

Izraženost LRP1 receptora u hipokampalnoj formaciji zdravih i osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti

Štampar, Emma

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:387351>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Emma Štampar

**IZRAŽENOST LRP1 RECEPTORA
U HIPOKAMPALNOJ FORMACIJI
ZDRAVIH I OSOBA OBOLJELIH
OD ALZHEIMEROVE BOLESTI**

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Lidije Šver (Prehrambeno-biotehnološki fakultet), na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga pod sumentorstvom prof. dr. sc. Gorana Šimića te uz pomoć Ene Španić, mag. biol. exp.

Rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „*Uloga krvno-moždane barijere, urođene imunosti i oligomerizacije tau proteina u patogenezi Alzheimerove bolesti*“ (IP-2019-04-3584; 15. siječnja 2020. - 14. siječnja 2024. godine). Voditelj projekta je prof. dr. sc. Goran Šimić.



ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Goranu Šimiću na svom trudu, ukazanom povjerenju, prenesenom znanju, savjetima, velikoj pristupačnosti i srdačnosti. Hvala vam što ste pokazali da niste samo velik profesor, već i čovjek. Velike zahvale za ogromnu pomoć tijekom izrade diplomskog i mojoj mag. biol. exp. Eni Španić koja se toliko trudila, izdvajala svoje vrijeme, nesebično pomagala, odgovarala na sve moje upitnike, pronalazila rješenja i uvijek bila tu kada je trebalo. S njom je cijela izrada i pisanje rada bila lakša. Hvala i mentorici prof. dr. sc. Lidiji Šver koja je prihvatila ovo mentorstvo i bila podrška i pomoć ne samo u završnom radu, već tijekom svih ovih fakultetskih dana. Hvala na svakom predavanju, vježbi, učenju, znanju, ljubaznosti i razumijevanju.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima koji su vjerovali u mene, slavili svaki moj uspjeh kao svoj, a davali vjetar u leđa da prebrodim svaki neuspjeh te mi tako bili motivacija kroz cjelokupno obrazovanje.

Zahvaljujem se također svima koji su me ikada pitali: „Emma, kada ćeš diplomirati više?“, iako ne znam je li mi to dalo motivaciju ili samo odužilo pisanje, no svakako im hvala što su mislili i bili uz mene.

Na kraju se zahvaljujem i sebi. Što sam učila, gurala, davala, dijelila, polagala, vjerovala i što nikada nisam odustala.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

IZRAŽENOST LRP1 RECEPTORA U HIPOKAMPALNOJ FORMACIJI ZDRAVIH I OSOBA OBOLJELIH OD ALZHEIMEROVE BOLESTI

Emma Štampar, univ. bacc. ing. biotechn.
0058208301

Sažetak: Posljednjih godina sve više istraživanja upućuje na uključenost LRP1 proteina u patogenezu Alzheimerove bolesti (AD), najčešćeg primarnog uzroka sindroma demencije. LRP1 protein je član LDL obitelji receptora s višestrukim ulogama od kojih je potencijalno najvažnija posredovanje unosa kolesterola u stanice, napose neurone, a mnoge druge uloge povezane su s metabolizmom prekursornog proteina za amiloid (APP), dok su neke povezane sa signalnim putovima tau proteina. Stoga je svrha ovog istraživanja bila ispitati razine izraženosti LRP1 proteina u hipokampusu osoba oboljelih od AD-a te osoba umrlih zbog drugih uzroka koje nisu imale neuroloških ili psihijatrijskih smetnji, odnosno ustanoviti je li povećana ili smanjena ekspresija LRP1 proteina povezana s neuropatološkim promjenama karakterističnima za AD, napose neurofibrilarnom degeneracijom. Rezultati analize šest postmortalnih uzoraka tkiva hipokampusa (triju od osoba s AD-om i triju od osoba umrlih od uzroka koji nisu bili neurološke naravi) dobiveni istodobnim prikazom LRP1 proteina i tau proteina fosforiliranog na epitopu Ser202/Thr205AT8 pomoću AT8 protutijela pokazali su povećane razine LRP1 proteina kod osoba oboljelih od AD-a u odnosu na kontrolne uzorke. Veći stupanj neurofibrilarnih promjena procijenjen AT8-imunoreaktivnošću neurona negativno je korelirao sa stupnjem izraženosti LRP1 proteina. Taj preliminarni rezultat potvrđuje inicijalnu hipotezu uključenosti LRP1 proteina u nastanak AD-a, ali za čvršći zaključak bilo bi potrebno analizirati puno veći broj uzoraka u različitim stadijima bolesti.

Ključne riječi: *LRP1 protein, Alzheimerova bolest, hipokampalna formacija, tau protein, imunofluorescencija*

Rad sadrži: 46 stranica, 11 slika, 3 tablice, 92 literaturna navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Šver

Komentor: prof. dr. sc. Goran Šimić, dr. med., Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatski Institut za istraživanje mozga

Pomoć pri izradi: Ena Španić, mag. biol. exp.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Blaženka Kos (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Lidija Šver (mentor)
3. prof. dr. sc. Goran Šimić, dr. med., MEF (član)
4. izv. prof. dr. sc. Reno Hrašćan (zamjenski član)

Datum obrane: 23. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of biochemical engineering
Laboratory for biology and genetics of microorganisms
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

EXPRESSION OF LRP1 RECEPTOR IN THE HIPPOCAMPAL FORMATION IN HEALTHY PEOPLE AND PERSONS SUFFERED FROM ALZHEIMER'S DISEASE

Emma Štampar, univ. bacc. ing. biotechn.
0058208301

Abstract: In recent years, accumulated evidence suggests the involvement of the LRP1 protein in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD), the most common primary cause of dementia syndrome. The LRP1 protein is a member of the LDL receptor family with multiple roles, of which the potentially most important is the mediation of cholesterol entry into cells, especially neurons, and many other roles are related to the metabolism of the amyloid precursor protein (APP), whereas some relate to tau protein signaling pathways. Therefore, the purpose of this research was to examine the expression levels of LRP1 protein in the hippocampus of persons who suffered from AD and persons who died due to other causes and did not have neurological or psychiatric disorders, i.e. whether increased or decreased expression of LRP1 protein is associated with neuropathological changes characteristic of AD, especially with neurofibrillary degeneration. The results of the analysis of six postmortem tissue samples of the hippocampus (three from persons with AD and three from persons who died of non-neurological causes) were obtained by the simultaneous visualization of LRP1 protein and tau protein phosphorylated on the Ser202/Thr205 epitope using the AT8 antibody showed increased LRP1 protein levels in AD patients compared to control samples. The greater levels of neurofibrillary changes assessed by neuronal AT8-immunoreactivity negatively correlated with the LRP1 protein expression levels. This preliminary result confirms the initial hypothesis on the involvement of the LRP1 protein in the development of AD, but for a firmer conclusion, it would be necessary to analyze a much larger number of samples in different stages of the disease.

Keywords: *LRP1 protein, Alzheimer's disease, hippocampal formation, tau protein, immunofluorescence*

Thesis contains: 46 pages, 11 figures, 3 tables, 92 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Lidija Šver, PhD, Full professor

Co-mentor: Goran Šimić; PhD, Full professor, Scientific Adviser (with tenure)

Technical support and assistance: Ena Španić, mag. biol. exp.

Reviewers:

1. Blaženka, Kos, PhD, Full professor
2. Lidija, Šver, PhD, Full professor
3. Goran, Šimić, PhD, Full professor, MEF
4. Reno, Hrašćan, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: September 23th, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ALZHEIMEROVA BOLEST.....	2
2.2. TEORIJE NASTANKA AD-A.....	4
2.2.1. Hipoteza amiloidne kaskade	4
2.2.2. Tau hipoteza.....	5
2.3. LRP1 protein.....	6
2.3.1. Struktura LRP1 proteina	8
2.3.2. Funkcije LRP1 proteina	10
2.3.3. LRP1 u AD-u	10
2.3.4. LRP1 i A β	12
2.3.5. LRP1 i tau	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI.....	15
3.1.1. Uzorci moždanog tkiva.....	15
3.1.2. Protutijela za imunofluorescencijsko bojanje	16
3.1.3. Kemikalije.....	16
3.1.4. Otopine i puferi	17
3.1.5. Oprema i uređaji	18
3.2. METODE.....	18
3.2.1. Imunofluorescencijsko bojanje	18
3.2.2. Histološko bojanje metodom po Nisslu	20
3.3. ANALIZA I OBRADA PODATAKA	21
3.3.1. Konfokalna mikroskopija	21
3.3.2. ImageJ.....	21
3.3.3. Svjetlosna mikroskopija.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
6. ZAKLJUČCI	35
7. LITERATURA	36

1. UVOD

U današnje vrijeme još uvijek postoje bolesti koje zahvaćaju velik dio populacije i uzrokuju veliku stopu smrtnosti. Tako u svijetu 47,5 milijuna ljudi boluje od nekog oblika demencije, bolesti koja dovodi do kognitivnih deficita i čiji nastanak, progresija i liječenje nije u potpunosti poznato (HZJZ, 2017). Najčešći uzrok sindroma demencije je Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease, AD*), kronična neurodegenerativna bolest koja dovodi do smrti (Blennow i sur., 2006). U mozgu osobe oboljele od AD-a dolazi do karakterističnih promjena, a te promjene su vidljivi plakovi koji se sastoje od amiloida beta ($A\beta$) i neurofibrilarni snopići (engl. *neurofibrillary tangles, NFT*) sastavljeni od hiperfosforiliranog tau proteina (Clavaguera i sur., 2009). Međutim, postoje receptori koji ulaze izravno ili neizravno u interakcije s $A\beta$ ili tau proteinom i na taj način utječu na tijek AD-a. Jedan od takvih receptora je protein 1 povezan s receptorom lipoproteina niske gustoće (engl. *LDLR-related protein 1, LRP1*) transmembranski protein, višefunkcijski receptor koji kontrolira endocitozu raznih liganada, spaja se s drugim receptorima ili proteinima stanične površine čime utječe na signalne putove i izravno regulira ekspresiju gena kroz svoju unutarstaničnu domenu (Kanekiyo i Bu, 2014). Zbog svojih brojnih funkcija pretpostavlja se da ima ulogu u patofiziologiji mnogih bolesti pa tako i u Alzheimerovoj bolesti. Osim što igra ulogu u održavanju homeostaze mozga, utječe na metabolizam lipida, signalizaciju leptina, metabolizam glukoze, inzulinsku signalizaciju i antiapoptotsku signalizaciju pa tako njegova delecija neizravno dovodi do neuroinflamacije, motoričke i kognitivne disfunkcije (Storck i Pietrzik, 2017). LRP1 izravno sudjeluje u apsorpciji i razgradnji $A\beta$ -a (Kanekiyo i Bu, 2014) i tau proteina (Cooper i sur., 2020) u neuronima i ostalim moždanim stanicama u kojima je izražen (astrociti, mikroglia, vaskularne stanice). Međutim, još uvijek ostaje nerazjašnjeno smanjuje li se ili povećava ekspresija gena *LRP1* pojavom AD-a i na koji način to utječe na sami tijek bolesti, a analiza i sprječavanje širenja $A\beta$ i tau patologije moglo bi poslužiti u razvoju lijekova koji sprječavaju nastanak AD-a (Watts i sur., 2014). Stoga je cilj ovog rada bio metodom dvostruke imunofluorescencije ispitati i usporediti razine LRP1 proteina u hipokampusu osoba oboljelih od AD-a i zdravih pojedinaca te vidjeti postoji li korelacija između izražaja LRP1 i AT8 proteina, odnosno utječu li hiperfosforilirani tau proteini na ekspresiju LRP1.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ALZHEIMEROVA BOLEST

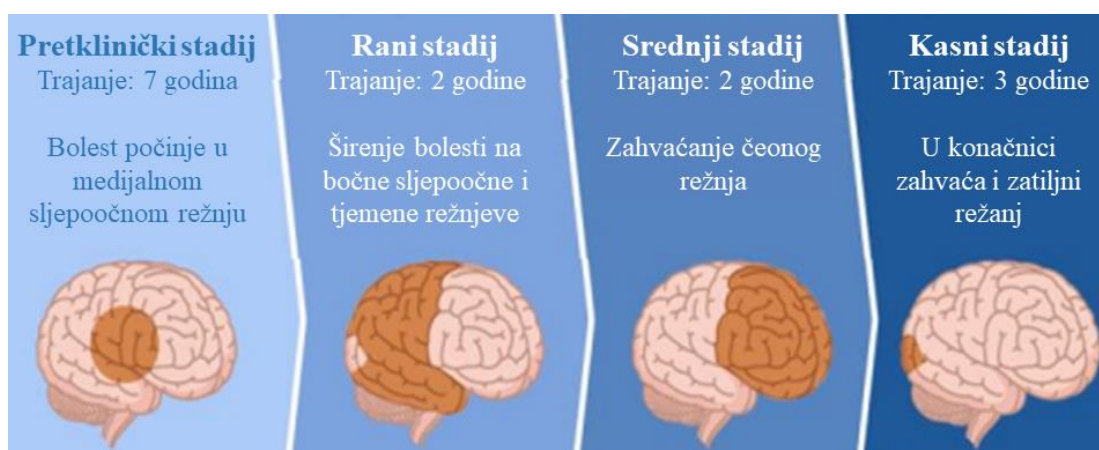
Napredovanjem tehnologija, stjecanjem znanja i vještina došlo je do medicinske revolucije, odnosno povećala se uspješnost liječenja bolesti koje su ranije bile neizlječive što je uzrokovalo linearno povećanje životnog vijeka. S druge strane, dugovječnost je donijela niz problema povezanih sa starenjem koji nisu u potpunosti istraženi pa prema tome ni nemaju učinkovito liječenje (Olshansky i Carnes, 2019). Jedan od primjera je demencija, klinički sindrom kojeg karakterizira gubitak kognitivnih sposobnosti (Achterberg i sur., 2020). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization, WHO*) 47,5 milijuna ljudi u svijetu boluje od nekog oblika demencije, a procjenjuje se da bi do 2050. taj broj mogao narasti na više od 115 milijuna oboljelih (HZJZ, 2017) jer revolucija, odnosno produljenje životnog vijeka donosi sve veći rizik od razvoja demencije. Manje česti primarni uzroci sindroma demencije su vaskularna demencija, demencija s Lewyjevim tjelešcima, frontotemporalna demencija, Parkinsonova bolest, Creutzfeldt-Jakobova bolest, Huntingtonova bolest, a najučestaliji uzrok je zasigurno Alzheimerova bolest (Lobo i sur., 2000) od koje trenutno u svijetu boluje 38 milijuna ljudi (Mimica, 2018), a u Republici Hrvatskoj više od 80 000 ljudi (Klepac, 2022). AD, odgovorna za 70 – 80 % svih slučajeva demencije, je teška, neizlječiva, neurodegenerativna bolest koja u uznapredovalom stadiju dovodi do smrti, u prosjeku za 4 – 8 godina. Glavni simptom koji se povezuje s AD je postupan poremećaj pamćenja nedavnih događaja. Uz gubitak epizodičkog pamćenja javljaju se i promjene raspoloženja, smetnje apetita, poremećaj ciklusa budnosti i spavanja, depresija, vremenska i prostorna dezorijentacija te halucinacije. Naposljetku, bolesnici u potpunosti postaju ovisni o skrbnicima, postaju komatozni te najčešće uslijed nepokretnosti, poremećaja hranjenja i respiratornih infekcija umiru (Šimić i sur., 2009; Sjögren, 1950).

Njemački psihijatar dr. Alois Alzheimer je 1906. godine prvi opisao bolest u 51-godišnje pacijentice Auguste Deter proučavanjem histoloških preparata moždanog tkiva. Pacijentica je imala simptome koji do tada nisu odgovorali niti jednom poznatom psihijatrijskom poremećaju (gubitak pamćenja, poteškoće s govorom, pisanjem i čitanjem) (Graeber i sur., 1997). Daljnjim histopatološkim istraživanjima dokazano je da se senilni plakovi (SP) i neurofibrilarni snopići (NFS), koje je prvi uočio i opisao Alzheimer, nalaze u mozgovima osoba s AD-om i onih sa senilnom demencijom, no te patološke nakupine izraženije su u AD-u s ranim početkom (Blennow i sur., 1991). Iako je provedeno mnogo istraživanja od prvog slučaja, još uvijek se ne

zna točan slijed patofizioloških procesa bolesti. Problem također predstavlja nedostatak adekvatnih testova ili markera kojima bi se bolest mogla uočiti u ranom stadiju kako bi se moglo što prije krenuti s liječenjem i usporavanjem bolesti. Iz tog razloga, dostupne terapije (npr. inhibitori kolinesteraze i memantin) ne mogu utjecati na patofiziološke procese koji dovode do odumiranja živčanih stanica, već samo pomažu ublažiti simptome (Huber i sur., 2018).

Po jednoj od brojnih podjela, bolest se može podijeliti na dva temeljna oblika AD-a, a to su sporadična i nasljedna (obiteljska) AD. Obiteljska AD, odnosno AD s ranim početkom (engl. *early-onset Alzheimer disease, EOAD*), ima snažnu genetičku podlogu te čini sveukupno manje od 1 % svih slučajeva. Sporadična AD još se naziva i AD s kasnim početkom (engl. *late-onset Alzheimer disease, LOAD*) jer najveći broj slučajeva toga oblika počinje poslije 65. godine života. Najvažniji rizični čimbenik za nastanak sporadične AD je dob, zatim spol (žene češće obolijevaju) (Altmann i sur., 2014) i genetička podloga gdje rizik predstavlja $\epsilon 4$ alel gena za apolipoprotein E (ApoE). U slučaju obiteljske AD rizik predstavljaju mutacije u genima za prekursori protein amiloida (engl. *amyloid precursor protein, APP*), presenilin 1 i presenilin 2 (*PSEN1* i *PSEN2*) (Alzheimer's Association, 2013). Međutim, studije govore da sporadični oblik nikada nije uzrokovan jednim patofiziološkim mehanizmom, već nastaje međudjelovanjem više različitih čimbenika (Iturria-Medina i sur., 2016), a neki od njih su smanjena kognitivna rezerva, trauma glave, dijabetes, povišen krvni tlak, ateroskleroza, moždani udar, hiperkolesterolemija, pušenje i prekomjerna konzumacija alkohola (Iadecola, 2016).

Progresivan tijek i simptomi AD-a mogu se podijeliti na pretkliničku, ranu, srednju te kasnu fazu AD-a (Slika 1).



Slika 1. Prikaz dijelova mozga koje zahvaća Alzheimerova bolest po fazama te njihovo trajanje (preuzeto i prilagođeno prema Dan i sur., 2022)

2.2. TEORIJE NASTANKA AD-A

Neuropatološke promjene u AD-u nastaju kao posljedica različitih patoloških mehanizama i obzirom na te mehanizme tijekom posljednjih desetljeća raspravljalo se o različitim hipotezama koje objašnjavaju nastanak AD-a. Neurovaskularna disfunkcija, upalni procesi i oksidativni stres samo su neki od njih, no dvije glavne teorije su agregacija amiloid- β peptida ($A\beta$) i njegovo odlaganje u obliku plakova, takozvane amiloidne naslage (amiloidna hipoteza) te hiperfosforilacija proteina tau koja dovodi do nastanka stvaranja neurofibrilarnih snopića (tau hipoteza) (Liu i sur., 2019). Većina studija AD otkriva da sam $A\beta$ nije dovoljan za razvoj demencije (Nelson i sur., 2012). Jedan od dokaza ukazuje da $A\beta$ plakovi, topljivi $A\beta$ oligomeri i NFT zajedno ometaju signalizaciju sinapsa, utječu na normalnu neuronsku funkciju te da njihovo nakupljanje dovodi do oštećenja neurona te posljedično smanjenje mase mozga i kognitivnih funkcija (Spires-Jones i Hyman, 2014). Međutim, zbog nedostatka kvantitativnih integrativnih modela još uvijek nije razjašnjeno u kojem su točno odnosu navedene patološke nakupine u mozgu oboljelih od AD-a, početak bolesti (budući da se oba proteina pojavljuju u normalnom mozgu tijekom starenja), sama progresija i, u konačnici, razvoj učinkovitih terapij (Iturria-Medina i sur., 2016).

2.2.1. Hipoteza amiloidne kaskade

Desetljeće nakon što je 1968. u starijih osoba primijećena povezanost između demencije i senilnih plakova, otkriveno je da su ti senilni plakovi sačinjeni uglavnom od amiloid-beta, a nastaju zbog pretjeranog stvaranja, nakupljanja (agregacije) i odlaganja $A\beta$ u mozgu. Pretpostavlja se da neravnoteža stvaranja i odstranjivanja $A\beta$ u mozgu dovodi do patoloških promjena, neurodegeneracije te Alzheimerove bolesti (Hardy i Selkoe, 2002).

$A\beta$ je peptid koji se sastoji od 39 do 43 aminokiseline, a nastaje iz APP prekursora, velikog transmembranskog glikoprotein neurona. Postoje dva puta cijepanja APP-a ovisno o djelovanju različitih enzima, put α -sekretaze i put β -sekretaze. Put α -sekretaze ili neamiloidogeni put prevladava u zdravih osoba jer cijepanjem APP-a α -sekretazom unutar slijeda $A\beta$ ne dolazi do stvaranja $A\beta$ (nastaje kraći peptid koji nema svojstvo stvaranja plakova). Međutim, cijepanjem β -sekretaze i γ -sekretaze nastaje $A\beta$ koji se sastoji od 40 ili od 42 aminokiseline ($A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$). Topljivi $A\beta$ prolazi kroz konformacijske promjene i agregira u topljive oligomere i veća netopljiva vlakna pri čemu $A\beta_{42}$ jače potiče abnormalno slaganje peptida za razliku od $A\beta_{40}$. Taj amiloidogeni put cijepanja prevladava u AD-u. Prvobitno se pogrešno smatralo da su neuroni jedini glavni tip stanica za proizvodnju $A\beta$ jer, uz glavni izvor i druge cerebralne stanice poput

glija stanice, stanice glatkih mišića, endotelne stanice kao i periferne stanice, mogu značajno doprinijeti proizvodnji A β i njegovom taloženju u mozgu (Storck i Pietrzik, 2017).

Amiloidna kaskada kao uzrok nasljednog oblika AD nastaje zbog mutacija u genima za proteine uključene u stvaranje A β kao što su APP, PSEN1 i PSEN2 (Alzheimer's Association, 2013). Disfunkcijom presenilina-1 dolazi do povećane proizvodnje A β_{42} što dovodi do akumulacije i oligomerizacije A β (Hardy i Selkoe, 2002). Najvažniji rizični genetski čimbenik sporadičnog oblika AD je genotip *APOE* ϵ 4 (Tai i sur., 2014) koji uz dodatne okolišne čimbenike dovodi do nedostatnog odstranjivanja A β s posljedičnim povećanjem razine A β u mozgu. Kao i kod obiteljskog oblika, to dovodi do nakupljanja A β u topljive oligomere, a onda i netopljive fibrile u amiloidnim plakovima (Blennow i sur., 2006).

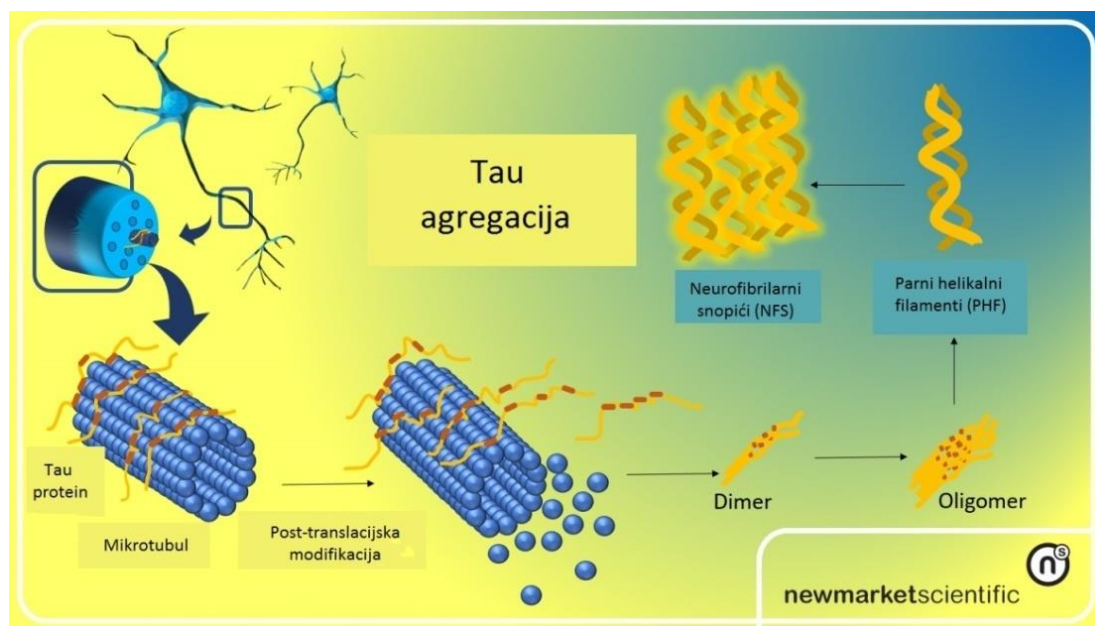
I u nasljednom i sporadičnom obliku AD pokazalo se da povišene razine A β u mozgu nisu rezultat prekomjerne proizvodnje, već nedovoljnog odstranjivanja A β (Mawuenyega i sur., 2010).

2.2.2. Tau hipoteza

Protein tau primarno se nalazi u aksonima neurona, a u manjoj mjeri u dendritima i glija stanicama gdje osigurava povezanost i stabilnost mikrotubula (MT). Jedna od glavnih funkcija mikrotubula je reguliranje cjelokupnog transporta duž aksona. Protein je građen od dviju domena. Projekcijska domena veže se na neurofilamente ili druge mikrotubule dok druga domena kopolimerizira s tubulinom u MT dajući mu pritom stabilnost. Biološka aktivnost tau proteina kontrolirana je fosforilacijom, odnosno ravnotežom aktivnosti kinaza i fosfataza. Ukoliko dođe do hiperfosforilacije tau proteina (više od 8 do 12 mola fosfata po molu proteina umjesto 2 – 3), mijenja se njegova konformacija što dovodi do njegovog odvajanja od mikrotubula, odnosno razgradnje mikrotubula. Posljedica toga je poremećeni transport unutar aksona, smetnja u sinaptičkoj funkciji neurona te smrt živčanih stanica (Iqbal i sur., 2005; Buee i sur., 2000).

Hiperfosforilirani protein tau postupno agregira u topive oligomere pa se s vremenom nakuplja u obliku ravnih, a zatim i sparenih uzvojitih filamenata (engl. *paired helical filament*, *PHF*) (Johnson i Stoothoff, 2004) te tako u citoplazmi neurona tvori netopive neurofibrilarne snopiće (NFS) (Slika 2). Takvi stabilni agregati su otporni na autofagiju i druge endogene stanične mehanizme (Braak i Del Tredici, 2011). Isto tako abnormalno hiperfosforilirani protein ne nalazi se samo u NFS nego i u nefibriliranom obliku u citosolu moždanog tkiva nakon raspada (smrti) neurona. On kao takav ne stupa u interakciju s mikrotubulom, već mijenja

konformaciju drugih, normalnih tau proteina uzrokujući njihovo odvajanje od mikrotubula (Alonso i sur., 1994). Povezivanje abnormalno hiperfosforiliranog tau proteina s normalnim također dovodi do stvaranja snopića. U osoba oboljelih od AD razine proteina tau u citosolu veće su 4 do 8 puta u usporedbi sa zdravim osobama. Ipak, takve živčane stanice mogu „preživjeti“ taj predugi (engl. *pretangle*) materijal (oblici tau prije stvaranja snopića) godinama pa je i to jedan od uzroka zbog čega je otežano otkrivanje AD-a u ranim stadijima, odnosno pretkliničkoj fazi (Braak i Del Tredici, 2011).



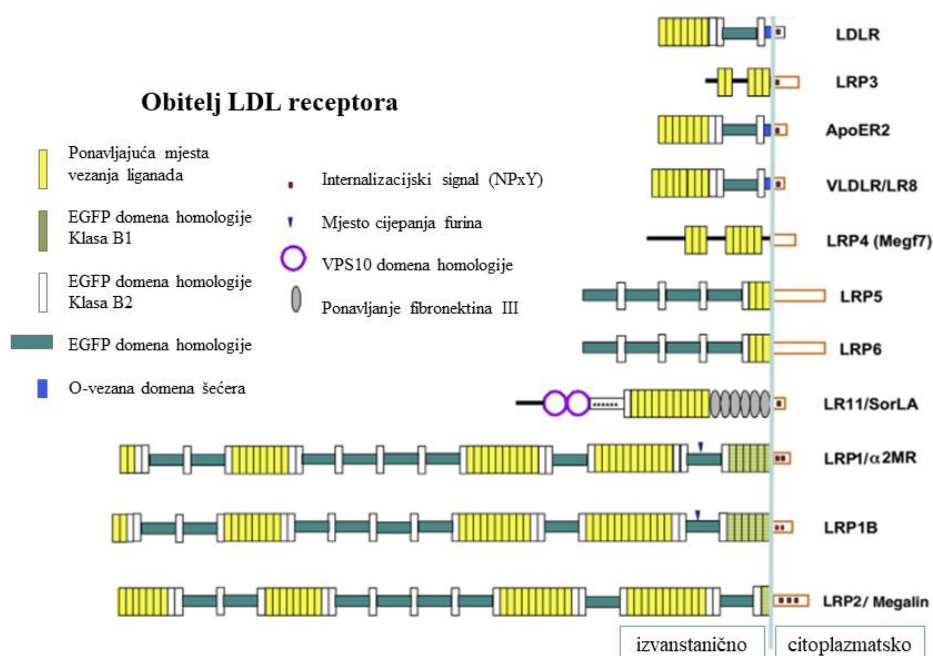
Slika 2. Prikaz Tau agregacije (preuzeto i prilagođeno prema Dale, 2018)

Smatra se da širenje tau proteina prati Braak i Braak (1991) neuropatološke stadije što znači da prve promjene kod AD zahvaćaju područja transentorinalnog korteksa i moždanog debla te se dalje šire u predvidljivom smjeru (Šimić i sur., 2017). Hiperfosforilirani tau može se vizualizirati u imunoreakcijama s protutijelom AT8 (Braak i Del Tredici, 2011) koje prepoznaje tau protein fosforiliran na serinu (202) i treoninu (205). Ta fosforilacija događa se rano u patogenezi AD i stoga se može reći kako AT8 prepoznaje rane promjene fosforiliranih tau vrsti, odnosno hiperfosforilirane tau vrste što ga čini idealnim protutijelom za dijagnostiku AD (Holmes i sur., 2014).

2.3. LRP1 protein

Puni naziv proteina LRP1 (*LDLR-related protein* (LRP)1) je protein 1 povezan s receptorom lipoproteina niske gustoće (LDL) (Huff i sur., 2016). Članovi obitelji LDL receptora,

lipoproteinskih receptora niske gustoće (LDLR) transmembranski su receptori na staničnoj površini, a uključuju 11 receptora: LDLR, LRP1, LRP1B, megalin/LRP2, LRP3, megf7/LRP4, VLDL receptor (VLDLR), apolipoprotein E receptor 2 (apoER2)/LRP8, receptor vezan za sortilin (SorLA/LR11), LRP5 i LRP6 (Kanekiyo i Bu, 2014) (Slika 3). Lipoprotein je biokemijski spoj koji se sastoji od hidrofobne jezgre nepolarnih lipida kao što su trigliceridi i esteri kolesterola te hidrofilne membrane fosfolipida, kolesterola i proteina. Mnogi enzimi, prijenosne molekule, strukturni proteini, antigeni, adhezini i toksini su po kemijskoj strukturi lipoproteini. Njihova funkcija u tijelu čovjeka je transport lipida, odnosno u vodi netopljivih masnih kiselina i kolesterola krvotokom među pojedinim tkivima (Feingold i Grunfeld, 2021). Jedan od lipoproteina koji prenosi kolesterol je apolipoprotein E (apoE) (Bu, 2009) o kojem će biti riječ kasnije.



Slika 3. Struktura članova obitelji LDL receptora. Legenda koja se nalazi u gornjem lijevom kutu prikazuje građevne blokove koji čine proteine. Lijevo od plazma membrane (siva okomita linija) nalaze se izvanstanične domene, a desno unutarstanične (preuzeto i prilagođeno prema Schneider, 2016)

*EGFP- epidermalni čimbenik rasta (engl. *epidermal growth factor protein*)

Ti receptori imaju neke zajedničke strukturne i funkcijske sličnosti, no njihove fiziološke uloge su različite zbog razlika u njihovoj stabilnosti, afinitetu prema ligandima, stupnju endocitoze, staničnoj lokalizaciji i obrascu ekspresije u tkivu. Prepoznaju izvanstanične ligande

za naknadnu signalizaciju, za putove razgradnje, a neki od njih prepoznaju ključne molekule u patogenezi AD-a kao apoE i amiloidne peptide (A β) (Shinohara i sur., 2017). Od svih članova LDLR obitelji, LRP1 je receptor koji je uključen u najviše puteva povezanih s AD, stoga je kao takav najviše proučavan (Kanekiyo i Bu, 2014). Otkriven je i identificiran 1988. iz biblioteka cDNA limfocita miša i jetre čovjeka (Herz i sur., 1988). LRP1 višefunkcijski je protein koji ima sposobnost prepoznavanja širokog raspona strukturno i funkcijski različitih liganada, točnije, stupa u interakciju s više od 40 liganada (Liu i sur., 2020) uključujući proteine uključene u metabolizam lipoproteina kao što su apolipoprotein E (ApoE) i lipoprotein vrlo niske gustoće (VLDL), amiloidne peptide (A β), aktivirani α 2-makroglobulin, aktivator tkivnog plazminogena (tPA), aktivirani faktori koagulacije, faktori rasta, protein povezan s receptorom (RAP, engl. *Ras-related protein*), proteini izvanstaničnog matriksa, prionski protein i aprotinin, proteinaze i inhibitore proteinaze (Potere i sur., 2019). Regulira njihovu endocitozu i transducira nekoliko staničnih putova spajanjem s drugim receptorima na površini stanice. Prisutan je na površini više tipova stanica, eksprimiran u različitim tkivima uključujući jetru, mozak, bubrege, pluća, krvne žile, endotelne stanice, vaskularne glatke mišićne stanice. Osim što se LRP1 nalazi u različitim tkivima, isto tako je izražen u različitim stanicama u mozgu pa je tako obilno izražen u neuronima, uglavnom u entorinalnom korteksu, hipokampusu i malom mozgu, astrocitima, mikroglija stanicama, vaskularnim stanicama (endotelne stanice mozga, glatke mišićne stanice i periciti) te u koroidnom pleksusu krvno-moždane barijere (engl. *blood-brain barrier, BBB*) (Spuch i sur., 2012).

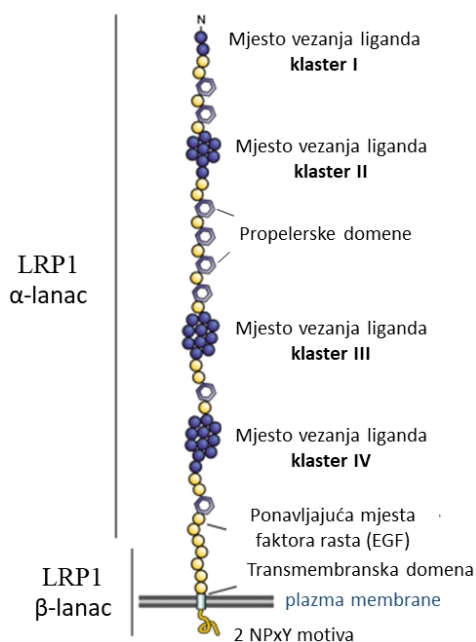
Pojedine studije pokazale su njegovu ulogu u razvoju i homeostazi svakog tkiva. Tako je delecija gena *LRP1* u mišjim modelima u hepatocitima, makrofagima, adipocitima ili vaskularnim glatkim mišićnim stanicama dovela do rane embrionalne letalnosti i razvoju bolesti kao što su ateroskleroza i tumori (Gonias i Campana, 2014; Herz i sur., 1992), dok je delecija u neuronima izazvala nekoliko neurodegenerativnih poremećaja povezanih s AD-om kao što je nakupljanje A β -a (Shinohara i sur., 2017). Također, LRP1 se nalazi i u sinciciotrofoblastima u posteljici (Semenkovich i sur., 2016) gdje je potreban za rani razvoj embrija (Nakajima i sur., 2014) pa je tako delecija *LRP1* u nekim tkivima nespojiva sa životom.

2.3.1. Struktura LRP1 proteina

LRP1, veliki transmembranski protein, sintetizira se kao 600 kDa prekursorski protein koji se zatim glikolizira i cijepa furinom na dvije podjedinice u Golgijevom kompleksu. Stoga se LRP1 sastoji od dvije nekovalentno povezane podjedinice, α -lanca ili N-terminalne

izvanstanične podjedinice (amino dio) veličine 515 kDa te β -lanca ili C-terminalne transmembranske podjedinice (karboksilni dio) veličine 85 kDa. Transport LRP1 na staničnu površinu zahtjeva protein povezan s receptorom RAP. RAP je molekularni *chaperone* (pratnja) (molekula koja pomaže konformacijskom savijanju drugih molekula) koji djeluje kao inhibitor LRP1 jer se veže na njega u ranom sekretornom putu čime sprječava prerano vezanje ostalih liganada za LRP1. U kasnom sekrecijskom putu dolazi do nižeg pH zbog čega LRP1 disocira od RAP-a.

Izvanstanična domena sadrži četiri domene za vezanje liganda, odnosno to su cisteinom bogata ponavljanja tipa komplementa (skupine I – IV) pri čemu su domene II i IV glavna vezna područja za gotovo sve ligande uključujući ligande povezane s AD-om poput apolipoproteina E (apoE) ili $A\beta$ (Shinohara i sur., 2017). Sveukupno, LRP1 sadrži 31 ponavljajuća mjesta vezanja liganada i 22 ponavljanja tipa epidermalnog čimbenika rasta (EGF). EGF ponavljanja i tzv. β -propelerske domene služe za oslobađanje liganda u uvjetima niskih pH vrijednosti (Lillis, 2005). Citoplazmatski rep LRP1 sadrži dvije kopije NPXY motiva koji služe kao signali za brzu endocitozu (Slika 4).



Slika 4. Struktura LRP1 proteina. LRP1 se sastoji od dvije nekovalentno povezane podjedinice, α i β lanca. Izvanstanični α -lanac sadrži ponavljajuća mjesta vezanja liganda (klasteri I – IV) i ponavljanja tipa epidermalnog čimbenika rasta (EGF ponavljanja). β -lanac obuhvaća transmembransku domenu i unutarstaničnu domenu, odnosno citoplazmatski rep koji sadrži dvije kopije NPXY motiva (preuzeto i prilagođeno prema Storck i Pietrzik, 2017)

U studiji usporedbe stope endocitoze među članovima LDLR obitelji, LRP1 pokazao je najbržu endocitozu (Li i sur., 2001). Djeluje tako da hvata i veže svoje ligande izvanstaničnom domenom, brzo ih internalizira kroz svoj citoplazmatski rep te dostavlja u lizosomske odjeljke gdje se oni disociraju. Nakon disocijacije, LRP1 se reciklira natrag na površinu stanice (Van Kerkhof i sur., 2005).

2.3.2. Funkcije LRP1 proteina

Kao što smo spomenuli ranije, LRP1 široko je izražen u mnogim tkivima pa tako ima različite uloge u različitim biološkim procesima. Zasigurno, njegov najvažniji zadatak je endocitoza širokog spektra liganada, no ne i njegova jedina uloga (Schneider, 2016) jer, osim spomenute endocitoze, izvanstanično vezanje liganada na LRP1 može aktivirati razne signalne putove. Tako je LRP1 uključen u staničnu signalizaciju, metabolizam i homeostazu lipoproteina i lipida, razgradnju proteaza, aktivaciju lizosomskih enzima, čišćenje apoptotičkih stanica. Može djelovati kao regulacijski receptor regulirajući signalne putove ili funkcionalne aktivacije spajanjem s drugim receptorima ili proteinima stanične površine kao što su APP, N-metil-D-aspartat (NMDA) receptor, integrini, faktor rasta koji potječe od trombocita (PDGF), receptor aktivatora plazminogena urokinaze, receptorske tirozin kinaze i drugi (Storck i Pietrzik, 2017). Zbog brojnih funkcija LRP1 ima ulogu u mnogim bolestima kao što su fibroza bubrega, steatoza jetre (masna jetra), sindrom akutnog respiratornog distresa (ARDS), ateroskleroza, akutni infarkt miokarda (AMI), Alzheimerova bolest (AD) (Gonias i Campana, 2014).

2.3.3. LRP1 u AD-u

Najvažnija uloga LRP1 u Alzheimerovoj bolesti je regulacija stanične apsorpcije i razgradnje A β u neuronima, astrocitima i mikroglijiji u moždanom parenhimu te u vaskularnim glatkim mišićnim stanicama i pericitima u cerebrovaskularnoj cirkulaciji (Kanekiyo i Bu, 2014). LRP1 izražen je u različitim stanicama u mozgu, a ovisno o tipu stanice razine LRP1 u AD-u mogu se razlikovati. Tako je objavljeno da su razine LRP1 smanjene u neuronima, ali povećane u vaskularnom sustavu ili astrocitima u blizini amiloidnih plakova u mozgu AD-u (Ruzali i sur., 2012). Nakon A β endocitoze i transcitoze kroz endotel mozga na periferiju slijedi eliminacija putem jetre, slezene i bubrega (Storck i Pietrzik, 2017). LRP1 ne samo da regulira metabolizam amiloidnih peptida (A β) u mozgu i periferiji, već i održava homeostazu mozga, a oštećenje mozga također doprinosi razvoju AD-a (Shinohara i sur., 2017).

Ulogu u čišćenju A β ovisno o LRP1 također ima apolipoprotein E (apoE), genski čimbenik

rizika za AD, jer utječe na agregaciju, staničnu apsorpciju i razgradnju A β . Od tri alela *APOE* gena čovjeka (ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4), najjači genski čimbenik rizika za AD je alel ϵ 4 (Shinohara i sur., 2017) i stoga bi bilo dobro odrediti na koji način oni sudjeluju s LRP1 u patogenezi AD. Eksperimenti *in vitro* pokazali su da apoE3 tvori kompleks apoE3-A β češće od apoE4 i štiti od toksičnosti A β u primarnim neuronima (Tai i sur., 2014) te da apoE2 i apoE3, ali ne apoE4, pospješuju čišćenje A β iz izvanstaničnog prostora putem LRP1 (Ma i sur., 2018). S druge strane, nekoliko istraživanja pokazalo je da LRP1 značajno pojačava apoE-posredovanu akumulaciju A β (Gilat-Frenkel i sur., 2014; Ruzali i sur., 2013), dok jedna studija govori da se apoE natječe s A β za interakciju i vezanje s LRP1 što rezultira smanjenim čišćenjem A β (Verghese i sur., 2013). Razlog ovakvih proturječnih rezultata studija mogu se objasniti time što na rezultate istraživanja bitno utječu svojstva A β i apoE (npr. koncentracija, agregacija i status lipidacije) i područja mozga u kojima A β , apoE i LRP1 međusobno djeluju tijekom taloženja A β u AD.

Spomenuli smo da apoE (osim što veže A β) veže i neke druge lipide među kojima je i kolesterol. Kolesterol je esencijalna komponenta membrane neurona i mijelinskih ovojnica. Stoga je kao takav ključan za funkcioniranje neurona, stabilnost lipidnih splavi te sinaptički integritet (Zhang i Liu, 2015). Kada dođe do smanjene sinteze i povećane potrebe za kolesterolom, potrebna je brza aktivacija njegovog transporta do neurona kako bi se održale sinaptičke funkcije i popravak (Bu, 2009). Transport i unos kolesterola u neuron provodi protein ApoE preko LRP1 receptora na površini stanice. LRP1 je glavni neuronski receptor za ApoE/lipoprotein. Stoga jedna od važnijih funkcija LRP1 u neuronima je uloga u transportu i metabolizmu kolesterola potrebnog za stvaranje sinapse. Ako dođe do neispravnosti ovog procesa, pojavit će se greške u unutarstaničnoj signalizaciji te skladištenju i oslobađanju hranjivih tvari i otrovnih spojeva, a sve se to smatra uzročnim čimbenikom AD-a. Nadalje, vezanjem apoE lipoproteina na LRP1 receptor u mozgu regulira se metabolizam kolesterola, a posredovanjem kolesterola i metabolizam A β što može također imati veliki utjecaj na razvoj patoloških promjena u AD-u (Spuch i sur., 2012).

LRP1 protein sudjeluje u patogenezi AD-a i ostalim bolestima na načine koji nisu direktno ovisni o A β . Tako delecija LRP1 u neuronima utječe na metabolizam lipida, signalizaciju leptina, metabolizam glukoze, inzulinsku signalizaciju i antiapoptotsku signalizaciju koja dovodi do neuroinflamacije, motoričke i kognitivne disfunkcije kod miševa te posljedično do AD-a (Shinohara i sur., 2017).

Studije su pokazale da je u mnogim neurodegenerativnim bolestima (pa tako i u AD-u) narušena krvno-moždana barijera (engl. *blood-brain barrier*, *BBB*) te da se takve vaskularne

promjene događaju ranije u tijeku bolesti, prije ostalih promjena (Iturria-Medina i sur., 2016). Pretpostavlja se da upravo narušavanje BBB-a može utjecati i ubrzati daljnji razvoj patologije. Delecija LRP1 dovela je do malformacije vaskularne mreže s prekinutim endotelnim slojem i krvarenjem (Nakajima i sur., 2014), dok nedostatak LRP1 u makrofagima i u vaskularnim glatkim mišićnim stanicama kod hiperkolesterolemičnih miševa uzrokuje aterosklerozu (Gonias i Campana, 2014). Budući da se ekspresija LRP1 u cerebralnim žilama smanjuje tijekom starenja (Osgood i sur., 2017), potencijalan način prevencije vaskularne patologije povezane s dobi i bolesti mogao bi biti održavanje signalnih funkcija LRP1 u endotelu (Storck i Pietrzik, 2017).

Postoje brojna istraživanja koja govore o razini LRP1 u mozgu zdravih i osoba oboljelih od AD. Starenjem i pojavom bolesti dolazi do smanjene ekspresije LRP1 u ukupnom mozgu i moždanim kapilarama (Osgood i sur., 2017; Silverberg i sur., 2010; Kang i sur., 2000), odnosno ekspresija ovog gena opada s godinama i niža je kod pacijenata s AD-om u odnosu na kontrolne uzorke (NCBI, 2022). Uzrok bi mogao biti inhibicija ekspresije gena uzrokovana smanjenim protokom krvi u bolesnika s AD (Kanekiyo i sur., 2012). Proturječno, druge studije dokazuju da su razine LRP1 mRNA povećane u temporalnom korteksu i hipokampusu pacijenata s AD-om (Akram i sur., 2012; Matsui i sur., 2007) kao i u neuronima i aktiviranim astrocitima koji okružuju senilne plakove bolesnika s AD-om (Arélin i sur., 2002). Donahue i suradnici (2006) mjerili su razine LRP1 u hipokampusu AD pacijenata, a rezultati su pokazali povećanje u mikrovaskulaturi, no smanjenje proteina u neuronima. Istraživanja na životinjskim modelima zapravo govore da ekspresija LRP1 tijekom starenja i AD-a raste (Devraj i sur., 2016; Erickson i sur., 2012) ili pada (Osgood i sur., 2017; Bouter i sur., 2014) ovisno o tipu stanice. Od ukupne količine LRP1 proteina u mozgu 50 % odlazi na neuronski LRP1 (Liu i sur., 2011), stoga bi smanjenje LRP1 u AD mozgu moglo biti objašnjeno gubitkom neurona kako bolest napreduje. Prema svemu navedenom, ekspresija LRP1 može biti ili pojačano regulirana u glija stanicama zbog neuroinflamacije ili potisnuta u neuronima zbog postsinaptičkih oštećenja u AD (Kanekiyo i Bu, 2014).

2.3.4. LRP1 i A β

Kao što se već spomenulo ranije, LRP1 je ključni receptor u čišćenju A β u cerebralnim stanicama koji olakšava njegov transport iz mozga u krv preko BBB i u perifernim organima uzrokuje njegovu razgradnju. LRP1 veže A β s visokim afinitetom pa je tako uklanjanje A β uz pomoć LRP1 kroz BBB vrlo brzo, točnije šest puta brže (Bell i sur., 2007) u usporedbi s drugim otopljenim tvarima duž stijenki kapilara i arterija. Međutim, ostaje nejasno je li LRP1 sposoban

vezati N-terminalno skraćene ili post-transkripcijski modificirane A β peptide sklone agregaciji. Pretpostavlja se da je put za odstranjivanje A β dimera i oligomera poremećen ili da LRP1 općenito nije sposoban posredovati u njihovom odstranjivanju (Ito i sur., 2007).

Otkriveno je da LRP1 zapravo ima dvostruku ulogu u stvaranju i čišćenju A β jer osim što je ključni receptor stanične površine za odstranjivanje ekstracelularnog A β , posreduje u endocitozi APP-a koja je bitna za intracelularno stvaranje A β . Neke studije govore da LRP1 ima prevladavajuću ulogu u proizvodnji A β (Cam i sur., 2005; Davis i sur., 2004), dok je delecija LRP1 u neuronima pokazala visoke razine A β što potvrđuje ulogu uklanjanja A β (Kanekiyo i sur., 2013; Kanekiyo i sur., 2012). Iz navedenih istraživanja pretpostavlja se da funkcija LRP1 ovisi o tipu stanice (Storck i Pietrzik, 2017).

Neke studije pokazale su da nositelji varijante C766T gena LRP1 imaju povećani rizik od oboljenja, odnosno uočena je povezanost C766T s taloženjem amiloida kod pacijenata s AD (Grimmer i sur., 2014), dok druge studije nisu potvrdile povezanost razina LRP1 i statusa demencije ili polimorfizma LRP1 C766T (Causevic i sur., 2003).

Istraživala se dinamička ravnoteža između A β na periferiji i A β u mozgu. Određene studije su dokazale da se povećanjem LRP1 u jetri ubrzava uklanjanje perifernog A β što narušava dinamičku ravnotežu i posljedično dovodi do otpuštanja A β iz mozga u krv kroz BBB (Sehgal i sur., 2012). Međutim, druge studije su opovrgnule takve rezultate (Reekmans i sur., 2010) što može sugerirati da takav „mehanizam perifernog ponora“ može ovisiti o LRP1 mehanizmu.

Još jedan mehanizam sprječavanja nakupljanja topljivog A β u mozgu, odnosno njegova eliminacija iz mozga je povećanje ekspresije LRP1 na BBB pomoću određenih prirodnih spojeva kao što su resveratrol, fluvastatin, rifampicin, kofein i drugi. Međutim, jedna od glavnih prepreka u liječenju AD-a je BBB zbog koje više od 98 % lijekova ne ulazi u mozak. Razlog tomu je posebna fiziologija i neurovaskularna struktura u mozgu koja ograničava difuziju molekula kroz paracelularni prostor (Storck i Pietrzik, 2017). Jedan od pristupa kojim se LRP1 cilja na BBB je korištenje nanočestica. Tako se lijek za snižavanje A β 1-42, flurbiprofen, ugradio u nanočestice polilaktida i učinkovito transportirao kroz endotel. Pri tome je zadržao svoju biološku aktivnost bez pokazivanja toksičnosti za stanice. Nanočestica je vezala nekoliko serumskih proteina uključujući apoE, ligand za LRP1. Ova metoda mogla bi biti potencijal za isporuku lijekova za neurodegenerativne bolesti u mozak, no potrebno je proučiti stanični transport i učinkovitost kod ljudi i provesti daljnja istraživanja (Meister i sur., 2013).

2.3.5. LRP1 i tau

U nedavnim istraživanjima smanjenje ekspresije LRP1 značajno je smanjilo unos proteina tau u stanice te tau propagaciju između neurona što pokazuje da LRP1, no ne i ostali članovi obitelji LDLR, djeluje kao endocitni neuronski receptor za unos i širenje proteina tau (Rauch i sur., 2020). Kao što je ranije spomenuto, tau sadrži dvije glavne domene: N-terminalnu „projekcijsku“ domenu i C-terminalnu domenu sastavljenu od četiri područja, svako od 18 aminokiselina koja se ponavljaju (*repeat domains* R1 – R4), što se vežu na mikrotubule. Istraženo je da se LRP1 preko svojih klastera II, III i IV, ali ne i I veže na R2 domenu tau proteina. U daljnjem istraživanju, nakon međusobnog vezanja, dokazano je da LRP1 transportira internalizirani tau u lizosomske odjeljke i učinkovito razgrađuje u tim stanicama. Zaključno, endocitoza posredovana LRP1 receptorima rezultira lizosomskom razgradnjom tau proteina. Međutim, postavlja se pitanje što u slučaju fosforilacije tau proteina budući da je fosforilacija tau vjerojatno povezana s povećanom tau patologijom. Nakon provedenih eksperimenata s rekombinantnim oblicima proteina tau došlo se do zaključka da se fosforilirani oblici vežu na LRP1 sa značajno nižim afinitetom, odnosno da fosforilacija smanjuje afinitet proteina tau za LRP1 što može imati važne posljedice za njihovo uklanjanje te na samu tau patologiju (Cooper i sur., 2020). Zanimljive rezultate dalo je sljedeće istraživanje u kojem su stanice koje eksprimiraju LRP1 kada su bile inkubirane s homogenatima mozгова pacijenata s AD-om poticale tau sijanje (engl. *seeding*) (sposobnost tau agregata da pogrešno savija naivni monomerni tau), ali ono se nije uočilo kada su stanice bile inkubirane s homogenatima mozгова zdravih kontrola. Ovi rezultati ukazuju da LRP1 u tau patologiji, kao i u A β patologiji, ima dvojnju ulogu, odnosno posreduje i u tau degradaciji i u tau sijanju, a to ovisi o staničnom okruženju i vrsti uključene tau (Cooper i sur., 2020).

Također se pokazalo da ApoE4 osim što pogoršava A β patologiju ovisno o ekspresiji LRP1 pogoršava i tau patologiju. Sveukupno to upućuje da LRP1 može pomoći u objašnjavanju istodobne pojave amiloidnih i tau lezija te da ga uloga regulatora širenja i agregacije taua u mozgu čini potencijalnom metom za liječenje neurodegenerativne bolesti povezane s tau proteinom (Rauch i sur., 2020).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci moždanog tkiva

U istraživanju su korišteni postmortalni uzorci humanog tkiva medijalnog dijela sljepoočnog režnja uklopljeni u parafinu uzeti iz zbirke mozgova čovjeka (engl. *Huddinge Brain Bank*), Karolinska institut, Stockholm, Švedska. Svako prikupljanje i korištenje moždanog tkiva bilo je u skladu s propisanim etičkim pravilima i uz odobrenje etičkog povjerenstva. Sveukupno je korišteno šest uzoraka od šest različitih osoba, od toga tri AD uzorka dobivena od osoba kojima je za života klinički dijagnosticirana Alzheimerova bolest, a neuropatološkom analizom poslije obdukcije potvrđena dijagnoza pomoću CERAD (engl. *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*) kriterija (Mirra i sur., 1991), a preostala tri su kontrolni uzorci osoba koje za života nisu bolovala od neuroloških ili psihijatrijskih poremećaja niti je uzrok smrti bio povezan s nekim od navedenih poremećaja ili traumom glave (Tablica 1). Moždano tkivo se pripremalo na način da su se nakon fiksacije u 4 % paraformaldehidu medijalni dijelovi sljepoočnog režnja rezali u blokove koji sadrže hipokampalnu formaciju, entorinalnu moždanu koru i dio sljepoočne moždane kore, a zatim se ti blokovi uklapali u parafin kako je opisano u radu Westa i Gundersena (1990). Blokovi su izrezani u frontalnoj ravni na debljinu od 3 mm paralelno jedan u odnosu na drugi, a u rostrokaudalnom smjeru okomito na septotemporalnu os. Zatim je slijedilo rezanje tkiva hipokampusa uklopljenog u parafinske blokove pomoću mikrotoma na rezove debljine 12 μm čime su dobiveni preparati za histološku i imunofluorescencijsku analizu. U istraživanju su korišteni slučajni rezovi različitih razina hipokampusa te uspoređivani na istoj ili približno istoj razini reza patološkog i kontrolnog tkiva.

Tablica 1. Podaci o korištenim uzorcima

UZORCI	OZNAKA UZORKA	SPOL	DOB (godine)	TRAJANJE BOLESTI (godine)	UZROK SMRTI
UZORCI MOZGOVA OSOBA S ALZHEIMEROVOM BOLESTI	AD081	Ž	80	6 godina	Infarkt miokarda
	AD240	Ž	80	5 godina	Bronhopneumonija
	AD460	M	81	3 godine	Bronhopneumonija
KONTROLNI UZORCI	KONT165	M	68	/	Prometna nesreća
	KONT003	Ž	77	/	Infarkt miokarda
	KONT417	Ž	84	/	Embolija pluća

3.1.2. Protutijela za imunofluorescencijsko bojanje

- Primarno protutijelo

Anti-LRP1 (Rb), RRID: AB_2234877, abcam, Boston, SAD

Phospho-Tau (AT8) (m), Thermo Fisher Scientific, Oregon, SAD

- Sekundarno protutijelo

AlexaFluor™ AF488 goat, anti-rabbit IgG, Thermo Fisher Scientific, Oregon, SAD

- Koncentracija 1:1000

AlexaFluor™ AF546 goat, anti-mouse IgG, Thermo Fisher Scientific, Oregon, SAD

- Koncentracija 1:1000

3.1.3. Kemikalije

- Ksilol I, II, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etanol apsolutni I, II, Honeywell, Francuska
- Etanol 96 %, Biognost, Zagreb, Hrvatska
- Etanol 70 %
- Destilirana voda, HIIM
- Natrijev klorid, krist., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Dinatrijev hidrogenfosfat, bezvodni, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska

- Monohidrat citratne kiseline, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidroksid, zrnca 2-5 mm, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- BSA (Bovine Serum Albumin), pH 7, >98 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Triton™ X-100, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- PAP pen, Daido Sangyo Co., Ltd., Tokyo, Japan
- TrueBlack Lipofuscin Autofluorescence Quencher, Biotium, Fremont, CA, SAD
- Vectashield® Antifade Mounting Medium with DAPI, Burlingame, CA, SAD

3.1.4. Otopine i puferi

- 10×PBS (od engl. *phosphate buffered saline*) pufer (pH=7,4)

Natrijev klorid	90 g
Kalijev klorid	2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	11,3 g
Kalijev dihidrogenfosfat	2 g
Destilirana voda	do 1000 mL

1×PBS pufer = 100 mL (10×PBS) + 900 mL (dH₂O)

- Citratni pufer (pH=6,0) (0,01 M)

Monohidrat citratne kiseline	2,1 g
Destilirana voda	900 mL
- Podesiti pH s 2M NaOH	
Destilirana voda	do 1000 mL

- Blocking (1 % BSA (engl. *bovine serum albumin*; goveđi serumski albumin) u 1×PBS + 0,5 % Triton)

1×PBS	25 mL
BSA	0,25 g
Triton	125 µL

- TrueBlack™

TrueBlack	5 µL
70 % EtOH	100 µL

3.1.5. Oprema i uređaji

- Kadica i nosač za držanje uzoraka
- Digestor, abzug DIN 12924, Köttermann, Njemačka
- Tresilica, Vibromix 311 EVT, Tehnica, Slovenija
- Analitička vaga, NewClassic MF JP503G, Mettler-Toledo, Švicarska
- Vorteks, Vortex-Genie 2 G560E, Scientific Industries, SAD
- Magnetska miješalica, MR Hei-Mix S, Heidolph, Njemačka
- Elektroda za mjerenje pH, SevenCompact Mettler-Toledo, Švicarska
- Mikrovalna pećnica, Bosch, Njemačka
- Falkonice, Sarstedt AG & C. KG, Njemačka
- Pipetmani, Eppendorf, Njemačka
- Pokrovna stakalca, VitroGnost 24 × 32 mm, BioGnost, Zagreb, Hrvatska
- Hladnjak (+4 °C), CHL 700 COMF, Pol-Eko-Aparatura, Poljska
- Hladnjak (-20 °C), 7086022-01, Liebherr, Njemačka
- Svjetlosni mikroskop, Olympus BX53, Tokyo, Japan
- Konfokalni mikroskop, Olympus FV3000, Tokyo, Japan

3.2. METODE

3.2.1. Imunofluorescencijsko bojanje

Za vizualizaciju i lokalizaciju proteina LRP1 u pojedinim slojevima hipokampusa te njegovu korelaciju s najranijim promjenama hiperfosforiliranog tau proteina uzorci moždanog tkiva osoba s Alzheimerovom bolešću i kontrolni uzorci podvrgnuti su imunofluorescencijskom bojanju biljezima LRP1 i AT8.

Imunofluorescencijsko bojanje (IF) je imunološka metoda za precizno otkrivanje i detektiranje željenih antigena u stanicama i tkivima. Temelji se na primjeni specifičnih protutijela vezanih s fluorescirajućim spojevima koja se potom dokazuju fluorescentnim mikroskopom. Postoji direktna i indirektna IF, a njihova razlika je u načinu vezanja fluorofora za protutijelo. Kod direktne IF primarno protutijelo obilježeno fluorokromom izravno se veže za određeni antigen. U ovom istraživanju korištena je indirektna IF koja se provodi u dvije faze. Specifično neobilježeno primarno protutijelo veže se za željeni antigen na tkivu, a na njega se veže sekundarno protutijelo na kojem je vezan fluorofor kao signal (Im i sur., 2019).

Nakon obilježavanja histoloških rezova oznakom uzorka te regije mozga iz koje je rez započinje IF postupak prema standardnom protokolu. Postupak je započeo procesom deparafinizacije uzoraka budući da su isti bili uklopljeni u parafinske blokove. Proces deparafinizacije radio se u digestoru tako da se nosač s uzorcima uronio u kadnicu napunjenu Ksilolom u dvije izmjene po 10 minuta, a zatim je slijedila rehidracija etanolom u nizu padajućih koncentracija (apsolutni etanol u dvije izmjene, 96 %, 70 %), po 5 minuta u svakom. Preparati su se zatim ispirali u puferskoj otopini 1×PBS 10 minuta na treskalici, a u međuvremenu se pripremao citratni pufer i podesio pH elektrodom do željene pH vrijednosti (pH = 6,0). Slijedilo je kuhanje preparata u citratnom puferu (pH = 6,0) u mikrovalnoj pećnici, najprije na 700 W do ključanja pet puta uz kontrolu tako da se dodavala dH₂O kako bi se smanjilo ključanje, a zatim na 350 W 20 min bez hlađenja. Kuhanjem dolazi do otvaranja epitopa antigena koje prepoznaje protutijelo i na taj način se olakšava njegovo prepoznavanje i vezanje (engl. *antigen retrieval*). Nakon kuhanja slijedilo je hlađenje na sobnoj temperaturi tijekom 30 min u digestoru te ispiranje PBS-om 3 puta po 10 minuta.

Idući korak bio je blokiranje. Blokiranje je postupak kojim se sprječava pojava lažno pozitivnog obojenja zbog nespecifičnog vezanja protutijela. Koristili su se serumu životinja ili otopine proteina koji tvore tanak sloj na površini tkiva i time sprječavaju nespecifično vezanje protutijela. Blokiranje se pripremalo tako da se najprije dodalo 125 µL Tritona u 20 mL 1×PBS-a na magnetnoj miješalici, a zatim se polako dodavalo 0,25 g BSA kako se ne bi stvorile grudice. Nakon što je smjesa postala homogena, dodavalo se 1×PBS do 25 mL te se Blocking otopina profiltrirala zbog mogućih zaostataka kristalića BSA. Prije nakapavanja otopine za blokiranje, stakalca se su obrisala krpicom oko uzorka, posložila na vlažnu komoru te se napravio obrub oko uzorka s markerom Super PAP pen. To je hidrofobna tekućina koja sprječava istjecanje nakapane tekućine preko ruba. Na uzorke je nakapano 200 µL blokiranja (1 % BSA + 0,5 % Triton u 1×PBS) te je inkubacija u blokingu trajala 60 minuta na sobnoj temperaturi. U međuvremenu se pripremilo primarno protutijelo u blokingu. Budući da su korištena dva primarna protutijela, radio se *double-labelling*, odnosno metoda dvostrukog imunofluorescencijskog bojanja.

Metoda dvostrukog IF bojanja koristila se da bi se vidjelo utječu li hiperfosforilirani tau proteini na ekspresiju LRP1. *Double-labelling* moguće je provesti ukoliko su aplicirana protutijela razvijena u različitim životinjskim vrstama. Primjerice, jedno protutijelo razvijeno u mišu (*anti-mouse*), a drugo protutijelo u zecu (*anti-rabbit*). Postupak dvostrukog IF bojanja u principu je jednak kao klasična IF, a jedina razlika je što se pripremaju oba protutijela različito

domaćina u otopini za blokiranje u jednu tubicu i kao takva nakapavaju na uzorak. U eksperimentu se koristilo Anti-LRP1 protutijelo koje je razvijeno u zecu (anti-rADbit) i Fosfo-Tau (AT8) koje je razvijeno u mišu (anti-mouse) na istome preparatu moždanog tkiva. LRP1 se apliciralo u koncentraciji 1:100, a AT8 u koncentraciji 1:200. Obzirom na zadane koncentracije, računao se volumen primarnih protutijela koji se pripremao u 1 % BSA blokingu. Nakon uklanjanja otopine za blokiranje, na preparate se nakapalo 150 μ L otopine primarnih protutijela u blokingu te stavilo na inkubaciju u hladnjak na +4 °C tijekom noći. Uz to, napravila se i negativna kontrola na tkivnom uzorku koji nije tretiran primarnim protutijelima. Negativna kontrola koristila se da bi se potvrdila specifičnost vezanja primarnog protutijela.

Sljedeći dan, uzorci su se izvadili iz hladnjaka i temperirali na sobnu temperaturu nakon čega su bili isprani s 1×PBS 3 puta po 10 minuta. Apliciranje sekundarnih protutijela nužno je provesti u zamračenom prostoru i ne izlagati jakoj svjetlosti. Od sekundarnih protutijela korišteni su AlexaFluor 488 anti-rADbit IgG za primarno protutijelo LRP1 (zeleno boja) i AlexaFluor 546 anti-mouse IgG za primarno protutijelo AT8 (crveno boja). Sekundarna protutijela također su se aplicirala u otopini za blokiranje u koncentraciji 1:1000 te su se nakapavala na sve rezove uključujući i negativnu kontrolu. Inkubacija preparata odvijala se u mraku na sobnoj temperaturi na treskalici tijekom 2 sata, a nakon toga je slijedilo ponovno ispiranje u 1×PBS 3 puta po 10 minuta. Za suzbijanje autofluorescencije preparati su se tretirali otopinom quencher TrueBlack™ koja se pripremila miješanjem 5 μ L TrueBlack-a u 100 μ L 70 % EtOH. Preparati su se u mraku nakapali s pripremljenom otopinom koja se drži na tkivu 30-60 s (ovisno o debljini reza), nakon čega se preparat isprao. Nakon suzbijanja autofluorescencije slijedilo je ponovno ispiranje u puferu 1×PBS 3 puta po 10 minuta. Zadnji korak je pokrivanje preparata pokrivalom koje sadrži DAPI (Vectashield with DAPI). DAPI je reagens koji boji DNA, odnosno jezgre kako bi nam lakše bilo raspoznati gdje su stanice. Na DAPI su se stavila pokrovna stakalca i preparati su se pohranili u hladnjak na +4 °C.

3.2.2. Histološko bojanje metodom po Nisslu

Za prikazivanje živčanog tkiva susjedni histološki rezovi onih bojanih za imunofluorescenciju bili su obojeni metodom po Nisslu. Metoda po Nisslu koristi se za raspoznavanje citoarhitektonskih granica zona, slojeva i staničnih odjeljaka telencefalona (stanično ustrojstvo živčanog sustava), za isticanje važnih strukturnih značajki neurona, lakšu orijentaciju i određivanje područja hipokampalne formacije. Boji se tzv. Nisslova tvar, odnosno nukleinske kiseline u jezgri stanice i ribosomi, stoga su jasno vide dijelovi tijela neurona, ali ne

i cijeli neuron. Metoda se bazira na principu da se boja (Cresyl Violet) veže na negativni naboj nukleinskih kiselina DNA i RNA u jezgri i granularnim nakupinama hrapavog ER. Rezultat bojenja su ljubičasto obojena Nisslova tjelešca (hrapava endoplazmatska mrežica) i slobodni ribosomi koji se nalaze u citoplazmi tijela neurona (Prophet i sur., 1992).

Uzorci moždanog tkiva najprije su prolazili proces deparafinizacije koji je prethodno opisan, a zatim je slijedilo bojanje 0,5 %-tnom otopinom Cresyl Violet razrijeđenoj u destiliranoj vodi u omjeru 1:4. Proces bojanja trajao je 10 minuta tijekom kojeg su se preparati konstantno promatrali, a zatim su se ispirali u destiliranoj vodi oko 1 minute. Slijedio je postupak diferenciranja pomoću otopine kiselog alkohola (70 %-tni etanol + nekoliko kapi 10 %-tne octene kiseline), a vrijeme provedbe ovisilo je o tkivu. Nakon toga su se preparati ispirali u 70 %-tnom (5 minuta), 96 %-tnom (2 puta po 5 minuta) etanolu te na kraju u 100 %-tnom etanolu (2 puta po 5 minuta). Zadnji korak bio je prosvijetljavanje preparata u otopini ksilola 5 minuta. Nakon sušenja, rezovi su se prekrili kapljicom Histomounta i pokrovnim stakalcem.

3.3. ANALIZA I OBRADA PODATAKA

3.3.1. Konfokalna mikroskopija

Nakon dvostrukog imunofluorescencijskog bojanja uzorci su se promatrali konfokalnim mikroskopom Olympus FV3000. Budući da se radilo dvostruko obilježavanje (*double-labelling*), odnosno upotrebljavala su se dva protutijela na istom uzorku, fluorescentni detektori su podijeljeni u dvije faze. Plava (DAPI) i crvena (AF546 za AT8) boja se na spektru manje preklapaju, stoga su oni bili u istoj fazi, dok je zelena (AF488 za LRP1) bila u drugoj. Detaljno su se proučavali slojevi svakog uzorka te se za svaki sloj napravilo pet fotografija na različitim mjestima. Sve slike bile su podešene na jednake parametre te fotografirane digitalnom kamerom pri povećanju od 20×.

3.3.2. ImageJ

Dodatna analiza uzoraka napravila se pomoću programa ImageJ koji služi za obradu digitalnih fotografija te je javno dostupan. Fotografije su bile spremljene u obliku tako da je svaka boja lasera bila zasebno pa su se za jednu sliku dobile tri fotografije, odnosno, posebno je prikazan DAPI, AT8 i LRP1. Svaka slika svakog sloja bila je povučena u program ImageJ te na njoj namješten ColorBalance tako da se jasno vidi svaki signal. Slike su spremljene svaka zasebno te preklopljeno (merge) zeleno i crveno kako bi se vidjela korelacija. Slike RGB Color

spremljen je u tiff formatu. Nakon toga se napravila kvalitativna analiza svake fotografije za svaki uzorak tako da se gledao broj neurona koji pokazuje signal, i zelenih i crvenih.

3.3.3. Svjetlosna mikroskopija

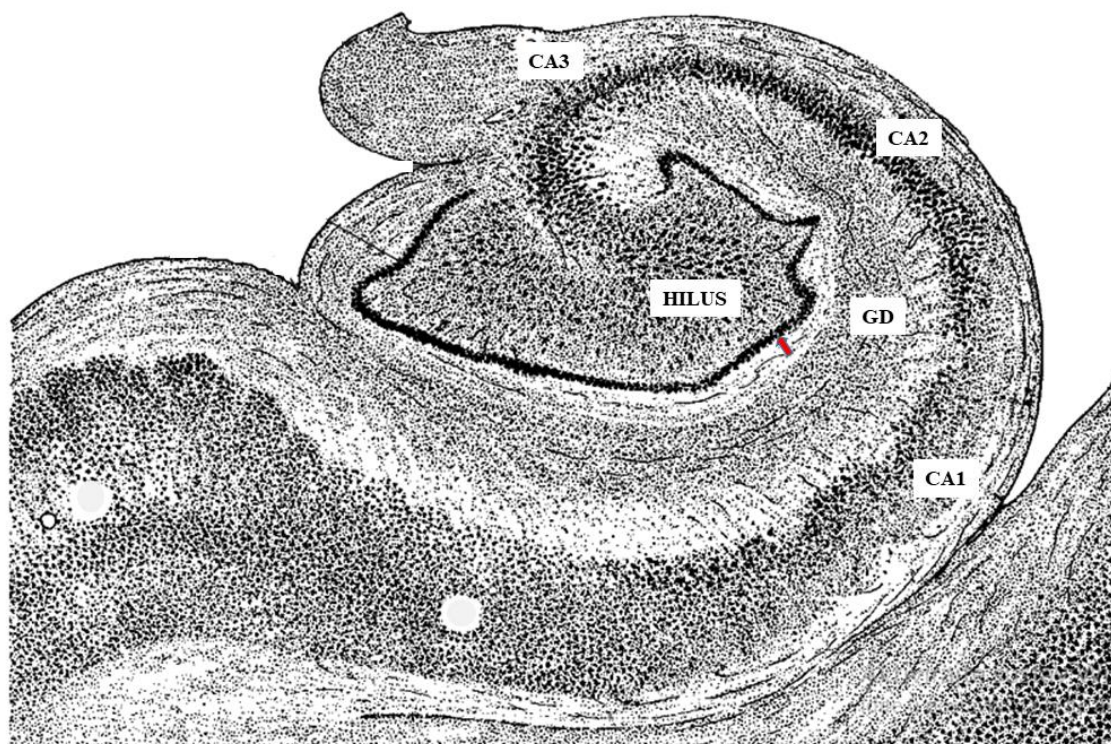
Rezovi obojani metodom po Nisslu kvalitetno su se analizirali mikroskopiranjem svjetlosnim mikroskopom Olympus BX53, a fotografije preparata napravljene su digitalnom kamerom Nikon DXM 1200 uz pomoć programa Nikon ACT-1.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Amiloidni plakovi i neurofibrilarni snopići zajedno ometaju funkciju neurona ometajući sinaptičku signalizaciju, a njihovo nakupljanje dovodi do oštećenja neurona što uzrokuje smanjenje mase mozga i kognitivni pad. Smatra se da se djelovanjem na A β plakove i NFT može utjecati na tijek i progresiju Alzheimerove bolesti (Huber i sur., 2018). Širenje neurofibrila prati Braak i Braak (1991) karakterističnu shemu u kojoj je u drugom stadiju zahvaćena hipokampalna formacija. Hipokampus je bilateralna struktura medijalnog dijela sljepoočnog režnja te zasigurno najistraživaniji dio središnjeg živčanog sustava zbog svoje ključne uloge u pamćenju. Tijekom AD-a dolazi do propadanja živčanih stanica entorinalne moždane kore što znači prekidanje veza prema hipokampusu (Šimić, 2019). Kao što smo spomenuli, porastao je interes za istraživanje LRP1 u području medicinskih znanosti u proučavanju Alzheimerove bolesti jer utječe na razinu i metabolizam A β -a i NFT-a te na homeostazu mozga (Shinohara i sur., 2017). Međutim, postoje određena neslaganja s tim zapažanjima, odnosno dosadašnji rezultati vrlo su proturječni pa tako još uvijek nema dovoljno istraživanja o njegovoj točnoj ulozi u AD-u. Uz to, većina istraživanja bila je na staničnim i životinjskim modelima. Razumijevanje njegove uloge u hipokampusu moglo bi pomoći u otkrivanju lijekova te usporavanju simptoma i tijeka bolesti. Iz tog se razloga ovim eksperimentom istraživala razina LRP1 proteina u hipokampalnoj formaciji, odnosno smanjuje li se ili povećava ekspresija LRP1 u AD ispitanika u odnosu na kontrolne uzorke. Uz protein LRP1, koristili smo protein AT8 za otkrivanje progresivnog nakupljanja hiperfosforiliranog taua u našim ljudskim uzorcima hipokampalnog korteksa.

Na uzorcima su praćena dva tipa neurona koji se razlikuju prema mjestu i obliku: piramidni neuroni i granularne stanice. Piramidni neuroni se nalaze u prefrontalnom korteksu, kori velikog mozga, hipokampusu i tijelu tonzila. Imaju trokutasti oblik piramide po kojem su dobili ime. U uzorcima prereza hipokampusa ljudskog mozga praćene su piramidne stanice u regiji CA2/3 i CA1. CA3 regija predstavlja širi sloj rijetko smještenih velikih piramidnih stanica, CA2 uski sloj gusto smještenih velikih piramidnih stanica, dok su u CA1 sloju male piramidne stanice u debljem, ali rahlije pakiranom sloju (Slika 5). Područja hipokampalne formacije (nazubljena vijuga (*gyrus dentatus*, GD)), hilus (CA4), CA2/3, CA1, subikulum (SUB) i bijela tvar određena su prema radu Westa i Gundersena (1990). Granularne stanice predstavljaju većinu neurona u ljudskom mozgu. Te zrnate stanice nalaze se u granularnom sloju malog mozga, nazubljenoj vijugi hipokampusa i mirisne lukovice, a karakteriziraju ih vrlo mala gusta pakirana tijela

neurona (tipa Golgi II). Na slici GD predstavlja *gyrus dentatus* gdje se nalazi sloj zrnatih stanica (Judaš i Kostović, 1997).



Slika 5. Amonov rog, frontalni presjek kroz hipokampus. Presjek prikazuje CA1, CA2, CA3 sloj piramidnih stanica, hilus ili CA4 sloj, sloj *gyrus dentatus* (GD) te granularne stanice područja *gyrus dentatus* označene crvenom strelicom (preuzeto i prilagođeno prema Kahle i Frotscher, 2003)

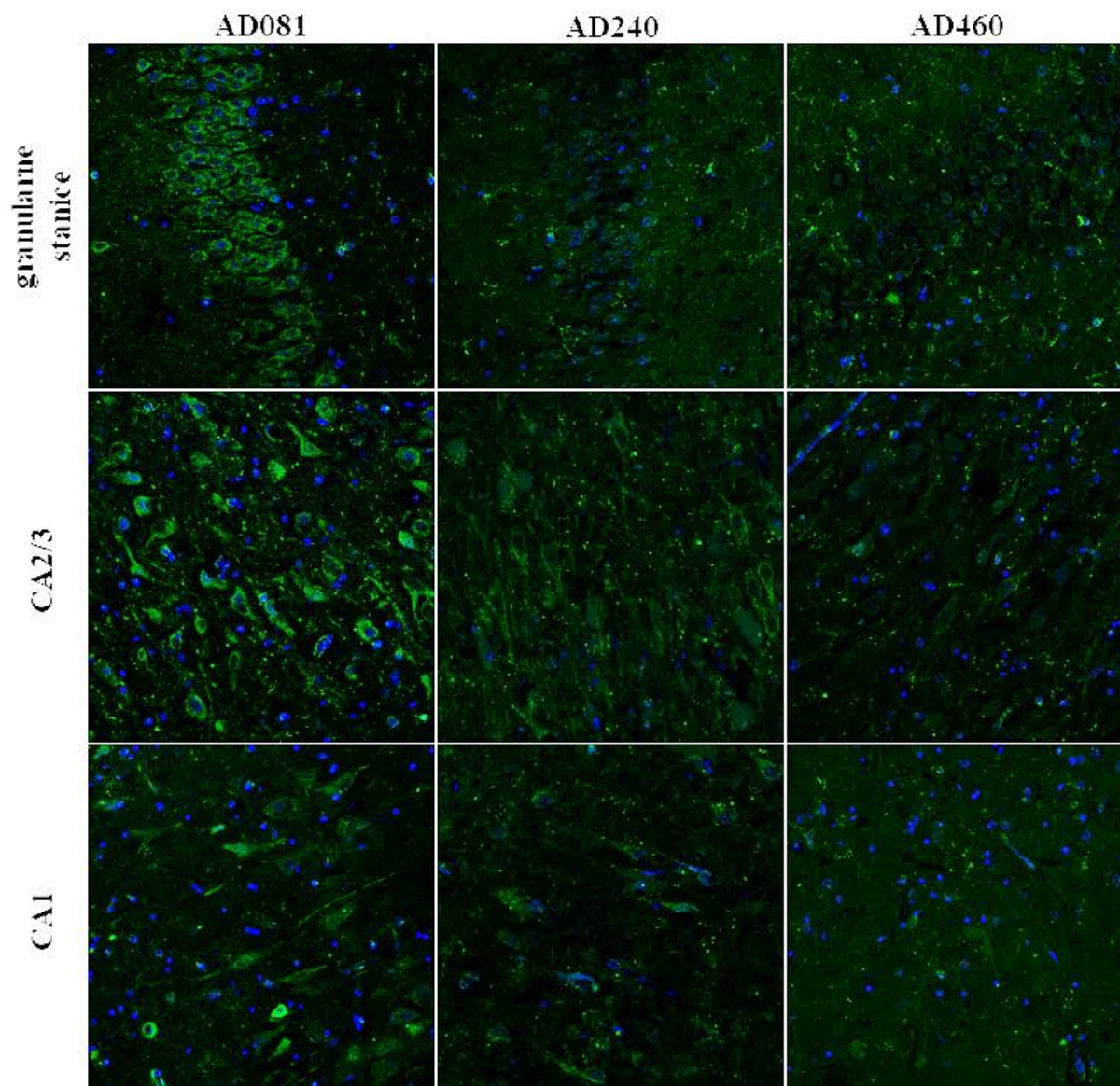
Nakon eksperimentalno odrađenog dijela, metode imunofluorescencije *double-labelling*, uzorci su bili proučavani pod konfokalnim mikroskopom te analizirani. Od svakog uzorka sa svake regije fotografirano je 5 nasumičnih područja, odnosno 15 slika po uzorku (5 slika puta 3 regije). Broj neurona je zbroj svih vidljivih neurona sa svih 5 slika po svakom uzorku. Analiza uzoraka bazirala se na preliminarnom opažanju što znači da brojevi iz Tablice 2 i Tablice 3 služe kao orijentacija, no ne prikazuju stvaran broj neurona koji prikazuju signal. Proučavane su sličnosti i razlike signala po pojedinim uzorcima između osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti te između kontrolnih uzoraka. Uz to, gledani su rezultati po regijama između svih uzoraka ne bi li se uočile određene sličnosti. Također, gledana je korelacija izraženosti LRP1 s AT8 signalima, odnosno pojavljuju li se ti signali na istim neuronima i s kojim intenzitetom. Osim zelenog (LRP1) i crvenog (AT8) signala, na uzorcima se nalazi i plavi signal koji predstavlja

DAPI, otopina s kojom su se tretirali preparati kako bi se vidjele stanice (DAPI boji DNA-jezgre).

Tablica 2. Prikaz rezultata AD uzoraka, osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti

Uzorak	Sloj	Broj i intenzitet pozitivnih LRP1	Broj pozitivnih AT8
AD081	Granularne	Puno, jako izraženi	12 jak signal
	CA2/3	Oko 200, jako izraženi	34 jak signal
	CA1	Oko 140, jako izraženi	32 jak signal
AD240	Granularne	Puno, ali slabo vidljivi	0
	CA2/3	Oko 145, slabi signali	31 jak signal
	CA1	Oko 75, slabi signali	62 jak signal
AD460	Granularne	Puno, ali jako slabi signali	26 umjereno jak signal
	CA2/3	Oko 120, jako slabi signali	14 umjereno jak signal
	CA1	Oko 50, jako slabi signali	45 umjereno jak signal

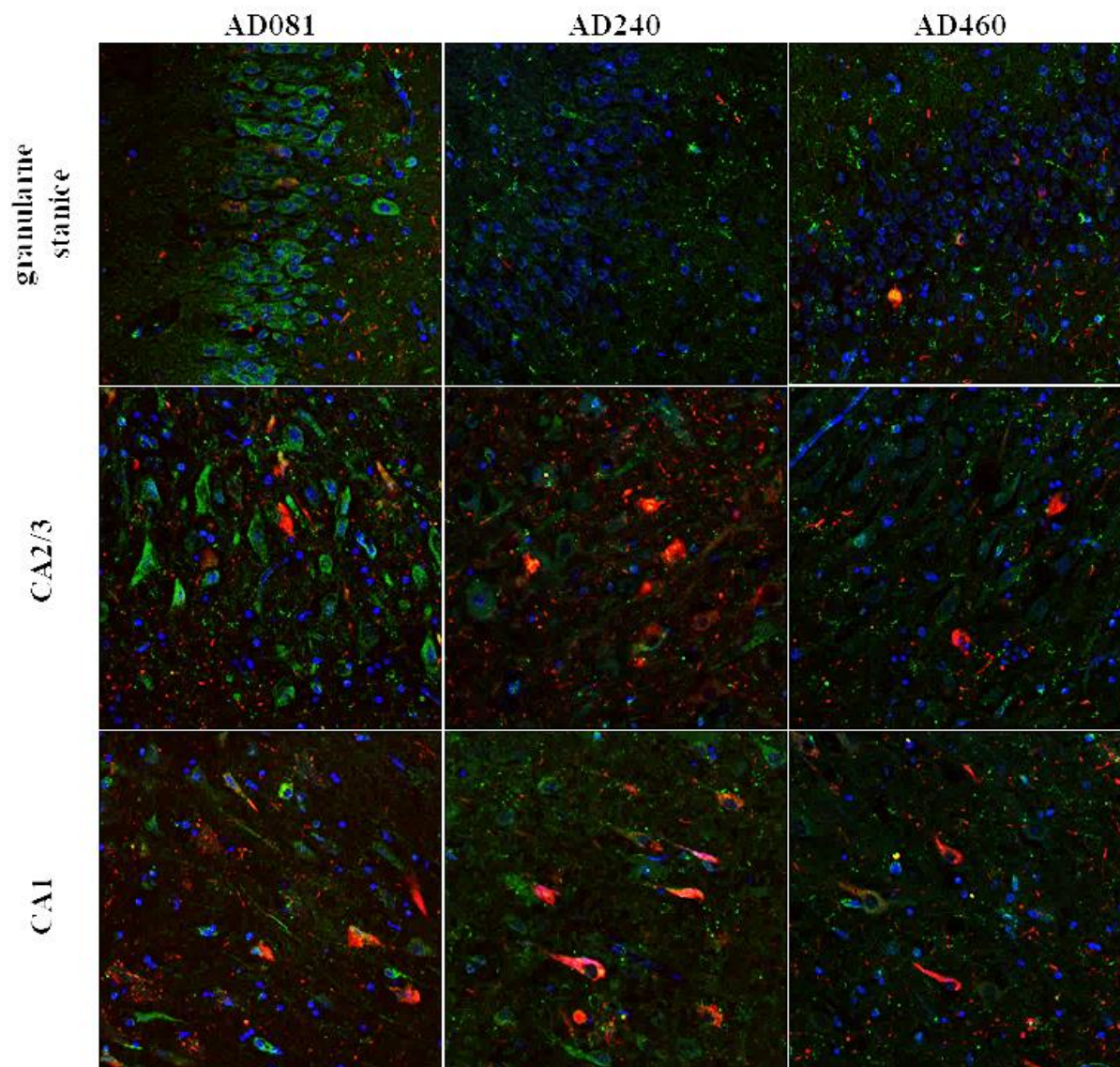
U sva tri uzorka osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti (Tablica 2), uzorak AD081 pokazivao je najbolju vidljivost i razlučivost neurona, ujedno i najjače signale. Radi se o ženskoj osobi starosti 80 godina čija je AD trajala 6 godina. U uzorku su se vidjeli vrlo izraženi signali te velik broj pozitivnih LRP1 neurona, pogotovo u sloju CA2/3. Sloj CA1 imao je također veći broj pozitivnih LRP1 neurona, međutim ti signali su nešto slabijeg intenziteta i ima ih izgledno manje nego u sloju CA2/3. Uzorci AD240 i AD460 pokazivali su slične karakteristike iz razloga što je tkivo u lošem stanju te sadrži puno lezija. Osim što sadrže značajno manje neurona od AD081, ti neuroni su izrazito slabijeg intenziteta, pogotovo AD460 koji ima jedva vidljive neurone. Radi se o muškoj osobi starosti 81 godina čija je bolest trajala 3 godine. Međutim, kao što je rečeno, histološka kvaliteta uzorka mozga AD240 i AD460 nije dovoljno dobra da bi se jasno razlučili navedeni signali (Slika 6).



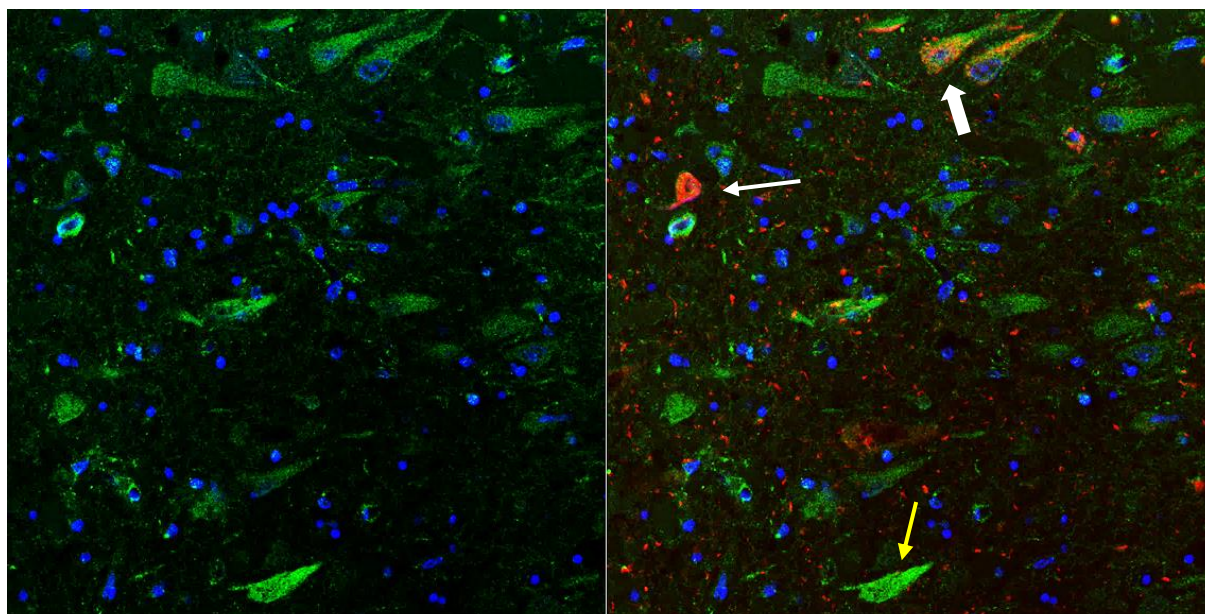
Slika 6. LRP1 signal (zeleno) u neuronima osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti (AD uzorci) u različitim područjima hipokampusa (piramidne stanice u regiji CA2/3 i CA1 hipokampusa te granularne stanice) promatrani konfokalnim mikroskopom nakon metode imunofluorescencije. DAPI (plavo) prikazuje jezgre neurona.

Pri promatranju AT8 signala (Tablica 2), kao što se može pretpostaviti, svi uzorci su sadržavali velik broj neurona pozitivnih na AT8 koji je pokazatelj prvih i najranijih promjena tau proteina u Alzheimerovoj bolesti jer se veže na određene epitope tau proteina čija se fosforilacija događa rano u patogenezi (Slika 7). Čini se da su signali izrazito jaki, a najjači AT8 signali bili su u LRP1 pozitivnim neuronima koji su slabijeg intenziteta ili čak u LRP1 negativnim neuronima (Slika 8). Ako se usporede signali između slojeva svakog uzorka, može se primijetiti da sloj zrnatih stanica nazubljene vijuge (granularne stanice) ne sadrži velik broj

AT8 pozitivnih neurona dok sloj CA1 sadži puno više pozitivnih AT8 neurona nego u ostalim slojevima. Otprije je poznato da je CA1 sloj više zahvaćen s hiperfosforiliranim tau proteinom (Cherry i sur., 2021). Naravno, puno više je bilo zdravih neurona, odnosno neurona koji su pozitivni na LRP1, a negativni na AT8.



Slika 7. Signal LRP1 (zeleno) i AT8 (crveno) u neuronima osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti (AD uzorci) u različitim područjima hipokampusa (piramidne stanice u regiji CA2/3 i CA1 hipokampusa te granularne stanice) promatrani konfokalnim mikroskopom nakon metode imunofluorescencije. DAPI (plavo) prikazuje jezgre neuronskih stanica.



Slika 8. AT8 i LRP1 signali na neuronima CA1 sloja hipokampusa osobe oboljele od AD (uzorak AD081). Lijeva slika prikazuje samo LRP1 (zeleno) signale, desna i LRP1 i AT8 (crveno) signale. DAPI (plavo) prikazuje jezgre neuronskih stanica.

Deblja bijela strelica prikazuje dva još uvijek živa neurona (vide se plavo označene jezgre) koji su istovremeno LRP1 imunoreaktivni, ali je u njima izražena neurofibrilarna degeneracija (AT8 crveni signal). Tanja bijela strelica prikazuje jedan neuron jačeg AT8 signala u kojem nema LRP1 ekspresije. Tanja žuta strelica prikazuje LRP1 imunoreaktivan neuron u kojem nedostaje AT8 signal.

Budući da je uzorak AD081 osobe kojoj je AD trajala 6 godina imao značajno više neurona koji su pokazivali najjači imunofluorescentni signal, može se pretpostaviti da se s povećanjem trajanja bolesti ekspresija LRP1 povećava. To je možda posljedica oštećenja staničnih membrana pa na taj način stanice pokušavaju kompenzatorno povećati unos kolesterola (kolesterol je neophodan sastojak staničnih membrana, posebice živčanih stanica te im osigurava cjelovitost i istovremenu fluidnost; na lipidnim raftovima staničnih membrana se odvijaju ključni procesi međustanične signalizacije i transporta). Određene studije su također pokazale da su razine LRP1 mRNA povećane u temporalnom korteksu i hipokampusu pacijenata s AD (Akram i sur., 2012; Matsui i sur., 2007) kao i u neuronima i aktiviranim astroцитima koji okružuju senilne plakove bolesnika s AD (Arélin i sur., 2002) Proturječno, Kang i sur. (2000) dokazuju smanjenje LRP1 u osoba s AD dok su Donahue i suradnici (2006), mjereći razine LRP1 u hipokampusu AD pacijenata, zapazili povećanje u mikrovaskulaturi te smanjenje proteina u neuronima. Kada gledamo spolne razlike, uzorak AD460 pokazivao je najslabije

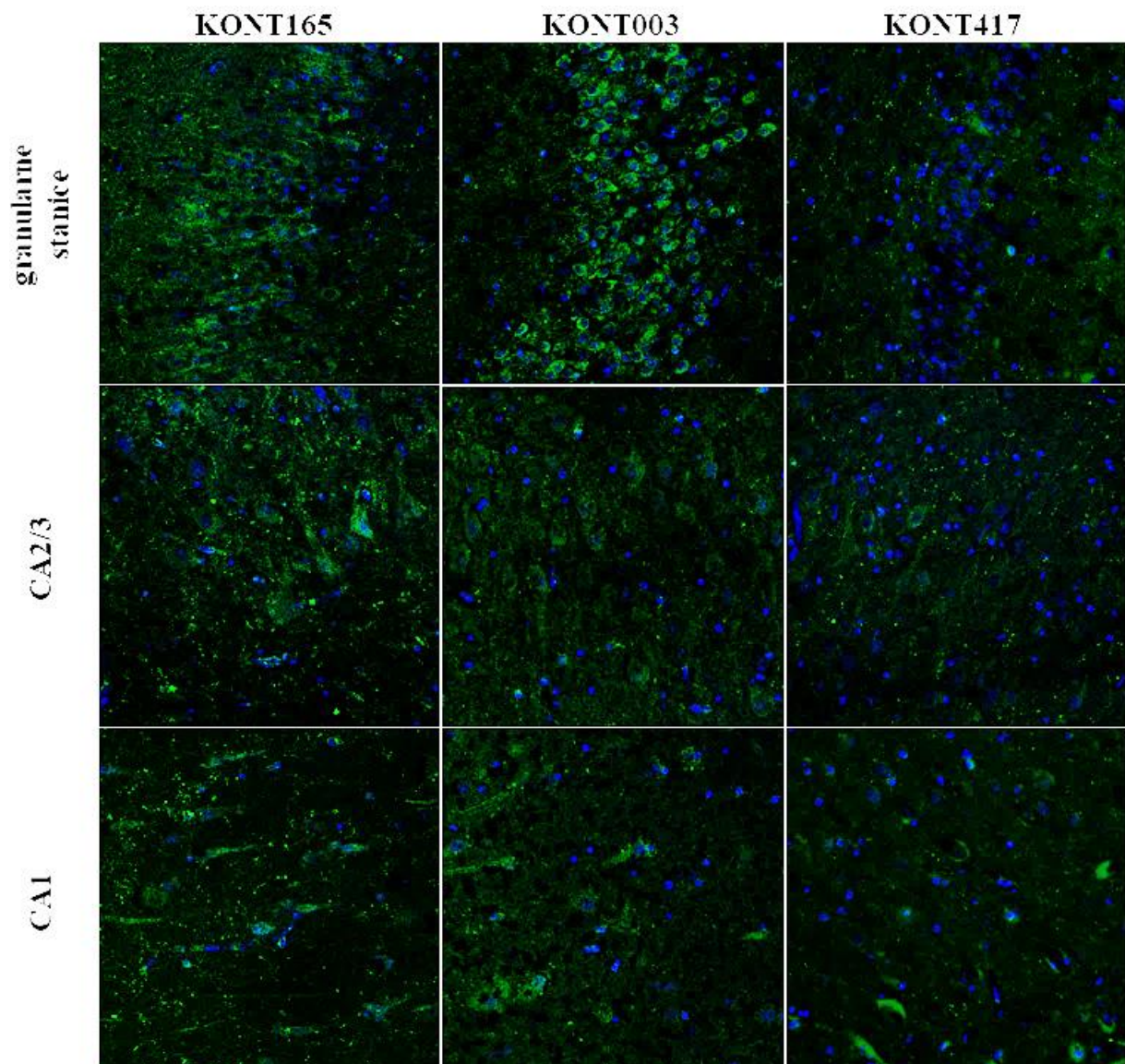
signale, no nije sigurno je li to zbog toga što se radi o muškoj osobi ili je to potvrda ranije pretpostavke da je ekspresija LRP1 niska ako je bolest trajala tek 3 godine i nije jako uznapredovala. Ostale razlike u spolu nisu uočene.

U nedavnim istraživanjima dokazano je da LRP1 djeluje kao neuronski receptor za unos i širenje taua te da nakon endocitoze slijedi lizosomska degradacija tau (Rauch i sur., 2020). S druge strane, LRP1 je poticao tau sijanje u uzorcima AD osoba, no ne i u kontrolama što bi potvrđivalo njegovu veću ekspresiju u patologiji (Cooper i sur., 2020). Međutim fosforilirani oblici tau vežu se na LRP1 sa značajno nižim afinitetom. Uspoređujući rezultate LRP1 i AT8, vidljivo je da se najjači AT8 signali nalaze u neuronima koji imaju slabu pozitivnost LRP1 signala ili on u potpunosti nedostaje. Moguće je da u tim neuronima LRP1 nije učinkovito vezao hiperfosforilirani tau, no opet smanjenje LRP1 u tim neuronima u AD mozgu moglo biti objašnjeno gubitkom neurona kako bolest napreduje.

Tablica 3. Prikaz rezultata kontrolnih uzoraka

Uzorak	Sloj	Broj i intenzitet pozitivnih LRP1	Broj pozitivnih AT8
KONT165	Granularne	Jako puno, jako izraženi	0, signal u jezgrama
	CA2/3	Oko 95 vidljivih, ostali signal vrlo slab	0, signal u jezgrama
	CA1	Oko 80 vidljivih, ostali signal vrlo slab	0, signal u jezgrama
KONT003	Granularne	Jako puno, jako izraženi	7
	CA2/3	Oko 95 vidljivih, ostali signal vrlo slab	0
	CA1	Oko 90 vidljivih, ostali signal vrlo slab	20
KONT417	Granularne	Nema jasno izraženih neurona, ostali signal vrlo slab	0
	CA2/3	Oko 100 vidljivih, ostali signal vrlo slab	0
	CA1	Oko 85 vidljivih, ostali signal vrlo slab	15

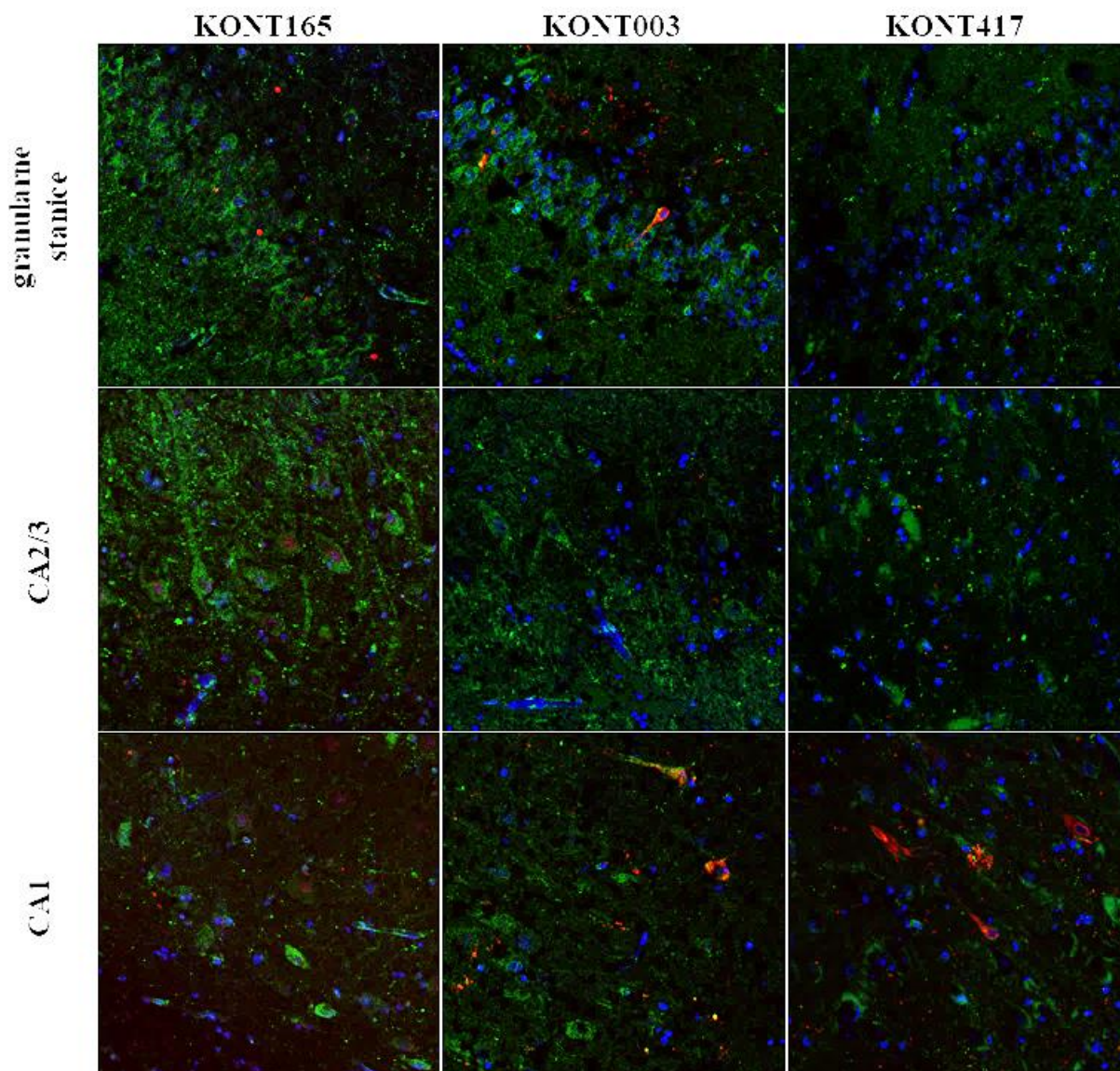
Kontrolni uzorci su se razlikovali od AD uzoraka, a međusobno su pokazivali sličnosti (Tablica 3). Treba napomenuti da histološka kvaliteta u svim kontrolnim uzorcima mozga nije bila dovoljno dobra da bi se jasno razlučili navedeni signali. Međutim pri opažanju je kod svih uzoraka bio vidljiv manji broj LRP1 pozitivnih neurona. U kontrolnom uzorku KONT003 granularnih stanica vidi se imunofluorescentni signal najjačeg intenziteta (jači i od AD081 uzorka), no taj intenzitet slabi po regijama. U regijama CA2/3 i CA1 svega je 40-tak jačih signala dobro vidljivih neurona dok su ostali LRP1 pozitivni neuroni puno slabijeg intenziteta signala. Kontrolni uzorak KONT165 ima približan broj LRP1 pozitivnih neurona kao KONT003 od kojih 50-tak pokazuje jači signal, a ostali su slabijeg intenziteta. Zasiurno najslabiji signali su uočeni u KONT417 uzorku mozga gdje u granularnim stanicama skoro pa i nema LRP1 pozitivnih neurona, a u ostalim regijama signali su vrlo slabog intenziteta, nema jasno vidljivih neurona te tkivo sadrži puno rupa (Slika 9).



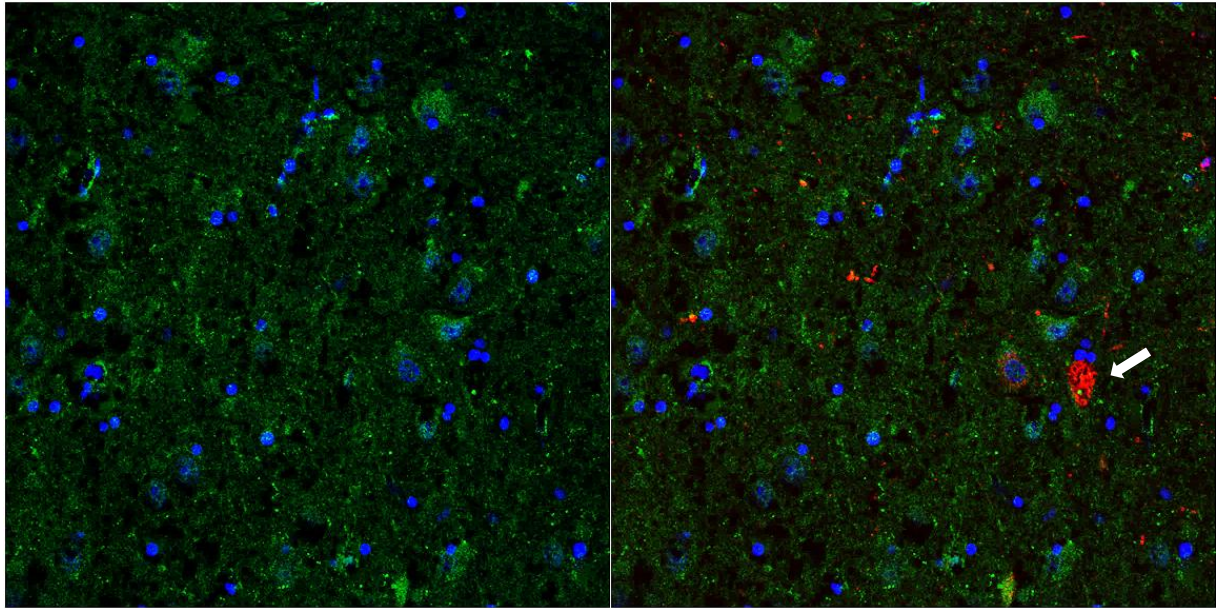
Slika 9. LRP1 signal (zeleno) u kontrolnim uzorcima (osobe koje nisu imale Alzheimerovu bolest) u različitim područjima hipokampusa (piramidne stanice u regiji CA2/3 i CA1 hipokampusa te granularne stanice) promatrani konfokalnim mikroskopom nakon metode imunofluorescencije. DAPI (plavo) prikazuje jezgre neuronskih stanica.

Budući da se radi o zdravim ispitanicima, odnosno osobama kojima za života nije dijagnosticirana AD, moglo se pretpostaviti da AT8 signal potpuno izostaje ili je mali broj pozitivnih AT8 neurona (Tablica 3). Također kao i u AD uzorcima dobili smo dojam da su najjači AT8 signali bili u LRP1 pozitivnim neuronima koji su slabijeg intenziteta ili čak u LRP1 negativnim neuronima (Slika 11). Kod KONT165 nisu nađeni AT8 signali ni u jednoj regiji, međutim uočeni su crveni signali u jezgrama neurona (Slika 10). Tau protein može se naći i u

jezgri stanica, no tamo njegova funkcija nije točno poznata. Pretpostavlja se da tau može djelovati kao epigenetički signal na deacetilaze histona s čime se pokušava objasniti njegova moguća uključenost u mehanizme hibernacije (Trujillo-Estrada i sur., 2021).



Slika 10. Signal LRP1 (zeleno) i AT8 (crveno) u kontrolnim uzorcima u različitim područjima hipokampusa (piramidne stanice u regiji CA2/3 i CA1 hipokampusa te granularne stanice) promatrani konfokalnim mikroskopom nakon metode imunofluorescencije. DAPI (plavo) prikazuje jezgre neuronskih stanica.



Slika 11. AT8 i LRP1 signali na neuronima CA1 sloja hipokampusa kontrolnog uzorka (KONT003). Lijeva slika prikazuje samo LRP1 (zeleno) signale, desna i LRP1 i AT8 (crveno) signale. DAPI (plavo) prikazuje jezgre neuronskih stanica.

Strelica prikazuje jedan rijedak AT8 imunoreaktivan neuron u kontrolnom uzorku.

Budući da je uzorak KONT417 pokazivao najslabije signale, a radi se o ženskoj osobi najstarijoj (84 godine) od preostala dva kontrolna uzorka, možemo pretpostaviti da se kod zdravih ljudi ekspresija LRP1 godinama smanjuje. Spolne razlike nisu uočene. Kang i suradnici (2000) također su otkrili da u frontalnom korteksu razina LRP1 opada u starijoj dobi u osoba koje nisu imale AD (kontrolni uzorci), odnosno da se dob i ekspresija LRP1 čini obrnuto koreliranima.

LRP1 pozitivnih neurona koji paralelno nemaju pozitivan signal na AT8 ima jako puno te je u njima LRP1 signal jako izražen, osim KONT417 u kojega nije uočena jasna izraženost LRP1 u neuronima, a tamo gdje je bila prisutna, imunofluorescentni signal je bio slab i neoštro ograničen.

U ovom istraživanju određivana je razina LRP1 u hipokampusu mozga starijih osobama oboljelih od AD i u zdravih osoba bez kognitivnih smetnji, također starije dobi. Postoje oprečna istraživanja o razinama proučavanog proteina. Mnoge studije govore da povećanje ekspresije LRP1 ili održavanje njegove funkcije kao receptora pozitivno utječe na funkciju mozga (Akram i sur., 2012; Matsui i sur., 2007) dok druge dokazuju suprotno (Osgood i sur., 2017; Silverberg i sur., 2010). Istraživanja na životinjskim modelima zapravo govore da povećanje (Devraj i sur.,

2016), odnosno smanjenje (Bouter i sur., 2014) ekspresije LRP1 proteina tijekom starenja i AD ovisi o tipu stanice. Smatra se također da u odnosu LRP1 i A β te LRP1 i tau postoji dvojna uloga, odnosno da, ovisno o staničnom okruženju te vrsti uključene stanice, LRP1 posreduje ili u degradaciji i čišćenju ili u stvaranju, širenju i akumulaciji neuropatoloških lezija povezanih s AD (Cooper i sur., 2020; Storck i Pietrzik, 2017). Međutim, još u potpunosti nije razjašnjena funkcija LRP1 tijekom patogeneze AD, ima li ulogu zaštite ili poticanja stanične toksičnosti i smrtnosti, odnosno je li njegova uloga promicanje patogeneze ili sprječavanje. Ovo istraživanje pokazalo je više razine LRP1 proteina u AD uzorcima za razliku od kontrolnih, što bi moglo značiti veću ulogu u širenju patologije. Problem ovog istraživanja je nedovoljan broj ispitanika koji bi potvrđivali navedene pretpostavke, stoga je potrebno daljnje istraživanje s većim brojem ispitanika, odnosno uzoraka. Osim većeg broja uzoraka trebalo bi se također usredotočiti na veći raspon dobi i različitih stadija bolesti.

U konačnici, protein LRP1 zbog svojih mnogobrojnih i važnih funkcija ne samo u mozgu, već u cijelom organizmu, predmet je opsežnog istraživanja. Uz istraživanja utjecaja na čišćenje amiloidnih peptida i tau proteina, promjena razina LRP1 u specifičnim stadijima AD-a, potrebno je istražiti njegove uloge ovisno o tipu stanice, dobi, fazi bolesti te koncentrirati se i dodatno istražiti ostale funkcije receptora i regulacijskih puteva budući da nikada uzrok ne predstavlja jedan aspekt, već niz čimbenika koji djeluju zajedno. Pojašnjavanje ovih aspekata u budućim studijama trebalo bi upotpuniti naše razumijevanje o LRP1 proteinu, pružiti nove uvide kako bismo u potpunosti iskoristili njegov potencijal za razvijanjem učinkovitih ciljnih terapija za poboljšanje liječenja i prevenciju neuropatoloških bolesti kao što je Alzheimerova bolest.

6. ZAKLJUČCI

1. Stupanj izraženosti LRP1 receptora bio je značajno veći u uzorcima hipokampusa osoba s AD-om u odnosu na kontrolne uzorke osoba umrlih od ne-neuroloških uzroka, stoga bi se moglo zaključiti da je ekspresija LRP1 proteina u mozgu osoba oboljelih od AD-a povećana, ali za potvrdu te tvrdnja bi trebalo analizirati puno veći broj uzoraka iz različitih stadija AD-a.
2. Uzorak KONT417 (osoba najstarije dobi) pokazivao je najslabiju LRP1 imunoreaktivnost pa je pretpostavljeno da se kod zdravih ljudi ekspresija LRP1 smanjuje u starijoj životnoj dobi.
3. Uzorak AD081 osobe kod koje je bolest trajala 6 godina nakon postavljanja dijagnoze imao je značajno veći broj neurona imunoreaktivnih na LRP1 pa je pretpostavljeno da se kao rezultat kompenzacijskih procesa s duljim trajanjem bolesti u preostalim živčanim stanicama ekspresija LRP1 proteina povećava.
4. Neuron koji su bili najjače zahvaćeni patološkim promjenama tau proteina (oni s najjačom imunoreaktivnošću na AT8 protutijelo) imali su slabiji izražaj LRP1 receptora u usporedbi s neuronima koji su bili slabije AT8 imunoreaktivni. Taj rezultat nije moguće jednoznačno interpretirati (u smislu što je uzrok, a što posljedica), ali on upućuje na moguću povezanost LRP1 receptora i neurofibrilarne degeneracije u AD-u.

7. LITERATURA

Achterberg W, Lautenbacher S, Husebo B, Erdal A, Herr K (2020) Pain in dementia. *Pain rep*, **5**(1). <https://doi.org/10.1097/PR9.0000000000000803>

Akram A, Schmeidler J, Katsel P, Hof PR, Haroutunian V (2012) Association of ApoE and LRP mRNA levels with dementia and AD neuropathology. *Neurobiol Aging*, **33**(3), 628. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.04.010>

Alonso AC, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994) Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *P Natl Acad Sci USA*, **91**(12), 5562-5566. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5562>

Altmann A, Tian L, Henderson VW, Greicius MD, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative Investigators (2014) Sex modifies the APOE -related risk of developing Alzheimer disease. *Ann Neurol*, **75**(4), 563-573. <https://doi.org/10.1002/ana.24135>

Alzheimer's Association (2013) 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, **9**(2), 208-245. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.02.003>

Arélin K, Kinoshita A, Whelan CM, Irizarry MC, Rebeck GW, Strickland DK, Hyman BT (2002) LRP and senile plaques in Alzheimer's disease: colocalization with apolipoprotein E and with activated astrocytes. *Mol Brain Res*, **104**(1), 38-46. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00203-6](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00203-6)

Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, Bedi GS, Holtzman DM, Deane R, Zlokovic BV (2007) Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J Cerebr Blood F Meta*, **27**(5), 909-18. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600419>

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006) Alzheimer's disease. *Lancet*, **368**(9533), 387-403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7)

Blennow K, Wallin A, Gottfries CG (1991) Presence of parieto-temporal symptomatology distinguishes early and late onset Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psych*, **6**(3), 147-54. <https://doi.org/10.1002/gps.930060306>

Bouter Y, Kacprowski T, Weissmann R, Dietrich K, Borgers H, Brauss A, i sur. (2014) Deciphering the molecular profile of plaques, memory decline and neuron loss in two mouse models for Alzheimer's disease by deep sequencing. *Front Aging Neurosci*, **6**, 75. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00075>

Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, **82**(4), 239-259. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>

Braak H, Del Tredici K (2011) Alzheimer's pathogenesis: is there neuron-to-neuron propagation?. *Acta Neuropathol*, **121**(5), 589-595. <https://doi.org/10.1007/S00401-011-0825-Z>

Bu, G (2009) Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci*, **10**(5), 333-344. <https://doi.org/10.1038/nrn2620>

Buee L, Bussiere T, Buee - Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev*, **33**(1), 95-130. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(00\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00019-9)

Cam JA, Zerbinatti CV, Li Y, Bu G (2005) Rapid endocytosis of the low density lipoprotein receptor-related protein modulates cell surface distribution and processing of the beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, **280**(15), 15464-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500613200>

Causevic M, Ramoz N, Haroutunian V, Davis KL, Buxbaum JD (2003) Lack of association between the levels of the lowdensity lipoprotein receptor-related protein (LRP) and either Alzheimer dementia or LRP exon 3 genotype. *J Neuropath Exp Neur*, **62**(10), 999-1005. <https://doi.org/10.1093/jnen/62.10.999>

Cherry JD, Esnault CD, Baucom ZH, Tripodis Y, Huber BR, Alvarez VE, i sur. (2021). Tau isoforms are differentially expressed across the hippocampus in chronic traumatic encephalopathy and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*, **9**(1), 86. <https://doi.org/10.1186/S40478-021-01189-4/FIGURES/11>

Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, i sur. (2009) Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol*, **11** 909. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>

Cooper JM, Lathuiliere A, Migliorini M, Arai AL, Wani MM, Dujardin S, i sur. (2020) LRP1 and SORL1 regulate tau internalization and degradation and enhance tau seeding. *BioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.11.17.386581>

Dale M (2018) Short Article on Alzheimer's Disease: #5 Tau Aggregation and Propagation. NewmarketScientificBlog. <http://newmarketscientific.blogspot.com/2018/08/short-article-on-alzheimers-disease-5.html>. Pristupljeno 25. lipnja 2022.

Dan S, Sharma D, Rastogi K, Shaloo, Ojha H, Pathak M, Singhal R, (2022) Therapeutic and diagnostic applications of nanocomposites in the treatment Alzheimer's disease studies. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, **12**(1), 940-960. <https://doi.org/10.33263/BRIAC121.940960>

Davis J, Xu F, Deane R, Romanov G, Previti ML, Zeigler K, i sur. (2004) Early-onset and robust cerebral microvascular accumulation of amyloid beta-protein in transgenic mice expressing low levels of a vasculotropic Dutch/Iowa mutant form of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem*, **279**(19), 20296-306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312946200>

Devraj K, Poznanovic S, Spahn C, Schwall G, Harter PN, Mittelbronn M, i sur. (2016) BACE-1 is expressed in the blood-brain barrier endothelium and is upregulated in a murine model of Alzheimer's disease. *J Cerebr Blood F Met*, **36**(7), 1281-1294. <https://doi.org/10.1177/0271678X15606463>

Donahue JE, Flaherty SL, Johanson CE, Duncan III JA, Silverberg GD, Miller MC, i sur. (2006) RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. **112**(4), 405-415. <https://doi.org/10.1007/S00401-006-0115-3>

Erickson MA, Niehoff ML, Farr SA, Morley JE, Dillman LA, Lynch KM, i sur. (2012) Peripheral administration of antisense oligonucleotides targeting the amyloid-beta protein precursor reverses ADetaPP and LRP-1 overexpression in the aged SAMP8 mouse brain. *J Alzheimers Dis*, **28**(4), 951-960. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-111517>

Feingold KR, Grunfeld C (2021) Introduction to lipids and lipoproteins. U: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, i sur. (ured.) Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>

Gilat-Frenkel M, Boehm-Cagan A, Liraz O, Xian X, Herz J, Michaelson DM (2014) Involvement of the Apoer2 and Lrp1 receptors in mediating the pathological effects of ApoE4 *in vivo*. *Curr Alzheimer Res*, **11**(6), 549-557. <https://dx.doi.org/10.2174/1567205010666131119232444>

Gonias SL i Campana WM (2014) LDL receptor-related protein-1: a regulator of inflammation in atherosclerosis, cancer, and injury to the nervous system. *Am J Pathol*, **184**(1), 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.08.029>

Graeber MB, Kosel S, Egensperger R, Banati RB, Müller U, Bise K, i sur. (1997) Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer in 1911: historical, histological and molecular genetic analysis. *Neurogenetics*, **1**(1), 73- 80. <https://doi.org/10.1007/s100480050011>

Grimmer T, Goldhardt O, Guo LH, Yousefi BH, Forster S, Drzezga A, i sur. (2014) LRP-1 polymorphism is associated with global and regional amyloid load in Alzheimer's disease in humans in-vivo. *Neuroimage-Clin*, **4**, 411-416. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2014.01.016>

Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, **297**(5580), 353-356. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1072994>

Herz J, Clouthier DE, Hammer RE (1992) LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell*, **71**(3), 411-421. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90511-A](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90511-A)

Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK (1988) Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDLreceptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J*, **7**(13), 4119-4127. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03306.x>

Holmes BB, Furman JL, Mahan TE, Yamasaki TR, Mirbaha H, Eades W, i sur. (2014) Proteopathic tau seeding predicts tauopathy in vivo. *P Natl Acad Sci USA*, **111**(41), E4376-E4385. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411649111>

Huber CM, Yee C, May T, Dhanala A, Mitchell CS (2018) Cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease: amyloid-beta versus tauopathy. *J Alzheimers Dis*, **61**(1), 265-281. <https://doi.org/10.3233/JAD-170490>

Huff MW, Daugherty A, Lu H (2016) Atherosclerosis. U: Ridgway ND, McLeod RS (ured.) Biochemistry of lipids, lipoproteins and membrane, 6. izd., Elsevier, Halifax, Nova Scotia, str. 519-548. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63438-2.00018-3>

HZJZ (2017) Alzheimerova bolest. HZJZ- Hrvatski zavod za javno zdravstvo. <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/alzheimerova-bolest/>. Pristupljeno 17. lipnja 2022.

Iadecola C (2016) Vascular and metabolic factors in Alzheimer's disease and related dementias: introduction. *Cell Mol Neurobiol*, **36**(2), 151-154. <https://doi.org/10.1007/S10571-015-0319-Y>

Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH (2019) An introduction to performing immunofluorescence staining. U: Yong WH (ured.) Biobanking. Methods in Molecular Biology, Humana Press, New York, **1897**, str. 299-311. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26

Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, i sur. (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *BBA - Mol Basis Dis* **1739**(2-3), 198-210. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.09.008>

Ito S, Ohtsuki S, Kamiie J, Nezu Y, Terasaki T (2007) Cerebral clearance of human amyloid-beta peptide (1-40) across the blood-brain barrier is reduced by self-aggregation and formation of lowdensity lipoprotein receptor-related protein-1 ligand complexes. *J Neurochem*, **103**(6), 2482-90. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04938.x>

Iturria-Medina Y, Sotero RC, Toussaint PJ, Mateos-Perez JM, Evans AC, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2016) Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. *Nat Commun*, **7**(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/ncomms11934>

Johnson GV, Stoothoff WH (2004) Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci*, **117**(24), 5721-5729. <https://doi.org/10.1242/jcs.01558>

Judaš M, Kostović I (1997) Temelji neuroznanosti: *Stanična građa središnjeg živčanog sustava: neuroni i glija; Regionalno, arealno, laminarno i modularno ustrojstvo moždane kore; Ustrojstvo i funkcije limbičkog sustava*, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, str. 8, 180-182, 381.

Kahle W, Frotscher M (2003) Color Atlas and Textbook Nervous System: Nervous System and Sensory Organs, vol. 3., Thieme, Stuttgart/New York, str. 233.

Kanekiyo T, Bu G (2014) The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid- β clearance in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* **6**, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00093>

Kanekiyo T, Cirrito JR, Liu CC, Shinohara M, Li J, Schuler DR, i sur. (2013) Neuronal clearance of amyloid-beta by endocytic receptor LRP1. *J Neurosci*, **33**(49), 19276-83. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3487-13.2013>

Kanekiyo T, Liu CC, Shinohara M, Li J, Bu G (2012) LRP1 in brain vascular smooth muscle cells mediates local clearance of Alzheimer's amyloid-beta. *J Neurosci*, **32**(46), 16458-65. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3987-12.2012>

Kang DE, Pietrzik CU, Baum L, Chevallier N, Merriam DE, Kounnas MZ, i sur. (2000) Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J Clin Invest*, **106**(9). <https://doi.org/1159-1166.10.1172/JCI11013>

Klepac N (2022) Kako prepoznati simptome Alzheimerove bolesti?- Pliva zdravlje. <https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/23218/Kako-prepoznati-simptome-Alzheimerove-bolesti.html>. Pristupljeno 11. srpnja 2022.

Li Y, Lu W, Marzolo MP, Bu G (2001) Differential functions of members of the low density lipoprotein receptor family suggested by their distinct endocytosis rates. *J Biol Chem*, **276**(21), 18000-18006. <https://doi.org/10.1074/JBC.M101589200>

Lillis AP, Mikhailenko I, Strickland DK (2005) Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability. *J Thromb Haemost*, **3**(8), 1884-1893. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01371.x>

Liu B, Zhang Z, Lu S, He Q, Deng N, Meng H., i sur. (2020) In-silico analysis of ligand-receptor binding patterns of α -MMC, TCS and MAP30 protein to LRP1 receptor. *J Mol Graph Model*, **98**, 107619. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2020.107619>

Liu PP, Xie Y, Meng XY, Kang JS (2019) History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Sig Transduct Target Ther*, **4**(1), 1-22. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8>

Liu Q, Zhang J, Zerbinatti C, Zhan Y, Kolber BJ, Herz J, i sur. (2011) Lipoprotein receptor LRP1 regulates leptin signaling and energy homeostasis in the adult central nervous system. *Plos Biol*, **9**(1), 1000575. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000575>

Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A, Breteler MM, i sur. (2000) Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*, **54**(11), 54-59.

Ma Q, Zhao Z, Sagare AP, Wu Y, Wang M, Owens NC, i sur. (2018) Blood-brain barrier-associated pericytes internalize and clear aggregated amyloid- β 42 by LRP1-dependent apolipoprotein E isoform-specific mechanism. *Mol neurodegener*, **13**(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/S13024-018-0286-0/FIGURES/5>

Matsui T, Ingelsson M, Fukumoto H, Ramasamy K, Kowa H, Frosch MP, i sur. (2007) Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res*, **1161**(1), 116-123. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.05.050>

Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, i sur. (2010) Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*, **330**(6012), 1774. <https://doi.org/10.1126/science.1197623>

Meister S, Zlatev I, Stab J, Docter D, Baches S, Stauber RH, i sur. (2013) Nanoparticulate flurbiprofen reduces amyloid-beta42 generation in an in vitro blood-brain barrier model. *Alzheimers Res Ther*, **5**(6), 51. <https://doi.org/10.1186/alzrt225>

Mimica N (2018) O društvu- Alzheimer HLZ. <http://alzheimer.hlz.hr/o-drustvu/>. Pristupljeno 11. srpnja 2022.

Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, i sur. (1991) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD): Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*, **41**(4), 479-479. <https://doi.org/10.1212/WNL.41.4.479>

Nakajima C, Haffner P, Goerke SM, Zurhove K, Adelman G, Frotscher M, i sur. (2014) The lipoprotein receptor LRP1 modulates sphingosine-1-phosphate signaling and is essential for vascular development. *Development*, **141**(23), 4513-25. <https://doi.org/10.1242/dev.109124>

NCBI (2022) LRP1 LDL receptor related protein 1, NCBI- National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4035>. Pristupljeno 16. svibnja 2022.

Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, i sur. (2012) Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropath Exp Neur*, **71**(5), 362-381. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31825018f7>

Olshansky SJ, Carnes BA (2019) Inconvenient truths about human longevity. *The Journals of Gerontology: Series A*, **74**(Supplement_1), S7-S12. <https://doi.org/10.1093/GERONA/GLZ098>

Osgood D, Miller MC, Messier AA, Gonzalez L, Silverberg GD (2017) Aging alters mRNA expression of amyloid transporter genes at the blood-brain barrier. *Neurobiol Aging*, **57**, 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.05.011>

Potere N, Del Buono MG, Mauro AG, Adbate A, Toldo S (2019) Low density lipoprotein receptor-related protein-1 in cardiac inflammation and infarct healing. *Front Cardiovasc Med*, **6**, 51. <https://doi.org/10.3389/FCVM.2019.00051>

Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH (1992) Laboratory methods in histotechnology. 3. Izd., American registry of pathology, Washington D.C.

Rauch JN, Luna G, Guzman E, Audouard M, Challis C, Sibih YE, i sur. (2020) LRP1 is a master regulator of tau uptake and spread. *Nature*, 580(7803), 381-385. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2156-5>

Reekmans SM, Pflanzner T, Gordts PL, Isbert S, Zimmermann P, Annaert W, i sur. (2010) Inactivation of the proximal NPXY motif impairs early steps in LRP1 biosynthesis. *Cell Mol Life Sci*, **67**(1), 135-45. <https://doi.org/10.1007/S00018-009-0171-7>

Ruzali WA, Kehoe PG, Love S (2012) LRP1 expression in cerebral cortex, choroid plexus and meningeal blood vessels: relationship to cerebral amyloid angiopathy and APOE status. *Neurosci Lett*, **525**(2), 123-128. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.07.065>

Ruzali WA, Kehoe PG, Love S (2013) Influence of LRP-1 and apolipoprotein E on amyloid-beta uptake and toxicity to cerebrovascular smooth muscle cells. *J Alzheimers Dis*, **33**(1), 95-110. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-121336>

Schneider WJ (2016) Lipoprotein Receptors. U: Ridgway ND, McLeod RS (ured.) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membrane*, 6. izd., Elsevier, Halifax, Nova Scotia, str. 489-518. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63438-2.00017-1>

Sehgal N, Gupta A, Valli RK, Joshi SD, Mills JT, Hamel E, i sur. (2012) *Withania somnifera* reverses Alzheimer's disease pathology by enhancing low-density lipoprotein receptor-related protein in liver. *P Natl Acad Sci USA*, **109**(9), 3510-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112209109>

Semenkovich, CF, Goldberg AC, Goldberg IJ (2016) Disorders of lipid metabolism. U: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM (ured.) *Williams Textbook of Endocrinology*, 13. izd., Elsevier, Boston / Chicago / Los Angeles, str. 1660-1700. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-29738-7.00037-X>

Shinohara M, Tachibana M, Kanekiyo T, Bu G (2017) Role of LRP1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease: evidence from clinical and preclinical studies: Thematic Review Series: ApoE and Lipid Homeostasis in Alzheimer's Disease. *J Lipid Res*, **58**(7), 1267-1281. <https://doi.org/10.1194/jlr.R075796>

Silverberg GD, Miller MC, Messier AA, Majmudar S, Machan JT, Donahue JE, i sur. (2010) Amyloid deposition and influx transporter expression at the blood-brain barrier increase in normal aging. *J Neuropath Exp Neur*, **69**(1), 98-108. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181c8ad2f>

Sjögren H (1950) Twenty-four cases of Alzheimer's disease; a clinical analysis. *Acta Med Scand*, **138**(S246), 225-233. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1950.tb12307.x>

Spires-Jones TL, Hyman BT (2014) The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron* **82**(4), 756-771. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.004>

Spuch C, Ortolano S, Navarro C (2012). LRP-1 and LRP-2 receptors function in the membrane neuron. Trafficking mechanisms and proteolytic processing in Alzheimer's disease. *Front Physiol*, **3**, 269. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2012.00269>

Storck SE, Pietrzik CU (2017) Endothelial LRP1-A potential target for the treatment of Alzheimer's disease. Theme: Drug Discovery, Development and Delivery in Alzheimer's Disease. *Pharm Res*, **34**(12), 2637-2651. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2267-3>

Šimić G (2019) Uvod u neuroznanost učenja i pamćenja, 1. izd., Ljevak. str. 67-69, 164.

Šimić G, Babić Leko M, Wraz S, Harrington CR, Delalle I, Jovanov-Milošević N, i sur. (2017) Monoaminergic neuropathology in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, **151**, 101-138. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.04.001>

Šimić G, Stanić G, Mladinov M, Jovanov-Milošević N, Kostović I, Hof P (2009) Does Alzheimer's disease begin in the brainstem?: Annotation. *Neuropathol Appl Neurobiol* **35**(6), 532-554. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2009.01038.x>

Tai LM, Mehra S, Shete V, Estus S, Rebeck GW, Bu G, LaDu MJ (2014) Soluble apoE/A β complex: mechanism and therapeutic target for APOE4-induced AD risk. *Mol neurodegener*, **9**(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-2/TABLES/2>

Trujillo-Estrada L, Vanderklis PW, Nguyen MMT, Kuang RR, Nguyen C, Huynh E, i sur. (2021) SPG302 Reverses Synaptic and Cognitive Deficits Without Altering Amyloid or Tau Pathology in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics*, **18**(4), 2468-2483. <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01143-1>

Van Kerkhof P, Lee J, McCormick L, Tetrault E, Lu W, Schoenfish M, i sur. (2005) Sorting nexin 17 facilitates LRP recycling in the early endosome. *The EMBO journal*, **24**(16), 2851-2861. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600756>

Verghese PB, Castellano JM, Garai K, Wang Y, Jiang H, Shah A, i sur. (2013) ApoE influences amyloid-beta ($A\beta$) clearance despite minimal apoE/ $A\beta$ association in physiological conditions. *P Natl Acad Sci USA*, **110**(19), E1807-E1816. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220484110>

Watts JC, Condello C, Stöhr J, Oehler A, Lee J, DeArmond SJ, i sur. (2014) Serial propagation of distinct strains of $A\beta$ prions from Alzheimer's disease patients. *P Natl Acad Sci USA*, **111**(28), 10323–10328. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408900111>

West MJ, Gundersen HJG (1990) Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol*, **296**(1), 1-22. <https://doi.org/10.1002/cne.902960102>

Zhang J, Liu Q (2015) Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein & cell*, **6**(4), 254-264. <https://doi.org/10.1007/S13238-014-0131-3/FIGURES/1>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Emma Štampar izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.


Vlastoručni potpis