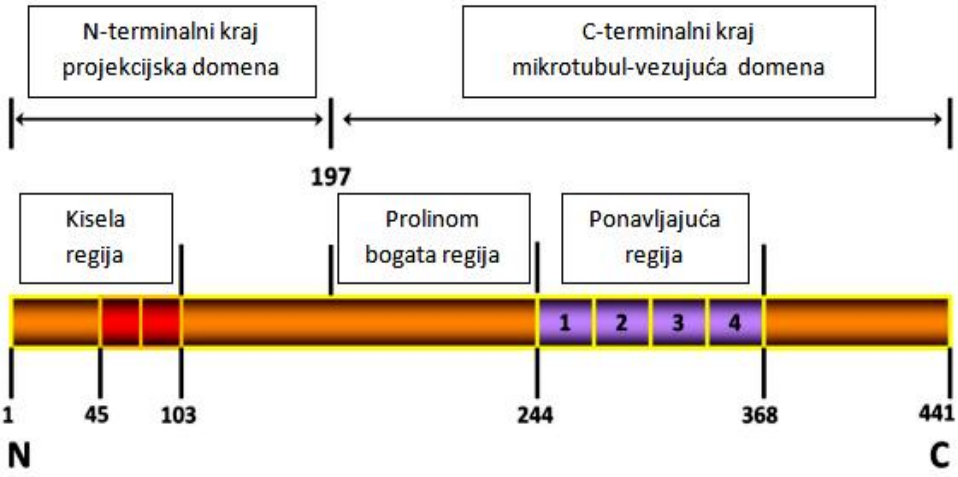
Prema toj hipotezi sporadični i obiteljski oblik Alzheimerove bolesti imaju različitu etiologiju, a povezuje ih disfunkcija mitohondrija. Pretpostavlja se da nasljeđe uvjetuje funkciju i trajanje mitohondrija koji se mijenjaju starenjem. U obiteljskom obliku Alzheimerove bolesti povećana produkcija Aβ narušava funkciju mitohondrija što posljedično dovodi do drugih histopatoloških promjena i pojave bolesti. Mitohondrijsko nasljeđe bi u tom slučaju utjecalo na vrijeme pojave te progresiju bolesti. Sporadični oblik Alzheimerove bolesti prema ovoj hipotezi javlja se kada promjene koje se tijekom godina nakupljaju dosegnu kritičnu razinu. Sekundarno se povećava proizvodnja Aβ i nastanak plakova, te dolazi do hiperfosforilacije proteina tau, oblikovanja neurofibrilarnih snopića, poremećaja staničnog ciklusa, gubitka sinapsi i nerodegeneracije (Swerdlow i Khan, 2004).

Istraživanja koja podupiru tu hipotezu su pokazala da je nakupljanje mutacija i smanjenje metabolizma mitohondrija u korelaciji sa starenjem. Najveći utjecaj starenje ima na aktivnost mitohondrijskog enzima citokrom-oksidaze (CO), ali još uvijek nije jasno razjašnjeno je li to posljedica mutacija u genima jezgre ili mitohondrija, promjene strukture proteina ili oboje (Swerdlow i Kish, 2002). U pacijenata s Alzheimerovom bolesti aktivnost CO smanjena je 10-50% u odnosu na kontrolnu skupinu iste dobi, a djeca tih osoba imaju također smanjenu aktivnost u odnosu na kontrolnu skupinu (Valla i sur., 2006). Također je pokazano smanjenje aktivnosti kompleksa I, IV i povećanje proizvodnje slobodnih radikala, ali ne i smanjenje broja mitohondrija (Navarro i Boveris, 2007). Pretpostavlja se da narušena oksidativna fosforilacija, inhibicija sinteze adenozin trifosfata (ATP) te inhibicija CO mijenjaju metabolizam APP, potičući njegovo cijepanje amiloidogenim putem (Swerdlow, 2007). Pokazano je također da smanjenje produkcije energije u stanici dovodi do povećane fosforilacije proteina tau (Swerdlow i Khan, 2009).

## *1.2 Protein tau i utjecaj promjena proteina tau na degeneraciju živčanih stanica*

### 1.2.1 Protein tau

Protein tau je mikrotubulima pridruženi protein (MAP, od engl. *microtubule-associated protein*), koji pospješuje slaganje i stabilnost mikrotubula te je uključen u regulaciju aksonskog transporta i polarnost neurona. Vezanje proteina tau s tubulinom (proteinom čiji dimeri tvore mikrotubule) glavni je proces koji određuje dinamičku ravnotežu mikrotubula, odnosno omjer njihove polimerizacije i depolimerizacije. U taj proces su uključeni i drugi MAP proteini kao što u MAP1A, MAP1B i MAP2, zbog čega nedostatak proteina tau nije letalan već uzrokuje samo blagi aksonski poremećaj (Harada i sur., 1994). Vezujući nekoliko drugih proteina, protein tau ima i ulogu u provođenju signala i regulaciji ostalih elemenata citoskeleta (Correas i sur., 1990). Eksprimiran je u cijelom živčanom sustavu te lokaliziran uglavnom u aksonima (Binder i sur., 1985) iako postoje značajne količine proteina tau i u dendritima (Kosik i sur., 1989) te u jezgri (Brady i sur., 1995). Protein tau je također prisutan u astrocitima i oligodendricitima (LoPresti i sur., 1995). Fosforilacija proteina tau je normalno povećana samo u fetalnom razvitku kada je eksprimirana samo jedna, najmanja izoforma proteina tau. Dosada je otkriveno 6 izoformi proteina tau koje nastaju alternativnim prekrajanjem transkripta *MAPT* gena na kromosomu 17q21. Izoforme proteina tau se razlikuju u jednom ili dva dodatka na N-terminalnom kraju, odnosno postojanju 3 ili 4 ponavljanja u domeni koja veže mikrotubule (na C-terminalnom kraju) (Šimić i sur., 2016). Fetalni oblik ima 3 ponavljanja na C-terminalnom kraju i nema niti jedan dodatak blizu N-terminalnog kraja, što uz povećanu fosforilaciju uzrokuje manji afinitet vezanja za mikrotubule te omogućava veliku plastičnost čunjića rasta prilikom elongacije aksona. Ta je plastičnost tijekom embriogeneze i fetalnog razvitka neophodna za normalan razvitak mozga (Goedert i sur., 1989a; Jovanov-Milošević i sur., 2012). U mozgu zdravih ljudi udio proteina tau sa 4 i 3 ponavljanja je podjednak dok se omjer uglavnom povećava u tauopatijama (Goedert i sur., 1989b). Shematski prikaz regija proteina tau prikazan je na **slici 4.**

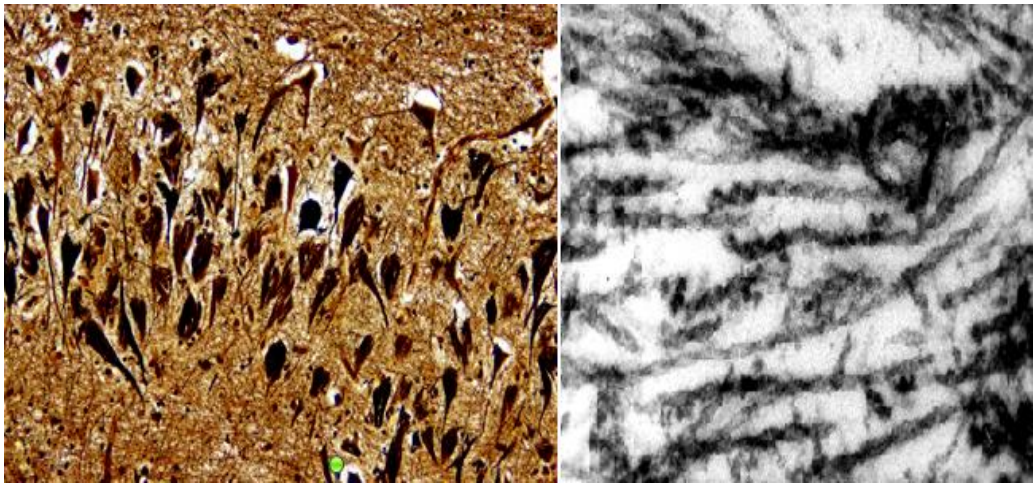



**Slika 4.** Shematski prikaz najdulje izoforme proteina tau duge 441 aminokiselinu. Crveno su označene insercijske regije, a ljubičasto i brojevima 1-4 ponavljajuće tau regije u domeni koja se veže za mikrotubule, a po čijoj se kombinaciji razlikuju izoforme proteina tau (preuzeto i prilagođeno prema Luna-Muñoz i sur., 2013).

### 1.2.2 Utjecaj promjena proteina tau na degeneraciju živčanih stanica

Neuritički plakovi i neurofibrilarni snopići (NFT od engl. *neurofibrillary tangles*), koji su uz amiloidne plakove karakteristično patološko obilježje Alzheimerove bolesti, sastavljeni su od hiperfosforiliranog proteina tau, a ultrastrukturalno imaju oblik nakupina sparenih uzvojitih (PHF, od engl. *paired helical filaments*) ili ravnih niti (SF, od engl. *straight filaments*) (**Slika 5**). NFT se uglavnom nakupljaju u tijelu i dendritima neurona kore velikog mozga i hipokampusa čiji aksoni prolaze kroz područja gdje se u uznapredovalim stadijima Alzheimerove boelsti nalaze amiloidni plakovi, dok su neuritički plakovi, odnosno distrofični neuriti, najkarakterističnija neuropatološka promjena u mozgu oboljelih i sastoje se od istovremene prisutnosti obiju navedenih vrsta promjena: srži od amiloida koju okružuju distrofični neuriti sačinjeni od hiperfosforiliranih proteina tau (Stoothoff i Johnson, 2005). Patologija proteina tau je prisutna i u brojnim drugim neurodegenerativnim bolestima u kojima ne dolazi do nakupljanja Aβ. Ta stanja nazivamo taupatijama, a u njih ubrajamo progresivnu supranuklearnu paralizu (PSP), frontotemporalnu demenciju s parkinsonizmom (FTDP-17) i kortikobazalnu degeneraciju (CBD, od engl. *Corticobasal degeneration*)

(Heutink, 2000). Nasuprot tome, bolesti u kojima nastaju patološke promjene peptida Aβ slične onima u Alzheimerovoj bolesti, kao što su sporadična cerebralna amiloidna angiopatija (CAA) (Coria i sur., 1987) i nasljedna cerebralna hemoragija sa amiloidozom nizozemskog tipa (Levy i sur., 1990) ne uzrokuju demenciju već raniji nastup moždanog udara, što ukazuje da patologija Aβ ne mora uzrokovati samo gubitak neurona i kognitivnih sposobnosti u bolesnika s Alzheimerovom bolesti, već i druge simptome i patološke promjene. Otkrićem mutacije *MAPT* gena koja uzrokuje nasljednu FTDP-17, patologija proteina tau počela se intenzivnije razmatrati kao ključna u nastanku Alzheimerove bolesti (Iqbal i sur., 2009). Do sada su poznate najmanje 32 patološke mutacije u više od 100 obitelji, a gotovo polovina tih mutacija smanjuje sposobnost interakcije proteina tau s mikrotubulima i povećava sklonost agregaciji, dok ostale remete omjer izoformi proteina tau (D'Souza i Schellenberg, 2005). No, mutacije unutar gena za protein tau ne dovode do nastanka Alzheimerove bolesti. Stoga je predložena tau hipoteza prema kojoj hiperfosforilacija proteina tau dovodi do destabilizacija mikrotubula što rezultira gubitkom citoplazmatskog skeleta dendrita i gubitkom sinapsi, degeneracijom membrane te smrti stanice (Iqbal i sur., 2009). *In vitro* i *in vivo* istraživanjima je pokazano da je protein tau možda mogući efektorni mehanizam „toksičnosti Aβ" (Rapoport i sur., 2002; Roberson i sur., 2007), ali i obrnuto, jer se pretpostavlja da aksonski deficit uzrokovan disfunkcijom proteina tau dovodi do poremećenog metabolizma APP i povećanja razine Aβ (Stokin i sur., 2005).



**Slika 5.** Prikaz neurofibrilarnih snopića u CA1 području hipokampalne formacije (lijevo) i elektronsko-mikroskopski prikaz uzvojitih sparenih niti od kojih se sastoje neurofibrilarni snopići (desno) (preuzeto sa http://neuropathology-web.org/chapter9/chapter9bAD.html)

### 1.2.3 Mehanizam nastanka patoloških promjena proteina tau

Novija istraživanja nastoje detaljnije razjasniti ulogu proteina tau u patologiji Alzheimerovoj bolesti budući da je broj NFT u mozgu u pozitivnoj korelaciji s progresijom bolesti. Nasuprot tome, broj senilnih plakova nije u direktnoj korelaciji s progresijom same bolesti (Medina, 2011). Nekoliko je teorija koje objašnjavaju mehanizam toksičnosti proteina tau, a dobitak toksične funkcije (engl. *toxic gain of function*) pretpostavlja da su hiperfosforilirani protein tau, njegovi oligomeri i NFT toksični (Geschwind, 2003). U eksperimentalnom modelu koji eksprimira modificirani protein tau sklon agregaciji, nakon njegovog utišavanja pokazano je poboljšanje kognitivnih funkcija, ali se nastavlja formiranje NFT. Na osnovu toga je predloženo da toksičan učinak imaju topivi i oligomerni oblici proteina tau (Kopeikina i sur., 2012), a da je formiranje NFT obrambeni mehanizam stanice (Santa Cruz i sur., 2005). Teorija gubitka funkcije (engl. *loss of function*) predlaže da hiperfosforilacija proteina tau i gubitak afiniteta za mikrotubule onemogućava održavanje njihove stabilnosti te dovodi do narušavanja aksonskog transporta i ugrožava vijabilnost stanice. To je pokazano već u ranim stadijima nastanka Alzheimerove bolesti na mišjem modelu kada još ne dolazi do formiranja NFT i amiloidnih plakova (Feinstein i Wilson, 2005). Ipak, smatra se da patologiji Alzheimerove bolesti pridonose oba navedena mehanizma (Medina i Avila, 2014).

Nedavno je pokazano da jednom kada se promjeni metabolizam proteina tau i dođe do agregacije bilo da je ona uzrokovana hiperfosforilacijom, konformacijskim promjenama ili drugim posttranslacijskim modifikacijama, dolazi do širenja proteina tau sličnog onome u prionskim bolestima. Agregati modificiranog proteina tau vežu druge nativne proteine tau šireći toksičan učinak u stanici (Šimić i sur., 2016). U tim uvjetima većina oligomera izbjegne degradacijske mehanizme proteasoma i autofagije te kretanjem citoplazme dospijeva do živčanih završetaka, dovodeći do narušavanja funkcije sinapse (Clavaguera i sur., 2013). Nakon što dospiju u izvanstanični prostor mogu se širiti u susjedne neurone gdje uzrokuju iste patološke promjene. Na taj način dolazi do širenja neurofibrilarne degeneracije. Tako se npr. oligomeri proteina tau iz II sloja neurona entorinalne moždane kore transgeničnog mišjeg modela šire u girus dentatus, CA regiju hipokampusa i cingularnu vijugu (Lasagna-Reeves i sur., 2012). Također su uočene strukture kružnih protofibrila (engl. *annular protofibrils*) koje oponašaju proteine koji čine pore na membranama neurona. Ove strukture su u neuronima oboljelih od Alzheimerove bolesti formirane od Aβ, α sinukleina i proteina tau. Pore na taj

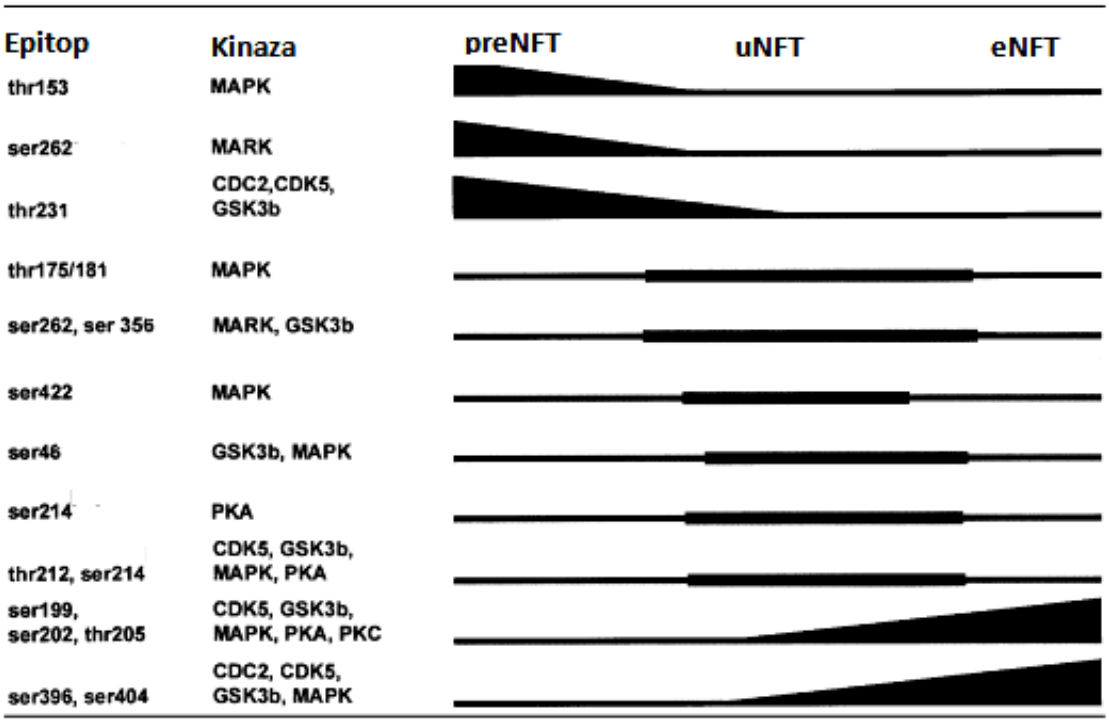
način narušavaju propusnost membrane uzrokujući oštećenje i smrt stanice te pridonose širenju patologije proteina tau (Lasagna-Reeves i sur., 2014).

### 1.2.4 Fosforilacija proteina tau i moguće implikacije u dijagnostici

Iako još nije potvrđeno je li povećana fosforilacija uzrok agregacije proteina tau ili je njezina posljedica, snažna korelacija hiperfosforilacije i patologije proteina tau s progresijom bolesti usmjerila je istraživanja prema njegovim kinazama i fosfatazama u svrhu iznalaženja potencijalnih terapeutika. Za razliku od kontrolne skupine iste dobi, u likvoru bolesnika s Alzheimerovom bolesti ukupna količina proteina tau je povećana 3-4 puta, a koncentracija $A\beta_{1-42}$ je smanjena za oko 50% (Blennow, 2004). Ukupni protein tau i $A\beta_{1-42}$ mjereni u likvoru ne dosežu dovoljne vrijednosti osjetljivosti i specifičnosti te ne mogu razlikovati Alzheimerovu bolest od frontotemporalne demencije, demencije Lewyevih tjelešaca i vaskularne demencije. Specifičnost proteina tau u dijagnostici Alzheimerove bolesti se može poboljšati ukoliko se promatra i koncentracija fosforiliranog proteina tau u likvoru. Najbolje proučeni fosforilirani proteini tau kao biomarkeri su proteini tau fosforilirani na epitopima treonin 181, serin 199 i treonin 231 (p-tau181, p-tau199 i p-tau231) te se njihovim mjerenjem može s 90%-tnom sigurnošću postaviti dijagnoza, a s gotovo jednakom točnošću predvidjeti i prisutnost Alzheimerove bolesti kod pacijenata s MCI (Mitchell i Brindle, 2003; Babić i sur., 2014).

Do sada je identificirano 45 fosforilacijskih mjesta proteina tau u bolesnika s Alzheimerovom bolesti što je više od polovine od 85 mogućih mjesta fosforilacije (Hanger i sur., 2007). Pokazano je da tijekom progresije bolesti dolazi do specifične fosforilacije proteina tau. Tako se pThr231, pSer262 i pThr153 nalaze uglavnom u neuronima s ranim neurofibrilarnim promjenama (pre-NFT) kada su vidljive samo točkaste nakupine u citoplazmi, dendritima i jezgri. Unutarstanični NFT (iNFT, od engl. *intracellular*) sadrže pThr175/181, pSer262/pS356, pSer422, pSer46 i pSer214 fosfo-tau epitope, a izvanstanični (eNFT, od engl. *extracellular*) pSer199/pS202/pThr205, pThr212/pSer214 i pSer396/pS404 fosfo-tau epitope (Augustinack i sur., 2002). Nekoliko kinaza fosforilira protein tau uključujući prolinom usmjerene kinaze (PDPK, od engl. *proline-directed protein kinase*) kao što je kinaza glikogen sintaze 3β (GSK-3β, od engl. *glycogen syntase kinase 3β*), ciklin ovisna kinaza 5 (CDK-5, od engl. *cyclin-dependent kinase 5*), dvostruko-specifična fosforiliranim

tirozinom regulirana kinaza 1A (Dyrk1A, od engl. *dual-specifity tyrosine phosphorylated-regulated kinase 1A*) te ne-PDPK kinaze kao što je kalcij-kalmodulinom aktivirana protein kinaza II (CaMKinase II, od engl. *calcium calmodulin-activeted protein kinase II*) (Gong i sur., 1995). U Alzheimerovoj bolesti je narušena aktivnost većeg broja kinaza te je fosforilacija proteina tau ne samo mjesno specifična, nego i kinazno specifična (Liu i sur., 2006). **Slika 6** prikazuje epitope i kinaze koje ih fosforiliraju te zastupljenost fosforilacije u NFT. Povećana fosforilacija može biti i posljedica narušene fosfatazne aktivnosti. Protein fosfataza 2A (PP, od engl. *protein phosphatase*) glavni je regulator fosforiliranosti proteina tau i glavna Ser/Thr-fosfataza u ljudskom mozgu. Obavlja više od 70% fosfatazne aktivnosti koja je narušena u bolesnika s Alzheimerovom bolesti (Gong i sur., 1993). U slučaju smanjene aktivnosti i direktnog povećanja fosforiliranosti, njezina inhibicija aktivira dodatno CaMKII, protein kinazu A (PK, od engl. *protein kinase* A) i mitogenima aktivirane kinaze (MAPK, od engl. *Mitogen-activated protein kinases*) (čija je aktivnost negativno regulirana s PP2A). Uz PP2A, u defosforilaciji proteina tau sudjeluju i PP1, 2B te 5 (Iqbal i sur., 2005). Osim same kinazne i fosfatazne aktivnosti, na fosforiliranost utječu i druge posttranslacijske modifikacije proteina tau kao što su acetilacija i *O*-glikozilacija (*O*-GlcNAc, od engl. *O-linked β-N-acetylglucosamine*) (Liu i sur., 2009). Razvoj novih terapeutika usmjeren je na aktivaciju PP2A, inhibiciju protein tau kinaza i promociju *O*-glikozilacije s obzirom da je ona smanjena u bolesnika s Alzheimerovom bolesti. Pasivnom imunizacijom nastoji se ukloniti promijenjene proteine tau i neutralizirati ih te inhibirati agregaciju. Nadalje, dodatni ciljevi su stabilizirati mikrotubule, unaprijediti neurogenezu i povećati plastičnost neurona (Iqbal i sur., 2014).




**Slika 6.** Najvažniji epitopi fosforilirani u Alzheimerovoj bolesti i njihove kinaze. Desno je prikazano u kojem stadiju neurofibrilarne degeneracije dolazi do fosforilacije pojedinog epitopa (preuzeto i prilagođeno prema Augustinack i sur., 2002).

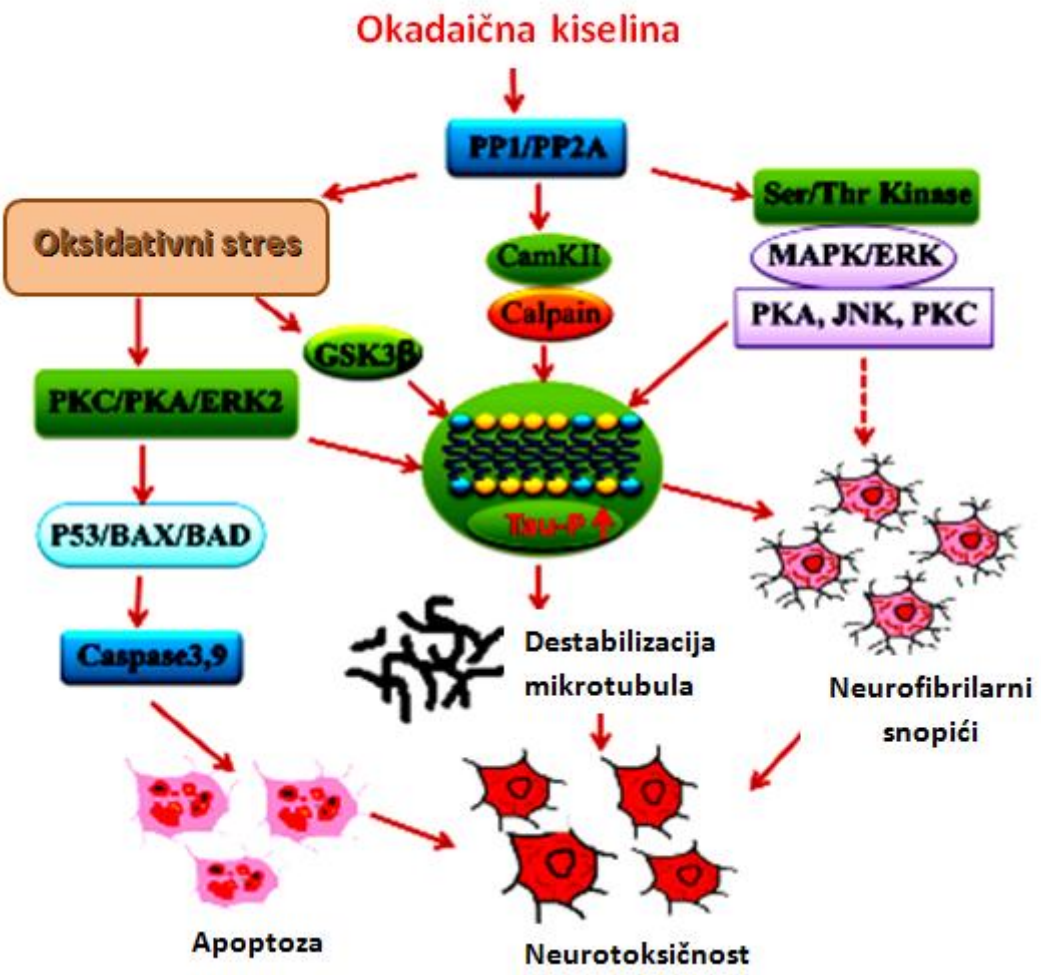
Kao posljedica činjenice da je u Alzheimerovoj bolesti metilacija PP2A reducirana za oko 50% (PP2A je u zdravih osoba gotovo u potpunosti metilirana), jedan od trenutno najizglednijih pristupa u svrhu mogućeg liječenja jest povećanje aktivnosti fosfataza proteina tau, napose putem pojačane metilacije PP2A. Taj se učinak može postići inhibicijom PP2A metil-esteraze (enzim koji demetilira PP2A). Posebno je zanimljivo da je jedna od malih netoksičnih molekula pronađenih u kavi (eikozanoil-5-hidroksitriptamid, EHT) otkrivena kao potentan inhibitor PP2A metil-esteraze (inhibira demetilaciju njezine katalitičke podjedinice PP2Ac), a njezino dodavanje u hranu kroz 6-12 mjeseci imalo je značajan učinak u smislu poboljšanja kognitivnih i motoričkih sposobnosti u štakorskom modelu tauopatije (Basurto-Islas i sur., 2014).

## *1.3 Okadaična kiselina*

Okadaična kiselina (OK) je polieter masne kiseline duge 38 ugljikovih atoma. Prvi put je izolirana iz crne spužve *Hallichondria okadaii* te kasnije i dinoflagelata *Prorocentrum lima* i *Dinophysis acuta.* Poznati je neurotoksin koji uzrokuje proljev uslijed trovanja školjkama. Zahvaljujući nespecifičnoj inhibiciji Ser/Thr fosfataza našla je široku primjenu u različitim istraživanjima, a budući da najveći utjecaj ima na inhibiciju PP2A sve više se koristi i u istraživanjima Alzheimerove bolesti (Medina i sur., 2013). He i sur. (2005) u svom su istraživanju pokazali da OK narušava pamćenje uzrokujući gubitak piramidalnih stanica CA1 regije hipokampusa i apoptozu stanica hipokampusa. Na dalje, u *in vivo* istraživanjima pokazalo se da injektiranje OK u lateralni ventrikul štakora uzrokuje neuropatološke promjene slične Alzheimerovoj bolesti, odnosno uzrokuje neurodegeneraciju, pojavu PHF sličnih struktura hiperfosforiliranog tau proteina te struktura sličnih plakovima građenih od Aβ. Na osnovi toga predložen je tretman OK kao potencijalni model za istraživanja patologije Alzheimerove bolesti i uloge PPA2 te općenito uloge fosfataza u regulaciji fosforilacije proteina tau, kao i njihove povezanosti sa patologijom APP (Zhang i Simpkins, 2010; Costa i sur., 2012). Okadaična kiselina se također često koristi kao neurotoksin u *in vitro* istraživanjima zbog brzog proapoptotičnog djelovanja ovisnog o dozi (Leira i sur., 2002) te se nastoji razviti stanični model OK inducirane neurodegeneracije na kulturi neurona iz neuroblastoma (Zhang i Simpkins, 2010). Doza pri kojoj se postiže inhibicija Ser/Thr fosfataza je 0.1-1.0 μM ovisno o tipu stanice, odnosno koncentraciji Ser/Thr fosfataza, permeabilnosti membrane i drugim čimbenicima (Cohen i sur., 1990). Zhang i sur. (2007) su u istraživanju neurotoksičnosti OK na kulturi stanica ljudskog neuroblastoma (stanična linija SH-SY5Y) inducirali patološke promjene slične Alzheimerovoj bolesti, a tretman se također koristi u istraživanjima signalnih putova PP2A i drugih mogućih terapeutika (u ovom slučaju agonista nikotinskih receptora) koji bi neutralizirali učinak OK (Del Barrio i sur., 2011).

### 1.3.1 Mehanizam djelovanja okadaične kiseline

Neurotoksičnost okadaične kiseline uzrokuje vežući se na aktivno mjesto katalitičke podjedinice PP2A i PP1 što direktno uzrokuje njihovu inhibiciju (pri čemu je PP2A oko 4000 puta osjetljivija na ovo djelovanje OK od PP1) (Takai et al., 1995). OK indirektno u stanici uzrokuje povećanje kinazne aktivnosti budući da je pokazano kako su mnoge kinaze regulirane stupnjem fosforilacije. Tako OK uzrokuje povećanje aktivnosti i fosforilacije Raf-1, MEK i MAPK, koje zajedno sa fosfatazama ujedno imaju i važne uloge u regulaciji mnogih transkripcijskih faktora i provođenju signala u stanici. Stalna aktivnost MAPK koje uključuju ERK (od engl. *extracellular signal-regulated protein kinase*), SAPK/JNK (od engl. *stress-activated protein kinase C-jun amino terminal kinase*) i p38 uzrokuje oksidativni stres te aktivaciju proapoptotskih proteina bcl-2 obitelji (BAD, Bid, Bik), kao i inaktivaciju antiapoptotskih Bcl-2, Bcl-XL i drugih. Zbog toga dolazi do smanjenja membranskog potencijala mitohondrija, curenja citokroma c i kofaktora iz mitohondrija, te posljedične aktivacije kaspaze 9, koja aktivira glavnu izvršnu kaspazu 3. Inhibicija Ser/Thr fosfataza dovodi do povećanja aktivnosti kinaza što uzrokuje povećanu fosforilaciju proteina tau, destabilizaciju mikrotubula i formiranje NFT. **Slika 7** shematski prikazuje na koji način OK uzrokuje neurotoksičnost iako točan molekularni mehanizam indirektnog djelovanja OK nije do kraja razjašnjen (Kamat i sur., 2014).




**Slika 7.** Shematski prikaz neurotoksičnog utjecaja okadaične kiseline sličnog patologiji kakva se vidi u Alzheimerovoj bolesti (preuzeto i prilagođeno prema Kamat i sur., 2014)

# 2 Cilj istraživanja

Do sada korišteni neurotoksini za proučavanje patologije Alzheimerove bolesti djeluju putem oksidativnog stresa i metabolizma glukoze, prometa kalcija ili uzrokuju propadanje kolinergičnih neurona. Okadaična kiselina inhibirajući Ser/Thr fosfataze uzrokuje niz patoloških promjena sličnim onima u Alzheimerovoj bolesti, uključujući narušavanje pamćenja, odumiranje neurona, hiperfosforilaciju proteina tau, njegovu agregaciju te nakupljanje amiloidnih plakova. Stoga je daljnja analiza utjecaja okadaične kiseline na fosforilaciju proteina tau potencijalno važna radi stvaranja eksperimentalnog modela za detaljnije istraživanje patologije proteina tau. Analiza utjecaja okadaične kiseline na fosforilaciju proteina tau bitna je i za razvoj novih lijekova čije se djelovanje temelji na sprječavanju hiperfosforilacije proteina tau. U novije vrijeme je taj pristup dodatno dobio na važnosti budući da do sada testirani spojevi usmjereni na sprječavanje nastanka patoloških promjena u Aβ nisu ostvarili željeni učinak (Kamat i sur., 2013).

Cilj istraživanja je ustanoviti utjecaj okadaične kiseline na fosforilaciju proteina tau na epitopima Thr231 i Ser396/S404 u kulturi stanica SH-SY5Y ljudskog neuroblastoma te neurona dobivenih diferencijacijom iz te stanične linije. Istraživanje bi trebalo doprinijeti razvitku eksperimentalnog modela za daljnja *in vitro* istraživanja djelovanja potencijalnih neuroprotektivnih spojeva na hiperfosforilaciju proteina tau.

# 3 Materijali i metode

## *3.1 Rad sa stanicama u kulturi*

Manipulacija sa stanicama izvođena je u sterilnom okruženju, u laminaru s okomitim strujanjem zraka pri čemu su korištene sterilne pipete te rukavice sterilizirane 70%-tnim etanolom. Rast stanica u plastičnim T-bocama različitih dimenzija (*flask*) odvijao se u inkubatoru u vlažnoj atmosferi pri koncentraciji ugljikovog dioksida od 5% i temperaturi od 37 °C. Odgovarajući sterilni mediji korišteni su za presađivanje i rad sa stanicama prilikom čega se posebno pazilo na sterilnost.

### 3.1.1 Stanična linija

Komercijalno dostupne SH-SY5Y stanice ljudskog neuroblastoma korištene u ovom istraživanju nastale su kloniranjem (SK-N-SH→ SH-SY→ SH-SY5Y) podlinije SK-N-SH dobivene iz neuroblastoma četverogodišnjakinje.

### 3.1.2 Odmrzavanje stanica

Stanice smrznute u kriotubicama su se nastojale što prije otopiti budući da stanice ne smiju početi metabolizirati medij s dimetil sulfoksidom (DMSO, od engl *dimethyl sulfoxide*). Kad je otopina bila blizu potpunog odmrzavanja prebačena je u Falcon tubicu od 15 ml gdje je nakon potpunog otapanja dodano 10 ml minimalnog esencijalnog medija (MEM), uz dodatak 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS), 2 mM L-glutamina, 0.1 mg/ml streptomicina / 100 U/ml penicilina i 1% otopine neesencijalnih aminokiselina. Stanice su zatim centrifugirane na 1500 rpm kroz 10 min na 4 °C nakon čega je supernatant odstranjen, a stanice resuspendirane u 10 ml MEM + 10% FBS, 2 mM L-glutamina, 0.1 mg/ml

streptomicina / 100 U/ml penicilina i 1% otopine neesencijalnih aminokiselina prethodno zagrijanog na sobnu temperaturu. Stanice su prebačene u veliku T-bocu (T-175), te kultivirane na 37 °C pri 5% $CO_2$.

### 3.1.3 Presađivanje stanica

Stanice su presađivane svaka dva do tri dana kada bi dosegle oko 90% konfluentnosti koja je provjeravana invertnim mikroskopom. Nakon uklanjanja starog medija iz T-boce u laminaru sterilnom staklenom pipetom oprezno je dodano 4-5 ml 10% v/v tripsina kako bi pocijepao proteinske veze i omogućio odvajanje stanica od podloge. Nakon odvajanja, tripsin je inaktiviran dodavanjem 10 ml medija sa 10% FBS stanicama. Nakon brojanja stanice su nasađene u nižoj koncentraciji u nove T-boce. Rast stanica odvijao se u inkubatoru i vlažnoj atmosferi s 5% $CO_2$ i temperaturi od 37 °C. Presađivanje je ponavljano do količine stanica potrebne za analizu (v. 3.1.4).

### 3.1.4 Određivanje broja stanica

Za brojenje stanica potrebnih za pokus korištena je otopina tripanskog modrila koja boji samo mrtve stanice zbog oštećenja njihove membrane. Stanice odvojene od podloge prema gore opisanom postupku dobro su resuspendirane te je uzeto 20 µl suspenzije i pomiješano s 80 µl otopine tripanskog modrila. Stanice su brojane pod svjetlosnim mikroskopom u Bürker-Türkovoj komorici za brojenje. Prebrojane su žive stanice nakon čega je njihov broj preračunat u broj stanica po mililitru. U obzir je uzet volumen komorice i razrjeđenje stanične suspenzije tripanskim modrilom prema formuli:

$$\text{br.st./ml} = (N/4) \times 5 \times 10^4$$

gdje je N broj stanica u 4 kvadratića komorice, 5 razrjeđenje (20 µl stanične suspenzije u 80 µl tripanskog modrila), a $10^4$ volumen komorice.

### 3.1.5 Tretiranje stanica

U 25 $cm^2$ T-boce nasađeno je 60345 stanica/$cm^2$. Nakon drugog i trećeg dana u kulturi su SH-SY5Y stanice tretirane u mediju s 1% FBS okadaičnom kiselinom koncentracije 30 nM, 60 nM i 100 nM i to u trajanjima redom 15 h, 5 h te 3 h i 15 min. Dio SH-SY5Y stanica diferenciran je u neurone sedmodnevnim tretmanom retinoičnom kiselinom (10 μM) u mediju s 10% FBS te četverodnevnim tretmanom moždanim neurotrofnim faktorom (25 nM, BDNF, od engl. *brain-derived neurotrophic factor*) u mediju s 1% FBS. U tom su razdoblju mediji mijenjani svaka dva dana. Neuroni su nakon diferencijacije tretirani 30 nM OK kroz 18 h i 30 min i 26 h te 100 nM OK kroz 3 h i 30 min. Kontrolne stanice SH-SY5Y i kontrolni neuroni nisu tretirani OK (**Tablica 1**).

**Tablica 1.** Prikaz određivanih epitopa, skupina i tretmana stanica

| Epitop | Skupina | Rast stanica | Tretman okadaičnom kiselinom |
|---|---|---|---|
| p-tau Thr231 | KONTROLA, SH-SY5Y | 2 dana u kulturi | -- |
| p-tau Thr231 | SH-SY5Y, OK, 30 nM 15 h | 2 dana u kulturi | 30 nM i 15 h |
| p-tau Thr231 | KONTROLA, NEURONI | diferencirani 11 dana | -- |
| p-tau Thr231 | NEURONI, OK, 30 nM 26 h | diferencirani 11 dana | 30 nM i 26 h |
| p-tau Ser396/S404 | KONTROLA, SH-SY5Y | 3 dana u kulturi | -- |
| p-tau Ser396/S404 | SH-SY5Y, OK, 100 nM 3 h 15 min | 3 dana u kulturi | 100 nM 3 h i 15 min |
| p-tau Ser396/S404 | SH-SY5Y, OK, 60 nM 5 h | 3 dana u kulturi | 60 nM 5 h |
| p-tau Ser396/S404 | KONTROLA, NEURONI | diferencirani 11 dana | -- |
| p-tau Ser396/S404 | NEURONI, OK 100 nM, 3 h 30 min | diferencirani 11 dana | 100 nM 3 h i 30 min |
| p-tau Ser396/S404 | NEURONI, OK, 30 nM, 18 h 30 min | diferencirani 11 dana | 30 nM 18 h i 30 min |

### 3.1.6 Sakupljanje proteina

Po završetku tretmana medij iz T-boce je uklonjen i stanice su isprane fiziološkom otopinom puferiranom fosfatom (PBS, od engl. *phosphate Buffered Saline*). Nakon dodatka RIPA staničnog ekstrakcijskog pufera, u koji su neposredno prije uporabe dodani inhibitori proteaza (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma, kat. br. P8340), stanice su sastrugane pomoću plastičnog strugača i sakupljene. Tijekom lize stanica na ledu kroz 30 min, vorteksirane su svakih 5 min, a potom centrifugirane 20 min na 16000 g i pohranjene na -80 °C.

## *3.2 Određivanje koncentracije proteina*

Koncentracija proteina određivana je prema protokolu Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, S.A.D.) koji omogućava kolorimetrijsku detekciju i kvantifikaciju ukupnog broja proteina u otopini, a temelji se na bicinkoniničnoj kiselini (BCA, od engl. *bicinchoninic acid*). Metoda kombinira biuret reakciju u kojoj dolazi do redukcije iona bakra u alkalnoj sredini koji s proteinima grade bezbojne komplekse. Ljubičasto obojenje koje nastaje kada se na taj kompleks vežu dvije molekule BCA, koja ima vršak apsorbancije na 562 nm.

Na mikropločici je u jažice dodavano po 25 µl RIPA pufera (slijepa proba), 25 µl standarda i uzoraka u triplikatu, nakon čega je u svaku jažicu dodano još po 200 µl radne otopine pripremljene prema protokolu (50:1, reagens A:B). Nakon što se pločica tresla 30 s, inkubirana je kroz 30 min na 37 °C. Kada se ohladila na sobnu temperaturu spektrofotometrijski je izmjerena apsorbancija na 595 nm. Koncentracija proteina određena je prema standardnoj krivulji u programu GraphPad (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, S.A.D.) pomoću algoritma s četiri parametra.

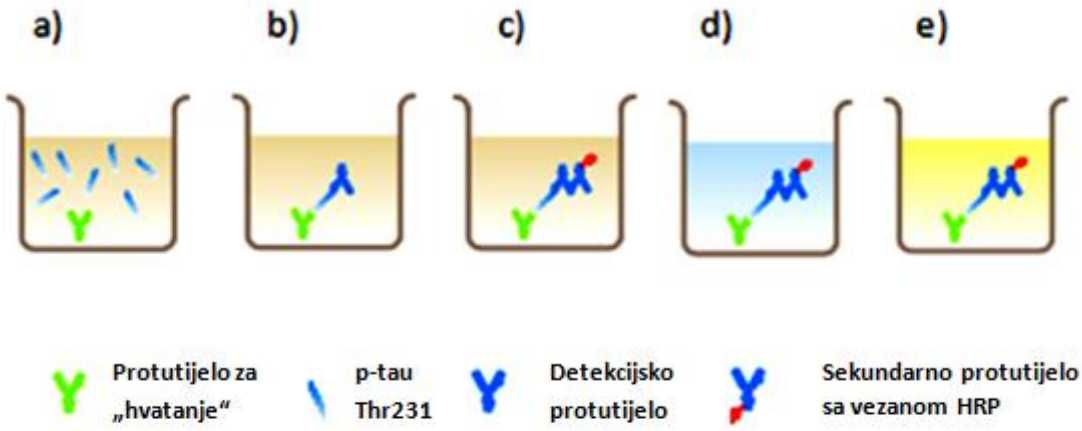
## *3.3 ELISA metoda*

Enzimski povezana imunoapsorpcijska analiza (ELISA, od engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) je pouzdana, precizna i visoko osjetljiva metoda kojom se kvantificiraju biološki parametri kao npr. protutijela ili antigenski epitopi. Temelji se na uspješnosti nastanka kompleksa antigen-protutijelo i njihovoj detekciji. Imunokemijska reakcija mjeri se apsorbancijom ili fluorescencijom.

ELISA je korištena za određivanje p-tau Thr231 prema protokolu proizvođača kita Human Tau [pThr231] PhosphoELISA Kit (Life Technologies, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, S.A.D.) koji omogućava njegovu kvantifikaciju u cerebrospinalnoj tekućini, i proteinskim lizatima staničnih kultura.

Ukratko, određivanje se provodi u jažicama mikropločice na čijoj je stijenci već vezano monoklonsko protutijelo za p-tau Thr231 koje po dodavanju uzorka „hvata“ specifično fosforilirani protein tau (ili njegove fragmente koji sadrže navedeni epitop). Radi kasnijeg određivanja koncentracije fosfo-tau proteina u uzorcima na temelju izmjerene apsorbancije, pored poznate koncentracije uzorka razrijeđenog u puferu za nanošenje i samog pufera kao slijepe probe, u jažice su dodani i standardi pripremljeni u serijskim razrjeđenjima (100 µl) potrebni radi iscrtavanja krivulje. Nakon dodavanja uzoraka pločica je prekrivena i inkubirana kroz 2 h na sobnoj temperaturi kako bi se protein tau fosforiliran na treoninu 231 u uzorcima (i njegovi fragmenti koji sadrže navedeni epitop) vezao na pločicu za vezano anti-p-tau Thr231 monoklonsko protutijelo (**Slika 8a**). Potom je slijedilo ispiranje 4 puta puferom za ispiranje kako bi se odstranili svi nebitni vezani proteini i ostatak otopine. Zatim je u svaku jažicu dodano 100 µl otopine detekcijskog zečjeg protutijela za fosforilirani tau epitop Thr231 te je pločica prekrivena i inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi (kako bi se na kompleks za pločicu vezanog monoklonskog protutijela i fosfo-tau epitopa „uhvatilo“ i zečje anti-fosfo-tau protutijelo) (**Slika 8b**). Nakon ponovnog ispiranja (4 puta), u svaku jažicu je dodano po 100 µl sekundarnog protu-zečjeg IgG protutijela na prethodno dodano zečje protutijelo. To protutijelo ima konjugiranu peroksidazu hrena (HRP, od engl. *horse-radish peroxidase*) preko koje se vrši detekcija (**Slika 8c**). Nakon inkubacije od 30 min na sobnoj temperaturi, pločica je opet isprana 4 puta puferom za ispiranje. Dodano je 100 µl stabilizacijskog kromogena u svaku jažicu kojeg HRP pocijepa te daje plavo obojenje (**Slika 8d**) (inkubacija u mraku kroz 30 min). Nakon toga dodano je 100 µl stop otopine (otopine koja prekida djelovanje peroksidaze na supstrat) koja boji jažice u žuto (**Slika 8e**) i očitana apsorbancija na ELISA

čitaču na 450 nm. Koncentracija p-tau Thr231 određena je prema standardnoj krivulji iscrtanoj prema točkama dobivenih iz standarda u serijskim razrjeđenjima u GraphPad (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, S.A.D.) pomoću algoritma s četiri parametra.




**Slika 8.** Shematski prikaz ELISA metode korištene za određivanje koncentracije fosforiliranog tau epitopa Thr231 u uzorcima (preuzeto i prilagođeno iz protokola proizvođača kita Human Tau [pThr231] PhosphoELISA Kit (Life Technologies, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, S.A.D.).

## *3.4 Metoda „western blot“*

Metoda „western blot“ ili jednodimenzionalna poliakrilamid gel elektroforeza je vrlo osjetljiva metoda za određivanje relativne koncentracije proteina u uzorku. Temelji se na prepoznavanju i ostvarivanju kompleksa antigen-protutijelo. Proteini se najprije razdvoje elektroforezom u poliakrilamidnom gelu te se s gela prenose na sintetsku membranu koja se inkubira s protutijelom koje specifično prepoznaje željeni antigen. Nakon blokiranja (kako bi se spriječilo nespecifično vezanje), membrana se isprva inkubira sa primarnim protutijelom, a zatim sa sekundarnim protutijelom, koje je pak konjugirano enzimom kako bi se omogućila detekcija proteina na membrani.

Pomoću metode „western blot“ određivana je koncentracija p-tau Ser396/S404 u uzorcima kojeg specifično prepoznaje PHF-1 protutijelo. PHF-1 protutijelo (dobiveno iz zeca) korišteno u ovom radu poklon je Dr. Petera Daviesa (Albert Einstein School of Medicine, New York, NY, S.A.D.).

### 3.4.1 Razdvajanje proteina

Proteini su razdvojeni elektroforezom u poliakrilamidnom gelu uz prisutnost natrijevog dodecil sulfata (SDS-PAGE, od engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*). Najprije je pripremljen gel za elektroforezu: donji gel za razdvajanje (9% poliakrilamidni) i gornji za sabijanje (4% poliakrilamidni). U aparaturu za elektroforezu dodan je 1x radni pufer za razdvajanje (10x pufer za razdvajanje: u 500 mL vode otopljeno je 15 g trisa, 57.6 g glicina i 5 g SDS). U jažice polimeriziranog gela je dodano 15 µl standarda i po 45 µl jednake koncentracije proteina razrijeđene 1x puferom za nanošenje uzoraka (pufer sadrži 20% 5x pufera za nanošenje uzoraka (0.2 g Coomassie Blue, 4 g SDS, 20 ml glicerola, 20 ml 0.5 M Tris-HCl (pH = 6.8)), 10% beta-merkaptoetanola i 70% destilirane vode). Uzorci su prethodno prokuhani kroz 10 min na 95 °C. Elektroforeza je trajala 30 min na 70 V te 1 h i 30 min na 120 V.

### 3.4.2 Transfer proteina

Nakon elektroforeze pripremljena je kazeta za transfer koja se sastojala od sljedećih slojeva: spužva, filtar papir, gel, nitrocelulozna membrana, filtar papir, spužva; pri tome se pazilo da ne ostane mjehurića zraka između slojeva koji su složeni u puferu za transfer. Pripremljena kazeta stavljena je u sustav za transfer, uz pravilnu orijentaciju katode i anode. Zatim je dodan 1x radni pufer za transfer (10x pufer za transfer: u 4 l vode otopljeno je 121.2 g trisa i 576 g glicina) i led za hlađenje sustava tijekom transfera. Transfer se odvijao 1 h na 100 V. Uspješnost je provjerena bojanjem proteina na membrani otopinom sintetičke crvene boje Ponceau 4R.

### 3.4.3 Imunodetekcija proteina na membrani

Membrana je ispirana od crvene boje 2 puta u destiliranoj vodi te u 0.05% PBS-Tween puferu dok nije izblijedila te je zatim inkubirana 45 min na sobnoj temperaturi u plastičnoj vrećici s blokirajućom otopinom (5% otopina nemasnog mlijeka u prahu u PBS-Tween puferu; 2.5 g nemasnog mlijeka u prahu, 50 ml 0.05% PBS-Tween) (kako bi se zasitila slobodna mjesta na membrani i time spriječilo nespecifično vezanje protutijela u kasnijim koracima). Nakon toga, membrana je inkubirana sa PHF-1 protutijelom u blokirajućoj otopini u omjeru 1:400 u zatvorenoj plastičnoj vrećici na sobnoj temperaturi preko noći (14 h). Nakon inkubacije membrana je isprana 0.05% PBS-Tweenom jednom kroz 15 min te još 3 puta po 5 min. Inkubacija s „detekcijskim" protutijelom na teški lanac ($F_c$ fragment) zečjeg protutijela koje je konjugirano peroksidazom hrena (HRP) u omjeru 1:1000 u blokirajućoj otopini trajala je 1h 30 min pri sobnoj temperaturi u zatvorenoj plastičnoj vrećici. Membrana je isprana PBS-Tweenom jednom kroz 15 min te još 3 puta po 5 min.

Za detekciju kemiluminiscencijom, na membranu je prije slikanja digitalnom CCD (engl. „*charged-coupled device*", uređaj koji pretvara fotone u električni signal) kamerom dodana kemiluminiscentna otopina (luminol:peroksid = 1:1) (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific, kat. br. 34095) koja je supstrat za peroksidazu hrena vezanu za sekundarno protutijelo.

Na istoj membrani je nakon ispiranja kroz 5 min PBS-Tweenom blokirana nespecifična imunoreaktivnost kroz 45 min u blokirajućoj otopini. Inkubacija sa protutijelom na β aktin u blokirajućoj otopini (1:1000) je trajala 2 h na sobnoj temperaturi. Uslijedilo je jednokratno ispiranje kroz 10 min, te 3 puta po 5 min 0.05% PBS-Tweenom te inkubacija sa sekundarnim protutijelom na teški lanac ($F_c$ fragment) zečjeg protutijela (u razrjeđenju 1:3000 u blokirajućoj otopini) kroz 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon ponovnog ispiranja napravljena je detekcija kemiluminiscencijom na isti način kao i za PHF-1 protutijelo, ali je korištena kemiluminiscentna otopina SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, kat. br. 34077).

Slike su obrađene u Image J (NIH, slobodno dostupan program, http://http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html) programu gdje je na osnovu optičke gustoće signala izračunat udio traženih epitopa. Vrijednosti PHF-1 zatim su izražene u odnosu na standard (β aktin).

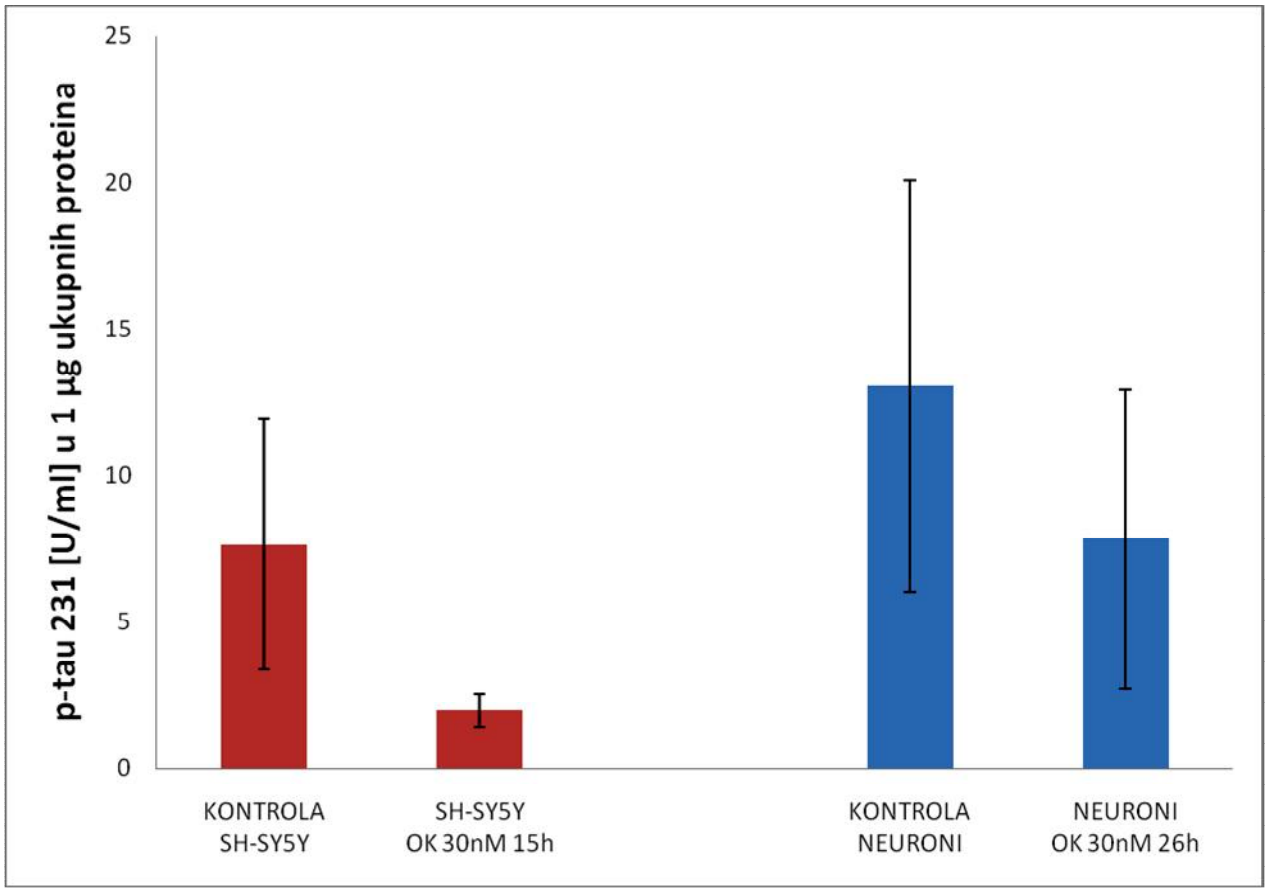
## *3.5 Statistička obrada podataka*

Koncentracije proteina i p-tau Thr231 određene su četiri parametarskom krivuljom dobivenom iz vrijednosti apsorbancije standarda u GraphPad programu (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, S.A.D.) koji je ujedno korišten i za statističku obradu podataka. Četiri parametarska krivulja prolazi kroz točke poznatih vrijednosti koncentracija te je sigmoidalnog oblika čime se omogućava točnija procjena koncentracija uzoraka u odnosu na standardnu linearnu krivulju, posebno kada su koncentracije blizu krajnosti krivulje. Statističke razlike između uzoraka analizirane su Studentovim *t* testom, razina značajnosti podešena je na $\alpha$=0,05. Svi su rezultati izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD).

# 4 Rezultati

## *4.1 Utjecaj okadaične kiseline na fosforilaciju proteina tau na epitopu p-tau Thr231*

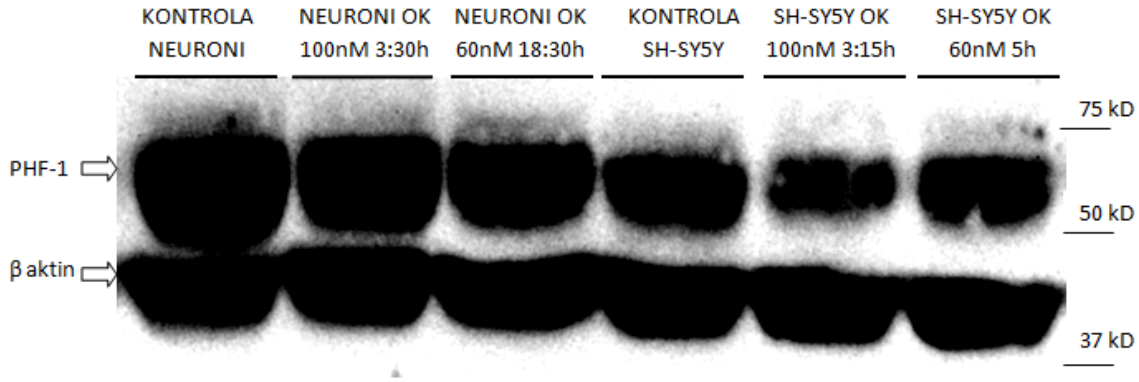
Studentovim *t* testom pokazano je da se koncentracija p-tau Thr231 u skupini stanica SH-SY5Y tretiranima 30 nM okadaičnom kiselinom 15 h ne razlikuje statistički od koncentracije u kontrolnoj SH-SY5Y skupini (t = 1.856, st. sl. = 2, **p = 0.205**) kao niti između neurona tretiranih 26 h s 30 nM OK-om, i kontrolne skupine neurona (t = 0.849, st. sl. = 2, **p = 0.485**). Stupanj slobode (st. sl.) odgovara broju uzoraka umanjenom za dva. Usporedba vrijednosti p-tau Thr231 između tretiranih i kontrolnih skupina prikazana je na **Slici 9.**




**Slika 9.** Razina fosforilacije proteina tau na epitopu Thr231 nakon tretmana okadaičnom kiselinom u stanicama SH-SY5Y i neuronima te kontrolnim skupinama.

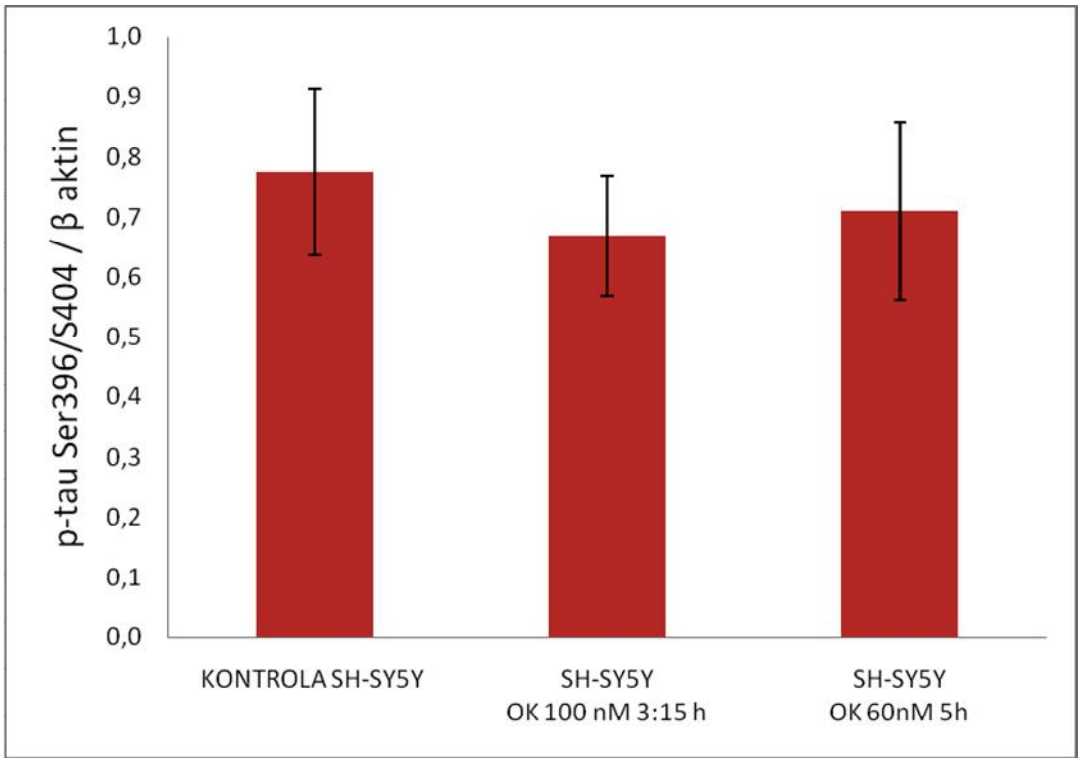
## *4.2 Utjecaj okadaične kiseline na fosforilaciju proteina tau na epitopu p-tau Ser396/S404*

Vrijednosti p-tau Ser396/S404 izražene su u odnosu na β aktin, a izračunate u ImageJ programu prema optičkoj gustoći kemiluminiscencijskog signala na nitroceluloznoj membrani (**Slika 10.**).



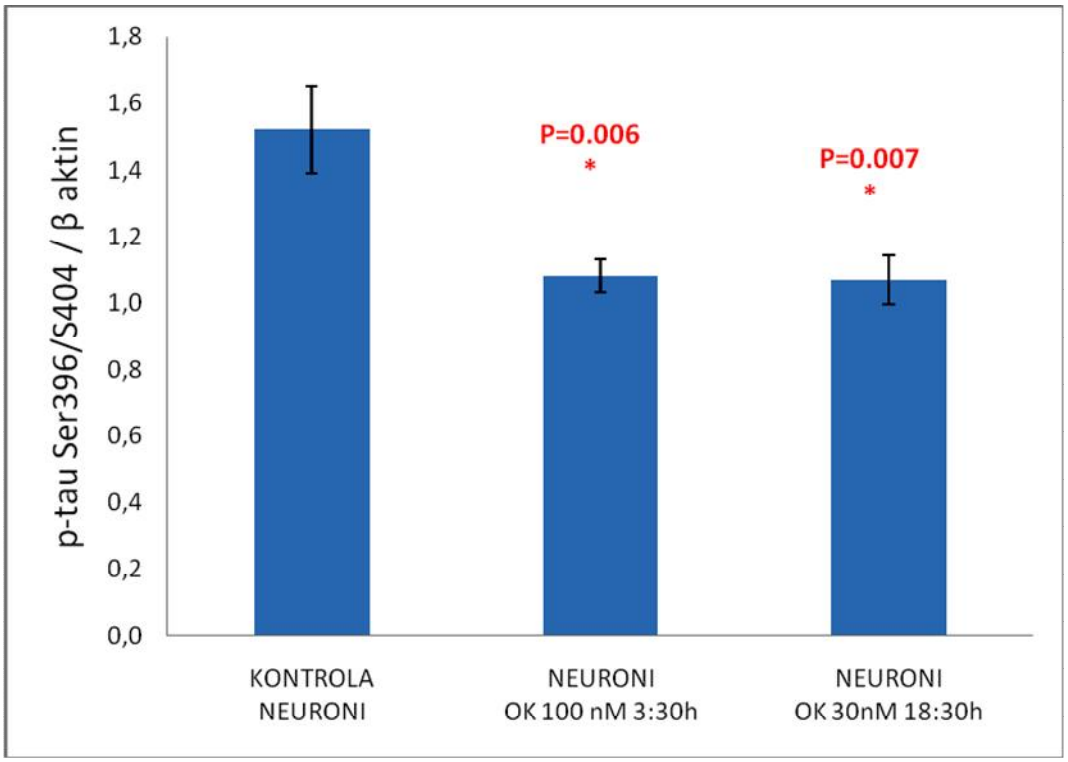

**Slika 10.** Prikaz kemiluminiscencijskog signala na membrani nakon metode „western blot“ čija optička gustoća odgovara koncentraciji fosforiliranog tau epitopa Ser396/S404 i β aktina u kontrolnim uzorcima i uzorcima tretiranima okadaičnom kiselinom.

Nije dokazana statistički značajna razlika u fosforilaciji proteina tau na epitopu Ser396/S404 u grupama SH-SY5Y tretiranih OK i kontrolnim stanicama. SH-SY5Y grupa stanica tretirana 100 nM OK kroz 3 h i 15 min nema statistički značajno promijenjen status fosforilacije Ser396/S404 epitopa u odnosu na kontrolnu SH-SY5Y grupu ($t = 0.914$, st. sl. = 3, $\mathbf{p = 0.428}$) kao niti grupa tretirana 60 nM OK kroz 5 h ($t = 0.562$, st. sl. = 4, $\mathbf{p = 0.604}$). Također, nije bilo statistički značajne razlike u p-tau Ser396/S404 između tretiranih grupa ($t = 0.332$, st. sl. = 3, $\mathbf{p = 0.762}$). Usporedba vrijednosti p-tau Ser396/S404 u odnosu na β aktin u kontrolnoj SH-SY5Y grupi i grupama tretiranima OK u koncentraciji od 100 nM kroz 3 h i 15 min i 60 nM kroz 5 h prikazane su na **Slici 11.**




**Slika 11.** Vrijednosti p-tau Ser396/S404 u odnosu na β aktin u kontrolnoj SH-SY5Y skupini i SH-SY5Y tretiranima s okadaičnom kiselinom u koncentraciji od 100 nM kroz 3 h i 15 min i 60 nM kroz 5 h.

U odnosu na kontrolnu skupinu neurona, u diferenciranim neuronima tretiranima OK 100 nM kroz 3 h i 30 min ($t = 5.399$, st. sl. = 4, $\mathbf{p = 0.006}$) i 30 nM kroz 18 h i 30 min ($t = 5.192$, st. sl. = 4, $\mathbf{p = 0.007}$) došlo je do značajnog smanjenja fosforilacije Ser396/S404 epitopa proteina tau. Između dvije tretirane grupe neurona nije dokazana statistički značajna promjena ($t = 0.215$, st. sl. = 4, $\mathbf{p = 0.840}$). Dokazana je statistički značajna razlika između kontrolne SH-SY5Y grupe i kontrolne grupe neurona, gdje je fosforilacija na Ser396/S404 epitopu bila povećana u neuronima ($t = 6.757$, st. sl. = 4, $\mathbf{p = 0.003}$). Usporedba vrijednosti p-tau Ser396/S404 u odnosu na β aktin u kontrolnoj grupi neurona i grupama neurona tretiranima OK u koncentraciji od 100 nM kroz 3 h i 30 min i 30 nM kroz 18 h i 30 min prikazane su na **Slici 12.**




**Slika 12.** Vrijednosti p-tau Ser396/S404 u odnosu na β aktin u kontrolnoj grupi neurona i neuronima tretiranima okadaičnom kiselinom u koncentraciji od 100 nM kroz 3 h i 30 min i 30 nM kroz 5 h.

# 5 Rasprava

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, od engl. *World Health Organization*) 2012. godine proglasila je demenciju javnim zdravstvenim prioritetom. Najčešći primarni uzrok sindroma demencije je Alzheimerova bolesti (otprilike tri četvrtine svih bolesnika sa sindromom demencije). Bolest karakterizira progresivno propadanje spoznajnih funkcija. Iako počinje blagim simptomima, postepeno progredira kroz dulje vremensko razdoblje (u prosjeku oko 4-5 godina), te završava teškim oštećenjima mozga i smrću. Kako oboljeli nisu sposobni za samostalan život, u cilju poboljšanja kvalitete njihovog života, obitelj i socijalna skrb imaju velike novčane i ostale troškove. Zabrinjavajuće je što se trend povećanja broja oboljelih nastavlja, još uvijek nije dostupna nikakva učinkovita terapija te nema dovoljno osjetljive dijagnostičke metode kojom bi se sa 100% sigurnošću mogla postaviti dijagnoza. Dodatno, patofiziologija bolesti nije do kraja razjašnjenja kao niti čimbenici rizika. Zbog napretka u razumijevanju patofiziologije bolesti i hitnosti potrebe za napretkom u dijagnostici i iznalaženju novih terapeutika intenzivno se provode različite znanstvene studije (Duthey, 2013).

U normalnim fiziološkim uvjetima protein tau se veže za mikrotubule i regulira njihovo spajanje, dinamiku te staničnu organizaciju (Drechsel i sur.,1992; LoPresti i sur., 1995). U Alzheimerovoj bolesti dolazi do njegove hiperfosforilacije koja je odgovorna za gubitak biološke funkcije, dobivanje toksične funkcije i agregaciju u PHF što je kritično za nastanak bolesti, a posljedica je neravnoteže u aktivnosti kinaza i fosfataza (Iqbal i sur., 1986; Alonso i sur., 1994; Perez i sur., 2002). Do sada je identificirano nekoliko kinaza koje doprinose patologiji proteina tau u Alzheimerovoj bolesti kao što su PDPK, GSK-3β, CDK-5, Dyrk1A, CaMKinase II i PKA te fosfataze PP1, PP2A, PP2B i PP5 (Wang i sur., 2012). Aktivnosti kinaza su dobro su proučene, ali nije uočeno smanjenje njihove aktivnosti u mozgu osoba sa Alzheimerovom bolesti, dok je aktivnost PP1 i PP2A koje su glavni regulatori fosforilacije proteina tau smanjena oko 20% (Gong i sur., 1995; Gong i sur., 2000; Bennecib i sur., 2000).

Zahvaljujući direktnoj inhibiciji PP2A i PP1, OK se u kombinaciji sa inhibitorima kinaza koristi za određivanje enzima odgovornih za fosforilaciju pojedinih mjesta proteina tau, doprinosa pojedinih enzima patologiji Alzheimerovoj bolesti (Liu i sur., 2005) i istraživanje njihovih signalnih puteva (Dickey i Strak, 2011). Također, tretman OK predstavlja potencijalni model za testiranje neuroprotektivnih spojeva na hiperfosforilaciju

proteina tau s obzirom da uzrokuje niz patoloških promjena *in vivo* i *in vitro* sličnih onima u Alzheimerovoj bolesti. Zhang i Simpkins (2010) pokazali su da mikroinfuzijom OK u desni dorzolateralni hipokampus štakora kojemu su prethodno odstranjeni jajnici dolazi do narušavanja kognitivnih sposobnosti bez utjecaja na motoriku. OK uzrokovala je formiranje NFT u kori velikog mozga i hipokampusu te povećanu fosforilaciju proteina tau, povećanu aktivnost CDK5 i oksidativni stres u tim područjima. U svom istraživanju Costa i sur. (2012) osim što su takav nalaz potvrdili, injekcijom 100 ng OK u hipokampus štakora utvrdili su i da dolazi do aktivacije mikroglije i smanjenja sinteze glutamina. Shea i Fisher (1996) ustanovili su da OK uzrokuje destabilizaciju mikrotubula u SH-SY5Y stanicama. Seidel i sur. (2012) su razvili trodimenzionalni model za analizu potencijalnih terapeutika u kojemu se u stvarnom vremenu može pomoću OK pratiti hiperfosforilacija specifičnih epitopa proteina tau.

Uloga pojedinih fosfataza proteina u regulaciji fosforilacije ovisi o njihovom afinitetu za protein tau, enzimatskoj aktivnosti i samom udjelu u mozgu. Iako najveću ekspresiju u mozgu sisavaca ima PP2B, njezin afinitet za protein tau je pet puta manji u odnosu na druge PP i doprinosi samo 7% fosforiliranosti proteina tau. PP2A doprinosi 71%, PP1 11% i PP5 10% fosforilaciji proteina tau. Različite fosfataze imaju različit afinitet za isti fosforilirani supstrat neovisno o njihovom ukupnom doprinosu fosforilaciji proteina tau (Liu i sur., 2005), a budući da upravo fosforilacija specifičnog mjesta proteina tau može narušiti njegovu biološku funkciju i potaknuti polimerizaciju u NFT, važno je razjasniti mjesno specifičnu regulaciju fosforilacije pojedinih fosfataza kako bi se moglo na isti način i djelovati terapeuticima (Alonso i sur., 2004).

U ovom istraživanju OK je imala značajan utjecaj na smanjenje fosforilacije Ser396/S404 epitopa proteina tau u kulturi neurona dobivenih diferencijacijom iz SH-SY5Y stanica ljudskog neuroblastoma. Smanjenje fosforilacije tog složenog epitopa vidljivo je i u SH-SY5Y stanicama tretiranim OK, iako ono nije bilo statistički značajno. Također, iako je nakon tretmana OK uočen trend smanjenja fosforilacije na epitopu Thr231, nije bilo statistički značajne razlike u razini fosforilacije Thr231 između SH-SY5Y stanica, neurona tretiranih OK i kontrolnih stanica. Kako OK inhibira PP1 i PP2A, moguće je da druge fosfataze reguliraju fosforilaciju tih epitopa, kao što sugerira i istraživanje Liu i sur. (2005) u kojemu su analizirali doprinos fosfataza izoliranih iz ljudskih mozgova na fosforilaciju pojedinih epitopa proteina tau. Prema njihovim rezultatima Ser396 i Ser404 su najosjetljiviji na djelovanje PP2B, zatim PP5, a najmanje na djelovanje PP1 i PP2A. Također, prema rezultatima Rahman i sur. (2005), PP1 pridonosi defosforilaciji pSer396 za 42%, dok nema utjecaja na

defosforilaciju pSer404. Uloga PP2B u patologiji Alzheimerove bolesti nije poznata, međutim njezina je aktivnost u mozgu oboljelih dvostruko povećana ako se mjeri aktivnost pročišćenog enzima ili ekspresija gena (Hata i sur., 2001; Liu i sur., 2005), dok u ukupnom ekstraktu povećanje nije zabilježeno (Lian i sur., 2001; Liu i sur., 2005). S obzirom na navedeno, pretpostavka je da fosforilaciju Thr231 i Ser396/S404 regulira PP2B, a inhibicijom PP1 i PP2A djelovanjem OK supstrat postaje dostupniji zbog smanjene kompeticije što je potrebno istražiti u budućim studijama. Također, tretmani različitim koncentracijama OK kroz kraća ili dulja vremenska razdoblja nisu uzrokovali značajno različite vrijednosti ispitanih epitopa proteina tau što je i bilo očekivano, budući da inhibirane fosfataze proteina nemaju značajan doprinos regulaciji njihove fosforilacije. Ipak, u literaturi se mogu naći istraživanja u kojima je nakon tretmana stanica OK zabilježeno povećanje vrijednosti pSer396/404 i pThr231. U tim istraživanjima su korištene različite koncentracije OK u različitom trajanju. Tako su na primjer Kim i sur. (2010) u kulturi fetalnih neurona čovjeka nakon tretmana s 100 nM OK kroz 72 h zabilježili povećanje fosforilacije epitopa Thr181, Ser199/S202, Thr231 i Ser396/404, dok su povećanje fosforilacije Ser396/S404 Kim i sur. (2010) u kulturi neurona kore velikog mozga embrija štakora zabilježili već pri tretmanu s 10 nM OK kroz 8 h. U kulturi stanica SH-SY5Y neuroblastoma čovjeka povećanje fosforilacije Ser396/404 Del Barrio i sur. (2011) dobili su nakon tretmana pomoću 30 nM OK kroz 16 h, a Huebinger i sur. (2008) nakon tretmana sa 100 nM OK u trajanju od 80 min. Chen i sur. (2012), koristeći različite koncentracije i trajanje tretmana utvrdili su da OK uzrokuje najveće povećanje fosforilacije Ser396 pri tretmanu s 40 nM kroz 12 h te da nakon toga fosforilacija postupno pada 36 h. Nakon 48 h tretmana 40 nM OK razina fosforilacije tog epitopa bila je niža od one u kontrolnoj skupini.

Aktivnost fosfataza osjetljiva je na različite uvjete. Tako na primjer PP1 najveću aktivnost ostvaruje uz dvovalentne metalne ione kao što su $Mn^{2+}$, $Ni^{2+}$ i $Co^{2+}$, dok su za maksimalnu aktivnost PP2B potrebne više razine kalcija i kalmodulina (Rahman i sur., 2005). Njihova prisutnost u puferima i tretiranim stanicama stoga može dovesti do različitih statusa fosforilacije proteina. Zbog toga je za jasniju sliku utjecaja OK na fosforilaciju proteina tau potrebno provesti opsežnije istraživanje na većem broju uzoraka u kojemu bi se analiziralo fosforilaciju više epitopa proteina tau (kao što su npr. Thr205, Thr212 i Ser409), a za koje PP1 i PP2A imaju najveću osjetljivost (Liu i sur., 2005). Također, potrebno je provesti ispitivanje koristeći različito duge tretmane, različitih koncentracija OK i pri različitim uvjetima, a kako bi se što preciznije ustanovilo u kojim uvjetima OK ostvaruje najjači učinak.

# 6 Zaključak

Prema rezultatima ovog istraživanja može se zaključiti:

- U odnosu na kontrolne (netretirane) stanice, fosforilacija proteina tau na epitopu Thr231 nije značajno promijenjena u stanicama SH-SY5Y neuroblastoma čovjeka i neuronima dobivenih diferencijacijom iz tih stanica nakon tretmana okadaičnom kiselinom
- Različiti tretmani stanica SH-SY5Y okadaičnom kiselinom nisu imali statistički značajan učinak na razinu fosforilacije Ser396/404 epitopa proteina tau.
- Tretman neurona okadaičnom kiselinom uzrokovao je značajno smanjenje fosforilacije Ser396/404 epitopa proteina tau.
- Fosforilacija proteina tau na epitopima Ser396/404 značajno je viša u neuronima dobivenim diferencijacijom iz stanica SH-SY5Y neuroblastoma čovjeka nego samim SH-SY5Y stanicama.
- Primjena različitih koncentracija okadaične kiseline tijekom različitih vremenskih razdoblja nisu uzrokovala značajnu promjenu fosforilacije Ser396/404 epitopa proteina tau u neuronima.
- S obzirom na različite literaturne navode o utjecaju okadaične kiseline na fosforilaciju proteina tau, ovo istraživanje ukazuje na potrebu daljnjih studija koje bi obuhvatile veći broj epitopa i uvjeta tretmana te veći broj uzoraka, a u svrhu razvitka optimalnog eksperimentalnog modela za istraživanja djelovanja potencijalnih neuroprotektivnih spojeva na hiperfosforilaciju proteina tau.

# 7 Literatura


1. Alonso A, Del C, Mederlyova A, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2004) Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. J. Biol. Chem. 279: 34873–34881.
2. Alonso A, Del C, Zaidi T, Grundke-Iqbal, I, Iqbal K (1994) Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5562–5566.
3. Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT (2002) Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. 103: 26–35.
4. Babić M, Švob Štrac D, Mück-Šeler D, Pivac N, Stanić G, Hof PR, Šimić G (2014) Update on the core and developing cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer disease. Croat. Med. J. 55: 347-365.
5. Basurto-Islas G, Blanchard J, Tung YC, Fernandez JR, Voronkov M, Stock M, Zhang S, Stock JB, Iqbal K (2014) Therapeutic benefits of a component of cofee in a rat model of Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging 35: 2701-2712.
6. Bennecib M, Gong C-X, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2000) Role of protein phosphatases-2A and –1 in the regulation of GSK-3, cdk5 and cdc2 and the phosphorylation of tau in rat forebrain. FEBS Lett. 485: 87–93.
7. Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. J. Cell Biol. 101: 1371-1378.
8. Bird TD (2005) Genetic factors in Alzheimer 's disease. N. Engl. J. Med. 352: 862–864.
9. Blennow K (2004) Cerebrospinal Fluid Protein Biomarkers for Alzheimer's Disease. NeuroRx 1: 213-225.
10. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006) Alzheimer's disease. Lancet 368: 387–403.
11. Brady RM, Zinkowski RP, Binder LI (1995) Presence of tau in isolated nuclei from human brain. Neurobiol. Aging 16: 479-486.
12. Chen Z, Chen B, Xu WF, Liu RF, Yang J, Yu CX (2012) Effects of PTEN inhibition on regulation of tau phosphorylation in an okadaic acid-induced neurodegeneration model. Int. J. Dev. Neurosci. 30: 411-419.

13. Chopra K, Misra S, Kuhad A (2011) Neurobiological aspects ofAlzheimer ’s disease. Expert Opin. Ther. Targets 15: 535-555.
14. Clavaguera F, Lavenir I, Falcon B, Frank S, Goedert M, Tolnay M (2013) “Prion-like” templated misfolding in tauopathies. Brain Pathol. 23: 342−349.
15. Cohen P, Holmes CF, Tsukitani Y (1990) Okadaic acid: A new probe for the study of cellular regulation. Trends Biochem. Sci. 15: 98–102.
16. Coria F, Castano EM, Frangione B (1987) Brain amyloid in normal aging and cerebral amyloid angiopathy is antigenically related to Alzheimer's disease beta-protein. The Am. J. Pathol. 129: 422-428.
17. Correas I, Padilla R, Avila J (1990) The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. Biochem J. 269: 61-64.
18. Costa AP, Tramontina AC, Biasibetti R, Batassini C, Lopes MW, Wartchow KM, Bernardi C, Tortorelli LS, Leal RB, Goncalves CA (2012) Neuroglial alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. Behav. Brain Res. 226: 420–427.
19. D’Souza I, Schellenberg GD (2005) Regulation of tau isoform expression and dementia. Biochim. Biophys. Acta 1739: 104–115.
20. Del Barrio L, Martin-de-Saavedra MD, Romero A, Parada E, Egea J, Avila J, McIntosh JM, Wonnacott S, Lopez MG (2011) Neurotoxicity induced by okadaic acid in the human neuroblastoma SH-SY5Y line can be differentially prevented by alpha7 and beta2* nicotinic stimulation. Toxicol. Sci. 123: 193–205.
21. Dickey AS, Strack S (2011) PKA/AKAP1 and PP2A/Bbeta2 regulate neuronal morphogenesis via Drp1 phosphorylation and mitochondrial bioenergetics. J. Neurosci. 31: 15716–15726.
22. Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. Mol. Biol. Cell 3: 1141–1154.
23. Duthey B (2013) Background paper 6.11: Alzheimer disease and other dementias. A Public Health Approach to Innovation 1-74.
24. Feinstein SC, Wilson L (2005) Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: a loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death. Biochim. Biophys. Acta 1739: 268-279.

25. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Mendezes PR, Rimmer E, Scazufca M (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. Lancet 366: 2112–2117.
26. Finckh U, Kuschel C, Anagnostouli M, Patsouris E, Pantes GV, Gatzonis S, Kapaki E, Davaki P, Lamszus K, Stavrou D, Gal A (2005) Novel mutations and repeated findings of mutations in familial Alzheimer disease. Neurogenetics 6: 85–89.
27. Fleminger S, Oliver DL, Lovestone S, Rabe-Hesketh S, Giora A (2003) Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on; a partial replication. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 74: 857–862.
28. Geschwind DH (2003) Tau Phosphorylation, tangles, and neurodegeneration: the chicken or the egg? Neuron 40: 457-640.
29. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989a) Multiple isoforms of human microtubule associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Neuron 3: 519 –526.
30. Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA (1989b) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. EMBO J. 8: 393-399.
31. Gong CX, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2000) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatases 2A in mammalian brain. J. Biol. Chem. 275: 5535–5544.
32. Gong CX, Shaikh S, Wang JZ, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1995) Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. J. Neurochem. 65: 732-738.
33. Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1993) Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. J. Neurochem. 61: 921-927.
34. Hanger DP, Byers HL, Wray S, Leung KY, Saxton MJ, Seereeram A, Reynolds CH, Ward MA, Anderton BH (2007) Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. J. Biol. Chem. 282: 23645–23654.
35. Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato-Yoshitake R, Takel Y, Noda T , Hirokawa N (1994) Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. Nature 369: 488-491.

36. Hardy J, Allsop D (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer ’s disease. Trends Pharmacol. Sci. 12: 383–388.
37. Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer ’s disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science 297: 353–356.
38. Hata R, Masumura M, Akatsu H, Li F, Fujuta H, Nagai Y, Yamamot T, Okada H, Kosaka K, Sakanaka M, Sawada T (2001) Up-regulation of calcineurin Abeta mRNA in the Alzheimer’s disease brain: Assessment by cDNA microarray. Biochem. Biophys. Res. Commun. 284: 310–316.
39. He J, Yang Y, Xu H, Zhang X, Li XM (2005) Olanzapine attenuates the okadaic acid-induced spatial memory impairment and hippocampal cell death in rats. Neuropsychopharmacology 30: 1511–1520.
40. Heutink P (2000) Untangling tau-related dementia. Hum. Mol. Genet. 9: 979–986.
41. Houlden H, Baker M, McGowan E, Lewis P, Hutton M, Crook R, Wood NW, Kumar-Singh S, Geddes J, Swash M, Scaravilli F, Holton JL, Lashley T, Tomita T, Hashimoto T, Verkkoniemi A, Kalimo H, Somer M, Paetau A, Martin JJ, Van Broeckhoven C, Golde T, Hardy J, Haltia M, Revesz T (2000) Variant Alzheimer ’s disease with spastic paraparesis and cotton wool plaques is caused by PS-1 mutations thatlead to exceptionally high amyloid-beta concentrations. Ann. Neurol. 48: 806–808.
42. Huebinger G, Geis S, LeCorre S, Muehlbacher S, Gordon S, Fracasso RP, Hoffman F, Ferrand S, Klafki HW, Roder HM (2008) Inhibition of PHF-like tau hyperphosphorylation in SH-SY5Y cells and rat brain slices by K252a. J. Alzheimers Dis.13: 281-294.
43. Hyman BT (1997) The neuropathological diagnosis of Alzheimer ’s disease: clinical-pathological studies. Neurobiol. Aging 18: 27–32.
44. Imbimbo BP, Lombard J, Pomara N (2005) Pathophysiology of Alzheimer’s Disease. Neuroimag. Clin. N. Am. 15: 727–753.
45. Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. Biochim. Biophys. Acta 1739: 198-210.
46. Iqbal K, Gong CX, Liu F (2014) Microtubule-associated protein tau as s therapeutic target in Alzheimer’s disease. Expert Opin. Ther. Targets 18: 1-12.
47. Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Zaidi T, Merz PA, Wen GY, Shaikh SS, Wisniewski HM, Alafuzoff I, Winblad B (1986) Defective brain microtubule assembly in Alzheimer’s disease. Lancet 2: 421–426.

48. Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso Adel C, Grundke-Iqbal I (2009) Mechanisms of tau induced neurodegeneration. Acta Neuropathol. 118: 53-69.
49. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PTJr (1993) The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. Biochemistry 32: 4693–4697.
50. Jovanov-Milošević N, Petrović D, Sedmak G, Vukšić M, Hof PR, Šimić G (2012) Human fetal tau protein isoform: possibilities for Alzheimer's disease treatment. Int. J. Biochem. Cell Biol. 44: 1290-1294.
51. Kamat PK, Rai S, Nath C (2013) Okadaic acid induced neurotoxicity: An emerging tool to study Alzheimer's disease pathology. NeuroToxicology 37: 163–172.
52. Kamat PK, Rai S, Swarnkar S, Shukla R, Nath C (2014) Molecular and Cellular Mechanism of Okadaic Acid (OKA)-Induced Neurotoxicity: A Novel Tool for Alzheimer's Disease Therapeutic Application. Mol. Neurobiol. 50: 852-865.
53. Kim SM, Yoon SY, Choi JE, Park JS, Choi JM, Nguyen T, Kim DH (2010) Activation of eukaryotic initiation factor-2α-kinases in okadaic acid-treated neurons. Neuroscience 169: 1831-1839.
54. Kojro E, Fahrenholz F (2005) The non-amyloidogenic pathway: structure and function of α-secretases. Subcell. Biochem. 38: 105–127.
55. Kopeikina K, Hyman B, Spires-Jones T (2012) Soluble forms of tau are toxic in Alzheimer's disease. Transl. Neurosci. 3: 223-233.
56. Kosik KS, Crandall JE, Mufson EJ, Neve RL (1989) Tau in situ hybridization in normal and Alzheimer brain: localization in the somatodendritic compartment. Ann. Neurol. 26: 352-361.
57. Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Guerrero-Munoz MJ, Kiritoshi T, Neugebauer V, Jackson GR, Kayed R (2012) Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. Sci. Rep. 2: 700.
58. Lasagna-Reeves CA, Sengupta U, Castillo-Carranza D, Gerson JE, Guerrero-Munoz M, Troncoso JC, Jackson GR, Kayed R (2014) The formation of tau pore-like structures is prevalent and cell specific: possible implications for the disease phenotypes. Acta Neuropathol. Commun. 2: 56.
59. Lauderdack, CM, Hackett JM, Huang FF, Keller JN, Szweda LI, Markesbery WR, Butterfield DA (2001) The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of Ab1-42. J. Neurochem. 78: 413–416.

60. Leira F, Alvarez C, Vieites JM, Vieytes MR, Botana LM (2002) Characterization of distinct apoptotic changes induced by okadaic acid and yessotoxin in the BE(2)-M17 neuroblastoma cell line. Toxicol. In Vitro 16: 23–31.
61. Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Liebergurg I, Van Duinen SG, Bots GTAM, Luyendijk W, Frangione B (1990) Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. Science 248: 1124-1126.
62. Lian Q, Ladner CJ, Magnuson D, Lee JM (2001) Selective changes of calcineurin (protein phosphates 2B) activity in Alzheimer's disease cerebral cortex. Exp. Neurol. 167: 158–165.
63. Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2005) Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. Eur. J. Neurosci. 22: 1942–1950.
64. Liu F, Liang Z, Shi J, Yin D, El-Akkad E, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2006) PKA modulates GSK-3beta- and cdk5- catalyzed phosphorylation of tau in site- and kinase-specific manners. FEBS Lett 580: 6269–6274.
65. Liu F, Shi J, Tanimukai H, Gu J, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2009) Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. Brain 132: 1820-1832.
66. LoPresti P, Szuchet S, Papasozomenos SC, Zinkowski RP, Binder LI (1995) Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 10369-10373.
67. Luchsinger JA, Tang MX, Stern Y, Shea S, Mayeux R (2001) Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort. Am. J. Epidemiol. 154: 635–641.
68. Luna-Muñoz J, Harrington CR, Wischik CM, Flores-Rodríguez P, Avila J, Zamudio SR, De la Cruz F, Mena R, Meraz-Ríos MA, Floran-Garduño B (2013) Phosphorylation of Tau Protein Associated as a Protective Mechanism in the Presence of Toxic, C-Terminally Truncated Tau in Alzheimer's Disease. InTech 5: 89-107.
69. Medina M (2011) Recent developments in tau-based therapeutics for neurodegenerative diseases. Recent Pat. CNS Drug Discov. 6: 20-30.
70. Medina M, Avila J (2014) New perspectives on the role of tau in Alzheimer' disease. Implications for therapy. Biochem. Pharmacol. 88: 540-547.
71. Medina M, Avila J, Villaneura N (2013) Use of Okadaic Acid to Identify Relevant Phosphoepitopes in Pathology: A Focus on Neurodegeneration. Mar. Drugs 11: 1656-1668.

72. Mitchell A, Brindle N (2003) CSF phosphorylated tau: does it constitute an accurate biological test for Alzheimer's disease? Int. J. Geriatr. Psychiatry 18: 407-411.
73. Navarro A, Boveris A (2007) The mitochondrial energy transduction system and theaging process. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 292: 670–686.
74. Perez M, Hernandez F, Gomez-Ramos A, Smith M, Perry G, Avila J (2002) Formation of aberrant phosphotau fibrillar polymers in neuralcultured cells. Eur. J. Biochem. 269: 1484–1489.
75. Praticò D (2008) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal Trends in Pharmacological Sciences 29: 609-615.
76. Rahman A, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2005) Phosphothreonine-212 of Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau is a preferred substrate of protein phosphatase-1. Neurochem. Res. 30: 277-287.
77. Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A (2002) Tau is essential to β-amyloid-induced neurotoxicity. Proc. Nat. Acad. Sci. 99: 6364–6369.
78. Reitz C, Mayeux R (2014) Alzheimer disease: Epidemiology, Diagnostic Criteria, Risk Factor and Biomarkers. Biochem. Pharmacol. 88: 640-651.
79. Roberson ED, Scearce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L (2007) Reducing endogenous tau ameliorates amyloid β-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. Science 316: 750–754.
80. Santa Cruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowen E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hymen B, Hutton M, Ashe KH (2005) Tau suppression in a Neurodegenerative Mouse Model Improves Memory Function. Science 309: 476-481.
81. Schrijvers EM, Verhaaren BF, Koudstaal PJ, Hofman A, Ikram MA, Breteler MM (2012) Is dementiaincidence declining?: Trends in dementia incidence since 1990 in the Rotterdam Study. Neurology 78: 1456–1463.
82. Seidel D, Krinke D, Jahnke HG, Hirche A, Kloss D, Mack TG, Striggow F, Robitzki A (2012) Induced tauopathy in a novel 3D-culture model mediates neurodegenerative processes: A real-time study on biochips. PLoS One 7: 49150.
83. Shea TB, Fischer I (1996) Phosphatase inhibition in human neuroblastoma cells alters tau antigenicity and renders it incompetent to associate with exogenous microtubules. FEBS letters 380: 63-67.

84. Shi XP, Tugusheva K, Bruce JE, Lucka A, Chen-Dodson E, Hu B, Wu GX, Price E, Register RB, Lineberger J, Miller R, Tang MJ, Espeseth A, Kahana J, Wolfe A, Crouthamel MC, Sankaranarayanan S, Simon A, Chen L, Lai MT, Pietrak B, DiMuzio J, Li Y, Xu M, Huang Q, Garsky V, Sardana MK, Hazuda DJ (2005) Novel mutations introduced at the beta-site of amyloid beta protein precursor enhance the production of amyloid beta peppeptide by BACE1 in vitro and in cells. J. Alzheimers Dis. 7: 139–148.
85. Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, Raman R, Davies P, Masliah E, Williams DS, Goldstein LSB (2005) Axonopathy and Transport Deficits Early in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. Science 307: 1282-1288.
86. Stoothoff WH, Johnson GVW (2005) Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. Biochim. Biophys. Acta 1739: 280-297.
87. Swerdlow RH (2007) Is aging part of Alzheimer's disease, or is Alzheimer's diseasepart of aging? Neurobiol. Aging 28: 1465–1480.
88. Swerdlow RH, Khan SM (2004) A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer's disease. Med. Hypotheses 63: 8–20.
89. Swerdlow RH, Khan SM (2009) The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: An update. Exp. Neurol. 218: 308–315.
90. Swerdlow RH, Kish SJ (2002) Mitochondria in Alzheimer's disease. Int. Rev. Neurobiol. 53: 341–385.
91. Šimić G, Babić Leko M, Wray S, Harrington C, Delalle I, Jovanov-Milošević N, Bažadona D, Buée L, de Silva R, Di Giovanni G, Wischik C, Hof PR (2016) Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer’s Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. Biomolecules 6: 6.
92. Takai A, Sasaki K, Nagai H, Mieskes G, Isobe M, Isono K, Yasumoto T (1995) Inhibition of specific binding of okadaic acid to protein phosphatase 2A by microcystin-LR, calyculin-A and tautomycin: method of analysis of interactions of tight-binding ligands with target protein. Biochem. J 306: 657-665.
93. Tokuda T, Calero M, Matsubara E, Vidal R, Kumar A, Permanne B, Zlokovic B, Smith JD, Ladu MJ, Rostagno A, Frangione B, Ghiso J (2000) Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer’s amyloid beta peptides. Biochem. J. 348: 359–365.
94. Traber MG, van der Vliet A, Reznick AZ, Cross CE (2000) Tobacco-related diseases. Is there a role for antioxidant micronutrient supplementation? Clin. Chest. Med. 21: 173–187.

95. Valla J, Schneider L, Niedzielko T, Coon KD, Caselli R, Sabbagh MN, Ahern GL, Baxter L, Alexander G, Walker DG, Reiman EM (2006) Impaired platelet mitochondrial activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Mitochondrion 6: 323–330.
96. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. Nature 416: 535-539.
97. Wang J, Markesbery WR, Lovell MA (2006) Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment. J. Neurochem. 96: 825–832.
98. Wang JZ, Xia YY, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2012) Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. J. Alzheimers Dis. 33: 123-139.
99. World Health Organization (2012) Dementia: a public health priority. World Health Organization.
100. Zhang J, Cheng Y, Zhang JT (2007) [Protective effect of (-) clausenamide against neurotoxicity induced by okadaic acid and beta-amyloid peptide25-35]. Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica 42(9): 935-942.
101. Zhang Z, Simpkins JW (2010) An okadaic acid-induced model of tauopathy and cognitive deficiency. Brain Res. 1359: 233–246.

**ELEKTRONIČKI IZVORI:**

http://act.alz.org/site/DocServer/2012_ABA_Fact_Sheet.pst.sl.?docID=1921

http://neuropathology-web.org/chapter9/chapter9bAD.html

http://www.alz.org/facts/

http://www.totalhealthinstitute.com/tips-on-preventing-alzheimers-disease-naturally/

# 8 Životopis

Rođena sam u Vinkovcima 29.3.1991. godine gdje sam završila srednjoškolsko obrazovanje u Gimnaziji M. A. Reljkovića, opći smjer za vrijeme kojeg sam ostvarila prvo i drugo mjesto na županijskim natjecanjima iz biologije 2008. i 2009. godine. Zahvaljujući tome 2010. godine ostvarila sam izravan upis na Odjel za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku gdje sam stekla zvanje *Sveučilišni prvostupnik biologije*.

Dobitnica sam pročelnikove Nagrade za najboljeg studenta prve godine (2012.) te Nagrade za najboljeg studenta druge godine (2013.).

Odličan uspjeh omogućio mi je 2013. godine upis na Sveučilišni diplomski studij Eksperimentalne biologije, smjer Fiziologija i imunobiologija na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu gdje sam trenutno apsolventica.

Kao područja posebnog interesa istaknula bih bazična istraživanja u području neurobiologije i imunobiologije.