

# Metabolizam proteina APP u lizosomskim bolestima nakupljanja

---

**Posavec, Melanija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2009**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:840841>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Melanija Posavec

Metabolizam proteina APP u lizosomskim  
bolestima nakupljanja

Diplomski rad

Zagreb, 2009. godina

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr.sc. Silve Hećimovi, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Veliko hvala mentorici Silvi He imovi na pristupa nosti od prvog dana, na nesebi nom prenašanju znanja, podupiranju moje daljnje edukacije i znanstvenog rada te na stvaranju nevjerovatno ugodne radne atmosfere.

Hvala Martini Malnar i Marku Koši eku na nesebi nosti u podu avanju i pomaganju, kako u laboratoriju, tako i van njega.

Hvala jedinstvenom kolegi Damiru Omerbaši u, Ani Krolo i Ani Lisici na tome što su znali za initi dane u laboratoriju.

Hvala djelatnicima Zavoda za molekularnu medicinu na ustupanju laboratorijske opreme i prostora.

Najve e hvala mami, tati i bratu te Marku. Bez obzira gdje se nalazili, uvijek e biti u mom srcu.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Metabolizam proteina APP u lizosomskim bolestima nakupljanja

**Melanija Posavec**

Bijenička 54, 10000 Zagreb

Nedavna istraživanja su pokazala da povišena razina kolesterola može mijenjati cijepanje prekursora proteina amiloid-beta (APP) i utjecati na nakupljanje peptida amiloid-beta ( $A\beta$ ), glavne patološke značajke Alzheimerove bolesti (AB). Nakupljanje kolesterola u endosomima/lizosomima u bolesti Niemann-Pick tipa C (NPC) prati značajno povećanje razine peptida  $A\beta$  i C-terminalnog odsjeka proteina APP - C99. Cilj rada je bio ispitati na in vivo djelovanja kolesterola na smještaj proteina APP i/ili presenilina 1 (PS1) u staničnim organelama u bolesti NPC. Uporabom modelnih stanica CHO NPC1-null i stanica divljeg tipa (CHOwt) u razdvajanju unutarstaničnih organela centrifugiranjem u gradijentu iodixanola, utvrđeno je da stanice CHO NPC1-null pokazuju promijenjen smještaj proteina APP i PS1 te povišenu razinu kolesterola i odsjeka C99 u ranim/kasnim endosomima. Ovi rezultati ukazuju da kolesterol najvjerojatnije doprinosi nastanku AB regulirajući i smještaj proteina APP i PS1 unutar organela endocitnog puta, središnjem mjestu stvaranja peptida  $A\beta$  u stanici, te da ova preraspodjela može dovesti do povećanog stvaranja peptida  $A\beta$ .

(39 stranica, 8 slika, 2 tablice, 63 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Cljučne riječi: APP, prekursor proteina amiloid-beta, kolesterol, Niemann-Pickova bolest tipa C, bolest NPC, Alzheimerova bolest

Voditelj: Dr. sc. Silva Katušić Hećimović, znanstveni suradnik

Ocjenitelji: Dr. sc. Dubravka Hranilović, doc.

Dr. sc. Mirta Tkalec, doc.

Dr. sc. Maja Matulić, doc.

Rad prihvaćen: 09. rujna 2009.

# **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Graduation Thesis

## **The metabolism of APP protein in lysosomal storage disorders**

**Melanija Posavec**

Bijeni ka 54, 10000 Zagreb

Recent reports have suggested that elevated cholesterol levels may modulate processing of beta-amyloid precursor protein (APP) by increasing formation of the amyloid-beta ( $A\beta$ ) peptide, a central event in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). Cholesterol accumulation in endosomes/lysosomes in Niemann-Pick Type C (NPC) disease is accompanied by a significant increase in  $A\beta$  levels and levels of the C-terminal APP fragment – C99. The goal of this work was to investigate the cholesterol accumulation-regulated subcellular redistribution of APP and/or presenilin 1 (PS1) in NPC disease. To test this we utilized NPC model cells (CHO NPC1-null) and parental CHOwt cells. Using subcellular fractionation we observed altered subcellular localization of APP and PS1 together with increased C99 levels in early/late endosomes in CHO NPC1-null vs. CHOwt cells. Our findings suggest that cholesterol may contribute to AD onset by altering trafficking of APP and PS1 within endocytic pathway leading to increased formation of  $A\beta$ .

(39 pages, 8 figures, 2 tables, 63 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library

Key words: APP, beta-amyloid precursor protein, cholesterol, Niemann-Pick type C disease (NPC disease), Alzheimer's disease

Supervisor: Dr. Silva Katušić Hećimović, Research Associate

Reviewers: Dr. Dubravka Hranilović, Asst. Prof.

Dr. Mirta Tkalec, Asst. Prof.

Dr. Maja Matulić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 9<sup>th</sup> September 2009

## SADRŽAJ

POPIS KRATICA.....	2
UVOD .....	3
CILJ RADA .....	11
MATERIJALI I METODE .....	12
Stani ne kulture.....	12
Razdvajanje stani nih organela centrifugiranjem u gradijentu gusto e .....	12
Odre ivanje koncentracije proteina .....	13
Taloženje proteina .....	13
Imunoprecipitacija .....	13
Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu i prijenos proteina na membranu .....	14
Western analiza .....	15
Odre ivanje razine kolesterola .....	16
Odre ivanje ja ine signala dobivenog western analizom pomo u ra unalnog programa ImageJ .....	17
REZULTATI .....	18
Ispitivanje razine i smještaja proteinskih biljega stani nih organela (TGN46, BIP/GRP78, EEA1, LAMP-1, Rab7, TfR) u stanicama CHO NPC1-null u odnosu na stanice CHOwt .....	18
Stanice CHO NPC1-null pokazuju promijenjen smještaj i ekspresiju proteina APP i PS1 u ranim/kasnim endosomima u odnosu na stanice CHOwt.....	24
U stanicama CHO NPC1-null pove ana razina C-terminalnog odsje ka proteina APP - C99 uo ena je u ranim/kasnim endosomima.....	25
U stanicama CHO NPC1-null razine kolesterola su povišene u endosomima i lizosomima u odnosu na stanice CHOwt .....	27
RASPRAVA .....	29
Stanice CHO NPC1-null pokazuju promijenjenu ekspresiju i/ili smještaj proteinskih biljega stani nih organela (TGN46, BIP/GRP78, EEA1, LAMP-1, Rab7, TfR) u odnosu na stanice CHOwt.....	29
Stanice CHO NPC1-null pokazuju promijenjen smještaj i ekspresiju proteina APP i PS1 u ranim/kasnim endosomima u odnosu na stanice CHOwt.....	31
U stanicama CHO NPC1-null razine C99, C-terminalnog odsje ka proteina APP, povišene su u ranim/kasnim endosomima .....	31
U stanicama CHO NPC1-null kolesterol se nakuplja u ranim/kasnim endosomima te lizosomima .....	32
ZAKLJU AK.....	33
LITERATURA.....	35

## POPI S KRATICA

A $\beta$  – peptid amiloid-beta

A $\beta$ 40 – peptid amiloid-beta 40

A $\beta$ 42 – peptid amiloid-beta 42

AB – Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease*)

AICD – unutarstani na domena proteina APP (engl. *APP intracellular domain*)

APP – prekursor proteina amiloid-beta

sAPP $\alpha/\beta$  - topive forme N-terminalnog odsje ka proteina APP dobivenog nakon cijepanja enzimom  $\alpha$ -, odnosno  $\beta$ -sekretazom

CHO – stanice jajnika kineskog hr ka (engl. *chinese hamster ovary*)

CHOwt – stanice jajnika kineskog hr ka divljeg tipa

CHO NPC1-null – stanice jajnika kineskog hr ka koje nemaju gen *NPC1*

CTF $\alpha/\beta$  (C83/C99) – C-terminalni odsje ak proteina APP dobiven nakon cijepanja enzimom  $\alpha$ -, odnosno  $\beta$ -sekretazom

FAD – obiteljski/nasljedni oblik Alzheimerove bolesti (engl. *familial Alzheimer's disease*)

LDL – lipoprotein male gusto e (engl. *low density lipoprotein*)

LSD – lizosomske bolesti nakupljanja (engl. *lysosomal storage disorders*)

NPC – bolest Niemann-Pick tipa C

NPC1 – protein Niemann-Pick tipa C1

NPC2 – protein Niemann-Pick tipa C2

PS1 – presenilin 1

PS2 – presenilin 2

SLSD – bolesti nakupljanja lipida (engl. *sphingolipid storage disorders*)

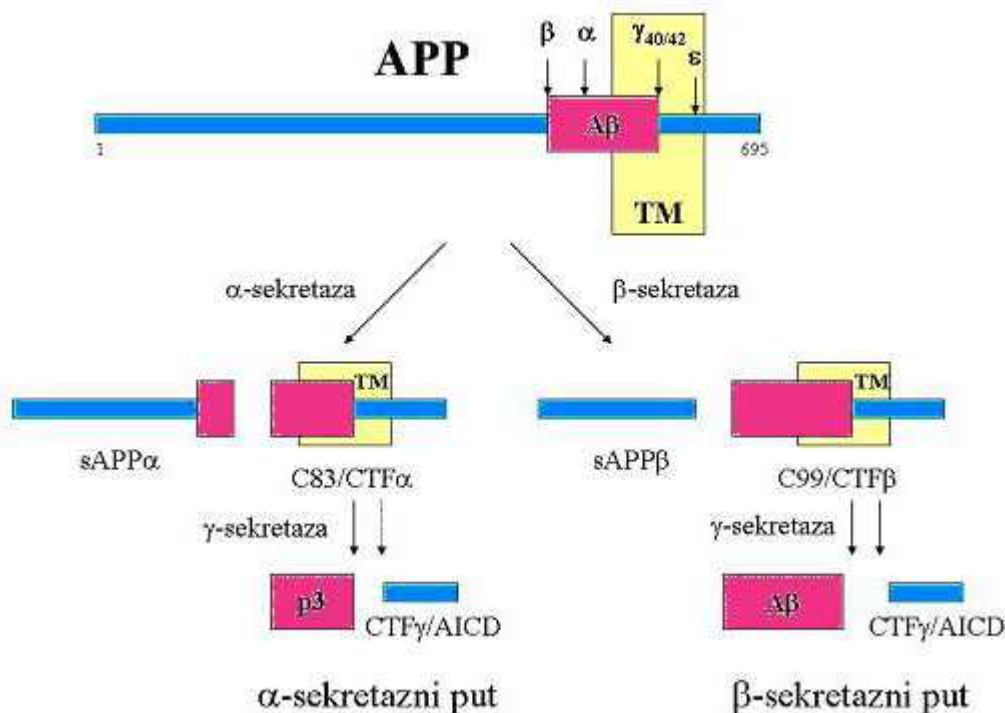


## UVOD

Alzheimerova bolest (AB) je vodeći uzrok demencije među starijom populacijom koji prema podacima organizacije Alzheimer's Association danas utrošku uje troškove zdravstvene brige te stoji na šestom mjestu glavnih uzroka smrti. Broj oboljelih od te opake bolesti u svijetu popeo se na 24 milijuna (Ferri i sur., 2005), od čega u Hrvatskoj 50 tisuća, no broj oboljelih stalno raste. Alzheimerovu bolest u početnom stadiju karakteriziraju poteškoće u pamćenju, apatija i depresija, a kasniji simptomi uključuju progresivni gubitak kognitivnih sposobnosti, promjene u ponašanju, poteškoće u obavljanju rutinskih zadataka, dezorijentaciju te u konačnici gubitak sposobnosti pamćenja i sposobnosti govora te promjene značajke ličnosti (www.alz.org). Iako su simptomi bolesti opisani već u djelima rimskih i grčkih pisaca pod različitim imenima, svoje današnje ime bolest je dobila prema psihijatru Aloisu Alzheimeru koji je bolest opisao u studenom 1906. Alzheimer je bolest proučavao kod 51-godišnje bolesnice koja je primljena u bolnicu sa simptomima promjene značajke ličnosti te jakim osjećajem ljubomore prema mužu. Naknadno su se razvili gubitak pamćenja, poteškoće u pisanju i čitanju, paranoja, halucinacije, dezorijentacija te je bolesnica naposljetku umrla. Alzheimer je prvi otkrio i povezo simptome bolesti s postmortalnim neuropatološkim obilježjima u mozgu. Primijetio je veliki gubitak neurona te tzv. senilne plakove koji su bili vidljivi i golim okom. U sljedećim desetljećima otkriveno je još nekoliko neuropatoloških promjena u mozgu bolesnika oboljelih od AB, kao npr. nakupljanje unutarstaničnih neurofibrilarnih niti (engl. *neurofibrillary tangles* - *NFTs*) kao posljedicu fosforilacije proteina tau. No, pojava nakupina neurofibrilarnih niti nije se pokazala specifičnom, tj. bila je prisutna i u nekim drugim patološkim stanjima, tj. drugim oblicima demencije kao npr. demencija Lewy-jevih tjelešaca, frontotemporalna demencija i dr., tako da pojava senilnih plakova u mozgu predstavlja do danas jedinu neuropatološku leziju karakterističnu za Alzheimerovu bolest. Iako se dugo vremena AB smatrala bolešću starijih od 65 godina, noviji podaci ukazuju da molekularni patološki procesi započinju 20 do 30 godina prije pojave prvih simptoma bolesti.

Glavni sastojak izvanstaničnih senilnih (amiloidnih) plakova je peptid amiloid- $\beta$  (A $\beta$ ) otkriven 1985. godine, a njegovo nakupljanje u plakovima kao uzročnik demencije Alzheimerove bolesti prihvaćeno je 2002. godine (Hardy, 2002). A $\beta$  nastaje cijepanjem prekursora proteina amiloid- $\beta$  (APP), glikoziliranog jednostrukog transmembranskog proteina molekulske mase 110-135 kDa (Scheuner i sur., 1996). U proteolizi proteina APP sudjeluje nekolicina membranskih proteaza:  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretaza (slika 1). APP se

prvo cijepa - (Lammich i sur., 1999) ili -sekretazom (Vassar i sur., 1999), a tim procesom nastaju N-terminalni odsje ci sAPP odnosno sAPP koji se izlu uju izvan stanice i C-terminalni odsje ci CTF (C83), odnosno CTF (C99). C83 i C99 se dalje cijepaju -sekretazom te nastaju N-terminalni odsje ci p3 odnosno A te C-terminalni odsje ak AICD (engl. *APP intracellular domain*) (Xia i sur., 1998; Sastre i sur., 2001). Zanimljivo svojstvo -sekretaze je da cijepa C99 na nekoliko mjesta unutar njegove transmembranske domene gdje ve inom nastaju peptidi A dužine 40 aminokiselina (A 40; 85-95%) te zatim peptidi A dužine 42 aminokiseline (A 42; 5-15%). Peptid A se sintetizira u stanici u sekretornom i u endosomalnom putu. Me utim, najnovija istraživanja ukazuju da je primarno mjesto sinteze peptida A u endosomima te da bi poreme ena funkcija ovih stani nih organela u Alzheimerovoj bolesti kao i u drugim oboljenjima mogla dovesti do pove ane sinteze peptida A .



Slika 1. Cijepanje proteina APP. APP se može cijepati  $\alpha$ -sekretaznim putem (lijevo) i  $\beta$ -sekretaznim putem (desno). U oba puta, zaostali C-terminalni odsje ci (CTF $\alpha$ / $\beta$ ) se cijepaju  $\gamma$ -sekretazom.  $\gamma$ -sekretaza cijepa transmembransku domenu (TM) proteina APP na dva topološki različita mjesta:  $\gamma_{40/42}$  mjesto cijepanja stvara peptide A $\beta$ /p3, a  $\epsilon$ -mjesto cijepanja stvara CTF $\gamma$ /AICD koji vjerojatno sudjeluje u stani nom prijenosu signala.

Dok -sekretazu kodira nekoliko gena (*ADAM9*, *ADAM10*, *ADAM17*) (Allinson i sur., 2003), -sekretazu kodira gen *BACE1* (a u manjoj mjeri *BACE2*) (Vassar i sur., 1999). -

sekretazu ini kompleks etiri proteina: presenilin (PS1 ili PS2), nikastrin (Nct), Aph1 i Pen2 (Edbauer i sur., 2003). Dok Nct, Aph1 i Pen2 vjerojatno predstavljaju kofaktore neophodne za aktivnost -sekretaze, brojna istraživanja ukazuju da presenilini ine aktivni centar kompleksa -sekretaze (Berezovska i sur., 2000; Esler i sur., 2000; Kimberly i sur., 2000). APP je član porodice visoko konzerviranih proteina od kojih samo neki sadrže slijed aminokiselina A<sub>β</sub>. Gen za APP nalazi se na duljem kraku 21. kromosoma i sastoji od 19 eksona, a prekrajanjem primarnog transkripta izrezivanjem introna nastaje 10 različitih izoformi proteina APP. U mozgu je uočen samo jedan oblik APP-a, APP695. Glasnik RNA, za neki od oblika APP-a, uočena je gotovo u svim tjelesnim stanicama premda to na uloga proteina APP nije sasvim poznata. Utvrđeno je da APP sudjeluje u signalnom putu Notch, u adheziji stanica i apoptozi, u regulaciji rasta aksona, zacjeljivanju rana te smanjenju staničnog stresa, u prijenosu i homeostazi iona bakra i cinka, u endocitozi i neuromišićnim procesima (<http://www.uniprot.org/uniprot/P05067>). Funkcija peptida A<sub>β</sub> također nije poznata. A<sub>β</sub> nastaje u većini tjelesnih stanica pa nije još jasno nastaje li prekomjerna količina A<sub>β</sub> primarno u mozgu ili izvan njega pa u mozak dolazi putem krvi. Procesi normalne razgradnje i odstranjenja A<sub>β</sub> nisu dobro poznati pa se smatra da i poremećaji u njegovoj razgradnji mogu biti uzrok njegova nakupljanja. Logično se nameće i mogućnost da se peptid A<sub>β</sub> nakuplja zbog njegove povećane proizvodnje.

Povećana proizvodnja A<sub>β</sub> prisutna je u obiteljskom nasljednom obliku AB (FAD, od engl. *familial Alzheimer's disease*) koji se pojavljuje u ranijoj dobi (između 30. i 60. godine – Alzheimerova bolest s ranim početkom, engl. *early onset Alzheimer's disease*) i obuhvaća manje od 1% od ukupnog broja oboljelih od Alzheimerove bolesti (<http://www.nia.nih.gov/Alzheimers/Publications/geneticsfs.htm>). Obiteljski nasljedni oblik AB nastaje mutacijom u jednom od tri gena: *APP*, *PS1* (presenilin1) ili *PS2* (presenilin2) koji se nalaze na kromosomima 21, 14 i 1. Do sada je otkriveno više od 10 mutacija u genu *APP* i više od 140 mutacija u genu *PS1* ([www.alzforum.org](http://www.alzforum.org)). Sve su povezane s povećanjem omjera peptida A<sub>β</sub>42/A<sub>β</sub>40. Međutim, većina oboljelih od AB bolest razvije nakon 60. godine te se tada bolest klasificira kao Alzheimerova bolest s kasnim početkom (engl. *late onset Alzheimer's disease*). Povećan rizik za razvitak AB s kasnim početkom povezuje se s genom za apolipoprotein E (Apo-E) smještenim na 19. kromosomu. Apo-E sudjeluje u vezanju, internalizaciji i katabolizmu lipoproteinskih čestica, a služi kao ligand za receptor LDL i za specifičan receptor apo-E hilomikronskih ostataka u jetri. Postoje tri alela *APOE*: *APOε2*, *APOε3* i *APOε4*. *APOε4* alel povezuje se s razvitkom AB s kasnim

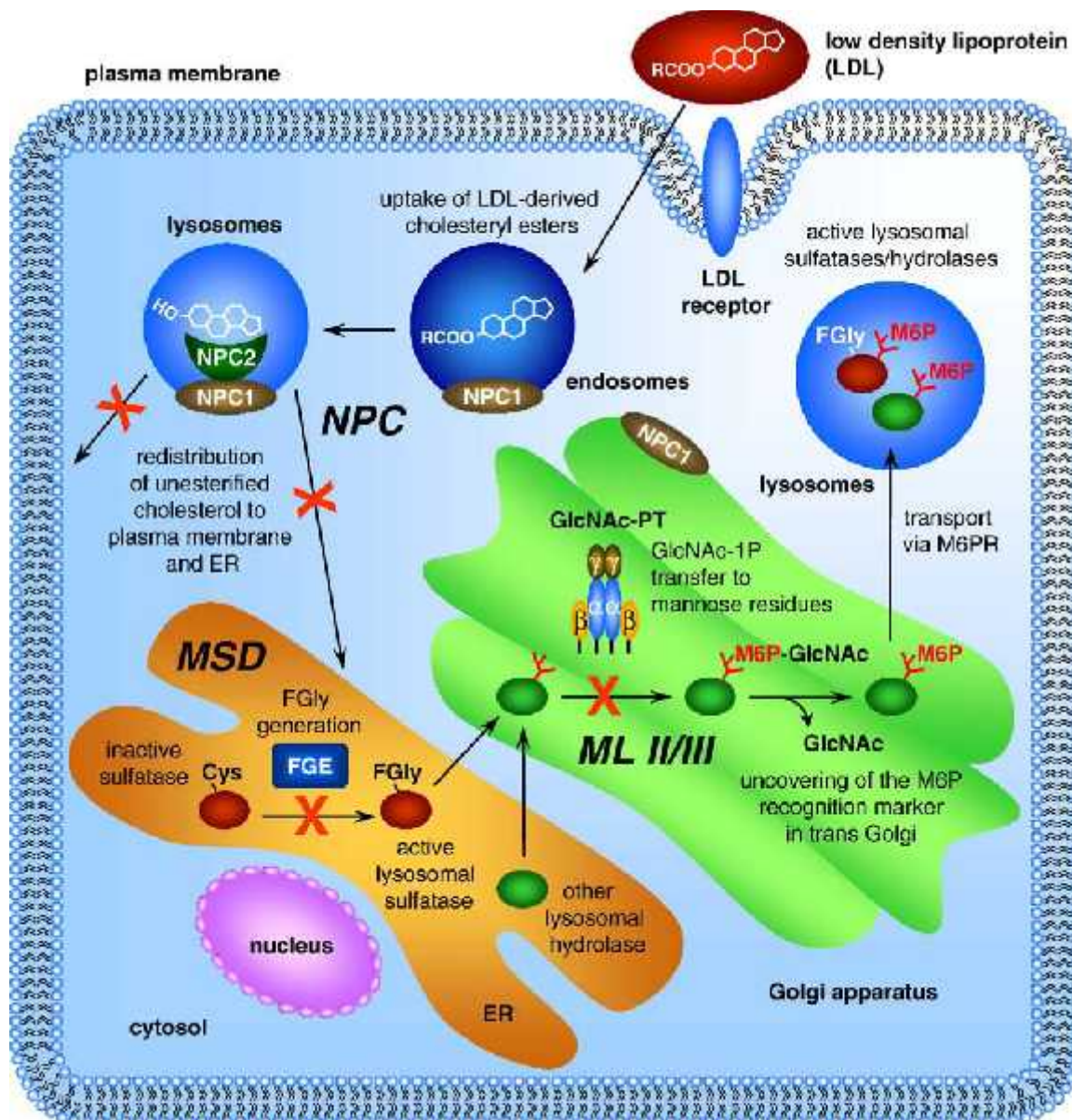
po etkom i sporadi nim slu ajevima AB. To an mehanizam sudjelovanja Apo-E u patogenezi nije poznat ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)).

Pokušavaju se otkriti mogu i dodatni imbenici rizika razvitka Alzheimerove bolesti. Kako Apo-E sudjeluje u metabolizmu lipida, ve je po etkom 1990-ih predložena teorija o vezi izme u Alzheimerove bolesti i kolesterola. Nedavna istraživanja sve više ukazuju na ulogu kolesterola u nastanku AB. Smatra se da kolesterol regulira stvaranje i odstranjivanje peptida A $\beta$ , a pove ane razine kolesterola pove avaju razinu peptida A $\beta$  u kulturi stanica (Simons i sur., 1998; Fassbender i sur., 2001) i u animalnim modelima bolesti (Sparks i sur., 1994; Refolo i sur., 2000; Refolo i sur., 2001). Tako er je važna raspodjela kolesterola u neuronima, a ne samo ukupne razine kolesterola (Wolozin, 2004a; Puglielli i sur., 2003). Koli ina kolesterola u mozgu puno je ve a u odnosu na ostala tkiva (Vance i sur., 2005). Kod ve ine sisavaca u mozgu se nalazi oko 25% ukupnog tjelesnog kolesterola iako na mozak otpada manje od 10% tjelesne mase. Kolesterol u mozgu se javlja uglavnom u slobodnom, neesterificiranom obliku. Dok ostala tkiva kolesterol dobivaju egzogeno (izvana unosom hrane) ili endogeno (vlastitiom sintezom), kolesterol u mozgu nastaje ve inom uslijed vlastite sinteze. Višak kolestrola u mozgu povezuje se s pove anim stvaranjem i taloženjem A $\beta$  (Shobab i sur., 2005). Eehalt i sur. (Eehalt i sur., 2003) su otkrili da kolesterol može regulirati razinu A $\beta$  putem tzv. lipidnih splavi (engl. *lipid rafts*), organiziranih struktura (mikrodomena) unutar membrana bogatih kolesterolom i sfingolipidima. Lipidne splavi su uklju ene u brojne stani ne procese poput razvrstavanja i prijenosa membrana, u stani ni prijenos signala i u infekciju stanice (Simons i Eehalt, 2002; Pike, 2004). 50-90% stani nog kolesterola akumulirano je u lipidnim splavima. U svom sastavu lipidne splavi sadrže brojne proteine, enzime i receptore, a me u njima i APP te  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretazu, klju ne proteine u patogenezi AB (Eehalt i sur., 2003; Simons i sur., 1998; Riddell i sur., 2001; Wahrle i sur., 2002; Vetrivel i sur., 2004; Simons i sur., 1998).

Terapija statinima (lijekovima koji snizuju razinu kolesterola), inhibitorima HMG-CoA reduktaze, glavnog regulatornog enzima u sintezi kolesterola, izgleda da smanjuje rizik pojave bolesti (Jick i sur., 2000; Wolozin i sur., 2000). Blaga kolesterolemija smatra se ranim imbenikom rizika za razvoj AB, a pacijenti s aterosklerozom imaju ve u incidenciju AB (Pappolla i sur., 2003). Pokusi na transgeni nim mišjim modelima AB pokazali su da prehrana bogata kolesterolom/masno ama pogoršava simptome AB (Refolo i sur., 2000), a simptomi se umanjuju nakon tretmana inhibitorima sinteze kolesterola (Refolo i sur., 2001).

Neuronalna disfunkcija i progresivan i nekontroliran gubitak neurona specifičan je za neurodegenerativne bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, no također i za monogenske bolesti iz skupine lizosomskih bolesti nakupljanja (engl. *lysosomal storage disorders, LSDs*). Lizosomske bolesti nakupljanja pojavljuju se u ranijoj životnoj dobi, a uzrokovane su mutacijom nekog od proteina uključenih u strukturu ili funkciju lizosoma. Zajednička biokemijska karakteristika tih bolesti, kao posljedica nefunkcionalnosti lizosomskog proteina, jest taloženje makromolekula u lizosomima (Jeyakumar i sur., 2005; Walkley i Vanier, 2009). Grupiranje i nomenklatura bolesti može se odrediti prema vrsti makromolekula koje se nakupljaju pa tako lizosomske bolesti nakupljanja dijelimo na sfingolipidoze, gangliozidoze, mukopolisaharidoze, glikoproteinoze itd (Walkley i Vanier, 2009). U Niemann-Pickovoj bolesti tipa C (NPC), nasljednoj sfingolipidozi (SLSD, od engl. *sphingolipid storage disease*), također je ustanovljena veza između kolesterola i A $\beta$ . Bolest NPC (slika 2) nastaje uslijed nakupljanja neesterificiranog kolesterola i drugih lipida u kasnim endosomima i lizosomima (Ory, 2004), a uzrokovana je mutacijom transmembranskog proteina NPC1 u više od 90% slučajeva, dok ostatak otpada na mutaciju u genu *NPC2* (Distl i sur., 2003; Ohm i sur., 2003; Auer i sur., 1995). Protein NPC1, unutarstanični šaperon (engl. *chaperone*), u normalnim (zdravim) stanicama je lokaliziran u endosomima (Pagano i sur., 2000), i to uglavnom u kasnim endosomima (dijelom u Golgijevom aparatu) (Dierks i sur., 2009), dok se kod prekomjernog taloženja kolesterola uočava pomak prema lizosomima (Pagano i sur., 2000). Protein NPC2 smješten je u lizosomima (Dierks i sur., 2009). Gen *NPC1* mutiran u većini pacijenata s bolešću NPC nalazi se na kromosomu 18q11-12 i kodira za protein duljine 1278 aminokiselina. Protein NPC1 sadrži 13 transmembranskih domena, tri velike petlje koje sežu u lumen kasnih endosoma i podliježu glikozilaciji te nekoliko manjih citoplazmatskih petlji i C-terminalni citoplazmatski rep (Scott i Ioannou, 2004).

Proteinska sekvenca proteina NPC1 u domenama 3-7 (Scott i Ioannou, 2004) dijeli homologiju s domenom koja je senzor za sterole/kolesterol (SSD, od engl. *sterol-sensing domain*) u proteinima HMG-CoA reduktaza i SCAP (*SREBP cleavage activating protein*). Protein NPC1, pored toga što sudjeluje u unutarstaničnom prijenosu kolesterola, vjerojatno je uključen i u retrogradni prijenos brojnih drugih lipida i proteina iz kasnih endosoma do *trans*-Golgijeve mreže (engl. TGN = *Trans-Golgi network*) (Scott i Ioannou, 2004; Vanier i Millat, 2003).



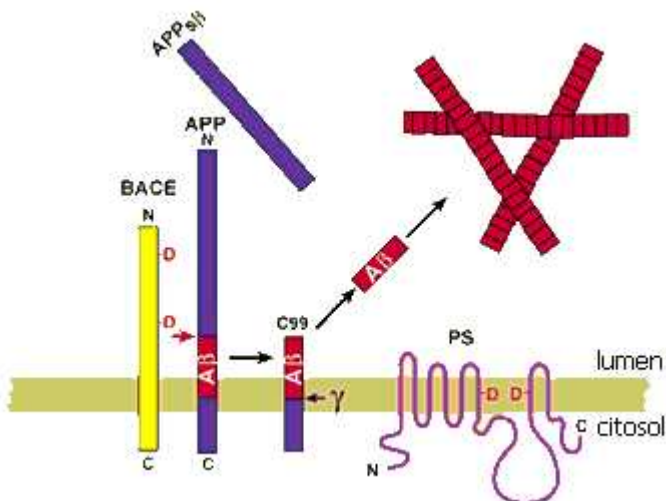
Slika 2. Molekularna osnova lizosomskih bolesti nakupljanja uzrokovanih ne-lizosomskim proteinima, među njima je i bolest NPC uzrokovana mutacijama većinom u genu NPC1, a manjim dijelom u genu NPC2. Zbog nefunkcionalnosti ova dva proteina, prijenos kolesterola dopremljenog u estici LDL do plazmatske membrane i/ili endoplazmatskog retikula je prekinut te dolazi do nakupljanja neesterificiranog kolesterola i glikosfingolipida u lizosomima. (Preuzeto iz Dierks i sur., 2009)

U normalnim fiziološkim uvjetima izvanstanični lipoproteini male gustoće (LDL), koje prepoznaju receptori za LDL na površini stanice, uneseni u stanicu hidroliziraju se u lizosomima pri čemu izmeđusobno nastaje neesterificirani kolesterol koji se prenosi djelomično u endoplazmatski retikul, a djelomično se vraća u plazmatsku membranu. U procesu prijenosa kolesterola iz kasnih endosoma odnosno lizosoma u endoplazmatski

retikul sudjeluju proteini NPC1 i NPC2. Ukoliko su ti proteini nefunkcionalni, kolesterol ostaje zarobljen u kasnim endosomima odnosno lizosomima te se takvi endosomi udružuju u multivezikularne komplekse uzrokuju i "zastoj u prometu lipida" (engl. *lipid traffic jam*) (Simons i Gruenberg, 2000; Puri i sur., 1999). Nakupljanje neesterificiranog kolesterola u endosomima/lizosomima kod pacijenata s boleš u NPC javlja se naj eš e u slezeni i u jetri (obi no 2-3 puta više razine od normalnih razina u jetri (Vanier, 1983), dok su u mišjim modelima uo ene i do 8-10 puta više razine kolesterola nego u normalnim mišjim hepatocitima (Beltroy i sur., 2007). U mišjim hepatocitima bez proteina NPC1 uo ena je ubrzana sekrecija lipoproteina i pove ana sinteza lipida, dok mišji modeli ukazuju na korelaciju izme u razine kolesterola u kasnim endosomima/lizosomima i ošte enja stanica (Beltroy i sur., 2007). Ispitivanja u cerebrokortikalnim neuronima ne pokazuju povišenje ukupne razine kolesterola kod bolesti NPC, no *in situ* bojanje filipinom pokazuje nakupljanje neesterificiranog kolesterola u pojedina nim stanicama u obliku spremišnih granula u neuronima i glija stanicama u bolesti NPC, ali i u nekim drugim lizosomskim bolestima nakupljanja. Nakupljanje kolesterola u kasnim endosomima/lizosomima, a da se pritom ukupne razine kolesterola ne pove avaju, upu uje na mogu u promjenu raspodjele kolesterola unutar stanice što u kona nici kao posljedicu nosi kobne promjene u strukturi i funkciji neurona (Walkley i Vanier, 2009). Biokemijska mjerenja razine neesterificiranog kolesterola u mozgu pacijenata s boleš u NPC i mišjih modela ne pokazuju zna ajno povišenje razina istih što se objašnjava istovremenim gubitkom mijelina. Istraživanja sive tvari pacijenata tako er ne pokazuju povišenje razine kolesterola, ali upu uju na mogu u neravnotežu u raspodjeli kolesterola izme u tijela neurona i distalnih aksona, odnosno nemogu nost održavanja strukture membrana na distalnim dijelovima (Vanier, 1999; Karten i sur., 2002).

Bolest NPC se javlja u ranijoj životnoj dobi: rje e kod djece, a naj eš e u adolescenata. Slu ajevi dijagnoze bolesti NPC u zrelijoj dobi su tako er rje i. Klini ki simptomi bolesti NPC su promjene kognitivnih sposobnosti, ponašanja, motori kih i senzori kih funkcija koje se o ituju kao mentalna retardacija i demencija, distonija, disartrija, ataksija, spazam, gubitak vida (Jin i sur., 2004; Jeyakumar i sur., 2005). Do disfunkcije cerebeluma u bolesti NPC dolazi zbog gubitka Purkinjeovih stanica u tom podru ju, što je primjer selektivne osjetljivosti neurona u lizosomskim bolestima nakupljanja (Jeyakumar i sur., 2005; Walkley i Vanier, 2009).





Slika 3. Prikaz mjesta cijepanja  $\alpha$ - i  $\gamma$ -sekretaze te princip nakupljanja A $\beta$  u lumenu endosomalnih/lizosomalnih organela

Otkad je otkriveno da razina kolesterola u stanici utječe na cijepanje proteina APP, povećano je zanimanje istraživača za A $\beta$  za bolest NPC. Zbog slične stanice ne patologije, koja uključuje stvaranje neurofibrilarnih niti, disfunkciju lizosomskog sustava, utjecaj genotipa apolipoproteina E  $\epsilon$ 4 te nakupljanje A $\beta$  u endosomima, bolest NPC koristi se kao model u istraživanju uloge kolesterola u nastanku A $\beta$ . U stanicama koje su tretirane tvari U18666A (hidrofobnim aminom koji inhibira funkciju proteina NPC1 pa time i prijenos kolesterola) kao i u stanicama s mutiranim oblikom proteina NPC1 te u mozgu NPC1-transgenih miševa otkriveno je značajno povećanje razine peptida C99, A $\beta$  i premještanje proteina PS1 u rane/kasne endosome (Fassbender i sur., 2001; Yamazaki i sur., 2001; Runz i sur., 2002; Burns i sur., 2003; Jin i sur., 2004). Međutim, mehanizam ovih događaja još uvijek nije razjašnjen.



## CILJ RADA

Ovim radom htjeli smo ispitati utje e li i na koji na in nakupljanje kolesterola na razmještaj proteina APP i PS1 u stani nim organelima u bolesti NPC. Pretpostavljamo da nakupljanje kolesterola u kasnim endosomima/lizosomima u bolesti NPC uzrokuje premještanje proteina APP i/ili PS1 u spomenute organele. Tako er, pretpostavljamo da zbog takvog prerazmještanja proteina APP dolazi do pove ane sinteze peptida A u kasnim endosomima/lizosomima. Cilj ovog istraživanja je bio pobliže razjasniti mehanizam djelovanja kolesterola na cijepanje proteina APP i sintezu peptida A te doprinjeti objašnjenju utjecaja kolesterola na nastanak Alzheimerove bolesti.

## MATERIJALI I METODE

### Stani ne kulture

U istraživanju smo koristili stanice jajnika kineskog hrka divljeg tipa (CHOwt, od engl. *Chinese Hamster Ovary*) i stanice kojima nedostaje gen za protein NPC1 (stanice CHO NPC1-null, odnosno stanice CHO NPC1<sup>-/-</sup>), dobivene ljubaznošću dr. Oryja (*Washington University School of Medicine, St. Louis, MO*). Stanice smo uzgajali u standardnoj tekućoj hranjivoj podlozi za stanice CHO koja se sastoji od: medija DMEM:F12 (1:1) (Gibco, SAD) koji sadrži 10% seruma fetusa goveda (FBS, Gibco) uz dodatak antibiotika penicilina (10 mg/mL, Gibco) i streptomicina (25 µg/mL, Gibco) te L-glutamina (2 mM, Gibco).

### Razdvajanje stanica i organela centrifugiranjem u gradijentu gustoće

Kako bismo razdvojili stanice i organele centrifugiranjem u gradijentu gustoće, slijedili smo protokol Lee i sur. uz manje izmjene (Lee i sur., 2003). Stanice smo uzgojili do 80%-tne popunjenosti na deset ploča za uzgoj kulture stanica promjera 15 cm. Zatim smo stanice isprali dva puta u puferu PBS bez Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> (pH 7,3; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) te smo ih skupili struganjem u 3 mL pufera za homogenizaciju (HB; 250 mM saharoza, 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA) uz dodatak inhibitora proteaza (*Complete Mini Protease inhibitor cocktail*, Roche Diagnostics GmbH, Njemačka). Stanice smo homogenizirali s dvadeset udaraca u Dounceovom homogenizatoru, a dobiveni homogenat smo centrifugirali 15 minuta pri 4°C i 800 × g (Eppendorf mikrocentrifuga 5415R) kako bismo uklonili ostatak stanica, jezgre i mitohondrije. Supernatant (tzv. PNS od engl. *post nuclear supernatant*) smo razrijedili u 60%-tnoj otopini Iodixanola (OptiPrep, Sigma-Aldrich) do konačnog udjela od 25%. Ovako pripremljen PNS smo nanijeli u epruvetu za ultracentrifugu (14x89mm, Beckman Coulter, SAD), pri čemu je količina proteina u uzorcima stanica CHOwt i CHO NPC1-null bila jednaka. PNS smo nadslojili s po 1 mL otopina Iodixanola u hladnom puferu za homogenizaciju (HB) različitih volumnih udjela Iodixanola (20, 18,5, 16,5, 14,5, 12,5, 10,5, 8,5, 6,5%). Tako pripremljen gradijent smo centrifugirali 20 sati pri 4°C i 27 000 rpm (85 000 × g) u ultracentrifugi (Beckman Coulter, Optima XL-100K Ultracentrifuge) koristeći rotor SW 41 Ti. Nakon centrifugiranja skupili smo 10 frakcija od po 1 mL s vrha tube, a frakcija 11 je sadržavala zaostatke stanica i jezgara iz PNS-a. U

svakoj frakciji smo zatim odredili koncentraciju proteina i kolesterola, precipitirali smo proteine i analizirali ih western analizom.

### **Određivanje koncentracije proteina**

Skupljenim frakcijama odredili smo koncentracije proteina koristeći komplet *DC Protein assay* (Bio-Rad Laboratories, SAD) koji se temelji na metodi određivanja koncentracije proteina po Lowryju uz manje izmjene. Ukratko, metoda se zasniva na reakciji između proteina i bakra u lužnatom mediju te naknadnoj redukciji Folinovog reagensa. Koristeći albumin iz govejeg seruma (BSA, Bio-Rad) kao standard pripremili smo razrješenja (0; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75 i 1 mg/mL) za izradu baždarnog pravca. Na mikrotitratske pločice s 96 bunara nanijeli smo 5  $\mu$ L pojedinog razrješenja standarda i 5  $\mu$ L razrješenog uzorka svake pojedine frakcije. Na to smo dodali 25  $\mu$ L otopine A (lužnata otopina bakrova tartarata), zatim 200  $\mu$ L otopine B (razrješeni Folinov reagens) te ostavili stajati pri sobnoj temperaturi 15 min. Nakon toga smo odredili apsorbanciju pri valnoj duljini 750 nm (Multiskan EX, Thermo Scientific, SAD). Koncentraciju proteina (izraženu u mg/mL) u pojedinoj frakciji odredili smo prema baždarnom pravcu. Svi ostali postupci određivanja koncentracije proteina bili su jednaki gore opisanom.

### **Taloženje proteina**

Kako bismo istaložili proteine u frakcijama, alikvotu frakcija dodali smo 4 volumena hladnog 100%-tnog acetona te smo uzorke nakon kratkog miješanja ostavili pri  $-20^{\circ}\text{C}$  preko noći. Uzorke smo centrifugirali 10 min pri  $4^{\circ}\text{C}$  i  $16\ 000 \times g$  (mikrocentrifuga Eppendorf 5415R) nakon čega smo aceton pažljivo uklonili. Isti talog proteina otopili smo u puferu za lizu (50 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP40, 0.5% Triton-X100, inhibitor proteaza (*Complete Mini Protease inhibitor cocktail*, Roche)) u koji smo još dodali pufer za nanošenje uzoraka (PLD, od engl. *protein loading dye*) do konačne koncentracije 2 puta (2x). Pri tom smo koristili 6 puta koncentriran pufer PLD (10 mL 6xPLD: 6,0 mL glicerola, 1,2 g SDS-a, 0,31g DTT-a, 1,25 mL 0,5 M pufera Tris pH 6,8, boje bromfenol plavo do pojave tamnoplave boje).

### **Imunoprecipitacija**

Uzorke frakcija (500  $\mu$ L) smo razrijedili dodatkom 500  $\mu$ L pufera za imunoprecipitaciju (IP: 50 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP40, 0.5% Triton-X100, inhibitor proteaza (*Complete Mini Protease inhibitor cocktail*, Roche)) te

smo dodali 40  $\mu\text{L}$  protein A agaroze (Invitrogen, SAD) te 4  $\mu\text{L}$  poliklonalnog antitijela 6687 koje detektira 20 zadnjih aminokiselina na C-terminusu proteina APP (dobiveno ljubaznoš u dr. Christiana Haass, Adolf-Butenandt Institute, Ludwig-Maximilians Univeristat, Munchen, Njema ka) kona nog razrje enja 1:250. Smjesu smo ostavili preko no i uz lagano miješanje pri 4°C. Agarozu s vezanim antitijelima i proteinima oborili smo centrifugiranjem 1 minutu pri 4°C i 16 000 x g (mikrocentrifuga Eppendorf 5415R). Talog smo isprali 2 puta s 1 mL pufera IP te ponovno oborili. Talog smo potom osušili pomo u vakuum sisaljke uz korištenje 30G igle. Na suhi talog dodali smo 30  $\mu\text{L}$  2x PLD pufera, uzorak smo inkubirali 10 min pri 70°C, nakon ega smo uzorak nanijeli na 12%-tni poliakrilamidni gel.

### Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu i prijenos proteina na membranu

Proteine koje smo detektirali western analizom prethodno smo razdvojili elektroforezom u poliakrilamidnom gelu. Ovisno o veli ini proteina kojeg smo željeli detektirati koristili smo 8% i 12%-tne poliakrilamidne gelove za razdvajanje te 5%-tni gel za sabijanje uzoraka. Sastav i volumeni otopina potrebnih za pripravu poliakrilamidnih gelova prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Sastav poliakrilamidnih gelova.

	8% gel (mL)	12% gel (mL)	5% gel (mL)
deH <sub>2</sub> O	2,35	1,65	1,42
30% otopina akrilamida*	1,3	2,0	0,33
1,5M tris (pH 8,8)	1,3	1,3	0,25**
10% APS	0,05	0,05	0,02
TEMED	0,003	0,002	0,002
ukupni volumen	5	5	2

\* dobiva se miješanjem akrilamida i bisakrilamida u omjeru 29:1

\*\* 5%-tni gel koristi se kao sabirni gel te se u njegov sastav umjesto pufera 1,5 M tris (pH 8,8) stavlja pufer 1,0 M tris (pH 6,8)

Prije nanošenja na gel, uzorke smo prethodno denaturirali dodatkom pufera PLD (6xPLD: 6,0 mL glicerola, 1,2 g SDS-a, 0,31g DTT-a, 1,25 mL 0,5 M pufera Tris pH 6,8,

boja bromfenol plavo, nadopuniti s vodom do ukupnog volumena 10 mL) te zagrijavanjem 10 minuta pri 70°C. Paralelno s uzorcima na gel smo nanijeli standard molekulske mase proteina (SeeBlue Plus2 Pre-stained standard, Invitrogen). Elektroforezu smo provodili u puferu sastava: tris baza (3 g/L), glicin (14,4 g/L) i SDS (1 g/L) u deH<sub>2</sub>O, pri konstantnom naponu struje 150 V. Nakon elektroforeze proteine s gela smo prenijeli na membranu PVDF (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka) u uvjetima istosmjernne struje u puferu sastava: 200 mL/L metanola, 14,4 g/L glicina i 3,03 g/L tris baze u deH<sub>2</sub>O, pri konstantnoj jakosti struje 200 mA u trajanju 80 min.

### **Western analiza**

Western analizom pratili smo prisutnost određenih proteina ili proteinskih biljega u pojedinim frakcijama dobivenim centrifugiranjem u gradijentu gustoće nakon taloženja proteina ili imunoprecipitacije. U tablici 2. su prikazana primarna antitijela i njihova razrjeđenja koja smo pri tom koristili.

Membrane PVDF na koje smo prenijeli proteine blokirali smo 30 minuta u puferu TBST koji sadrži 5%-tno nemasno mlijeko (Carnation, Nestlé, Švicarska) uz kontinuirano protresanje. Blokiranu membranu smo inkubirali preko noći u otopini odgovarajućeg primarnog antitijela (vidi tablicu 2). Kako bismo uklonili nespecifično vezano antitijelo, membranu smo zatim ispirali tri puta u puferu TBST tijekom 30 minuta uz kontinuirano protresanje te ju inkubirali 60 minuta u otopini sekundarnog antitijela konjugiranog peroksidazom iz hrena (*Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP-Conjugate* ili *Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP-Conjugate*, Bio-Rad Laboratories, SAD) u puferu TBST koji sadrži 5%-tno mlijeko, u omjeru 1:3 000. Nakon ponovnog ispiranja tri puta u puferu TBST tijekom 30 minuta uz kontinuirano protresanje, na membranu smo dodali kemiluminiscentni supstrat (*BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit)*, Roche) te nakon 5 minuta djelovanja supstrata, signal smo vizualizirali na filmu (*Lumi-film chemiluminescent detection film*, Roche) uz variranje vremena ekspozicije. Filmove smo razvijali u uređaju za razvijanje Curix 60 (AGFA, Njemačka).

Tablica 2. Proteinski biljezi korišteni u western analizi.

Organel/protein	Biljeg/Ime	Proizvođa	Razrjeenje*	Molekulska masa / kDa
<i>Trans</i> -Golgijska mreža	TGN46	Sigma-Aldrich	1:500	80-100
Endoplazmatski retikulum	BIP/GRP78	BD Transduction Laboratories	1:250	78
Rani endosomi	EEA1	BD Transduction Laboratories	1:500	180
Lizosomi	LAMP-1	Sigma-Aldrich	1:1000	120
Presenilin 1	PS1/2953	Dobiveno ljubaznošću u Dr. Christiana Haass	1:500	30
Kasni endosomi	Rab7	Santa Cruz Biotechnology	1:200	23
Recikliraju i endosomi (engl. <i>recycling endosomes</i> )	Receptor transferina/TfR	Zymed Laboratories Inc.	1:500	95
APP	C-terminus proteina APP/ 22C11	Chemicon Int.	1:1000	120
C99	C-terminus proteina APP/ 6687	Dobiveno ljubaznošću u Dr. Christiana Haass	1:1000	36

\* Razrjeenje antitijela u 5%-tnom mlijeku (nemasno mlijeko u prahu, Nestle, Švicarska) otopljenom u puferu TBST (20 mL/L 1M pufera Tris pH 7,5, 9 g/L NaCl, 50  $\mu$ L/L Tween-20 u deH<sub>2</sub>O) uz dodatak 0,025% NaN<sub>3</sub>.

### Određivanje razine kolesterola

Razine ukupnog kolesterola odredili smo koristeći komplet *Amplex Red Cholesterol assay* (Molecular probes, SAD) koji detektira slobodni kolesterol i kolesterol estere. Komplet se temelji na oslobađanju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidacijom kolesterola kolesterol oksidazom te detekcijom peroksida u prisutnosti peroksidaze iz hrena (HRP) pri čemu nastaje fluorescencija i produkt rezorufin. Standardna razrjeenje smo pripravili razrjeenjem referentnog standarda kolesterola (*Cholesterol reference standard*) u prije pripremljenom reakcijskom puferu (*Reaction Buffer*), uz reakcijski pufer bez kolesterola kao negativnu kontrolu. Pozitivnu kontrolu smo priredili otapanjem vodikovog peroksida u reakcijskom puferu. Alikvote uzoraka smo razrijedili u istom puferu te smo ih nanijeli na mikrotitarske ploče s 96 bunara a zajedno s razrjeenjem standarda. U standarde, uzorke i kontrole dodali smo radnu otopinu koja je sadržavala reagens

*Amplex Red*, peroksidazu hrena, kolesterol oksidazu i kolesterol esterazu otopljene u reakcijskom puferu. Nakon 30 minuta inkubacije pri 37°C, fluorescenciju smo mjerili pobuivanjem pri 530 nm, te detekcijom pri 590 nm u aparatu Fluoroskan Ascent FL, Thermo Scientific (SAD).

### **Odreivanje ja ine signala dobivenog western analizom pomo u ra unalnog programa ImageJ**

Program *ImageJ*, koji se koristi za obraivanje slika, skinuli smo sa stranica ameri kog Nacionalnog instituta za zdravlje (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) te pomo u njega, prema uputama, odredili ja inu signala pojedina nih proteinskih biljega po frakcijama u odnosu na ukupnu ekspresiju tog biljega u stanici.

## REZULTATI

### **Ispitivanje razine i smještaja proteinskih biljega stani nih organela (TGN46, BIP/GRP78, EEA1, LAMP-1, Rab7, TfR) u stanicama CHO NPC1-null u odnosu na stanice CHOwt**

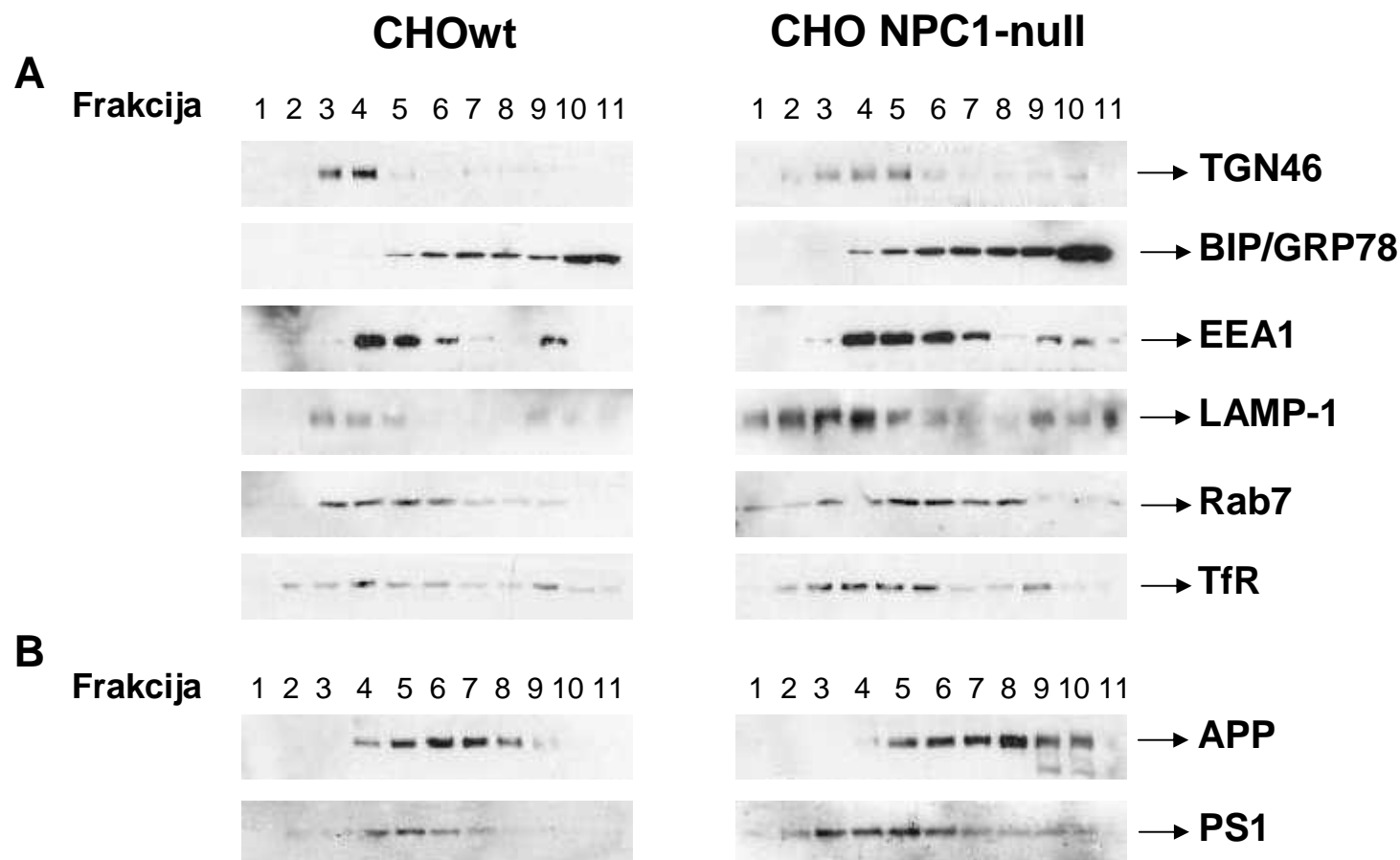
Metodu centrifugiranja u gradijentu Iodixanola primjenili smo kako bismo utvrdili utje e li nakupljanje kolesterola u stanicama CHO NPC1-null na razinu i smještaj proteina APP i PS1 u stani nim organelima u odnosu na stanice CHOwt. Organele razdvojene spomenutom metodom ispitali smo western analizom na prisutnost biljega pojedinih oganela (tablica 2). Rezultati su prikazani na slici 4A, pri emu brojevi iznad rezultata western analize ozna avaju broj frakcije (brojem 1 ozna ena je najlakša/najrje a frakcija, a brojem 11 najguš a odnosno najteža frakcija). Na slici 5 prikazani su rezultati odre ivanja ja ine signala dobivenog western analizom pojedina nih proteinskih biljega (TGN46, BIP/GRP78, LAMP-1, TfR, EEA1 i Rab7) po frakcijama u odnosu na ukupni signal/ekspresiju tog biljega u stanici dobiveni ra unalnim programom *ImageJ*. Na slici 4A može se zamijetiti da je ve ina proteinskih biljega pokazala duga iju razinu i/ili raspodjelu u stanicama CHO NPC1-null u odnosu na stanice CHOwt. Na primjer, dok su proteini BIP/GRP78, LAMP-1 i TfR dali ja i signal western analizom u stanicama CHO NPC1-null u odnosu na stanice CHOwt, proteini EEA1, Rab7 kao i proteini LAMP-1 i TfR pokazali su razli itu raspodjelu u frakcijama u istim stanicama. Op enito, raspodjela ovih proteina u frakcijama u stanicama CHO NPC1-null bila je znatno proširena u odnosu na njihovu raspodjelu u stanicama CHOwt (slike 4A, 5 i 6), ukazuju i na promijenjenu raspodjelu ovih proteina u stanici usljed nakupljanja kolesterola u kasnim endosomima/lizosomima..

Biljeg za endoplazmatski retikul, protein BIP/GRP78, u stanicama CHOwt je pokazao najja i signal u frakcijama 6-8 i 10–11, a nešto slabiji u frakcijama 5 i 9 (slike 4A i 5). U stanicama CHO NPC1-null protein BIP/GRP78 dao je razvu eniji sinal; odnosno pojavio se u frakcijama 4–11 s kontinuiranim pove ajem relativne razine proteina od frakcija manjih prema frakcijama ve ih gusto a (slike 4A i 5). Nadalje, razina proteina BIP/GRP78 u svakoj pojedinoj frakciji u stanicama CHO NPC1-null viša je od razina proteina u odgovaraju im frakcijama stanica CHOwt. Ispitali smo i lokalizaciju biljega za *trans*-Golgijevu (TGN46) mrežu u stanicama CHOwt i CHO NPC1-null. Biljeg TGN46 jasno je dao signal u dvije frakcije – 3 i 4 u stanicama CHOwt, dok se u stanicama CHO NPC1-null najja i signal proteže kroz frakcije 3-5 (slike 4A i 5). Rezultati

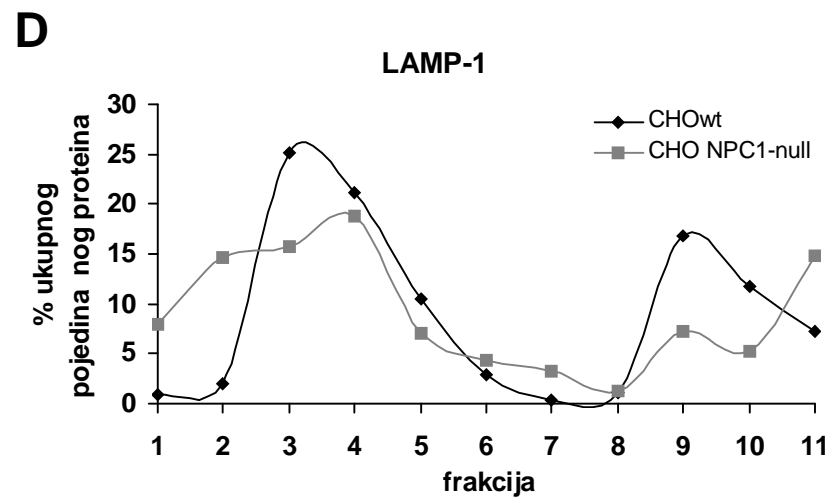
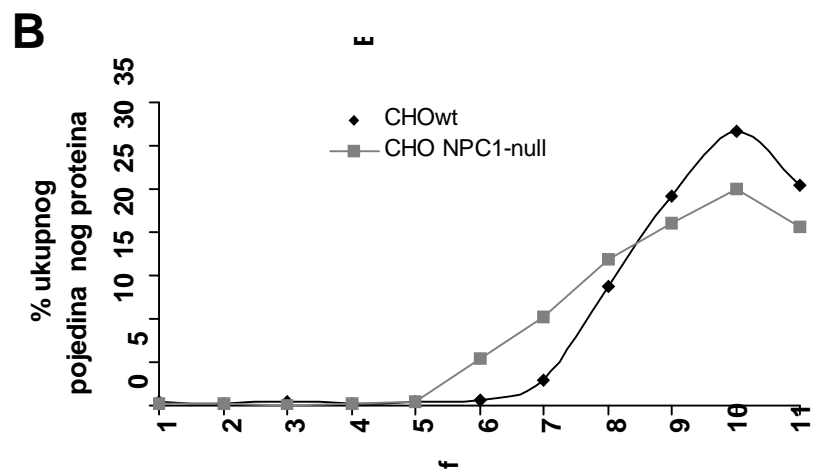
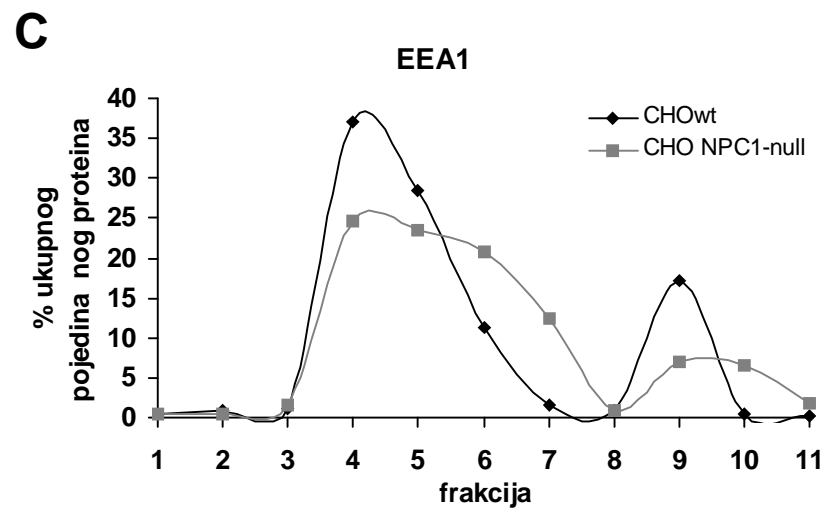
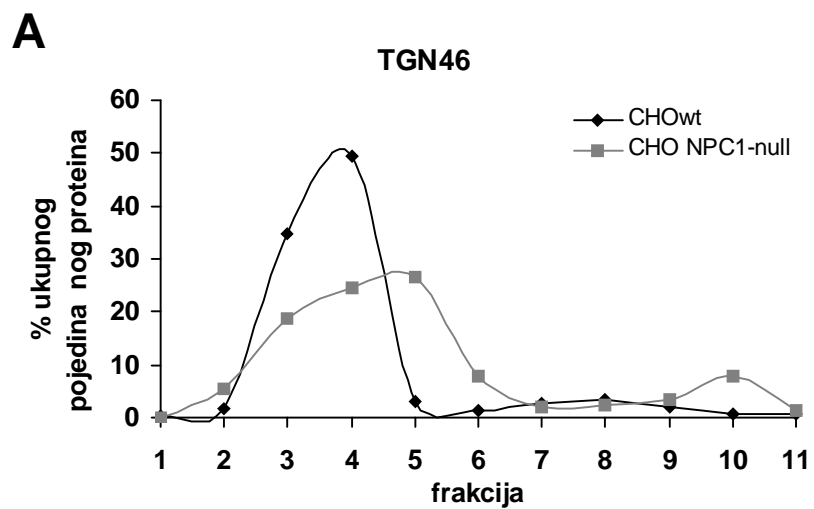


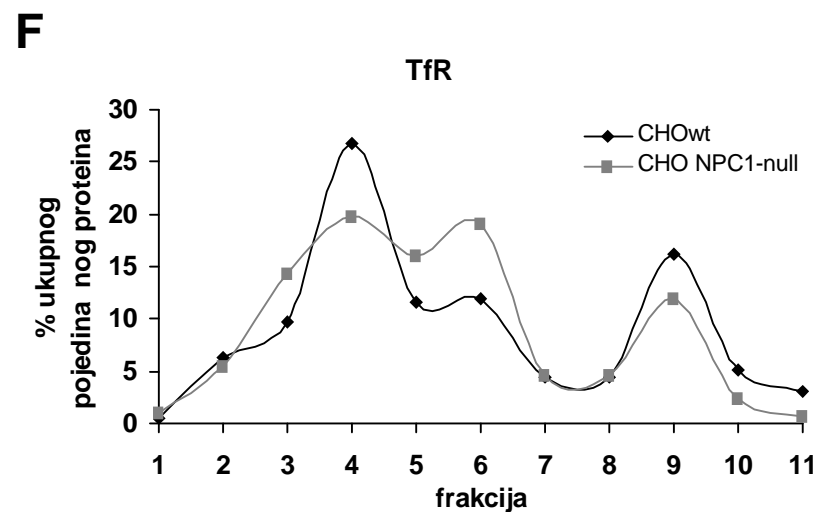
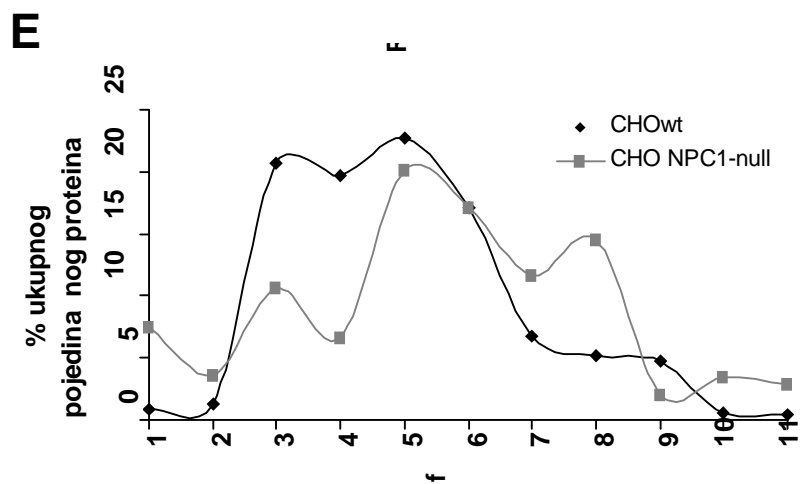
na slici 4A i 5 pokazuju i rasprostranjenost biljega recikliraju ih endosoma - receptora transferina, TfR. Dok smo u stanicama CHOwt najja i signal proteina TfR detektirali u frakciji 4 uz nešto slabiji signal u frakcijama 2-6, u stanicama CHO NPC1-null TfR je dao najja i signal u frakcijama 3-6 i tek nešto slabiji u frakciji 2.

Biljeg ranih endosoma, EEA1, pokazao je najve u relativnu razinu proteina u frakcijama 4 i 5 te slabiji signal u frakciji 6 u stanicama CHOwt, a u stanicama CHO NPC1-null najja i signal je detektiran u frakcijama 4-6 te slabiji u frakciji 7 (slike 4A i 5). Antitijelo na protein Rab7, kao biljeg kasnih endosoma, u stanicama CHOwt najja e smo detektirali u frakcijama 3-6, dok je u stanicama CHO NPC1-null Rab7 pokazao puno širu raspodjelu po frakcijama s najve om relativnom razinom proteina u frakcijama 3-8 (slike 4A i 5). Biljezi za rane/kasne endosome pokazuju razli it raspored biljega izme u stanica CHOwt i CHO NPC1-null s puno razvu enijim signalom oba biljega u stanicama CHO NPC1-null. Biljeg LAMP-1 koristili smo kako bismo odredili raspodjelu lizosoma u obje stani ne linije, a rezultati i u slu aju ovog biljega pokazuju razvu eniji signal u stanicama CHO NPC1-null u usporedbi sa stanicama CHOwt. Dok je u stanicama CHOwt protein LAMP1 prisutan u frakcijama 3 i 4 te nezatno i u frakciji 5, u stanicama CHO NPC1-null najja i signal smo detektirali u frakcijama 2-4, a nešto slabiji u frakcijama 1, 5 i 6 (slike 4A i 5).

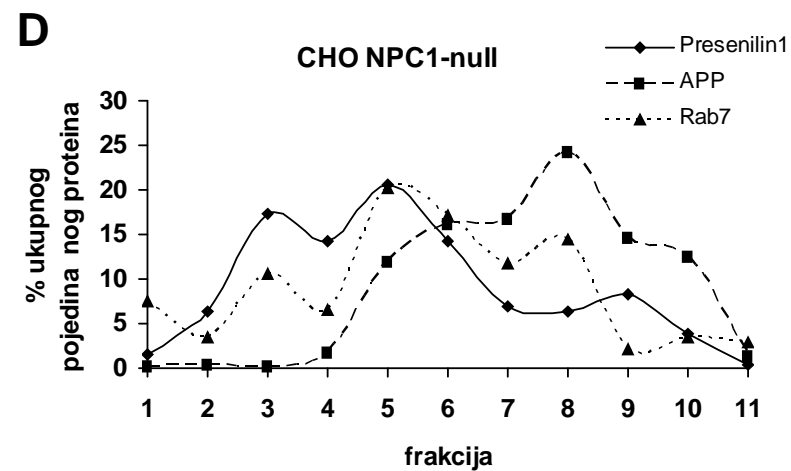
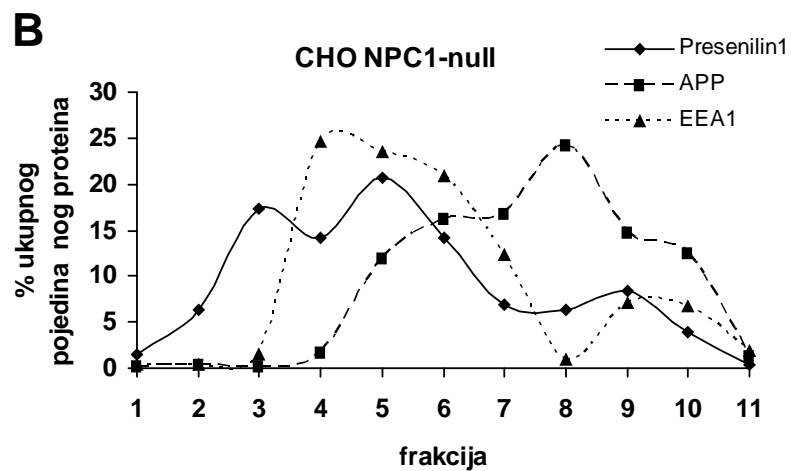
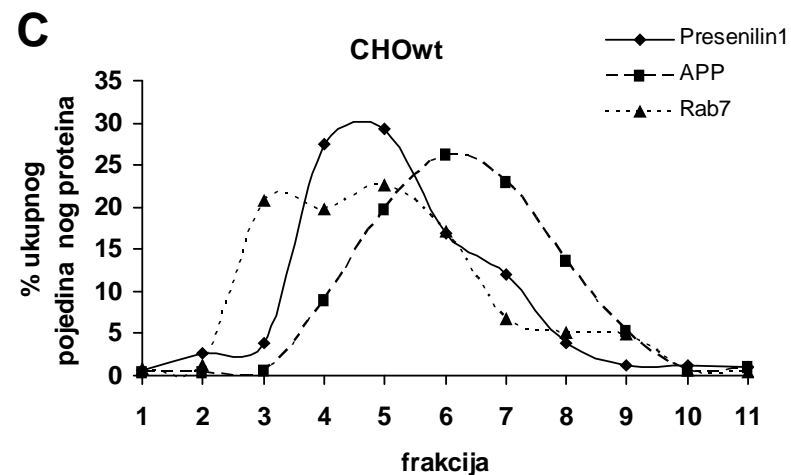
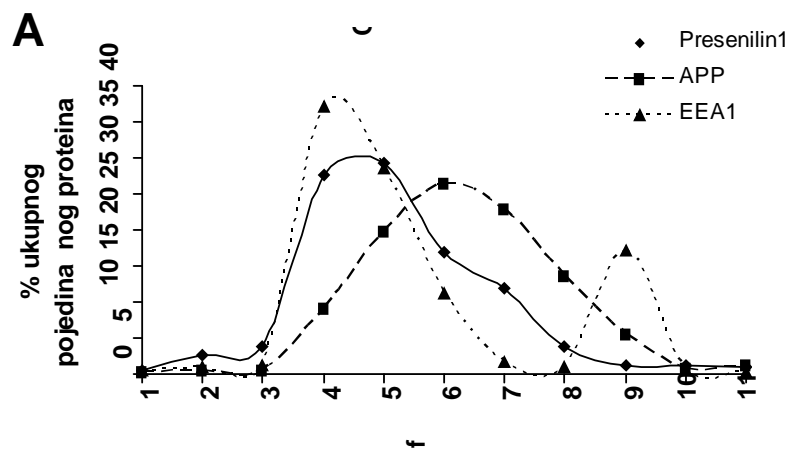


Slika 4. Stani ni organeli odvojeni metodom centrifugiranja u gradijentu gustoće. Organele smo razdvojili u gradijentu Iodixanola i detektirali pomoću sljedećih antitijela. A: TGN46 (Sigma-Aldrich), BIP/GRP78 (BD Transduction Laboratories), EEA1 (BD Transduction Laboratories), LAMP-1 (Sigma-Aldrich), Rab7 (Santa Cruz Biotechnology), TfR (Zymed Laboratories Inc.). B: Za detekciju proteina APP koristili smo antitijelo 22C11 (Chemicon Int.), a za protein PS1 antitijelo 2953 (PS1, dobiveno ljubaznošću u Dr. Christiana Haassa). Brojevi iznad rezultata western analize označavaju broj frakcije: brojem 1 označena je najlakša/najrjeđa frakcija, a brojem 11 najgušća odnosno najteža frakcija.





Slika 5. Kvantifikacija signala proteina TGN46, BIP/GRP78, EEA1, LAMP-1, Rab7, i TfR dobivenih western analizom pomoću analnog programa ImageJ. U stanicama CHOwt i CHO NPC1-null kvantificirali smo signale biljega za trans-Golgijevu mrežu (A, TGN46), endoplazmatski retikulum (B, BIP/GRP78), rane i kasne endosome (EEA1, Rab7) (C, E), lizosome (D, LAMP-1) i receptor transferina (F, TfR).



Slika 6. Kvantifikacija signala proteina APP, PS1, EEA1 i Rab7 dobivenih western analizom u stanicama CHOwt i CHO NPC1-null pomoću analnog programa ImageJ. U stanicama divljeg tipa, CHOwt (A i C), i u stanicama CHO NPC1-null (B i D) kvantificirali smo signale proteina APP i PS1 te ranih i kasnih endosoma, EEA1 i Rab7.

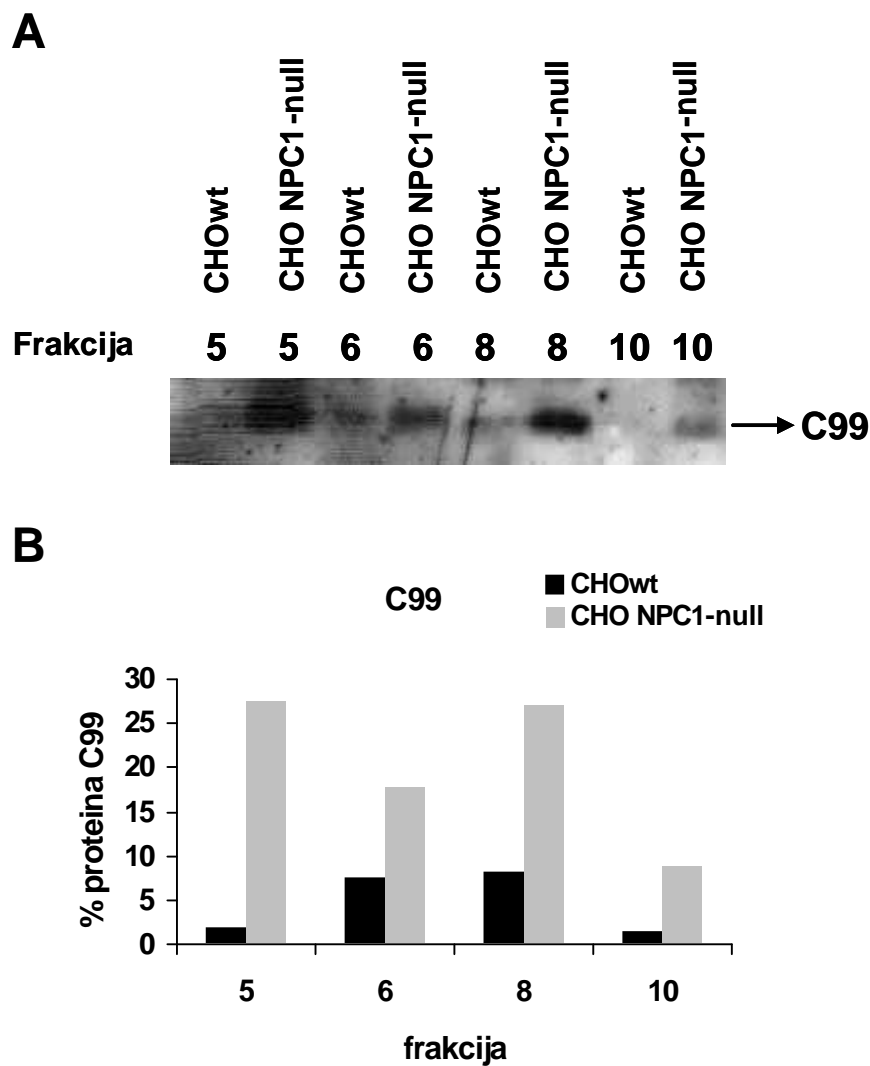
## **Stanice CHO NPC1-null pokazuju promijenjen smještaj i ekspresiju proteina APP i PS1 u ranim/kasnim endosomima u odnosu na stanice CHOwt**

Kako bismo ispitali je li povećana sinteza peptida A $\beta$  i odsjeka C99 u stanicama CHO NPC1-null posljedica promijenjenog smještaja prekursora proteina amiloid- $\beta$  (APP) uslijed nakupljanja kolesterola u ovim stanicama, pratili smo raspodjelu proteina APP u stanicama CHOwt i CHO NPC1-null u gradijentu gustoće Iodixanola (slika 4B). Paralelno smo pratili i smještaj proteina PS1 za kojeg je od prije već bilo poznato da pokazuje različit smještaj u ranim/kasnim endosomima uslijed disfunkcije proteina NPC1 (Runz i sur., 2002; Burns i sur., 2003). Na slici 6 prikazani su rezultati određivanja jačine signala proteina APP i PS1 kao i signala proteinskih biljega ranih/kasnih endosoma (EEA1/Rab7) po frakcijama, u odnosu na ukupnu ekspresiju tih biljega u stanici, dobiveni računalnim programom *ImageJ*. U stanicama CHOwt, APP smo detektirali u frakcijama 5-7, a nešto slabije u frakcijama 4 i 8 (slike 4B i 6). U stanicama CHO NPC1-null signal za APP je bio najjači u frakcijama 6-8, što prema slici 4A odgovara ranim/kasnim endosomima (biljezi EEA1 i Rab7). Slabiji signal je također uočeno u frakcijama 5 i u frakcijama 9 i 10, što pokazuje da je signal u stanicama CHO NPC1-null razvučeniji i pokazuje pomak «u desno» u odnosu na stanice CHOwt (slike 4B i 6). Ovaj rezultat je ukazao da je lokalizacija proteina APP promijenjena u stanicama CHO NPC1-null te da se uočene promjene u raspodjeli proteina APP djelomično poklapaju s biljezima ranih/kasnih endosoma.

Također smo ispitali smještaj proteina PS1 u obje stanične linije. U stanicama CHOwt najjači signal proteina PS1 detektirali smo u frakcijama 4 i 5, a nešto slabiji signal u frakcijama 6 i 7, dok se u stanicama CHO NPC1-null najjači signal pojavio u frakcijama 3-6, a slabiji u frakcijama 2 i 7-9 (slike 4B i 6). Signal za PS1 u stanicama CHO NPC1-null pokazao je veće relativne razine proteina u frakcijama 4-7 nego u stanicama CHOwt. Također je signal za PS1 u stanicama CHO NPC1-null razvučeniji te pokazuje i pomak «u desno» (slike 4B i 6). Međutim, iako su proteini APP i PS1 pokazali promijenjenu raspodjelu u gradijentu Iodixanola u stanicama CHO NPC1-null u odnosu na stanice CHOwt, nismo zamijetili povećanje u preklapanju njihove raspodjele u ranim/kasnim endosomima u stanicama CHO NPC1-null.

**U stanicama CHO NPC1-null pove ana razina C-terminalnog odsje ka proteina APP - C99 uo ena je u ranim/kasnim endosomima**

Uzorke frakcija, koje su pokazale prisutnost biljega ranih/kasnih endosoma (frakcije 5, 6, 8, i 10) u stanicama CHOwt i CHO NPC1-null, imunoprecipitali smo i analizirali western analizom kako bismo ispitali prisutnost peptida C99, C-terminalnog odsje ka proteina APP koji je ujedno direktni supstrat  $\gamma$ -sekretaze pri proizvodnji peptida A (slika 7A). U svim ispitanim frakcijama razine odsje ka C99 u stanicama CHO NPC1-null više su nego razine u stanicama CHOwt, a najve u razliku u relativnoj razini odsje ka C99 izme u stanica CHOwt i stanica CHO NPC1-null uo ili smo u frakciji 5 te u frakciji 8 (slika 7B). Iako smo u obje stani ne linije u frakciji 5 detektirali protein APP i to u sli nim relativnim razinama ekspresije (vidi sliku 4B), razina odsje ka C99 u stanicama CHO NPC1-null u frakciji 5 je 14 puta ve a nego u stanicama CHOwt, što je odre eno iz western analize pomo u programa *ImageJ* (slika 7B). Frakcije 5 i 8 u stanicama CHO NPC1-null predstavljaju frakcije s najja im detektiranim signalom odsje ka C99. S obzirom da ove frakcije u stanicama CHO NPC1-null, prema slici 4A, predstavljaju frakcije ranih (frakcija 5) i kasnih (frakcija 8) endosoma, ovaj rezultat ukazuje da je pove ana proizvodnja odsje ka C99 u stanicama CHO NPC1-null smještena u ovim organelima. U stanicama CHO NPC1-null u frakciji 6 signal je slabiji nego u frakcijama 5 i 8, dok je u frakciji 10 signal najslabiji. U stanicama CHOwt, u frakcijama u kojim smo detektirali biljege ranih (frakcije 5 i 6) i kasnih endosoma (frakcije 5, 6, 8), detektirani signal je znatno slabiji u odnosu na dobivene signale ovog odsje ka u istim frakcijama u stanicama CHO NPC1-null (slika 7A i B). Ovaj rezultat je potvrdio da je proizvodnja odsje ka C99 znatno pove ana u stanicama CHO NPC1-null u odnosu na stanice CHOwt te je pokazao da se njegova proizvodnja u uvjetima nedostatka proteina NPC1 i povišene razine kolesterola odvija u kasnim i ranim endosomima.

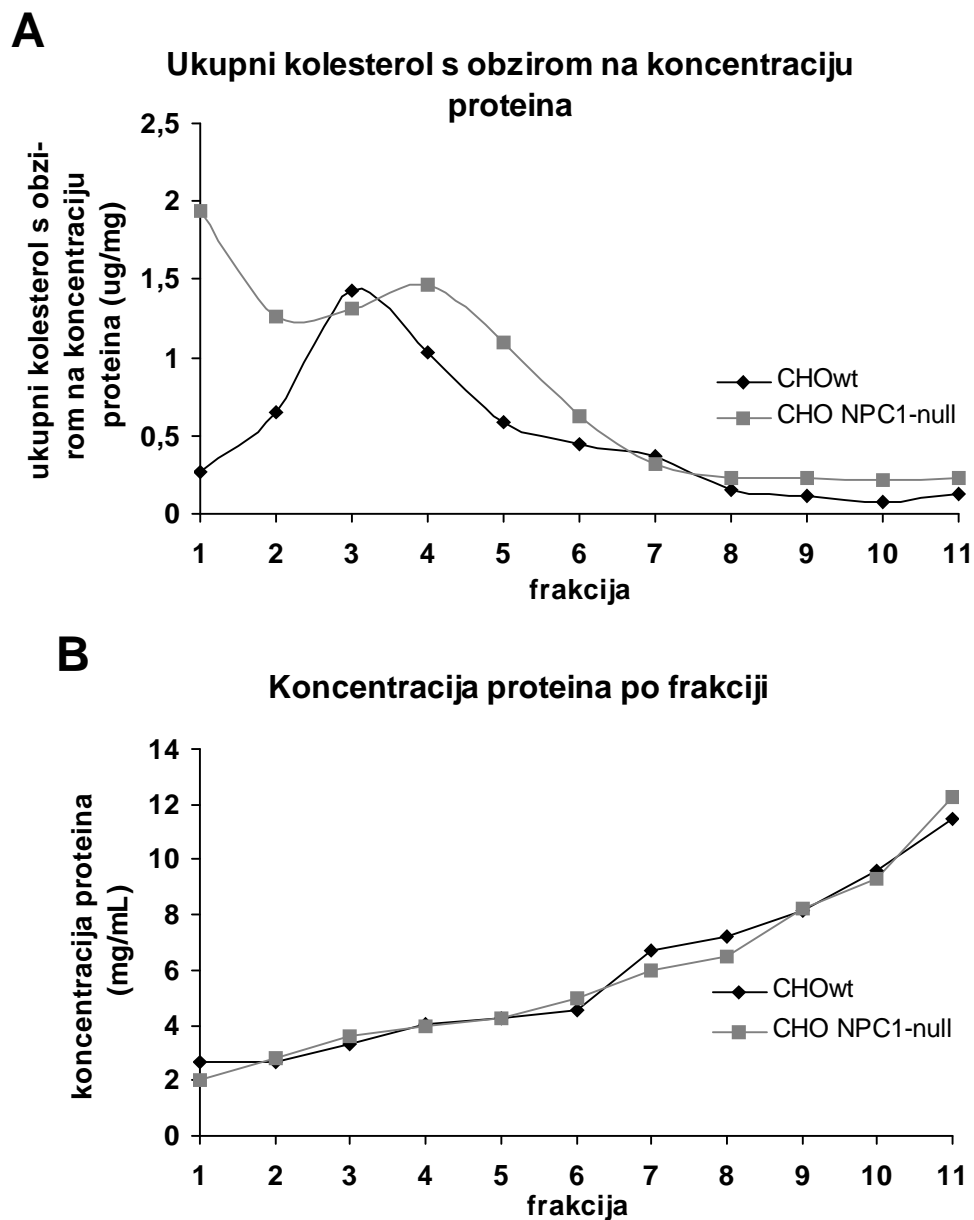


Slika 7. Ispitivanje razine i smještaja odsjeka C99 u frakcijama ranih/kasnih endosoma u stanicama CHOWt i CHO NPC1-null. A: Western analiza ekspresije odsjeka C99 u endosomalnim frakcijama stanica CHOWt i CHO NPC1-null. B: Prikaz jačine signala dobivenog western analizom odsjeka C99 po frakcijama 5, 6, 8 i 10 u odnosu na ukupnu ekspresiju po svim frakcijama i stanicama dobivenih računarnim programom ImageJ.



**U stanicama CHO NPC1-null razine kolesterola su povišene u endosomima i lizosomima u odnosu na stanice CHOwt**

Primjenom metode centrifugiranja u gradijentu gustoće i Iodixanola za razdvajanje staničnih organela te mjerenjem razine kolesterola u svakoj pojedinoj frakciji uočeno je da je u stanicama CHO NPC1-null omjer razine ukupnog kolesterola i razine proteina u pojedinoj frakciji bio povišen u frakcijama 1-2, 4-6 i 8-11 u odnosu na isti u stanicama divljeg tipa (slika 8A). U prvoj frakciji razina kolesterola s obzirom na koncentraciju proteina viša je u stanicama CHO NPC1-null nego u stanicama CHOwt (oko 7 puta), dok je u ostalim frakcijama 1-2 puta viša razina kolesterola s obzirom na koncentraciju proteina u stanicama CHO NPC1-null. U frakciji 3 i 7 razine kolesterola u stanicama CHOwt slične su razinama kolesterola u stanicama CHO NPC1-null. Frakcije 1-2, 4-6 i 8-11, u kojima smo detektirali višu razinu kolesterola u stanicama CHO NPC1-null u odnosu na stanice CHOwt (slika 8A), predstavljaju frakcije lizosoma te ranih i kasnih endosoma (vidi sliku 4A i 5). Koncentracija proteina u uzorcima frakcija koje smo koristili u western analizi, imunoprecipitaciji i protokolu za određivanje razine kolesterola, u obje stanične linije bila podjednaka (slika 8B).



Slika 8. Ukupni kolesterol s obzirom na koncentraciju proteina i koncentracije proteina po frakcijama u stanicama CHOwt i CHO NPC1-null. A: Rezultati određivanja razina ukupnog kolesterola s obzirom na koncentraciju proteina koriste i komplet Amplex Red Cholesterol assay (Molecular probes, SAD). B: Rezultati određivanja koncentracije proteina po frakcijama.

## RASPRAVA

Utjecaj kolesterola na stvaranje peptida A i patogenezu Alzheimerove bolesti u žiži je istraživanja posljednjih nekoliko godina (Wolozin, 2004b; Wolozin i sur., 2006). Iako su *in vitro* i *in vivo* pokusi pokazali da kolesterol regulira proizvodnju peptida A (Simons i sur., 1998; Fassbender i sur., 2001; Refolo i sur., 2000; Refolo i sur., 2001), glavnog uzroka AB, molekularni mehanizam ovog efekta još uvijek nije poznat. Stoga je cilj ovog rada bio istražiti regulira li kolesterol prijenos proteina APP i PS1, dva ključna proteina u patogenezi AB, u određenim staničnim organelima doprinose i tako povišenom stvaranju peptida A. Pretpostavili smo da kolesterol indirektno djeluje na proteine APP i PS1 na način da regulira njihov smještaj u organelima endocitoznog puta, centralnom mjestu sinteze peptida A u stanici. U našim istraživanjima primijenili smo model bolesti Niemann-Pick tipa C (NPC) za koju je već od prije poznato da dolazi do nakupljanja kolesterola u kasnim endosomima/lizosomima (Millard i sur., 2000; Puri i sur., 1999) te da pokazuje fenotip sličan Alzheimeru, tj. povišeno stvaranje peptida A i odsjeka C99 (Burns i sur., 2003; Yamazaki i sur., 2001; Runz i sur., 2002; Jin i sur., 2004).

### **Stanice CHO NPC1-null pokazuju promijenjenu ekspresiju i/ili smještaj proteinskih biljega staničnih organela (TGN46, BIP/GRP78, EEA1, LAMP-1, Rab7, TfR) u odnosu na stanice CHOwt**

Metodu centrifugiranja u gradijentu Iodixanola primijenili smo kako bismo utvrdili utječe li nakupljanje kolesterola u stanicama CHO NPC1-null na smještaj proteina APP i/ili PS1 u staničnim organelima (Lee i sur., 2003). Organele razdvojene spomenutom metodom ispitali smo western analizom na prisutnost biljega pojedinih organela (tablica 2). Rezultati prikazani na slikama 4A i 5 pokazuju da svi ispitani biljezi staničnih organela (TGN46, BIP/GRP78, EEA1, LAMP-1, Rab7, TfR) pokazuju promijenjenu ekspresiju i/ili smještaj u stanicama CHO NPC1-null u odnosu na stanice CHOwt. S obzirom da su prethodna istraživanja ukazala na promijenjen prijenos proteina u endocitoznom putu u bolesti NPC, kao i u ostalim bolestima nakupljanja lipida (engl. *sphingolipid storage disorders – S LSDs*) (Simons i Ehehalt, 2002; Puri i sur., 1999; Jeyakumar i sur., 2005) posebnu pozornost smo pridali praćenju ovih organela. Biljezi za rane (EEA1) i kasne endosome (Rab7) pokazuju različitu raspodjelu između stanica CHOwt i CHO NPC1-null. Detektiran signal ovih biljega u stanicama CHO NPC1-null je više razvijen s većom relativnom razinom proteina od razina proteina u odgovarajućim frakcijama

stanica CHOwt. Razlog pomicanja biljega za endosome u stanicama CHO NPC1-null «na desno» (prema težim, guš im frakcijama) je taj što su u bolesti NPC endosomi pove anij (Sobo i sur., 2007) te agregiraju i stvaraju multivezikularne odjeljke (Simons i Gruenberg, 2000). Biljeg LAMP-1 koristili smo kako bismo odredili raspodjelu lizosoma u frakcijama u obje stani ne linije, a rezultati i u slu aju ovog biljega pokazuju razvu eniji signal u stanicama CHO NPC1-null. Nasuprot tome, u stanicama CHOwt signal se pojavljuje u samo odre enim frakcijama (3-5 i 8-11) i zna ajno je slabiji u odnosu na relativnu razinu proteina u stanicama CHO NPC1-null. Ovaj rezultat je u skladu s rezultatima prijašnjih istraživanja koja su ukazala na promijenjen prijenos membrana i proteina u endocitoznom putu u bolesti NPC (Simons i Gruenberg, 2000; Puri i sur., 1999; Jeyakumar i sur., 2005). S obzirom da su prethodna istraživanja ukazala na to da u bolesti NPC paralelno s nakupljanjem kolesterola u kasnim endosomima/lizosomima vrlo vjerojatno dolazi do njegove deprivacije u endoplazmatskom retikulu (ER) (Ikonen i Holtta-Vuori, 2004; Liscum i Dahl, 1992; Liscum i Faust, 1987), ispitili smo raspodjelu biljega za ER u stanicama CHOwt i CHO NPC1-null. Biljeg za endoplazmatski retikul, protein BIP/GRP78, u stanicama CHO NPC1-null dao je razvu eniji sinal, s pove anjem relativne razine proteina od frakcija manjih prema frakcijama ve ih gusto a. Nadalje, razina proteina BIP/GRP78 u svakoj pojedinoj frakciji u stanicama CHO NPC1-null viša je od razina proteina u odgovaraju im frakcijama stanica CHOwt. Ovi rezultati su pokazali da, paralelno s promjenama organela endocitoznog puta, u bolesti NPC može do i do promijenjene razine i/ili prijenosa proteina/membrana unutar endoplazmatskog retikula. Naime, nedavna istraživanja razine ovog proteina u bolesti GM1-gangliozidozi koja, kao i bolest NPC, spada u poreme aje nakupljanja lipida (engl. *sphingolipid storage disorders*), pokazala su njegovu pove anu ekspresiju (Jeyakumar i sur., 2005; Tessitore i sur., 2004). Ispitavši lokalizaciju biljega za *trans*-Golgijevu mrežu, u stanicama CHO NPC1-null tako er smo pokazali efekt promijenjene ekspresije i smještaja u stanici. Pošto su prijašnja istraživanja pokazala usporeno recikliranje receptora transferina (TfR) i transferina u stanicama NPC (Pipalia i sur., 2007), ispitili smo i smještaj biljega za receptor transferina, TfR, u obje stani ne linije. Rezultati pokazuju ve u rasprostranjenost receptora transferina, TfR, u stanicama CHO NPC1-null kao i njegovu ve u razinu u ovim stanicama u odnosu na stanice CHOwt.

### **Stanice CHO NPC1-null pokazuju promijenjen smještaj i ekspresiju proteina APP i PS1 u ranim/kasnim endosomima u odnosu na stanice CHOwt**

Kako bismo ispitali je li povećana sinteza peptida A $\beta$  zbog nakupljanja kolesterola u stanicama CHO NPC1-null posljedica promijenjenog smještaja prekursora proteina amiloid- $\beta$  (APP), pratili smo lokalizaciju proteina APP u stanicama CHOwt i CHO NPC1-null (Slika 4B). U stanicama CHO NPC1-null zamijetili smo drugačiju raspodjelu signala proteina APP u odnosu na stanice CHOwt, tj. u stanicama CHO NPC1-null signal za APP bio je prisutan u težim frakcijama. Ovaj rezultat je pokazao da je lokalizacija proteina APP promijenjena u stanicama CHO NPC1-null te da se u ovoj promjeni u smještaju proteina djelomično poklapaju s biljezima ranih/kasnih endosoma.

Prethodna istraživanja na stanicama CHO u kojima je protein NPC1 mutiran i istraživanja na mišjem modelu bolesti NPC pokazala su da disfunkcija proteina NPC1 te nakupljanje kolesterola izazivaju promijenjen smještaj proteina presenilin 1 - PS1. S tim u vezi, ispitali smo smještaj proteina PS1 u stanicama CHO u kojima je gen *NPC1* deletiran. Rezultat ispitivanja smještaja proteina PS1 u stanicama CHO NPC1-null pokazao je znatno razvučeniji signal te također pomak «u desno» (slika 4B i 6) što pokazuje da je lokalizacija proteina PS1 kao i lokalizacija proteina APP promijenjena u stanicama CHO NPC1-null. Dok je raspodjela proteina PS1 u potpunosti pratila raspodjelu biljega ranih i kasnih endosoma (EEA1 i Rab7) u stanicama CHOwt i u stanicama CHO NPC1-null, ukazuju i na lokalizaciju ovog proteina u ovim organelima endocitnog puta, raspodjela proteina APP se djelomično preklapala s raspodjelom ovih proteina. Ovaj rezultat nam govori da se u bolesti NPC protein APP zajedno s proteinom PS1 premješta unutar endocitnog puta prema ranim/kasnim endosomima.

### **U stanicama CHO NPC1-null razine C99, C-terminalnog odsjeka proteina APP, povišene su u ranim/kasnim endosomima**

Uzorke frakcija koje su pokazale prisutnost biljega ranih/kasnih endosoma u stanicama CHOwt i CHO NPC1-null (frakcije 5, 6, 8, i 10) smo imunoprecipitali i analizirali western analizom kako bismo ispitali prisutnost peptida C99, C-terminalnog odsjeka proteina APP koji je ujedno direktni supstrat  $\gamma$ -sekretaze pri proizvodnji peptida A $\beta$  (slika 7). U ispitanim frakcijama razine odsjeka C99 u stanicama CHO NPC1-null više su nego razine u stanicama CHOwt, a najveća razlika u relativnoj razini odsjeka C99 između stanica CHOwt i stanica CHO NPC1-null uočena je u frakcijama 5 i 8. U stanicama CHOwt u frakcijama 5, 6 i 8 u kojim smo detektirali i biljeg proteina APP, detektirali smo slabiji signal za biljeg odsjeka C99. Ovaj rezultat je, po prvi put, pokazao

da se povišena proizvodnja odsječka C99 u stanicama CHO NPC1-null odvija u ranim/kasnim endosomima, pretpostavljaju i tako da ove organele predstavljaju mjesta povišene sinteze i nakupljanja peptida A u ovim stanicama. Iako smo u ovim frakcijama pokušali analizirati razinu peptida A metodom ELISA, razine endogenog peptida su vjerojatno bile vrlo niske, tj. ispod granice detekcije spomenutog kompleta, te ih nismo mogli analizirati.

### **U stanicama CHO NPC1-null kolesterol se nakuplja u ranim/kasnim endosomima te lizosomima**

Vizualizacija mjesta nakupljanja kolesterola u stanici metodom fluorescentne mikroskopije (uz primjenu filipina) je pokazala da se u bolesti NPC kolesterol nakuplja u kasnim endosomima/lizosomima (Neufeld i sur., 1999). Primjenom metode centrifugiranja u gradijentu gustoće i lodixanola za razdvajanje stanih organela te mjerenjem razine kolesterola u svakoj pojedinoj frakciji uočili smo da je u stanicama CHO NPC1-null razina ukupnog kolesterola s obzirom na proteine prisutne u pojedinoj frakciji bila povišena u frakcijama 1-2, 4-6 i 8-11 (1-2 puta) u odnosu na razinu kolesterola u stanicama divljeg tipa (slika 8A). Kako je koncentracija proteina stanica CHOwt i CHO NPC1-null bila podjednaka u svim frakcijama (slika 8B), detektirana povišena razina kolesterola u stanicama CHO NPC1-null odgovara realnom stanju nakupljanja kolesterola u određenim organelima tih stanica. U skladu s prijašnjim rezultatima (Puri i sur., 1999; Neufeld i sur., 1999), povišenu razinu kolesterola smo uočili u frakcijama ranih/kasnih endosoma i u lizosomima (slika 4A i 8A), što je posljedica fenotipa stanica CHO NPC1-null kod kojih je zbog nedostatka proteina NPC1 poremećen prijenos kolesterola te se on nakuplja u kasnim endosomima/lizosomima. Pretpostavljamo da povišenje razine kolesterola u prvim frakcijama dijelom predstavlja i kolesterol prisutan u masnim kapljicama (engl. *lipid droplets*) raspršenim u citoplazmi stanica CHO NPC1-null (Liu i sur., 2007; Wiegand i sur., 2003). Naime, od prije je poznato da stanice CHO NPC1-null imaju značajno povećane masne kapljice (Wiegand i sur., 2003) koje smo zbog niske gustoće vjerojatno izdvojili u prvim frakcijama gradijenta lodixanola.

## ZAKLJUČAK

Otkako su brojne studije ukazale na moguću ulogu kolesterola u nastanku Alzheimerove bolesti (AB), unatrag desetak godina intenzivno se proučava i pokušava utvrditi točan mehanizam djelovanja poremećene ravnoteže kolesterola na nastanak te bolesti. Uoči je da terapija statinima smanjuje rizik pojave bolesti, dok hiperkolesterolemija povećava rizik bolesti. Također su pokusi *in vitro* i *in vivo* pokazali kako razina kolesterola utječe na stvaranje i razinu peptida amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ), ključnog događaja u nastanku AB. Pored sličnosti u simptomima, i u bolesti Niemann-Pick tipa C (NPC) kao i Alzheimerovoj bolesti nakupljanje kolesterola u kasnim endosomima/lizosomima ima veliku ulogu i na razinu peptida  $A\beta$ . Međutim, molekularni mehanizam ovog događaja još uvijek nije razjašnjen.

Cilj ovog rada je bio ispitati je li povećana razina peptida  $A\beta$  i odsjeka C99 u bolesti NPC posljedica djelovanja kolesterola na smještaj proteina APP i aktivne komponente  $\gamma$ -sekretaze - presenilina 1 (PS1) u određene stanične organele te na koji način nakupljanje kolesterola u bolesti NPC utječe na lokalizaciju odsjeka C99, direktnog supstrata enzimskog kompleksa  $\gamma$ -sekretaze.

Pokazali smo da:

- stanice CHO NPC1-null predstavljaju dobar model za istraživanje uloge kolesterola na metabolizam i smještaj proteina APP jer pokazuju povišenu razinu kolesterola (kao u bolesti NPC) i povišenu razinu C-terminalnog odsjeka proteina APP – C99, što je u skladu s rezultatima primjenom drugih modela bolesti NPC.
- Stanice CHO NPC1-null, razdvajanjem unutarstaničnih organela metodom centrifugiranja u gradijentu gustoće iodixanola, pokazuju promijenjenu raspodjelu proteinskih biljega za unutarstanične organele: rane endosome (EEA1), kasne endosome (Rab7), lizosome (LAMP-1), reciklirajuće endosome (receptor transferina - TfR) kao i endoplazmatski retikulum (BIP/GRP78) te *trans*-Golgijevu mrežu (TGN46).
- Stanice CHO NPC1-null također pokazuju promijenjenu raspodjelu i povišenu ekspresiju proteina APP i proteina PS1 u ranim/kasnim endosomima u odnosu na stanice CHOwt.
- Značajno povišene razine C-terminalnog odsjeka C99 u stanicama CHO NPC1-null utvrđene su u endosomalnim organelima.

Ovi rezultati ukazuju da bi kolesterol mogao djelovati na nastanak Alzheimerove bolesti na način da regulira smještaj proteina APP i proteina PS1 unutar staničnih organela endocitoznog puta, te da ova preraspodjela proteina APP i PS1 dovodi do povećanog stvaranja odcjepeka C99, a kasnije i peptida A $\beta$  u ovim organelima. Ovi rezultati doprinose rasvjetljavanju mehanizma djelovanja kolesterola na metabolizam proteina APP, sintezu peptida A $\beta$  i smještaj proteina APP i PS1 te ukazuju da bi reguliranje razine kolesterola (statinima ili njima sličnim lijekovima) moglo utjecati na prevenciju ili usporavanje progresije Alzheimerove bolesti.



## LITERATURA

Allinson,T.M., Parkin,E.T., Turner,A.J., i Hooper,N.M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci. Res.* 74, 342-352.

Auer,I.A., Schmidt,M.L., Lee,V.M., Curry,B., Suzuki,K., Shin,R.W., Pentchev,P.G., Carstea,E.D., i Trojanowski,J.Q. (1995). Paired helical filament tau (PHFtau) in Niemann-Pick type C disease is similar to PHFtau in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl)* 90, 547-551.

Beltroy,E.P., Liu,B., Dietschy,J.M., i Turley,S.D. (2007). Lysosomal unesterified cholesterol content correlates with liver cell death in murine Niemann-Pick type C disease. *J Lipid Res.* 48, 869-881.

Berezovska,O., Jack,C., McLean,P., Aster,J.C., Hicks,C., Xia,W., Wolfe,M.S., Kimberly,W.T., Weinmaster,G., Selkoe,D.J., i Hyman,B.T. (2000). Aspartate mutations in presenilin i gamma-secretase inhibitors both impair notch1 proteolysis i nuclear translocation with relative preservation of notch1 signaling. *J Neurochem.* 75, 583-593.

Burns,M., Gaynor,K., Olm,V., Mercken,M., LaFrancois,J., Wang,L., Mathews,P.M., Noble,W., Matsuoka,Y., i Duff,K. (2003). Presenilin redistribution associated with aberrant cholesterol transport enhances beta-amyloid production in vivo. *J Neurosci.* 23, 5645-5649.

Dierks,T., Schlotawa,L., Frese,M.A., Radhakrishnan,K., von,F.K., i Schmidt,B. (2009). Molecular basis of multiple sulfatase deficiency, mucopolipidosis II/III i Niemann-Pick C1 disease - Lysosomal storage disorders caused by defects of non-lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 710-725.

Distl,R., Treiber-Held,S., Albert,F., Meske,V., Harzer,K., i Ohm,T.G. (2003). Cholesterol storage i tau pathology in Niemann-Pick type C disease in the brain. *J Pathol.* 200, 104-111.

Edbauer,D., Winkler,E., Regula,J.T., Pesold,B., Steiner,H., i Haass,C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat. Cell Biol.* 5, 486-488.

Eehalt,R., Keller,P., Haass,C., Thiele,C., i Simons,K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol.* 160, 113-123.

Esler,W.P., Kimberly,W.T., Ostaszewski,B.L., Diehl,T.S., Moore,C.L., Tsai,J.Y., Rahmati,T., Xia,W., Selkoe,D.J., i Wolfe,M.S. (2000). Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1. *Nat. Cell Biol.* 2, 428-434.

Fassbender,K., Simons,M., Bergmann,C., Stroick,M., Lutjohann,D., Keller,P., Runz,H., Kuhl,S., Bertsch,T., von Bergmann,K., Hennerici,M., Beyreuther,K., i Hartmann,T. (2001). Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 5856-5861.

- Ferri,C.P., Prince,M., Brayne,C., Brodaty,H., Fratiglioni,L., Ganguli,M., Hall,K., Hasegawa,K., Hendrie,H., Huang,Y., Jorm,A., Mathers,C., Menezes,P.R., Rimmer,E., i Scazufca,M. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366, 2112-2117.
- Hardy,J. (2002). Testing times for the "amyloid cascade hypothesis". *Neurobiol. Aging* 23, 1073-1074.
- Ikonen,E. i Holtta-Vuori,M. (2004). Cellular pathology of Niemann-Pick type C disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 445-454.
- Jeyakumar,M., Dwek,R.A., Butters,T.D., i Platt,F.M. (2005). Storage solutions: treating lysosomal disorders of the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 713-725.
- Jick,H., Zornberg,G.L., Jick,S.S., Seshadri,S., i Drachman,D.A. (2000). Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356, 1627-1631.
- Jin,L.W., Shie,F.S., Maezawa,I., Vincent,I., i Bird,T. (2004). Intracellular accumulation of amyloidogenic fragments of amyloid-beta precursor protein in neurons with Niemann-Pick type C defects is associated with endosomal abnormalities. *Am. J Pathol.* 164, 975-985.
- Karten,B., Vance,D.E., Campenot,R.B., i Vance,J.E. (2002). Cholesterol accumulates in cell bodies, but is decreased in distal axons, of Niemann-Pick C1-deficient neurons. *J Neurochem.* 83, 1154-1163.
- Kimberly,W.T., Xia,W., Rahmati,T., Wolfe,M.S., i Selkoe,D.J. (2000). The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J Biol. Chem.* 275, 3173-3178.
- Lammich,S., Kojro,E., Postina,R., Gilbert,S., Pfeiffer,R., Jasionowski,M., Haass,C., i Fahrenholz,F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 3922-3927.
- Lee,M.S., Kao,S.C., Lemere,C.A., Xia,W., Tseng,H.C., Zhou,Y., Neve,R., Ahljianian,M.K., i Tsai,L.H. (2003). APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *J Cell Biol.* 163, 83-95.
- Liscum,L. i Dahl,N.K. (1992). Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res.* 33, 1239-1254.
- Liscum,L. i Faust,J.R. (1987). Low density lipoprotein (LDL)-mediated suppression of cholesterol synthesis and LDL uptake is defective in Niemann-Pick type C fibroblasts. *J Biol. Chem.* 262, 17002-17008.
- Liu,P., Bartz,R., Zehmer,J.K., Ying,Y.S., Zhu,M., Serrero,G., i Anderson,R.G. (2007). Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets. *Biochim. Biophys. Acta.*

Millard,E.E., Srivastava,K., Traub,L.M., Schaffer,J.E., i Ory,D.S. (2000). Niemann-pick type C1 (NPC1) overexpression alters cellular cholesterol homeostasis. *J Biol. Chem.* 275, 38445-38451.

Neufeld,E.B., Wastney,M., Patel,S., Suresh,S., Cooney,A.M., Dwyer,N.K., Roff,C.F., Ohno,K., Morris,J.A., Carstea,E.D., Incardona,J.P., Strauss,J.F., III, Vanier,M.T., Patterson,M.C., Brady,R.O., Pentchev,P.G., i Blanchette-Mackie,E.J. (1999). The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *J Biol. Chem.* 274, 9627-9635.

Ohm,T.G., Treiber-Held,S., Distl,R., Glockner,F., Schonheit,B., Tamanai,M., i Meske,V. (2003). Cholesterol and tau protein--findings in Alzheimer's and Niemann Pick C's disease. *Pharmacopsychiatry* 36 *Suppl* 2, S120-S126.

Ory,D.S. (2004). The niemann-pick disease genes; regulators of cellular cholesterol homeostasis. *Trends Cardiovasc. Med* 14, 66-72.

Pagano,R.E., Puri,V., Dominguez,M., i Marks,D.L. (2000). Membrane traffic in sphingolipid storage diseases. *Traffic.* 1, 807-815.

Pappolla,M.A., Bryant-Thomas,T.K., Herbert,D., Pacheco,J., Fabra,G.M., Manjon,M., Girones,X., Henry,T.L., Matsubara,E., Zambon,D., Wolozin,B., Sano,M., Cruz-Sanchez,F.F., Thal,L.J., Petanceska,S.S., i Refolo,L.M. (2003). Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology* 61, 199-205.

Pike,L.J. (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem. J* 378, 281-292.

Pipalia,N.H., Hao,M., Mukherjee,S., i Maxfield,F.R. (2007). Sterol, protein and lipid trafficking in Chinese hamster ovary cells with Niemann-Pick type C1 defect. *Traffic.* 8, 130-141.

Puglielli,L., Tanzi,R.E., i Kovacs,D.M. (2003). Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat. Neurosci.* 6, 345-351.

Puri,V., Watanabe,R., Dominguez,M., Sun,X., Wheatley,C.L., Marks,D.L., i Pagano,R.E. (1999). Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases. *Nat. Cell Biol.* 1, 386-388.

Refolo,L.M., Malester,B., LaFrancois,J., Bryant-Thomas,T., Wang,R., Tint,G.S., Sambamurti,K., Duff,K., i Pappolla,M.A. (2000). Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol. Dis.* 7, 321-331.

Refolo,L.M., Pappolla,M.A., LaFrancois,J., Malester,B., Schmidt,S.D., Thomas-Bryant,T., Tint,G.S., Wang,R., Mercken,M., Petanceska,S.S., i Duff,K.E. (2001). A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 8, 890-899.

Riddell,D.R., Christie,G., Hussain,I., i Dingwall,C. (2001). Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr. Biol.* 11, 1288-1293.

Runz,H., Rietdorf,J., Tomic,I., de Bernard,M., Beyreuther,K., Pepperkok,R., i Hartmann,T. (2002). Inhibition of intracellular cholesterol transport alters presenilin localization and amyloid precursor protein processing in neuronal cells. *J Neurosci.* 22, 1679-1689.

Sastre,M., Steiner,H., Fuchs,K., Capell,A., Multhaup,G., Condrón,M.M., Teplow,D.B., i Haass,C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep.* 2, 835-841.

Scheuner,D., Eckman,C., Jensen,M., Song,X., Citron,M., Suzuki,N., Bird,T.D., Hardy,J., Hutton,M., Kukull,W., Larson,E., Levy-Lahad,E., Viitanen,M., Peskind,E., Poorkaj,P., Schellenberg,G., Tanzi,R., Wasco,W., Lannfelt,L., Selkoe,D., i Younkin,S. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med* 2, 864-870.

Scott,C. i Ioannou,Y.A. (2004). The NPC1 protein: structure implies function. *Biochim. Biophys. Acta* 1685, 8-13.

Shobab,L.A., Hsiung,G.Y., i Feldman,H.H. (2005). Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 4, 841-852.

Simons,K. i Ehehalt,R. (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin. Invest* 110, 597-603.

Simons,K. i Gruenberg,J. (2000). Jamming the endosomal system: lipid rafts and lysosomal storage diseases. *Trends Cell Biol.* 10, 459-462.

Simons,M., Keller,P., De Strooper,B., Beyreuther,K., Dotti,C.G., i Simons,K. (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 6460-6464.

Sobo,K., Chevallier,J., Parton,R.G., Gruenberg,J., i van der Goot,F.G. (2007). Diversity of raft-like domains in late endosomes. *PLoS. One.* 2, e391.

Sparks,D.L., Scheff,S.W., Hunsaker,J.C., III, Liu,H., Landers,T., i Gross,D.R. (1994). Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp. Neurol.* 126, 88-94.

Tessitore,A., del,P.M., Sano,R., Ma,Y., Mann,L., Ingrassia,A., Laywell,E.D., Steindler,D.A., Hendershot,L.M., i d'Azzo,A. (2004). GM1-ganglioside-mediated activation of the unfolded protein response causes neuronal death in a neurodegenerative gangliosidosis. *Mol. Cell* 15, 753-766.

Vance,J.E., Hayashi,H., i Karten,B. (2005). Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 193-212.

Vanier,M.T. (1983). Biochemical studies in Niemann-Pick disease. I. Major sphingolipids of liver and spleen. *Biochim. Biophys. Acta* 750, 178-184.

Vanier,M.T. (1999). Lipid changes in Niemann-Pick disease type C brain: personal experience and review of the literature. *Neurochem. Res.* 24, 481-489.

Vanier,M.T. i Millat,G. (2003). Niemann-Pick disease type C. *Clin. Genet.* 64, 269-281.

Vassar,R., Bennett,B.D., Babu-Khan,S., Kahn,S., Mendiaz,E.A., Denis,P., Teplow,D.B., Ross,S., Amarante,P., Loeloff,R., Luo,Y., Fisher,S., Fuller,J., Edenson,S., Lile,J., Jarosinski,M.A., Biere,A.L., Curran,E., Burgess,T., Louis,J.C., Collins,F., Treanor,J., Rogers,G., i Citron,M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.

Vetrivel,K.S., Cheng,H., Lin,W., Sakurai,T., Li,T., Nukina,N., Wong,P.C., Xu,H., i Thinakaran,G. (2004). Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J Biol. Chem.* 279, 44945-44954.

Wahrle,S., Das,P., Nyborg,A.C., McLendon,C., Shoji,M., Kawarabayashi,T., Younkin,L.H., Younkin,S.G., i Golde,T.E. (2002). Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol. Dis.* 9, 11-23.

Walkley,S.U. i Vanier,M.T. (2009). Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 726-736.

Wiegand,V., Chang,T.Y., Strauss,J.F., III, Fahrenholz,F., i Gimpl,G. (2003). Transport of plasma membrane-derived cholesterol and the function of Niemann-Pick C1 Protein. *FASEB J* 17, 782-784.

Wolozin,B. (2004a). Cholesterol and the biology of Alzheimer's disease. *Neuron* 41, 7-10.

Wolozin,B. (2004b). Cholesterol, statins and dementia. *Curr. Opin. Lipidol.* 15, 667-672.

Wolozin,B., Kellman,W., Ruosseau,P., Celesia,G.G., i Siegel,G. (2000). Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* 57, 1439-1443.

Wolozin,B., Manger,J., Bryant,R., Cordy,J., Green,R.C., i McKee,A. (2006). Re-assessing the relationship between cholesterol, statins and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand. Suppl* 185, 63-70.

Xia,W., Zhang,J., Ostaszewski,B.L., Kimberly,W.T., Seubert,P., Koo,E.H., Shen,J., i Selkoe,D.J. (1998). Presenilin 1 regulates the processing of beta-amyloid precursor protein C-terminal fragments and the generation of amyloid beta-protein in endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochemistry* 37, 16465-16471.

Yamazaki,T., Chang,T.Y., Haass,C., i Ihara,Y. (2001). Accumulation and aggregation of amyloid beta-protein in late endosomes of Niemann-pick type C cells. *J Biol. Chem.* 276, 4454-4460.