

# Karakterizacija neuropatoloških značajki novog mišjeg modela bolesti Niemann-Pick tipa C s deletiranim genom BACE1

---

Vidatić, Lea

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:969597>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-28**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Lea Vidatić

**KARAKTERIZACIJA  
NEUROPATHOLOŠKIH ZNAČAJKI  
NOVOGA MIŠJEG MODELA BOLESTI  
NIEMANN-PICK TIPA C S  
DELETIRANIM GENOM *BACE1***

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2024.



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Lea Vidatić

**KARAKTERIZACIJA  
NEUROPATHOLOŠKIH ZNAČAJKI  
NOVOGA MIŠJEG MODELA BOLESTI  
NIEMANN-PICK TIPA C S  
DELETIRANIM GENOM *BACE1***

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Silva Katušić

Rijeka, 2024.



UNIVERSITY OF RIJEKA  
FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND DRUG  
DEVELOPMENT

Lea Vidatić

**CHARACTERISATION OF  
NEUROPATHOLOGICAL FEATURES OF  
A NEW NIEMANN-PICK TYPE C  
DISEASE MURINE MODEL WITH  
GENETICALLY DEPLETED *BACE1***

DOCTORAL THESIS

Mentor: Silva Katušić, PhD

Rijeka, 2024

Mentor rada: dr. sc. Silva Katušić (Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska)

Doktorski rad obranjen je dana 24. svibnja 2024. na Fakultetu biotehnologije i razvoja lijekova Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Jelena Ban, predsjednica povjerenstva (Fakultet biotehnologije i razvoja lijekova, Rijeka, Hrvatska)
2. doc. dr. sc. Željka Minić (Fakultet biotehnologije i razvoja lijekova, Rijeka, Hrvatska)
3. izv. prof. dr. sc. Dubravka Švob Štrac (Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska)

## ZAHVALE

*Izrada ovog doktorskog rada bila je dug i često samostalan proces, ali ipak ne bi bila moguća bez prisustva i podrške velikog broja dragih ljudi.*

*Prvo i veliko hvala mentorici dr. sc. Silvi Katušić na ovoj nevjerojatnoj prilici. Hvala Vam i na svom prenesenom stručnom znanju, svim dodatnim usavršavanjima koje ste mi omogućili, i svim izazovima koje ste postavili pred mene – učinili su me kvalitetnijim radnikom, a nadam se i znanstvenikom.*

*Od srca veliko hvala dr. sc. Kristini Dominko, bivšoj kolegici, ali i dragoj prijateljici. Hvala ti na opsežnom praktičnom znanju i vještinama koje si me naučila u vrlo kratkom periodu. Hvala ti na pomoći, raspravama i savjetima svih ovih godina, ali i na druženju, bez kojeg ne mogu zamisliti svoje dane na Ruđeru. Kamo god da nas budućnost odvede, nadam se da ćemo imati priliku opet raditi zajedno i ostvariti još nešto nevjerojatno kao što je bio PNI. A tko zna, možda konačno dobijem i plus... :)*

*Hvala preostalim članicama Laboratorija za istraživanje neurodegenerativnih bolesti, dr. sc. Mireli Baus Lončar, te bivšim kolegicama, dr. sc. Ani Rastiji, dr. sc. Ivi Bazini i dr. sc. Kate Šešelji, na godinama ispunjenima kvalitetnom suradnjom i smijehom.*

*Posebno veliko hvala Luciji Horvat, mag. biol. mol., na stručnoj pomoći s konfokalnom mikroskopijom. Hvala ti na beskrajnom trudu oko analize mojih uzoraka, za sve što si sama istraživala ne bismo li izvukle najviše, za sve što si me naučila o anatomiji mozga, za svaku dodatnu minutu termina, za nevjerojatnu objektivnost, ali i za razgovore i svakog „manekena“.*

*Veliko, veliko hvala dragoj tehničarki Marini Marš, na pomoći u radu s miševima, te na tehničkoj, ali i osobnoj brizi i podršci.*

*Hvala djelatnicima Pogona laboratorijskih životinja, dr. sc. Ranku Stojkoviću, Višnji Novalić, Maji Boranić i Goranu Golešu, na prenesenom znanju i pomoći.*

*Od srca hvala članicama Laboratorija za metabolizam i starenje, dr. sc. Marijani Popović Hadžiji, dr. sc. Sandri Sobočanec, dr. sc. Ivi Škrinjar, dr. sc. Mariji Pinterić, Eni Šimunić, mag. chem., te posebno Ivi Pešun Međimorec. Hvala Vam na susretljivosti, pomoći, savjetima, posudbama, razgovorima i podršci, a najviše na motivirajućem primjeru zajedništva.*

*Veliko hvala dr. Sabini Tahirović, suradnici iz Njemačkog centra za neurodegenerativne bolesti, što mi je omogućila usavršavanje u svojem laboratoriju. Hvala i dr. Alessiu Colombu, dr. Lauri Sebastián Monasor i Lini Dinkel na divnoj dobrodošlici, prenesenom znanju i suradnji. Svima Vama, kao i dr. Matthiasu Prestelu, dr. Robertu Vassararu i dr. Emanueleu Burattiju, hvala na konstruktivnim komentarima i ohrabrenju tijekom provedbe ovog istraživanja.*

*Hvala dragoj kolegici dr. sc. Tatjani Mijošek Pavin i ostalim članicama Laboratorija za biološke učinke metala, jer su mi u ključnom trenutku pomogle i omogućile korištenje*

*ultracentrifuge. Dr. sc. Lidiji Milković zahvaljujem na brizi, ohrabrenju i podršci u teškim trenucima te radnim vikendima.*

*Zahvaljujem i članicama Povjerenstva na brzim odgovorima i komentarima za koje vjerujem da su ovaj doktorski rad učinili kvalitetnijim. Posebno hvala dr. sc. Jeleni Ban na ažurnoj administrativnoj podršci i odgovorima na moje brojne upite.*

*Moj privatni krug vrlo je malen, ali zato nimalo manje snažan ili važan.*

*Od srca veliko hvala mojim prijateljicama, koje strpljivo čekaju moju „novu godinu“.*

*Hvala Mireli, mojoj najstarijoj prijateljici, jer ni gotovo trideset godina, ni stotine kilometara, nisu pokolebale naše prijateljstvo.*

*Hvala Petri, jer iako nas je povezao ples, bila si prva vršnjakinja koja je razumjela i podržavala moje akademske tendencije.*

*Hvala Ani, mojoj suputnici, jer smo zajedno prebrodile teške trenutke i sada je cijeli svijet pred nama. Salute!*

*U ovom periodu, moja je obitelj najviše osjetila moje odsustvo, stoga im posebno hvala na strpljenu, razumijevanju i podršci.*

*Na kraju, najveće, najposebnije i najiskrenije beskrajno hvala mojim roditeljima. Mama i tata, hvala Vam na svemu što ste mi pružili i omogućili, što ste me pustili da sama biram svoj pravac, i što ste mi pritom bili bezuvjetna podrška i najveći navijači. Hvala Vam za svaki „Da te pokupim?“, svaki „ručak za sutra“, i sve druge sitnice koje su mi olakšale ovo izazovno razdoblje. Volim Vas najviše i nadam se da ste ponosni.*

*Svima još jednom od srca hvala,*

*Lea*

## SAŽETAK

Bolest Niemann-Pick tipa C (NPC) je rijetka monogenska neurodegenerativna bolest i poremećaj nakupljanja lizosoma. Bolest NPC uzrokovana je mutacijom u genima *NPC1* ili *NPC2* koji kodiraju za prijenosnike kolesterola. Zbog nedostatka ili promijenjene funkcije proteina NPC1 ili NPC2, u kasnim endosomima i lizosomima dolazi do nakupljanja slobodnog kolesterola, što uzrokuje poremećaj funkcije endolizosomalnog puta, snažnu neuroinflamaciju (aktivaciju astrocita i mikroglia) i neurodegeneraciju prvenstveno Purkinjeovih neurona u malom mozgu. Klinički, bolest NPC karakterizira heterogeni fenotip koji uključuje brojne neurovisceralne poremećaje i ranu smrt. Unatoč etiološkoj razlici između bolesti NPC i kompleksne Alzheimerove bolesti (AB), ovi poremećaji dijele nekoliko patoloških značajki, poput promijenjenog metabolizma kolesterola, neurodegeneracije, neuroinflamacije te nakupljanja hiperfosforiliranog proteina tau i peptida amiloida- $\beta$  u mozgu. Povećano stvaranje amiloida- $\beta$  uslijed povećanog proteolitičkog cijepanja proteina APP enzimom BACE1 smatra se glavnim mehanizmom patogeneze AB. Zanimljivo, povećana proteolitička aktivnost enzima BACE1 zabilježena je i u bolesti NPC. S obzirom da je enzim BACE1 potencijalna farmakološka meta za liječenje AB, cilj ovog doktorskog rada bio je ispitati učinak genetičke modulacije razine enzima BACE1 na razinu i progresiju neuropatoloških značajki bolesti NPC. Za ovo istraživanje korišten je mišji model *knock-in* koji nosi najčešću mutaciju u ljudi, *NPC1-I1061T*, te je križan s modelom *knock-out BACE1*. Neuropatološke značajke (uključujući gubitak Purkinjeovih neurona, poremećaj funkcije endolizosomalnog puta, aktivaciju astrocita i mikroglia te hiperfosforilaciju proteina tau) ispitane su u malom mozgu, kori velikog mozga i hipokampusu metodama imunofluorescencije i Western blot. Delecija oba alela gena *BACE1* u jedinki *knock-in NPC1-I1061T* (N-KI) uzrokovala je ranu smrt uz povećanu progresiju svih neuropatoloških značajki (izuzev odumiranja Purkinjeovih neurona) već u asimptomatskoj fazi bolesti. Delecijom jednog alela gena *BACE1* u jedinki N-KI ublaženo je nakupljanje ranih endosoma i lizosoma, aktivacija astrocita te odumiranje Purkinjeovih neurona u simptomatskoj fazi bolesti. Međutim, u završnoj fazi bolesti, delecijom jednog alela gena *BACE1* u jedinki N-KI povećana je aktivacija mikroglia te ubrzano odumiranje Purkinjeovih neurona, što je uzrokovalo raniju smrt u odnosu na jedinke N-KI koje sadrže divlji tip gena *BACE1*. Zaključno, genetičko smanjenje razine enzima BACE1 ima i povoljne i štetne učinke na neuropatološke značajke bolesti NPC u mišjem modelu *knock-in NPC1-I1061T*, čime je istaknuta važnost uloge enzima BACE1 i njegovih supstrata za funkciju mozga. Daljnja istraživanja trebala bi razjasniti koji supstrati enzima BACE1 te koji tipovi stanica doprinose patobiologiji bolesti NPC. Dobiveni rezultati doprinose boljem razumijevanju bolesti NPC, kao i terapijskog potencijala enzima BACE1 u liječenju bolesti NPC i drugih neurodegenerativnih poremećaja sličnog mehanizma nastanka.

**KLJUČNE RIJEČI:** NPC1, I1061T, BACE1, nakupljanje kolesterola, endolizosomalni put, neurodegeneracija, neuroinflamacija, hiperfosforilacija proteina tau

## SUMMARY

Niemann-Pick type C disease (NPC) is a rare monogenic neurodegenerative disease and lysosomal storage disorder. NPC is caused by mutation in *NPC1* or *NPC2* genes which code for cholesterol transporters. Upon lack or dysfunction of NPC1 or NPC2 proteins, free cholesterol accumulates in late endosomes and lysosomes causing disruption of the endolysosomal pathway, profound neuroinflammation (activation of astrocytes and microglia) and neurodegeneration of primarily Purkinje cells in the cerebellum. Clinically, NPC is characterized by heterogenous phenotype including numerous neurovisceral pathologies and early death. Despite etiological differences between NPC and complex Alzheimer's disease (AD), these disorders share several pathological features, such as altered cholesterol metabolism, neurodegeneration, neuroinflammation and accumulation of hyperphosphorylated tau and amyloid- $\beta$  peptides in the brain. Increased generation of amyloid- $\beta$  due to increased BACE1-mediated proteolysis of APP is considered a potential mechanism of AD pathogenesis. Interestingly, increased BACE1-cleavage is observed in NPC as well. Since BACE1 is a potential pharmacological target against AD, the goal of this doctoral thesis was to analyse the effect of BACE1-genetic depletion on the levels and progression of neuropathological features of NPC. Therefore, we used a *knock-in* murine model carrying the most common human mutation, *NPC1*-I1061T, and crossed it with *BACE1* *knock-out* mice. Neuropathological features (including Purkinje cell loss, endolysosomal dysfunction, activation of astrocytes and microglia, and hyperphosphorylation of tau) were analysed in the cerebellum, cortex and hippocampus using immunofluorescence and Western blot. Deletion of both *BACE1* alleles in *NPC1*-I1061T *knock-in* (N-KI) mice caused early death with increased progression of all neuropathological features analysed (except Purkinje cell loss) already at the presymptomatic disease stage. Deletion of one *BACE1* allele in N-KI mice attenuated early endosome and lysosome accumulation, astrocyte activation, and Purkinje cell loss at the symptomatic disease stage. However, at the terminal disease stage, deletion of one *BACE1* allele in N-KI mice enhanced microglial activation and Purkinje cell loss, resulting in earlier death compared to N-KI mice containing wild-type *BACE1* gene. In conclusion, BACE1-genetic depletion has both beneficial and detrimental effects on neuropathological features of NPC in *NPC1*-I1061T *knock-in* murine model, which highlights the importance of BACE1 and its substrates in brain function. Future studies should aim to determine which BACE1 substrates and which cell types contribute to NPC pathobiology. These findings contribute to a better understanding of NPC disease and the potential of BACE1-targeted therapies against NPC and other neurodegenerative disorders with similar underlying pathologies.

**KEY WORDS:** NPC1, I1061T, BACE1, cholesterol accumulation, endolysosomal pathway, neurodegeneration, neuroinflammation, tau hyperphosphorylation

## POPIS KRATICA

|                  |   |
|------------------|---|
| AB               | Alzheimerova bolest   |
| AICD             | unutarstanična domena proteina APP nastala cijepanjem odsječka APP CTF $\alpha$ ili CTF $\beta$ $\gamma$ -sekretazom (engl. <i>APP intracellular domain</i> ) |
| ApoE             | apolipoprotein E  |
| APP              | protein prekursor amiloida- $\beta$ (engl. <i>amyloid-<math>\beta</math> precursor protein</i> )  |
| APP CTFs         | ukupni C-terminalni odsječci proteina APP (engl. <i>C-terminal fragments</i> )  |
| APP CTF $\alpha$ | C-terminalni odsječak $\alpha$ nastao cijepanjem proteina APP $\alpha$ -sekretazom (engl. <i>C-terminal fragment <math>\alpha</math></i> )                    |
| APP CTF $\beta$  | C-terminalni odsječak $\beta$ nastao cijepanjem proteina APP $\beta$ -sekretazom, tj. enzimom BACE1 (engl. <i>C-terminal fragment <math>\beta</math></i> )    |
| APP/PS1          | transgenični mišji model AB s kimernim mišjim i ljudskim genom <i>APP</i> te mutantnim ljudskim genom <i>PSEN1</i>  |
| AT8              | biljeg fosforilacije proteina tau na mjestu pSer202/Thr205  |
| B-KO             | miševi <i>knock-out BACE1</i>   |
| BACE1            | $\beta$ -sekretaza (engl. <i><math>\beta</math>-site APP cleaving enzyme 1</i> )  |
| CA1              | regija hipokampusa <i>cornu Ammonis 1</i>   |
| CA3              | regija hipokampusa <i>cornu Ammonis 3</i>   |
| CD68             | biljeg fagocitno aktivnih mikroglija (engl. <i>cluster of differentiation 68</i> )  |
| CHO              | linija stanica ovarija kineskog hrčka (engl. <i>chinese hamster ovary cells</i> )   |
| CP13             | biljeg fosforilacije proteina tau na mjestu pSer202   |
| CTD              | C-terminalna luminalna domena proteina NPC1   |
| DAM              | fagocitno aktivne mikroglije (engl. <i>disease associated microglia</i> )   |
| EEA1             | biljeg ranih endosoma (engl. <i>early endosome antigen 1</i> )  |
| ER               | endoplazmatski retikulum  |
| FAD              | nasljedni oblik Alzheimerove bolesti (engl. <i>familial Alzheimer's disease</i> )   |
| flAPP            | cjeloviti, nepocijepani protein APP (engl. <i>full-length</i> )   |
| flSEZ6(L)        | cjeloviti, nepocijepani protein SEZ6 ili SEZ6L (engl. <i>full-length</i> )  |
| GA               | Golgijev aparat   |

|   |   |
|---|---|
| GFAP  | biljeg aktivnih astrocita (engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i> )   |
| HP $\beta$ CD                                   | 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin  |
| IBA1  | strukturni biljeg mikroglia (engl. <i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i> )  |
| iPSC  | inducirane pluripotentne matične stanice (engl. <i>induced pluripotent stem cells</i> )   |
| IRB   | Institut Ruđer Bošković   |
| LAMP1   | biljeg lizosoma (engl. <i>lysosomal associated membrane protein 1</i> )   |
| linija <i>BACE1</i>                             | miševi soja B6.129- <i>Bace1</i> <sup>tm1Pcw/J</sup>  |
| linija <i>NPC1</i> -I1061T                      | miševi soja B6.129- <i>Npc1</i> <sup>tm1Dso/J</sup> koji sadrže mutantni protein NPC1-I1061T ili stanice/stanične linije koje sadrže mutantni protein NPC1-I1061T |
| LSDs  | poremećaji nakupljanja lizosoma (engl. <i>lysosomal storage disorders</i> )   |
| LTP   | dugotrajna potencijacija (engl. <i>long-term potentiation</i> )   |
| N-HET B-HET                                     | miševi heterozigoti za gen <i>NPC1</i> -I1061T i heterozigoti za gen <i>BACE1</i>   |
| N-HET B-KO                                      | miševi heterozigoti za gen <i>NPC1</i> -I1061T i <i>knock-out BACE1</i>   |
| N-HET B-WT                                      | miševi heterozigoti za gen <i>NPC1</i> -I1061T i divlji tip za gen <i>BACE1</i>   |
| N-KI  | miševi <i>knock-in NPC1</i> -I1061T   |
| N-KI B-HET                                      | miševi <i>knock-in NPC1</i> -I1061T i heterozigoti za gen <i>BACE1</i>  |
| N-KI B-KO                                       | miševi <i>knock-in NPC1</i> -I1061T i <i>knock-out BACE1</i>  |
| N-KI B-WT                                       | miševi <i>knock-in NPC1</i> -I1061T i divlji tip za gen <i>BACE1</i>  |
| N-WT  | miševi divljeg tipa za gen <i>NPC1</i>  |
| N-WT B-HET                                      | miševi divljeg tipa za gen <i>NPC1</i> i heterozigoti za gen <i>BACE1</i>   |
| N-WT B-KO                                       | miševi divljeg tipa za gen <i>NPC1</i> i <i>knock-out BACE1</i>   |
| N-WT B-WT                                       | miševi divljeg tipa za gene <i>NPC1</i> i <i>BACE1</i> , kontrolne jedinice   |
| NEUN  | biljeg jezgara zrelih neurona (engl. <i>neuronal nuclear antigen</i> )  |
| NFTs  | neurofibrilarni snopići hiperfosforiliranog proteina tau (engl. <i>neurofibrillary tangles</i> )  |
| NPC   | bolest Niemann-Pick tipa C  |
| <i>NPC1</i> <sup>-/-</sup> ( <i>NPC1</i> -null) | miševi soja BALB/cNctr- <i>Npc1</i> <sup>m1N/J</sup> koji ne sadrže protein NPC1 ili stanice/stanične linije koje ne sadrže protein NPC1                          |
| <i>NPC1</i> -I1061T                             | mutantni protein NPC1 kodiran genom <i>NPC1</i> -I1061T   |



|                |   |
|----------------|---|
| NPC1-I1061T    | gen <i>NPC1</i> koji sadrži mutaciju I1061T   |
| NTD            | N-terminalna domena proteina NPC1   |
| PBS            | fosfatni pufer (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> )  |
| PCR            | lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )  |
| PHF-1          | biljeg fosforilacije proteina tau na mjestu pSer396/404   |
| PLŽ            | Pogon laboratorijskih životinja   |
| pTAU           | fosforilirani protein tau   |
| RAB5           | biljeg ranih endosoma (engl. <i>RAS-related protein 5A</i> )  |
| RAB7           | biljeg kasnih endosoma (engl. <i>RAS-related protein 7A</i> )   |
| RZ3            | biljeg fosforilacije proteina tau na mjestu pThr231   |
| sAPPtotal      | ukupni topivi N-terminalni odsječci nastali cijepanjem proteina APP   |
| sAPP $\alpha$  | topivi N-terminalni odsječak $\alpha$ nastao cijepanjem proteina APP $\alpha$ -sekretazom (engl. <i>soluble APP<math>\alpha</math></i> )  |
| sAPP $\beta$   | topivi N-terminalni odsječak $\beta$ nastao cijepanjem proteina APP $\beta$ -sekretazom, tj. enzimom BACE1 (engl. <i>soluble APP<math>\beta</math></i> )                                  |
| SEZ6           | protein Seizure 6   |
| SEZ6L          | protein Seizure 6-like  |
| SLD            | srednja luminalna domena proteina NPC1 (engl. <i>middle luminal domain</i> )  |
| SSD            | sterolna domena proteina NPC1 (engl. <i>sterol sensing domain</i> )   |
| sSEZ6(L)       | topivi N-terminalni odsječci nastali cijepanjem proteina SEZ6 ili SEZ6L   |
| TBS-T          | tris-pufer s dodatkom deterdženta Triton X-100 ili Tween-20 (engl. <i>tris-buffered saline</i> )  |
| TOTAL pTAU     | ukupni fosforilirani protein tau  |
| TOTAL TAU      | ukupni protein tau  |
| VPS35          | retromerni protein (engl. <i>vacuolar protein sorting-associated protein 35</i> )   |
| WB             | Western blot  |
| 5 $\times$ FAD | transgenični mišji model AB s prekomjerno eksprimiranim ljudskim mutantnim genima <i>APP-K670N/M671L</i> , <i>APP-I716V</i> , <i>APP-V717I</i> te <i>PSEN1-M146L</i> i <i>PSEN1-L286V</i> |

## SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 1  |
| 1.1. Bolest Niemann-Pick tipa C .....  | 1  |
| 1.2. Klinička slika bolesti Niemann-Pick tipa C.....   | 3  |
| 1.3. Neuropatološke značajke bolesti Niemann-Pick tipa C.....  | 4  |
| 1.3.1. Nakupljanje kolesterola i poremećaj funkcije endolizosomalnog puta.....   | 4  |
| 1.3.2. Neurodegeneracija.....  | 5  |
| 1.3.3. Neuroinflamacija.....   | 6  |
| 1.3.4. Hiperfosforilacija proteina tau .....   | 9  |
| 1.4. Mutacija NPC1-I1061T .....  | 10 |
| 1.5. Alzheimerova bolest .....   | 11 |
| 1.6. Bolest Niemann-Pick tipa C i Alzheimerova bolest – sličnosti i razlike .....  | 12 |
| 1.7. Enzim BACE1 .....   | 13 |
| 1.8. Amiloidogeni put cijepanja proteina APP.....  | 14 |
| 1.9. Supstrati enzima BACE1 .....  | 16 |
| 1.10. Mišji modeli BACE1 .....   | 18 |
| 1.11. Uloga enzima BACE1.....  | 19 |
| 1.12. Dosadašnja istraživanja u Laboratoriju za istraživanje neurodegenerativnih bolesti: Uloga enzima BACE1 u patogenezi bolesti Niemann-Pick tipa C..... | 20 |
| 2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....  | 21 |
| 3. MATERIJALI I METODE .....   | 22 |
| 3.1. Mišji modeli i uzgoj.....   | 22 |
| 3.2. Uspostava miješane linije .....   | 22 |
| 3.3. Genotipizacija miševa.....  | 23 |
| 3.4. Prikupljanje tkiva mozga .....  | 25 |
| 3.5. Priprema kriorezova mozgova.....  | 25 |
| 3.6. Analiza raspodjele biljega neuropatoloških značajki bolesti Niemann-Pick tipa C i supstrata enzima BACE1 .....  | 26 |
| 3.7. Priprema homogenata mozgova.....  | 29 |
| 3.8. Analiza razine biljega neuropatoloških značajki bolesti Niemann-Pick tipa C i supstrata enzima BACE1 .....  | 30 |
| 3.9. Kvantifikacija i statistička analiza rezultata .....  | 32 |

|   |     |
|---|-----|
| 4. REZULTATI .....  | 33  |
| 4.1. Validacija mišjeg modela <i>knock-in NPC1-I1061T</i> .....   | 34  |
| 4.1.1. Genotipizacija i analiza razine proteina NPC1 i BACE1 u mozgu miševa linije <i>NPC1-I1061T</i> .....   | 34  |
| 4.1.2. Analiza intenziteta i raspodjele enzima BACE1 u mozgu miševa linije <i>NPC1-I1061T</i> .....   | 35  |
| 4.1.3. Analiza fenotipa miševa linije <i>NPC1-I1061T</i> .....  | 36  |
| 4.1.4. Neurodegeneracija u malom mozgu miševa linije <i>NPC1-I1061T</i> .....   | 37  |
| 4.1.5. Nakupljanje slobodnog kolesterola u mozgu miševa linije <i>NPC1-I1061T</i> ...   | 38  |
| 4.1.6. Poremećaj endolizosomalnog puta u mozgu miševa linije <i>NPC1-I1061T</i> ...   | 39  |
| 4.1.7. Analiza neuroinflamacije u mozgu miševa linije <i>NPC1-I1061T</i> .....  | 43  |
| 4.1.8. Analiza hiperfosforilacije proteina tau u mozgu miševa linije <i>NPC1-I1061T</i> .....   | 47  |
| 4.1.9. Analiza supstrata enzima BACE1 u mozgu miševa linije <i>NPC1-I1061T</i> ....   | 48  |
| 4.2. Karakterizacija mišjeg modela <i>knock-in NPC1-I1061T</i> s deletiranim genom <i>BACE1</i> .....   | 56  |
| 4.2.1. Genotipizacija i razina proteina NPC1 i BACE1 u mozgu miševa <i>knock-in NPC1-I1061T</i> s deletiranim genom <i>BACE1</i> .....                      | 57  |
| 4.2.2. Enzim BACE1 u mozgu miševa <i>knock-in NPC1-I1061T</i> kojima je deletiran jedan ili oba alela gena <i>BACE1</i> .....                               | 61  |
| 4.2.3. Analiza fenotipa miševa <i>knock-in NPC1-I1061T</i> kojima je deletiran jedan ili oba alela gena <i>BACE1</i> .....                                  | 65  |
| 4.2.4. Analiza neurodegeneracije u mozgu miševa <i>knock-in NPC1-I1061T</i> kojima je deletiran jedan ili oba alela gena <i>BACE1</i> .....                 | 66  |
| 4.2.5. Poremećaj endolizosomalnog puta u mozgu miševa <i>knock-in NPC1-I1061T</i> kojima je deletiran jedan ili oba alela gena <i>BACE1</i> .....           | 81  |
| 4.2.6. Analiza neuroinflamacije u mozgu miševa <i>knock-in NPC1-I1061T</i> kojima je deletiran jedan ili oba alela gena <i>BACE1</i> .....                  | 99  |
| 4.2.7. Analiza hiperfosforilacije proteina tau u mozgu miševa <i>knock-in NPC1-I1061T</i> kojima je deletiran jedan ili oba alela gena <i>BACE1</i> .....   | 122 |
| 4.2.8. Analiza proteolize supstrata enzima BACE1 u mozgu miševa <i>knock-in NPC1-I1061T</i> kojima je deletiran jedan ili oba alela gena <i>BACE1</i> ..... | 131 |
| 5. RASPRAVA .....   | 163 |
| 5.1. Odabir mišjeg modela <i>knock-in NPC1-I1061T</i> .....   | 163 |
| 5.2. Validacija mišjeg modela <i>knock-in NPC1-I1061T</i> .....   | 164 |

|  |     |
|--|-----|
| 5.3. Karakterizacija novoga mišjeg modela <i>knock-in NPC1-I1061T</i> s deletiranim genom <i>BACE1</i> .....     | 172 |
| 5.3.1. Karakterizacija miševa <i>knock-in NPC1-I1061T</i> s deletirana oba alela gena <i>BACE1</i> .....         | 172 |
| 5.3.2. Karakterizacija miševa <i>knock-in NPC1-I1061T</i> s deletiranim jednim alelom gena <i>BACE1</i> .....    | 175 |
| 5.4. Potencijalna daljnja istraživanja uloge enzima <i>BACE1</i> u funkciji mozga u drugim mišjim modelima ..... | 181 |
| 5.4.1. Heterozigoti za gen <i>NPC1</i> .....   | 181 |
| 5.4.2. Mišji model kondicionalni <i>knock-out BACE1</i> .....  | 182 |
| 5.5. Završni komentar .....  | 184 |
| 6. ZAKLJUČCI .....   | 185 |
| 7. LITERATURA .....  | 187 |
| 8. POPIS ILUSTRACIJA .....   | 207 |
| 8.1. Popis tablica .....   | 207 |
| 8.2. Popis slika .....   | 207 |
| 9. ŽIVOTOPIS .....   | 209 |
| 10. POPIS PUBLIKACIJA .....  | 210 |
| 11. PRIVITCI .....   | 211 |

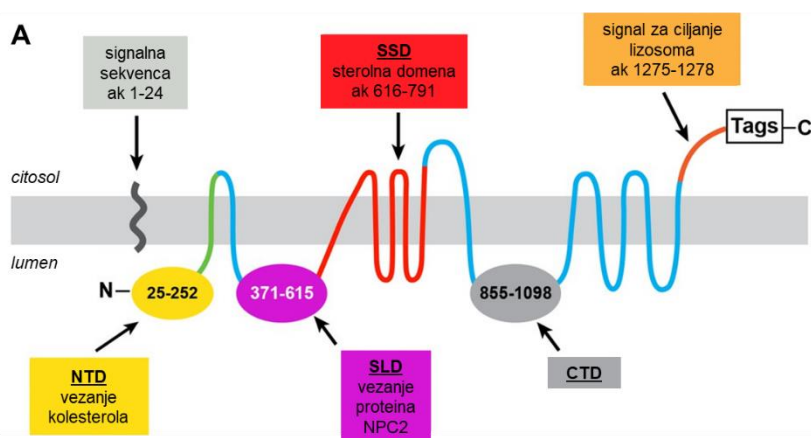
# 1. UVOD

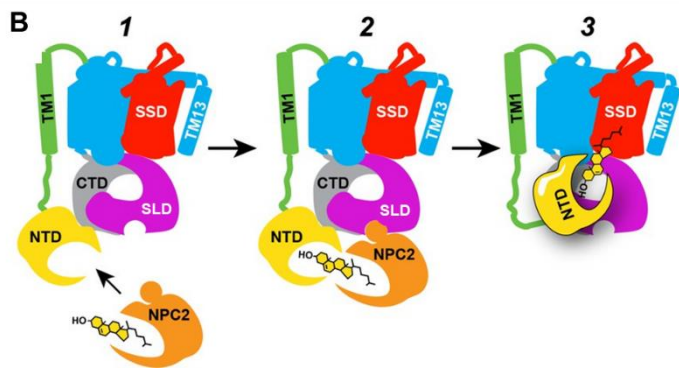
## 1.1. Bolest Niemann-Pick tipa C

Bolest Niemann-Pick tipa C (NPC) je rijetka neurodegenerativna bolest koja se nasljeđuje autosomno recesivno, a pogađa prvenstveno novorođenčad, djecu i mlade. Učestalost bolesti je oko 1:120000 živorođene djece, a novije studije ukazuju da bi učestalost zbog neprepoznavanja bolesti uslijed heterogenog fenotipa mogla biti i znatno veća [1, 2]. U Hrvatskoj su zabilježena dva slučaja unutar iste obitelji [3].

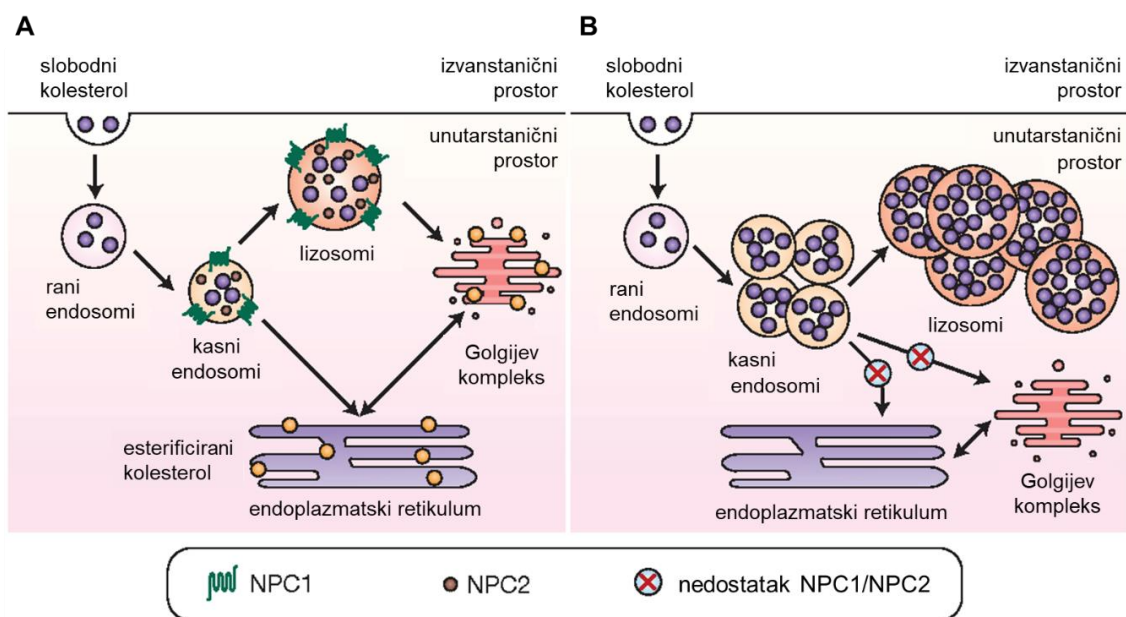
U 95% slučajeva, bolest NPC uzrokovana je mutacijom u genu *NPC1*, dok je u preostalih 5% slučajeva uzrok bolesti mutacija u genu *NPC2* [4]. Gen *NPC1* smješten je na kromosomu 18 i eksprimira se u svim tkivima. Protein NPC1 je membranski protein od 13 transmembranskih i tri velike luminalne domene (**Slika 1 A**), a smješten je na membrani kasnih endosoma i lizosoma (**Slika 2 A**). N-terminalna luminalna domena proteina NPC1 sadrži vezno mjesto za slobodni, neesterificirani kolesterol, a srednja luminalna domena veže protein NPC2 (**Slika 1 A**). Gen *NPC2* smješten je na kromosomu 14 i kodira za mali globularni topivi protein ekspimiran u većini tkiva, a smješten u lumenu kasnih endosoma i lizosoma (**Slika 2 A**) [5].

Pretpostavljeni mehanizam kooperativnog djelovanja ovih proteina ukazuje da protein NPC2 pospješuje vezanje slobodnog, neesterificiranog kolesterola iz lumena na N-terminalnu domenu proteina NPC1 [5]. Vezanje kolesterola za protein NPC1 moguće je i bez proteina NPC2, ali je znatno sporije [6]. Protein NPC2 veže se na srednju luminalnu domenu proteina NPC1 i predaje kolesterol na transmembransku domenu proteina NPC1 (**Slika 1 B**) [5]. Kolesterol se zatim prenosi izvan endolizosomalnih vezikula, na plazma membranu, u Golgijev aparat (GA) i/ili na membranu endoplazmatskog retikuluma (ER). Točan mehanizam translokacije kolesterola preko membrane kasnih endosoma i lizosoma u druge stanične odjeljke još se istražuje [7–10].





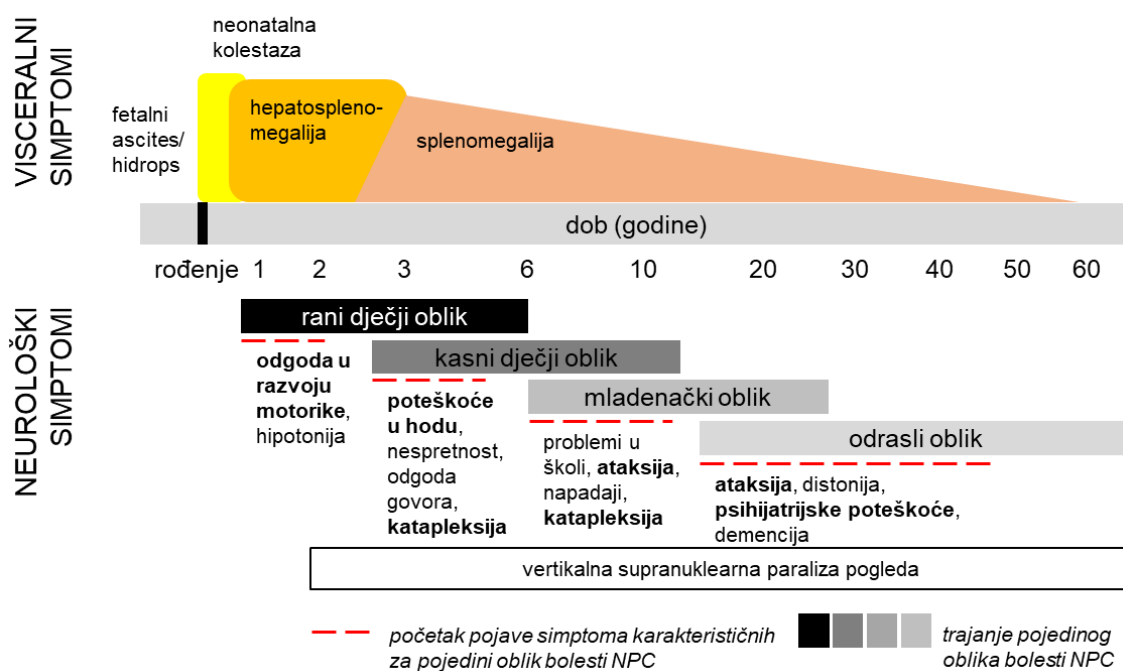
**Slika 1. Struktura proteina NPC1 i kooperativno djelovanje proteina NPC1 i NPC2 pri prijenosu kolesterola iz kasnih endosoma i lizosoma.** A Shematski prikaz strukture transmembranskog proteina NPC1. N-terminalna luminalna domena (NTD) sadrži vezno mjesto za slobodni kolesterol, a središnja luminalna domena (SLD) sadrži vezno mjesto za protein NPC2. Mutacija I1061T događa se u C-terminalnoj luminalnoj domeni (CTD). B Shematski prikaz interakcije proteina NPC1 i NPC2 u prijenosu kolesterola: 1) protein NPC2 veže kolesterol u lumenu kasnih endosoma i lizosoma, 2) protein NPC2 se veže na domenu SLD proteina NPC1 i predaje kolesterol domeni NTD proteina NPC1, 3) pretpostavljeni mehanizam prijenosa kolesterola iz domene NTD u sterolnu domenu proteina NPC1 (eng. *sterol sensing domain*, SSD). Preuzeto i prilagođeno prema izvoru [11].



**Slika 2. Prijenos kolesterola iz kasnih endosoma i lizosoma u fiziološki normalnim uvjetima te u bolesti Niemann-Pick tipa C.** A U fiziološki normalnim uvjetima, protein NPC1 smješten je na membrani, a protein NPC2 u lumenu kasnih endosoma i lizosoma, gdje vrše prijenos slobodnog kolesterola iz ovih vezikula u druge stanične odjeljke. B Uslijed mutacija u genu za protein NPC1 ili NPC2, odnosno uslijed nedostatka proteina NPC1 ili NPC2, onemogućen je prijenos slobodnog kolesterola iz kasnih endosoma i lizosoma, kolesterol se nakuplja u ovim organelima te uzrokuje poremećaj njihove funkcije. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru [12].

## 1.2. Klinička slika bolesti Niemann-Pick tipa C

Klinička slika bolesti NPC vrlo je varijabilna [4, 13], a raspon simptoma i brzina progresije ovise o dobi u kojoj bolest započinje (**Slika 3**). Bolest NPC karakteriziraju neurološki i psihijatrijski, te visceralni simptomi (hepatosplenomegalija i plućna patologija) sa smrtnim ishodom [2, 4, 14]. Međutim, neurološki i visceralni simptomi ne ispoljavaju se istovremeno. Visceralna patologija je prisutna u oko 85% pacijenata te uvijek prethodi neurološkim simptomima. Najčešći neurološki simptomi bolesti NPC su ataksija, dizartrija, disfagija, progresivna demencija i vertikalna supranuklearna paraliza pogleda, a u starijih pacijenata i katapleksija, napadaji te psihijatrijske smetnje. Smrt u najtežim perinatalnim oblicima bolesti nastupa unutar prvih šest mjeseci života, dok je u najčešćim dječjim oblicima preživljenje oko pet do 10 godina. Životni vijek pacijenata s mladenačkim oblikom bolesti NPC je i do 30 godina. Postoje i odrasli oblici bolesti NPC koji se javljaju u starijoj životnoj dobi.



**Slika 3. Klinička slika različitih oblika bolesti Niemann-Pick tipa C.** Shematski prikaz neuroloških i visceralnih simptoma bolesti NPC te dobi početka i trajanja različitih oblika bolesti (rani i kasni dječji oblik, mladenački oblik i odrasli oblik). Preuzeto i prilagođeno prema izvoru [15].

Dijagnoza bolesti NPC otežana je zbog niske učestalosti, velike varijabilnosti te preklapanja kliničkih simptoma, kao i polimorfije gena *NPC1*. Bolest NPC moguće je utvrditi primarno genetičkim testovima i biopsijom fibroblasta, odnosno bojanjem nakupljenog slobodnog kolesterola filipinom (antibiotikom iz bakterije *Streptomyces filipinensis* koji veže neesterificirani kolesterol). Ipak, dijagnoza bolesti NPC podrazumijeva širok raspon neuroloških i biokemijskih testova, a istražuju se i novi klinički biomarkeri koji bi omogućili rano i točno otkrivanje bolesti, praćenje progresije bolesti te praćenje učinkovitosti terapije [1, 4, 13, 16–18].

Bolest NPC zasad se tretira samo simptomatski. Ispitano je nekoliko testnih terapija, poput transplantacije koštane srži i jetre u svrhu unošenja funkcionalnih proteina NPC1 i NPC2, ali ove terapije nisu bile učinkovite za neurološki aspekt bolesti. U nekim zemljama EU odobrena je terapija miglustatom (inače terapeutik za Gaucherovu bolest). Miglustat je iminošećer koji može prijeći krvno-moždanu barijeru te selektivno, reverzibilno inhibira enzim glikozilceramid sintazu, odnosno sintezu glikosfingolipida, i na taj način smanjuje nakupljanje lipida. U pacijenata oboljelih od bolesti NPC, miglustat stabilizira ili odgađa progresiju neuroloških simptoma, međutim, uzrokuje gastrointestinalne nuspojave koje značajno utječu na kvalitetu života [4, 13, 19–21]. Novija istraživanja usmjerena su prema ispravljanju autofagije i procesa prijenosa kolesterola [12]. U kliničkim istraživanjima je spoj 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin (HP $\beta$ CD), ciklički oligosaharid s hidrofobnom šupljinom koji se koristi kao nosač lijekova. U pacijenata, odnosno modela bolesti NPC, HP $\beta$ CD može prenositi neesterificirani kolesterol iz kasnih endosoma i lizosoma u citosol (neovisno o proteinima NPC1 i NPC2) i na taj način smanjiti nakupljanje kolesterola. Međutim, zbog veličine ovog spoja, kroz krvno-moždanu barijeru prolazi svega oko 0,2% intravenski unesenog HP $\beta$ CD. Primjena HP $\beta$ CD pokazala se učinkovita u životinjskim testiranjima, stoga su trenutna klinička istraživanja usmjerena na ispitivanje bolje propustljivosti HP $\beta$ CD kroz krvno-moždanu barijeru i etički prihvatljive metode primjene (intravenski, u odnosu na dosad korištenu intratekalnu primjenu) [1, 2, 22, 23].

### **1.3. Neuropatološke značajke bolesti Niemann-Pick tipa C**

#### **1.3.1. Nakupljanje kolesterola i poremećaj funkcije endolizosomalnog puta**

Kolesterol se u mozgu sintetizira *in situ*, prvenstveno u astrocitima, a u manjoj mjeri i u neuronima. Sistemski kolesterol ne može prijeći krvno-moždanu barijeru, što mozak čini osjetljivim na promjene u metabolizmu kolesterola i drugih lipida [24]. Normalna funkcija endolizosomalnog puta i autofagije neophodna je za održavanje proteinske homeostaze u stanici te prijenos signala u somu neurona [12, 25, 26]. Zbog specifične morfologije, odnosno polarnosti, neuroni su posebno osjetljivi na poremećaje u ovim putovima. Nakupljanje vezikula i proteinskih agregata uslijed poremećaja funkcije



endolizosomalnog puta i autofagije u podlozi je mnogih neurodegenerativnih bolesti, poput Alzheimerove bolesti (AB) i tauopatija, ali i bolesti NPC [25].

U bolesti NPC, zbog nedostatka, promijenjene funkcije i/ili neispravnog smještaja proteina NPC1 (ili NPC2), u kasnim endosomima i lizosomima dolazi do nakupljanja slobodnog kolesterola i glikosfingolipida (**Slika 2 B**). Kasni endosomi i lizosomi pritom više ne vrše svoju funkciju, njihov prijenos unutar neurona je promijenjen i usporen, a vezikule su povećane (zbog nakupljanja proteina i poremećaja njihove razgradnje), što za posljedicu na razini organizma ima niz ranije opisanih neuroloških i visceralnih promjena [27, 28].

Bolest NPC stoga se ubraja i u poremećaje nakupljanja lizosoma (engl. *lysosomal storage disorders*, LSDs), skupinu monogenetskih, autosomno recesivnih poremećaja uzrokovanih promjenama u lizosomalnim enzimima i proteinskim komponentama (npr. hidrolazama, integralnim membranskim proteinima ili prijenosnicima). LSDs su vrlo heterogeni poremećaji jer jedan genotip može rezultirati nizom preklapajućih fenotipova [1].

### 1.3.2. Neurodegeneracija

U bolesti NPC, nakupljanje lipida u perifernim tkivima (jetri i slezeni) dovodi do aktivacije makrofaga, proizvodnje proupalnih citokina i stanične smrti. Međutim, točan mehanizam neurodegeneracije još nije poznat [1, 4, 27].

U odnosu na miševе divljeg tipa, u malom mozgu miševa kojima nedostaje protein NPC1 (BALB/c *NPC1*<sup>-/-</sup>) zabilježena je promjena u ekspresiji gena koji sudjeluju u procesima poput biosinteze i prijenosa lipida, imunološkog odgovora, stanične adhezije i pokretljivosti [29]. Promijenjeni metabolizam kolesterola za posljedicu ima odumiranje neurona (ali ne i ne-neuronalnih stanica, npr. astrocita) [30]: nakupljanje kolesterola u endolizosomalnim vezikulama dovodi do povećanja some i procesa neurona u brojnim regijama mozga (uključujući koru velikog mozga, talamus, mali mozak, moždano deblo), formiranja meganeurita, zadebljanja i distrofije aksona te prekidanja dendrita [1, 12, 31]. Purkinjeovi neuroni u malom mozgu posebno su osjetljivi na gubitak proteina NPC1. Jedno od objašnjenja jest da Purkinjeovi neuroni imaju intrinzična anatomska i biokemijska svojstva zbog kojih su skloniji nakupljanju proteina i vezikula [32–35]. Ovo nakupljanje zatim uzrokuje aktivaciju autofagije i staničnu smrt kao odgovor na nedostatak kolesterola u odgovarajućim staničnim odjeljcima [35]. Također, razina proteina NPC1 povišena je u malom mozgu u odnosu na preostale regije mozga neovisno o genotipu. Još jedan razlog osjetljivosti na nedostatak kolesterola možda je činjenica da se razvoj i sazrijevanje malog mozga (proliferacija, migracija i diferencijacija stanica) događa i postnatalno (u ljudi i do 20. godine) [36, 37]. Ovi procesi dodatno su otežani zbog poremećaja funkcije autofagije [12, 24, 38, 39] i funkcije mitohondrija u patogenezi bolesti NPC [40–43].

Ekspresija proteina NPC1 u Purkinjeovim neuronima miševa BALB/c *NPC1<sup>-/-</sup>* smanjuje nakupljanje kolesterola, sprječava neurodegeneraciju, smanjuje aktivaciju glija stanica te popravlja ukupnu fenotipsku sliku životinja [12, 44]. Ovime se produljuje životni vijek Purkinjeovih neurona, ali je progresija simptoma bolesti u ovom modelu dugoročno samo usporena: smrt u ovih miševa nastupa zbog razvoja patologije i u drugim regijama mozga [44, 45]. Ekspresija divljeg tipa proteina NPC1 u svim neuronima (tj. ne samo u Purkinjeovim neuronima) mišjeg modela bolesti NPC ima povoljan učinak na neurodegeneraciju i rani mortalitet, čime je potvrđeno da su neuropatološke značajke prevaga bolesti NPC u odnosu na visceralne promjene [30, 44–46].

U mozgu mišjih modela, ali i pacijenata oboljelih od bolesti NPC, zbog povišene razine slobodnog kolesterola u somi neurona, zabilježena je i smanjena mijelinacija perifernih dendrita i aksona te demijelinacija [47]. Uslijed gubitka proteina NPC1, smanjeno je sazrijevanje oligodendrocita, što negativno regulira mijelinaciju, posebno u kori velikog mozga i regiji *corpus callosum* [48]. Hipomijelinacija u modelima bolesti NPC povezuje se i s promijenjenim prijenosom kolesterola između astrocita i oligodendrocita [49], kao i s povećanim nakupljanjem mijelina u aktivnim mikroglijama [50]. Patološke promjene aksona (sferoidi i presinaptički agregati) zabilježene su i u leđnoj moždini miševa BALB/c *NPC1<sup>-/-</sup>*, gdje su prisutne već u dobi od pet tjedana. Ove značajke također su povezane s ranom povećanom aktivacijom astrocita i mikroglija (koja nastupa već u dobi nakon jednog tjedna), što dugoročno doprinosi i hiperfosforilaciji proteina tau [51].

### 1.3.3. Neuroinflamacija

Iako se neurodegeneracija definira kao glavna značajka bolesti NPC, neuroinflamacija, odnosno aktivacija astrocita i mikroglija, predstavlja važnu karakteristiku bolesti NPC jer se javlja rano, vrlo progresivno, te zahvaća cijeli mozak. Neuroinflamacija (koja je patološka značajka brojnih neurodegenerativnih bolesti) smatra se odgovorom na neurodegeneraciju, tj. sekundarnim učinkom neurodegeneracije. Međutim, novija istraživanja ukazuju da bi neuroinflamacija u bolesti NPC, kao i u drugim neurodegenerativnim bolestima, mogla biti posljedica zasebnih patoloških procesa u glija stanicama, koji se odvijaju paralelno uz neurodegeneraciju ili joj doprinose [1, 37, 52].

Poteškoće u koordinaciji i hodu te ataksija u kasnom dječjem obliku bolesti NPC javljaju se prije neuroloških simptoma, stoga se smatra da ove promjene u malom mozgu prethode samoj neurodegeneraciji, odnosno da bi mogle biti povezane s ranom neuroinflamacijom [37]. U miševa BALB/c *NPC1<sup>-/-</sup>* zabilježena je razlika u razini aktivacije astrocita i mikroglija ovisno o regiji mozga i fazi patologije bolesti (najranija aktivacija astrocita i mikroglija izražena je u talamusu). Aktivaciju glija stanica prati i nakupljanje presinaptičkih biljega u zadebljanjima aksona, što ukazuje na prisutnost patoloških procesa ne samo u somi, već i u završecima neurona [53]. Novo istraživanje terapijskog mehanizma djelovanja ciklodekstrina, tj. uklanjanja kolesterola iz neurona retine miševa BALB/c *NPC1<sup>-/-</sup>* ukazuje na interakciju neurona i glija stanica u uklanjanju kolesterola

[54]. Primjenom ciklodekstrina, neuroni retine miševa *NPCI*<sup>-/-</sup> oslobađaju lamelarne inkluzije bogate lipidima u izvanstanični prostor, gdje ih procesiraju glija stanice. Naime, iako je fenotip glija stanica promijenjen uslijed nedostatka proteina NPC1, primjenom ciklodekstrina potaknuta je njihova fagocitna aktivnost te one uklanjaju suvišak lipida.

### 1.3.3.1. Astrociti

Tijekom razvoja, ali i u zrelom mozgu, astrociti imaju ulogu u regulaciji formiranja sinapsi (recikliranjem neurotransmitera) i održavanju homeostaze neurona (prenošenjem lipida i šećera iz krvi do neurona) [55]. Astrociti su i glavno mjesto sinteze kolesterola u mozgu [48].

Proces starenja može promijeniti ekspresiju upalnih biljega u astrocitima, što povećava aktivnost astrocita u uklanjanju sinapsi. Ovo svojstvo razlikuje se ovisno o regiji mozga, a posebno je izraženo u malom mozgu. Također, pretpostavlja se da ovakva povećana aktivacija astrocita pospješuje razvoj neurodegenerativnih bolesti [55]. U slučaju bolesti NPC, *in vitro* ispitivanja primarnih astrocita *NPCI*<sup>-/-</sup> dobivenih iz mozгова miševa su otežana jer često ne rekapituliraju značajke astrocita *in vivo* [45, 48].

Protein NPC1 u astrocitima je lokaliziran unutar lizosoma uz plazma membranu presinaptičkih procesa astrocita koji su smješteni oko dendrita i aksona neurona. Upravo su ti završeci neurona prva mjesta degeneracije u bolesti NPC (koja počinje prije pojave neurološkog fenotipa). U mozgu i leđnoj moždini kolesterol se sintetizira *in situ*, uz niski doprinos kolesterola iz plazme. Pritom u samim aksonima neurona nema sinteze kolesterola, već su ovisni o kolesterolu iz drugih izvora, poput astrocita. Međutim, u mozgu miševa BALB/c *NPCI*<sup>-/-</sup> promijenjen je i fenotip astrocita, npr. smanjena je sekrecija nosača kolesterola apolipoproteina D. Promijenjena funkcija, odnosno nedostatak proteina NPC1 u astrocitima stoga može ometati prijenos lipida između neurona i astrocita, i tako utjecati na recikliranje receptora, prijenos sinaptičkih vezikula, plastičnost neurona i razinu mijelinacije, odnosno doprinositi ukupnoj neurodegeneraciji [48, 56–58].

U miševa BALB/c *NPCI*<sup>-/-</sup>, aktivni astrociti su u ranoj asimptomatskoj fazi (u dobi od dva tjedna) prisutni samo u talamusu, ali su do četvrtog tjedna utvrđeni u svim regijama mozga. U regijama gdje je zabilježena neurodegeneracija, aktivacija astrocita u korelaciji je i s aktivacijom citokina [59].

Za razvoj sinapsi potreban je protein NPC1 i u neuronima i u astrocitima, neovisno o stadiju razvoja mozga [30, 34, 57]. Istovremeni nedostatak proteina NPC1 u astrocitima i Purkinjeovim neuronima uzrokuje promijenjenu presinaptičku signalizaciju, ali nema učinka na razvoj dendrita ili podražljivost sinapsi. Poremećaj funkcije sinapsi u mišjem modelu BALB/c *NPCI*<sup>-/-</sup> može se ispraviti ekspresijom proteina NPC1 samo u astrocitima, pri čemu se dendriti Purkinjeovih neurona normalno formiraju i imaju očuvanu sinaptičku aktivnost [57]. Ekspresija proteina NPC1 u astrocitima mišjih modela

bolesti NPC produljuje i životni vijek miševa (trostruko u modelu BALB/c *NPC1<sup>nmf164</sup>* [60]), ispravlja značajan gubitak tjelesne mase i neplodnost [61], smanjuje nakupljanje kolesterola i stvaranje zadebljanja aksona te povisuje razinu mijelinacije. Zanimljivo, neurodegeneracija je usporena, ali odumiranje samih Purkinjeovih neurona nije spriječeno, što dodatno ističe njihova intrinzična svojstva [44, 45, 48, 60].

### 1.3.3.2. Mikroglije

Mikroglije su endogene imunološke stanice središnjeg živčanog sustava, a aktiviraju se uslijed štetnih promjena ili pojave patogena u stanicama i tkivu. Njihova uloga u mozgu je uklanjanje apoptotskih stanica i suvišnih sinapsi (engl. *synaptic pruning*) u sklopu procesa razvoja mozga te regulacije neurogeneze i plastičnosti sinapsi [37, 62–64].

Tijekom postnatalnog razvoja i diferencijacije neurona malog mozga odvija se i migracija, proliferacija i diferencijacija mikroglija. U usporedbi s drugim regijama mozga, mikroglije u malom mozgu imaju specifičnu ekspresiju gena koja ukazuje na njihovu povećanu fagocitnu aktivnost [37, 62, 63]. Okolišni čimbenici poput starenja, dijabetesa tipa II, pretilosti, kardiovaskularnih bolesti te ozljeda glave mogu doprinijeti razvoju neurodegenerativnih bolesti [65, 66]. Zanimljivo, i sama fagocitna aktivnost mikroglija može biti potaknuta okolišnim čimbenicima (npr. „zapadnjačkom“ prehranom s visokim udjelom šećera, proteina i masti) [62].

Gubitak proteina NPC1 utječe na morfologiju i fenotip mikroglija. U mišjem modelu C57BL/6 *NPC1<sup>nmf164</sup>* (točkasta mutacija *NPC1*-D1005G, fenotip sličan modelu *NPC1*-I1061T), mikroglije aktivacijskog profila DAM (od engl. *disease associated microglia*) smještene su u molekularnom sloju režnjeva malog mozga (u području dendritičkog stabla Purkinjeovih neurona) [62], imaju povećano tijelo i kraće procese [52, 59, 62], njihova migracija je smanjena, proliferacija povećana, te je spriječena diferencijacija prekursora novih mikroglija. Također, fagocitna aktivnost ovih mikroglija je povećana pa ometaju postnatalni razvoj sinapsi, što može prethoditi, ali i doprinijeti odumiranju Purkinjeovih neurona [37, 52, 62].

U miševa BALB/c *NPC1<sup>-/-</sup>*, porast aktivacije mikroglija u različitim regijama mozga (uključujući i mali mozak), osim u simptomatskoj fazi (u dobi od 7 tjedana) [63], vidljiv je već u ranoj asimptomatskoj fazi bolesti (u dobi od jednog ili dva tjedna) [50, 59, 62]. *In vitro*, mikroglije *NPC1<sup>-/-</sup>* imaju i promijenjenu razinu procesiranja mijelina koji se nakuplja u multivezikularnim tijelima unutar kasnih endosoma. Međutim, u ovim mikroglijama, funkcija lizosoma u razgradnji proteina nije promijenjena [50].

Uslijed gubitka proteina NPC1, transkriptomski i proteomski profil mikroglija miševa BALB/c *NPC1<sup>-/-</sup>* u simptomatskoj fazi bolesti može se klasificirati kao DAM, što je profil aktivacije karakterističan i za AB (imaju povišenu razinu biljega kasnih endosoma i lizosoma, poput LAMP1, LAMP2, CD68 i CD63) [50, 63]. Početna aktivacija ovih mikroglija vjerojatno ima protektivnu, imunološku ulogu u odgovoru na patološke

promjene, ali njihova kronična aktivnost rezultira neurotoksičnim učinkom (poticanjem apoptoze ili fagocitiranjem neurona koji imaju promijenjenu homeostazu, ali još ne odumiru) [62–64]. Genetička inaktivacija mikroglija u miševa BALB/c *NPC1*<sup>-/-</sup> smanjuje neurološke poremećaje i produljuje životni vijek miševa za 15%, što potvrđuje značajnu ulogu mikroglija u patogenezi bolesti NPC [52].

#### 1.3.4. Hiperfosforilacija proteina tau

Protein tau je mikrotubulima pridruženi protein, s primarnom ulogom u stabilizaciji mikrotubula, a povezuje se i s procesima anterogradnog i retrogradnog prijenosa vezikula u aksonima [67]. Uslijed hiperfosforilacije, protein tau se odvajava od mikrotubula i uzrokuje njihovu destabilizaciju, što može potaknuti stvaranje zadebljanja aksona. Ove promjene su u patološkoj podlozi tauopatija, a zabilježene su i u kroničnim oblicima bolesti NPC s kasnom pojavom (mladenački i odrasli oblik) [12, 67–69].

Hiperfosforilirani protein tau nakuplja se u filamente (engl. *paired helical filaments*, PHFs) koji zatim formiraju neurofibrilarne snopiće (engl. *neurofibrillary tangles*, NFTs). NFTs u bolesti NPC istovjetni su onima karakterističnima za AB, ali nastaju neovisno o amiloidnim plakovima [68, 70]. Nedostatak kolesterola u membrani neurona (uslijed njegova nakupljanja u kasnim endosomima i lizosomima zbog nedostatka proteina NPC1) čini membranu endocitičkih vezikula propusnom za protein tau, što omogućava izlazak proteina tau u citosol, odnosno doprinosi nakupljanju toksičnih agregata proteina tau u stanici [71–73]. Širenju proteina tau doprinosi i ometanje funkcije kasnih endosoma i retromernog kompleksa (uslijed smanjenja razine proteina RAB7, odnosno VPS35) [71]. NFTs se u pacijenata oboljelih od bolesti NPC nakupljaju najviše u hipokampusu, a manje u kori velikog mozga. Zanimljivo, formiranje NTFs nije zabilježeno u Purkinjeovim neuronima pacijenata [68, 70], vjerojatno zbog smanjene razine proteina tau u malom mozgu u odnosu na druge regije mozga [74]. Također, u mišjim modelima bolesti NPC ne dolazi do stvaranja NFTs, ali je povišena razina hiperfosforiliranog proteina tau vidljiva na endogenoj razini [27, 73].

Ispitivanjem mišjeg modela bolesti NPC kojem nedostaju i protein NPC1 i protein tau zabilježen je progresivniji sistemski fenotip (morfološke promjene u građi, smanjena masa, poremećaji u hodu) s ranijim mortalitetom (50% miševa *NPC1*-null/*TAU*-null ugiba do petog tjedna, u odnosu na jedinke *NPC1*-null koje žive 10-12 tjedana). Delecija proteina tau u staničnom modelu smanjuje autofagiju, stoga se smatra da je promjena u razini fosforilacije proteina tau povezana s poremećajem funkcije razgradnje proteina u patologiji bolesti NPC [67, 75].

Preostale neuropatološke značajke bolesti NPC opisane su u nastavku (u poglavlju 1.6.).

#### 1.4. Mutacija NPC1-I1061T

Iako je najveći dio istraživanja bolesti NPC proveden na staničnim i životinjskim modelima u kojima je protein NPC1 potpuno odsutan, u ljudi je takva situacija rijetkost. Naime, većina mutacija zabilježenih u genu *NPC1* kao produkt ipak daje protein NPC1, ali je njegova razina, smještaj ili funkcija promijenjena u odnosu na divlji tip proteina [16].

Dosad je zabilježeno više od 500 različitih mutacija u genu *NPC1* [1, 13, 76, 77]. Najteži neurološki oblici bolesti uglavnom su povezani s *nonsense* ili *frameshift* mutacijama, kao i *missense* mutacijama u kolesterol-vezujućoj domeni proteina NPC1. Trećina zabilježenih mutacija događa se u C-terminalnoj luminalnoj domeni bogatoj cisteinom, a uzrokuju blaži, ali vrlo varijabilan fenotip [1, 4]. Mutacije u genu *NPC2* vezane su prvenstveno za teške kliničke oblike bolesti NPC [4].

Najčešća mutacija u genu *NPC1* zabilježena u ljudi (oko 20% alela) je supstitucija *NPC1*-I1061T. Ova mutacija nastaje uslijed tranzicije T<sub>3182</sub>→C u eksonu 21, i to u C-terminalnoj luminalnoj domeni proteina NPC1 bogatoj cisteinom (CTD, **Slika 1 A**) [28, 78]. Pacijenti homozigoti za mutaciju *NPC1*-I1061T imaju blagi neurološki fenotip s mladenačkom pojavom bolesti, a fenotip je klinički i biokemijski vrlo homogen. Ova mutacija nije pronađena u pacijenata s ranim dječjim oblikom bolesti NPC. Podrijetlo nositelja je pretežno zapadno europsko [78].

Protein NPC1-I1061T se sintetizira, ali se pogrešno smata, zbog čega je nestabilan i razgrađuje se u ER [28, 79, 80]. Razina proteina NPC1-I1061T snižena je u odnosu na divlji tip te uzrokuje nakupljanje neesterificiranog kolesterola u promijenjenim kasnim endosomima i lizosomima fibroblasta. Pojačanom ekspresijom gena *NPC1*-I1061T u stanicama *NPC1*-null dolazi do ispravnog smještanja proteina NPC1-I1061T u kasnim endosomima gdje uspješno prenosi kolesterol. Smatra se da dio proteina NPC1-I1061T ipak može proći kontrolni mehanizam UPR (od engl. *unfolded protein response*) u ER (potencijalno zbog zasićenja ER), te da zbog ispravnog smještanja malog udjela proteina NPC1-I1061T dolazi do ublažavanja fenotipa. Protein NPC1-I1061T stoga se definira kao djelomično funkcionalan [28].

Jedan od mogućih tretmana ispitanih u staničnom modelu *NPC1*-I1061T su mali kemijski šaperoni koji pospješuju ispravno smatanje proteina NPC1-I1061T [28, 81, 82], te inhibitori histon deacetilaza koji doprinose sintezi ovog proteina, što također rezultira povećanim prijenosom kolesterola iz kasnih endosoma i lizosoma [83, 84]. S obzirom da najčešće korišteni mišji modeli bolesti NPC ne sadrže protein NPC1 (BALB/c *NPC1*<sup>-/-</sup>) ili on nije funkcionalan (*knock-in Npc1<sup>pp/pp</sup>*), Praggastis i suradnici [85] kreirali su novi mišji model bolesti NPC, *knock-in NPC1*-I1061T (na genetičkoj podlozi C57BL/6) u svrhu ispitivanja proteostatskih terapija.

Ovaj mišji model rekapitulira sve dosad opisane značajke bolesti NPC, kako u drugim staničnim i mišjih modela [12], tako i u ljudi. Mutacija I1061T unesena je u mišji lokus *NPC1*, a uzrokuje destabilizaciju proteina NPC1 koji zatim ne dopijeva u kasne

endosome i lizosome. Fenotip obuhvaća progresivni gubitak Purkinjeovih neurona i motoričke koordinacije, promijenjen rast, tremor u mirovanju nakon 8. tjedna, gubitak tjelesne mase nakon 10. tjedna i skraćeni životni vijek u odnosu na jedinke divljeg tipa. Također, ovi miševi pokazuju i aktivaciju astrocita, mikroglia i citokina, te nakupljanje kolesterola i drugih lipida u jetri i mozgu. Međutim, fenotip je blaži, a progresija bolesti usporena u odnosu na mišji model BALB/c *NPC1*<sup>-/-</sup>. Životni vijek modela *knock-in NPC1-I1061T* je oko 18 tjedana, u odnosu na 10-12 tjedana miševa *NPC1*<sup>-/-</sup>, i to zbog ekspresije djelomično funkcionalnog proteina NPC1-I1061T. U odnosu na divlji tip jedinki, razina proteina NPC1-I1061T u jedinki *knock-in* je snižena unatoč jednakoj razini mRNA [85].

### 1.5. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AB) je najučestalija neurodegenerativna bolest koja zahvaća stariju populaciju (u dobi nakon 65 godina). Procjenjuje se da u svijetu trenutno postoji više od 55 milijuna oboljelih od AB [86]. AB još uvijek je neizlječiva, a pravovremeni dijagnostički testovi i dalje su u razvoju.

U više od 95% slučajeva, AB je kompleksna bolest, uzrokovana genetičkim, epigenetičkim, ali i okolišnim čimbenicima (poput kroničnih bolesti, prehrane, toksina, manjka fizičke i mentalne aktivnosti). Preostali postotak otpada na rjeđi, nasljedni oblik bolesti, tzv. obiteljsku AB (engl. *familial Alzheimer's disease*, FAD). Obiteljska AB uzrokovana je mutacijama u genu *APP* ili u genima *presenilin 1* ili *2* koji kodiraju za katalitičku podjedinicu enzima  $\gamma$ -sekretaze. Zbog ovih mutacija dolazi do povećanog stvaranja peptida amiloida- $\beta$  i njegovog nakupljanja u izvanstanične senilne plakove u hipokampusu i kori velikog mozga, kao i stvaranja unutarstaničnih NFTs, što izaziva smrt neurona u regijama mozga odgovornim za kogniciju i pamćenje [87]. Uzrok patologije u kompleksnom obliku AB je smanjeno uklanjanje nakupljenih proteina, odnosno agregata, i to zbog poremećaja funkcije endolizosomalnog i autofagosomalnog puta [25, 88, 89].

Klinički, AB karakteriziraju kognitivne promjene, gubitak intelektualne sposobnosti i demencija [27, 90]. Zbog promjena u kvaliteti i trajanju životnog vijeka, sve je veći broj rano dijagnosticiranih slučajeva, zbog čega AB predstavlja veliki izazov u zdravstvu i ekonomiji društva: predviđa se da će do 2050. godine u svijetu biti više od 139 milijuna oboljelih od AB [91]. U kompleksnom obliku AB ne postoje pouzdani genetički biljezi kao uzroci bolesti, već samo genetički rizični čimbenici, stoga su posljednjih godina istraživanja usmjerena prvenstveno na pronalazak rizičnih genskih varijanti, kao i ranih biomarkera. S obzirom da patološke promjene mogu početi i desecima godina prije pojave demencije, cilj je dijagnosticirati AB u asimptomatskoj fazi bolesti ili u fazi blagog kognitivnog poremećaja (engl. *mild cognitive impairment*), što bi omogućilo uspješnije liječenje [92–97].

## 1.6. Bolest Niemann-Pick tipa C i Alzheimerova bolest – sličnosti i razlike

Bolest NPC je monogenska, pogađa većinom mlađu populaciju, a mali mozak je patološki primarno pogođena regija, dok se hipokampus smatra „zaštićenim“. Za razliku od bolesti NPC, AB je kompleksna bolest koja pogađa stariju populaciju, a karakteristična patologija (amiloidni plakovi i NFTs) prisutna je prvenstveno u hipokampusu i kori velikog mozga. Ipak, ove dvije bolesti dijele velik broj zajedničkih neuropatoloških karakteristika (uključujući neurodegeneraciju, neuroinflamaciju i hiperfosforilaciju proteina tau), kao i preklapanja u kliničkoj slici (kognitivni poremećaji, demencija) [27, 98].

Zanimljivo, u AB je zabilježena promijenjena ekspresija mRNA i proteina NPC1 [27, 99, 100], a u pacijenata s neurodegenerativnom demencijom zabilježene su heterozigotne mutacije u genu *NPC1* [101]. Križanje transgeničnog mišjeg modela AB (APP/PS1) s miševima heterozigotima za gen *NPC1* pokazalo je da djelomično smanjenje razine proteina NPC1 doprinosi ranijem nakupljanju peptida amiloida- $\beta$  i stvaranju plakova [102].

S pojavom AB povezan je velik broj rizičnih gena identificiranih cijelogenomskim studijama (engl. *genome-wide association studies*) [103–105]. Većina ovih gena ukazuje na poremećaj tri procesa u AB, i to na poremećaj metabolizma kolesterola (npr. prijenosnici kolesterola poput ApoE i ABCA7 sudjeluju u uklanjanju peptida amiloida- $\beta$ ), neuroinflamaciju, tj. poremećaj imunološkog odgovora u mozgu (npr. fagocitni odgovor mikroglia na stvaranje plakova), te na poremećaj funkcije endolizosomalnog puta (gdje se odvija procesiranje proteina APP i prijenos peptida amiloida- $\beta$  kroz krvno-moždanu barijeru) [106]. Navedeni procesi također su u molekularnoj podlozi bolesti NPC.

Neuroni dobivaju kolesterol pretežno iz astrocita, prijenosom preko apolipoproteina E (ApoE) [4]. Najčešća od tri izoforme ApoE u ljudi je ApoE  $\epsilon$ 3, koja se u kontekstu genetičkog rizičnog čimbenika ili progresije AB i bolesti NPC smatra neutralnom, dok je izoforma ApoE  $\epsilon$ 2 protektivna. Izoforma ApoE  $\epsilon$ 4 smanjuje neurogenezu hipokampalnih neurona [107], kao i razgradnju agregata amiloida- $\beta$ , te još uvijek nepoznatim mehanizmom povećava rizik za kompleksnu AB, a povezana je i s progresivnim oblikom bolesti NPC s ranom pojavom [27, 108]. Ove izoforme na različiti način reguliraju proizvodnju i uklanjanje amiloida- $\beta$ , što je povezano i sa stvaranjem NFTs [27].

Normalna funkcija živčanog sustava uvelike ovisi i o retromeru, proteinskom kompleksu koji vrši retrogradni prijenos proteina iz endosoma u trans-Golgijevu mrežu. Ovim mehanizmom oslobađaju se presinaptički neurotransmiteri, regulira se gustoća postsinaptičkih receptora, te se enzimi prenose do endolizosomalnog sustava. Retromer također reciklira molekule iz endosoma prema plazma membrani [109]. Disfunkcija retromera prvo je otkrivena u AB [110], a kasnije je povezana i s brojnim drugim poremećajima, poput Parkinsonove bolesti i Downovog sindroma. U staničnim i životinjskim modelima ovih bolesti, povišena razina retromernih komponenti pospješuje



funkciju retromera, što ispravlja fenotip [109, 111, 112]. Poremećaj funkcije retromera potvrđen je i u staničnim i mišjim modelima bolesti NPC [113, 114]. Komponente retromera (npr. protein VPS35) i retromerni receptor sorLA nakupljaju se u procesima neurona i zadebljanjima aksona, te imaju promijenjenu raspodjelu u mozgu mišjeg modela BALB/c *NPCI*<sup>-/-</sup> već u asimptomatskoj fazi bolesti NPC. Snižavanje razine kolesterola popravlja poremećaj funkcije retromera, što upućuje na njegovu ulogu dodatnog ranog čimbenika u patogenezi bolesti NPC [113, 114].

Poremećaj funkcije endolizosoma i autofagosoma u AB utječe na unutarstanično stvaranje proteinskih agregata (amiloida- $\beta$  i proteina tau), te na njihovo lučenje u izvanstanični prostor [25]. Povećano stvaranje peptida amiloida- $\beta$  te smanjeno uklanjanje peptida amiloida- $\beta_{42}$  i dalje se smatraju glavnim uzročnicima AB, kao i glavnom terapijskom metom. Peptidi amiloid- $\beta$  nastaju cijepanjem proteina APP enzimom BACE1 i enzimskom kompleksom  $\gamma$ -sekretaza (detaljnije opisano u nastavku, u poglavlju 1.8.) [106]. Upravo je ovaj proces još jedna od zajedničkih značajki AB i bolesti NPC (cijepanje proteina APP u bolesti NPC opisano je u nastavku, u poglavlju 1.12.) [115].

## 1.7. Enzim BACE1

Enzim BACE1 (od engl.  *$\beta$ -site APP cleaving enzyme 1*) je membranska aspartil proteaza eksprimirana u svim tkivima, ali predominantno u mozgu, gdje je i najaktivnija [116]. Najviša zabilježena razina mRNA je u gušterači, međutim, aktivnost enzima BACE1 u ovom organu je vrlo niska [88, 117]. U mozgu, mRNA je primarno eksprimirana u neuronima malog mozga, kore velikog mozga i hipokampusu [118, 119], i to posebno u prva dva tjedna postnatalnog razvoja nakon čega naglo pada [120]. U stanici, enzim BACE1 najzastupljeniji je u endosomima i GA (gdje postiže optimalnu aktivnost pri pH 5,5) [116, 121], a manje i u ER te lizosomima [88].

Ekspresija enzima BACE1 utvrđena je i u astrocitima *in vitro*, u aktivnim astrocitima u uvjetima kronične neuroinflamacije *in vivo* [122, 123], te u blizini amiloidnih plakova u odraslih jedinki transgeničnog mišjeg modela AB (Tg2576) [124]. Ekspresija enzima BACE1 nije utvrđena u mirujućim astrocitima [123] niti u aktivnim mikroglijama [122]. Unatoč homologiji s enzimom BACE2 (koji prevladava u perifernim tkivima), utvrđeno je da je enzim BACE1 glavna  $\beta$ -sekretaza koja cijepa protein APP *in vivo*, i to u neuronima [125, 126]. Enzim BACE2 također može cijepati APP, ovisno o vrsti stanica iz kojih potječe. Na primjer, enzim BACE2 iz astrocita cijepa APP *in vitro*, ali tako nastali odsječci amiloida- $\beta$  nisu pronađeni u amiloidnim plakovima [88, 125]. Miševi *knock-out BACE2* nemaju fiziološki i anatomski fenotip. Istraživanje miševa koji su dvostruki *knock-out* za gene *BACE1* i *BACE2* ukazalo je na snažan fenotip i značajno smanjenu stopu preživljenja. Ipak, 40% dvostrukih *knock-out* miševa preživljava više od 1,5 godinu [125].

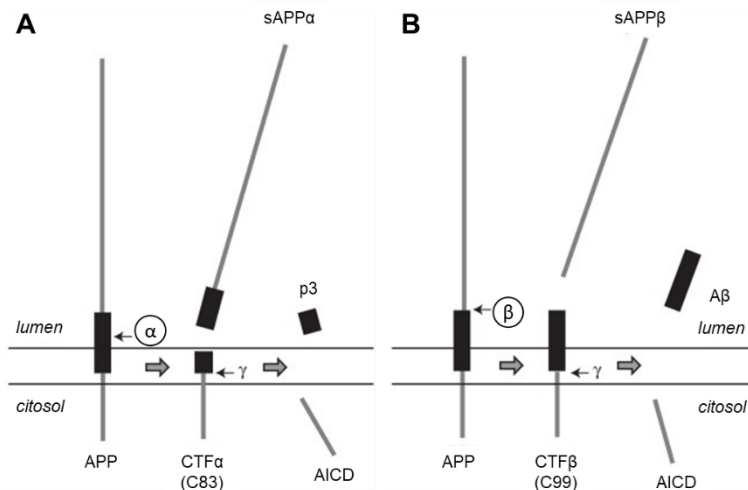
## 1.8. Amiloidogeni put cijepanja proteina APP

Gen za protein APP smješten je na kromosomu 21 te je najviše eksprimiran u neuronima kore velikog mozga i hipokampusa. U istraživanjima *in vitro*, zabilježena je ekspresija proteina APP i u mikroglijama i astrocitima, ali nije potvrđena *in vivo*. Unutar neurona, protein APP lokaliziran je u vezikulama u somi, dendritima i aksonima, odakle sazrijeva kroz endolizosomalni put i dospijeva na plazma membranu [127].

Protein APP ima važnu fiziološku ulogu tijekom razvoja, ali i u zrelom mozgu: djeluje kao regulator transkripcije, površinski receptor ili ligand, a uključen je i u procese plastičnosti neurona i sinapsi, pamćenje i neuroprotekciju [127]. Mutacije u genu *APP* uzrokuju mali broj slučajeva obiteljskog oblika AB, ali razumijevanje uloge ovog proteina važno je i zbog patologije Downovog sindroma, odnosno trisomije kromosoma 21 [108].

U fiziološki zdravoj stanici, protein APP smješten je na plazma membrani gdje se cijepa neamiloidogenim putem pomoću  $\alpha$ -sekretaze (**Slika 4 A**), pri čemu nastaje topivi odsječak proteina APP (engl. *soluble APP $\alpha$* , sAPP $\alpha$ ) i C-terminalni odsječak  $\alpha$  (engl. *C-terminal fragment  $\alpha$* , CTF $\alpha$  ili C83) [88, 127]. Fiziološka uloga odsječka CTF $\alpha$  nije poznata, a odsječak sAPP $\alpha$  ima protektivnu ulogu u učenju i pamćenju, dugotrajnoj potencijaciji (engl. *long-term potentiation*, LTP) te ispravnom grananju dendrita, a doprinosi i neurogenezi, smanjenom stvaranju plakova te smanjenoj fosforilaciji proteina tau [127]. Daljnjim cijepanjem odsječka CTF $\alpha$   $\gamma$ -sekretazom, nastaju odsječci AICD (engl. *APP intracellular domain*) i p3 [88, 127]. Fiziološka uloga odsječka p3 nije poznata, ali dosad nisu zabilježeni njegovi patološki učinci. Ni uloga odsječka AICD još nije u potpunosti ispitana, ali mogao bi sudjelovati u regulaciji transkripcije u jezgri, kao i uzrokovati fosforilaciju proteina tau [127].

Enzim BACE1 aktiviraju „stresne“ promjene u organizmu, poput oksidacijskog stresa, promjena u homeostazi, upale, hipoksije i ishemije [128]. U AB, ali i u bolesti NPC, dolazi do zadržavanja proteina APP u vezikulama niskog pH (rani i reciklirajući endosomi) gdje se cijepa amiloidogenim putem pomoću  $\beta$ -sekretaze, odnosno enzima BACE1 (**Slika 4 B**). Pritom prvo nastaje topivi odsječak proteina APP (sAPP $\beta$ ; funkcija nije istražena) i C-terminalni odsječak  $\beta$  (CTF $\beta$  ili C99), a njegovim daljnjim cijepanjem  $\gamma$ -sekretazom, nastaje peptid amiloid- $\beta$  te odsječak AICD [88, 127]. Cijepanje  $\gamma$ -sekretazom je heterogeno, pa nastali odsječci peptida amiloida- $\beta$  mogu biti različite duljine (od 38 do 46 aminokiselina). Odsječak amiloid- $\beta_{42}$  je najviše neurotoksičan zbog svojeg svojstva agregiranja u amiloidne plakove [88, 108], a njegovo povećano nastajanje može biti uzrokovano povišenom razinom kolesterola u membranama [129].



**Slika 4. Shematski prikaz cijepanja proteina APP (ne)amiloidogenim putom. A** Neamiliodogeni put cijepanja proteina APP pomoću  $\alpha$ -sekretaze i  $\gamma$ -sekretaze. **B** Amiliodogeni put cijepanja proteina APP pomoću  $\beta$ -sekretaze (enzim BACE1) i  $\gamma$ -sekretaze. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru [108].

Inhibicija  $\gamma$ -sekretaze, koja neposredno stvara toksični peptid amiloid- $\beta$  iz odsječka CTF $\beta$ , ne ublažava fenotipske promjene u sinapsama i pamćenju u mišjem modelu demencije s amiloidnom patologijom [130]. Novija istraživanja pokazuju da već i odsječak CTF $\beta$  doprinosi patologiji AB, tako što remeti sinaptičku funkciju, LTP, funkciju lizosoma i autofagije, te uzrokuje neurodegeneraciju i neuroinflamaciju [127, 131]. Povišena razina odsječka CTF $\beta$  aktivira RAB5 u endosomima, čime potiče endocitozu i fuziju endosoma, remeti aksonalni prijenos endosoma, te doprinosi odumiranju neurona [132–134]. U ljudskom staničnom modelu AB (iPSC), razina proteina tau regulirana je povišenom razinom odsječka CTF $\beta$  [135].

U mišjim modelima bolesti NPC, kao i u većine pacijenata oboljelih od bolesti NPC, ne dolazi do stvaranja amiloidnih plakova u mozgu, vjerojatno zbog brze progresije bolesti i činjenice da se bolest NPC najčešće javlja u djece, za razliku od AB. Međutim, amiloid- $\beta$  se nakuplja i agregira unutar stanice, u vezikulama bogatima kolesterolom [27, 136]. U pacijenata oboljelih od bolesti NPC, uslijed amiloidogenog cijepanja proteina APP, zabilježena je povišena razina peptida amiloida- $\beta_{42}$  u cerebrospinalnoj tekućini, hipokampusu i frontalnom korteksu, dok je u malom mozgu zabilježena povišena razina C-terminalnih odsječaka proteina APP (APP CTFs) [99, 137]. Uzrok izostanka amiloidnih plakova vjerojatno je nedostatak čimbenika starenja u ovoj progresivnoj bolesti. Samo u malom broju pacijenata, koji su homozigoti za ApoE  $\epsilon_4$ , prisutni su difuzni plakovi [27, 138]. U većine pacijenata oboljelih od bolesti NPC pronađene su i nakupine  $\alpha$ -sinukleina te Lewyjeva tjelešca, značajke karakteristične za Parkinsonovu bolest, odnosno demenciju s Lewyjevim tjelešcima [139], što dodatno ukazuje na zajedničke mehanizme u podlozi brojnih neurodegenerativnih bolesti i LSDs [140–143].

Prije formiranja amiloidnih plakova u mozgu, enzim BACE1 nakuplja se u kasnim endosomima unutar presinaptičkih distrofičnih neurita [144]. Peptidi amiloid- $\beta$  nastali

amiloidogenim cijepanjem proteina APP prvo se nakupljaju unutar neurona [145], a zatim u izvanstanične amiloidne plakove koji uzrokuju karakterističnu patologiju AB [146]. Povećana aktivnost enzima BACE1 i povećana razina peptida amiloida- $\beta$  doprinose disfunkciji sinapsi i neurodegeneraciji aksona [25, 147] te nakupljanju prekursora lizosomalnih vezikula u zadebljanjima aksona (engl. *axonal swellings*), čime sprječavaju njihovo sazrijevanje i retrogradni prijenos [146]. U normalnim uvjetima, enzim BACE1 razgrađuje se u lizosomima u somi (gdje dospijeva autofagijom), a protein APP prolazi kroz endolizosomalni put uz pomoć retromernog receptora sorLA. Stoga poremećaji funkcije retrogradnog prijenosa, endolizosomalnog puta i autofagije u bolesti NPC i AB dodatno doprinose povećanoj razini i nakupljanju peptida amiloida- $\beta$  te sinaptotoksičnosti [25, 147–149]. Također, u mišjim modelima AB, plakovi nastali nakupljanjem peptida amiloida- $\beta_{42}$  izazivaju porast razine enzima BACE1 i tako uzrokuju dodatno stvaranje amiloida- $\beta$  [144, 150, 151].

Enzim BACE1 pokazao se kao potencijalna terapijska meta kada je otkriveno da određene mutacije u proteinu APP utječu na njegovu učinkovitost cijepanja amiloidogenim putem, što je ključni korak u patogenezi AB [88]. Mutacija *APP-K670N/M671L*, tzv. švedska mutacija (koja je uzročnik obiteljskog oblika AB), čini protein APP podložniji cijepanju enzimom BACE1 [152, 153]. Suprotno, mutacija *APP-A673T*, tzv. islandska mutacija, ima zaštitni učinak jer protein APP čini manje podložnim cijepanju enzimom BACE1, tj. u ljudi koji su nositelji ove mutacije zabilježena je i do 40% niža razina amiloida- $\beta$  [108, 154]. Zanimljivo, druga mutacija na istoj poziciji, *APP-A673V*, povezana je s obiteljskim oblikom AB kao i švedska mutacija [153, 155].

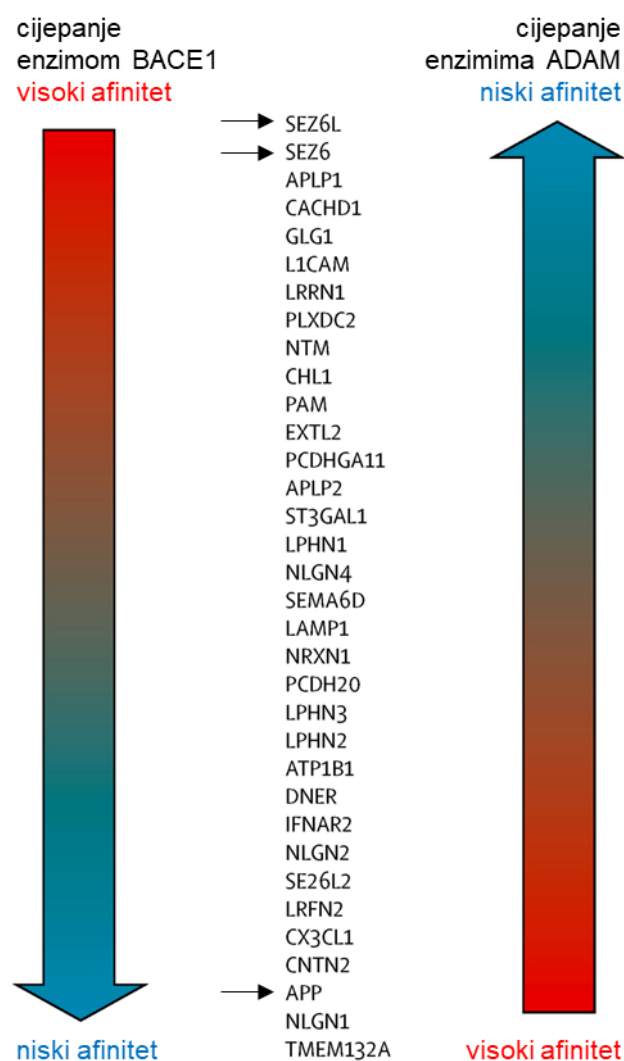
## 1.9. Supstrati enzima BACE1

Novija istraživanja enzima BACE1 i njegovih supstrata pokazala su da je afinitet cijepanja proteina APP enzimom BACE1 u fiziološki zdravoj stanici vrlo nizak. Također, otkriven je i niz drugih supstrata (**Slika 5**), čiji je afinitet cijepanja enzimom BACE1 puno viši. Neki od njih, npr. proteini iz obitelji Seizure 6, su gotovo isključivi supstrati enzima BACE1 [156, 157]. Također, s obzirom da razina enzima BACE1 pada u kasnijoj fazi života, neki od supstrata tada se cijepaju alternativnim enzimima. Za mnoge od supstrata enzima BACE1 još uvijek nije poznata njihova funkcija, kao ni koja od njihovih formi ima ulogu u staničnim procesima, cjeloviti proteini ili N-terminalne topive forme koje nastaju nakon cijepanja [156].

Točna uloga i molekularni mehanizmi djelovanja još nisu razjašnjeni ni za obitelj proteina Seizure 6 (engl. *Seizure 6*, *SEZ6*, i *Seizure 6-like*, *SEZ6L*). Geni za ove proteine dosad su identificirani kao potencijalni rizični čimbenici za neurološke i psihijatrijske poremećaje (autizam, shizofreniju, epilepsiju, bipolarni poremećaj), ali i rak [157–159]. U miševa *knock-out SEZ6(L)* pokazano je da proteini SEZ6 i SEZ6L reguliraju broj i plastičnost sinapsi te morfologiju dendrita (uravnoteženu elongaciju i grananje), a u malom mozgu i

umrežavanje neurona. Gubitak ovih proteina rezultira pogoršanjem kognicije, pamćenja i motoričkih funkcija [156, 158–163].

Transmembranski proteini SEZ6 i SEZ6L lokalizirani su u vezikulama u somi i dendritima neurona [160], dakle nemaju potpunu kolokalizaciju s enzimom BACE1 (koji je primarno smješten u aksonima) [164]. Na temelju strukture, pretpostavlja se da imaju ulogu receptora ili liganda, ali im interakcijski partneri još nisu identificirani [164]. Ekspimirani su u mozgu, i tijekom razvoja i u zreloj dobi, ali je razina promjenjiva ovisno o dobi i regiji mozga [159, 165].



**Slika 5. Supstrati enzima BACE1.** Afinitet cijepanja supstrata enzimom BACE1 ispitan je u kulturi embrionalnih primarnih neurona miševa *knock-out BACE1* i miševa divljeg tipa, a suprotan je afinitetu cijepanja  $\alpha$ -sekretazom (ADAM). Preuzeto i prilagođeno prema izvoru [153].

## 1.10. Mišji modeli BACE1

Brojna ranija istraživanja životinjskih modela s delecijom ili inhibicijom enzima BACE1 nisu zabilježila nuspojave, što je povećalo interes za farmakološko ciljanje enzima BACE1. Nekoliko istraživačkih grupa kreiralo je različite linije miševa *knock-out BACE1* te je isprva pokazano da se ove jedinke, u odnosu na divlji tip miševa, normalno razvijaju, da su zdrave, plodne i vijabilne. Također, imaju normalnu morfološku, anatomsku, histološku i fiziološku sliku te ne pokazuju značajne promjene u ponašanju. U mozgu ovih miševa, kao ni u njihovim primarnim neuronima *in vitro*, nije zabilježena aktivnost  $\beta$ -sekretaze, odnosno nisu utvrđeni peptidi amiloid- $\beta$  niti odsječci APP CTF $\beta$  [117, 118]. Križanjem miševa *knock-out BACE1* (B-KO) s mišjim modelom obiteljske AB (5 $\times$ FAD) spriječeno je stvaranje amiloida- $\beta$ , gubitak neurona u kori velikog mozga, te je popravljeno pamćenje miševa [166].

Međutim, novija istraživanja pokazuju da miševi B-KO imaju složen fenotip [167]: zabilježen je povećan mortalitet (općenito, ali i prije odbijanja od majke, dakle u dobi do 30 dana) i smanjena tjelesna masa u odnosu na jedinke divljeg tipa [125, 167]. Također, zabilježena je hiperaktivnost i povećana razina kretanja, fenotip povezan sa shizofrenijom i epilepsijom, promijenjena struktura i funkcija sinapsi te smanjena mijelinacija [120, 125, 162, 168]. Uočene su i promjene u neurogenezi i astrogenezi, jer enzim BACE1 regulira ove procese u sklopu signalnog puta Jag1-Notch [131, 156, 169, 170].

Delecija gena *BACE1* nakon ranih stadija razvoja (kao model inhibicije enzima BACE1 u pacijenata s AB) potpuno uklanja nakupljanje peptida amiloida- $\beta$ , smanjuje aktivaciju glija stanica i distrofiju neurita te popravljiva sinaptičku funkciju u mišjem modelu AB (5 $\times$ FAD). Ipak, enzim BACE1 se u ovom modelu pokazao kao neophodan za optimalan LTP [131]. Novo istraživanje pokazalo je da je moguće spasiti ovakav sinaptički fenotip primjenom modulatora za metabotropni glutamatni receptor 1 uz inhibiciju enzima BACE1 [171].

Miševi heterozigoti za gen *BACE1* nemaju patološki fenotip, što je potaklo ispitivanja smanjenja razine enzima BACE1 za 50%. Delecija jednog alela gena *BACE1* značajno smanjuje razinu amiloida- $\beta_{42}$ , plakova i pocijepanih odsječaka proteina APP u ženki mišjeg modela AB (5 $\times$ FAD) [172], a u mišjem modelu Downovog sindroma smanjuje razinu odsječaka APP CTF $\beta$  te povoljno djeluje na poremećaj funkcije endosoma i kolinergičkih neurona [132].

### 1.11. Uloga enzima BACE1

Kako uloga enzima BACE1 još nije u potpunosti razjašnjena, zbog visoke ekspresije tijekom prenatalnog i ranog postnatalnog razvoja, te na temelju funkcije supstrata koje cijepa, zaključeno je da je enzim BACE1 uključen u važne neurološke procese, poput grananja i razvoja dendrita, mijelinacije te plastičnosti i podražljivosti sinapsi [120, 173]. U mišjem modelu AB (APP/PS1) pokazano je da farmakološka inhibicija enzima BACE1 djelomično usporava rast već postojećih plakova, ali i da može zaustaviti nakupljanje peptida amiloida- $\beta$  u nove plakove [92]. Primjena ovakvog tretmana u ranoj fazi bolesti mogla bi odgoditi progresiju AB. Međutim, klinička inhibicija enzima BACE1 u simptomatskoj fazi AB, iako pretežno ima blage nuspojave, nema povoljan učinak na ublažavanje kognitivnog poremećaja u pacijenata s blagim do umjerenim fenotipom AB [167]. Razlog tome vjerojatno je primjena ovih inhibitora u već dijagnosticiranih pacijenata, odnosno u patološki (pre)kasnoj fazi bolesti. Također, doza inhibitora je značajna: u pojedinim kliničkim ispitivanjima, naglo snižavanje aktivnosti enzima BACE1 uzrokovalo je pogoršanje simptoma, vjerojatno zbog djelovanja na sinapse i druge supstrate osim proteina APP [128, 174].

Zbog brojnih supstrata enzima BACE1 te implikacije u ranije spomenutim neurološkim procesima, postavlja se pitanje dugoročnih učinaka modulacije razine i aktivnosti ovog enzima, te u kojim je fazama razvoja neurološkog sustava ključan [88]. Također, odsutnost enzima BACE1 kroz cijeli razvoj i životni vijek može rezultirati razvojem kompenzacijskih mehanizama s fenotipskom slikom drugačijom u odnosu na modele farmakološke inhibicije. Sve više istraživanja ukazuje na negativne posljedice potpune inaktivacije enzima BACE1, ali djelomična inhibicija i dalje se smatra neuroprotektivnom u pacijenata oboljelih od AB. Enzim BACE1 stoga je i dalje potencijalna meta za razvoj terapija [128, 155, 163, 173, 175, 176], s fokusom na utvrđivanje optimalne razine modulacije enzima BACE1 koja bi imala protektivan učinak na progresiju AB, a ne bi uzrokovala poremećaj funkcije ostalih supstrata enzima BACE1.

## 1.12. Dosadašnja istraživanja u Laboratoriju za istraživanje neurodegenerativnih bolesti: Uloga enzima BACE1 u patogenezi bolesti Niemann-Pick tipa C

Bolest NPC pokazala se kao odličan model za ispitivanje homeostaze lipida i utjecaja nakupljanja kolesterola na procesiranje proteina APP i stvaranje amiloida- $\beta$ . U staničnom modelu bolesti NPC (CHO *NPC1*-null) potvrđeno je nakupljanje kolesterola uslijed gubitka funkcije proteina NPC1, što dovodi do promijenjene lokalizacije proteina APP: razina ekspresije na površini stanice je smanjena, a povećana je u endosomima [177], i to u lipidnim splavima [178]. Također, protein APP se u takvim uvjetima povećano cijepa enzimom BACE1. Smanjenje razine nakupljenog kolesterola, odnosno nadomještanje proteina NPC1, popravljajući lokalizaciju proteina APP i značajno snižava razinu odsječaka APP CTF $\beta$  te nakupljanje unutarstaničnog amiloida- $\beta$  [177]. Daljnjom analizom ovog mehanizma utvrđeno je da nakupljanje kolesterola u staničnom modelu bolesti NPC dovodi do zadržavanja proteina APP i enzima BACE1 u povećanim endosomalnim vezikulama što izravno doprinosi povećanom cijepanju proteina APP amiloidogenim putem [177]. Isti fenotip utvrđen je i uslijed povećanja razine kolesterola ili inhibicijom proteina NPC1 (tretmanom reagensom U18666A) u stanicama divljeg tipa [99]. Time je potvrđen utjecaj povećane razine i nakupljanja kolesterola na funkciju ranih i kasnih endosoma, lizosoma te reciklirajućih endosoma, čiji je poremećaj u podlozi bolesti NPC [99], ali i kompleksne AB [179, 180].

Cijepanje proteina APP, SEZ6 i SEZ6L (supstrata enzima BACE1) ispitano je *in vivo*, u mozgu miševa BALB/c *NPC1*<sup>-/-</sup>, u završnoj fazi bolesti (u dobi od 10 tjedana), kao i u asimptomatskoj fazi bolesti (u dobi od četiri tjedna) [181]. Povećano cijepanje svih ispitanih supstrata zabilježeno je u malom mozgu, kori velikog mozga i hipokampusu miševa *NPC1*<sup>-/-</sup> u odnosu na miševe divljeg tipa. Ekspresija proteina APP i SEZ6L zabilježena je u Purkinjeovim neuronima, a izgubljena je uslijed odumiranja Purkinjeovih neurona miševa *NPC1*<sup>-/-</sup> u dobi od 10 tjedana. U primarnim kortikalnim neuronima miševa *NPC1*<sup>-/-</sup> *in vitro*, utvrđeno je nakupljanje enzima BACE1 te supstrata SEZ6 i SEZ6L u povećanim endolizosomalnim vezikulama, čime je potvrđeno da poremećaj funkcije endolizosomalnog puta doprinosi povećanom cijepanju enzimom BACE1 u ovom modelu bolesti NPC [181]. Daljnjim ispitivanjem kortiko-hipokampalnih organotipskih rezova mozгова miševa *NPC1*<sup>-/-</sup> *ex vivo*, utvrđeno je povećano cijepanje supstrata SEZ6 i SEZ6L enzimom BACE1 uslijed njihovog nakupljanja u ranim endosomima [182]. Farmakološka inhibicija enzima BACE1 *in vitro* i *ex vivo* imala je djelomično povoljan učinak na neuropatološke značajke ovog modela, i to na smanjeno nakupljanje supstrata enzima BACE1 u procesima neurona, smanjeno nakupljanje ranih endosoma i lizosoma, te nižu aktivaciju astrocita i mikroglia [182]. Istraživanje provedeno u sklopu ovog doktorskog rada predstavlja nastavak ispitivanja uloge enzima BACE1 u patogenezi bolesti NPC, u mišjem modelu bolesti NPC *in vivo*.



## 2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog doktorskog rada bio je kreirati novi mišji model bolesti NPC s deletiranim genom *BACE1* kako bi se ispitao učinak genetičkog moduliranja, odnosno smanjenja razine enzima BACE1 na patogenezu bolesti NPC *in vivo*. Pritom je korišten *knock-in* mišji model bolesti NPC koji nosi najčešću mutaciju u ljudi, *NPCI-I1061T*.

Specifični ciljevi ovog doktorskog rada bili su:

1. Validirati mišji model *knock-in NPCI-I1061T*, odnosno ispitati neuropatološke značajke bolesti NPC (neurodegeneraciju, nakupljanje kolesterola, poremećaj endolizosomalnog puta, neuroinflamaciju i hiperfosforilaciju proteina tau) u ovom modelu;
2. Križanjem linije miševa *NPCI-I1061T* (B6.129-*Npc1*<sup>tm1Dso/J</sup>) i linije miševa *BACE1* (B6.129-*Bace1*<sup>tm1Pcw/J</sup>) kreirati novi mišji model *knock-in NPCI-I1061T* s deletiranim jednim ili oba alela gena *BACE1*;
3. Karakterizirati neuropatološke značajke miševa *knock-in NPCI-I1061T* s deletiranim jednim ili oba alela gena *BACE1* (neurodegeneraciju, poremećaj endolizosomalnog puta, neuroinflamaciju i hiperfosforilaciju proteina tau) u odnosu na mišveve *knock-in NPCI-I1061T* i mišveve divljeg tipa, kako bi se ispitala uloga enzima BACE1 u patogenezi bolesti NPC.

Hipoteza ovog doktorskog rada je da povećano cijepanje enzimom BACE1 doprinosi patogenezi bolesti NPC, te da će genetičko smanjenje razine proteina BACE1 imati povoljan učinak na neuropatološke značajke bolesti NPC u mišjem modelu *knock-in NPCI-I1061T*. Delecija jednog ili oba alela gena *BACE1* usporit će neurodegeneraciju, smanjiti poremećaj endolizosomalnog puta, neuroinflamaciju i hiperfosforilaciju proteina tau, te na taj način usporiti progresiju bolesti NPC, odnosno doprinijeti produljenju životnog vijeka miševa *knock-in NPCI-I1061T*.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Mišji modeli i uzgoj

U ovom doktorskom radu korištena su dva soja miševa, soj *NPCI-I1061T* B6.129-*Npc1*<sup>tm1Dso</sup>/J (soj broj 027704) i soj *BACE1* B6.129-*Bace1*<sup>tm1Pcw</sup>/J (soj broj 004714; nabavljeni od The Jackson Laboratory, SAD). Sva istraživanja odobrena su od strane Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (klasa UP/I-322-01/15-01/42 i klasa UP/I-322-01/17-01/15) te Bioetičkog povjerenstva Instituta Ruđer Bošković (IRB). Uzgoj miševa i svi pokusi napravljeni u sklopu ovog istraživanja u skladu su s važećim Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/2017, 32/2019) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 39/2017, 116/2019). Doktorandica je osposobljena za rad s laboratorijskim životinjama (Program osposobljavanja osoba koje rade s pokusnim životinjama i životinjama za proizvodnju bioloških pripravaka, ekvivalent tečaja FELASA 80 sati<sup>1</sup>, Potvrda o osposobljenosti: 208.3-18, HR 191/02/P, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb).

Miševi su uzgajani u Pogonu laboratorijskih životinja (PLŽ) IRB-a s ciklusom od 12 h svjetla/12 h tame, a temperatura prostorije održavana je pri 22 °C uz 60% vlage. Miševi su imali neograničen pristup vodi i standardiziranoj hrani (4RF21 peleti 12 mm; Mucedola, Italija). Linije miševa *NPCI-I1061T* i *BACE1* održavane su zasebno, parenjem heterozigotnih parova (jer su za nastavak pokusa bili potrebni heterozigoti oba soja, te zato što su i mužjaci i ženke genotipa *knock-in NPCI-I1061T* sterilni) [183, 184].

#### 3.2. Uspostava miješane linije

Nova miješana linija, odnosno linija s dvostrukim genotipom, kreirana je na način da su prvo križane jedinke heterozigoti za gen *NPCI-I1061T* s jedinkama heterozigotima za gen *BACE1* kako bi se dobile jedinke heterozigotne za oba gena. Dvostruki heterozigoti (N-HET B-HET) dalje su međusobno pareni za održavanje nove miješane linije i za dobivanje jedinki potrebnih za ovo istraživanje. Korištene su:

- kontrolne jedinke divljeg tipa za oba gena (N-WT B-WT),
- jedinke *knock-in NPCI-I1061T* i divlji tip za gen *BACE1* (N-KI B-WT),
- jedinke *knock-in NPCI-I1061T* i heterozigoti za gen *BACE1* (N-KI B-HET),
- jedinke *knock-in NPCI-I1061T* i *knock-out BACE1* (N-KI B-KO),
- te dodatne kontrole, jedinke divljeg tipa za gen *NPCI* i heterozigoti za gen *BACE1* (N-WT B-HET), i
- jedinke divljeg tipa za gen *NPCI* i *knock-out BACE1* (N-WT B-KO).

---

<sup>1</sup> Kategorija B, tj. ekvivalent tečaja FELASA C prema staroj klasifikaciji.

Jedinke genotipova N-HET B-WT i N-HET B-KO nisu ispitivane u ovom doktorskom radu.

### 3.3. Genotipizacija miševa

Uoči četiri tjedna starosti, miševi su odbijeni od majke, razdvojeni u kaveze prema spolu, označeni bušenjem uške te im je odrezan vršak repa. Iz prikupljenog tkiva repa izolirana je DNA. U mikrotubice (Sarstedt, Njemačka) s tkivom repa dodano je 100  $\mu$ L 50 mM NaOH u mqH<sub>2</sub>O. Kratkom vrtnjom u centrifugi (Eppendorf Centrifuge 5424, Eppendorf, Njemačka) repovi su potopljeni u pufer. Mikrotubice su zatim inkubirane u termobloku (neoLab Migge GmbH, Njemačka) pri 95 °C tijekom 15 min tri puta, između čega su mikrotubice promiješane koristeći vortex miješalicu (neoLab Migge GmbH, Njemačka) te ponovno kratko centrifugirane kako bi tkivo bilo potopljeno. Nakon treće inkubacije na termobloku, u otopinu je dodano 10  $\mu$ L pufera 1,5 M Tris pH 8,8 te su mikrotubice promiješane na vortex miješalici. Nakon centrifugiranja na najvećoj brzini (16000 $\times$ g; Eppendorf Centrifuge 5408R, Eppendorf, Njemačka) tijekom 5 min pri 4 °C, supernatant je prebačen u novu mikrotubicu. Koncentracija DNA izmjerena je pomoću spektrofotometra (NanoPhotometer, Implemen GmbH, Njemačka). Uzorci DNA su za korištenje u reakcijskoj smjesi lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) razrijeđeni do finalne koncentracije 10 ng/ $\mu$ L u mqH<sub>2</sub>O.

Genotipizacija je napravljena prema niže opisanim protokolima prilagođenima prema preporuci The Jackson Laboratory (protokol 28838 za gen *NPCI* i protokol 22631/24214 za gen *BACE1*). Izolirana DNA umnožena je metodom PCR pomoću uređaja Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, SAD). Korištene početnice navedene su u **Tablici 1**. Reakcijske smjese pripremljene su prema sastavu u **Tablici 2**, a uvjeti reakcije PCR navedeni su u **Tablici 3**.

Produkt reakcije PCR (20  $\mu$ L) nanesen je u jažice 2,5%-tnog agaroznog (Sigma-Aldrich, SAD) gela pripremljenog u puferu 1 $\times$ TAE (40 mM Tris baza u redestiliranoj vodi, 20 mM ledena octena kiselina, 1 mM EDTA pH 8,0). U gel je dodana boja za nukleinske kiseline Gel Red (1:20000; Biotium, SAD). Horizontalna elektroforeza (BioRad, SAD) tekla je u puferu 1 $\times$ TAE pod stalnim naponom od 90 V tijekom 55 min. Umnožena DNA vizualizirana je koristeći uređaj UVITEC (Alliance 4.7, UVITEC, UK). Očekivani produkti reakcije PCR zabilježeni su na veličinama 146 parova baza (alel divljeg tipa) i 210 parova baza (alel *knock-in*) za gen *NPCI*, odnosno na veličinama 272 para baza (alel divljeg tipa) i 157 parova baza (alel *knock-out*) za gen *BACE1*.

**Tablica 1.** Početnice korištene za genotipizaciju miševa linije *NPCI-I1061T* i linije *BACE1*.

| gen          | početnica | sekvenca 5'→3'                |
|--------------|-----------|-------------------------------|
| <i>NPCI</i>  | 24238     | TCA GCC CTC TCT TAC TTG GTG   |
|              | 24239     | CTG CTG TGT GCT AGG AAT CAC T |
| <i>BACE1</i> | oIMR3169  | AGG CAG CTT TGT GGA GAT GGT G |
|              | oIMR3170  | CGG GAA ATG GAA AGG CTA CTC C |
|              | oIMR8162  | TGG ATG TGG AAT GTG TGC GAG   |

**Tablica 2.** Sastav reakcijske smjese za PCR.

| reagensi  | gen <i>NPCI</i> | gen <i>BACE1</i> |
|---|-----------------|------------------|
| mqH <sub>2</sub> O  | 10,3 µl         | 9,3 µl           |
| 5×reakcijski pufer<br>5X Green GoTaq Reaction Buffer (Promega, SAD)   | 4 µl            | 4 µl             |
| 2,5 mM dNTP<br>Deoxynucleotide Solution Set (New England BioLabs, UK) | 1,6 µl          | 1,6 µl           |
| 20 µM početnica 24238   | 1 µl            | /                |
| 20 µM početnica 24239   | 1 µl            | /                |
| 20 µM početnica oIMR3169  | /               | 1 µl             |
| 20 µM početnica oIMR3170  | /               | 1 µl             |
| 20 µM početnica oIMR8162  | /               | 1 µl             |
| 5 U/µL DNA polimeraza<br>GoTaq DNA Polymerase (Promega, SAD)          | 0,1 µl          | 0,1 µl           |
| 10 ng/µL DNA  | 2 µl            | 2 µl             |

**Tablica 3.** Uvjeti reakcije PCR za genotipizaciju miševa.

| korak                | temperatura (°C) | vrijeme | broj ciklusa |
|----------------------|------------------|---------|--------------|
| početna denaturacija | 94               | 3 min   | -            |
| denaturacija         | 94               | 30 s    | 35×          |
| vezanje početnica    | 63               | 30 s    |              |
| elongacija           | 72               | 30 s    |              |
| završna elongacija   | 72               | 2 min   | -            |
| hlađenje             | 10               | ∞       | -            |

### 3.4. Prikupljanje tkiva mozga

Nakon određivanja genotipa, jedinke od interesa uzgajane su do dobi od četiri, 9 ili 15 tjedana starosti (ove vremenske točke predstavljaju asimptomatsku, simptomatsku i završnu fazu bolesti NPC u mišjem modelu *knock-in NPC1-I1061T*) [85]. Nakon odbijanja od majke pa do dana žrtvovanja, jedinkama je jednom tjedno mjerena tjelesna masa. Po navršavanju željene dobi, jedinke su usmrćene cervikalnom dislokacijom.

Izolacija mozga odvijala se na hladnoj podlozi. Velikim škarama je odstranjena glava, a zatim manjim škarama razrezana dlaka i koža glave. Lubanja je otvorena pomoću lateralnih rezova kroz *foramen magnum*, uz zigmatične kosti prema njušci. Odrezani dio lubanje je odignut te je pomoću zakrivljene pincete mozak izvađen na komad aluminijske folije. Koristeći špatule, razdvojene su lijeva i desna polutka mozga (mali mozak je presječen po pola). Lijeva polutka je uronjena u tubu (Sarstedt, Njemačka) sa svježe pripremljenim 4%-tnim paraformaldehiom (Sigma-Aldrich, SAD) u puferu 1×PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Desna polutka je disecirana na mali mozak, koru velikog mozga te hipokampus. Prikupljen je i uzorak vrška repa (za potrebe ponavljanja genotipizacije). Navedeni dijelovi tkiva prikupljeni su u zasebne mikrotubice i brzo smrznuti uranjanjem u tekući dušik, a zatim pohranjeni pri -80 °C (zamrzivač Ultra-Low Vip Series MDF-433V, Sanyo, Japan) do daljnje obrade.

### 3.5. Priprema kriorezova mozgova

Nakon 24 h u 4%-tnoj otopini paraformaldehida, polutke su prebačene u 15%-tnu otopinu saharoze u puferu 1×PBS i ostavljene preko noći, a onda u 30%-tnu otopinu saharoze u puferu 1×PBS i ostavljene preko noći. Polutke su zatim zamrznute: u kalup za uklapanje (Peel-A-Way Embedding Mold, Polysciences, SAD) na nekoliko kapi medija za uklapanje (Shandon M-1 Embedding Matrix, Thermo Scientific, SAD) postavljena je polutka mozga (orijentirana sagitalnim prerezom prema dolje) te je kalup dopunjen medijem za uklapanje tako da tkivo bude potpuno prekriveno. Kalup je uronjen u limenku s izopentanom (VWR Chemicals, SAD) ohlađenim na suhom ledu. Nakon što se medij za uklapanje smrznuo, cijeli kalup je potpuno potopljen u izopentan na dodatnih šest minuta. Kalup s tkivom je zatim pohranjen pri -80 °C do daljnje obrade.

Kriorezovi debljine 30 i 16 μm pripremljeni su pri -25 °C koristeći kriostat CM1850 (Leica, Njemačka) s mikrotomskom oštricom (High Profile Disposable Microtome Blades 818, Leica, Njemačka). Kriorezovi su prikupljeni u ploče sa šest bunarića (Sigma-Aldrich, SAD) ispunjenih s puferom 1×PBS, a zatim nanесeni na predmetna stakla za kriorezove (Menzel Superfrost Plus White Adhesive Microscope Slides, Thermo Scientific, SAD). Kriorezovi su osušeni u laminaru (Klimaoprema, Hrvatska) pod strujom zraka tijekom 1 h (ili na sobnoj temperaturi preko noći) i pohranjeni na -80 °C do daljnje obrade, ili odmah korišteni za imunohistokemijsku analizu.

### 3.6. Analiza raspodjele biljega neuropatoloških značajki bolesti Niemann-Pick tipa C i supstrata enzima BACE1

Metodom imunohistokemije, odnosno imunofluorescencije ispitana je raspodjela biljega od interesa u histološkim prerezima mozgova miševa. Smrznuti kriorezovi osušeni su u laminaru pod strujom zraka tijekom 1 h. Kriorezovi su okruženi hidrofobnom olovkom (PAP Pen, Sigma-Aldrich, SAD) te su predmetna stakla smještena u vlažnu komoru pri sobnoj temperaturi. Kriorezovi su permeabilizirani tijekom 30 min koristeći pufer TBS-T (50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100), a zatim blokirani u puferu TBS-T s 4% magarećeg ili 5% kozjeg seruma (Sigma-Aldrich, SAD) tijekom 1 h. Otopina primarnih protutijela pripravljena je u otopini za blokiranje (popis primarnih protutijela i korištenih razrjeđenja naveden je u **Tablici 4**) te su kriorezovi inkubirani preko noći.

Idući dan, kriorezovi su isprani u puferu TBS-T tri puta tijekom 10 min. Otopina sekundarnih protutijela konjugiranih s fluoroforima pripravljena je u otopini za blokiranje (1:200; korištena sekundarna protutijela navedena su u **Tablici 5**), a inkubacija kriorezova odvijala se u mraku tijekom 3 h. Kriorezovi su isprani u puferu TBS-T tri puta tijekom 10 min.

Stanične jezgre obojene su otopinom boje Hoechst (1:2000; Thermo Scientific, SAD) u puferu HBSS (Gibco, SAD) tijekom 20 min. Alternativno, slobodni kolesterol obilježen je inkubiranjem kriorezova u otopini filipina (finalna koncentracija 100 µg/mL; Sigma-Aldrich, SAD) u otopini za blokiranje tijekom 45 min. Kriorezovi su ponovno isprani u puferu TBS-T tri puta tijekom 10 min te dva puta kratko u mqH<sub>2</sub>O, a zatim osušeni u mraku, u laminaru pod strujom zraka tijekom 1 h.

Kriorezovi su uklopljeni koristeći medij za uklapanje Fluoromount (Sigma-Aldrich, SAD) te staklene pokrovnice (BioGnost, Hrvatska). Imunofluorescencijska analiza kriorezova napravljena je na konfokalnom mikroskopu Leica TCS SP8 X FLIM (Leica, Njemačka). Dobivene snimke obrađene su koristeći programe LAS AF Lite (Leica, Njemačka), ImageJ i Statistica (opisano u nastavku, u poglavlju **3.9**).

**Tablica 4.** Popis korištenih primarnih protutijela.

| ciljani antigen                | protutijelo (klon) | proizvođač<br>(kataloški broj)        | metoda |         |
|--------------------------------|--------------------|---------------------------------------|--------|---------|
|                                |                    |                                       | IHC/IF | WB      |
| C-terminalni kraj proteina APP | APP (Y188)         | Abcam (ab32136)                       | 1:100  | 1:10000 |
| C-terminalni kraj proteina APP | APP (1127)         | <i>dar dr. sc. Mirsade Čaušević</i>   | /      | 1:2000  |
| N-terminalni kraj proteina APP | APP (22C11)        | Merck (MAB348)                        | /      | 1:2000  |
| BACE1                          | BACE1 (D10E5)      | Cell Signaling (#5606)                | 1:100  | 1:1000  |
| Purkinjeovi neuroni            | CALBINDIN (D-28k)  | SWANT (300)                           | 1:500  | 1:1000  |
| mikroglije                     | CD68 (FA-11)       | Bio-Rad (MCA1957)                     | 1:750  | 1:1000  |
| rani endosomi                  | EEA1 (C45B10)      | Cell Signaling (#3288)                | 1:100  | 1:1000  |
| astrociti                      | GFAP (GA5)         | Cell Signaling (#3670)                | 1:500  | 1:1000  |
| mikroglije                     | IBA1 (EPR16588)    | Abcam (ab178846)                      | 1:100  | 1:1000  |
| lizosomi                       | LAMP1              | Sigma-Aldrich (L1418)                 | 1:100  | 1:1000  |
| lizosomi                       | LAMP1 (1D4B)       | Santa Cruz (sc-199929)                | 1:200  | /       |
| jezgre zrelih neurona          | NEUN               | Sigma-Aldrich (ABN78)                 | 1:250  | 1:1000  |
| NPC1                           | NPC1 (EPR5209)     | Abcam (ab134113)                      | 1:100  | 1:2000  |
| kasni endosomi                 | RAB7 (EPR7589)     | Abcam (ab137029)                      | 1:100  | 1:2000  |
| protein seizure 6              | SEZ6               | <i>dar dr. Stefana Lichtenthalera</i> | 1:100  | 1:1000  |
| protein seizure 6-like         | SEZ6L              | <i>dar dr. Stefana Lichtenthalera</i> | 1:2    | 1:10    |
| ukupni protein tau             | TOTAL TAU          | Dako (A0024)                          | /      | 1:5000  |
| fosfo-tau pSer396/404          | pTAU (PHF-1)       | <i>dar dr. Petera Daviesa</i>         | /      | 1:500   |
| fosfo-tau pSer202              | pTAU (CP13)        | <i>dar dr. Petera Daviesa</i>         | /      | 1:500   |
| fosfo-tau pThr231              | pTAU (RZ3)         | <i>dar dr. Petera Daviesa</i>         | /      | 1:250   |
| fosfo-tau pSer202/Thr205       | pTAU (AT8)         | Invitrogen (MN1020)                   | /      | 1:1000  |

**Tablica 5.** Popis korištenih sekundarnih protutijela.

| <b>sekundarna protutijela za imunofluorescenciju</b> |                               |  |                                       |
|--|-------------------------------|--|---------------------------------------|
| <b>domaćin</b>                                       | <b>sekundarno protutijelo</b> | <b>fluorescentni konjugat</b>                                    | <b>proizvođač (kataloški broj)</b>    |
| magarac  | protu-IgG kunića              | AlexaFluor 488   | Invitrogen, Molecular Probes (A21206) |
|  | protu-IgG štakora             | AlexaFluor 488   | Invitrogen, Molecular Probes (A21208) |
|  | protu-IgG miša                | AlexaFluor 594   | Invitrogen, Molecular Probes (A21203) |
|  | protu-IgG štakora             | AlexaFluor 647   | Invitrogen, Molecular Probes (A78947) |
|  | protu-IgG kunića              | AlexaFluor 680   | Invitrogen, Molecular Probes (A10043) |
| koza   | protu-IgG kunića              | AlexaFluor 488   | Invitrogen, Molecular Probes (A11008) |
|  | protu-IgG miša                | AlexaFluor 594   | Invitrogen, Molecular Probes (A11005) |
|  | protu-IgG štakora             | AlexaFluor 647   | Invitrogen, Molecular Probes (A21247) |
| <b>sekundarna protutijela za metodu Western blot</b> |                               |  |                                       |
| <b>domaćin</b>                                       | <b>sekundarno protutijelo</b> | <b>enzimatski konjugat</b>                                       | <b>proizvođač (kat. br.)</b>          |
| koza   | protu-IgG kunića              | peroksidaza iz hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i> , HRP) | Bio-Rad (170-6515)                    |
|  | protu-IgG miša                |  | Bio-Rad (170-6516)                    |
|  | protu-IgG štakora             |  | Bio-Rad (5204-2504)                   |



### 3.7. Priprema homogenata mozgova

Od pojedinačnih diseciranih regija mozga (malog mozga, kore velikog mozga i hipokampusa) pripremljeni su homogenati tkiva, i to citosolna frakcija u puferu DEA (0,25% dietilamin, 100 mM NaCl) te membranska frakcija u puferu TRITON (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 mM EDTA). Neposredno prije homogenizacije, u pufere su dodani proteazni (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Švicarska) i fosfatazni inhibitori (PhosSTOP, Roche, Švicarska). Mikrotubice s tkivom su izvagane (analitička vaga Ohaus E02130 Explorer, SAD), a masa tkiva određena je oduzimanjem mase prazne mikrotubice.

Na ledu, u stakleni homogenizator Dounce dodan je volumen ( $\mu\text{L}$ ) pufera DEA 10 puta veći od mase tkiva (mg) za mali mozak i koru velikog mozga, odnosno 7 puta veći za hipokampus. Tkivo je zatim prebačeno u odgovarajući homogenizator i usitnjeno s 30 potisaka klipom homogenizatora. Homogenati su prikupljeni u tube za ultracentrifugu (4 mL Open-Top Thickwall Polycarbonate Tube, 13 x 64mm, Beckman Coulter, SAD). Korištena je ultracentrifuga Optima XL-100K (Beckman Coulter, SAD) s rotorom 50.4 Ti ultra<sup>2</sup>. Uzorci su centrifugirani na 100000 $\times$ g tijekom 30 min pri 4 °C. Supernatant je prebačen u novu mikrotubicu te označen kao citosolna frakcija homogenata.

U tubu s peletom zatim je dodan isti početni volumen pufera TRITON. Pelet je odvojen sa stijenke tube pomoću špatule te je sadržaj preliven u homogenizator. Pelet je usitnjen s 30 potisaka klipom homogenizatora. Homogenat je prebačen u novu mikrotubicu, dodatno usitnjen s 10 provlačenja kroz iglu (23G; BD Microlance, SAD) te ostavljen na ledu tijekom 30 min. Homogenati su zatim prebačeni u tube za ultracentrifugu i centrifugirani na 100000 $\times$ g tijekom 30 min pri 4 °C. Supernatant je prebačen u novu mikrotubicu te označen kao membranska frakcija homogenata. Uzorci su alikvotirani i pohranjeni pri -80 °C do daljnje obrade.

---

<sup>2</sup> Zbog kvara navedene ultracentrifuge, dio uzoraka pripremljen je koristeći centrifugu Avanti J-E (Beckman Coulter, SAD) s rotorom JA-21. Centrifugiranje ovih uzoraka odvijalo se na 50000 $\times$ g tijekom 1 h pri 4 °C u tubama za ultracentrifugu (10 mL Open-Top Thickwall Polycarbonate Tube, 16 x 76mm, Beckman Coulter, SAD).

### 3.8. Analiza razine biljega neuropatoloških značajki bolesti Niemann-Pick tipa C i supstrata enzima BACE1

Metodom Western blot (WB) u homogenatima mozgova miševa ispitana je razina proteina od interesa. S ciljem analize iste količine proteina uzoraka, u svim je homogenatima izmjerena ukupna koncentracija proteina, koristeći komercijalni komplet BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, SAD). Apsorbancija uzoraka izmjerena je pri 570 nm koristeći spektrofotometar Multiskan EX (Thermo Scientific, SAD). Iz standardne krivulje definirane pomoću uzoraka poznatih koncentracija (serijsko razrjeđenje proteina BSA početne koncentracije 2 mg/mL iz kompleta), izračunata je koncentracija proteina u pojedinim homogenatima.

Otopljeni alikvoti homogenata zatim su pomiješani s puferom za nanošenje: korišten je pufer 6×*Sample Buffer* (6 mL glicerol, 1,2 g SDS, 0,31 g DTT, 1,25 mL 0,5 M Tris pH 6,8, boja bromfenol modro, destilirana voda do ukupnog volumena 10 mL) te pufer 6×*Non-Reducing* (bez DTT) za analizu proteina SEZ6L i CD68 u nereducirajućim uvjetima. Uzorci su denaturirani u termobloku pri 70 °C tijekom 10 min, a zatim promiješani na vortex miješalici i centrifugirani na maksimalnoj brzini tijekom 1 min.

Pripremljeni homogenati nanoseni su na Tris-glicin poliakrilamidne gelove (sastav gelova naveden je u **Tablici 6**), i to 20 µg proteina uzoraka topive frakcije, odnosno 15 µg proteina uzoraka membranske frakcije<sup>3</sup>. Vertikalna elektroforeza odvijala se u sustavu Mini-PROTEAN (BioRad, SAD) u puferu za elektroforezu (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS, pH 8,3), prvo pod stalnim naponom od 100 V (tijekom otprilike 20 min, do sabijanja uzoraka), a zatim pod naponom od 120-150 V do dostizanja željenog razdvajanja proteina, što je praćeno pomoću standardnog proteinskog biljega (Cozy Prestained Protein Ladder, highQu, Njemačka).

**Tablica 6.** Sastav Tris-glicin poliakrilamidnih gelova za vertikalnu elektroforezu.

| reagensi                              | gel za razdvajanje (mL) |       |       |       |       | gel za sabijanje (mL) |
|---------------------------------------|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|
|                                       | 6%                      | 8%    | 10%   | 12%   | 15%   | 5%                    |
| dH <sub>2</sub> O                     | 5,4                     | 4,7   | 4,1   | 3,4   | 2,4   | 6,9                   |
| 30% akrilamid/<br>bisakrilamid (29:1) | 2,0                     | 2,7   | 3,3   | 4,0   | 5,0   | 1,7                   |
| 1,5 M Tris-HCl pH 8,8                 | 2,5                     | 2,5   | 2,5   | 2,5   | 2,5   | /                     |
| 1 M Tris-HCl pH 6,8                   | /                       | /     | /     | /     | /     | 1,25                  |
| 10% amonijev persulfat                | 0,1                     | 0,1   | 0,1   | 0,1   | 0,1   | 0,1                   |
| TEMED                                 | 0,008                   | 0,006 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,01                  |

<sup>3</sup> Zbog malog prinosa proteina uslijed homogenizacije tkiva hipokampusu, za analizu ove regije metodom WB na gelove je nanošeno 20 µg proteina uzoraka topive frakcije, odnosno 7 µg proteina uzoraka membranske frakcije.

Po završetku elektroforeze, gelovi su inkubirani u puferu za prijenos (25 mM Tris, 192 mM glicin, 20% metanol, pH 8,4) tijekom 10 min. Gelovi su zatim složeni u kazete za prijenos proteina, na polivinilnu membranu (PVDF Western Blotting Membranes, Roche, Švicarska). Prijenos proteina odvijao se u sustavu Mini-PROTEAN u puferu za prijenos, pri stalnoj jakosti struje od 100 mA tijekom 16 h pri 4 °C.

Nakon prijenosa proteina iz gela na membranu, membrana je obojana metodom AMIDO BLACK, u svrhu provjere kvalitete prijenosa proteina te za normalizaciju kasnijih rezultata imunodetekcije. Svi daljnji koraci odvijali su se uz njihanje (tresilica UltraRocker Rocking Platform, BioRad, SAD). Membrana je inkubirana u 1×PBS pri sobnoj temperaturi tijekom 10 min, a zatim u otopini boje AMIDO BLACK (0,1% AMIDO BLACK 10B, 20% metanol, 2% octena kiselina, destilirana voda) tijekom 2 min. Membrana je zatim isprana u otopini za odbojavanje (45% metanol, 7% octena kiselina, destilirana voda) dva puta tijekom 30 min, te snimljena koristeći uređaj UVITEC Alliance Q9 Mini (UVITEC, UK). Nakon četiri ispiranja u redestiliranoj vodi tijekom 2 min, membrana je isprana u puferu TBS-T (engl. *Tris-Buffered Saline*; 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1% Tween-20) tijekom 20 min.

Membrana je zatim inkubirana u otopini za blokiranje, i to u 5%-tnoj otopini I-BLOCK (Tropix, SAD) u puferu 1×PBS tijekom 1 h uz njihanje. Slijedila je inkubacija u otopini primarnog protutijela (popis i razrjeđenja korištenih primarnih protutijela navedena su u **Tablici 4**) pripremljenog u otopini za blokiranje, a odvijala se preko noći pri 4 °C uz njihanje (tresilica ROCKER 35A, Labnet, SAD). Idući dan, membrana je isprana u puferu TBS-T pri sobnoj temperaturi tri puta tijekom 10 min uz njihanje, a zatim inkubirana tijekom 1 h u otopini sekundarnog protutijela označenog s enzimom HRP (1:5000; korištena sekundarna protutijela navedena su u **Tablici 5**) pripremljenog u otopini za blokiranje. Membrana je opet isprana u puferu TBS-T tri puta tijekom 10 min, nakon čega je slijedila detekcija signala.

Membrana je ocijedena te inkubirana u otopini za kemiluminiscenciju koja sadrži supstrat peroksidaze hrena (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, SAD) u mraku tijekom 1 min, a kemiluminiscentni signal na mjestu proteinskih vrpca zabilježen je koristeći uređaj UVITEC Alliance Q9 Mini. Nakon detekcije, membrane su isprane u puferu TBS-T tijekom 10 min. Dobiveni rezultati obrađeni su koristeći programe ImageJ i Statistica (opisano u nastavku, u poglavlju **3.9**).

### 3.9. Kvantifikacija i statistička analiza rezultata

Snimke kriorezova dobivene konfokalnim mikroskopom kvantificirane su programom ImageJ (NIH, SAD), prema protokolu za kvantifikaciju intenziteta [185]. Proteinske vrpce zabilježene metodom WB i ukupna količina proteina zabilježena bojom AMIDO BLACK kvantificirane su pomoću programa ImageJ. Kvantificirani signal pojedinog biljega zatim je normaliziran prema kvantitativnim vrijednostima AMIDO BLACK za odgovarajuću membranu. Svi rezultati grafički su prikazani kao srednja vrijednost intenziteta biljega, odnosno količine proteina za skupinu (genotip)  $\pm$  standardna devijacija (SD), relativno prema jedinkama divljeg tipa (N-WT, tj. N-WT B-WT). Statistička analiza podataka provedena je pomoću programa StatSoft STATISTICA 8 (TIBCO Software, SAD). Normalna raspodjela podataka provjerena je Shapiro-Wilk testom. U prvoj skupini rezultata uspoređivane su dvije skupine uzoraka (mišji mozgovi genotipa N-WT i N-KI; poglavlje 4.1.) te je za njihovu usporedbu korišten t-test (za podatke s normalnom raspodjelom), odnosno Mann-Whitney U test (za podatke koji nemaju normalnu raspodjelu). U drugoj skupini rezultata uspoređivano je šest skupina uzoraka (mišji mozgovi genotipova N-WT B-WT, N-KI B-WT, N-KI B-HET, N-KI B-KO, N-WT B-HET i N-WT B-KO; poglavlje 4.2.) te je za njihovu usporedbu korišten jednosmjerni ANOVA test (za podatke s normalnom raspodjelom), odnosno Kruskal-Wallis test (za podatke koji nemaju normalnu raspodjelu). Statističke analize napravljene su na razini značajnosti  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

Cilj ovog doktorskog rada bio je generirati novi mišji model bolesti NPC s deletiranim genom *BACE1*, tako da se miševima linije *NPCI-I1061T* križanjem s linijom miševa *BACE1* deletira jedan ili oba alela gena *BACE1*. Korišteno je šest genotipova od interesa, i to N-WT B-WT (kontrolne jedinke divljeg tipa), N-KI B-WT, N-KI B-HET, N-KI B-KO, te dodatne kontrole, N-WT B-HET i N-WT B-KO. Ovim jedinkama karakterizirane su neuropatološke značajke bolesti NPC, i to neurodegeneracija (odumiranje Purkinjeovih neurona u malom mozgu), poremećaj endolizosomalnog puta (nakupljanje endosoma i lizosoma), neuroinflamacija (aktivacija astrocita i mikroglia) i hiperfosforilacija proteina tau. Ispitana je i razina enzima *BACE1* te njegova proteolitička aktivnost (na osnovi analize razine cijepanja supstrata APP, SEZ6 i SEZ6L; poglavlje 4.2.). Također, prethodno je provjereno da sama linija *NPCI-I1061T* u našim uvjetima uzgoja rekapitulira iznad navedene značajke bolesti NPC kao što je opisano i u literaturi [85] (poglavlje 4.1.). Uzorci (kriorezovi i homogenati mozgovia miševa) su prikupljeni, obrađeni i analizirani metodama imunohistokemije, odnosno imunofluorescencije, te metodom WB (opisano u poglavlju 3.).

Analizirane su tri regije mozga: mali mozak (primarno pogođena regija u bolesti NPC zbog odumiranja Purkinjeovih neurona), kora velikog mozga (regija u kojoj je patologija prisutna, ali manje izražena) te hipokampus (regija koja se smatra zaštićenom). Imunohistokemijska analiza napravljena je na kriorezovima mozgovia jedinki miješanog spola ( $n=4-6$ ) u više tehničkih replikata. Analiza metodom WB napravljena je na homogenatima mozgovia jedinki miješanog spola ( $n_{\text{mali mozak}}=4$ ,  $n_{\text{kora velikog mozga}}=4$  ili  $6^4$ ,  $n_{\text{hipokampus}}=4$ ). Analiza homogenata hipokampusa napravljena je u manjem obujmu zbog male količine tkiva, odnosno posljedično malog volumena dobivenog homogenata. Na temelju rezultata dobivenih analizom malog mozga i kore velikog mozga, analiza hipokampusa metodom WB usmjerena je na najrelevantnije biljege i biljege s kvalitetnom imunodetekcijom. Zabilježeni signal svih biljega normaliziran je prema odgovarajućoj ukupnoj razini proteina na membrani (utvrđeno bojom AMIDO BLACK). Zbog jednostavnosti prikaza, u nastavku je za svaku skupinu biljega prikazana samo jedna membrana, odnosno po jedan reprezentativni blot za svaki analizirani biljeg (prikazani uzorci su biološki replikati). Dobiveni rezultati su kvantificirani koristeći program ImageJ te statistički obrađeni odgovarajućim statističkim testovima.

---

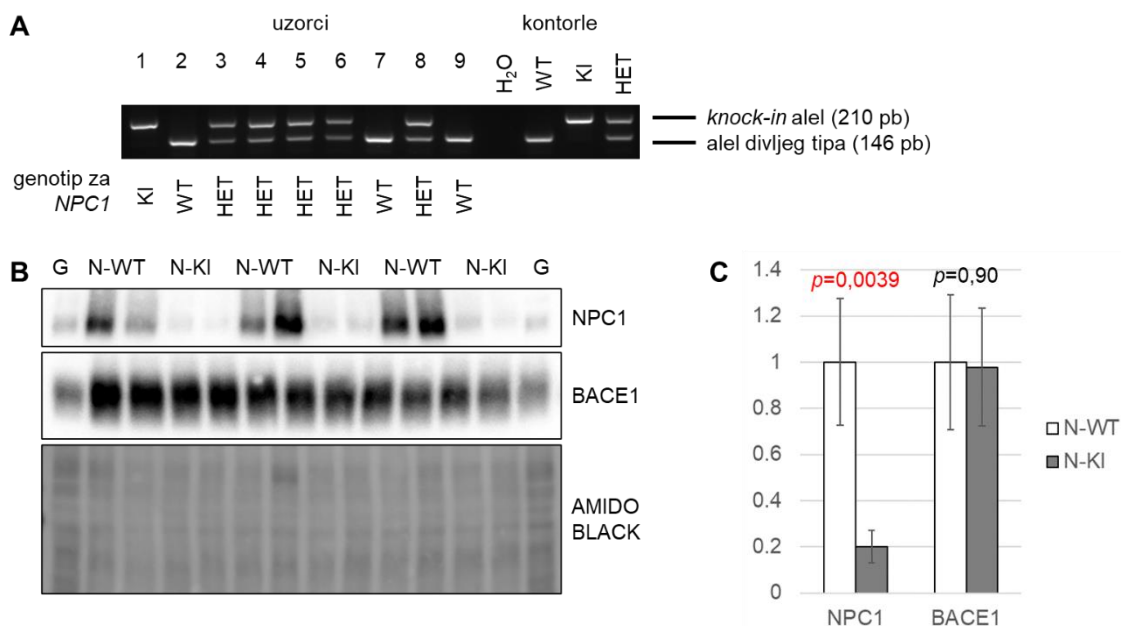
<sup>4</sup> Za validaciju miševa linije *NPCI-I1061T* metodom WB korišteno je šest uzoraka po skupini (genotipu), dok je četiri uzorka po skupini (genotipu) korišteno za karakterizaciju miševa dobivenih križanjem linija *NPCI-I1061T* i *BACE1*.

#### 4.1. Validacija mišjeg modela *knock-in NPC1-I1061T*

Za validaciju modela *NPC1-I1061T* korištene su jedinke divljeg tipa (N-WT) i jedinke *knock-in NPC1-I1061T* (N-KI) starosti 15 tjedana. Sve regije mozga od interesa (mali mozak, kora velikog mozga i hipokampus) analizirane su imunohistokemijom, dok su za analizu metodom WB korišteni samo homogenati kore velikog mozga. Detaljnija analiza preostalih dobnih skupina (četiri i 9 tjedana starosti), te analiza homogenata preostalih regija (malog mozga i hipokampusa) metodom WB napravljene su i opisane u nastavku, u sklopu karakterizacije nove linije dobivene križanjem miševa linije *NPC1-I1061T* i linije *BACE1* (poglavlje 4.2.).

##### 4.1.1. Genotipizacija i analiza razine proteina NPC1 i BACE1 u mozgu miševa linije *NPC1-I1061T*

Nakon uspostavljanja kolonije miševa linije *NPC1-I1061T* u PLŽ-u IRB-a, jedinke divljeg tipa i jedinke N-KI odabrane su koristeći genotipizaciju metodom PCR (Slika 6 A). Genotip je dodatno potvrđen u homogenatima kore velikog mozga analizom proteina NPC1 i BACE1 metodom WB (Slika 6 B, C). Razina proteina NPC1 u jedinki N-KI starosti 15 tjedana je značajno snižena, te iznosi oko 20% razine proteina NPC1 zabilježene u jedinki divljeg tipa. Sve analizirane jedinke sadrže divlji tip gena *BACE1*, te nije zabilježena razlika u razini proteina BACE1 između uspoređivanih skupina.

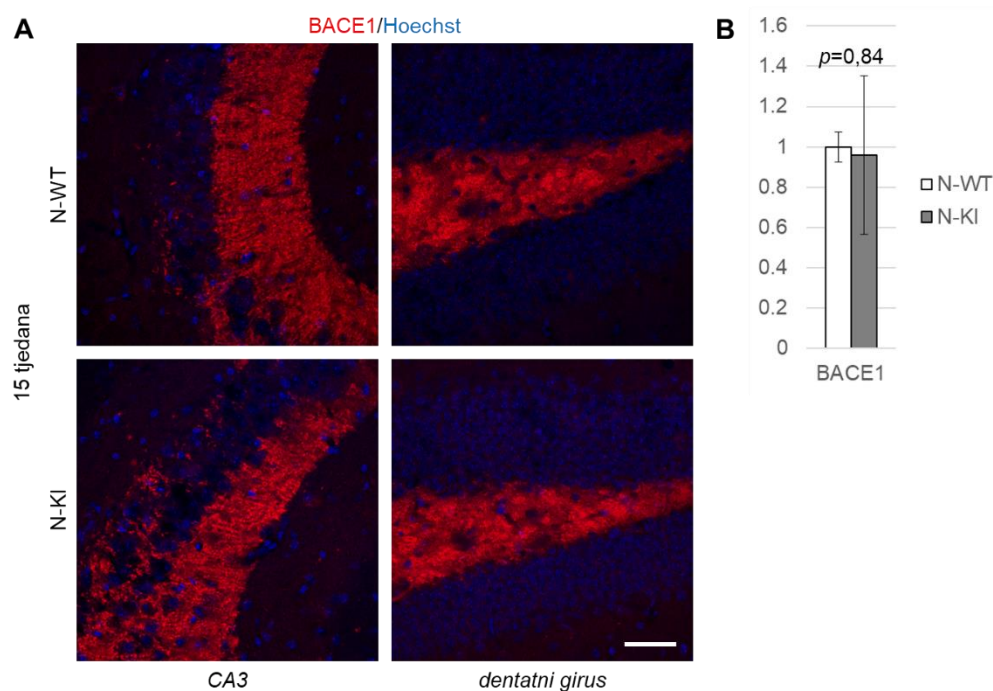


Slika 6. Genotipizacija i analiza razine proteina NPC1 i BACE1 u mozgu miševa linije *NPC1-I1061T*. A Primjer genotipizacije miševa metodom PCR za gen *NPC1*. H<sub>2</sub>O – negativna kontrola, WT – jedinke divljeg tipa, KI – jedinke *knock-in NPC1-I1061T*, HET – jedinke heterozigoti za gen *NPC1-I1061T*, pb –

parovi baza. **B** Analiza razine proteina NPC1 i BACE1 metodom WB u homogenatima kore velikog mozga jedinki divljeg tipa i jedinki N-KI. G – interna kontrola (od engl. *generic brain sample*). **C** Kvantitativni prikaz razine proteina NPC1 i BACE1 u homogenatima kore velikog mozga jedinki divljeg tipa i jedinki N-KI starosti 15 tjedana. Na grafu su prikazane *p* vrijednosti dobivene odgovarajućom statističkom analizom.

#### 4.1.2. Analiza intenziteta i raspodjele enzima BACE1 u mozgu miševa linije *NPC1-I1061T*

Miševi linije *NPC1-I1061T* sadrže divlji tip gena *BACE1*, te nije uočena razlika u razini proteina BACE1 između jedinki divljeg tipa i jedinki N-KI starosti 15 tjedana (**Slika 6 B, C**). Imunohistokemijskom analizom kriorezova mozgova debljine 16  $\mu\text{m}$  također je pokazano da nema razlike u intenzitetu bojanja i raspodjeli enzima BACE1 u hipokampusu jedinki N-KI u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od 15 tjedana (**Slika 7**). Enzim BACE1 ovom je metodom zabilježen samo u mahovinastim vlaknima hipokampusa.

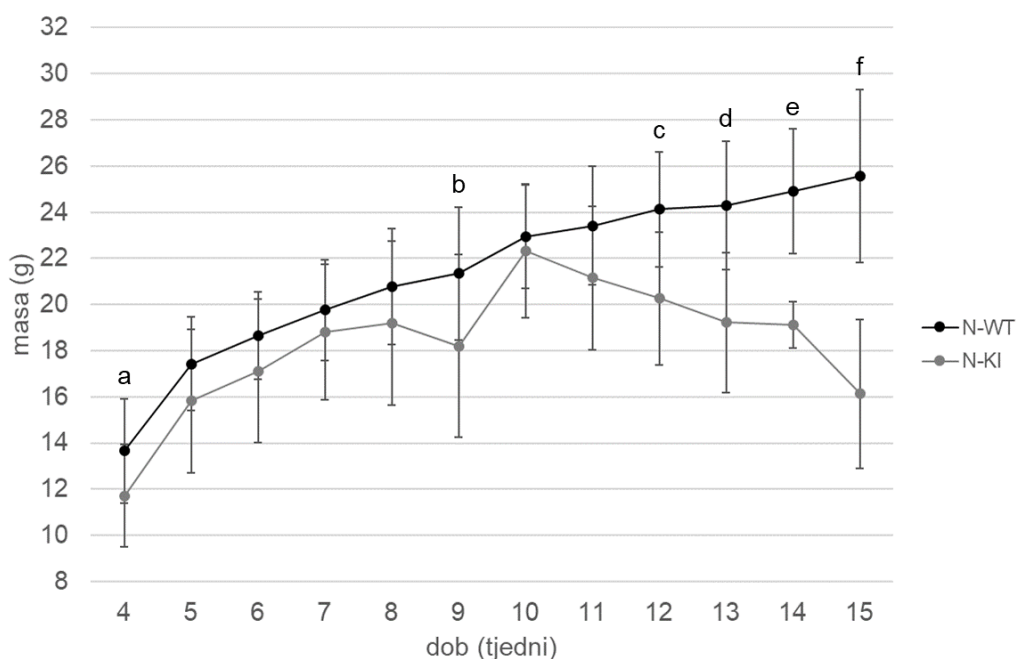


**Slika 7. Analiza intenziteta i raspodjele bojanja enzima BACE1 u hipokampusu miševa linije *NPC1-I1061T*. A** Raspodjela enzima BACE1 u mahovinastim vlaknima hipokampusa jedinki divljeg tipa i jedinki N-KI starosti 15 tjedana. Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). BACE1 (crveno) – biljeg enzima BACE1. Skala 50  $\mu\text{m}$ . **B** Kvantitativni prikaz intenziteta bojanja enzima BACE1 u hipokampusu jedinki divljeg tipa i jedinki N-KI. Na grafu je prikazana *p* vrijednost dobivena odgovarajućom statističkom analizom.

### 4.1.3. Analiza fenotipa miševa linije NPC1-I1061T

U svrhu validacije modela NPC1-I1061T u uvjetima uzgoja u PLŽ-u IRB-a, odabranim jedinkama analizirane su patološke značajke bolesti NPC. Potvrđeno je da u usporedbi s jedinkama divljeg tipa, u završnoj fazi bolesti (u dobi od 15 tjedana), jedinke N-KI pokazuju očekivane patološke promjene karakteristične za bolest NPC, uključujući neurodegeneraciju Purkinjeovih neurona u malom mozgu, nakupljanje kolesterola, poremećaj endolizosomalnog puta, neuroinflamaciju (aktivaciju mikroglija i astrocita) i dr.

Jedinke N-KI imaju značajno manju tjelesnu masu u trenutku odbijanja od majke (u dobi od četiri tjedna; **Slika 8**) te pokazuju progresivan gubitak tjelesne mase nakon navršenih 10 tjedana, pri čemu je razlika u odnosu na jedinke divljeg tipa značajna nakon 12 tjedana starosti. Također, jedinke N-KI pokazuju i progresivni tremor u mirovanju s početkom u dobi od šest do 8 tjedana. Životni vijek ovih jedinki u našim uvjetima uzgoja iznosi oko 18 tjedana ( $127 \pm 8$  dana;  $n=3$ ).

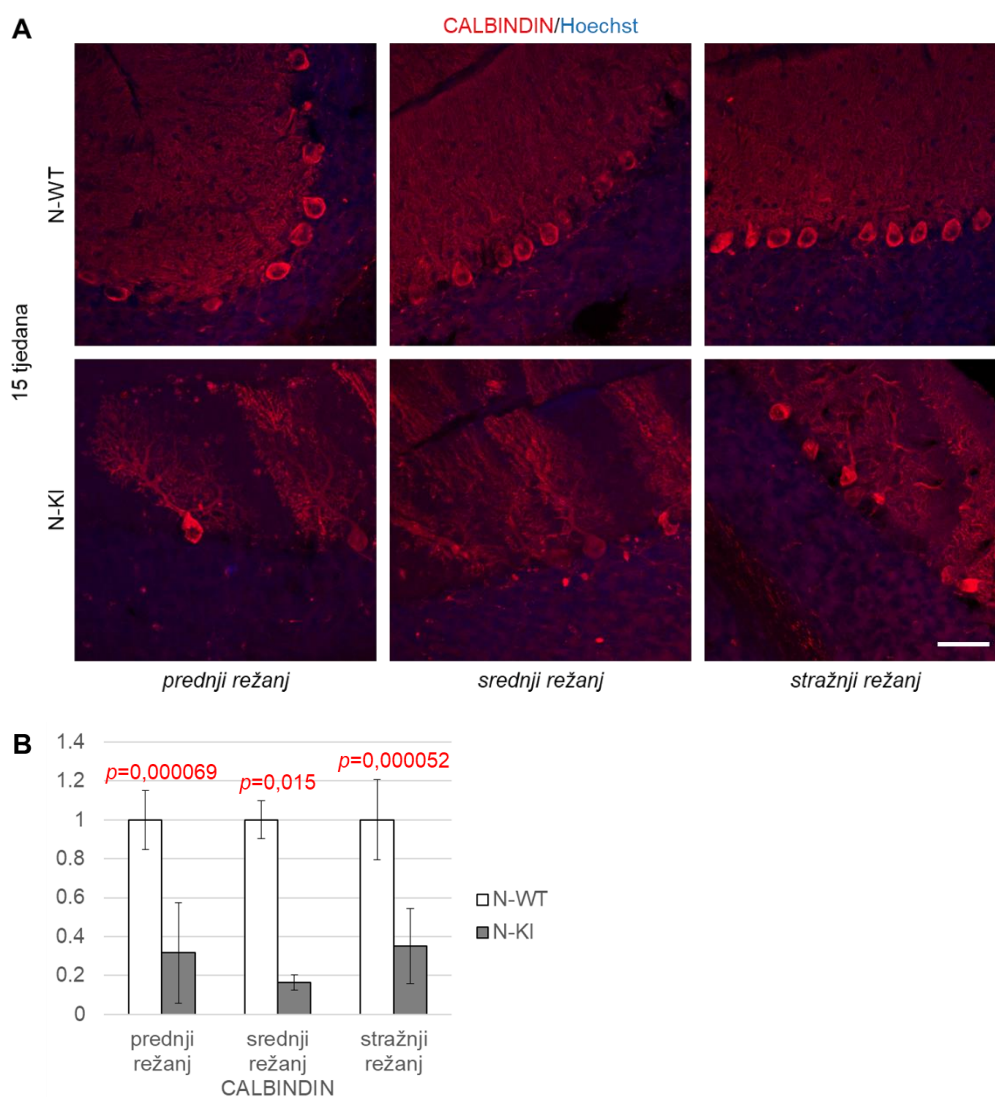


**Slika 8. Analiza tjelesne mase miševa linije NPC1-I1061T.** Zabilježen je progresivan gubitak tjelesne mase jedinki N-KI u odnosu na jedinke divljeg tipa nakon 10 tjedana starosti. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost skupine (genotipa)  $\pm$  SD. Jedinke N-KI imaju statistički značajno manju masu u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od a) četiri tjedna ( $p=0,0028$ ), b) 9 tjedana ( $p=0,0067$ ), c) 12 tjedana ( $p=0,016$ ), d) 13 tjedana ( $p=0,0066$ ), e) 14 tjedana ( $p=0,00084$ ) i f) 15 tjedana ( $p<0,00001$ ). Broj analiziranih jedinki po skupini (genotipu) je  $n_{4 \text{ tjedna}}=27$ ,  $n_{5-9 \text{ tjedana}}=18$ ,  $n_{10-15 \text{ tjedana}}=9$ .



#### 4.1.4. Neurodegeneracija u malom mozgu miševa linije NPC1-I1061T

Osnovna neuropatološka karakteristika bolesti NPC je neurodegeneracija, odnosno odumiranje Purkinjeovih neurona u malom mozgu. Kriorezovi mozgovna jedinki divljeg tipa i jedinki N-KI debljine 30  $\mu\text{m}$  analizirani su metodom imunohistokemije, odnosno imunofluorescencije, koristeći protutijelo za CALBINDIN (biljeg Purkinjeovih neurona). U usporedbi s jedinkama divljeg tipa, jedinke N-KI starosti 15 tjedana pokazuju značajan gubitak Purkinjeovih neurona, i to pravocrtno, od prednjih prema stražnjim reznjevima malog mozga (Slika 9). Osim smanjenog broja tijela Purkinjeovih neurona, vidljivo je i odumiranje njihovih procesa u molekularnom sloju malog mozga.



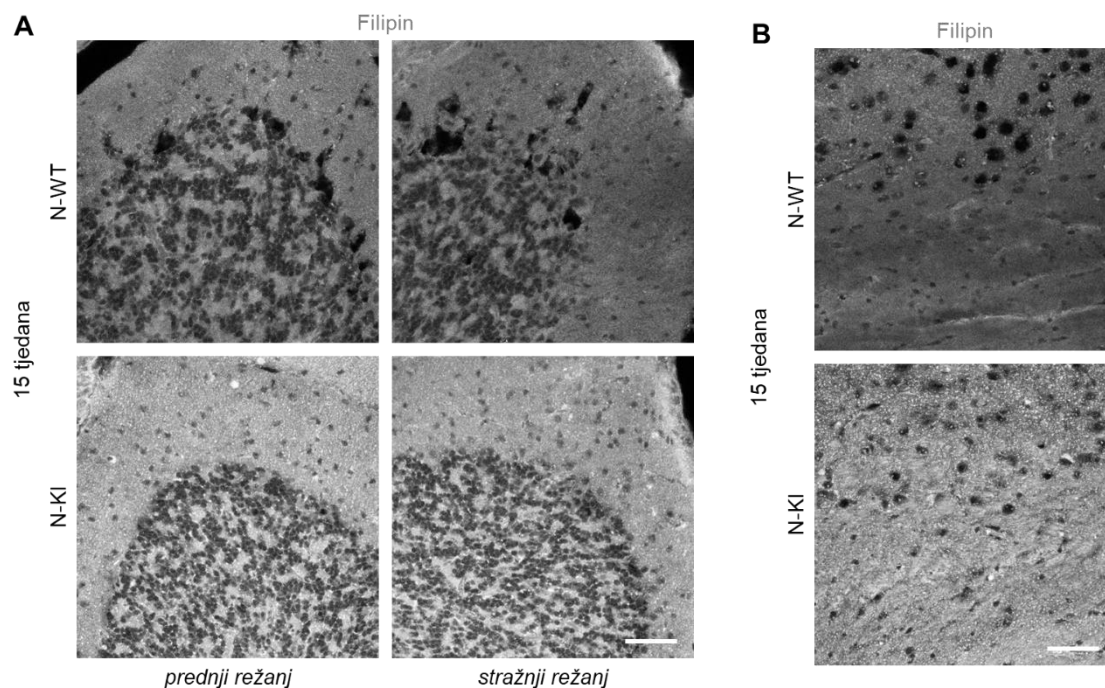
**Slika 9. Analiza neurodegeneracije Purkinjeovih neurona u malom mozgu miševa linije NPC1-I1061T.** A Linearna neurodegeneracija Purkinjeovih neurona u malom mozgu jedinki N-KI starosti 15 tjedana u odnosu na jedinke divljeg tipa. Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). Calbindin (crveno) – biljeg Purkinjeovih neurona. Skala 50  $\mu\text{m}$ . B Kvantitativni prikaz razine Purkinjeovih

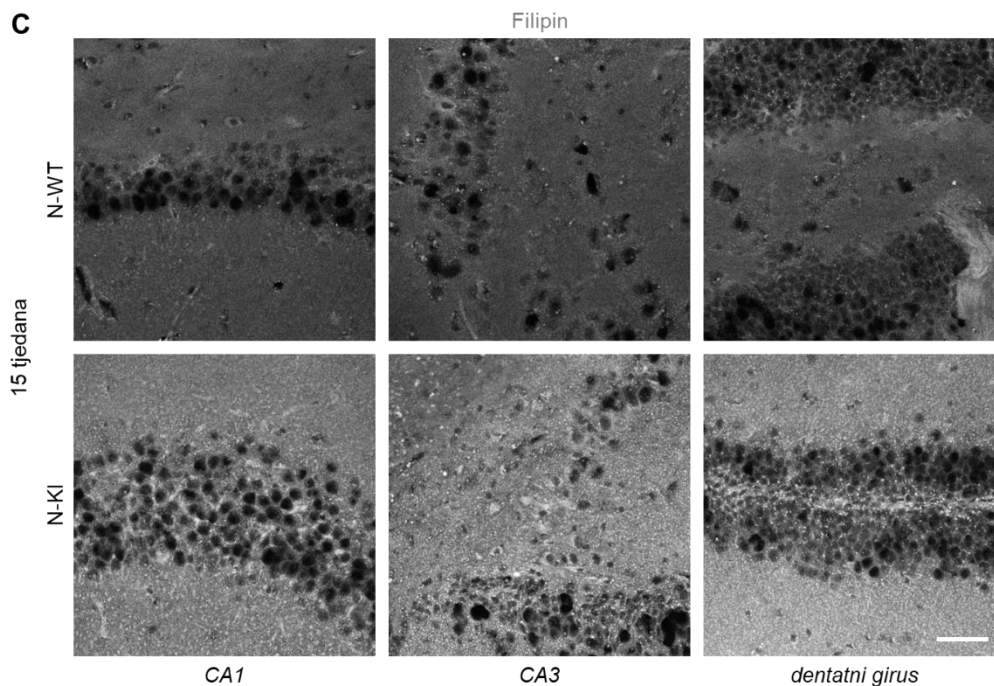
neurona u prednjim, srednjim i stražnjim režnjevima malog mozga jedinki divljeg tipa i jedinki N-KI starosti 15 tjedana. Na grafu su prikazane *p* vrijednosti dobivene odgovarajućom statističkom analizom.

#### 4.1.5. Nakupljanje slobodnog kolesterola u mozgu miševa linije NPC1-I1061T

Bolest NPC karakterizira nakupljanje slobodnog, neesterificiranog kolesterola (kao i drugih lipida, npr. sfingomijelina i gangliozida) u kasnim endosomima i lizosomima uslijed disfunkcije proteina NPC1 ili NPC2. U skladu s tim, zbog prethodno utvrđene snižene razine proteina NPC1-I1061T u jedinki N-KI (Slika 6 B, C), ispitano je nakupljanje slobodnog kolesterola u mozgovima ovih jedinki. Kriorezovi mozgova debljine 16  $\mu\text{m}$  analizirani su metodom imunohistokemije, odnosno obojeni otopinom filipina (antibiotika iz bakterije *Streptomyces filipinensis*) koji veže slobodni, neesterificirani kolesterol.

U usporedbi s jedinkama divljeg tipa, jedinke N-KI starosti 15 tjedana pokazuju povećano bojanje filipinom u vidu povišenog intenziteta bojanja te točkastih nakupina u malom mozgu (Slika 10 A), ali i u kori velikog mozga (Slika 10 B) te u različitim regijama hipokampusa (*CA1*, *CA3* i dentatnom girusu; Slika 10 C).





**Slika 10. Analiza nakupljanja slobodnog kolesterola u mozgu miševa linije NPC1-I1061T.** Nakupljanje slobodnog kolesterola u malom mozgu (A), kori velikog mozga (B) i hipokampusu (C) jedinki N-KI starosti 15 tjedana u odnosu na jedinice divljeg tipa. Filipin (bijelo) – slobodni kolesterol, CA1 – *cornu Ammonis 1*, CA3 – *cornu Ammonis 3*. Skala 50 µm.

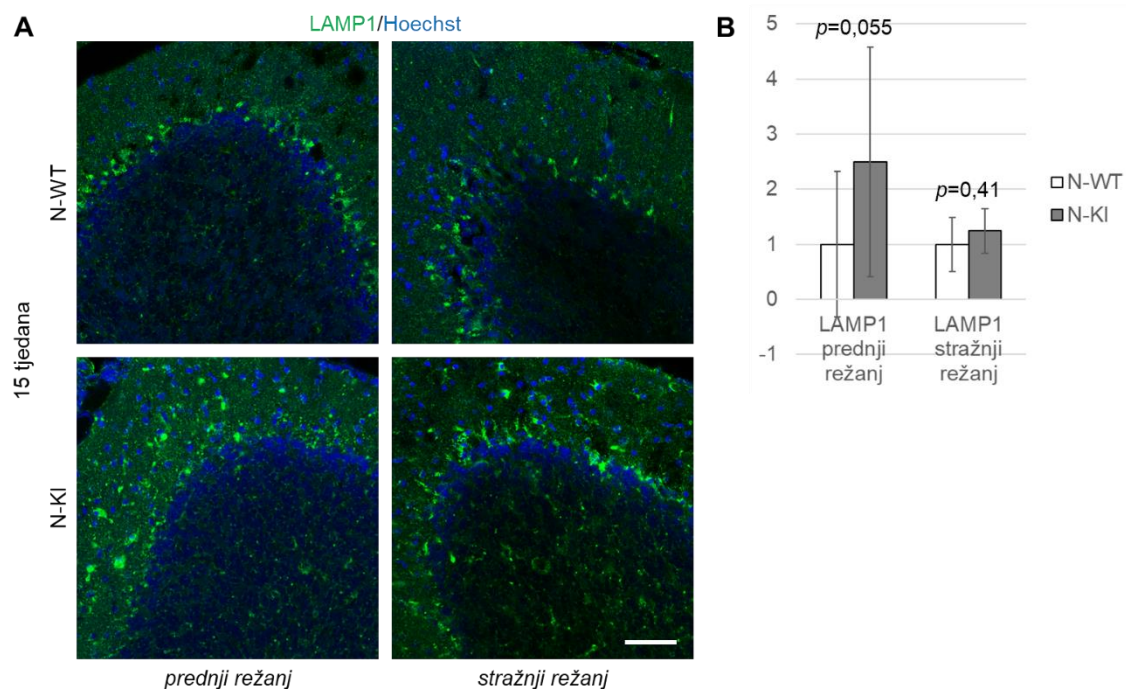
#### 4.1.6. Poremećaj endolizosomalnog puta u mozgu miševa linije NPC1-I1061T

Nakupljanje slobodnog kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima dovodi do povećanja ovih vezikula, što uzrokuje poremećaj u njihovom prijenosu, odnosno poremećaj funkcije endolizosomalnog puta. Kriorezovi mozгова debljine 16 µm analizirani su metodom imunohistokemije, odnosno imunofluorescencije, a homogenati kore velikog mozga metodom WB. Za detekciju vezikula endolizosomalnog puta korištena su protutijela EEA1 (biljeg ranih endosoma), RAB7 (biljeg kasnih endosoma) te LAMP1 (biljeg lizosoma).

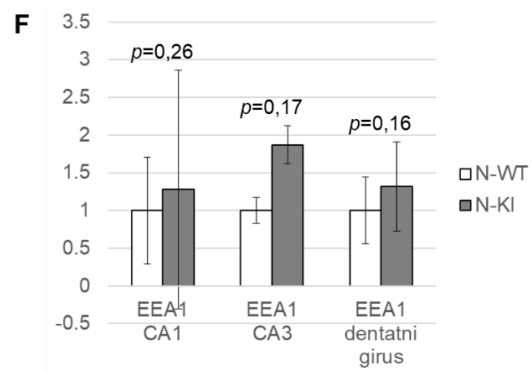
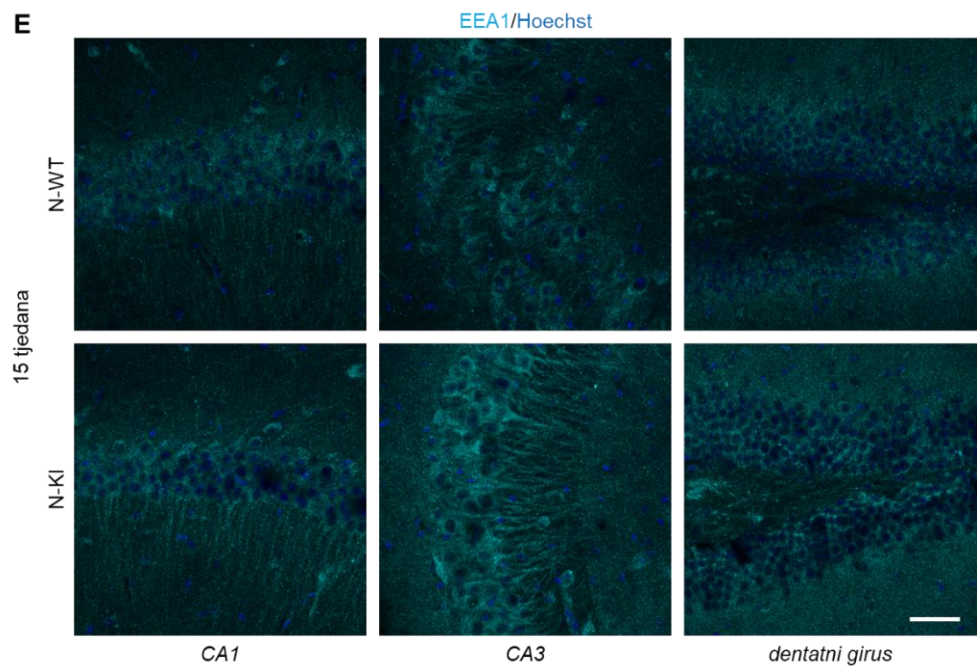
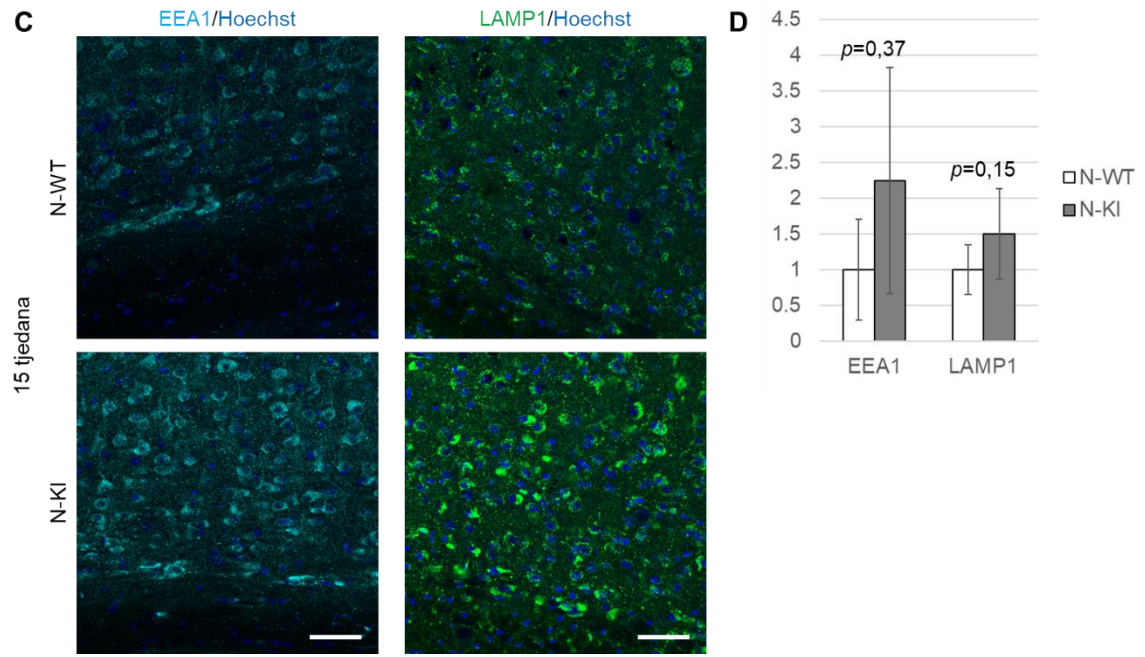
U malom mozgu jedinki divljeg tipa, lizosomalni biljeg LAMP1 zabilježen je primarno u sloju gdje su smještena tijela Purkinjeovih neurona (Slika 11 A). Analiza jedinki N-KI starosti 15 tjedana pokazuje promijenjeno bojanje biljega LAMP1, tj. nakupine lizosoma izraženije su u molekularnom sloju malog mozga. Ova značajka posebno je izražena u prednjim režnjevima malog mozga, a manje izražena u stražnjim režnjevima (Slika 11 A). Kvantifikacijom dobivenih rezultata zabilježena je i povišena razina signala lizosomalnog biljega LAMP1 u prednjim režnjevima malog mozga jedinki N-KI u odnosu na jedinice divljeg tipa (Slika 11 B). Bojanje ranih endosoma u malom mozgu rezultiralo je samo pozadinskim bojanjem, stoga nije prikazano.

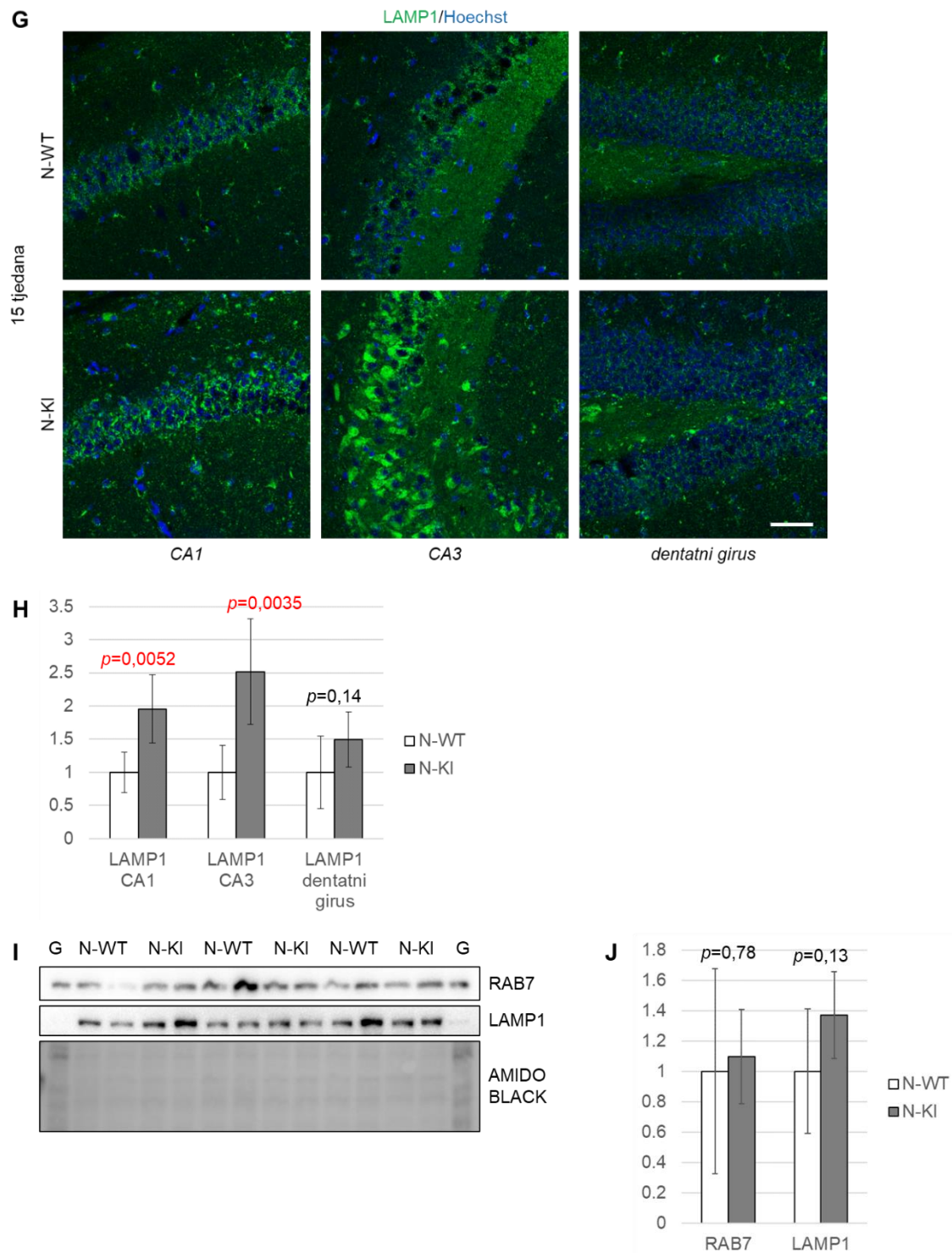
Imunohistokemijska analiza kore velikog mozga pokazala je povišen intenzitet bojanja te nakupljanje biljega ranih endosoma (EEA1) i lizosoma (LAMP1) u jedinki N-KI starosti 15 tjedana u odnosu na jedinke divljeg tipa (**Slika 11 C, D**). Također, imunohistokemijska analiza triju regija hipokampusa pokazala je povišeni intenzitet te nakupljanje biljega ranih endosoma (EEA1; **Slika 11 E, F**) i lizosoma (LAMP1; **Slika 11 G, H**) u jedinki N-KI starosti 15 tjedana u odnosu na jedinke divljeg tipa. Kvantifikacija dobivenih rezultata ukazuje na značajno nakupljanje lizosomalnog biljega LAMP1 u regijama *CA1* i *CA3* hipokampusa jedinki N-KI u odnosu na jedinke divljeg tipa.

Analiza metodom WB pokazala je da u kori velikog mozga nema značajne razlike u razini biljega kasnih endosoma (RAB7) između jedinki N-KI starosti 15 tjedana u odnosu na jedinke divljeg tipa. U usporedbi s jedinkama divljeg tipa, u jedinki N-KI starosti 15 tjedana dolazi do porasta razine biljega lizosoma (LAMP1; **Slika 11 I, J**), ali razlika nije statistički značajna. Proširena analiza razine ovih biljega u različitim dobnim skupinama prikazana je u nastavku (u poglavlju 4.2.). Osim promjene razine biljega LAMP1, zabilježena je i razlika u razini biljega EEA1 i/ili RAB7, ukazujući na poremećaj endolizosomalnog puta.









**Slika 11. Analiza biljega endolizosomalnog puta u mozgu miševa linije NPC1-I1061T.** Nakupljanje biljega lizosoma (LAMP1) u malom mozgu (A, B), te nakupljanje biljega ranih endosoma (EEA1) i biljega lizosoma (LAMP1) u kori velikog mozga (C, D) i hipokampusu (E-H) jedinki N-KI u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od 15 tjedana. Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). EEA1 (tirkizno) – biljeg ranih endosoma, LAMP1 (zeleno) – biljeg lizosoma. Skala 50  $\mu$ m. I, J Razina biljega kasnih endosoma i lizosoma u homogenatima kore velikog mozga jedinki divljeg tipa i jedinki N-KI starosti 15 tjedana. RAB7 – biljeg kasnih endosoma, LAMP1 – biljeg lizosoma. Na grafovima su prikazane  $p$  vrijednosti dobivene odgovarajućom statističkom analizom.

#### 4.1.7. Analiza neuroinflamacije u mozgu miševa linije NPC1-I1061T

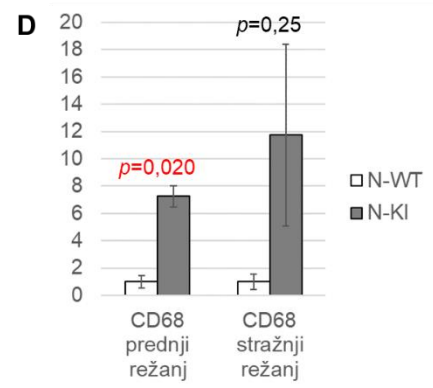
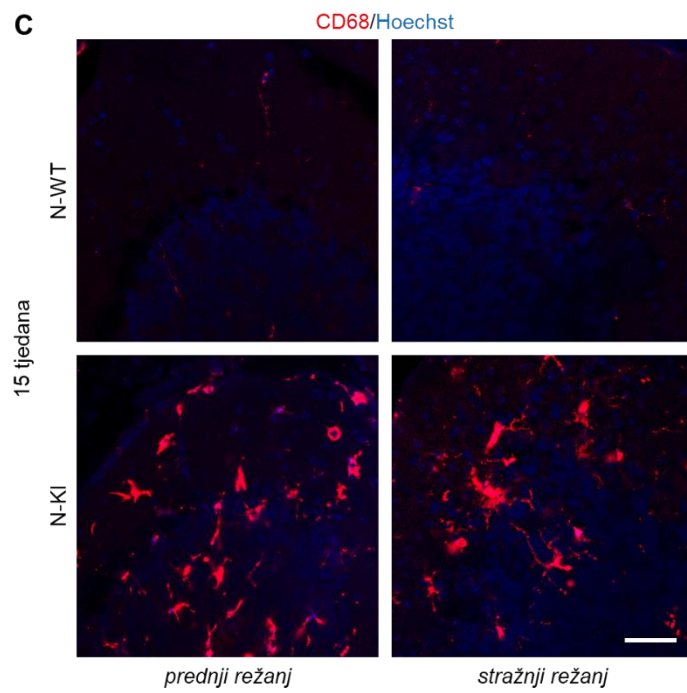
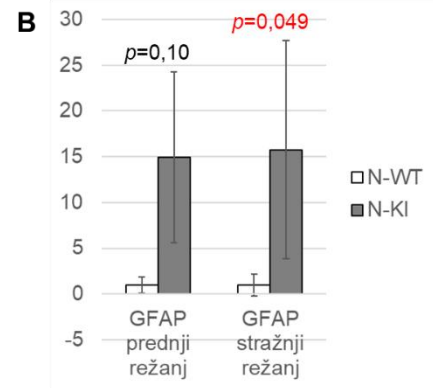
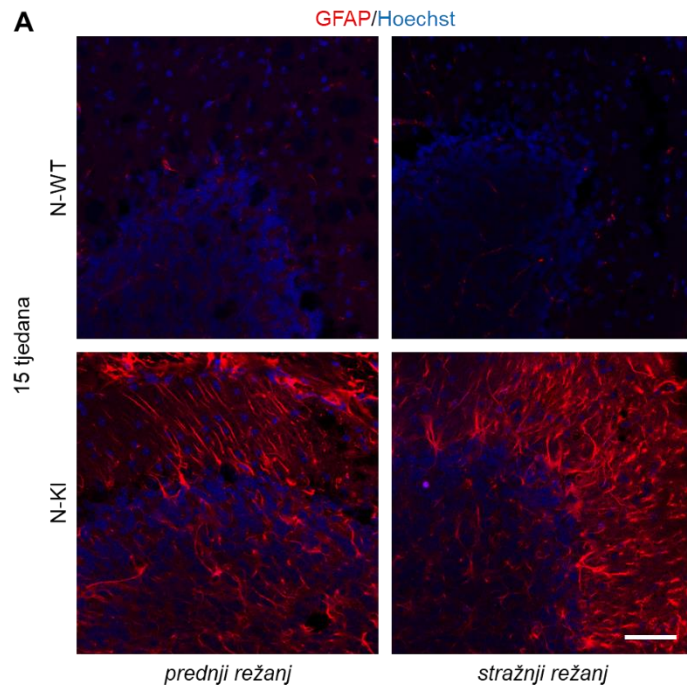
Uz neurodegeneraciju, značajna karakteristika bolesti NPC je i neuroinflamacija, odnosno aktivacija astrocita i mikroglia. Kriorezovi mozgova debljine 30  $\mu\text{m}$  analizirani su metodom imunohistokemije, odnosno imunofluorescencije, a metodom WB analizirani su homogenati kore velikog mozga. Korištena su protutijela GFAP (biljeg astrocita), IBA1 (strukturni biljeg mikroglia) te CD68 (biljeg aktivnih mikroglia, odnosno lizosomske aktivnosti mikroglia).

U usporedbi s malim mozgom jedinki divljeg tipa, gdje nije uočena aktivacija astrocita (**Slika 12 A, B**) ni mikroglia (**Slika 12 C, D**), u malom mozgu jedinki N-KI starosti 15 tjedana pokazana je značajna neuroinflamacija. Snažna aktivacija astrocita i mikroglia prisutna je i u prednjim i u stražnjim režnjevima malog mozga.

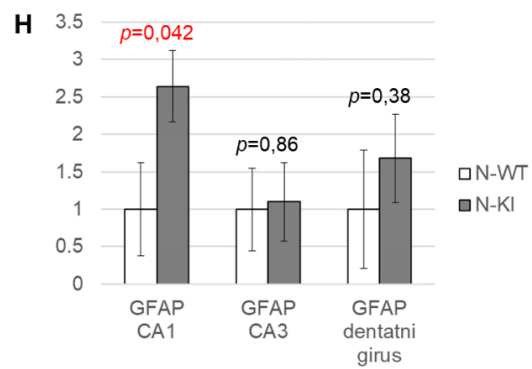
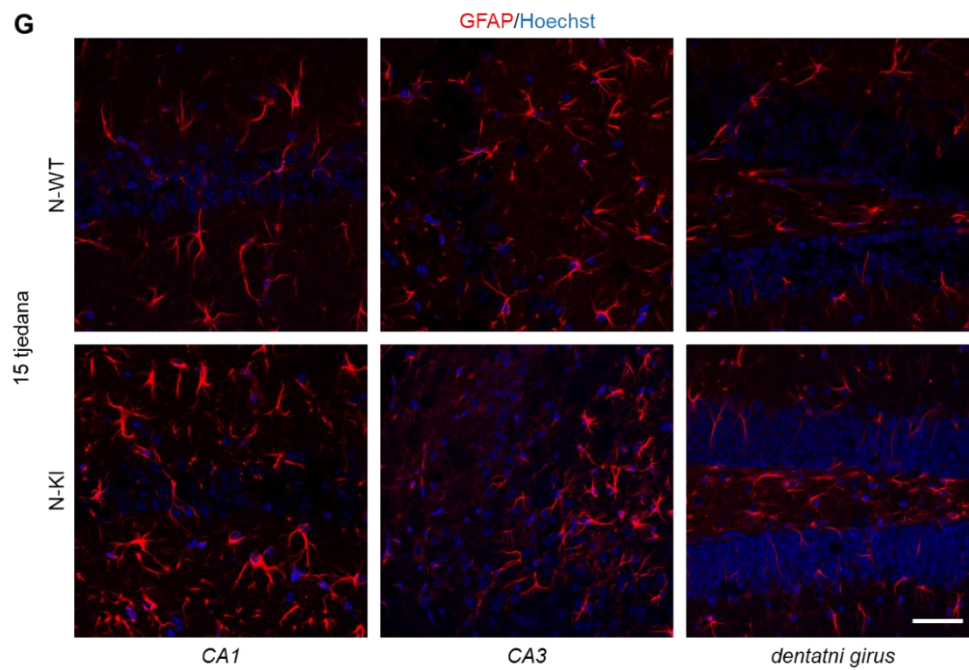
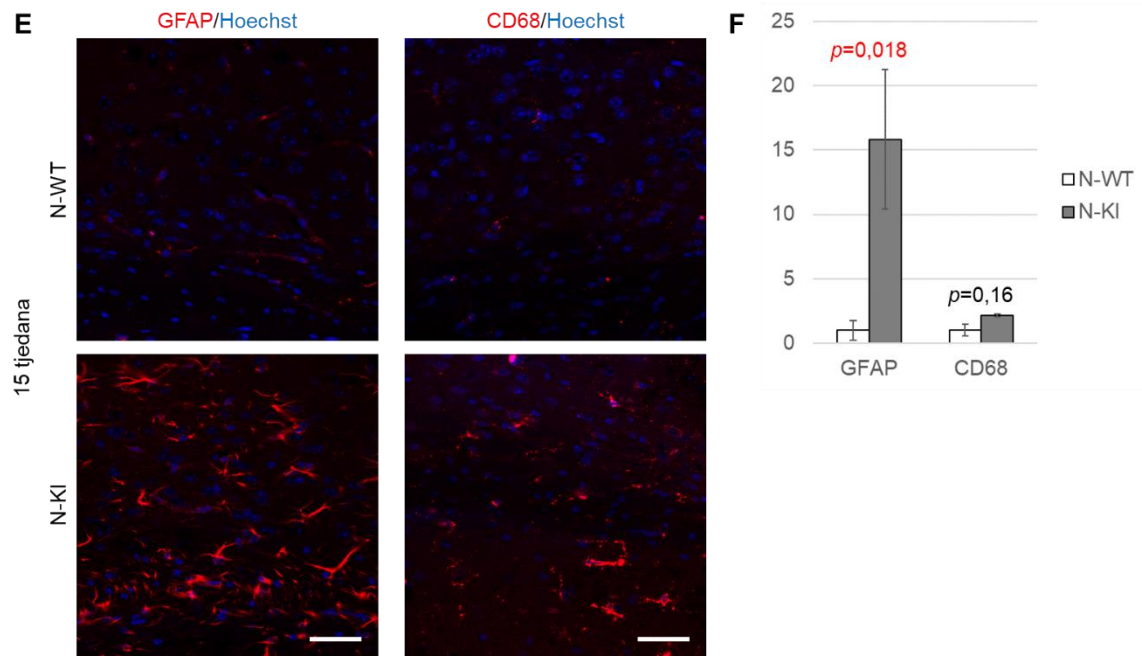
U usporedbi s jedinkama divljeg tipa, u kojih nije uočena neuroinflamacija u kori velikog mozga, jedinke N-KI starosti 15 tjedana pokazuju značajno povećanu aktivaciju astrocita te povećanu aktivaciju mikroglia (**Slika 12 E, F**). Međutim, u kori velikog mozga jedinki N-KI aktivacija mikroglia je manje izražena nego u malom mozgu.

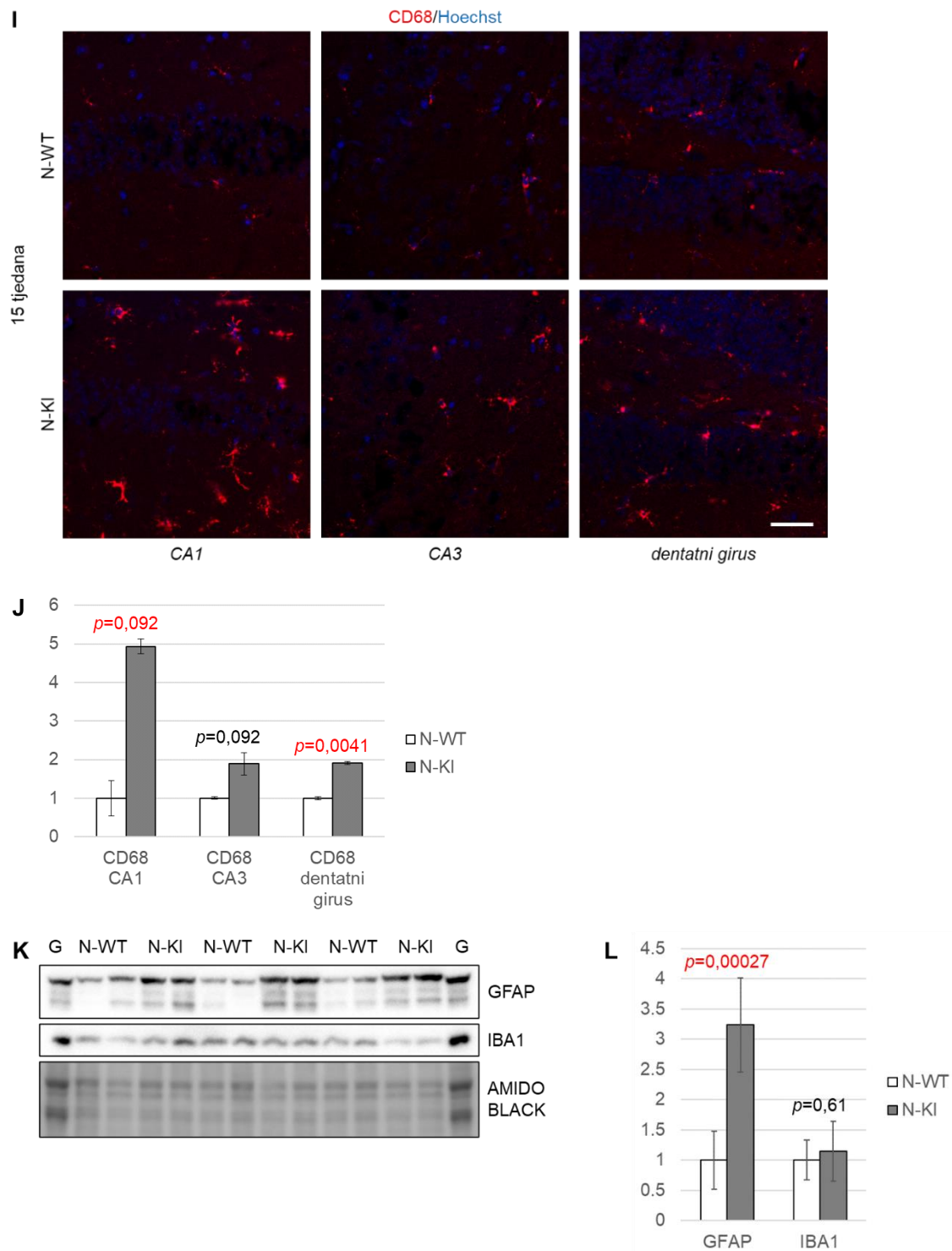
Zanimljivo, aktivacija astrocita uočena je u hipokampusu jedinki divljeg tipa (**Slika 12 G, H**). Međutim, njihova aktivacija još je izraženija u jedinki N-KI starosti 15 tjedana, i to značajno povišena u regiji *CA1* hipokampusu. U usporedbi s jedinkama divljeg tipa, u kojih nije uočena aktivacija mikroglia u hipokampusu, jedinke N-KI starosti 15 tjedana pokazuju značajno povećanu aktivaciju mikroglia (**Slika 12 I, J**).

Metodom WB (**Slika 12 K, L**) potvrđeno je značajno povećanje razine biljega GFAP u homogenatima kore velikog mozga jedinki N-KI u odnosu na jedinke divljeg tipa, što ukazuje na aktivaciju astrocita u jedinki N-KI starosti 15 tjedana. Nije uočena razlika u razini biljega IBA1, što ukazuje da nema porasta samog broja stanica mikroglia u kori velikog mozga jedinki N-KI u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od 15 tjedana.









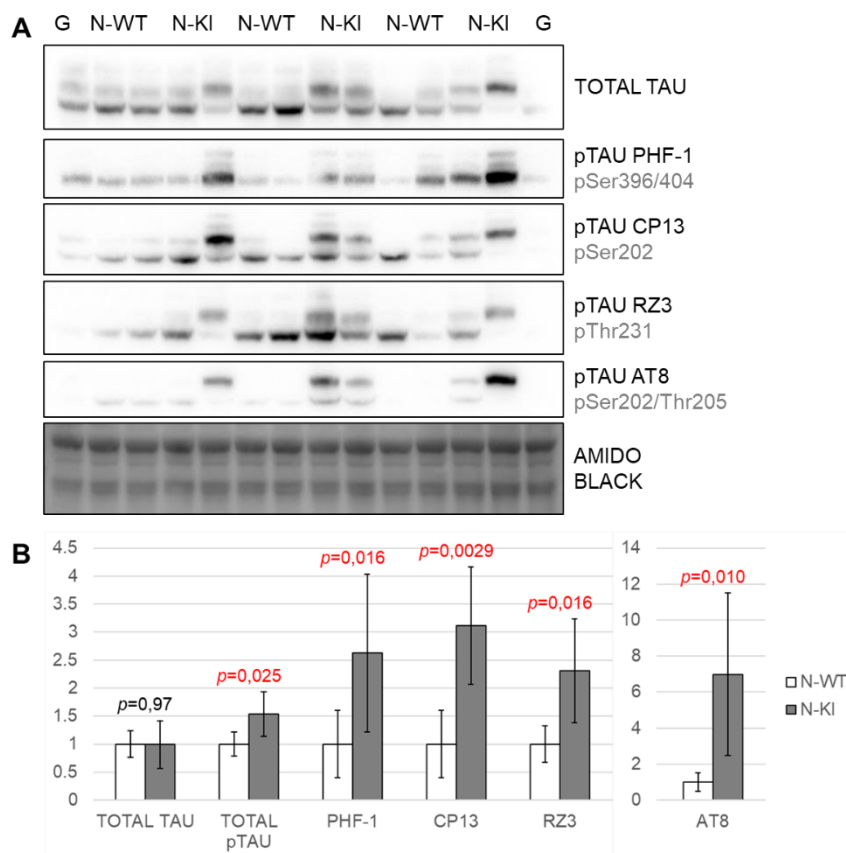
**Slika 12. Analiza neuroinflamacije u mozgu miševa linije NPC1-I1061T.** Aktivacija astrocита (A, B) i mikroglija (C, D) u malom mozgu jedinki N-KI starosti 15 tjedana u odnosu na jedinke divljeg tipa. E, F Aktivacija astrocита i mikroglija u kori velikog mozga jedinki N-KI starosti 15 tjedana u odnosu na jedinke divljeg tipa. Aktivacija astrocита (G, H) i mikroglija (I, J) u hipokampusu jedinki N-KI starosti 15 tjedana u odnosu na jedinke divljeg tipa. Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). GFAP (crveno) – biljeg astrocита, CD68 (crveno) – biljeg aktivnih mikroglija. Skala 50  $\mu$ m. K, L Analiza razine biljega astrocита i mikroglija metodom WB u homogenatima kore velikog mozga jedinki divljeg tipa i

jedinki N-KI starosti 15 tjedana. GFAP – biljeg astrocita, IBA1 – biljeg mikroglija. Na grafovima su prikazane  $p$  vrijednosti dobivene odgovarajućom statističkom analizom.

#### 4.1.8. Analiza hiperfosforilacije proteina tau u mozgu miševa linije *NPCI-I1061T*

U modelima bolesti NPC, hiperfosforilaciju proteina tau moguće je utvrditi na endogenoj razini. Metodom WB u homogenatima kore velikog mozga ispitana je ukupna razina proteina tau (TOTAL TAU) te razina fosforiliranog proteina tau (pTAU) na četiri različita mjesta fosforilacije (pSer 396/404, pSer202, pThr231, pSer202/Thr205).

Analiza ukupne razine proteina tau ne pokazuje razliku između jedinki divljeg tipa i jedinki N-KI starosti 15 tjedana (**Slika 13 A, B**). Međutim, iz kvalitativne analize vidljivo je da dolazi do promjene profila fosforilacije koju je moguće utvrditi protutijelom za ukupni tau: jedinke N-KI starosti 15 tjedana pokazuju značajno povišenu razinu ukupnih fosforiliranih vrsta (TOTAL pTAU). Analiza razine fosforiliranog proteina tau (pTAU) pokazala je značajno povišenu razinu fosforilacije proteina tau za sva ispitivana mjesta fosforilacije u kori velikog mozga jedinki N-KI starosti 15 tjedana u odnosu na jedinke divljeg tipa. Također, uočena je velika varijabilnost unutar samih skupina, posebno za pTAU vrste. Razlike u razini fosforilacije proteina tau nije bilo moguće utvrditi metodom imunohistokemije, odnosno imunofluorescencije.

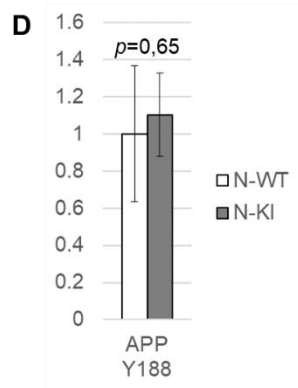
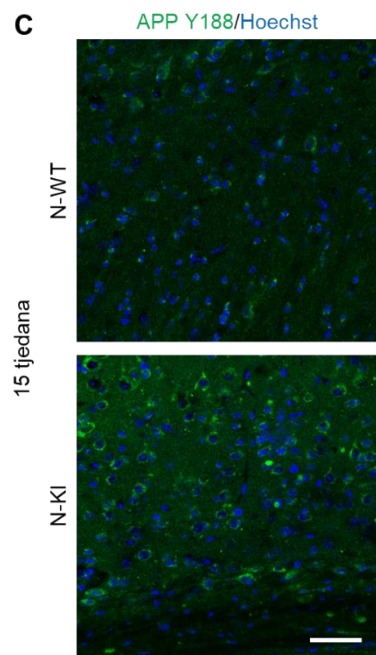
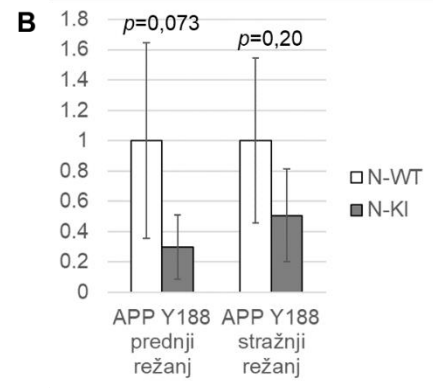
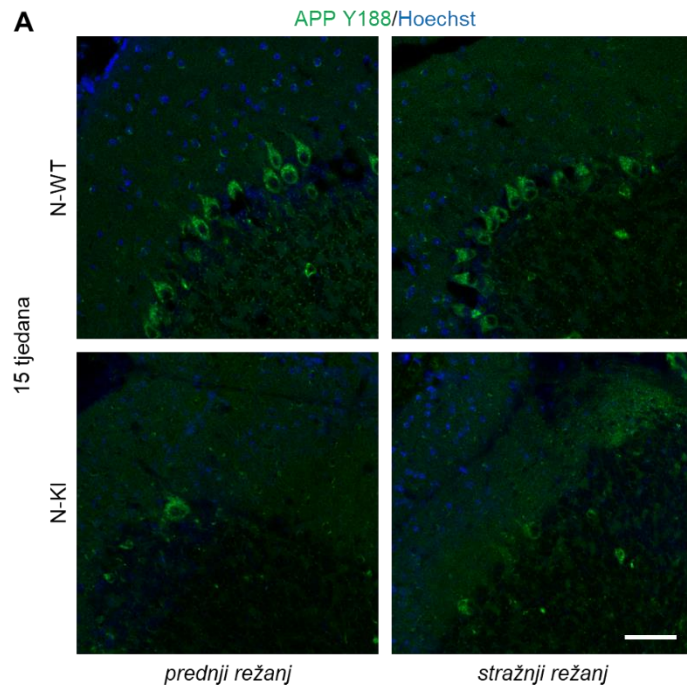


◀ **Slika 13. Analiza razine i fosforilacije proteina tau u mozgu miševa linije NPC1-I1061T.** **A** Analiza razine ukupnog proteina tau i razine fosforiliranog proteina tau na četiri mjesta fosforilacije metodom WB u homogenatima kore velikog mozga jedinki divljeg tipa i jedinki N-KI starosti 15 tjedana. **B** Kvantitativni prikaz razine ukupnog proteina tau (TOTAL TAU), ukupnog fosforiliranog proteina tau (TOTAL pTAU), te razine pojedinih oblika fosforiliranog proteina tau (pTAU PHF-1 – pSer 396/404, CP13 – pSer202, RZ3 – pThr231, AT8 – pSer202/Thr205). Na grafu su prikazane *p* vrijednosti dobivene odgovarajućom statističkom analizom.

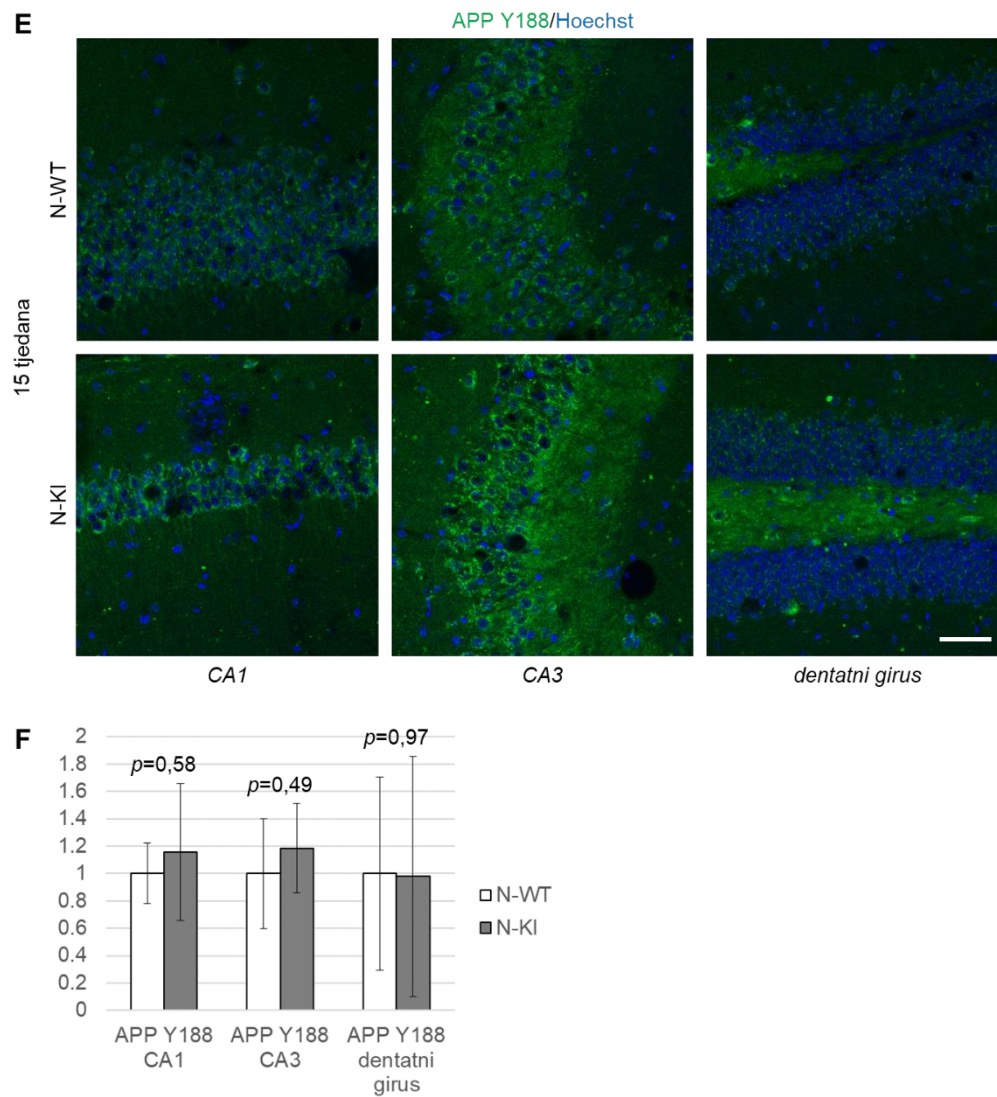
#### 4.1.9. Analiza supstrata enzima BACE1 u mozgu miševa linije NPC1-I1061T

Analizom razine enzima BACE1 tijekom validacije modela *knock-in* NPC1-I1061T nije uočena razlika između jedinki divljeg tipa i jedinki N-KI, međutim, varijabilnost razine enzima BACE1 bila je visoka. Proširenom analizom jedinki N-KI (poglavlje 4.2.) potvrđena je povišena razina enzima BACE1 u jedinki N-KI u odnosu na jedinke divljeg tipa. U pacijenata oboljelih od bolesti NPC, kao i u dosad istraživanim modelima bolesti NPC, opisana je povećana proteoliza supstrata enzima BACE1 [115, 177, 181]. S ciljem potvrde povećanog cijepanja enzimom BACE1 u mozgovima jedinki N-KI u odnosu na jedinke divljeg tipa, analizirane su razine cjelovitih supstrata enzima BACE1, kao i razine njihovih N-terminalnih i/ili C-terminalnih proteolitičkih produkata. Ispitana je razina proteina APP (čije je cijepanje povećano u bolesti NPC i AB), te proteina SEZ6 i SEZ6L, koji se cijepaju isključivo enzimom BACE1. Kriorezovi mozgova debljine 16  $\mu$ m analizirani su metodom imunohistokemije, odnosno imunofluorescencije, a homogenati kore velikog mozga metodom WB. Korištena su protutijela APP Y188 i APP 1127 (protutijela za C-terminalni kraj proteina APP), APP 22C11 (protutijelo za N-terminalni kraj proteina APP), te SEZ6 i SEZ6L (protutijela za N-terminalni kraj proteina SEZ6 i SEZ6L).

U malom mozgu jedinki divljeg tipa, protein APP pretežno je raspodijeljen u tijelima Purkinjeovih neurona (**Slika 14 A, B**). U jedinki N-KI starosti 15 tjedana dolazi do gubitka bojanja proteina APP, u skladu s odumiranjem Purkinjeovih neurona u prednjim, ali i u stražnjim režnjevima malog mozga. U odnosu na jedinke divljeg tipa, u kori velikog mozga (**Slika 14 C, D**) i u hipokampusu (**Slika 14 E, F**) jedinki N-KI starosti 15 tjedana, bojanje proteina APP je intenzivnije, vidljivo u obliku većih točkastih nakupina u tijelima neurona u svim analiziranim regijama. Međutim, kvantifikacijom dobivenih rezultata nije uočena značajna razlika u razini signala proteina APP u ovim regijama.

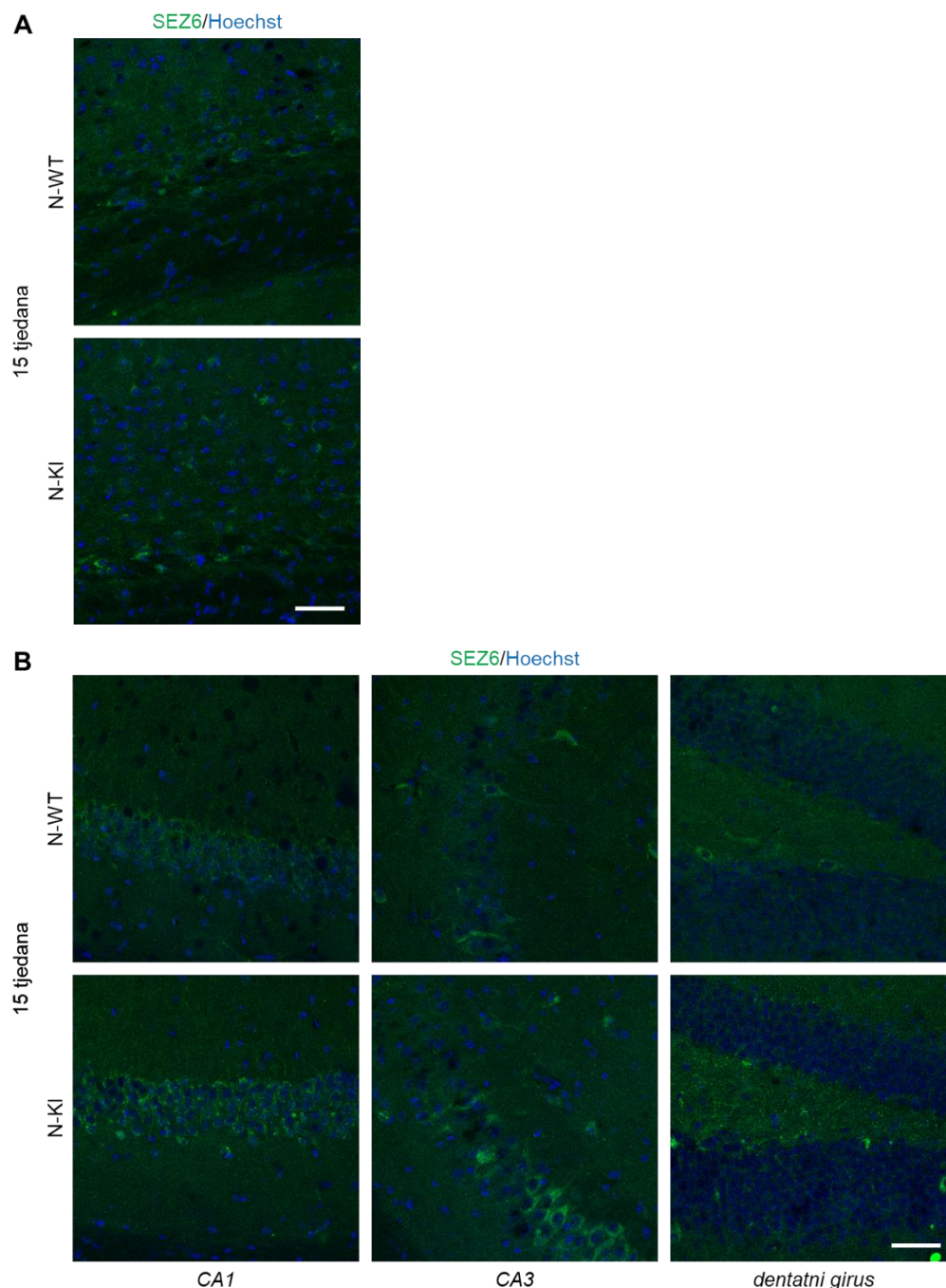






**Slika 14. Analiza raspodjele proteina APP u mozgu miševa linije *NPCI-I1061T*.** Raspodjela i intenzitet signala proteina APP u malom mozgu (**A, B**), kori velikog mozga (**C, D**) i hipokampusu (**E, F**) jedinki divljeg tipa i jedinki N-KI starosti 15 tjedana. Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). APP Y188 (zeleno) – biljeg proteina APP. Skala 50  $\mu\text{m}$ . Na grafovima su prikazane  $p$  vrijednosti dobivene odgovarajućom statističkom analizom.

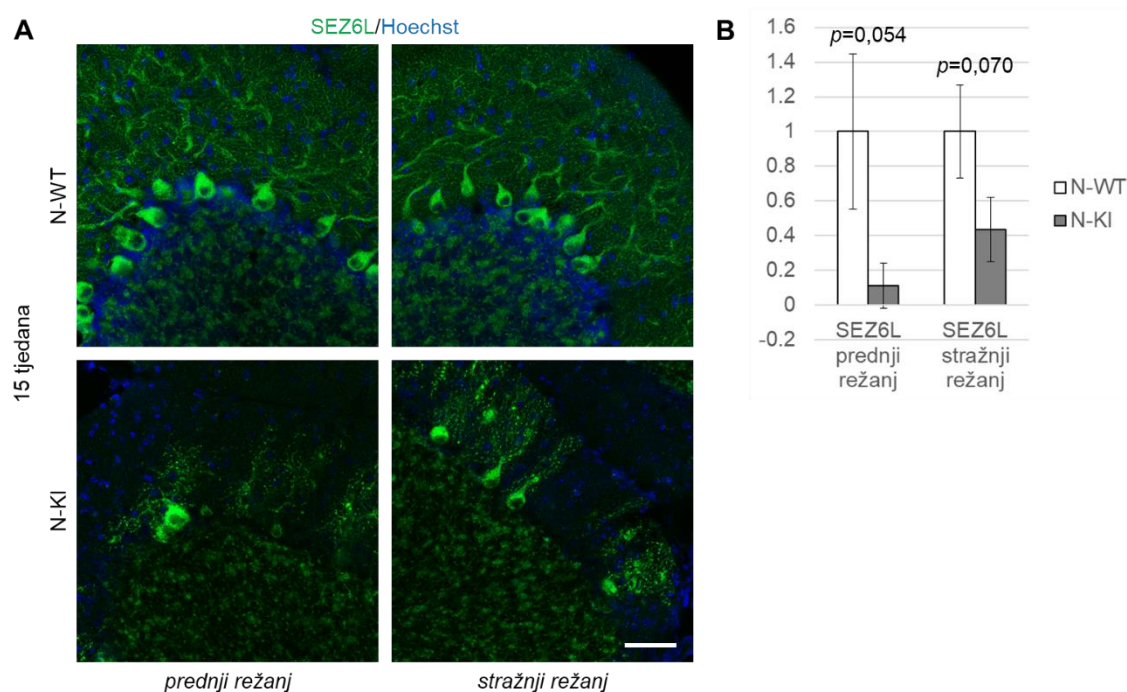
U usporedbi s jedinkama divljeg tipa, bojanje proteina SEZ6 u kori velikog mozga (**Slika 15 A**) i hipokampusu (**Slika 15 B**) jedinki N-KI starosti 15 tjedana pokazuje nakupljanje ovog proteina u somi neurona, dok je bojanje proteina SEZ6 u malom mozgu rezultiralo pozadinskim signalom te stoga nije prikazano. Kvantifikacija dobivenih rezultata nije bila moguća zbog niskog signala biljega SEZ6.



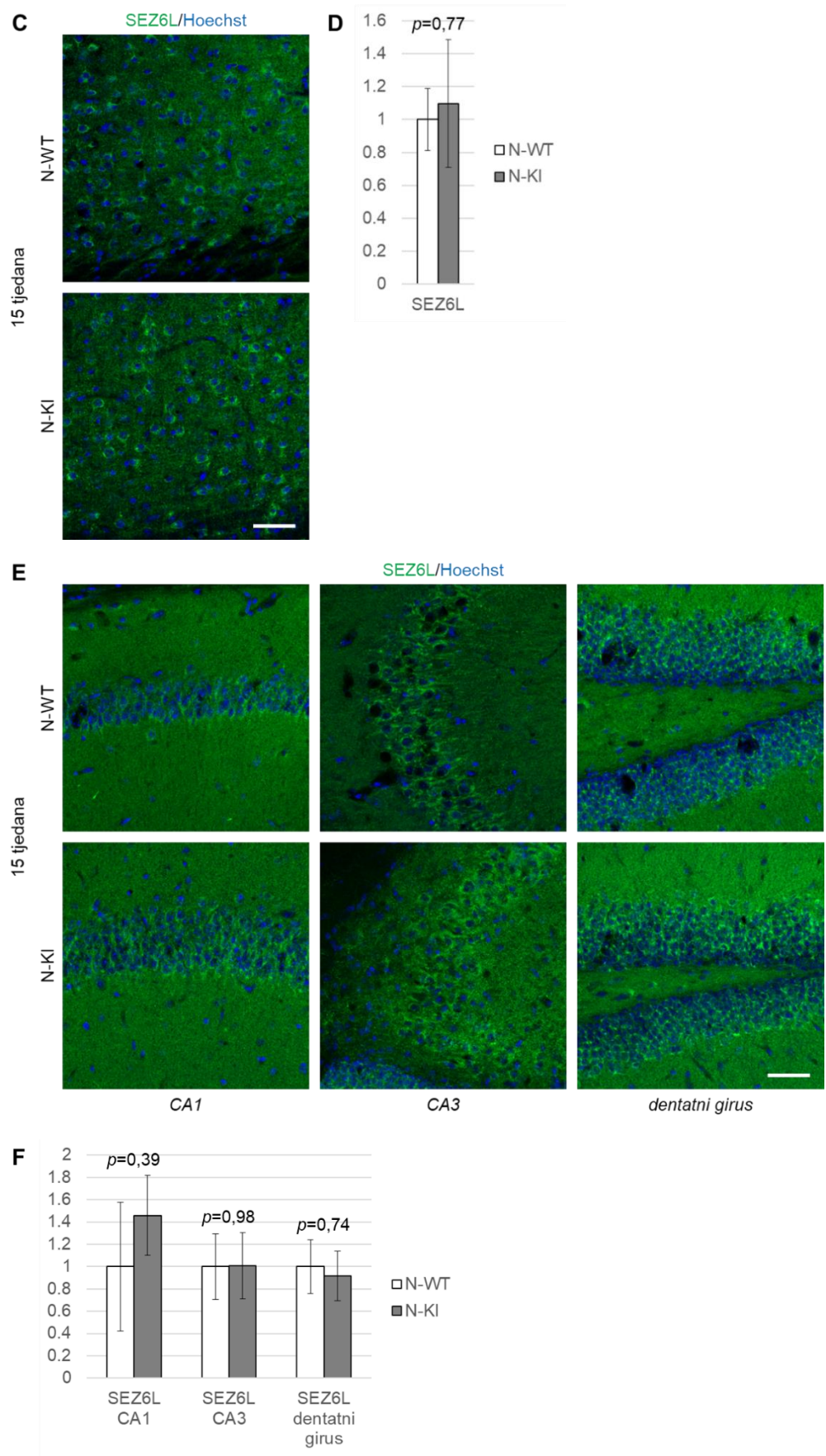
**Slika 15. Analiza raspodjele proteina SEZ6 u mozgu miševa linije NPC1-I1061T.** Raspodjela proteina SEZ6 u kori velikog mozga (A) i hipokampusu (B) jedinki divljeg tipa i jedinki N-KI starosti 15 tjedana. Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). SEZ6 (zeleno) – biljeg proteina SEZ6. Skala 50  $\mu$ m.

Imunohistokemijskom analizom proteina SEZ6L u malom mozgu jedinki divljeg tipa, vidljivo je njegovo bojanje u tijelima Purkinjeovih neurona, kao i zrakasto bojanje u dendritičkim procesima (Slika 16 A, B). U jedinki N-KI dolazi do gubitka bojanja proteina SEZ6L u skladu s odumiranjem Purkinjeovih neurona, što je posebno izraženo u prednjim režnjevima malog mozga. Također, bojanje proteina SEZ6L u tijelima preostalih Purkinjeovih neurona jedinki N-KI starosti 15 tjedana je intenzivnije, a u dendritičkim procesima vidljivo u obliku točkastih nakupina.

Bojanje proteina SEZ6L u kori velikog mozga (Slika 16 C, D) te u hipokampusu (Slika 16 E, F) ukazalo je na nešto jače obojenje, odnosno povećane točkaste nakupine proteina SEZ6L u somi neurona jedinki N-KI u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od 15 tjedana. Međutim, kvantifikacijom dobivenih rezultata nije potvrđena značajna razlika između uspoređivanih skupina.

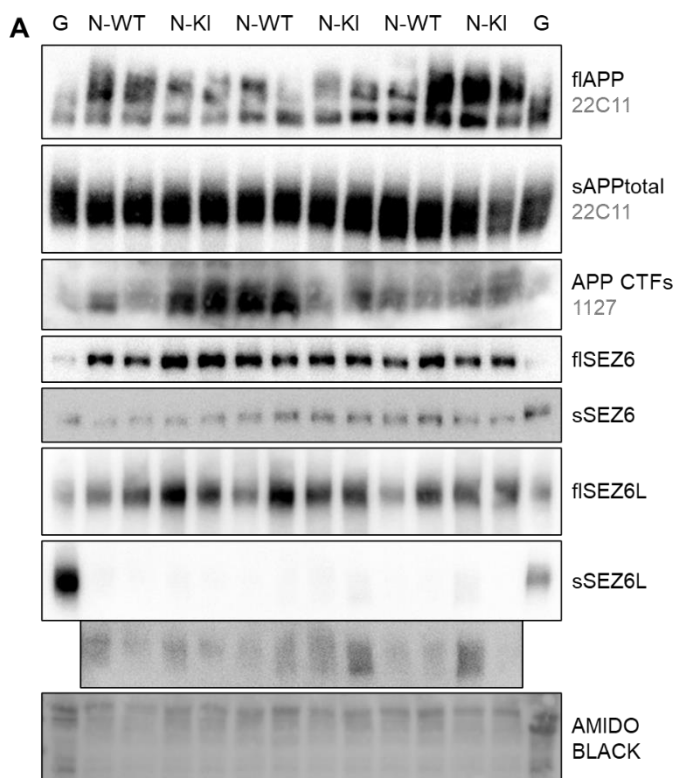


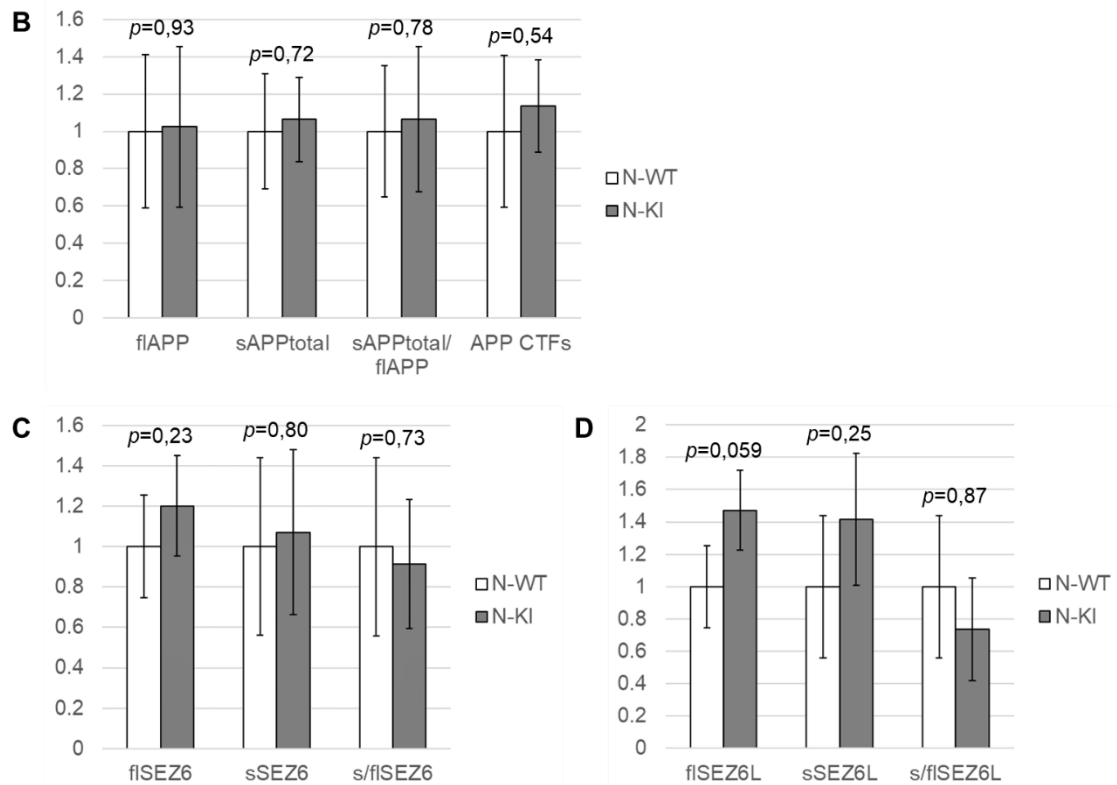




◀ **Slika 16. Analiza raspodjele proteina SEZ6L u mozgu miševa linije NPC1-I1061T.** Raspodjela proteina SEZ6L u malom mozgu (**A, B**), kori velikog mozga (**C, D**) i hipokampusu (**E, F**) jedinki divljeg tipa i jedinki N-KI starosti 15 tjedana. Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). SEZ6L (zeleno) – biljeg proteina SEZ6L. Skala 50  $\mu\text{m}$ . Na grafovima su prikazane *p* vrijednosti dobivene odgovarajućom statističkom analizom.

U homogenatima kore velikog mozga nije zabilježena značajna razlika u razini cijepanja supstrata APP, SEZ6 i SEZ6L enzimom BACE1 između jedinki N-KI i jedinki divljeg tipa u dobi od 15 tjedana (**Slika 17**). Naime, u jedinki N-KI ne dolazi do sniženja razine cjelovitih (nepocijepanih) oblika supstrata BACE1 (flAPP, flSEZ6 i flSEZ6L), kao ni do povećanja razine topivih N-terminalnih odsječaka ovih supstrata, sAPPtotal i sSEZ6 (**Slika 17 B, C, D**). Iako je razina topive forme sSEZ6L povećana, omjer topivog i cjelovitog oblika proteina (s/flSEZ6L) ne razlikuje se između jedinki N-KI i jedinki divljeg tipa (**Slika 17 D**). Razina odsječaka APP CTFs je nešto veća u jedinki N-KI u odnosu na jedinke divljeg tipa, ali razlika nije statistički značajna (**Slika 17 B**).





**Slika 17. Analiza razine supstrata enzima BACE1 u kori velikog mozga miševa linije NPC1-I1061T.** A Analiza razine cjelovitih proteina flAPP, flSEZ6 i flSEZ6L te njihovih odsječaka koji nastaju kao produkt cijepanja enzimom BACE1 (sAPPtotal, APP CTFs, sSEZ6 i sSEZ6L) metodom WB. Kvantitativni prikaz cjelovitih oblika i pocijepanih odsječaka proteina APP (**B**) te SEZ6 (**C**) i SEZ6L (**D**) u homogenatima kore velikog mozga jedinki divljeg tipa i jedinki N-KI starosti 15 tjedana. flAPP – cjeloviti protein APP, sAPPtotal – ukupni topivi odsječci proteina APP, 22C11 – N-terminalni odsječak proteina APP, APP CTFs – C-terminalni odsječci proteina APP, 1127 – C-terminalni odsječak proteina APP, flSEZ6 – cjeloviti protein SEZ6, sSEZ6 – N-terminalni topivi odsječak proteina SEZ6, flSEZ6L – cjeloviti protein SEZ6L, sSEZ6L – N-terminalni topivi odsječak proteina SEZ6L. Na grafovima su prikazane  $p$  vrijednosti dobivene odgovarajućom statističkom analizom.

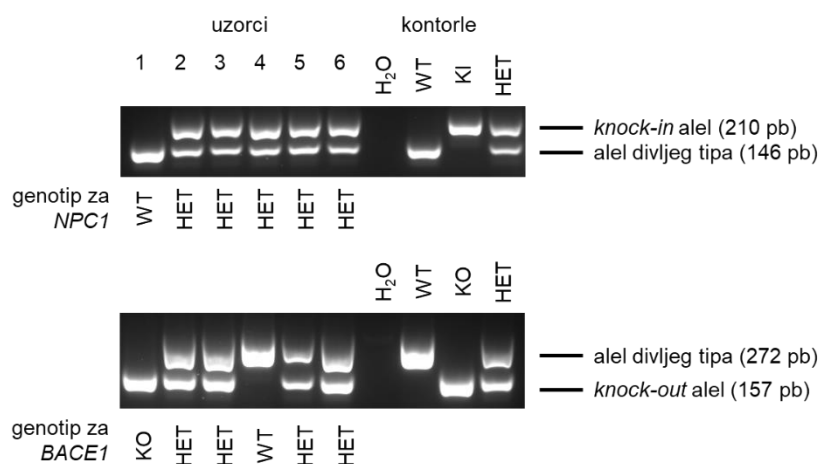
## 4.2. Karakterizacija mišjeg modela *knock-in NPC1-I1061T* s deletiranim genom *BACE1*

Nakon križanja jedinki heterozigota za gen *NPC1-I1061T* s jedinkama heterozigotima za gen *BACE1*, dobivene jedinke koje su heterozigoti za oba gena dalje su križane u svrhu dobivanja šest genotipova od interesa. Prikupljene su jedinke *knock-in NPC1-I1061T* s deletiranim jednim alelom (N-KI B-HET) ili oba alela gena *BACE1* (N-KI B-KO) te pripadajuće kontrole, uključujući jedinke divljeg tipa (N-WT B-WT) i jedinke *knock-in NPC1-I1061T* (N-KI B-WT), te jedinke divljeg tipa za gen *NPC1* s deletiranim jednim alelom (N-WT B-HET, heterozigoti za gen *BACE1*), odnosno s deletirana oba alela gena *BACE1* (N-WT B-KO, *knock-out BACE1*) kao dodatne kontrole. Jedinke su žrtvovane u dobi od četiri, 9 i 15 tjedana starosti, a uzorci (kriorezovi i homogenati mozгова) analizirani su u svrhu karakterizacije neuropatoloških značajki uobičajenih za bolest NPC, kako bi se utvrdio utjecaj genetičke modulacije razine enzima *BACE1* na progresiju bolesti NPC. Značajnost ukupne statističke analize prikazana je na grafovima, dok su pojedinačne *post-hoc* analize prikazane u poglavlju **11. Privitci**.

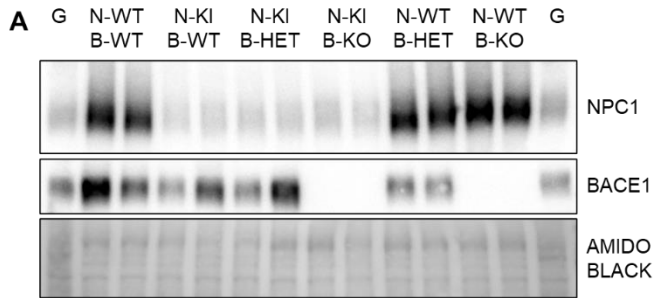
#### 4.2.1. Genotipizacija i razina proteina NPC1 i BACE1 u mozgu miševa *knock-in NPC1-I1061T* s deletiranim genom *BACE1*

Jedinke od interesa (N-KI B-HET i N-KI B-KO) te pripadajuće kontrole identificirane su genotipizacijom koristeći metodu PCR (Slika 18). Genotip je kasnije potvrđen i u homogenatima različitih regija mozga jedinki starosti četiri, 9 i 15 tjedana tijekom analize metodom WB (Slika 19 A-L).

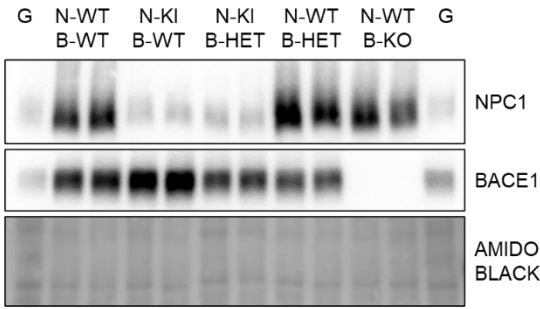
Razina proteina NPC1-I1061T u malom mozgu jedinki genotipa N-KI, tj. u jedinki N-KI B-WT, N-KI B-HET i N-KI B-KO je značajno snižena, te iznosi oko 20% razine zabilježene u jedinki divljeg tipa u svim ispitivanim dobnim skupinama (Slika 19 A-D). U kori velikog mozga ovih jedinki uočena je nešto viša razina proteina NPC1-I1061T, oko 40% razine zabilježene u jedinki divljeg tipa u svim ispitivanim dobnim skupinama (Slika 19 E-H). Razina proteina NPC1-I1061T u hipokampusu ovih jedinki varira u istom rasponu od 20 do 40%, ovisno o dobnj skupini (Slika 19 I-L). Razina proteina BACE1 komentirana je u nastavku (poglavlje 4.2.2.).



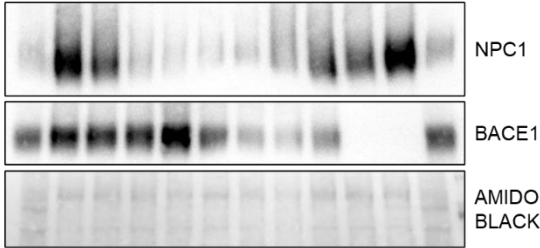
Slika 18. Genotipizacija miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*. Primjer genotipizacije metodom PCR za gene *NPC1* i *BACE1*. H<sub>2</sub>O – negativna kontrola, WT – jedinke divljeg tipa, KI – jedinke *knock-in NPC1-I1061T*, HET – jedinke heterozigoti za gen *NPC1-I1061T* ili *BACE1*, KO – jedinke *knock-out BACE1*, pb – parovi baza.



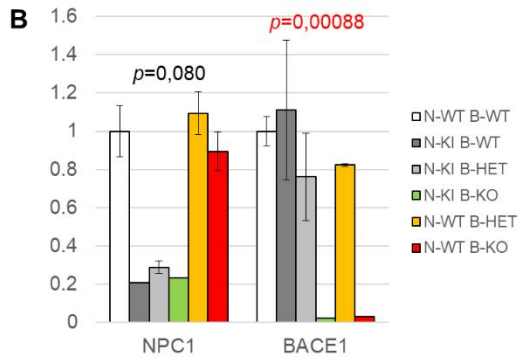
*mali mozak, 4 tjedna*



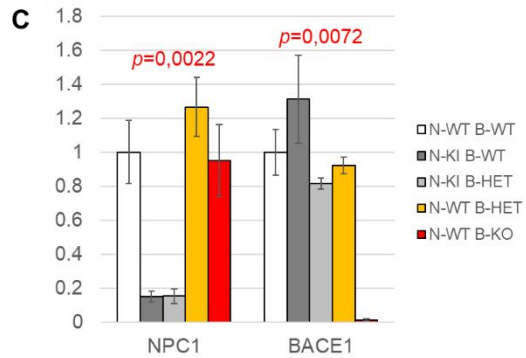
*mali mozak, 9 tjedana*



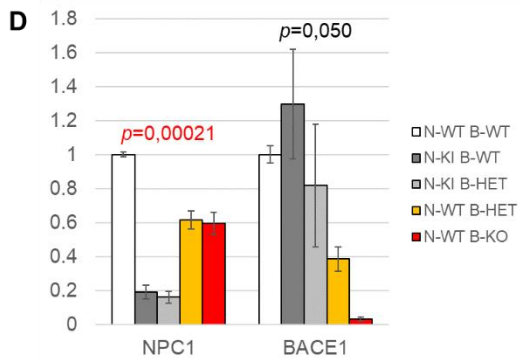
*mali mozak, 15 tjedana*



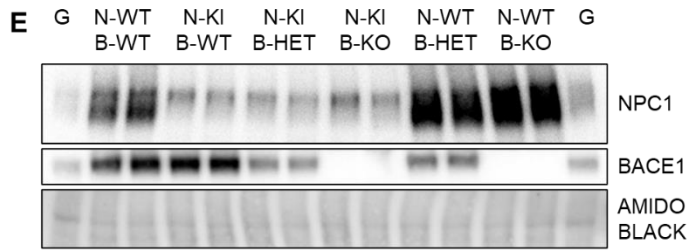
*mali mozak, 4 tjedna*



*mali mozak, 9 tjedana*

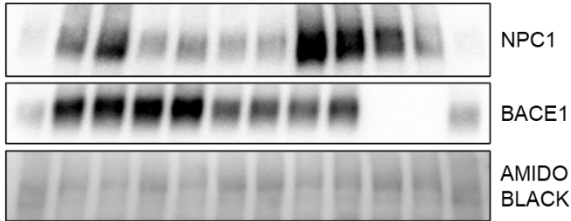


*mali mozak, 15 tjedana*

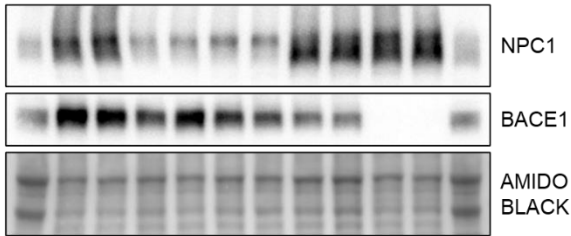


*kora velikog mozga, 4 tjedna*

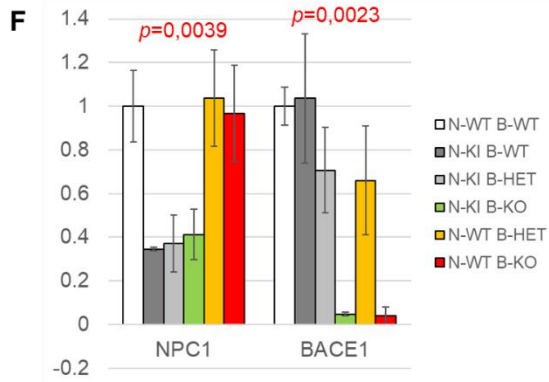
|   |      |      |       |       |      |   |
|---|------|------|-------|-------|------|---|
| G | N-WT | N-KI | N-KI  | N-WT  | N-WT | G |
|   | B-WT | B-WT | B-HET | B-HET | B-KO |   |



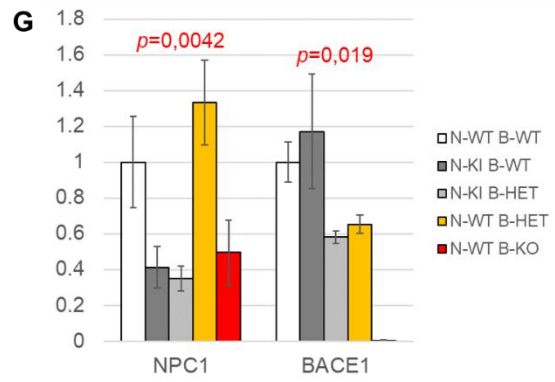
*kora velikog mozga, 9 tjedana*



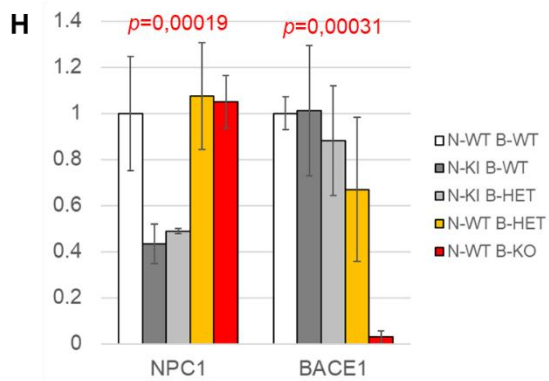
*kora velikog mozga, 15 tjedana*



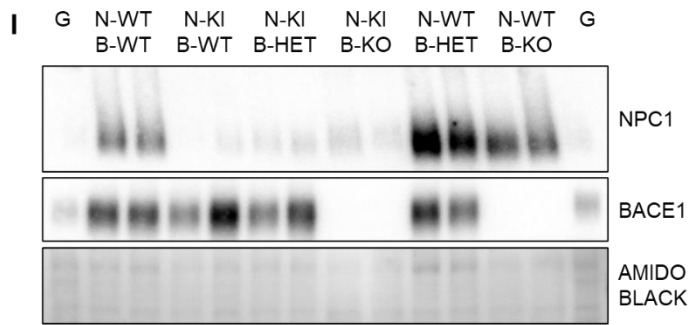
*kora velikog mozga, 4 tjedna*



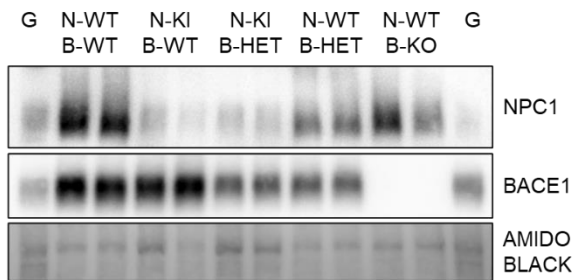
*kora velikog mozga, 9 tjedana*



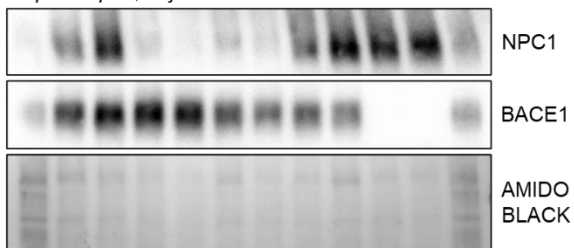
*kora velikog mozga, 15 tjedana*



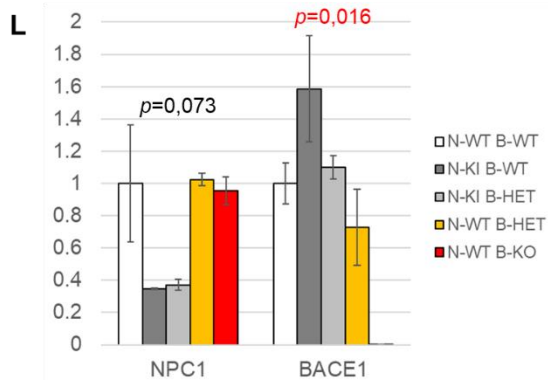
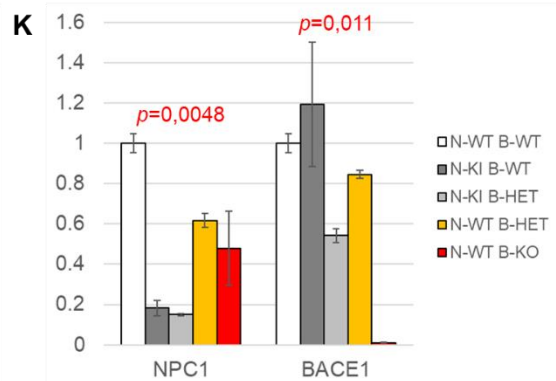
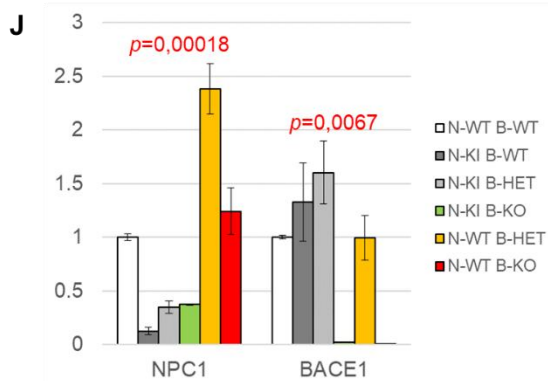
*hipokampus, 4 tjedna*



*hipokampus, 9 tjedana*



*hipokampus, 15 tjedana*

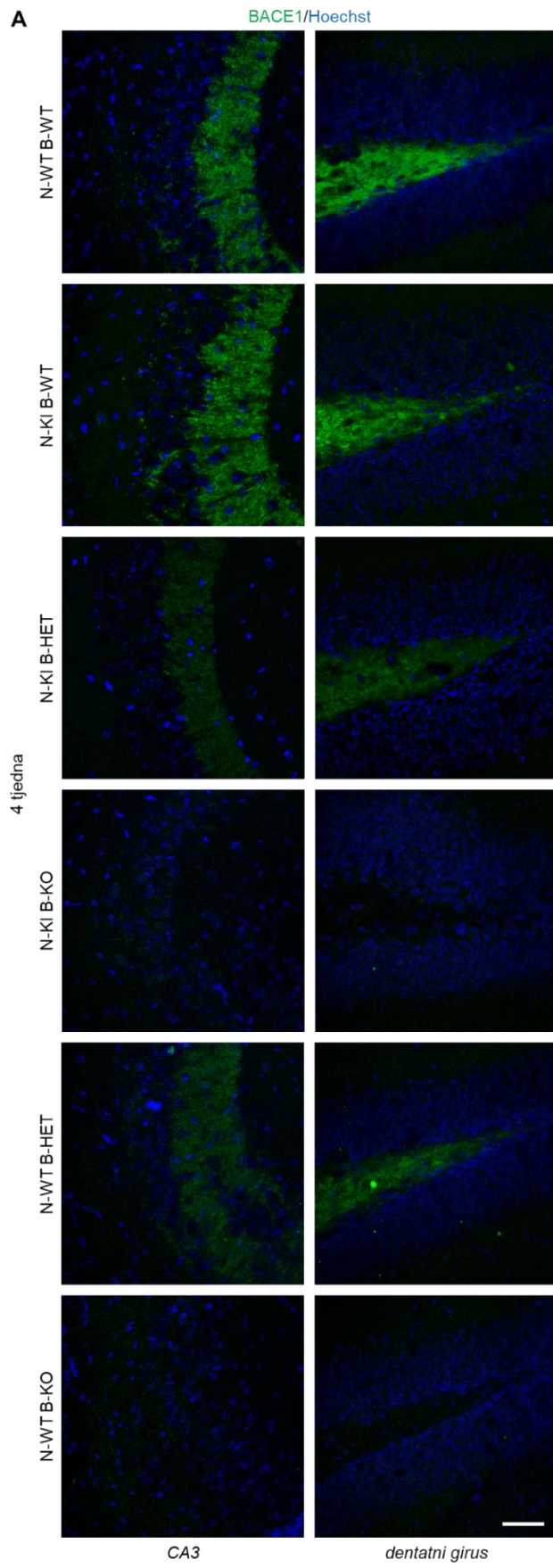


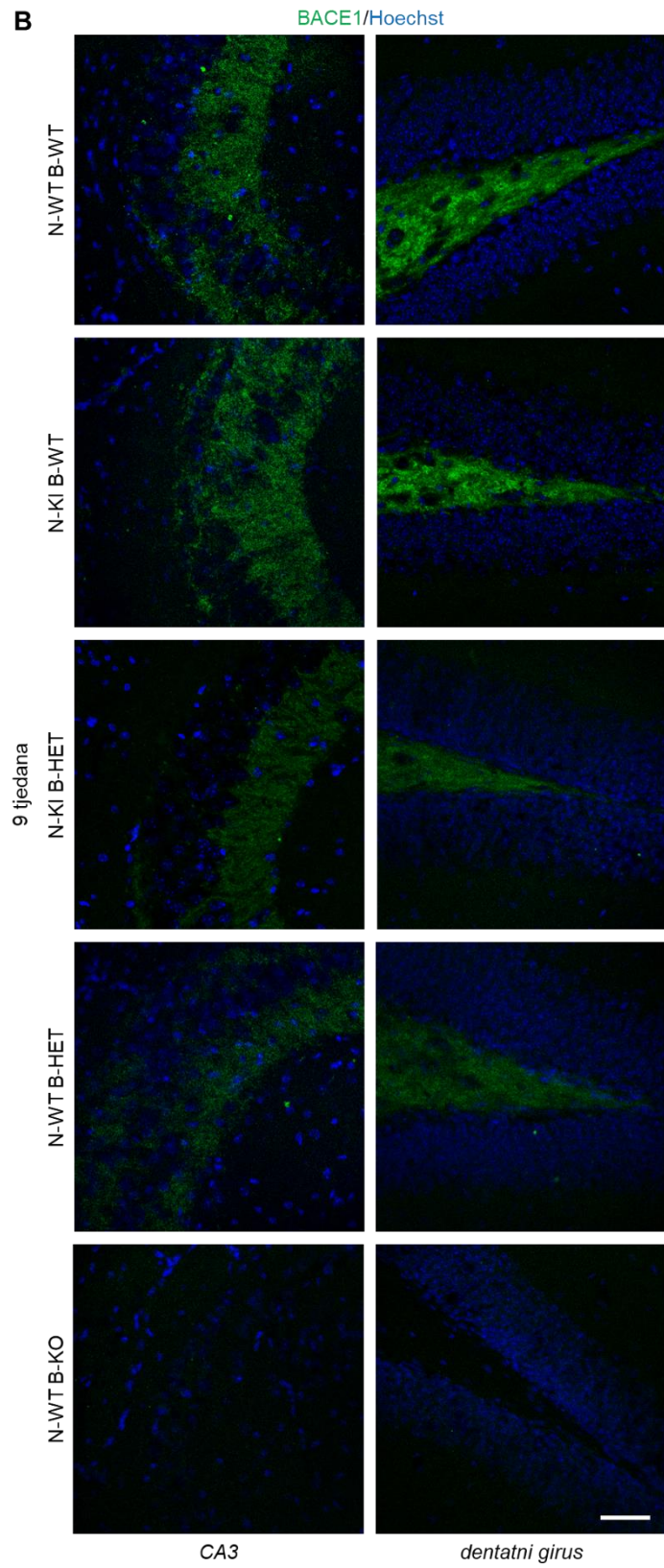


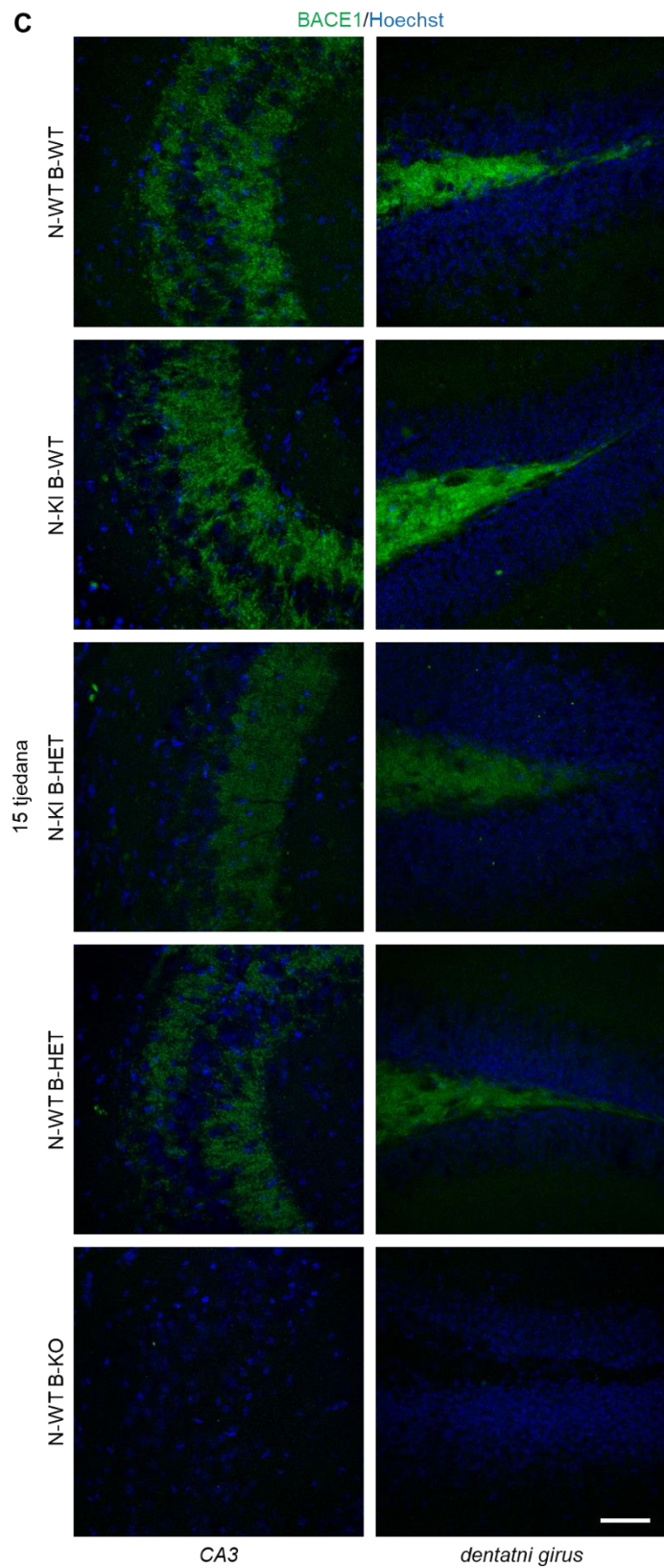
◀ **Slika 19. Razina proteina NPC1 i BACE1 u mozgu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.** Analiza razine proteina NPC1 i BACE1 metodom WB u homogenatima malog mozga (**A-D**), kore velikog mozga (**E-H**) i hipokampusa (**I-L**) uz kvantitativni prikaz koristeći program ImageJ. G – interna kontrola (od engl. *generic brain sample*). Na grafovima su prikazane *p* vrijednosti dobivene ukupnom statističkom analizom, dok je *post-hoc* analiza, odnosno usporedba srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina prikazana u **Privitku 1** (biljeg NPC1) i **Privitku 2** (biljeg BACE1).

#### **4.2.2. Enzim BACE1 u mozgu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1***

U jedinki *knock-out BACE1*, dakle u jedinki N-KI B-KO te u kontroli N-WT B-KO, nije zabilježen signal za protein BACE1 ni u jednoj od ispitivanih regija mozga, odnosno dobnih skupina (**Slika 19 A-L**). U odnosu na jedinke divljeg tipa, razina proteina BACE1 u jedinki N-KI B-WT povišena je u malom mozgu i hipokampusu svih ispitivanih dobnih skupina. Također, u jedinki heterozigotnih za gen *BACE1*, dakle u jedinki N-KI B-HET te u kontroli N-WT B-HET, razina proteina BACE1 iznosila je više od očekivanih 50% razine zabilježene u jedinki divljeg tipa. U malom mozgu ovih jedinki zabilježeno je oko 80% razine proteina BACE1 (**Slika 19 A-D**), a u kori velikog mozga oko 60% razine proteina neovisno o ispitivanoj dobnjoj skupini (**Slika 19 E-H**). U odnosu na jedinke divljeg tipa, u hipokampusu jedinki N-KI B-HET starosti četiri tjedna zabilježena je povišena razina proteina BACE1, a snižena je u jedinki starosti 9 tjedana (**Slika 19 I-L**). Sukladno literaturi [186], imunohistokemijskom analizom kriorezova mozгова debljine 16 µm enzim BACE1 zabilježen je u mahovinastim vlaknima hipokampusa (**Slika 20 A-C**). U odnosu na jedinke divljeg tipa i jedinke N-KI B-WT, u jedinki N-KI B-HET te N-WT B-HET zabilježen je sniženi intenzitet biljega BACE1. U jedinki N-KI B-KO te N-WT B-KO nije zabilježen signal biljega BACE1. Ovaj rezultat ponavlja se u svim analiziranim dobnim skupinama.







Slika 20. Analiza raspodjele i intenziteta biljega enzima BACE1 u hipokampusu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*. Imunohistokemijska analiza enzima

BACE1 u mahovinastim vlaknima hipokampusa miševa u dobi od četiri (A), 9 (B) i 15 tjedana (C). Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). BACE1 (zeleno) – enzim BACE1. Skala 50 µm.

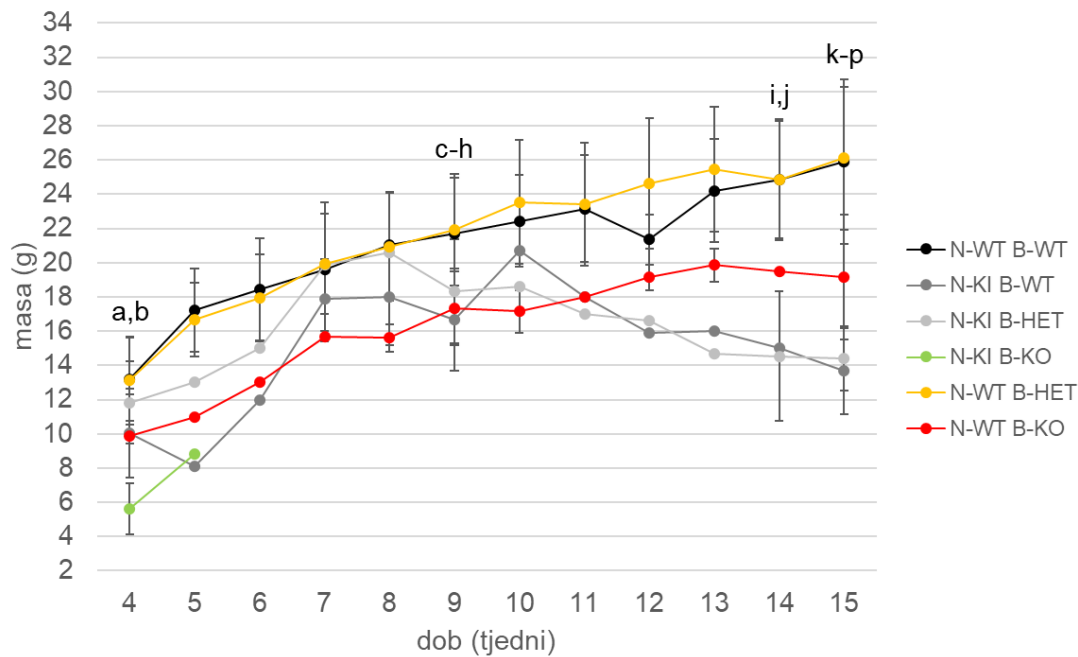
#### 4.2.3. Analiza fenotipa miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*

Jedinke N-KI B-WT dobivene križanjem dvostrukih heterozigota za gene *NPC1-I1061T* i *BACE1*, u usporedbi s jedinkama divljeg tipa, pokazuju očekivane fenotipske patološke promjene karakteristične za bolest NPC (kao što je prethodno opisano u poglavlju 4.1.3.). Hipoteza ovog doktorskog rada je da će fenotip jedinki N-KI B-HET i N-KI B-KO biti blaži u odnosu na fenotip jedinki N-KI B-WT, što će rezultirati produljenim životnim vijekom ovih miševa. Nakon odbijanja od majki u dobi od četiri tjedna, jedinke N-KI B-HET imaju veću tjelesnu masu od jedinki N-KI B-WT (**Slika 21**). Ta razlika je vidljiva sve do 10. tjedna starosti, kada počinje progresivniji gubitak mase. Jedinke N-KI B-HET također počinju pokazivati tremor u mirovanju u istom periodu kao i jedinke N-KI B-WT (između šest i 8 tjedana starosti). Suprotno hipotezi, fenotip bolesti ovih jedinki postaje progresivniji oko 10. tjedna starosti, te ugibaju već u dobi od oko 15 tjedana (tri tjedna ranije u odnosu na jedinke N-KI B-WT).

Jedinke N-KI B-KO rađale su se u udjelu znatno manjem od očekivanog prema Mendelovom zakonu segregacije. Opaženo je i da je stopa smrtnosti mladih unutar prvih mjesec dana od okota nešto veća u novoj liniji dobivenoj križanjem dvostrukih heterozigota za gene *NPC1-I1061T* i *BACE1*, stoga je moguće da jedinke N-KI B-KO ugibaju i prije genotipizacije. Prikupljene su svega četiri jedinke, a žrtvovane su u starosti od četiri tjedna jer su fenotipski ukazivale na vrlo progresivan stadij bolesti (uključujući izrazito malu tjelesnu masu (**Slika 21**), snažan tremor, potencijalno hidrocefalus, te ponašanje nalik epileptičkim napadajima).

Jedinke N-WT B-HET nisu pokazivale nikakav fenotip. Jedinke N-WT B-KO imale su smanjenu stopu preživljenja unutar prvih mjesec dana od okota (sukladno literaturi), međutim, preostale jedinke nisu pokazivale nikakav fenotip izuzev niže tjelesne mase u odnosu na jedinke divljeg tipa (značajno u dobi od 9 i 15 tjedana; **Slika 21**). Životni vijek ovih dodatnih kontrola odgovara životnom vijeku jedinki divljeg tipa (130-150 tjedana).



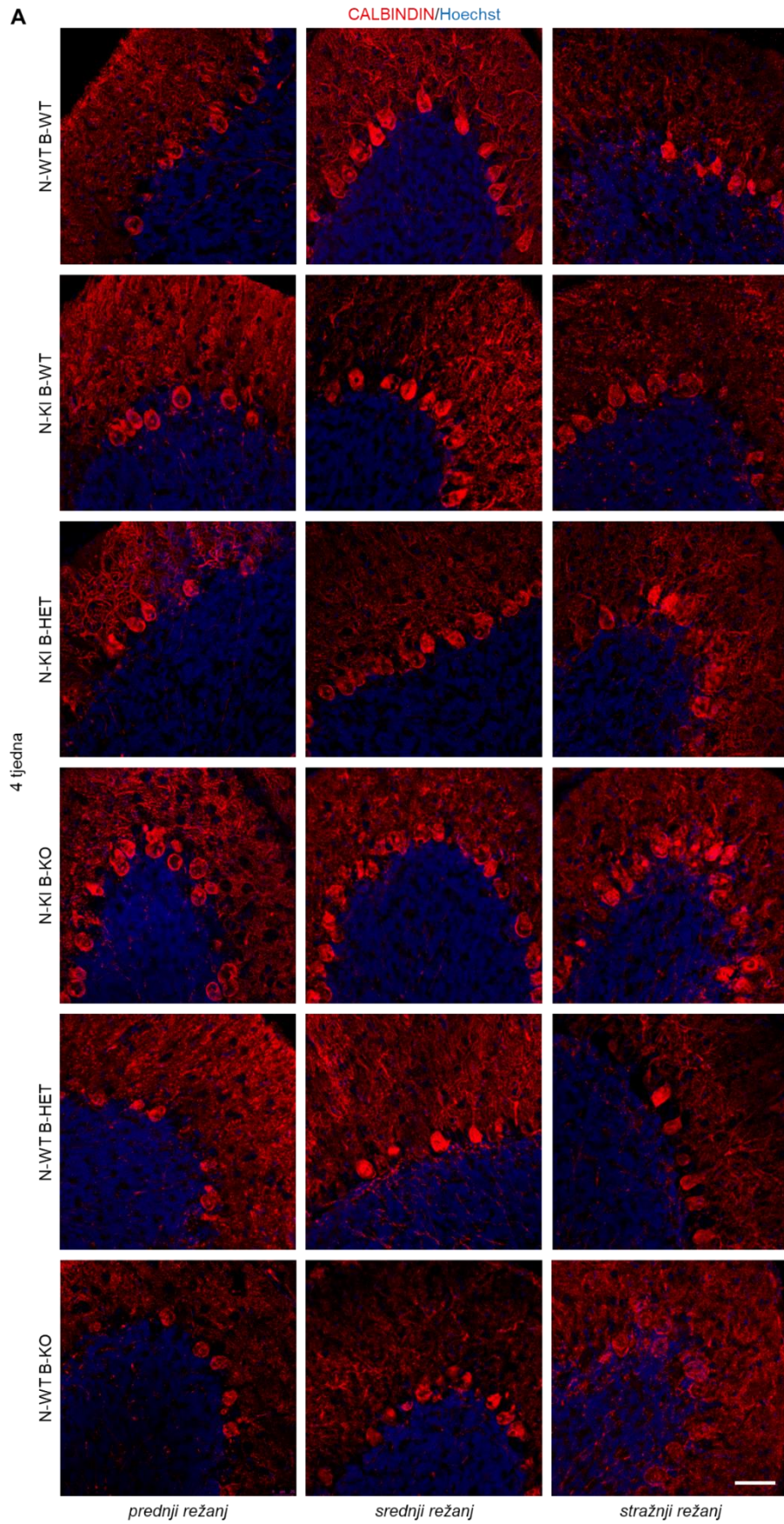


**Slika 21. Analiza tjelesne mase miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.** Niska tjelesna masa jedinki genotipa N-KI B-WT, N-KI B-HET i N-KI B-KO te progresivan gubitak tjelesne mase jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET u odnosu na jedinke divljeg tipa nakon 10 tjedana starosti. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost skupine (genotipa)  $\pm$  SD. U dobi od četiri tjedna, jedinke N-KI B-KO imaju značajno manju tjelesnu masu u odnosu na jedinke a) jedinke N-WT B-WT ( $p=0,0069$ ) i b) jedinke N-WT B-HET ( $p=0,0056$ ). U dobi od 9 tjedana, jedinke N-WT B-KO imaju značajno manju tjelesnu masu u odnosu na jedinke c) jedinke N-WT B-WT ( $p=0,0026$ ) i d) jedinke N-WT B-HET ( $p=0,0010$ ); jedinke N-KI B-WT imaju značajno manju tjelesnu masu u odnosu na jedinke e) jedinke N-WT B-WT ( $p=0,00018$ ) i f) jedinke N-WT B-HET ( $p=0,000048$ ); jedinke N-KI B-HET imaju značajno manju tjelesnu masu u odnosu na jedinke g) jedinke N-WT B-WT ( $p=0,0075$ ) i h) jedinke N-WT B-HET ( $p=0,0028$ ). U dobi od 14 tjedana, jedinke N-KI B-HET imaju značajno manju tjelesnu masu u odnosu na jedinke i) jedinke N-WT B-WT ( $p=0,0015$ ) i j) jedinke N-WT B-HET ( $p=0,0015$ ). U dobi od 15 tjedana, jedinke N-WT B-KO imaju značajno manju tjelesnu masu u odnosu na jedinke k) jedinke N-WT B-WT ( $p=0,025$ ) i l) jedinke N-WT B-HET ( $p=0,019$ ); jedinke N-KI B-WT imaju značajno manju tjelesnu masu u odnosu na jedinke m) jedinke N-WT B-WT ( $p=0,000007$ ) i n) jedinke N-WT B-HET ( $p=0,000003$ ); jedinke N-KI B-HET imaju značajno manju tjelesnu masu u odnosu na jedinke o) jedinke N-WT B-WT ( $p=0,0018$ ) i p) jedinke N-WT B-HET ( $p=0,0014$ ). Broj analiziranih jedinki po skupini (genotipu) iznosio je  $n_{4 \text{ tjedna}}=19-27$  (izuzev genotipa N-KI B-KO,  $n=4$ ),  $n_{5-9 \text{ tjedana}}=12-18$ ,  $n_{10-15 \text{ tjedana}}=7-9$ .

#### 4.2.4. Analiza neurodegeneracije u mozgu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*

Za analizu neurodegeneracije korištena su protutijela za CALBINDIN (biljeg Purkinjeovih neurona) i NEUN (biljeg jezgara zrelih neurona). Kriorezovi mišjih mozгова starosti četiri, 9 i 15 tjedana debljine 30  $\mu\text{m}$  analizirani su metodom imunohistokemije, odnosno imunofluorescencije, a homogenati malog mozga, kore velikog mozga i hipokampusa miševa istih dobnih skupina analizirani su metodom WB.

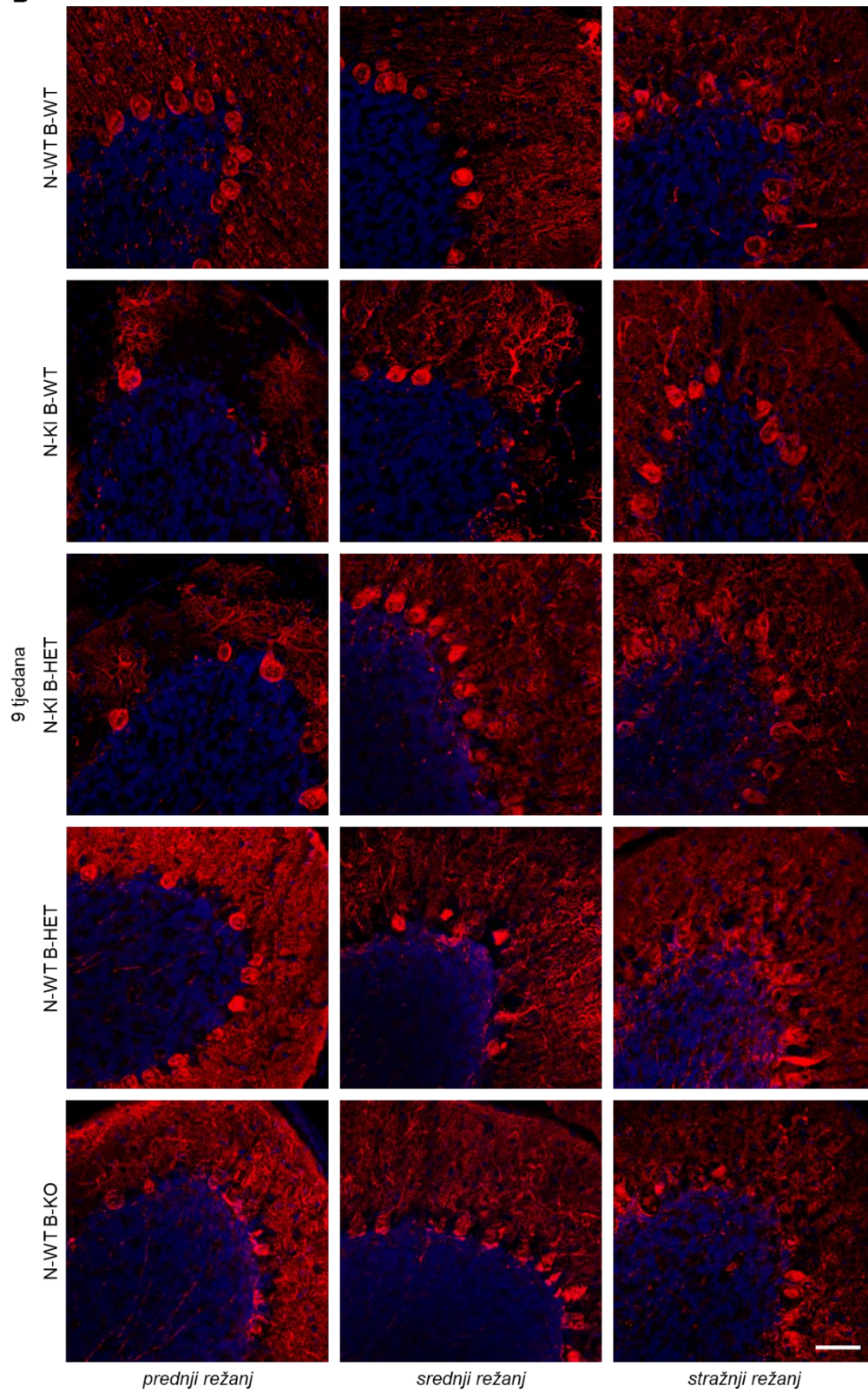
U malom mozgu jedinki nijednog od ispitivanih genotipova nije uočen gubitak Purkinjeovih neurona u dobi od četiri tjedna (**Slika 22 A, G, H**). U jedinki N-KI B-WT u dobi od 9 tjedana, u odnosu na jedinke divljeg tipa, kao i na dodatne kontrole (N-WT B-HET i N-WT B-KO) iste dobi, vidljiv je gubitak Purkinjeovih neurona (**Slika 22 B**): bojanje protutijelom za biljeg CALBINDIN pokazuje nedostatak tijela Purkinjeovih neurona, kao i gubitak dendritičkog stabla u molekularnom sloju. Ovo je svojstvo posebno izraženo u prednjim režnjevima malog mozga, a vidljivo je i u srednjim režnjevima. Jedinke genotipa N-KI B-HET starosti 9 tjedana pokazuju višu razinu očuvanosti Purkinjeovih neurona u prednjim režnjevima, dok u srednjim režnjevima nije zabilježen očigledan gubitak u odnosu na jedinke N-KI B-WT, što ukazuje na moguću sporiju progresiju bolesti NPC uslijed gubitka jednog alela gena *BACE1*. Purkinjeovi neuroni očuvani su u stražnjim režnjevima jedinki genotipa N-KI B-HET i N-KI B-WT u dobi od 9 tjedana. Međutim, u dobi od 15 tjedana (**Slika 22 C**), vidljiv je jednak, potpuni gubitak Purkinjeovih neurona u prednjim režnjevima jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET. Gubitak Purkinjeovih neurona vidljiv je i u srednjim režnjevima ovih dviju skupina u dobi od 15 tjedana, ali bez jasne razlike između skupina. Jedinke divljeg tipa i dodatne kontrole imaju potpuno očuvane Purkinjeove neurone u svim dijelovima malog mozga u dobi od 9 i 15 tjedana (**Slika 22 B, C**), što je potvrđeno i metodom WB (**Slika 22 G, I, J**). Analizom WB potvrđen je i značajan gubitak Purkinjeovih neurona u malom mozgu jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET u dobi od 9 (**Slika 22 G, I**) i 15 tjedana (**Slika 22 G, J**). Međutim, ovom metodom nije zabilježena razlika u razini odumrlih, odnosno očuvanih Purkinjeovih neurona između jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET u dobi od 9 tjedana (**Slika 22 G, I**) kao što je kvalitativno vidljivo na prerezima mozga (**Slika 22 B**). Analize biljega NEUN nisu pokazale nikakvu razliku u raspodjeli (**Slika 22 D-F**), odnosno razini zrelih neurona u malom mozgu jedinki nijednog od ispitivanih genotipova ni dobnih skupina (**Slika 22 G, H**). Razlika u raspodjeli i razini biljega NEUN nije uočena niti u kori velikog mozga jedinki nijednog od ispitivanih genotipova, odnosno dobnih skupina (**Slika 23 A-D**), izuzev snižene razine biljega NEUN zabilježene u homogenatu jedinki N-KI B-HET u dobi od 15 tjedana (**Slika 23 B, D**). Imunohistokemijskom analizom hipokampusa pokazano je da u odnosu na jedinke divljeg tipa i jedinke N-WT B-HET, jedinke N-KI B-WT, ali i jedinke N-WT B-KO, pokazuju naznake gubitka zrelih neurona u dentatnom girusu već u dobi od četiri tjedna (**Slika 24 A**), kao i s 9 tjedana starosti (**Slika 24 B**). Jedinke genotipa N-KI B-HET, a zanimljivo ni jedinke N-KI B-KO, nisu pokazale ovo svojstvo. U dobi od 15 tjedana, gubitak zrelih neurona u dentatnom girusu je nešto manje izražen u jedinki N-KI B-WT, ali je uočeno u jedinki N-KI B-HET, kao i u kontroli N-WT B-HET (**Slika 24 C**). Analizom hipokampusa jedinki starosti 15 tjedana metodom WB potvrđena je značajno snižena razina biljega NEUN u jedinki N-KI B-WT te N-WT B-KO u odnosu na ostale genotipove (**Slika 24 D, E**).



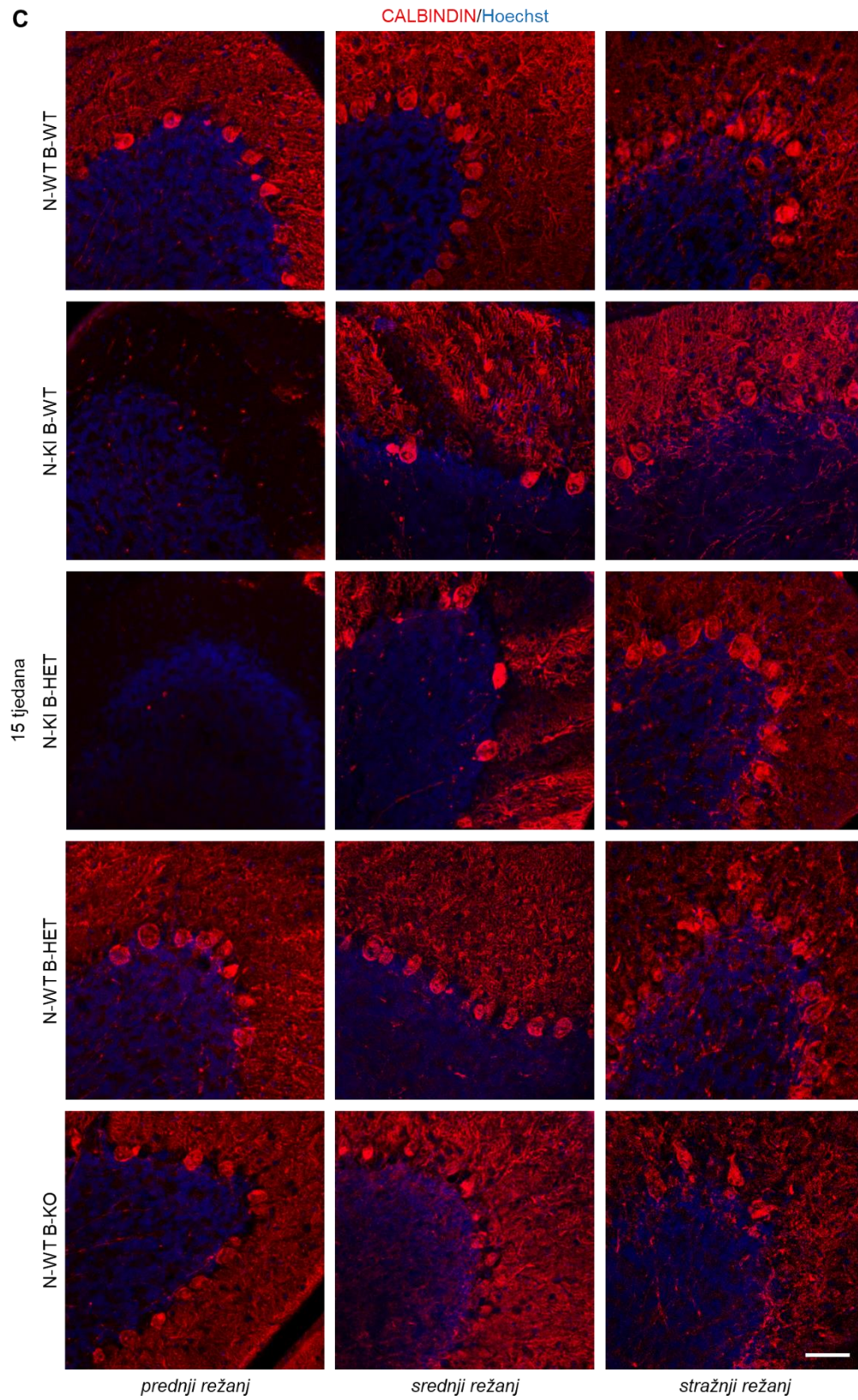


**B**

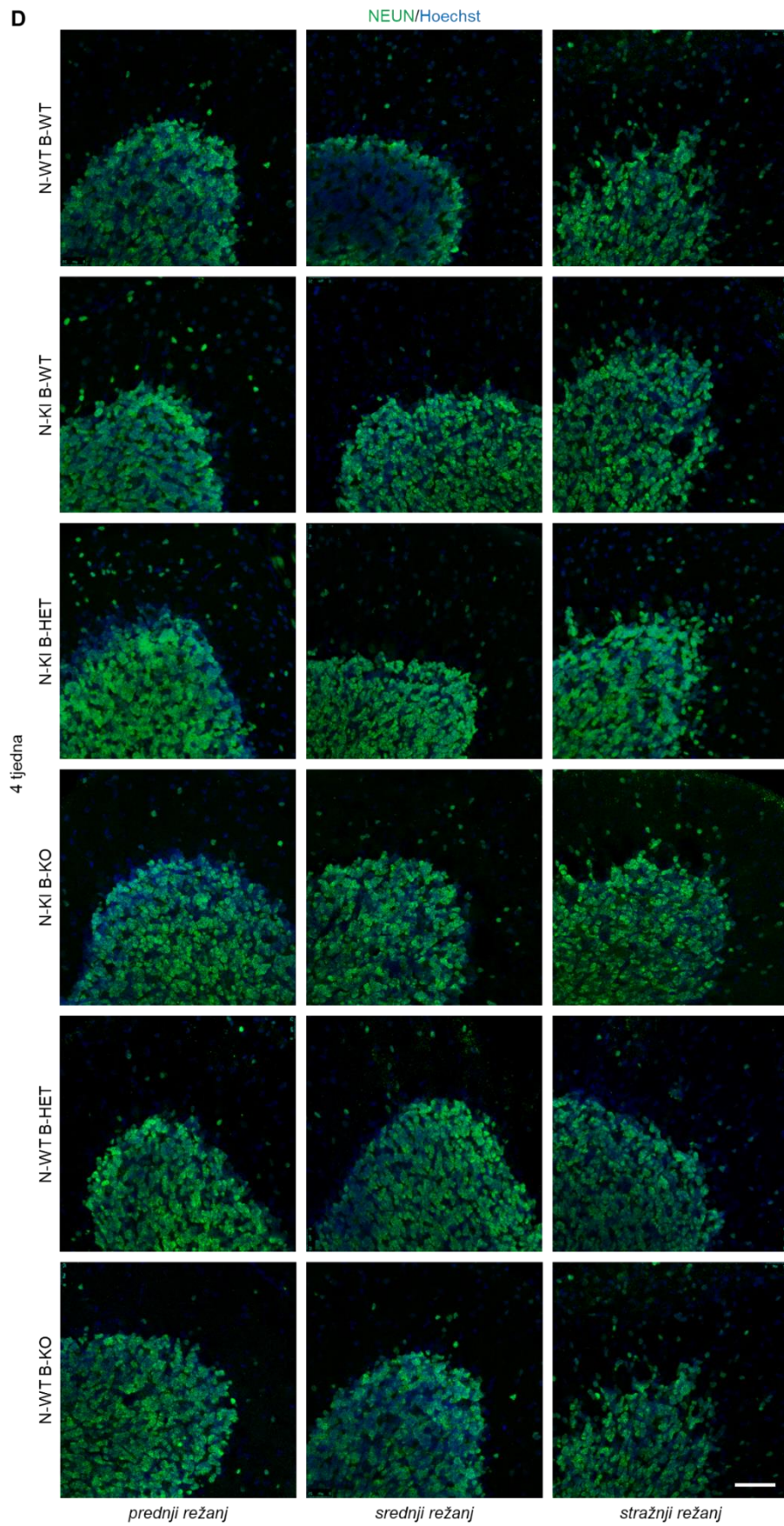
CALBINDIN/Hoechst



**C**

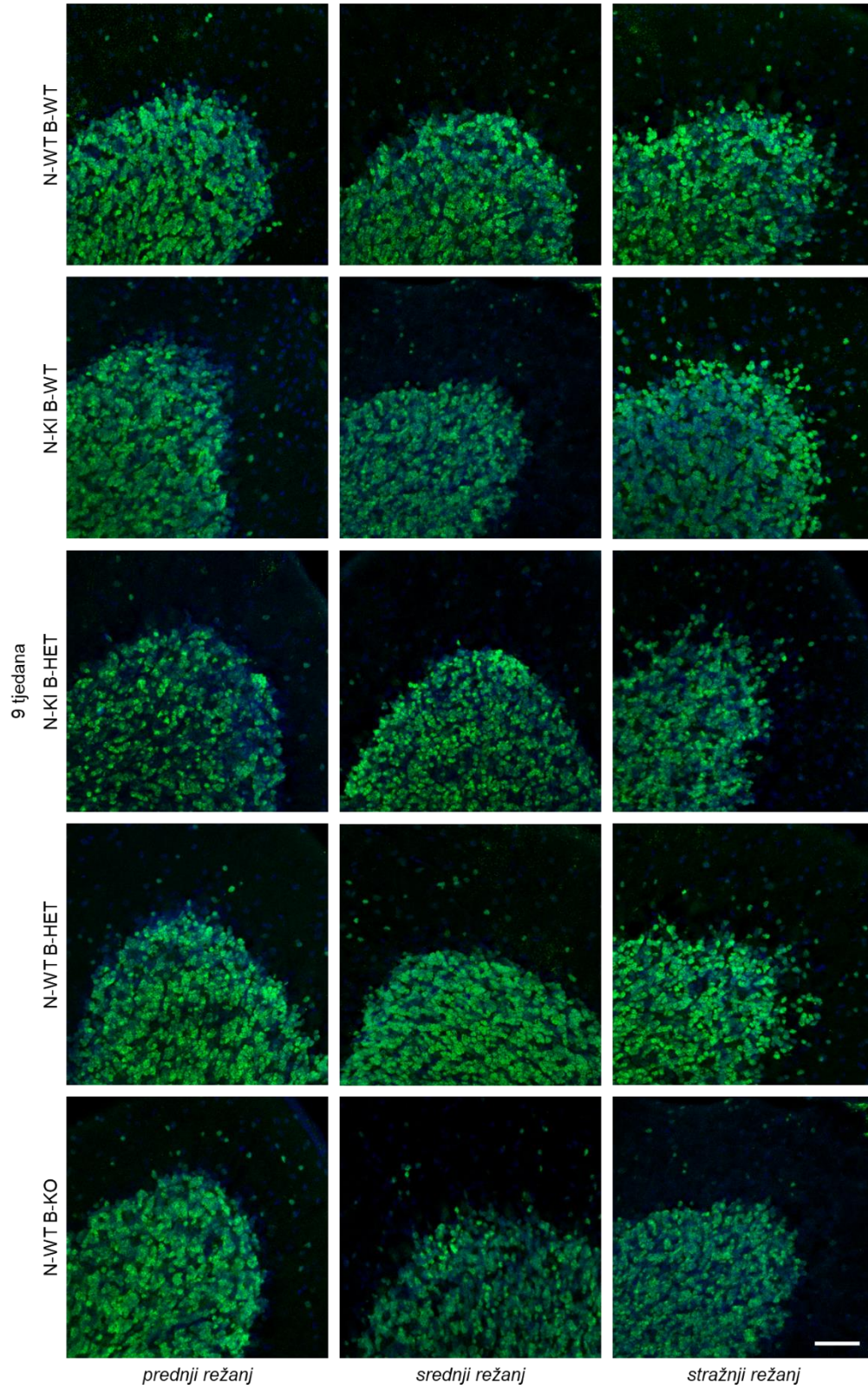






**E**

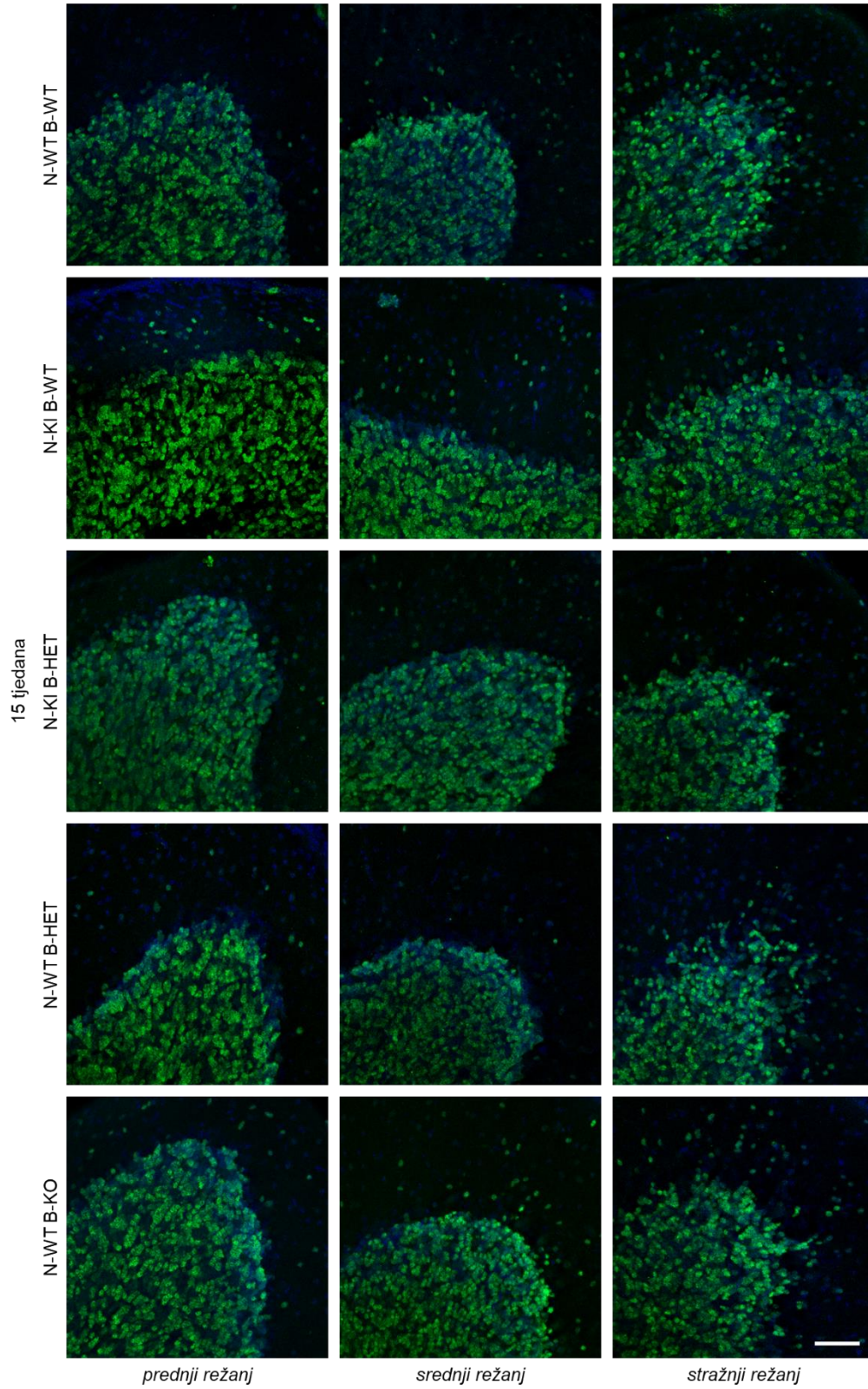
NEUN/Hoechst

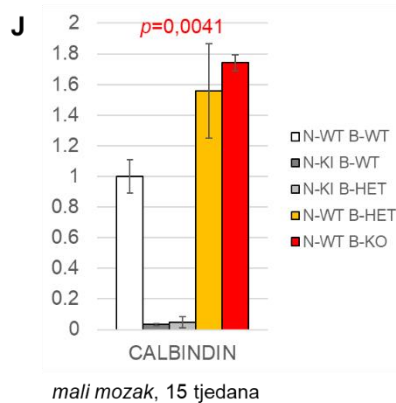
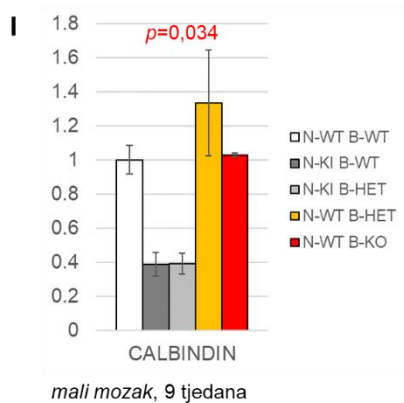
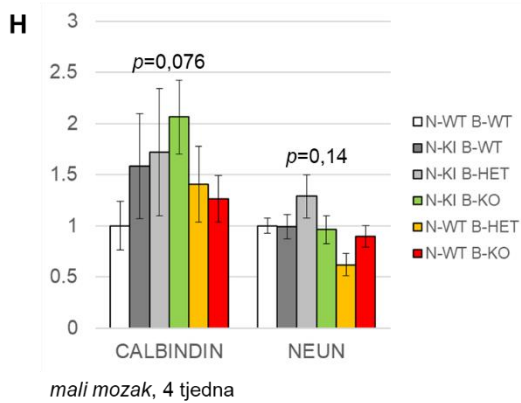
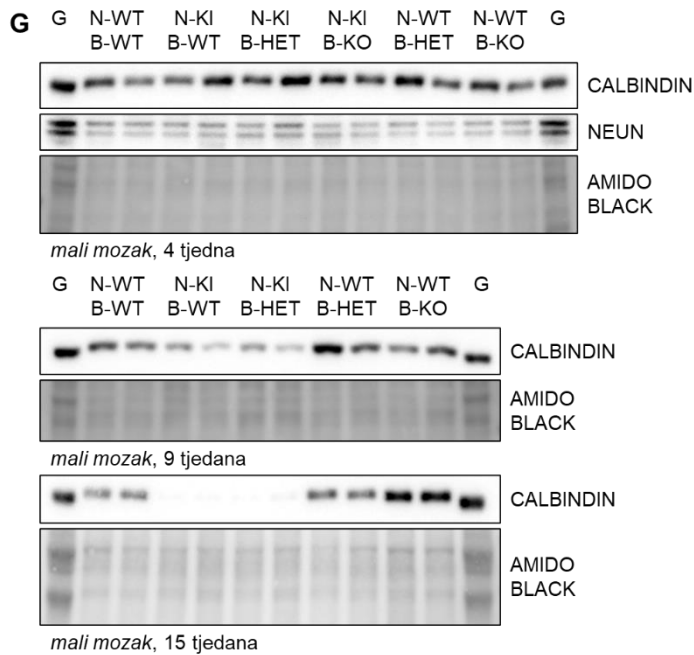




**F**

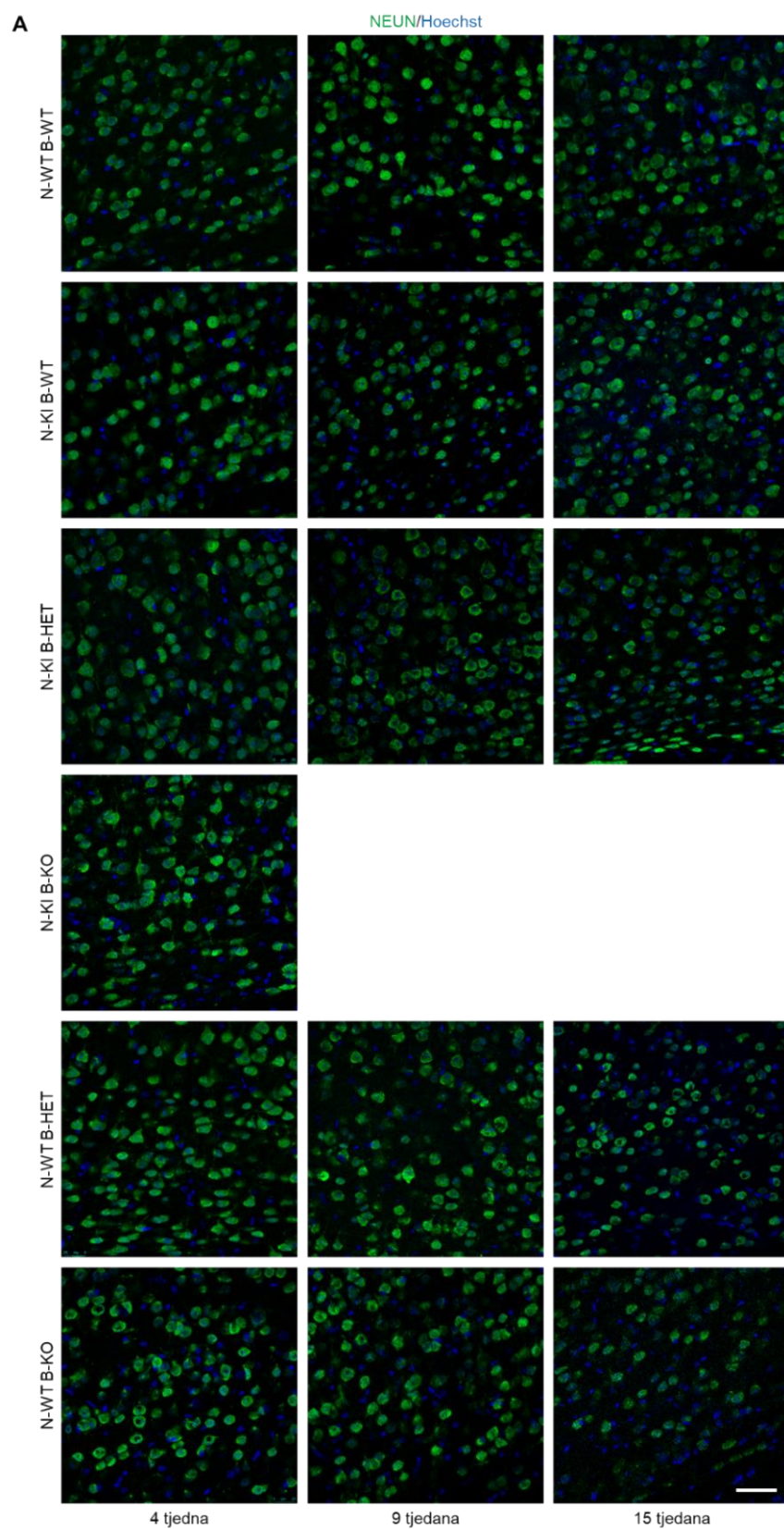
NEUN/Hoechst



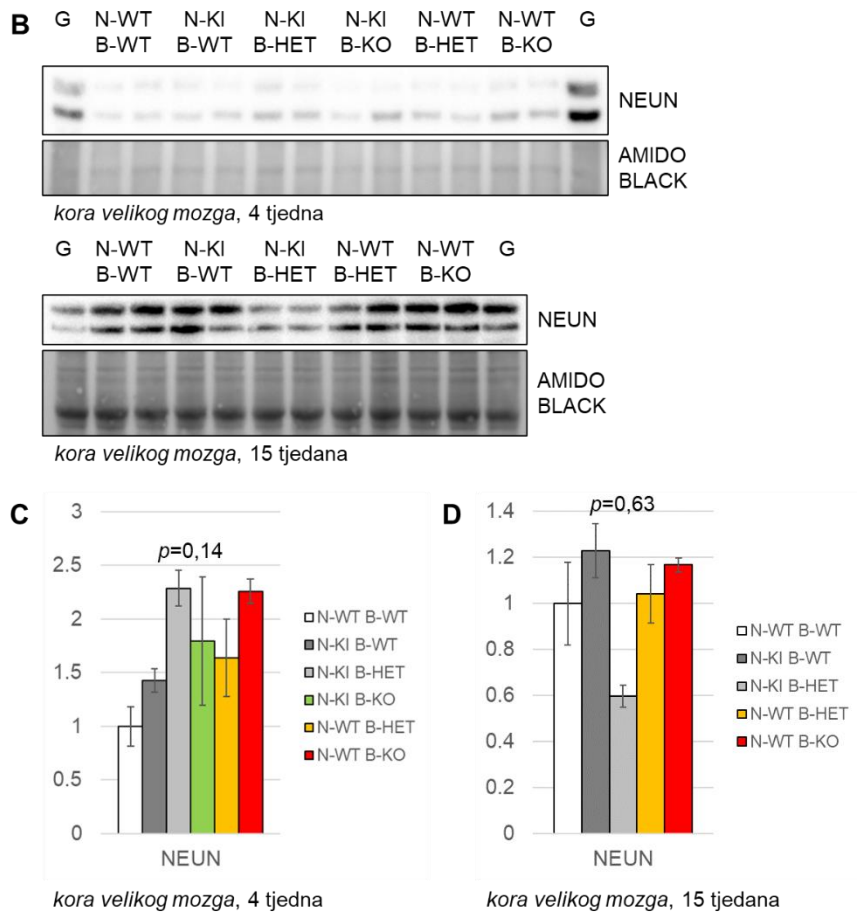


**Slika 22. Analiza biljega neurodegeneracije u malom mozgu miševa *knock-in NPC1-I10616T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.** Imunohistokemijska analiza Purkinjeovih neurona u malom mozgu miševa u dobi od četiri (A), 9 (B) i 15 tjedana (C). Imunohistokemijska analiza zrelih neurona u malom mozgu miševa u dobi od četiri (D), 9 (E) i 15 tjedana (F). Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). CALBINDIN (crveno) – biljeg Purkinjeovih neurona, NEUN (zeleno) – biljeg jezgara zrelih neurona. Skala 50  $\mu$ m. G Analiza biljega neurodegeneracije metodom WB u malom mozgu miševa. Kvantitativni prikaz razine biljega u malom mozgu miševa u dobi od četiri (H), 9 (I) i 15 tjedana (J). Na grafovima su prikazane  $p$  vrijednosti dobivene ukupnom statističkom analizom, dok je *post-hoc*

analiza, odnosno usporedba srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina prikazana u **Privitku 3** (biljeg CALBINDIN) i **Privitku 4** (biljeg NEUN).



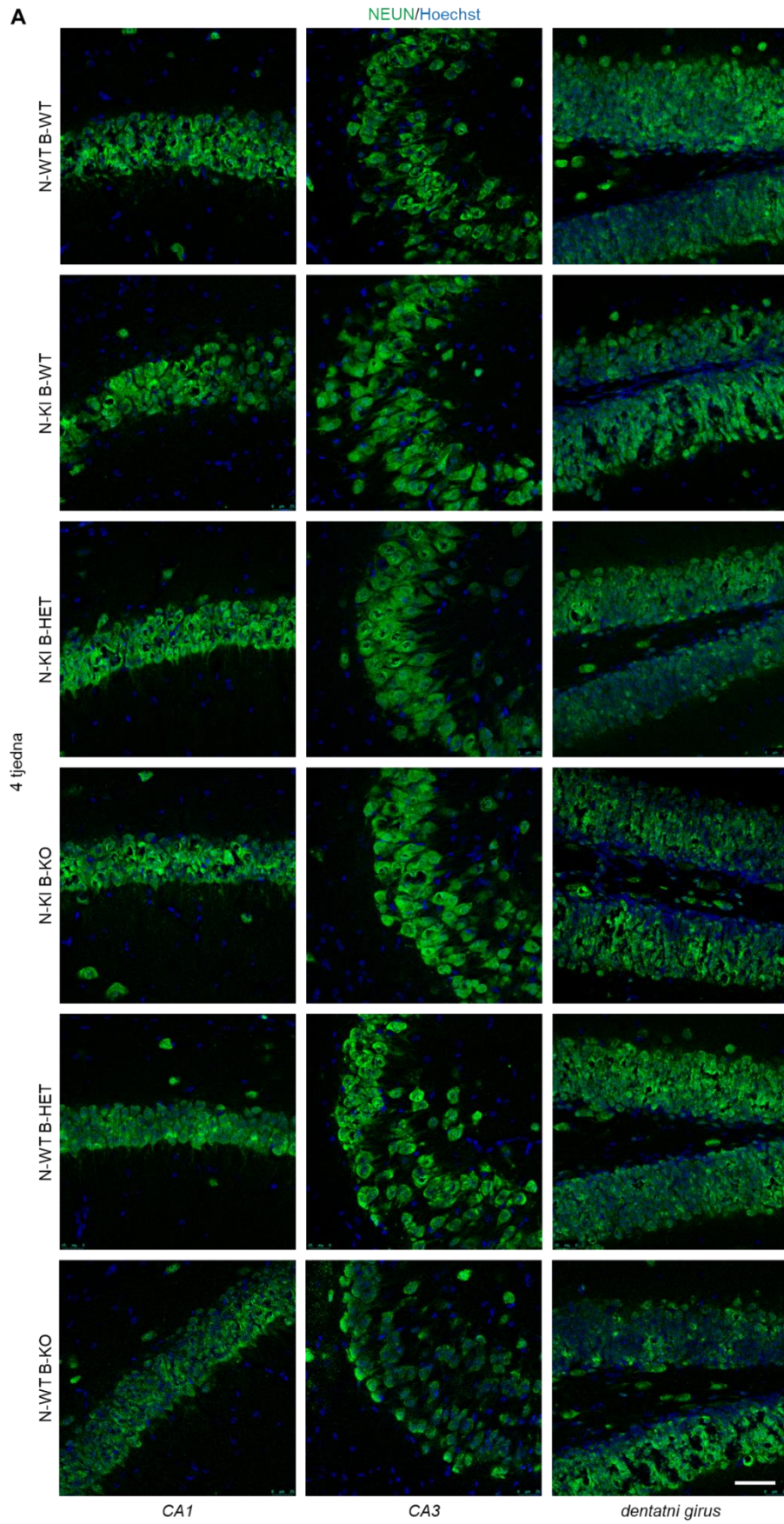




**Slika 23. Analiza biljega neurodegeneracije u kori velikog mozga miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.** **A** Imunohistokemijska analiza zrelih neurona u kori velikog mozga miševa u dobi od četiri, 9 i 15 tjedana. Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). NEUN (zeleno) – biljeg jezgara zrelih neurona. Skala 50  $\mu\text{m}$ . **B** Analiza biljega neurodegeneracije metodom WB u kori velikog mozga miševa. Kvantitativni prikaz razine biljega u kori velikog mozga miševa u dobi od četiri (**C**) i 15 tjedana (**D**). Na grafovima su prikazane  $p$  vrijednosti dobivene ukupnom statističkom analizom, dok je *post-hoc* analiza, odnosno usporedba srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina prikazana je u **Privitku 4** (biljeg NEUN).

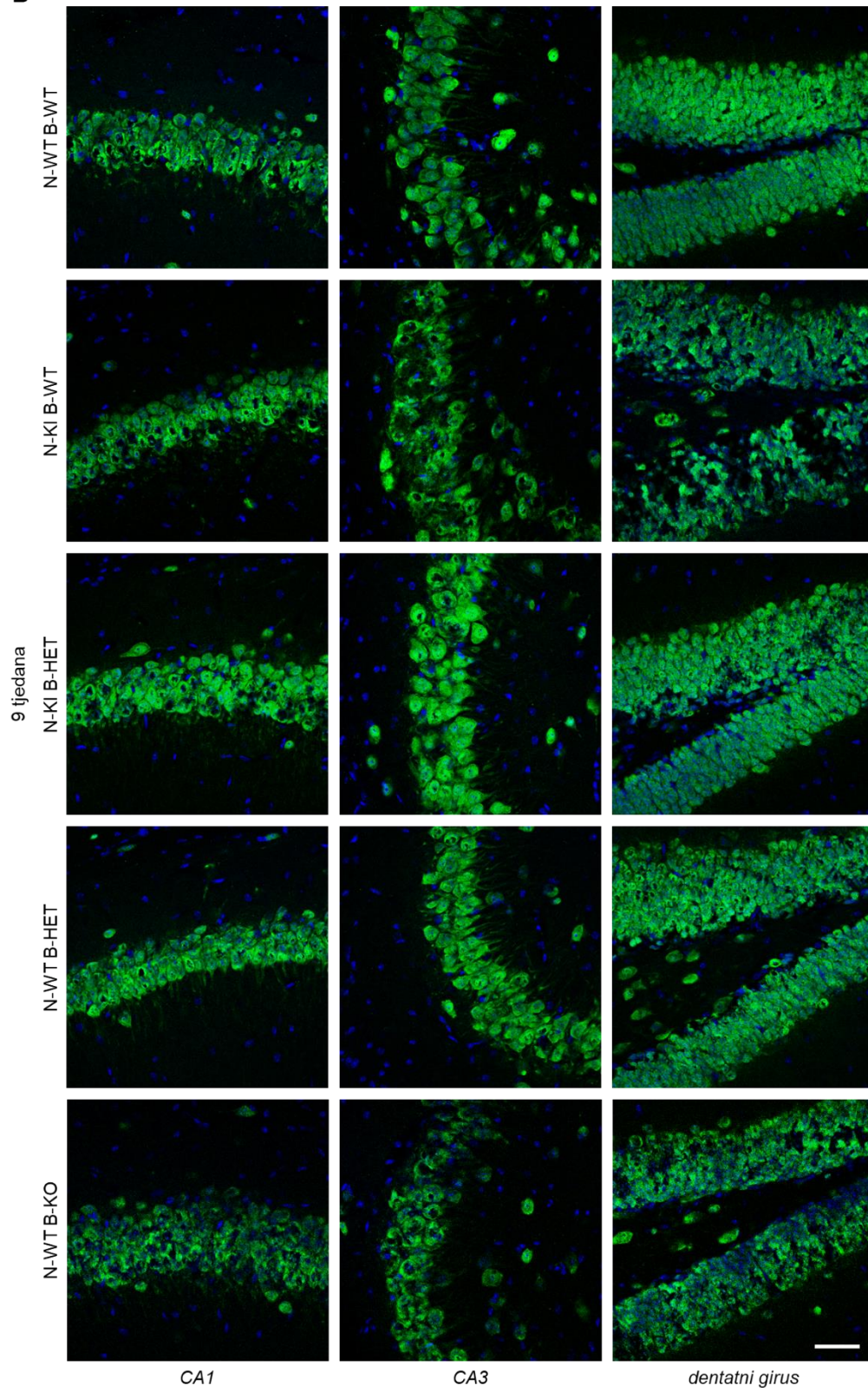


**A**



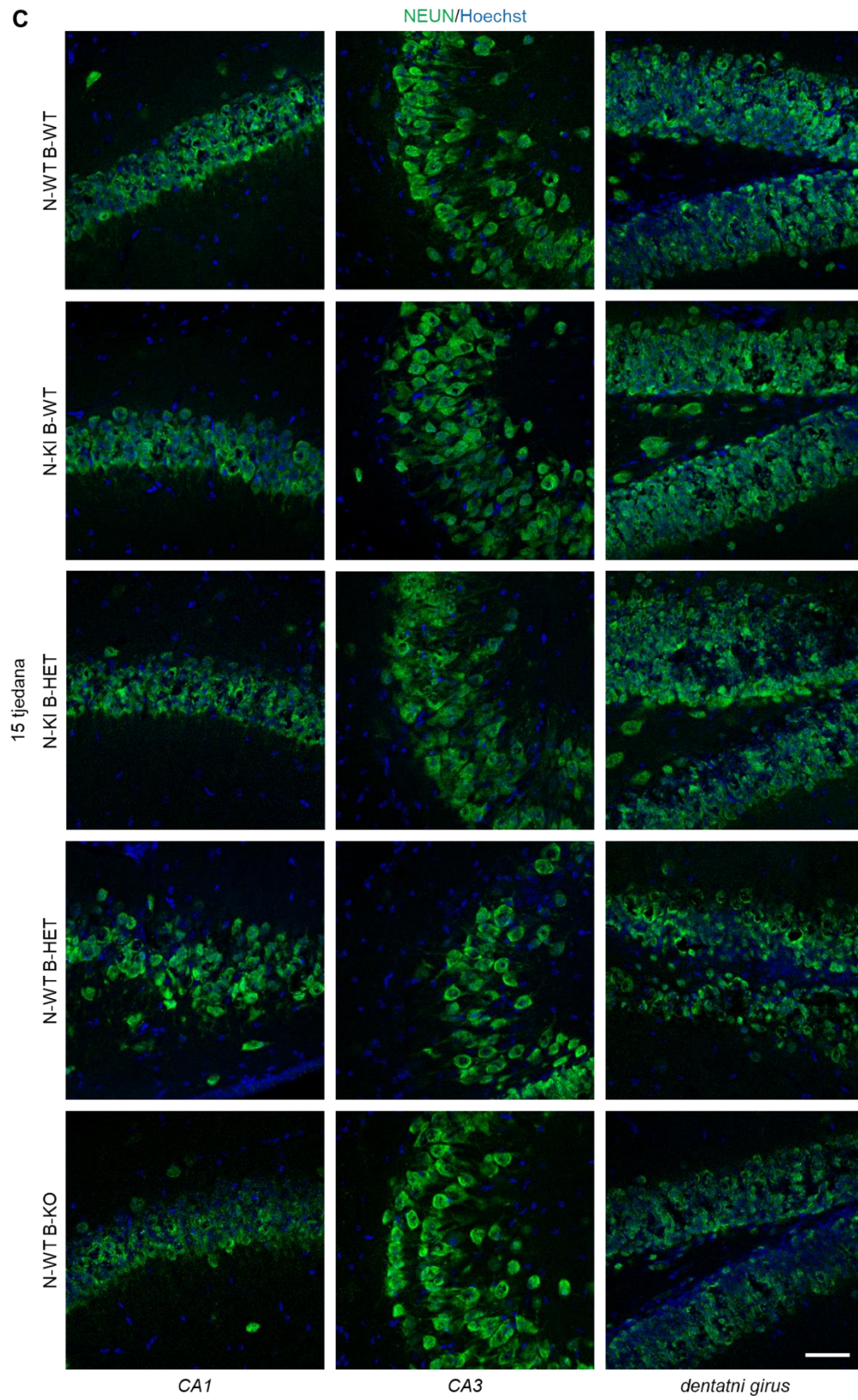
**B**

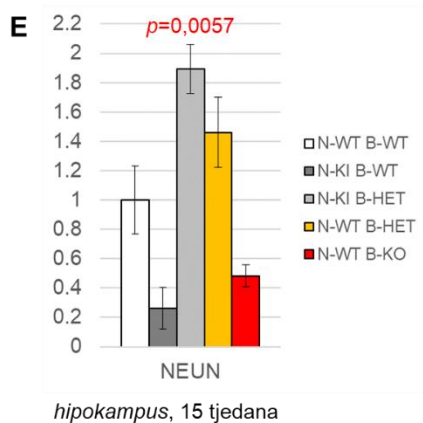
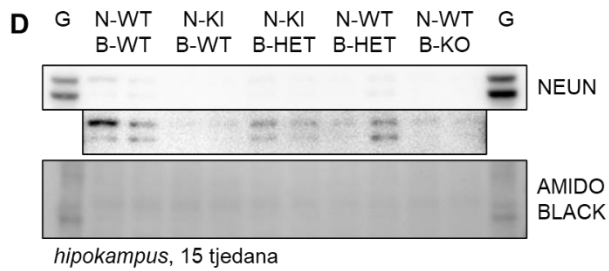
NEUN/Hoechst





**C**





**Slika 24. Analiza biljega neurodegeneracije u hipokampusu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.** Imunohistokemijska analiza zrelih neurona u hipokampusu miševa u dobi od četiri (A), 9 (B) i 15 tjedana (C). Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). NEUN (zeleno) – biljeg jezgara zrelih neurona. Skala 50  $\mu$ m. **D** Analiza biljega neurodegeneracije metodom WB u hipokampusu miševa. **E** Kvantitativni prikaz razine biljega u hipokampusu miševa u dobi od 15 tjedana. Na grafu je prikazana *p* vrijednosti dobivena ukupnom statističkom analizom, dok je *post-hoc* analiza, odnosno usporedba srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina prikazana u **Privitku 4** (biljeg NEUN).

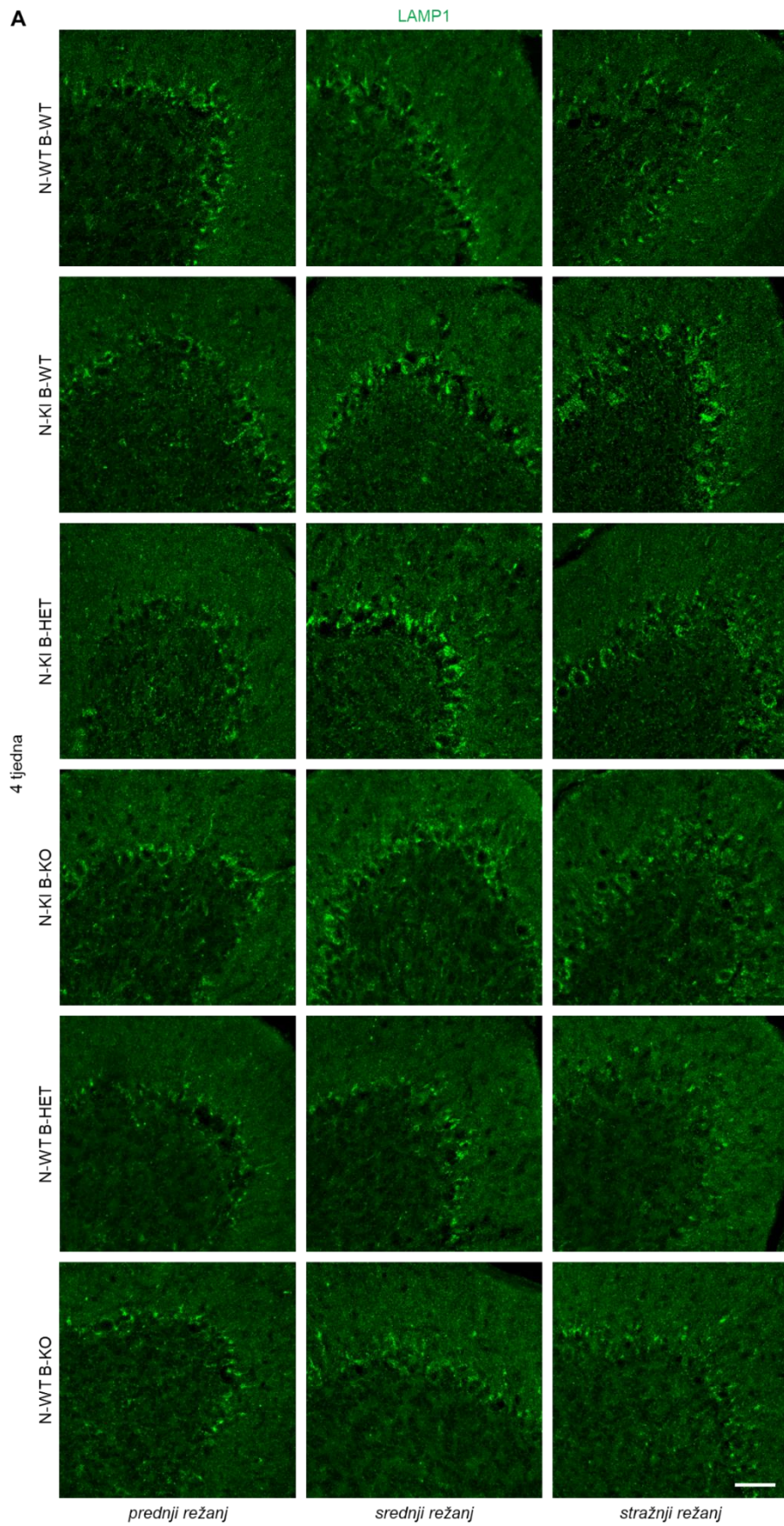
#### 4.2.5. Poremećaj endolizosomalnog puta u mozgu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*

Za analizu endolizosomalnog puta korištena su protutijela za EEA1 (biljeg ranih endosoma), RAB7 (biljeg kasnih endosoma) i LAMP1 (biljeg lizosoma). Kriorezovi mišjih mozгова starosti četiri, 9 i 15 tjedana debljine 16  $\mu\text{m}$  analizirani su metodom imunohistokemije, odnosno imunofluorescencije, a homogenati malog mozga, kore velikog mozga i hipokampusa analizirani su metodom WB.

U malom mozgu jedinki svih genotipova u dobi od četiri tjedna, analiza lizosomalnog biljega LAMP1 rezultirala je ujednačenim bojanjem ovog biljega primarno u tijelima Purkinjeovih neurona (**Slika 25 A**). U dobi od 9 tjedana, u jedinki N-KI B-WT u odnosu na jedinke divljeg tipa i dodatne kontrole (N-WT B-HET i N-WT-B-KO) vidljivo je promijenjeno, točkastije bojanje lizosomalnog biljega u prednjim i srednjim režnjevima malog mozga (**Slika 25 B**). U jedinki N-KI B-WT dolazi do nakupljanja biljega LAMP1 u velike vezikule, nevezano samo za tijela Purkinjeovih neurona, već je prošireno i na molekularni sloj režnjeva malog mozga. Ovakvo bojanje prisutno je, iako slabije, u prednjim režnjevima jedinki N-KI B-HET, dok su u srednjim režnjevima zabilježene samo naznake nakupljanja lizosomalnih vezikula. U dobi od 15 tjedana, promijenjeno bojanje prisutno je u molekularnom sloju prednjih i srednjih režnjeva malog mozga jedinki N-KI B-WT, ali i jedinki N-KI B-HET (**Slika 25 C**). Nije zabilježena promjena u bojanju stražnjih režnjeva ovih skupina. Jedinke divljeg tipa i dodatne kontrole (N-WT B-HET i N-WT-B-KO) pokazuju ujednačeno bojanje kroz sve režnjeve u dobi od 9 (**Slika 25 B**) i 15 tjedana (**Slika 25 C**). Bojanje ranih endosoma u malom mozgu rezultiralo je samo pozadinskim bojanjem, stoga nije prikazano.

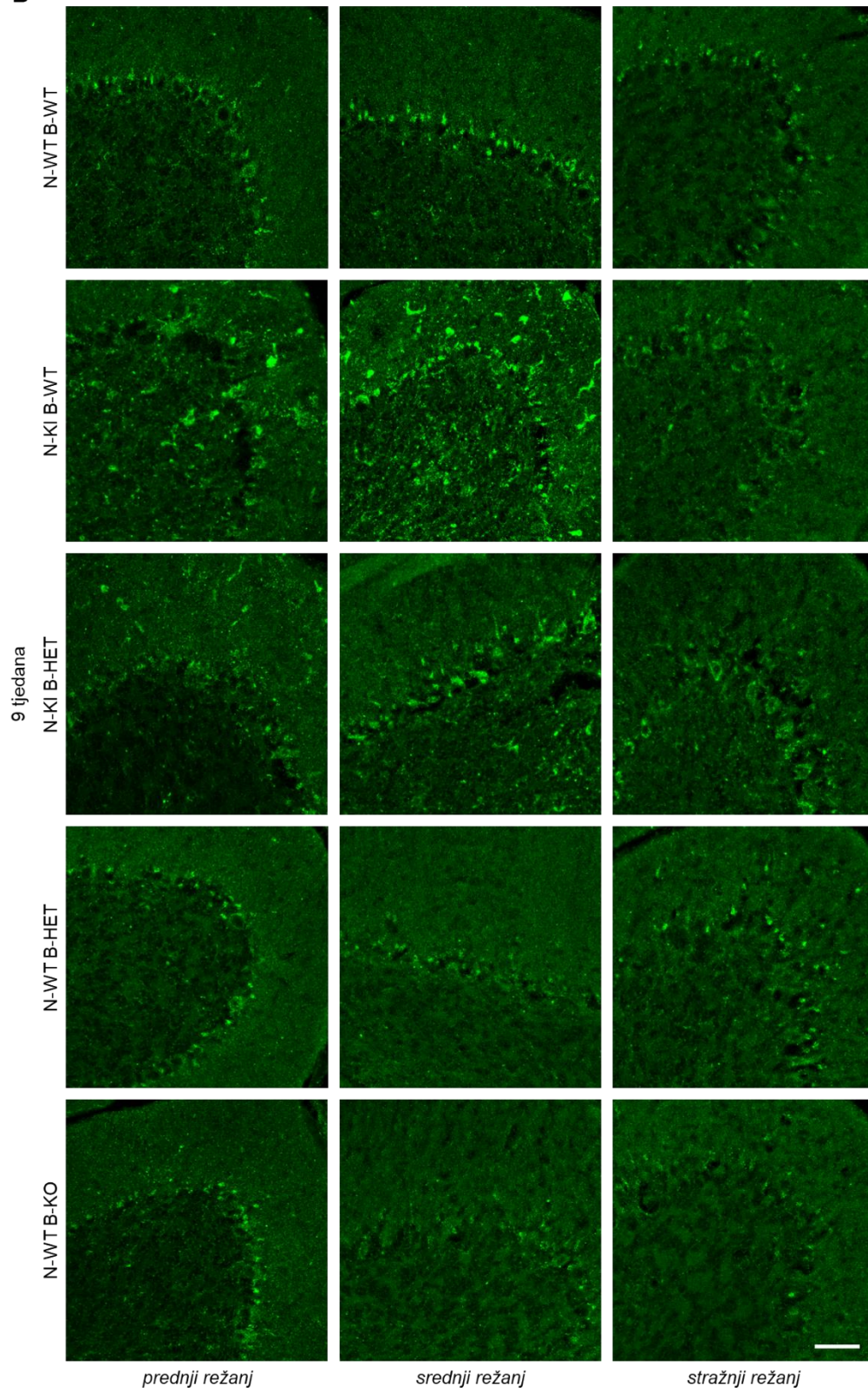
Analizom homogenata malog mozga metodom WB nije zabilježena značajna razlika u razini biljega ranih endosoma EEA1 između ispitivanih genotipova u dobi od četiri i 9 tjedana (**Slika 25 D-F**). Razina biljega kasnih endosoma RAB7 povišena je u jedinki N-WT B-KO u odnosu na ostale genotipove u dobi od četiri (**Slika 25 D, E**) i 15 tjedana (**Slika 25 D, G**). Razina lizosomalnog biljega LAMP1 povišena je u jedinki N-KI B-WT u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od 9 tjedana (**Slika 25 D, F**). U dobi od 15 tjedana, razina biljega LAMP1 povišena je u jedinki N-KI B-WT, ali i N-KI B-HET (**Slika 25 D, G**), što je u skladu s rezultatima imunohistokemijske analize.





**B**

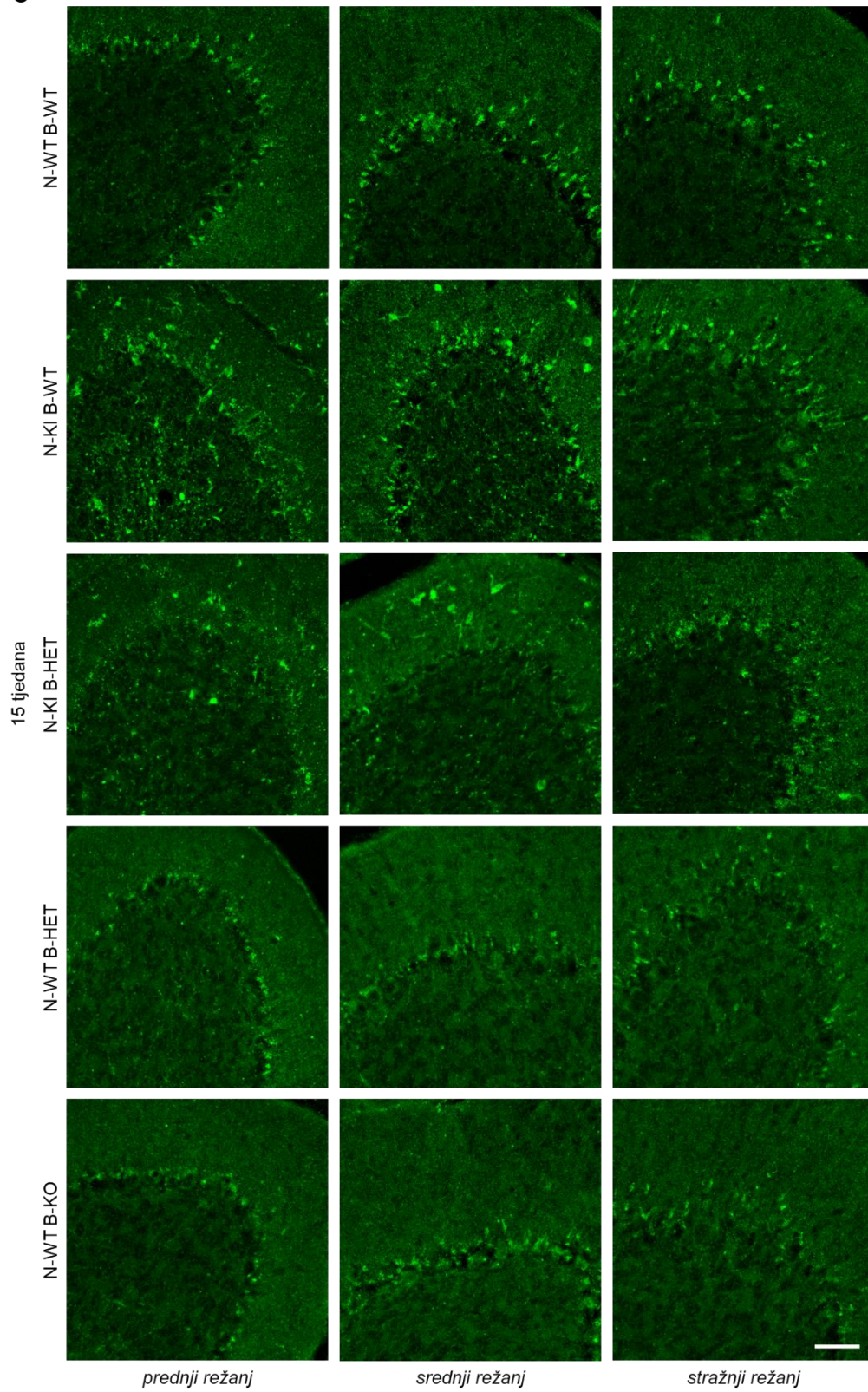
LAMP1



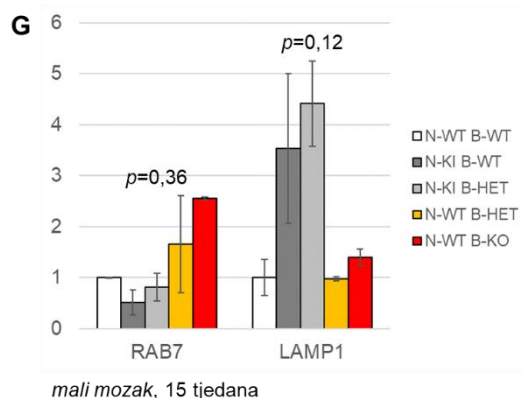
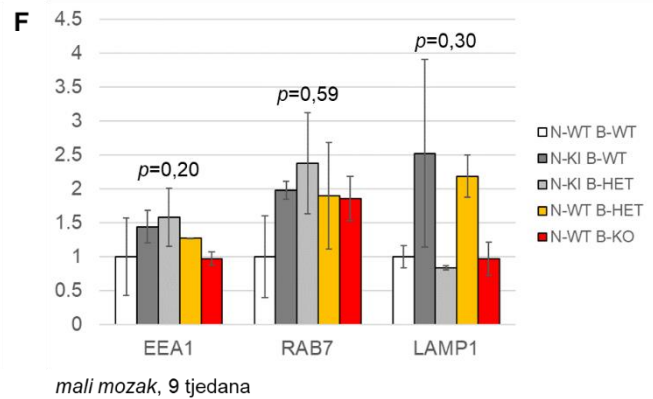
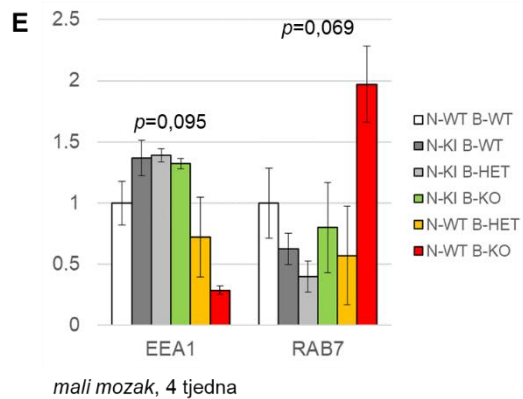
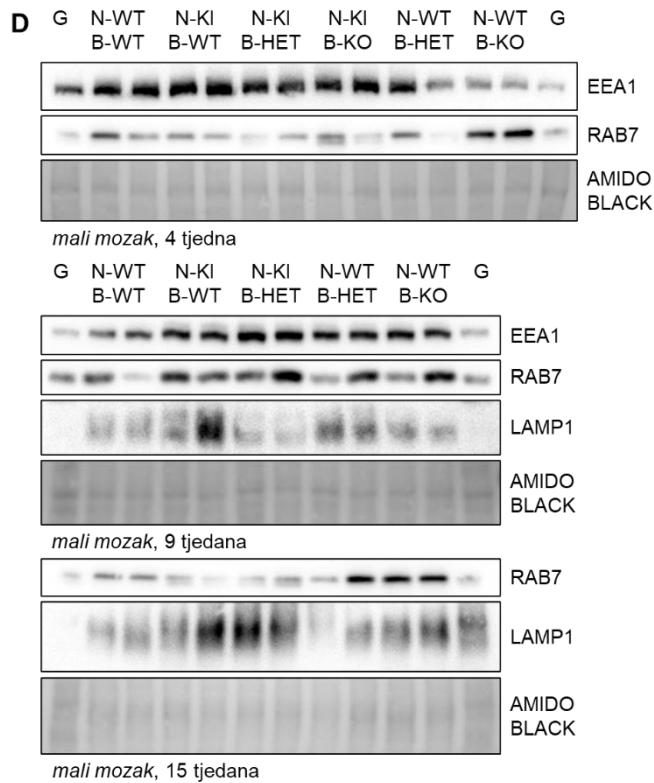


**C**

LAMP1





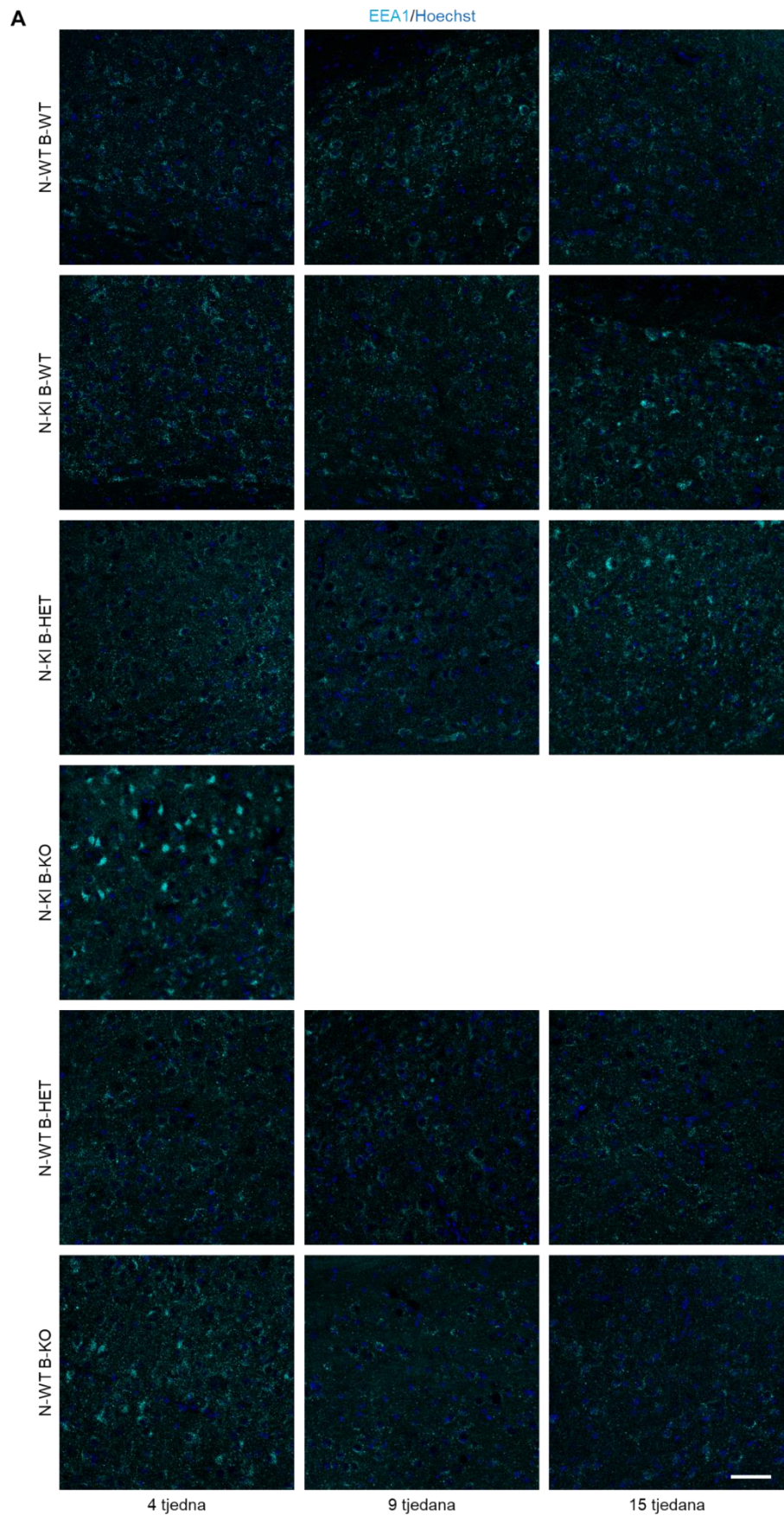


**Slika 25. Analiza biljega endolizosomalnog puta u malom mozgu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*. Imunohistokemijska analiza biljega lizosoma (LAMP1) u malom mozgu miševa u dobi od četiri (A), 9 (B) i 15 tjedana (C). Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). LAMP1 (zeleno) – biljeg lizosoma. Skala 50  $\mu$ m. G Analiza biljega**

endolizosomalnog puta metodom WB u malom mozgu miševa. EEA1 – biljeg ranih endosoma, RAB7 – biljeg kasnih endosoma, LAMP1 – biljeg lizosoma. Kvantitativni prikaz razine biljega u malom mozgu miševa u dobi od četiri (E), 9 (F) i 15 tjedana (G). Na grafovima su prikazane *p* vrijednosti dobivene ukupnom statističkom analizom, dok je *post-hoc* analiza, odnosno usporedba srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina prikazana je u **Privitku 5** (biljeg EEA1), **Privitku 6** (biljeg RAB7) i **Privitku 7** (biljeg LAMP1).

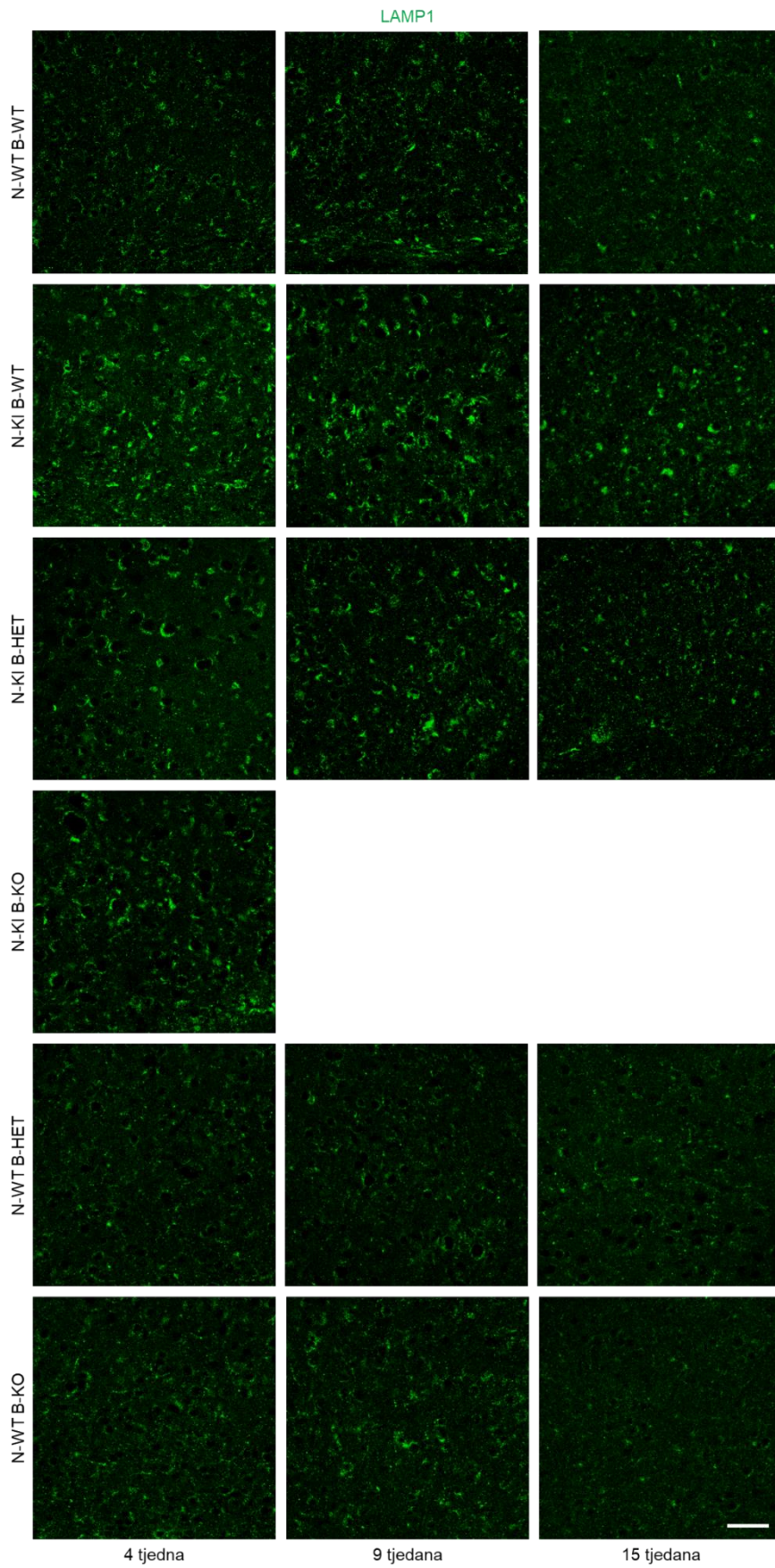
Imunohistokemijskom analizom kore velikog mozga zabilježeno je značajno povećano nakupljanje biljega ranih endosoma EEA1 u jedinki N-KI B-KO u dobi od četiri tjedna u usporedbi s ostalim genotipovima (**Slika 26 A**). Dolazi do nakupljanja ovog biljega i u jedinki N-WT B-KO u dobi od četiri tjedna, no ono se gubi u kasnijoj dobi. U dobi od 15 tjedana, jedinke N-KI B-WT i N-KI B-HET pokazuju snažno nakupljanje ovog biljega u somi neurona (**Slika 26 A**). Imunohistokemijskom analizom lizosomalnog biljega LAMP1 zabilježeno je povećano nakupljanje vezikula, odnosno lizosomalnog biljega u jedinki N-KI B-WT u odnosu na jedinke divljeg tipa i dodatne kontrole (N-WT B-HET i N-WT B-KO) u svim ispitivanim dobnim skupinama (**Slika 26 B**). Jedinke N-KI B-HET također pokazuju nešto veće nakupljanje lizosoma u odnosu na jedinke divljeg tipa, ali je ono u svim dobnim skupinama manje izraženo nego u jedinki N-KI B-WT. Jedinke N-KI B-KO u dobi od četiri tjedna također pokazuju značajno nakupljanje biljega lizosoma u odnosu na jedinke divljeg tipa i dodatne kontrole.

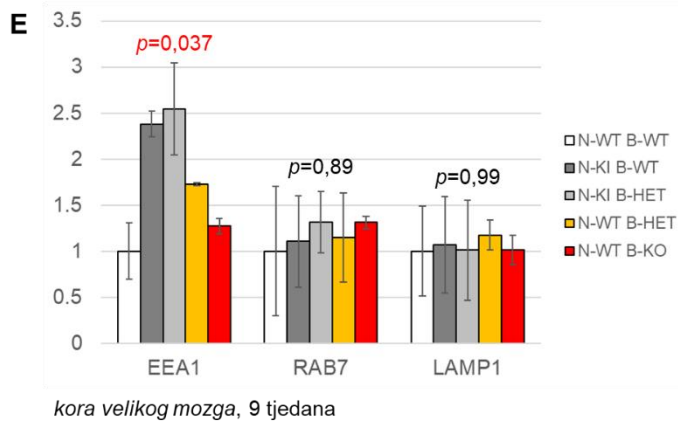
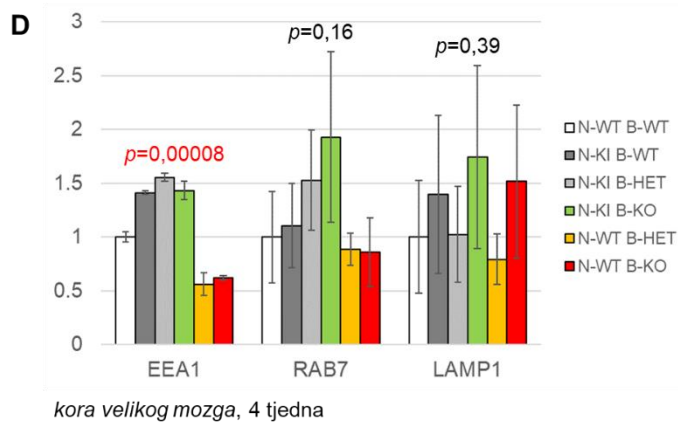
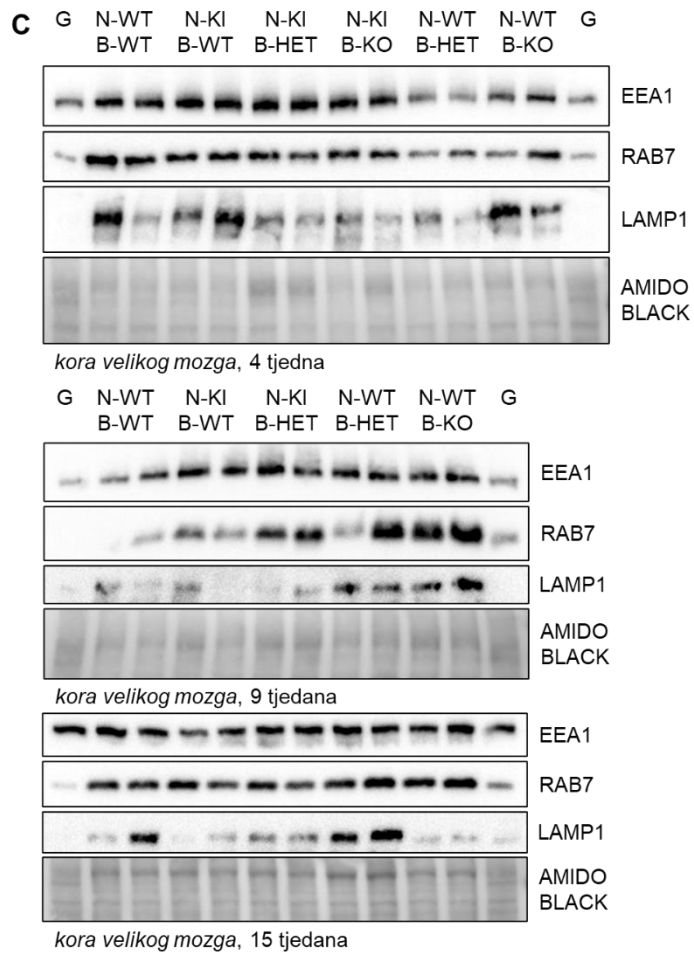
Analizom homogenata kore velikog mozga metodom WB uočena je značajno povišena razina biljega ranih endosoma EEA1 u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od 9 tjedana (**Slika 26 C, E**). Razina biljega kasnih endosoma RAB7 povišena je u jedinki N-KI B-KO u odnosu na jedinke divljeg tipa i dodatne kontrole (N-WT B-HET i N-WT B-KO) već u dobi od četiri tjedna (**Slika 26 C, D**). Ostali ispitivani genotipovi nisu pokazali značajnu razliku u razini ovog biljega neovisno o dobnj skupini (**Slika 26 C-F**). Povišena razina lizosomalnog biljega LAMP1 zabilježena je u homogenatima kore velikog mozga jedinki N-KI B-WT, N-KI B-KO, ali i N-WT B-KO u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od četiri tjedna (**Slika 26 C, D**). U dobi od 9 tjedana nije zabilježena razlika u razini ovog biljega između ispitivanih genotipova (**Slika 26 C, E**), a u dobi od 15 tjedana je razina biljega LAMP1 snižena u jedinki N-KI B-WT u odnosu na ostale genotipove (**Slika 26 C, F**).

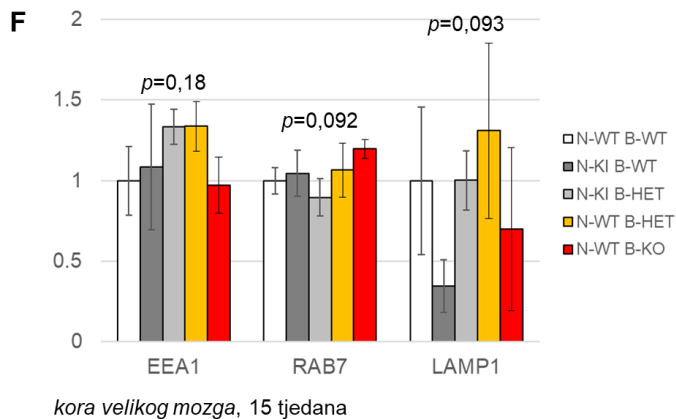




**B**







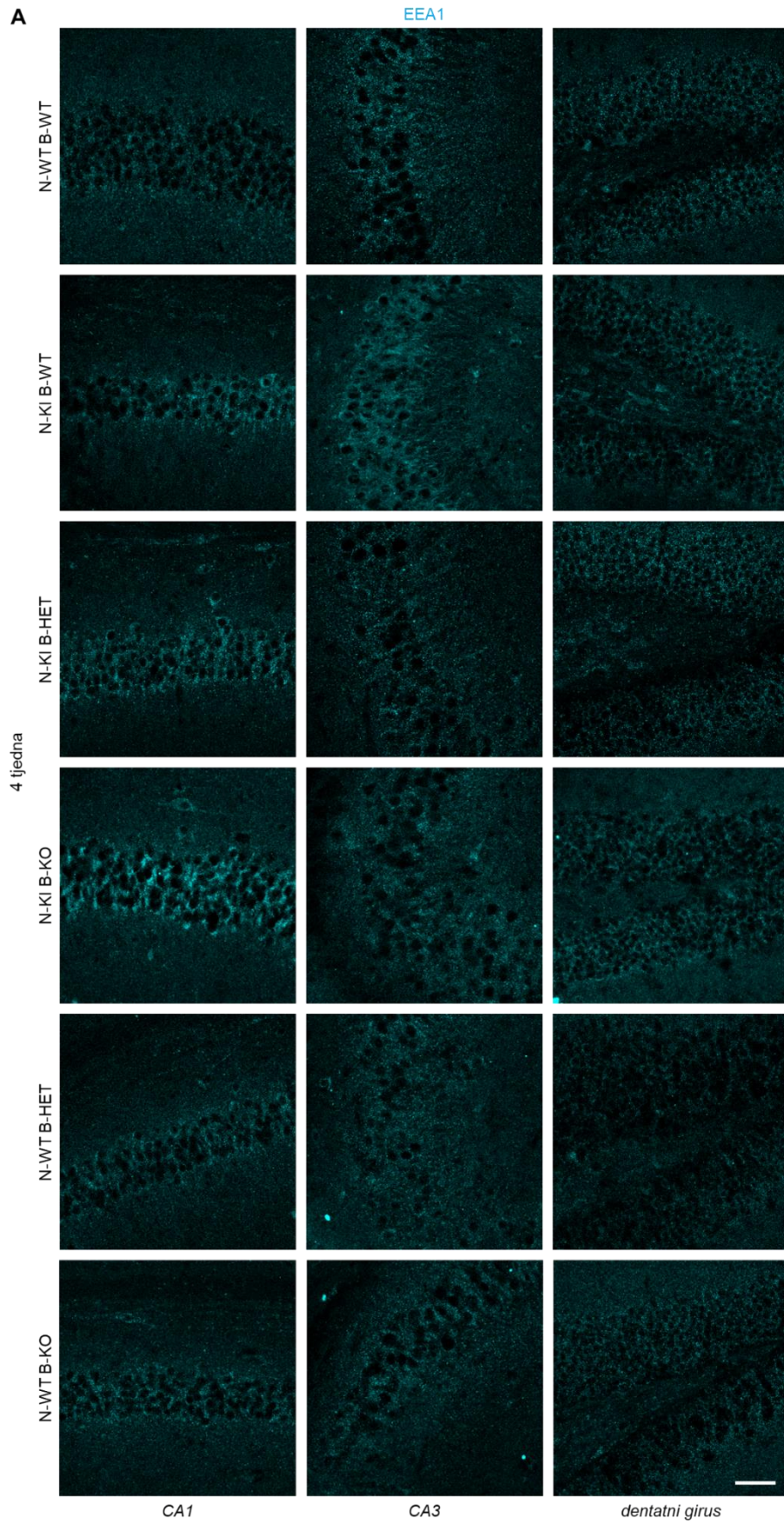
**Slika 26. Analiza biljega endolizosomalnog puta u kori velikog mozga miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.** Imunohistokemijska analiza biljega ranih endosoma (A) i lizosoma (B) u kori velikog mozga miševa u dobi od četiri, 9 i 15 tjedana. Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). EEA1 (tirkizno) – biljeg ranih endosoma, LAMP1 (zeleno) – biljeg lizosoma. Skala 50  $\mu$ m. C Analiza biljega endolizosomalnog puta metodom WB u kori velikog mozga miševa. EEA1 – biljeg ranih endosoma, RAB7 – biljeg kasnih endosoma, LAMP1 – biljeg lizosoma. Kvantitativni prikaz razine biljega u kori velikog mozga miševa u dobi od četiri (D), 9 (E) i 15 tjedana (F). Na grafovima su prikazane *p* vrijednosti dobivene ukupnom statističkom analizom, dok je *post-hoc* analiza, odnosno usporedba srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina prikazana u **Privitku 5** (biljeg EEA1), **Privitku 6** (biljeg RAB7) i **Privitku 7** (biljeg LAMP1).

Imunohistokemijska analiza hipokampusa ukazala je na povišeno nakupljanje biljega ranih endosoma EEA1 u jedinki N-KI B-WT svih ispitivanih dobnih skupina u odnosu na jedinke divljeg tipa i dodatne kontrole (N-WT B-HET i N-WT B-KO), što je posebno izraženo u regijama *CA1* i *CA3* hipokampusa (**Slika 27 A-C**). Jedinke N-KI B-HET pokazuju povećano nakupljanje endosomalnih vezikula samo u regiji *CA1* hipokampusa u dobi od četiri tjedna (**Slika 27 A**). Ostale regije hipokampusa, odnosno preostale dobne skupine ovog genotipa, pokazuju bojanje sukladno onome jedinki divljeg tipa i dodatnih kontrola (**Slika 27 A-C**). Jedinke N-KI B-KO u dobi od četiri tjedna pokazuju značajno nakupljanje biljega ranih endosoma EEA1 u regiji *CA1* hipokampusa (**Slika 27 A**).

Imunohistokemijska analiza lizosomalnog biljega LAMP1 u hipokampusu nije pokazala razliku u bojanju između jedinki divljeg tipa i dodatnih kontrola (N-WT B-HET i N-WT B-KO) ni u jednoj od ispitivanih dobnih skupina (**Slika 27 D-F**). Značajno nakupljanje lizosomalnih vezikula uočeno je u jedinki N-KI B-WT, u odnosu na jedinke divljeg tipa, u svim ispitivanim regijama hipokampusa u dobi od četiri (**Slika 27 D**), 9 (**Slika 27 E**) i 15 tjedana (**Slika 27 F**). Nakupljanje lizosomalnog biljega LAMP1 zabilježeno je i u jedinki N-KI B-HET u odnosu na jedinke divljeg tipa u svim dobnim skupinama (**Slika 27 D-F**). Međutim, nakupljanje ovog biljega manje je u jedinki N-KI B-HET u odnosu na jedinke N-KI B-WT, pogotovo u dobi od četiri (**Slika 27 D**) i 15 tjedana (**Slika 27 F**). U odnosu na jedinke divljeg tipa, nakupljanje lizosomalnog biljega zabilježeno je i u jedinki N-KI B-KO u svim regijama hipokampusa u dobi od četiri tjedna (**Slika 27 D**).

Analiza homogenata hipokampusa metodom WB ukazala je na značajno povišenu razinu biljega ranih endosoma EEA1 u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET u odnosu na jedinke divljeg tipa u svim ispitivanim dobnim skupinama (**Slika 27 G-J**). Razina ovog biljega pritom je viša u jedinki N-KI B-HET u odnosu na jedinke N-KI B-WT u dobi od četiri (**Slika 27 H**) i 9 tjedana (**Slika 27 I**). Razina biljega kasnih endosoma RAB7 u jedinkama genotipova N-KI B-WT i N-KI B-HET značajno je povišena u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od 9 tjedana (**Slika 27 G, I**). Međutim, razina ovog biljega, u odnosu na jedinke divljeg tipa, snižena je u hipokampusu jedinki N-KI B-WT u dobi od 15 tjedana, kao i u jedinki N-WT B-KO (**Slika 27 G, J**). Razina lizosomalnog biljega LAMP1 povišena je u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od 9 (**Slika 27 G, I**) i 15 tjedana (**Slika 27 G, J**). Također, jedinke N-WT B-HET pokazuju značajno povišenu razinu ovog biljega u dobi od 9 tjedana (**Slika 27 G, I**), a jedinke N-WT B-KO sniženu razinu u dobi od 15 tjedana (**Slika 27 G, J**) u odnosu na jedinke divljeg tipa.

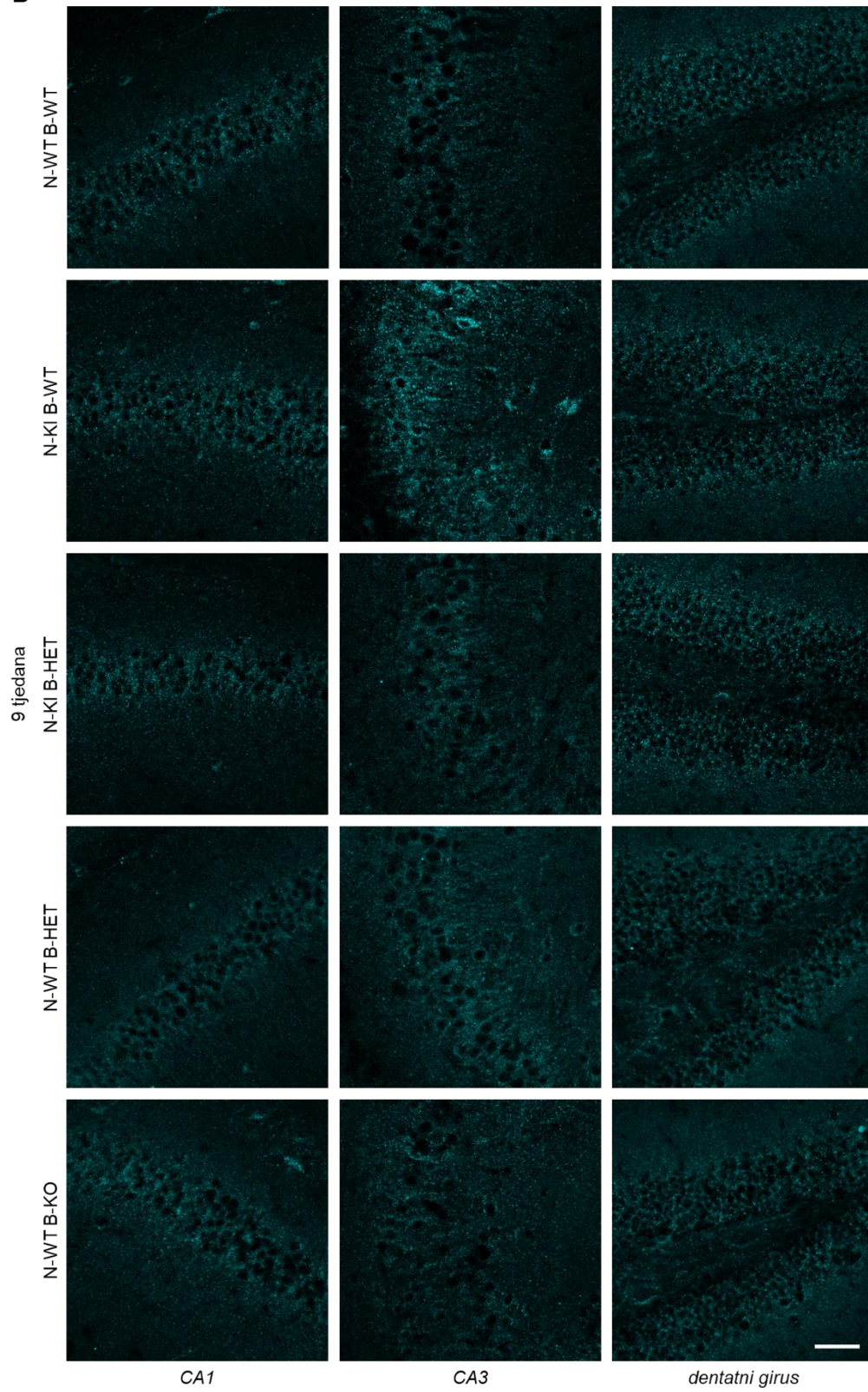






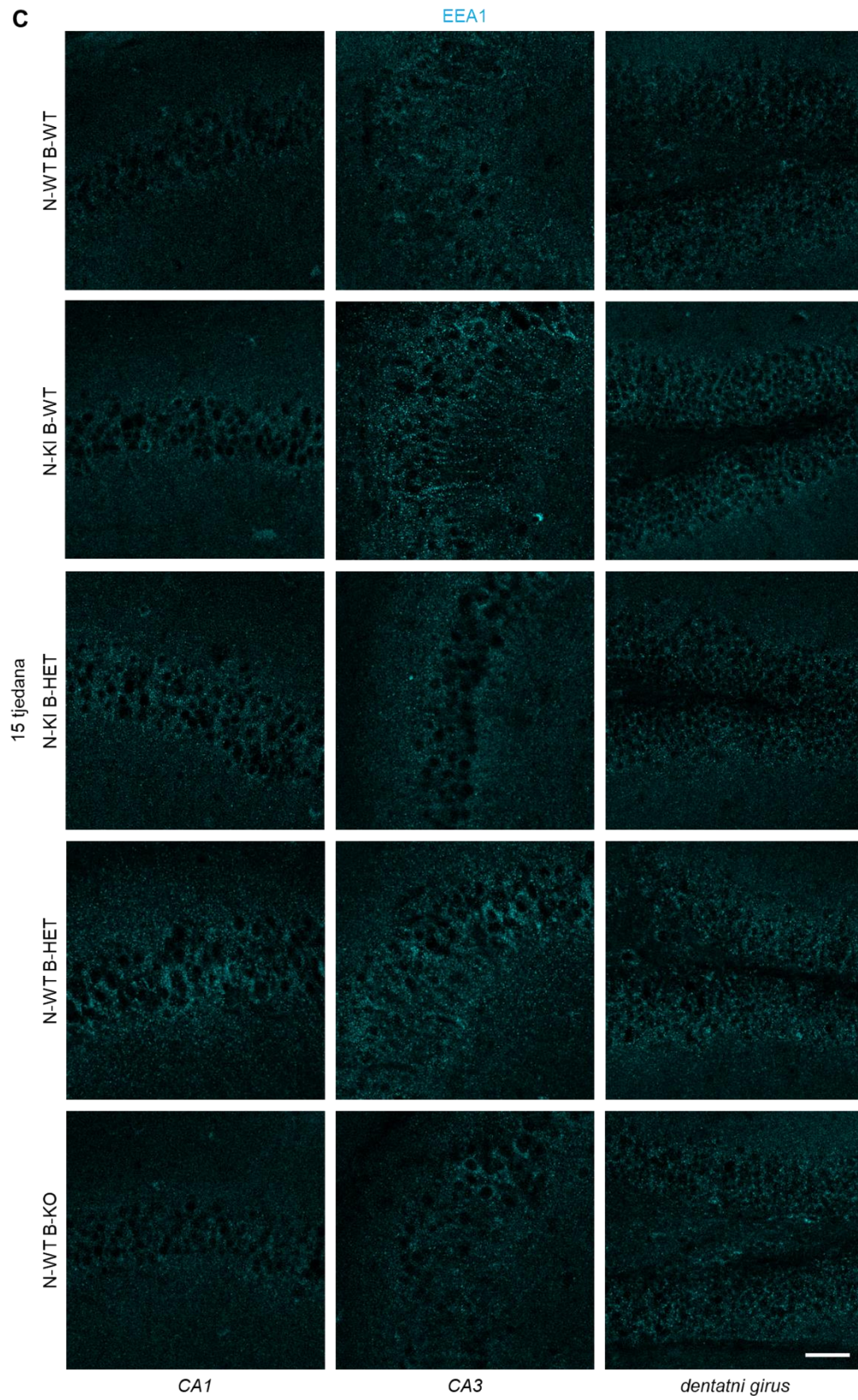
**B**

EEA1



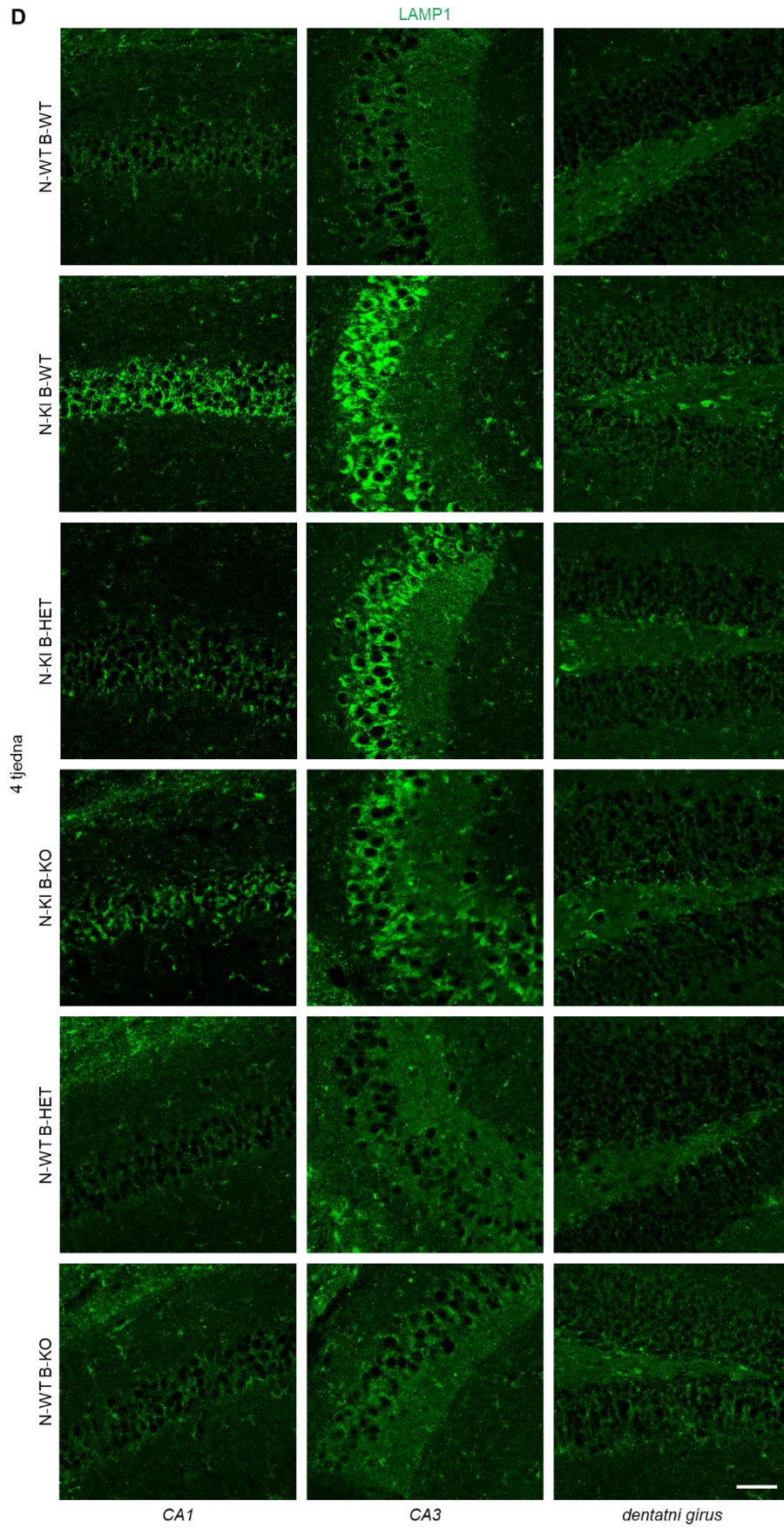


**C**





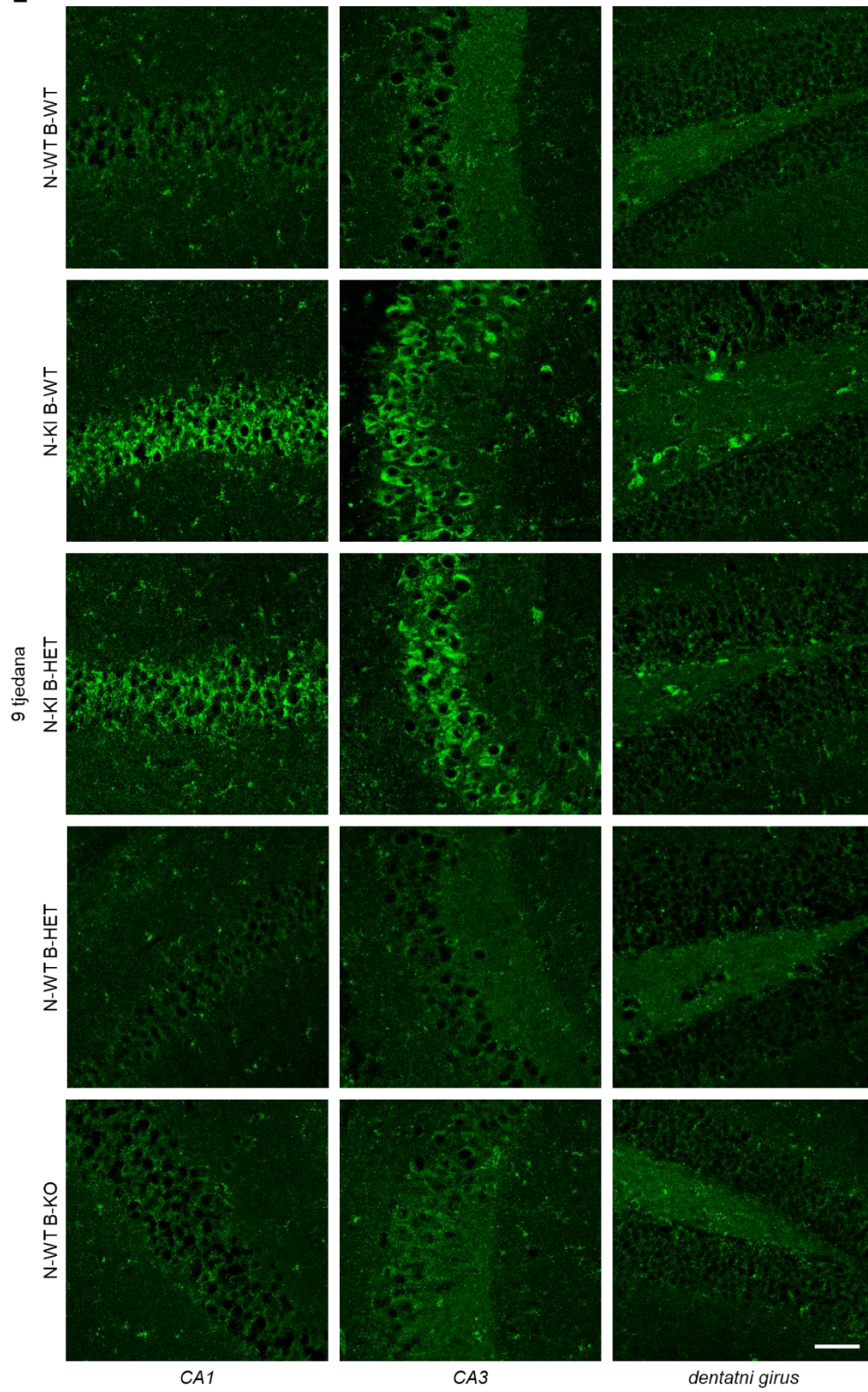
D



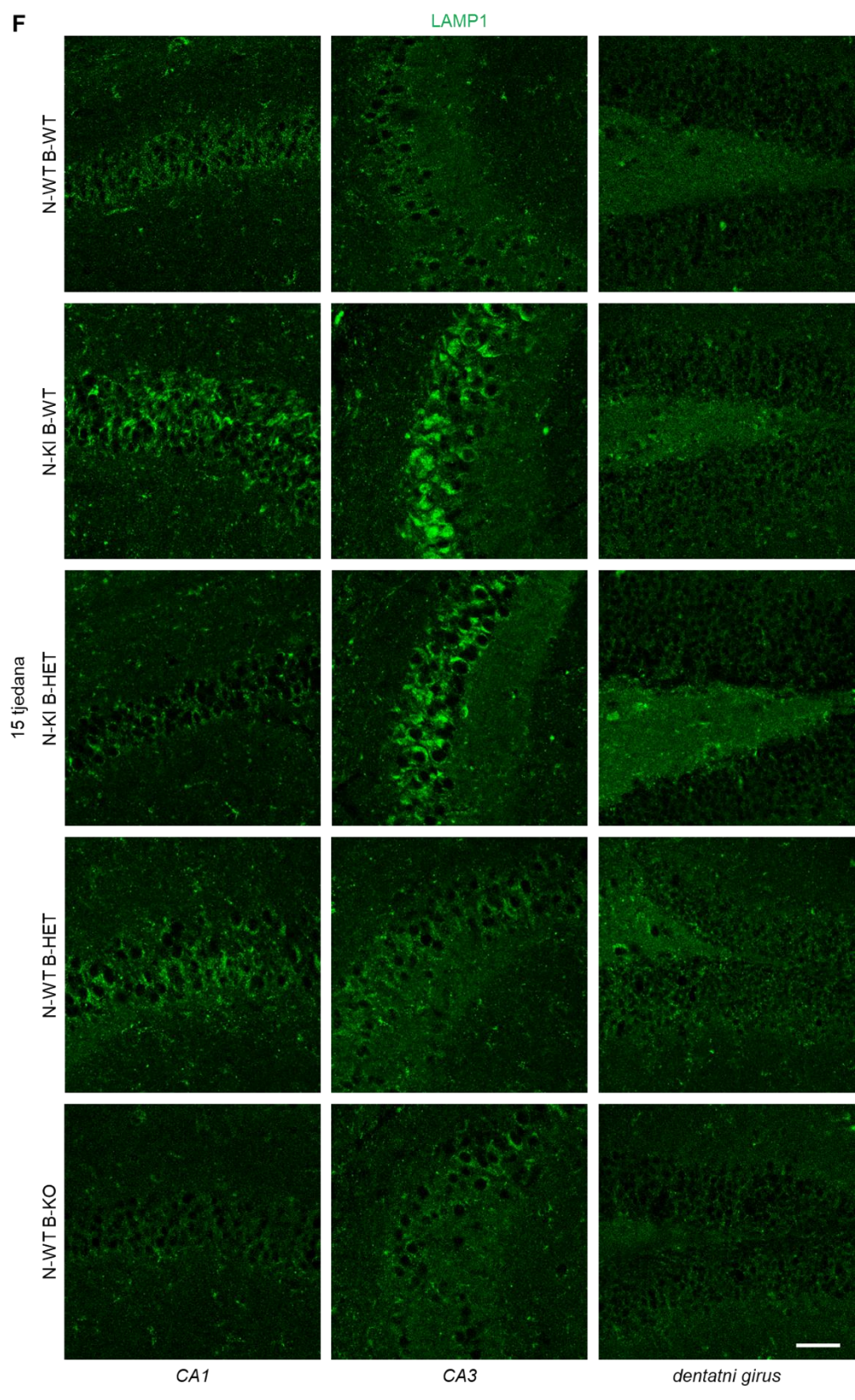


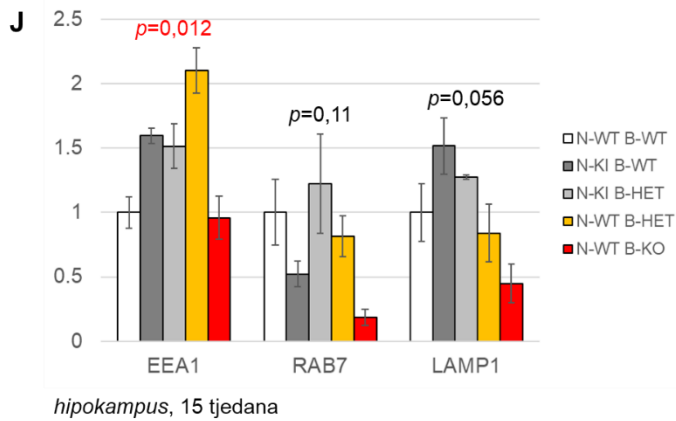
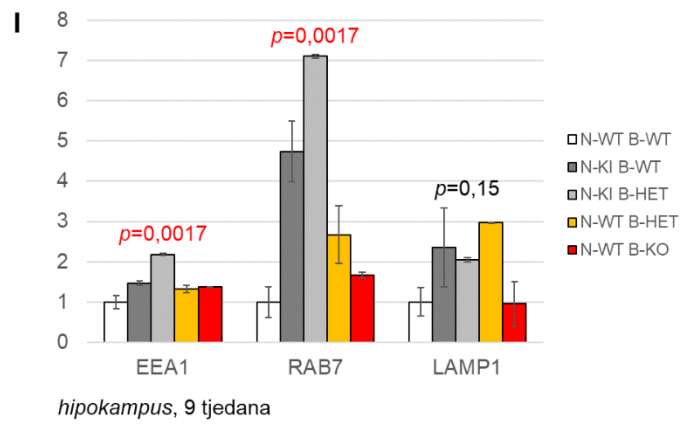
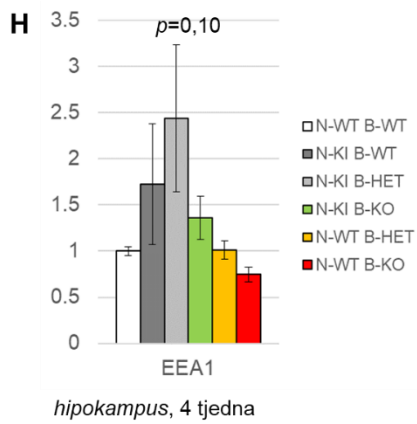
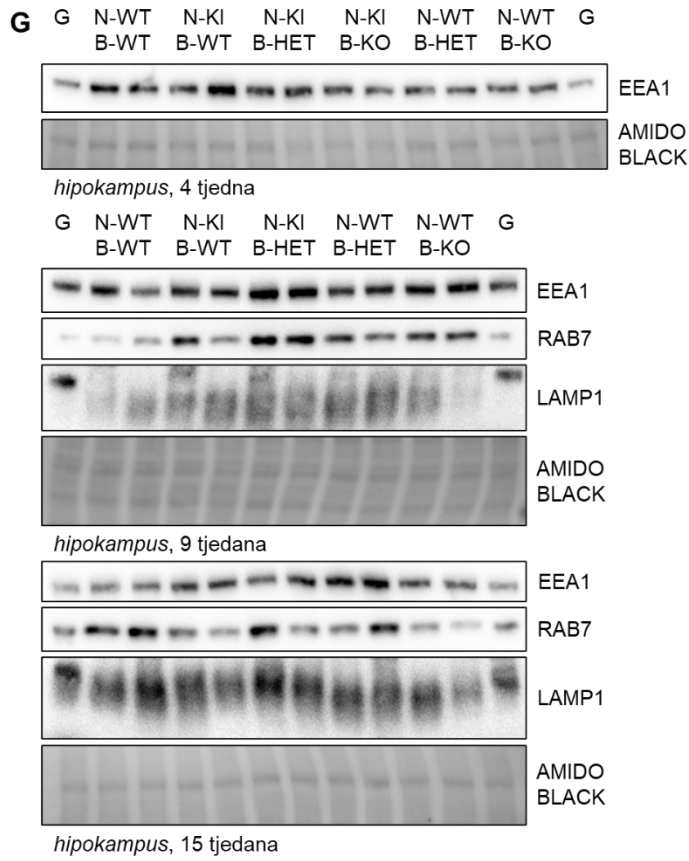
**E**

LAMP1









◀ **Slika 27. Analiza biljega endolizosomalnog puta u hipokampusu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.** Imunohistokemijska analiza biljega ranih endosoma (EEA1) u hipokampusu miševa u dobi od četiri (A), 9 (B) i 15 tjedana (C). Imunohistokemijska analiza biljega lizosoma (LAMP1) u hipokampusu miševa u dobi od četiri (D), 9 (E) i 15 tjedana (F). Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). EEA1 (tirkizno) – biljeg ranih endosoma, LAMP1 (zeleno) – biljeg lizosoma. Skala 50  $\mu\text{m}$ . G Analiza biljega endolizosomalnog puta metodom WB u hipokampusu miševa. EEA1 – biljeg ranih endosoma, RAB7 – biljeg kasnih endosoma, LAMP1 – biljeg lizosoma. Kvantitativni prikaz razine biljega u hipokampusu miševa u dobi od četiri (H), 9 (I) i 15 tjedana (J). Na grafovima su prikazane *p* vrijednosti dobivene ukupnom statističkom analizom, dok je *post-hoc* analiza, odnosno usporedba srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina prikazana u **Privitku 5** (biljeg EEA1), **Privitku 6** (biljeg RAB7) i **Privitku 7** (biljeg LAMP1).

#### 4.2.6. Analiza neuroinflamacije u mozgu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*

Za analizu neuroinflamacije korištena su protutijela za GFAP (biljeg astrocita), IBA1 (strukturni biljeg mikroglia) i CD68 (biljeg aktivnih mikroglia). Kriorezovi mozgovia miševa starosti četiri, 9 i 15 tjedana debljine 30  $\mu\text{m}$  analizirani su metodom imunohistokemije, odnosno imunofluorescencije, a homogenati malog mozga, kore velikog mozga i hipokampusia analizirani su metodom WB.

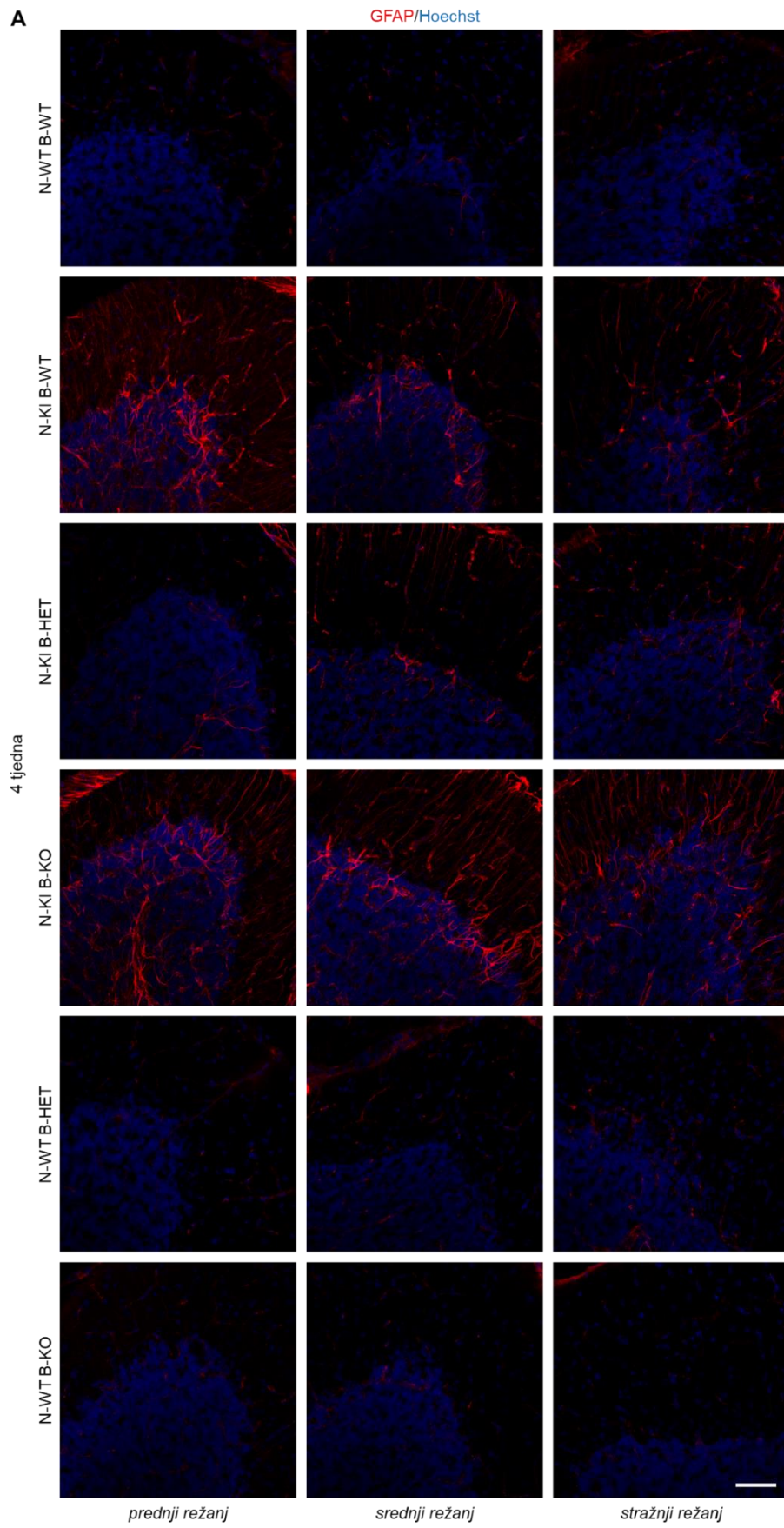
Imunohistokemijskom analizom malog mozga nije zabilježen signal biljega astrocita, tj. aktivnih astrocita u jedinki divljeg tipa ni u jednoj od ispitivanih dobnih skupina (**Slika 28 A-C**). U dodatnih kontrola, jedinki N-WT B-HET i N-WT B-KO, također nije uočena aktivacija astrocita. Jedinke N-KI B-WT pokazuju značajnu aktivaciju astrocita već u dobi od četiri tjedna (**Slika 28 A**), što je posebno izraženo u prednjim režnjevima. U dobi od 9 (**Slika 28 B**) i 15 tjedana (**Slika 28 C**) zabilježena je snažna aktivacija astrocita kroz cijeli mali mozak jedinki N-KI B-WT, uključujući i stražnji režanj. U jedinki N-KI B-HET u dobi od četiri tjedna uočena je niska aktivacija astrocita (**Slika 28 A**) u odnosu na jedinke divljeg tipa, te je izraženo niža od razine aktivacije u jedinki N-KI B-WT. U dobi od 9 i 15 tjedana jedinke N-KI B-HET, u odnosu na jedinke divljeg tipa, pokazuju povećanu aktivaciju astrocita progresivno s dobi (**Slika 28 B, C**). Nije zabilježena aktivacija astrocita u stražnjim režnjevima ovih jedinki. U odnosu na jedinke N-KI B-WT, jedinke N-KI B-HET pokazuju nešto nižu razinu aktivacije astrocita u prednjim režnjevima u dobi od 9 tjedana (**Slika 28 B**), dok s 15 tjedana nema značajne razlike u aktivaciji astrocita u prednjim i srednjim režnjevima između ovih genotipova (**Slika 28 C**). Jedinke N-KI B-KO u dobi od četiri tjedna pokazuju visoku razinu aktivacije astrocita u odnosu na kontrolne jedinke u svim režnjevima malog mozga (**Slika 28 A**). U usporedbi s jedinkama N-KI B-WT, aktivacija astrocita povišena je u srednjim režnjevima, a prisutna je i u stražnjim režnjevima malog mozga jedinki N-KI B-KO.

Imunohistokemijskom analizom malog mozga nije zabilježen biljeg aktivnih mikroglia CD68 u jedinki divljeg tipa, kao ni u dodatnim kontrolama (N-WT-B-HET i N-WT B-KO) ni u jednoj od ispitivanih dobnih skupina (**Slika 28 D-F**). Slaba aktivacija mikroglia

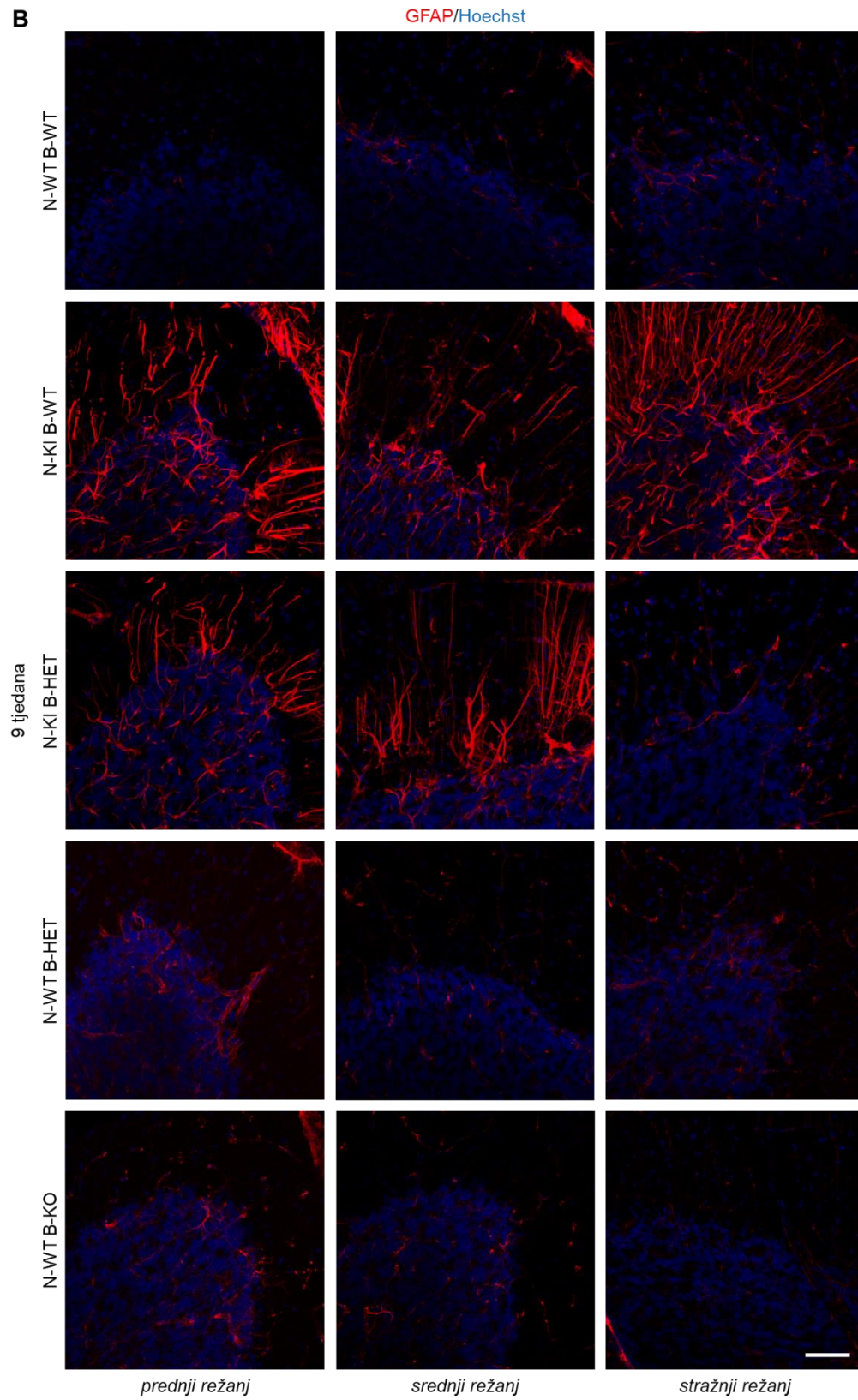
zabilježena je u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET već u dobi od četiri tjedna (**Slika 28 D**), ali nije uočena jasna razlika između ovih skupina. U dobi od 9 tjedana, obje skupine pokazuju vrlo snažnu aktivaciju mikroglia u prednjim režnjevima, dok je u srednjim i stražnjim režnjevima aktivacija slabija (**Slika 28 E**). U dobi od 15 tjedana zabilježena je još viša razina aktivacije mikroglia u prednjim i srednjim režnjevima jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET (**Slika 28 F**). Nije uočena jasna razlika u razini aktivacije mikroglia između jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET u prednjim i srednjim režnjevima malog mozga u dobi od 9 i 15 tjedana (**Slika 28 E, F**), međutim, jedinke N-KI B-HET pokazuju nižu razinu aktivacije mikroglia u stražnjim režnjevima u obje dobne skupine. Jedinke N-KI B-KO u dobi od četiri tjedna pokazuju snažnu aktivaciju mikroglia u prednjim režnjevima malog mozga u odnosu na kontrolne jedinke (**Slika 28 D**). Aktivacija mikroglia u ovih jedinki nešto je slabija u srednjim režnjevima, slično jedinkama N-KI B-WT i N-KI B-HET, dok u stražnjim režnjevima nema aktivacije mikroglia. Bojanje protutijelom za strukturni biljeg mikroglia IBA1 dalo je rezultate istovjetne biljegu CD68 stoga nije prikazano.

Analizom biljega neuroinflamacije metodom WB u malom mozgu potvrđena je povišena razina aktivacije astrocita u jedinki N-KI B-WT u odnosu na jedinke divljeg tipa u svim ispitivanim dobnim skupinama (**Slika 28 G-J**). U odnosu na jedinke divljeg tipa, povišena je i razina biljega GFAP, tj. aktivacija astrocita u jedinki N-KI B-HET u dobi od 9 (**Slika 28 G, I**) i 15 tjedana (**Slika 28 G, J**), međutim nije toliko izražena kao u jedinki N-KI B-WT. Razina proteina GFAP povišena je i u jedinki N-KI B-KO u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od četiri tjedna (**Slika 28 G, H**). Analiza strukturnog biljega IBA1 i biljega aktivacije mikroglia CD68 pokazuje njihovu povišenu razinu u jedinki N-KI B-WT u odnosu na jedinke divljeg tipa u svim ispitivanim dobnim skupinama (**Slika 28 G-J**). Zanimljivo, jedinke N-KI B-HET pokazale su još značajnije višu razinu ovih biljega mikroglia u svim ispitivanim dobnim skupinama (**Slika 28 G-J**). U dobi od četiri tjedna, jedinke N-KI B-KO također imaju značajno povišenu razinu strukturnog biljega mikroglia IBA1 u odnosu na jedinke divljeg tipa, te najvišu razinu biljega aktivacije mikroglia CD68 u odnosu na sve ispitivane genotipove (**Slika 28 G, H**).



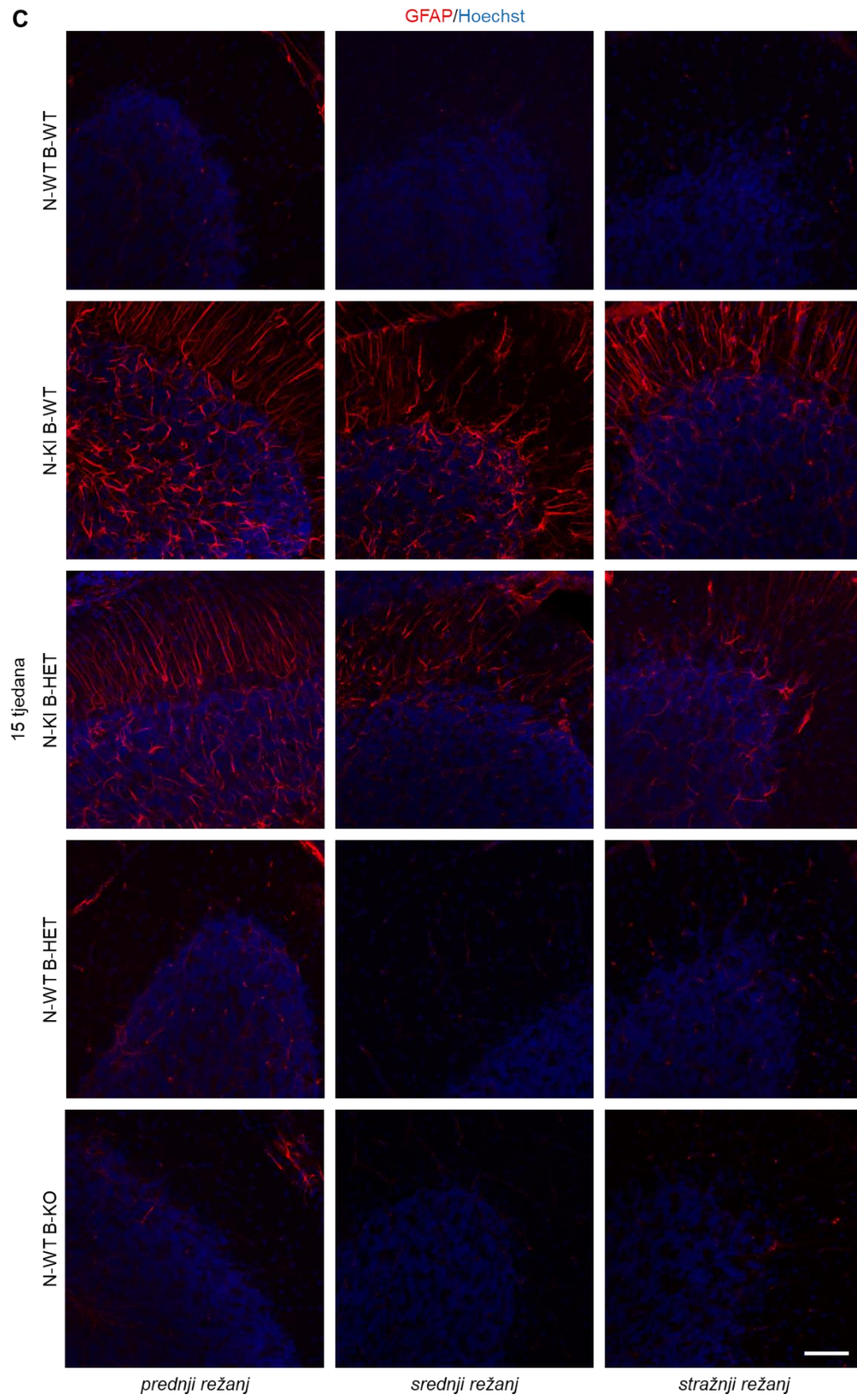


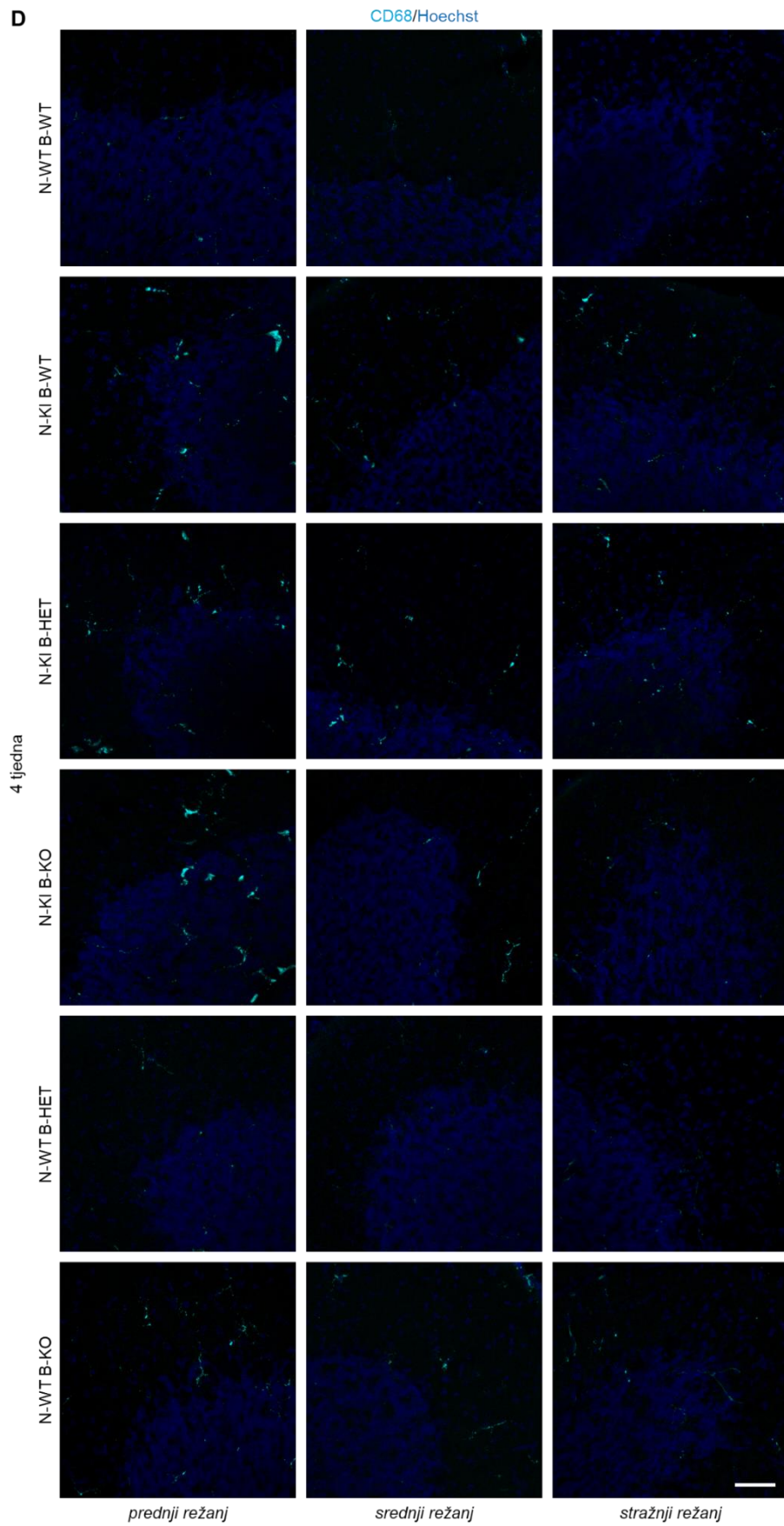
**B**





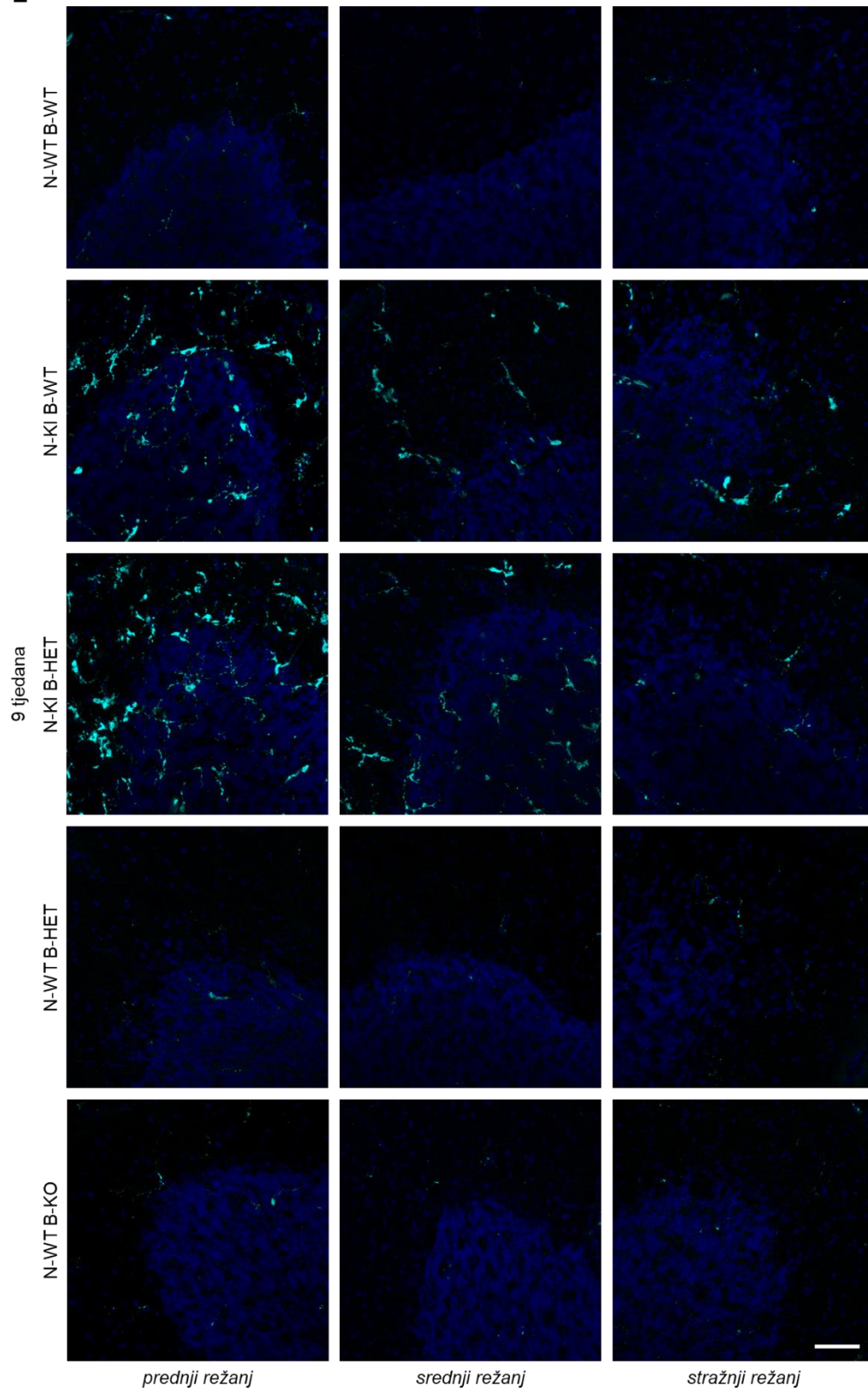
**C**



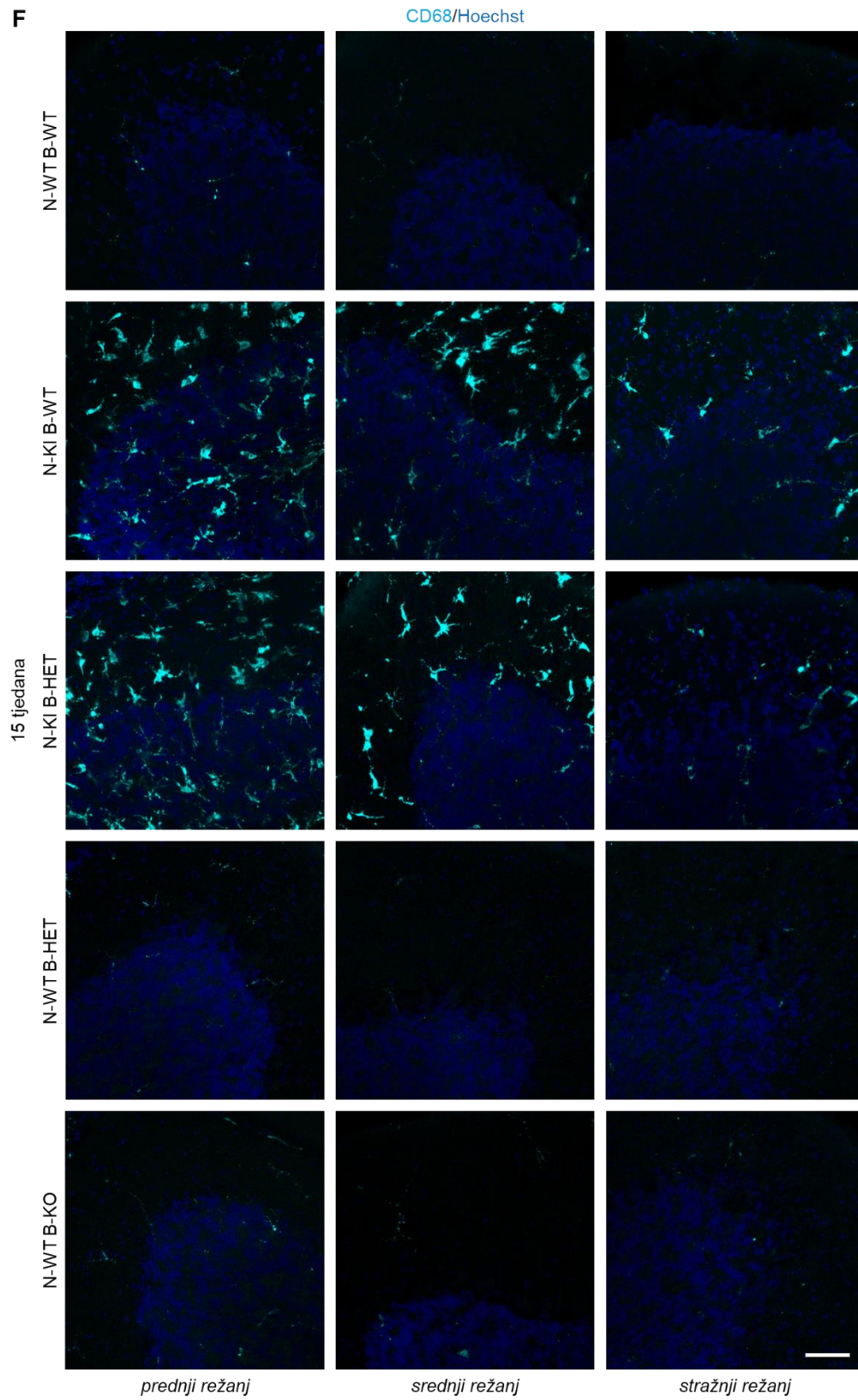


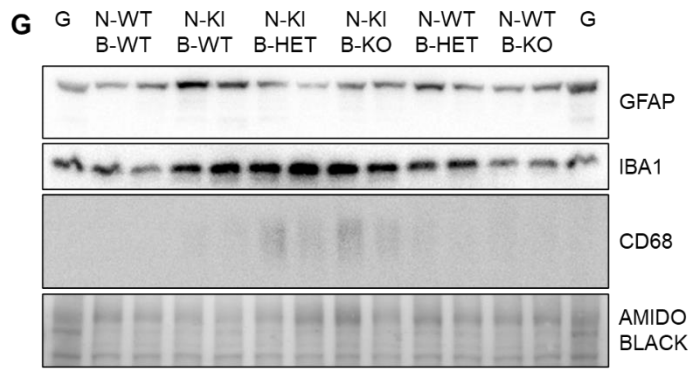
**E**

CD68/Hoechst

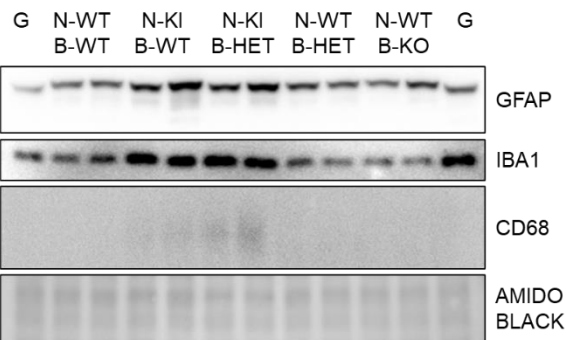




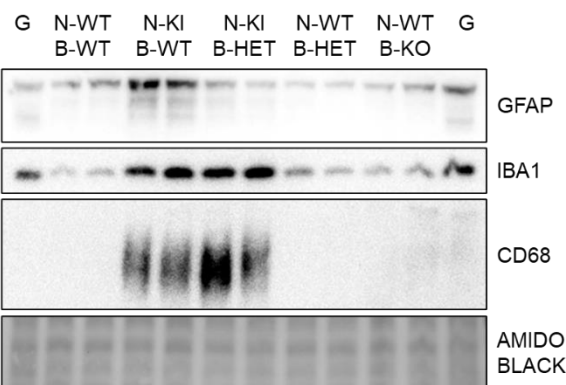




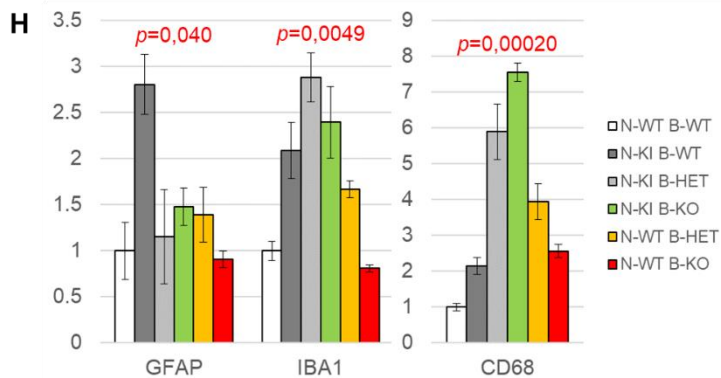
*mali mozak, 4 tjedna*

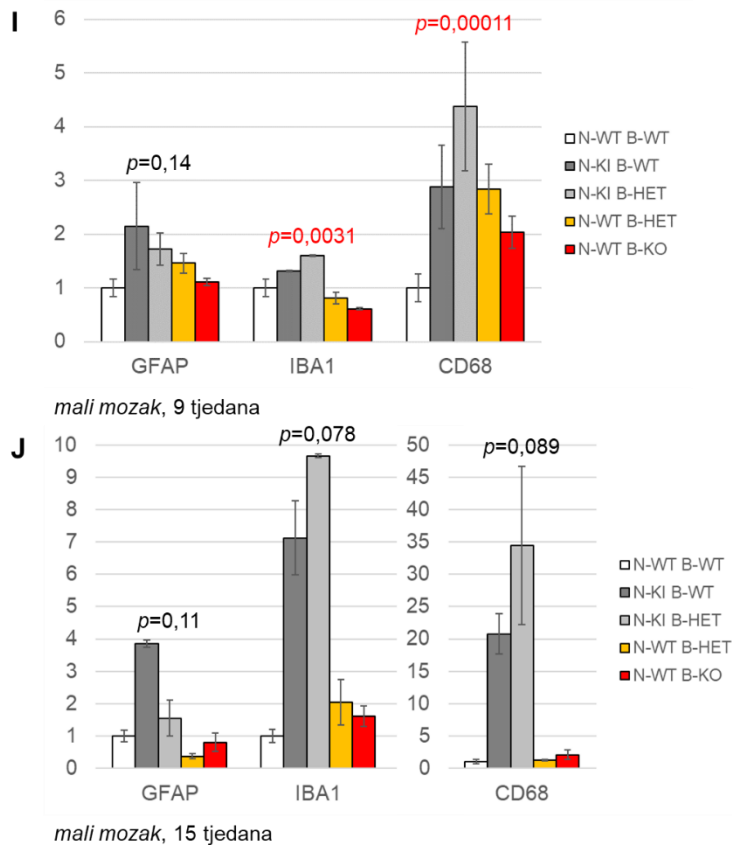


*mali mozak, 9 tjedana*



*mali mozak, 15 tjedana*

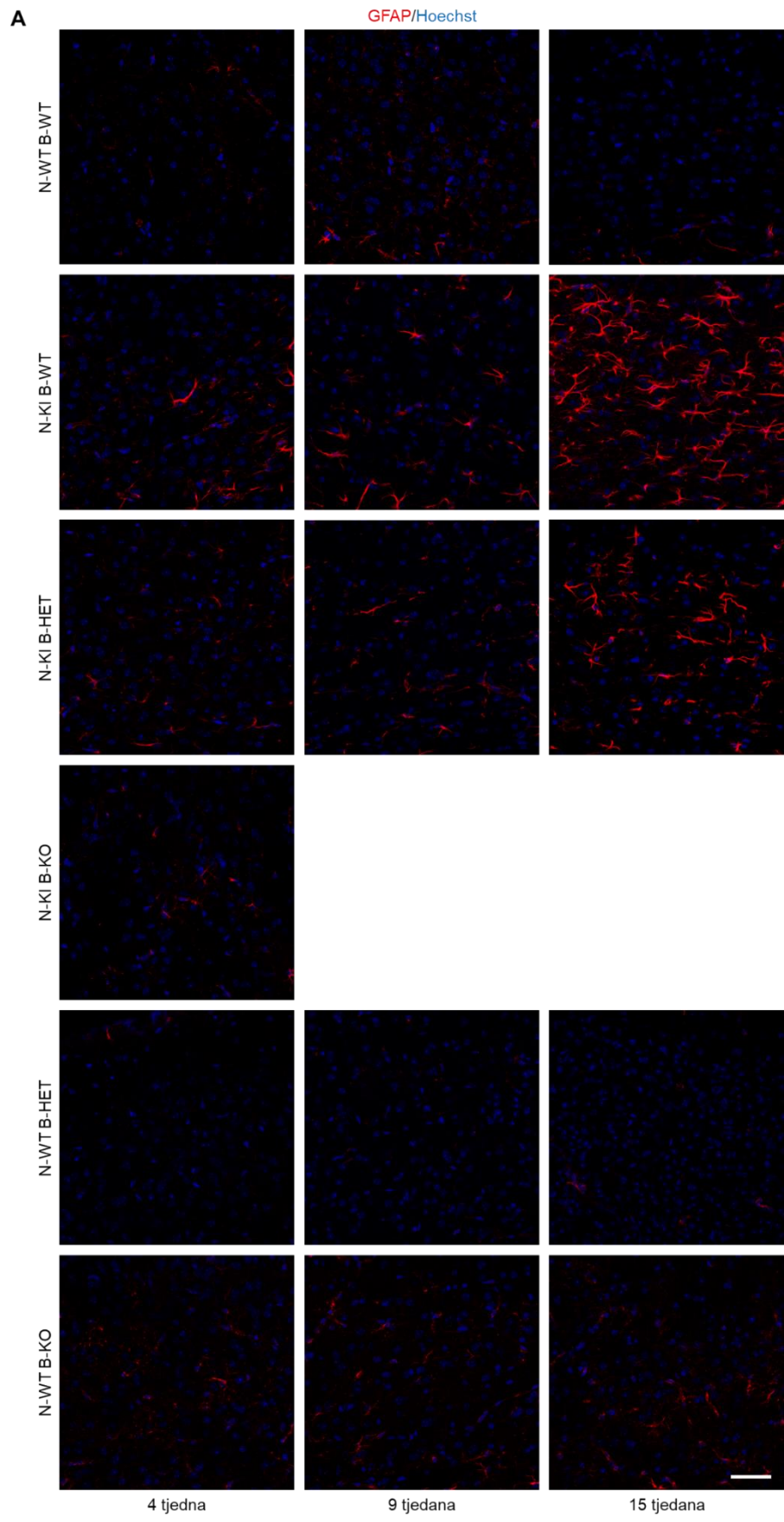




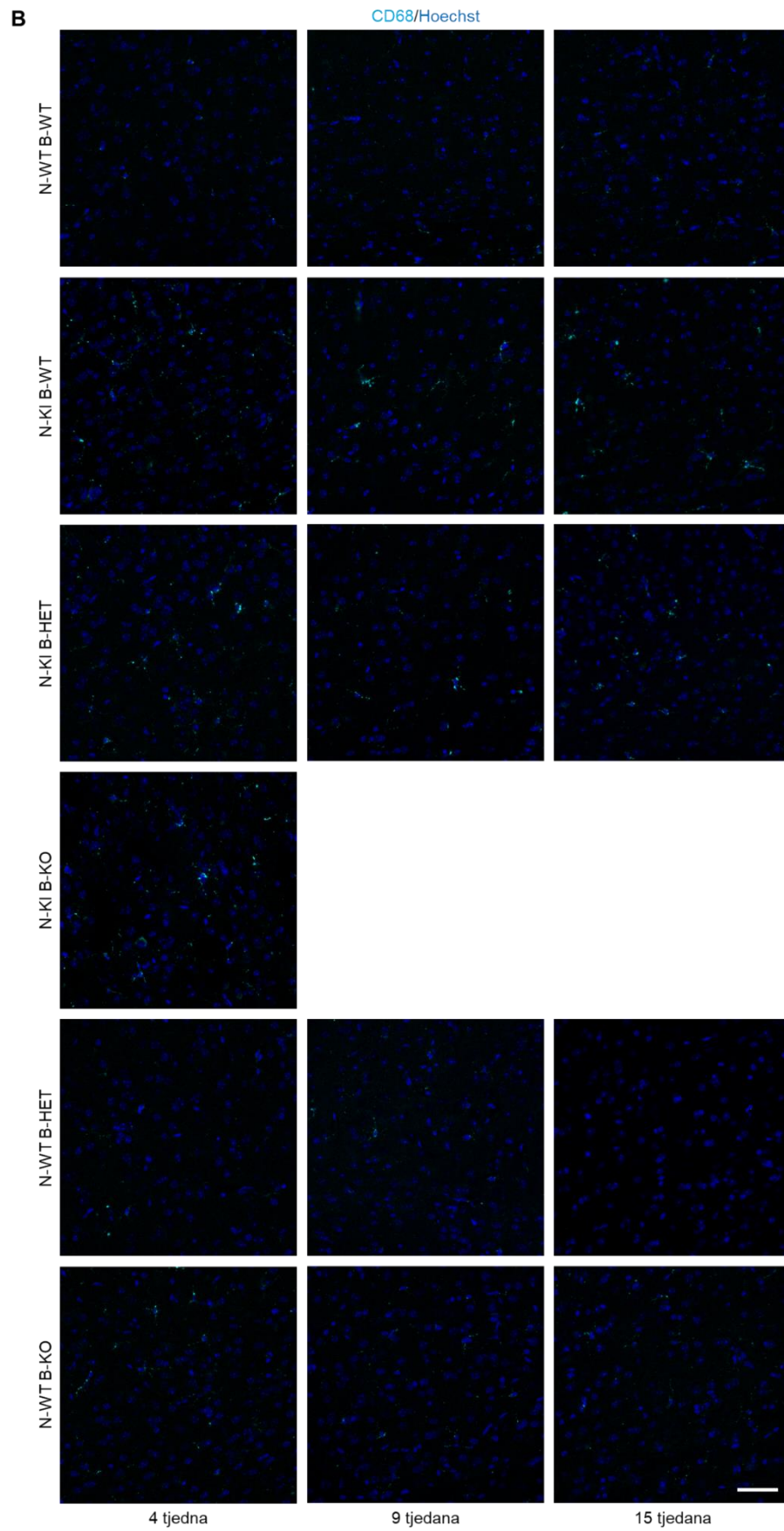
**Slika 28. Analiza biljega neuroinflamacije u malom mozgu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.** Imunohistokemijska analiza biljega astrocita (GFAP) u malom mozgu miševa u dobi od četiri (A), 9 (B) i 15 tjedana (C). Imunohistokemijska analiza biljega aktivnih mikroglia (CD68) u malom mozgu miševa u dobi od četiri (D), 9 (E) i 15 tjedana (F). Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). GFAP (crveno) – biljeg astrocita, CD68 (tirkizno) – biljeg aktivnih mikroglia. Skala 50  $\mu$ m. G Analiza biljega neuroinflamacije metodom WB u malom mozgu miševa. GFAP – biljeg astrocita, IBA1 – strukturni biljeg mikroglia, CD68 – biljeg aktivnih mikroglia. Kvantitativni prikaz razine biljega neuroinflamacije u malom mozgu miševa u dobi od četiri (H), 9 (I) i 15 tjedana (J). Na grafovima su prikazane *p* vrijednosti dobivene ukupnom statističkom analizom, dok je *post-hoc* analiza, odnosno usporedba srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina prikazana u **Privitku 8** (biljeg GFAP), **Privitku 9** (biljeg IBA1) i **Privitku 10** (biljeg CD68).

Imunohistokemijskom analizom kore velikog mozga nije zabilježena neuroinflamacija u vidu aktivacije astrocita (**Slika 29 A**) ili mikroglia (**Slika 29 B**) u jedinki divljeg tipa, kao ni u dodatnim kontrolama (N-WT B-HET i N-WT B-KO) ni u jednoj od ispitivanih dobnih skupina. U jedinki N-KI B-WT, u odnosu na jedinke divljeg tipa, zabilježena je aktivacija astrocita u kori velikog mozga (**Slika 29 A**), a progresivna je s dobi: aktivacija astrocita prisutna je već u dobi od četiri tjedna, dok je izrazito povišena u dobi od 15 tjedana. Aktivacija astrocita zabilježena je i u jedinki N-KI B-HET (**Slika 29 A**): u dobi od četiri i 9 tjedana, ove jedinke pokazuju nisku razinu aktivacije astrocita u kori velikog mozga. Aktivacija astrocita povišena je u dobi od 15 tjedana, međutim niža je u odnosu na jedinke N-KI B-WT. Aktivacija mikroglia u kori velikog mozga jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET je prisutna, ali je vrlo niska, stoga nije utvrđena razlika između ovih skupina ni u jednoj od ispitivanih dobnih skupina (**Slika 29 B**). Zanimljivo, jedinke N-KI B-KO ne pokazuju značajnu aktivaciju astrocita (**Slika 29 A**) niti mikroglia (**Slika 29 B**) u kori velikog mozga u dobi od četiri tjedna.

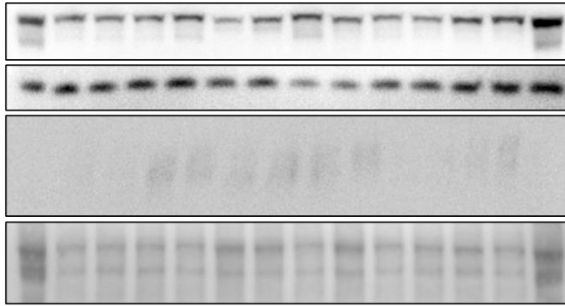
Analizom biljega neuroinflamacije metodom WB u kori velikog mozga potvrđena je povišena razina biljega GFAP, tj. aktivacija astrocita u jedinki N-KI B-WT u odnosu na jedinke divljeg tipa u svim ispitivanim dobnim skupinama (**Slika 29 C-F**). U odnosu na jedinke divljeg tipa, povišena je i razina aktivacije astrocita u jedinki N-KI B-HET u dobi od četiri (**Slika 29 C, D**) i 15 tjedana (**Slika 29 C, F**). Međutim, nije uočena značajna razlika u razini aktivacije astrocita između jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET. Razina proteina GFAP povišena je i u jedinki N-KI B-KO u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od četiri tjedna (**Slika 29 C, D**). U dobi od četiri tjedna, nije uočena razlika u razini strukturnog biljega mikroglia IBA1 između jedinki divljeg tipa te jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET (**Slika 29 C, D**). Razina ovog biljega značajno je povišena u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od 9 tjedana (**Slika 29 C, E**), dok je u dobi od 15 tjedana razina biljega značajno povišena samo u jedinki N-KI B-HET (**Slika 29 C, F**). Razina biljega aktivacije mikroglia CD68 značajno je povišena u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET u odnosu na preostale genotipove u svim ispitivanim dobnim skupinama (**Slika 29 C-F**). Razlika između ovih skupina nije uočena u dobi od četiri i 9 tjedana (**Slika 29 C-E**), dok je, zanimljivo, razina aktivacije mikroglia u jedinki N-KI B-HET povišena u usporedbi s jedinkama N-KI B-WT u dobi od 15 tjedana (**Slika 29 C, F**). U dobi od četiri tjedna, jedinke N-KI B-KO imaju sniženu razinu strukturnog biljega mikroglia IBA1, ali povišenu razinu biljega aktivacije mikroglia CD68 u odnosu na jedinke divljeg tipa (**Slika 29 C, D**).





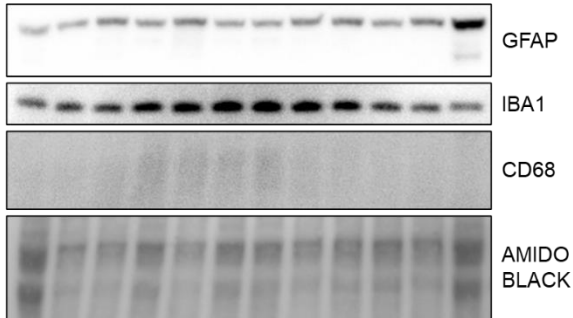


**C** G N-WT N-KI N-KI N-KI N-WT N-WT G  
 B-WT B-WT B-HET B-KO B-HET B-KO

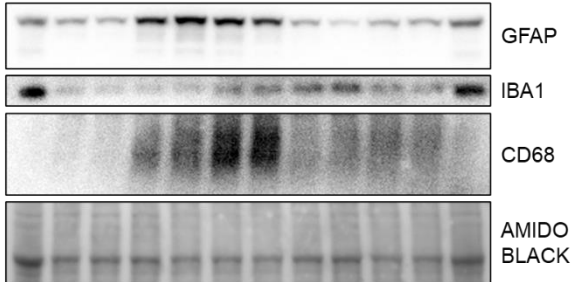


*kora velikog mozga, 4 tjedna*

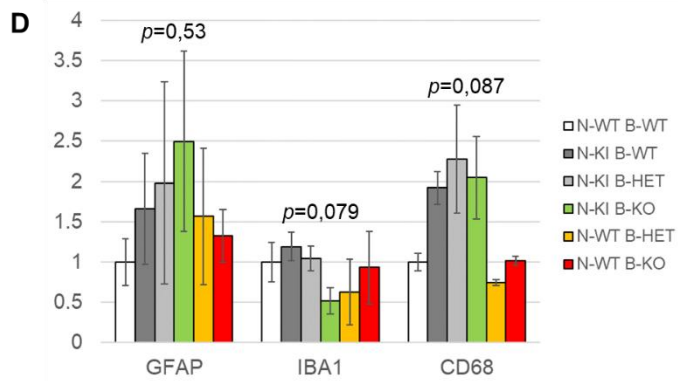
G N-WT N-KI N-KI N-WT N-WT G  
 B-WT B-WT B-HET B-HET B-KO



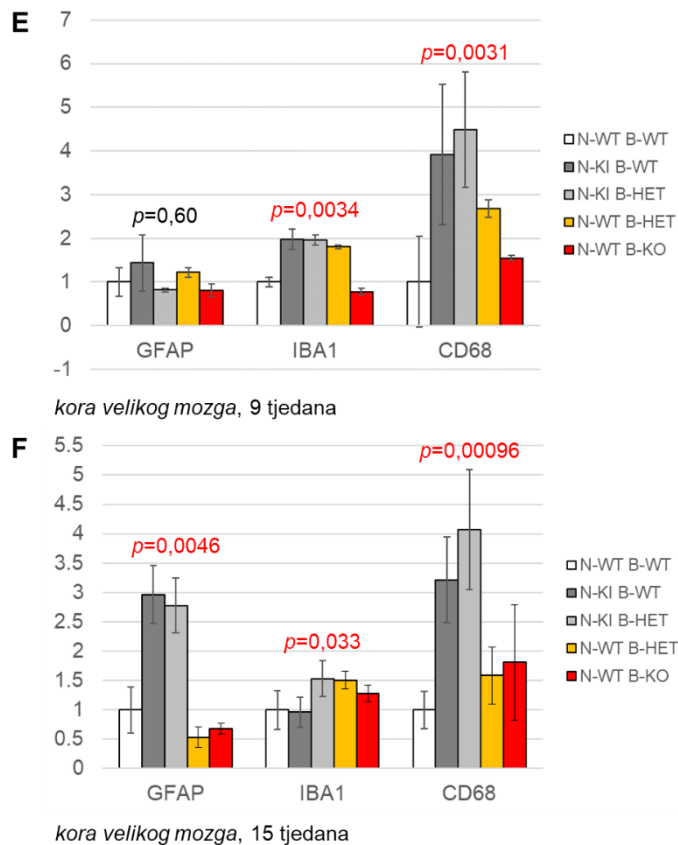
*kora velikog mozga, 9 tjedana*



*kora velikog mozga, 15 tjedana*



*kora velikog mozga, 4 tjedna*

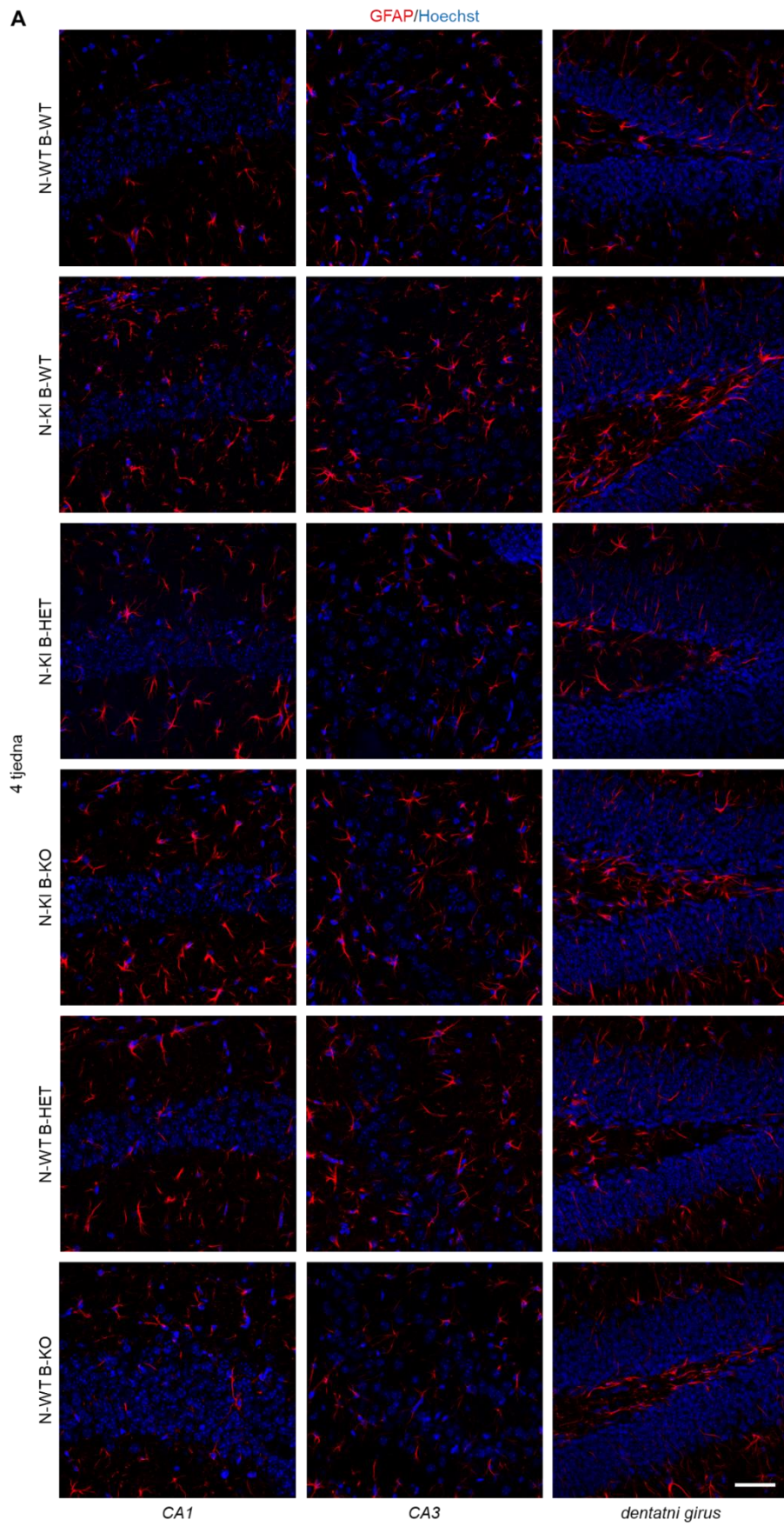


**Slika 29. Analiza biljega neuroinflamacije u kori velikog mozga miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.** Imunohistokemijska analiza biljega astrocita (A) i aktivnih mikroglija (B) u kori velikog mozga miševa u dobi od četiri, 9 i 15 tjedana. Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). GFAP (crveno) – biljeg astrocita, CD68 (tirkizno) – biljeg aktivnih mikroglija. Skala 50  $\mu$ m. C Analiza biljega neuroinflamacije metodom WB u kori velikog mozga miševa. GFAP – biljeg astrocita, IBA1 – strukturni biljeg mikroglija, CD68 – biljeg aktivnih mikroglija. Kvantitativni prikaz razine biljega neuroinflamacije u kori velikog mozga miševa u dobi od četiri (D), 9 (E) i 15 tjedana (F). Na grafovima su prikazane *p* vrijednosti dobivene ukupnom statističkom analizom, dok je *post-hoc* analiza, odnosno usporedba srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina prikazana u **Privitku 8** (biljeg GFAP), **Privitku 9** (biljeg IBA1) i **Privitku 10** (biljeg CD68).

Imunohistokemijskom analizom biljega neuroinflamacije u hipokampusu zabilježena je niska aktivacija astrocita u jedinki divljeg tipa svih ispitivanih dobnih skupina (**Slika 30 A-C**). Aktivacija astrocita, tj. signal biljega GFAP, zabilježen je i u dodatnih kontrola: posebno je izražen u jedinki N-WT B-KO u dobi od 9 tjedana (**Slika 30 B**), te u jedinki N-WT B-HET i N-WT B-KO u dobi od 15 tjedana (**Slika 30 C**). Međutim, u odnosu na jedinke divljeg tipa, zabilježena je i povišena aktivacije astrocita u jedinki N-KI B-WT u svim ispitivanim dobnim skupinama (**Slika 30 A-C**). Aktivacija astrocita u jedinki N-KI B-HET također je prisutna, ali je nešto niža u odnosu na jedinke N-KI B-WT (**Slika 30 A-C**). U odnosu na ostale analizirane genotipove, jedinke genotipa N-KI B-KO imaju najvišu razinu aktivacije astrocita u dobi od četiri tjedna (**Slika 30 A**).

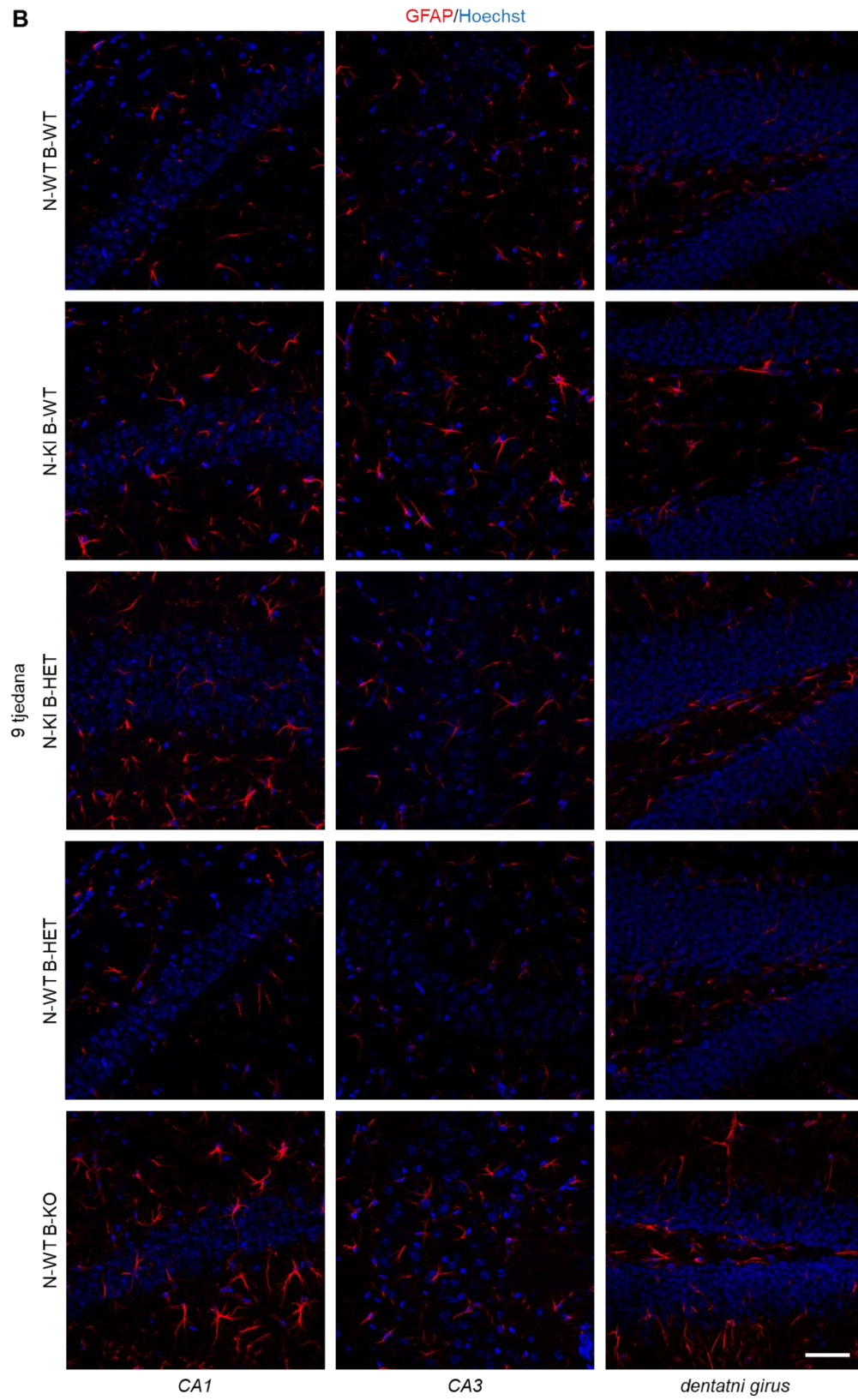
Imunohistokemijskom analizom biljega aktivnih mikroglia CD68 nije zabilježena aktivacija mikroglia u hipokampusu jedinki divljeg tipa i dodatnih kontrola (N-WT B-HET i N-WT B-KO) ni u jednoj od ispitivanih dobnih skupina (**Slika 30 D-F**). U odnosu na jedinke divljeg tipa, u hipokampusu jedinki N-KI B-WT prisutna je niska razina aktivacije mikroglia, tj. niska razina signala biljega CD68 u svim ispitivanim dobnim skupinama (**Slika 30 D-F**). Ista razina aktivacije mikroglia zabilježena je i u jedinki N-KI B-HET u dobi od četiri (**Slika 30 D**) i 9 tjedana (**Slika 30 E**), dok je u dobi od 15 tjedana u regiji *CA1* hipokampusa zabilježena povišena aktivacija mikroglia u odnosu na jedinke N-KI B-WT (**Slika 30 F**). Aktivacija mikroglia najizraženija je u jedinki N-KI B-KO u odnosu na ostale ispitivane skupine u dobi od četiri tjedna (**Slika 30 D**).

Analiza homogenata hipokampusa metodom WB pokazala je povišenu razinu biljega aktivnih astrocita GFAP u jedinki N-KI B-WT i N-WT B-KO u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od četiri tjedna (**Slika 30 G, H**). Također, u dobi od četiri tjedna zabilježena je dodatno povišena razina biljega GFAP u jedinki N-KI B-HET (u odnosu na jedinke N-KI B-WT), odnosno N-KI B-KO (u odnosu na jedinke N-KI B-HET). U dobi od 15 tjedana, neočekivano, uočena je snižena razina biljega GFAP u jedinki N-KI B-WT i N-WT B-KO u odnosu na jedinke divljeg tipa, dok je razina ovog biljega u jedinki N-KI B-HET značajno povišena (**Slika 30 G, I**). Razina strukturnog biljega mikroglia IBA1 i biljega aktivnih mikroglia CD68 u homogenatima hipokampusa bila je preniska za detekciju, stoga nije prikazana.

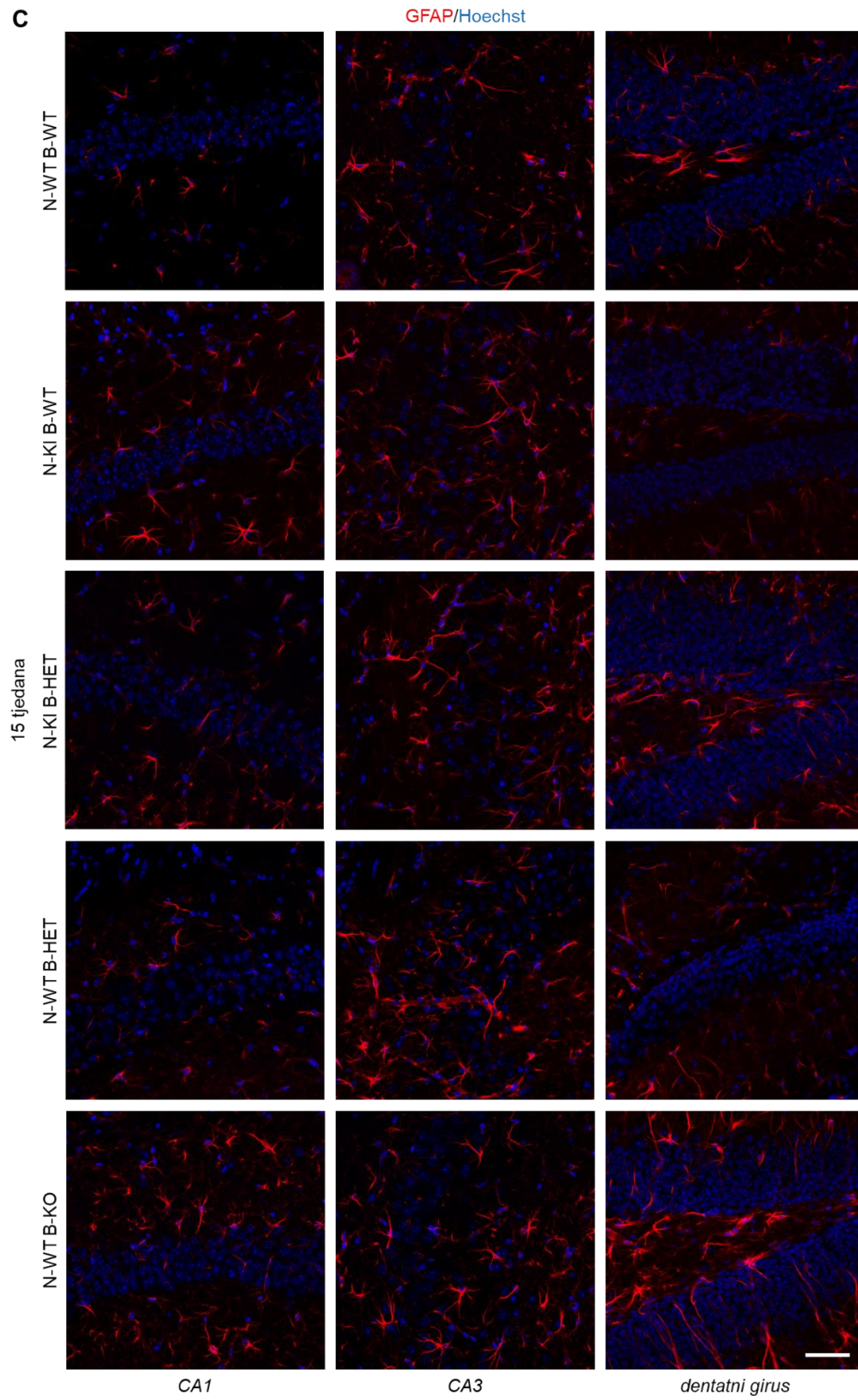




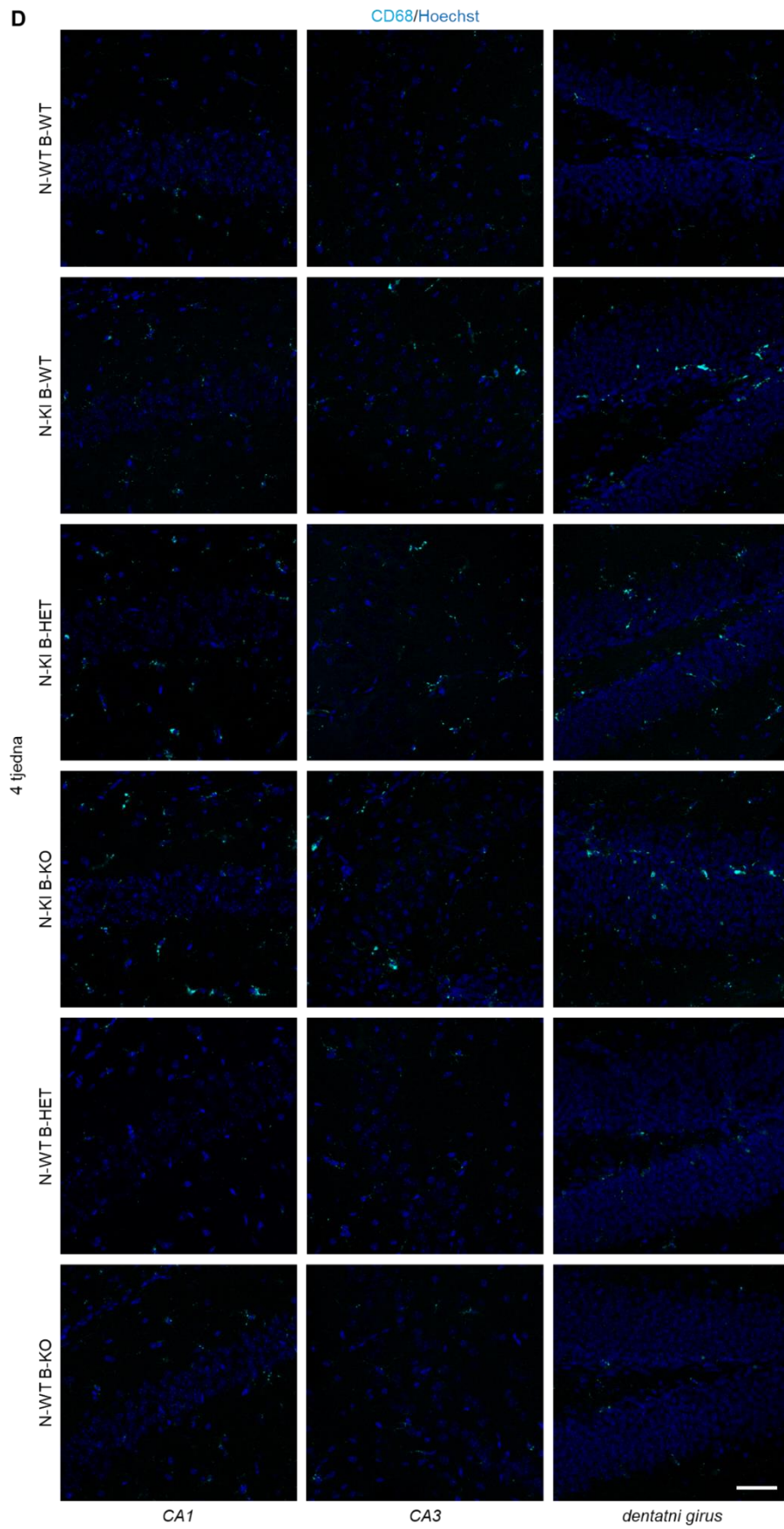
**B**

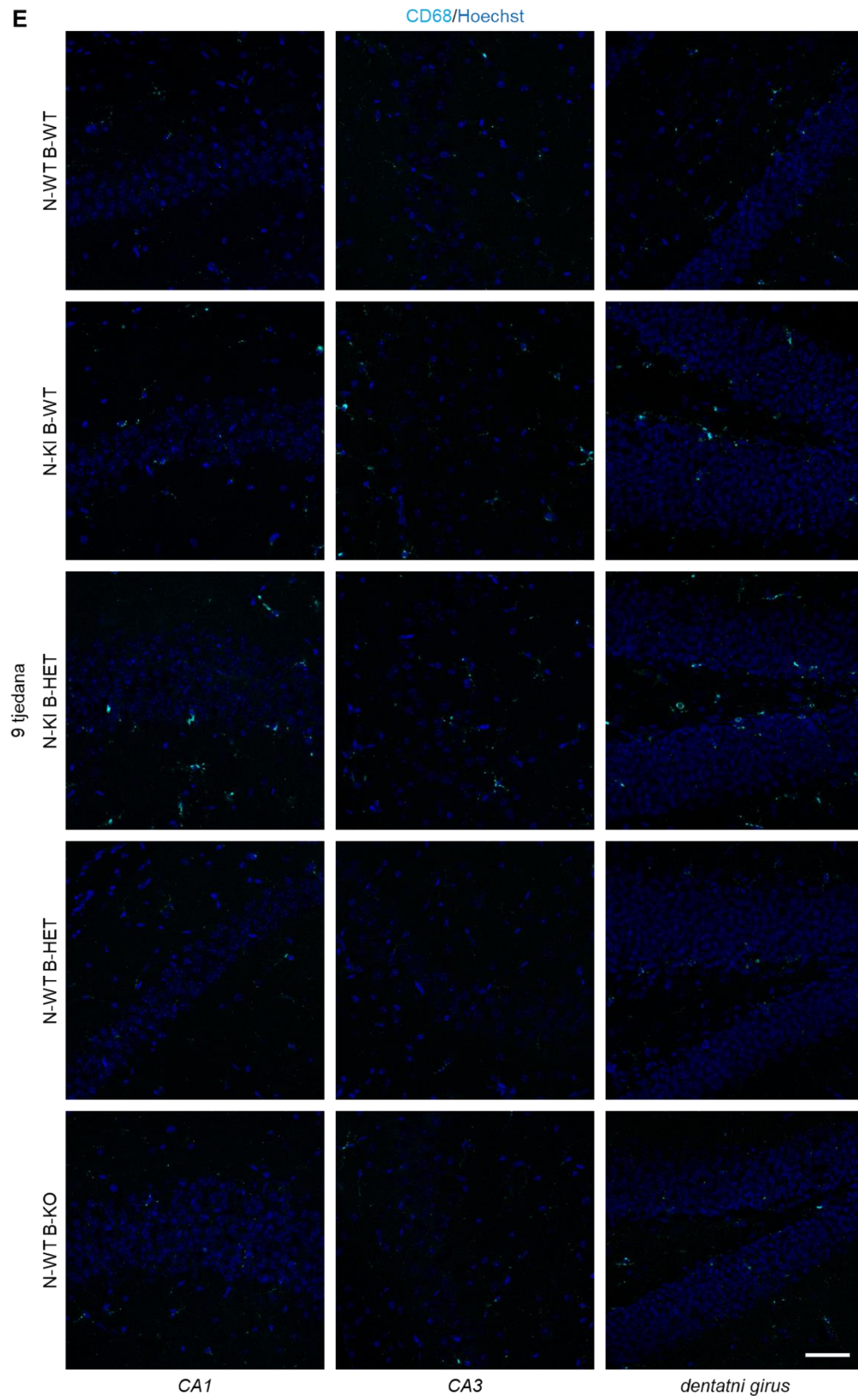


**C**



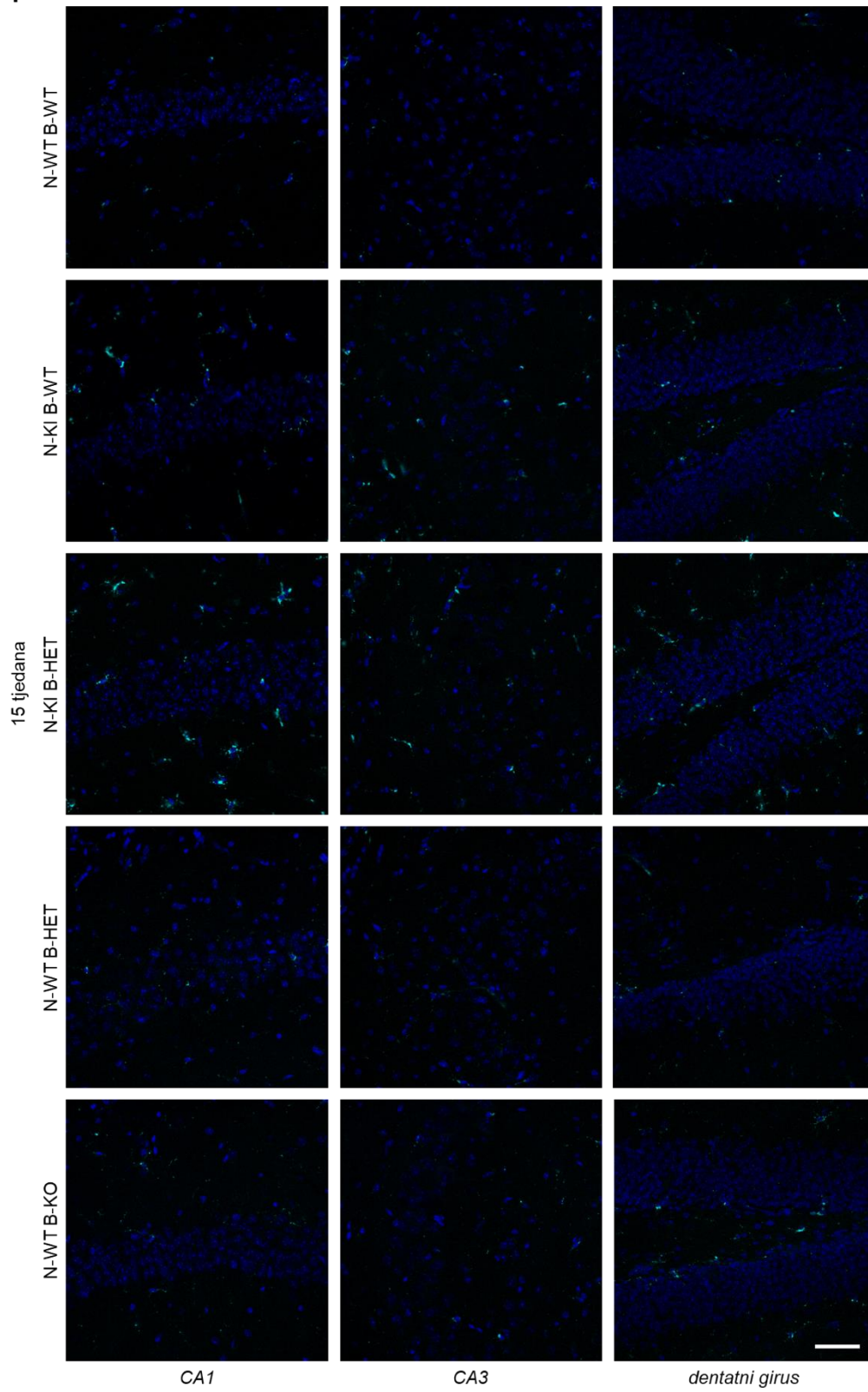




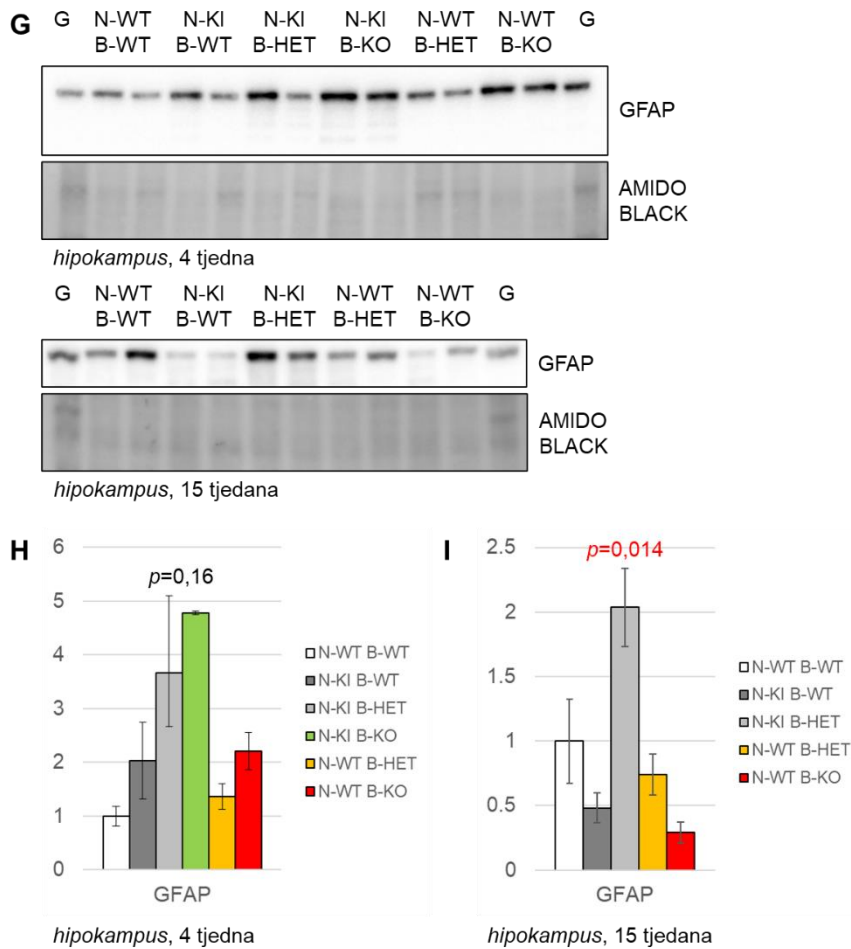


**F**

CD68/Hoechst





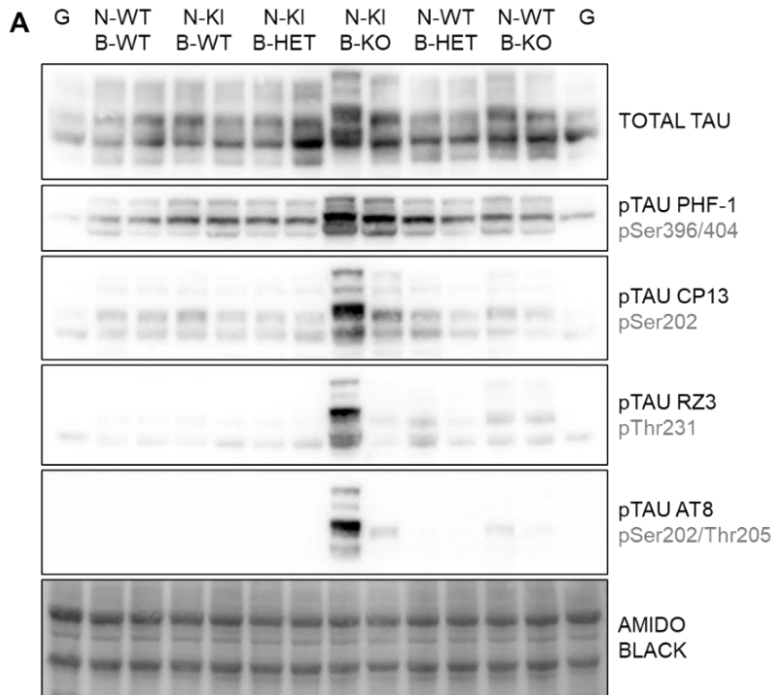


**Slika 30. Analiza biljega neuroinflamacije u hipokampusu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.** Imunohistokemijska analiza biljega astrocita (GFAP) u hipokampusu miševa u dobi od četiri (A), 9 (B) i 15 tjedana (C). Imunohistokemijska analiza biljega aktivnih mikroglija (CD68) u hipokampusu miševa u dobi od četiri (D), 9 (E) i 15 tjedana (F). Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). GFAP (crveno) – biljeg astrocita, CD68 (tirkizno) – biljeg aktivnih mikroglija. Skala 50  $\mu$ m. **G** Analiza biljega neuroinflamacije, tj. aktivacije astrocita metodom WB u hipokampusu miševa. GFAP – biljeg astrocita. Kvantitativni prikaz razine biljega astrocita GFAP u hipokampusu miševa u dobi od četiri (H) i 15 tjedana (I). Na grafovima su prikazane *p* vrijednosti dobivene ukupnom statističkom analizom, dok je *post-hoc* analiza, odnosno usporedba srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina prikazana u **Privitku 8** (biljeg GFAP).

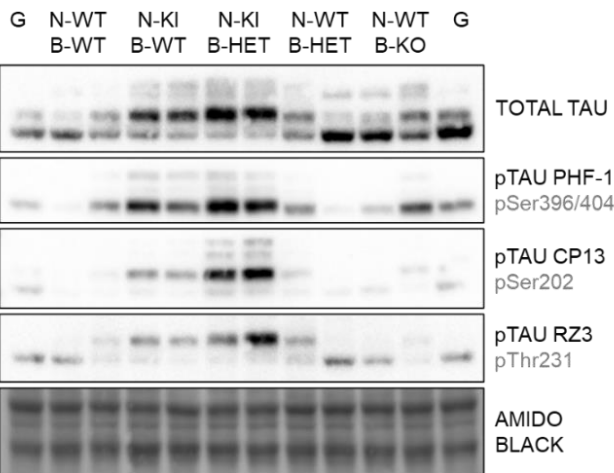
#### 4.2.7. Analiza hiperfosforilacije proteina tau u mozgu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*

Metodom WB ispitana je endogena razina ukupnog fosforiliranog proteina tau (TOTAL TAU) te razine četiriju različitih mjesta fosforilacije (pSer 396/404, pSer202, pThr231, pSer202/Thr205) proteina tau (pTAU) u homogenatima triju moždanih regija jedinki svih dobnih skupina.

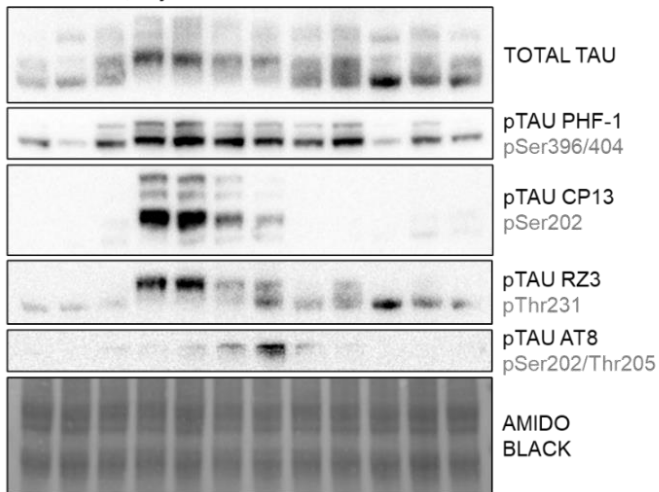
Analizom homogenata malog mozga metodom WB nije zabilježena značajna razlika u razini ukupnog fosforiliranog proteina tau u jedinki divljeg tipa i jedinkama N-WT B-HET te N-WT B-KO ni u jednoj od ispitivanih dobnih skupina (**Slika 31 A-D**). Ukupna razina fosforilacije proteina tau progresivno raste u jedinki N-KI B-WT, N-KI B-HET te N-KI B-KO u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od četiri tjedna (**Slika 31 A, B**). Također, u dobi od 9 (**Slika 31 A, C**) i 15 tjedana (**Slika 31 A, D**) razina ukupnog fosforiliranog proteina tau značajno je povišena u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET u odnosu na jedinke divljeg tipa, ali značajna razlika između ove dvije skupine nije utvrđena. U odnosu na jedinke divljeg tipa, u dobi od četiri tjedna, u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET povišena je razina fosforiliranog proteina tau samo na mjestu fosforilacije pSer 396/404 (PHF-1; **Slika 31 A, B**). U dobi od 9 (**Slika 31 A, C**) i 15 tjedana (**Slika 31 A, D**), u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET, u odnosu na jedinke divljeg tipa, kao i u odnosu na dodatne kontrole (N-WT B-HET i N-WT B-KO), povišen je ukupni fosforilirani tau, kao i pTAU na svim analiziranim mjestima fosforilacije. Pritom jedinke N-KI B-HET pokazuju višu razinu pTAU na svim ispitivanim mjestima u odnosu na jedinke N-KI B-WT u dobi od 9 tjedana (**Slika 31 A, C**). U dobi od 15 tjedana, razina pTAU na mjestima fosforilacije pSer 396/404 (PHF-1), pSer202 (CP13) i pThr231 (RZ3) povišena je u jedinki N-KI B-WT u odnosu na jedinke N-KI B-HET, dok je razina pTAU na mjestu pSer202/Thr205 (AT8) povišena u jedinki N-KI B-HET u odnosu na jedinke N-KI B-WT (**Slika 31 A, D**). U jedinki N-KI B-KO povišena je razina svih analiziranih pTAU vrsta u odnosu na sve ostale ispitane genotipove u dobi od četiri tjedna (**Slika 31 A, B**).



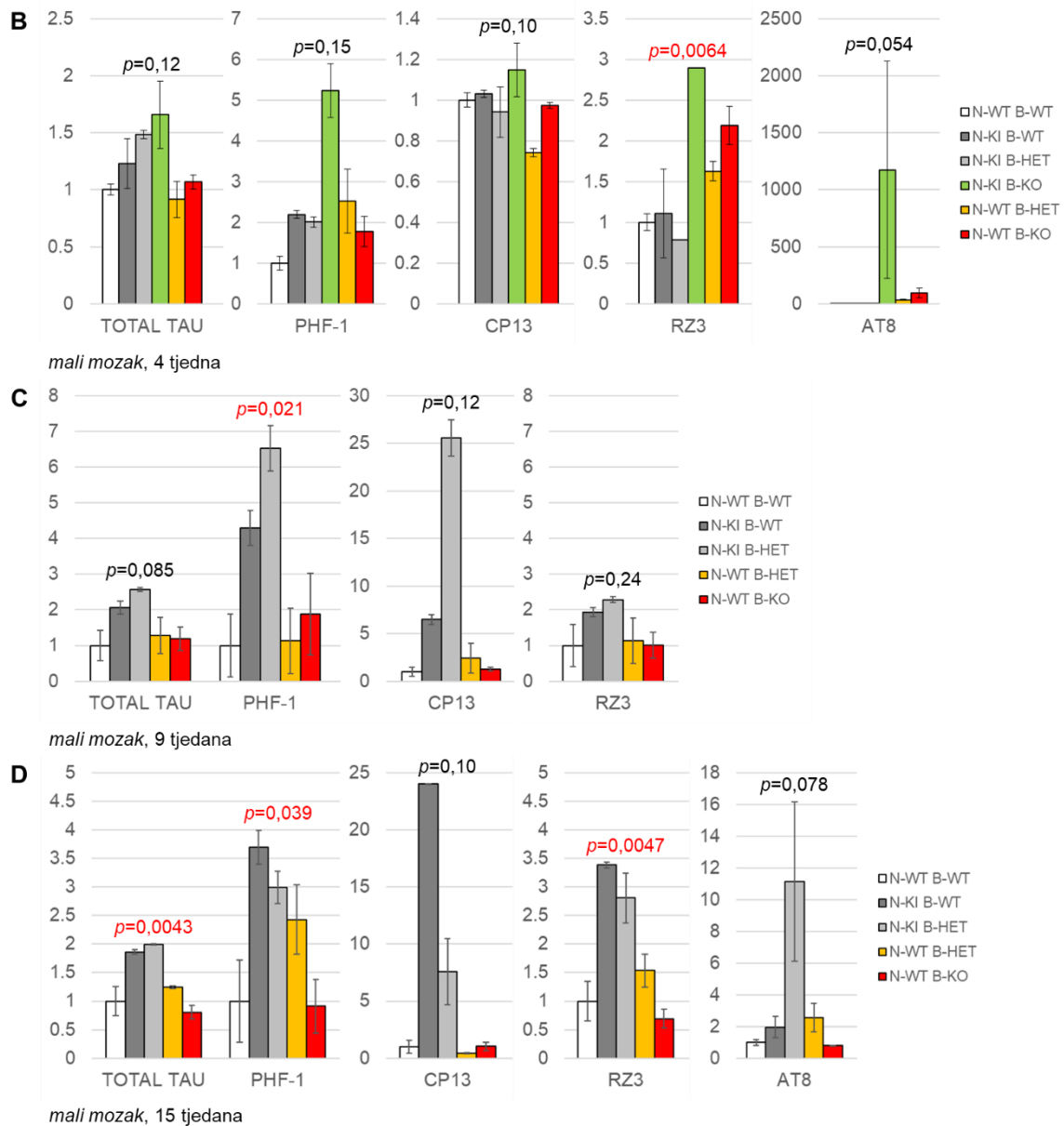
*mali mozak, 4 tjedna*



*mali mozak, 9 tjedana*



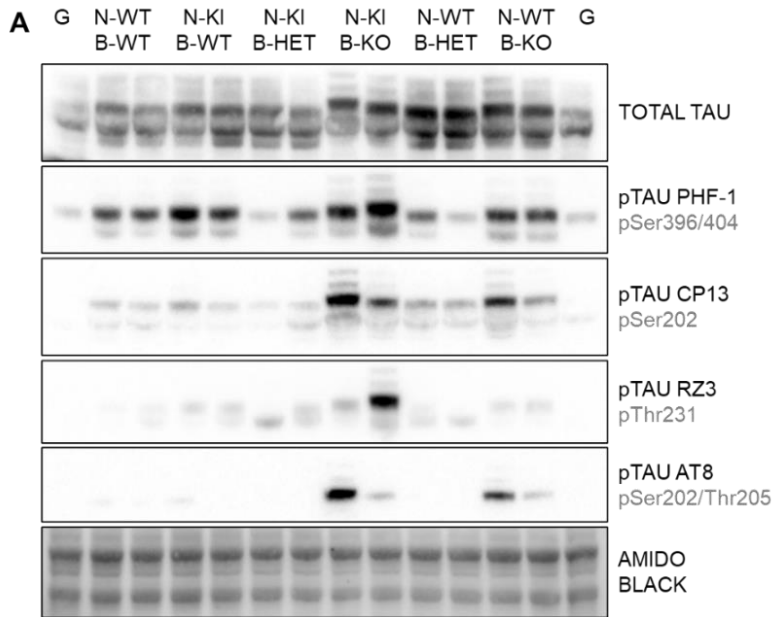
*mali mozak, 15 tjedana*



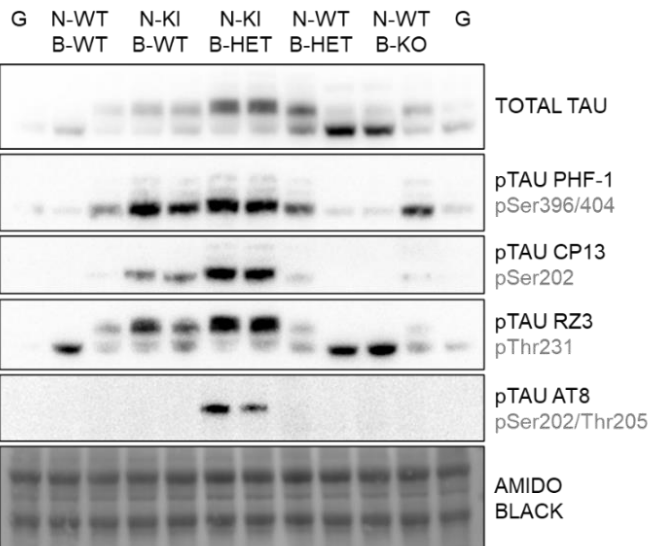
**Slika 31. Analiza razine ukupnog i fosforiliranog proteina tau u malom mozgu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*. A Analiza razine ukupnog i fosforiliranog proteina tau metodom WB u malom mozgu miševa u dobi od četiri, 9 i 15 tjedana. TOTAL TAU – ukupni fosforilirani protein tau, PHF-1 – pTAU na mjestu fosforilacije pSer 396/404, CP13 – pTAU na mjestu fosforilacije pSer202, RZ3 – pTAU na mjestu fosforilacije pThr231, AT8 – pTAU na mjestu fosforilacije pSer202/Thr205. Kvantitativni prikaz razine ukupnog i fosforiliranog proteina tau u malom mozgu miševa u dobi od četiri (B), 9 (C) i 15 tjedana (D). Na grafovima su prikazane *p* vrijednosti dobivene ukupnom statističkom analizom, dok je *post-hoc* analiza, odnosno usporedba srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina prikazana u **Privtcima 11-15**.**

Analizom homogenata kore velikog mozga metodom WB nije uočena razlika u razini ukupnog fosforiliranog tau (TOTAL TAU) između ispitivanih skupina u dobi od četiri tjedna, izuzev značajno povišene razine ukupnog fosforiliranog proteina tau u jedinki N-KI B-KO u odnosu na preostale ispitivane genotipove (**Slika 32 A, B**). Međutim, u dobi od 9 (**Slika 32 A, C**) i 15 tjedana (**Slika 32 A, D**), u odnosu na jedinke divljeg tipa i dodatne kontrole (N-WT B-HET i N-WT B-KO), povišena je razina ukupnog fosforiliranog proteina tau u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET. Razlika u razini ukupnog fosforiliranog tau između ove dvije skupine pritom nije utvrđena. U odnosu na jedinke divljeg tipa, razina fosforilacije proteina tau na svim ispitanim mjestima fosforilacije povišena je u kori velikog mozga jedinki N-KI B-WT u svim ispitivanim dobnim skupinama (**Slika 32 A-D**). U dobi od četiri tjedna (**Slika 32 A, B**), razina fosforilacije proteina tau na svim ispitanim mjestima fosforilacije u jedinki N-KI B-HET niža je u odnosu na jedinke N-KI B-WT, odnosno odgovara razini fosforilacije u jedinki divljeg tipa. Međutim, u dobi od 9 tjedana, razina fosforilacije proteina tau na svim ispitivanim mjestima fosforilacije povišena je u jedinki N-KI B-HET u odnosu na jedinke divljeg tipa (**Slika 32 A, C**), ali i u odnosu na jedinke N-KI B-WT na mjestima fosforilacije pSer202 (CP13) i pSer202/Thr205 (AT8). U dobi od 15 tjedana, razina fosforilacije proteina tau na svim ispitivanim mjestima fosforilacije u jedinki N-KI B-HET povišena je u odnosu na jedinke divljeg tipa, odnosno slična je razini fosforilacije u jedinki N-KI B-WT (**Slika 32 A, D**). Jedinke N-KI B-KO u dobi od četiri tjedna pokazuju povišenu razinu fosforilacije proteina tau na svim ispitivanim mjestima fosforilacije u odnosu na jedinke divljeg tipa, ali i u odnosu na ostale ispitane genotipove (**Slika 32 A, B**). Razina fosforilacije proteina tau povišena je i u jedinki N-WT B-KO u odnosu na jedinke divljeg tipa na mjestima fosforilacije pSer 396/404 (PHF-1), pThr231 (RZ3) i pSer202/Thr205 (AT8) u dobi od četiri tjedna (**Slika 32 A, B**), dok takva razlika nije zabilježena u preostalim dobnim skupinama (**Slika 32 A, C, D**).

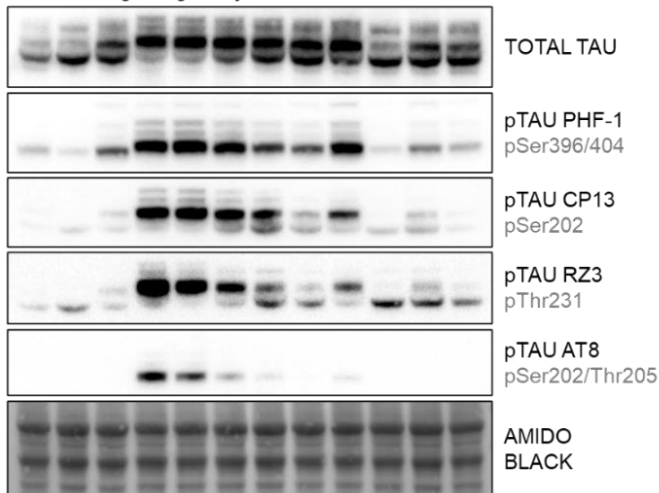




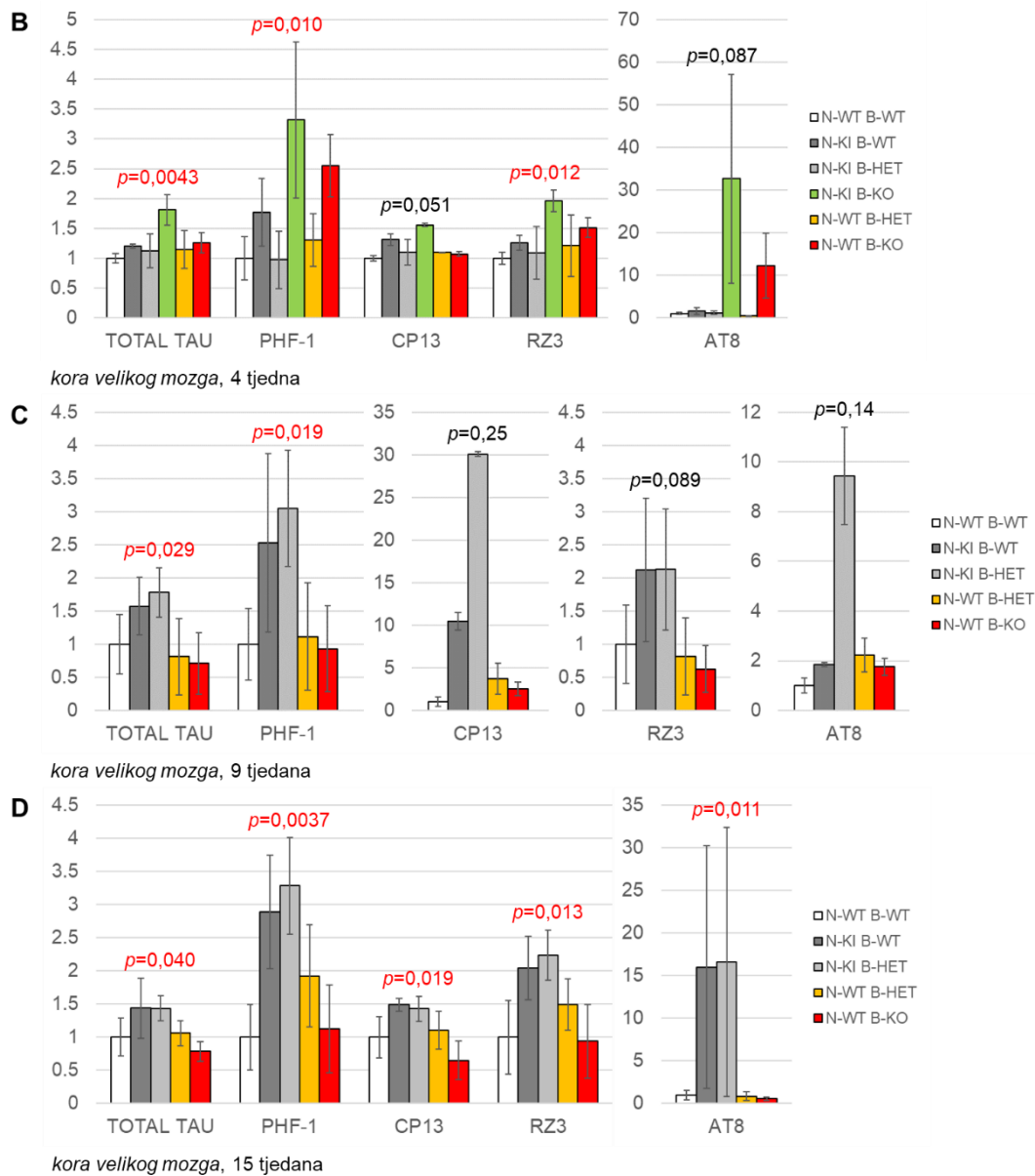
*kora velikog mozga, 4 tjedna*



*kora velikog mozga, 9 tjedana*

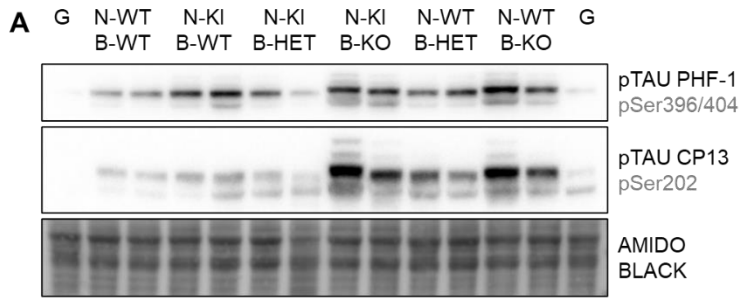


*kora velikog mozga, 15 tjedana*

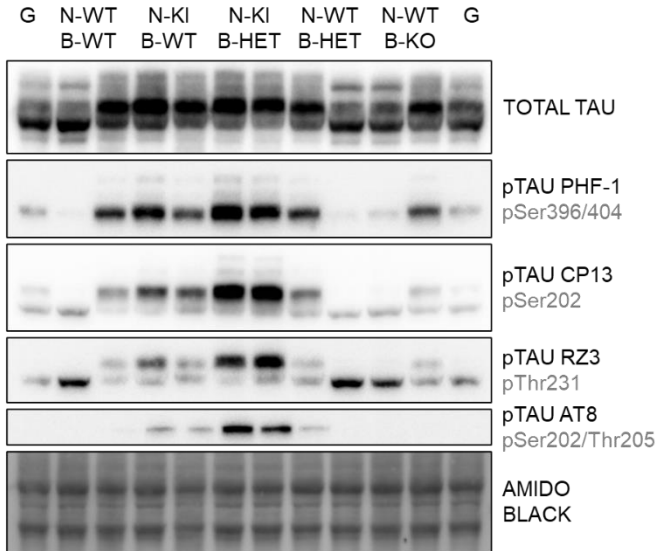


**Slika 32. Analiza razine ukupnog i fosforiliranog proteina tau u kori velikog mozga miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.** A Analiza razine ukupnog i fosforiliranog proteina tau metodom WB u kori velikog mozga miševa u dobi od četiri, 9 i 15 tjedana. TOTAL TAU – ukupni fosforilirani protein tau, PHF-1 – pTAU na mjestu fosforilacije pSer 396/404, CP13 – pTAU na mjestu fosforilacije pSer202, RZ3 – pTAU na mjestu fosforilacije pThr231, AT8 – pTAU na mjestu fosforilacije pSer202/Thr205. Kvantitativni prikaz razine ukupnog i fosforiliranog proteina tau u kori velikog mozga miševa u dobi od četiri (**B**), 9 (**C**) i 15 tjedana (**D**). Na grafovima su prikazane *p* vrijednosti dobivene ukupnom statističkom analizom, dok je *post-hoc* analiza, odnosno usporedba srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina prikazana u **Privitcima 11-15**.

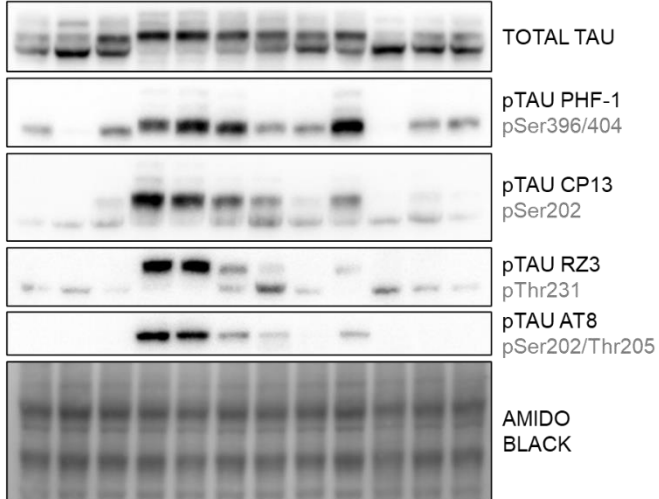
Analizom homogenata hipokampusa metodom WB, u odnosu na jedinke divljeg tipa, pokazana je značajno povišena razina ukupnog fosforiliranog proteina tau u jedinki N-KI B-HET u dobi od 9 tjedana (**Slika 33 A, C**), odnosno značajno povišena razina ukupnog fosforiliranog proteina tau u jedinki N-KI N-WT i N-KI B-HET u dobi od 15 tjedana (**Slika 33 A, D**). U dobi od četiri tjedna, razina fosforilacije proteina tau na mjestu fosforilacije pSer 396/404 (PHF-1) povišena je u jedinki N-KI B-WT u odnosu jedinke divljeg tipa i jedinke N-KI B-HET (**Slika 33 A, B**). Također, razina fosforilacije proteina tau povišena je na mjestu fosforilacije pSer202 (CP13) u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET u odnosu jedinke divljeg tipa. Između jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET pritom nije utvrđena razlika u razini fosforilacije proteina tau na mjestu fosforilacije pSer202 (CP13). U dobi od 9 tjedana, razina fosforilacije proteina tau na svim ispitivanim mjestima fosforilacije povišena je u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET u odnosu jedinke divljeg tipa (**Slika 33 A, C**). Pritom je razina fosforilacije u jedinki N-KI B-HET viša u odnosu na jedinke N-KI B-WT na mjestima fosforilacije pThr231 (RZ3) i pSer202/Thr205 (AT8). U dobi od 15 tjedana, razina fosforilacije proteina tau na svim ispitivanim mjestima fosforilacije povišena je u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET u odnosu jedinke divljeg tipa (**Slika 33 A, D**), pri čemu je razina fosforilacije u jedinki N-KI B-WT viša u odnosu na jedinke N-KI B-HET na svim ispitivanim mjestima fosforilacije. U hipokampusu jedinki N-KI B-KO u dobi od četiri tjedna zabilježena je najviša razina fosforilacije proteina tau na mjestima fosforilacije pSer 396/404 (PHF-1) i pSer202 (CP13; **Slika 33 A, B**). Visoka razina fosforilacije na ovim mjestima prisutna je i u jedinki N-WT B-KO u dobi od četiri tjedna (značajno povišena u odnosu na jedinke divljeg tipa; **Slika 33 A, B**), dok je u dobi od 9 (**Slika 33 A, C**) i 15 tjedana (**Slika 33 A, D**) niža, odnosno slična razini fosforilacije u jedinki divljeg tipa.



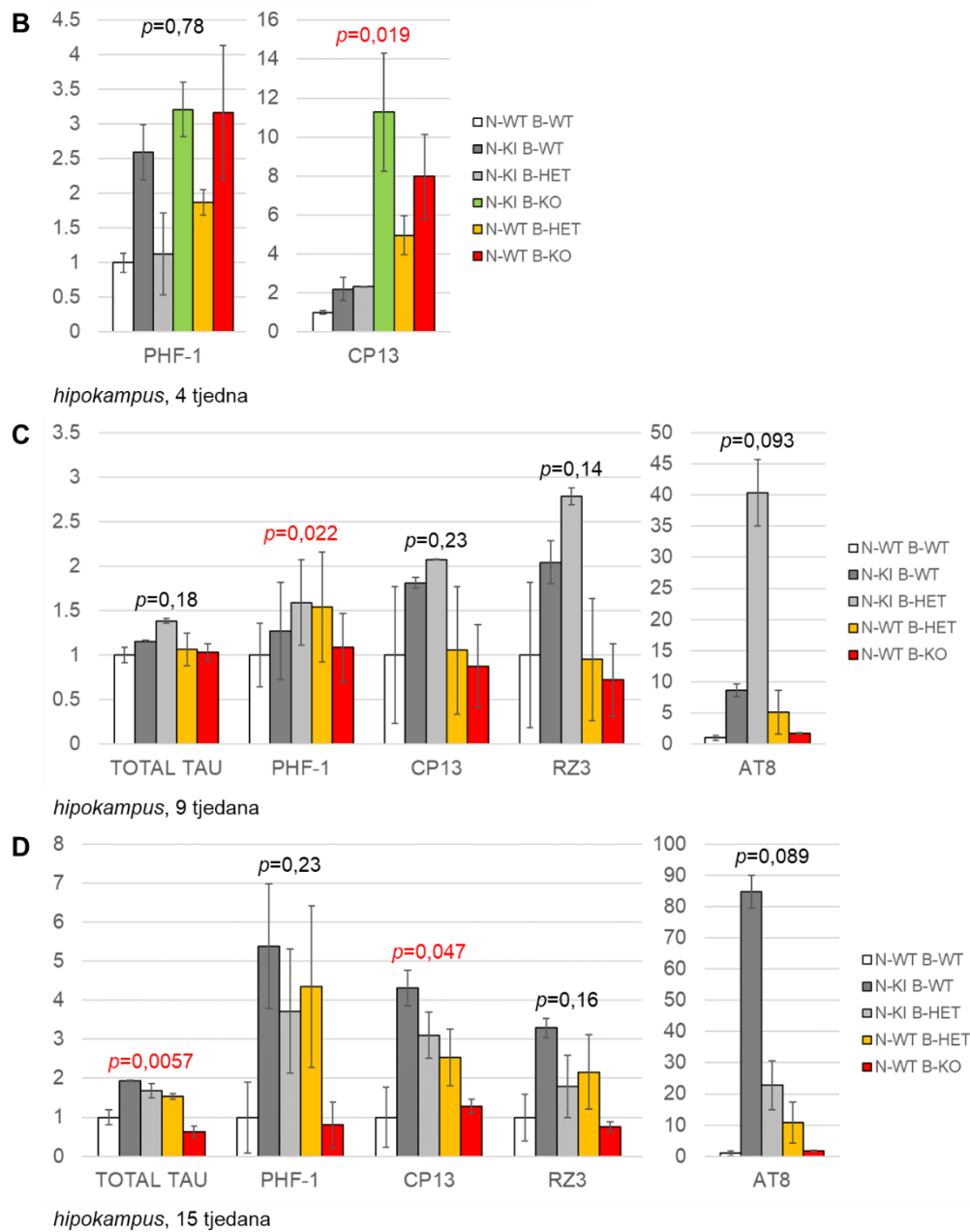
*hipokampus, 4 tjedna*



*hipokampus, 9 tjedana*



*hipokampus, 15 tjedana*



**Slika 33. Analiza razine ukupnog i fosforiliranog proteina tau u hipokampusu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.** A Analiza razine ukupnog i fosforiliranog proteina tau metodom WB u hipokampusu miševa u dobi od četiri, 9 i 15 tjedana. TOTAL TAU – ukupni fosforilirani protein tau, PHF-1 – pTAU na mjestu fosforilacije pSer 396/404, CP13 – pTAU na mjestu fosforilacije pSer202, RZ3 – pTAU na mjestu fosforilacije pThr231, AT8 – pTAU na mjestu fosforilacije pSer202/Thr205. Kvantitativni prikaz razine ukupnog i fosforiliranog proteina tau u hipokampusu miševa u dobi od četiri (**B**), 9 (**C**) i 15 tjedana (**D**). Na grafovima su prikazane *p* vrijednosti dobivene ukupnom statističkom analizom, dok je *post-hoc* analiza, odnosno usporedba srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina prikazana u **Privtcima 11-15**.

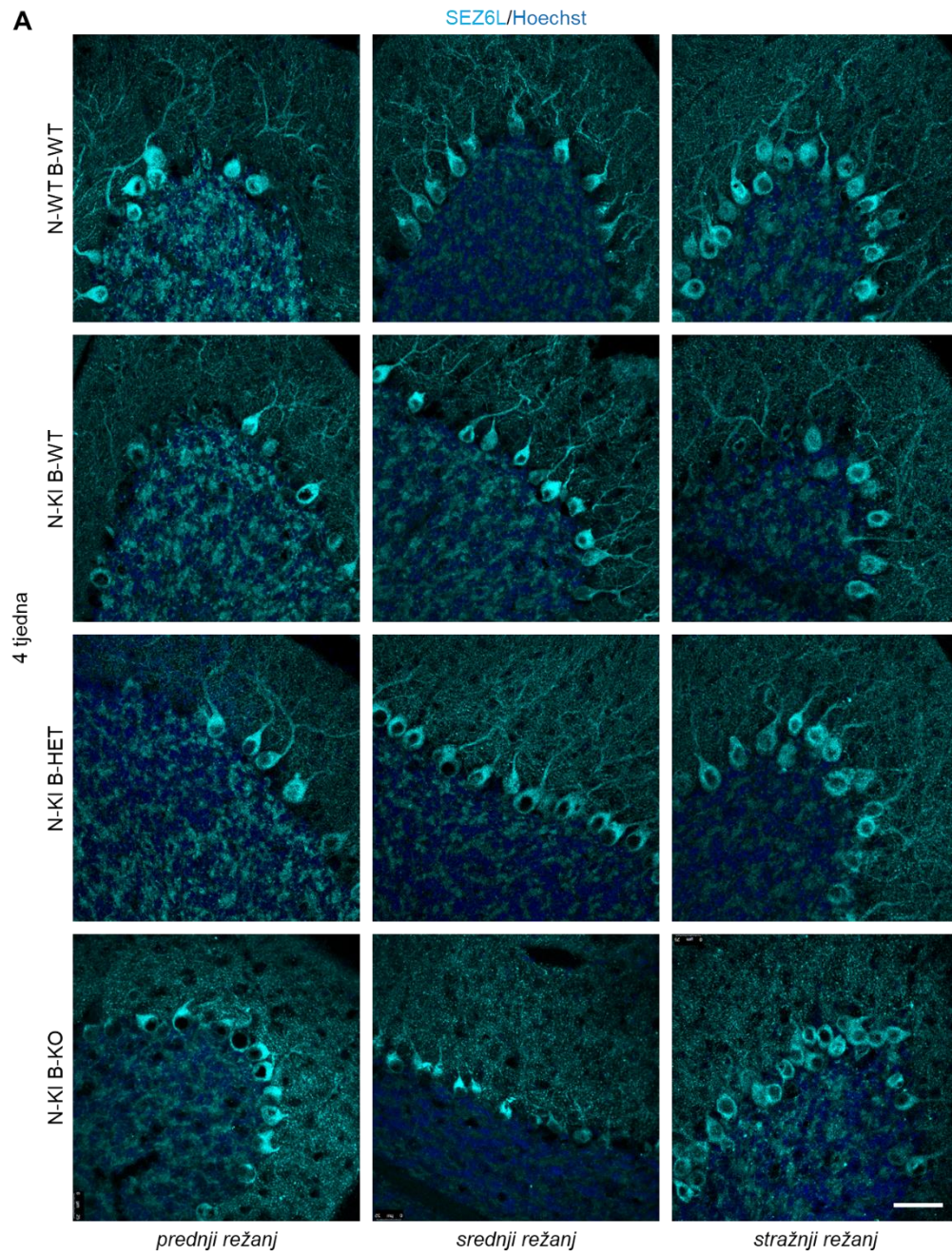


#### 4.2.8. Analiza proteolize supstrata enzima BACE1 u mozgu miševa *knock-in NPC1-11061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*

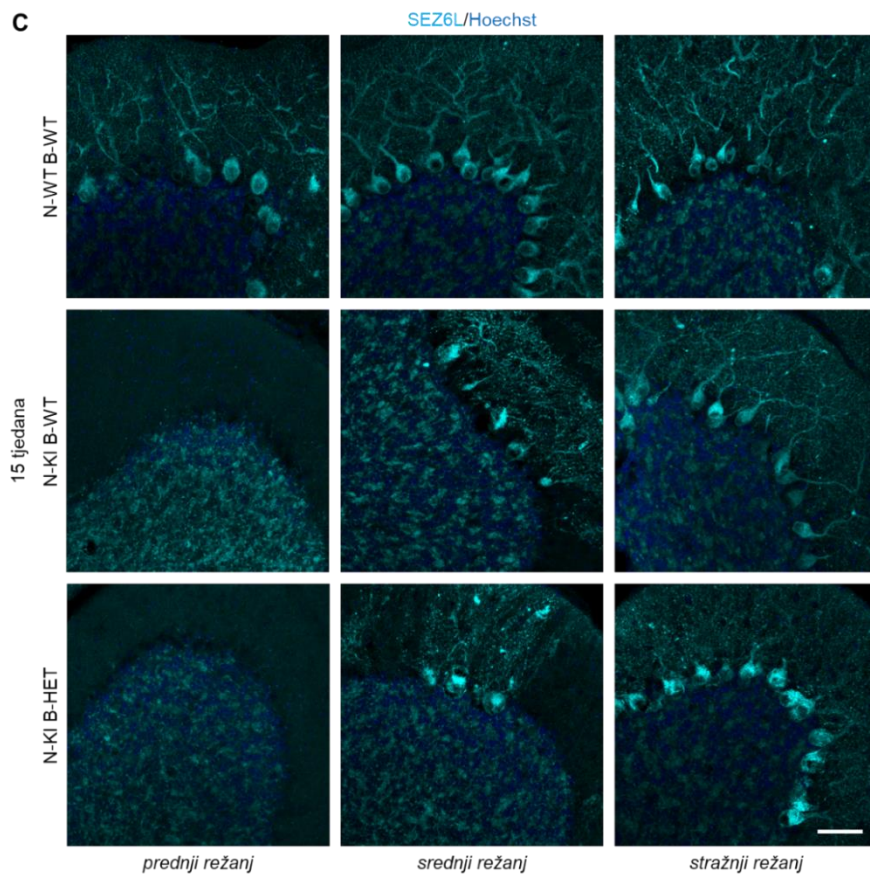
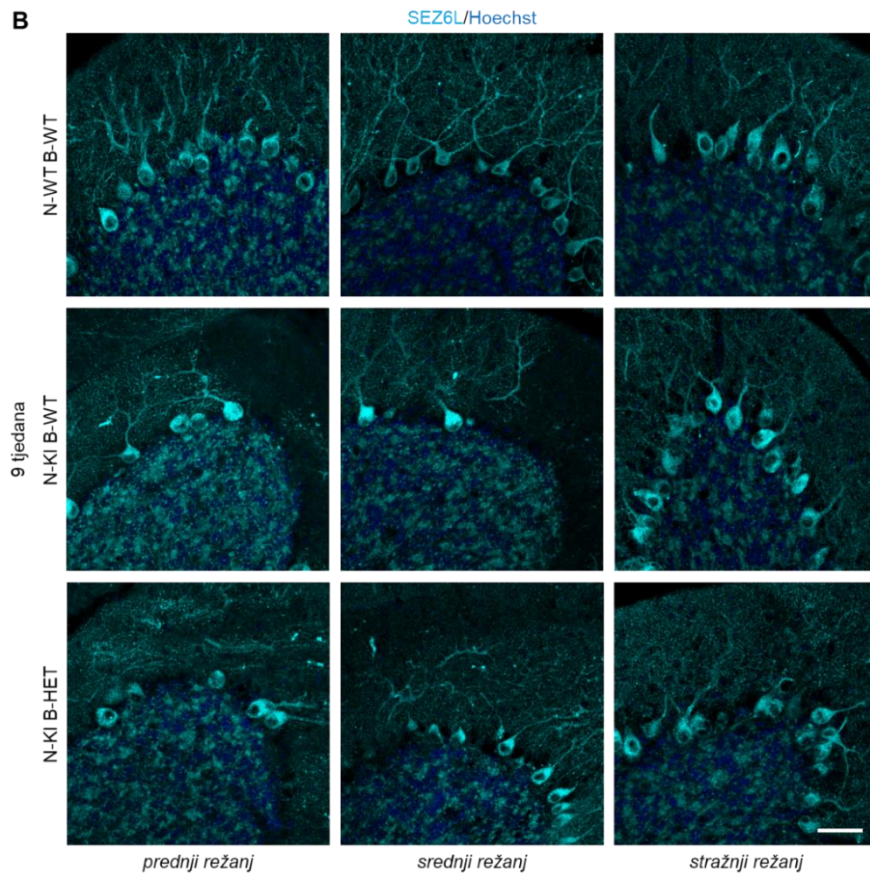
Imunohistokemijskom analizom kriorezova mozgovna debljine 16  $\mu\text{m}$  te analizom homogenata mozgovna metodom WB ispitana je raspodjela i proteoliza supstrata enzima BACE1, i to proteina SEZ6, SEZ6L i APP. Korištena su sljedeća protutijela: APP 22C11 – biljeg N-terminalnog kraja cjelovitog proteina APP (flAPP) i pocijepanih odsječaka proteina APP (sAPPtotal), APP Y188 – biljeg C-terminalnog kraja cjelovitog proteina APP, odnosno C-terminalnih odsječaka pocijepanog proteina APP (APP CTFs), SEZ6 – biljeg N-terminalnog kraja cjelovitog proteina SEZ6 (flSEZ6) i pocijepanog odsječka proteina SEZ6 (sSEZ6), SEZ6L – biljeg N-terminalnog kraja cjelovitog proteina SEZ6L (flSEZ6L) i pocijepanog odsječka proteina SEZ6L (sSEZ6L).

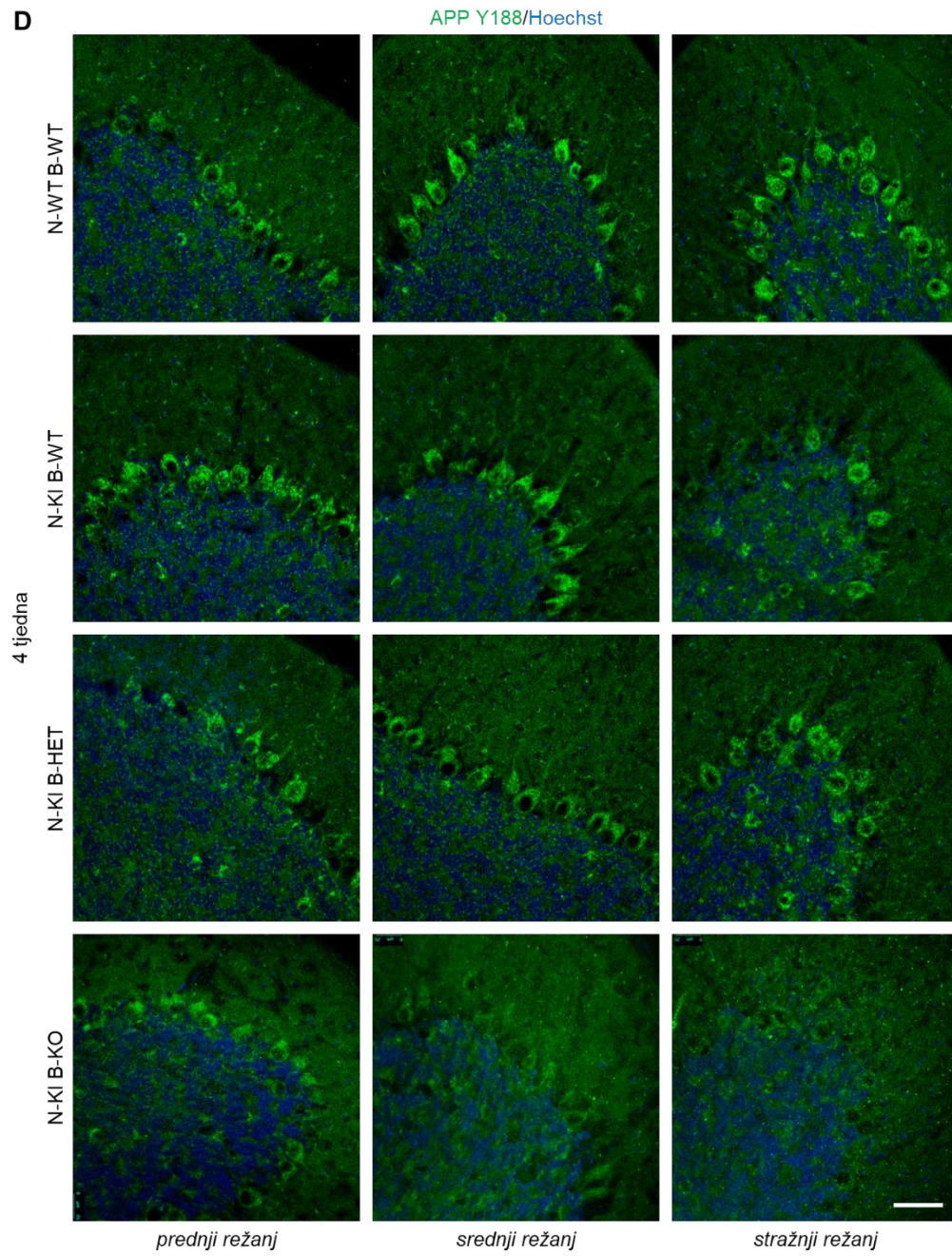
Imunohistokemijska analiza proteina SEZ6L u malom mozgu jedinki divljeg tipa pokazala je prisutnost ovog proteina u tijelima Purkinjeovih neurona, kao i bojanje u dendritičkom stablu u svim ispitivanim dobnim skupinama (**Slika 34 A-C**). U jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET u dobi od četiri tjedna nije zabilježena razlika u raspodjeli i kvaliteti bojanja ovog biljega u odnosu na jedinke divljeg tipa (**Slika 34 A**). U dobi od 9 tjedana, u ovim je skupinama zabilježen gubitak signala bojenja proteina SEZ6L u skladu s odumiranjem Purkinjeovih neurona u prednjim i srednjim režnjevima malog mozga (**Slika 34 B**). U dobi od 15 tjedana dolazi do potpunog gubitka signala u prednjim režnjevima (**Slika 34 C**), dok Purkinjeovi neuroni preostali u srednjim režnjevima pokazuju povećan intenzitet bojanja u somi te točkasto bojanje u dendritičkim procesima, što ukazuje na nakupljanje proteina SEZ6L. Pritom nije utvrđena razlika u intenzitetu i raspodjeli biljega SEZ6L između jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET. Jedinke N-KI B-KO u dobi od četiri tjedna pokazuju odsutnost bojanja SEZ6L u dendritičkom stablu te nešto veći intenzitet bojanja u somi Purkinjeovih neurona u odnosu na jedinke ostalih ispitivanih genotipova (**Slika 34 A**). Bojanje proteina SEZ6 u malom mozgu rezultiralo je samo pozadinskim bojanjem, stoga nije prikazano.

Imunohistokemijskom analizom proteina APP u malom mozgu moguće je utvrditi protein APP samo u somi Purkinjeovih neurona (**Slika 34 D-F**). U dobi od četiri tjedna, protein APP zabilježen je u Purkinjeovim neuronima jedinki svih ispitivanih genotipova (**Slika 34 D**). Međutim, u jedinki N-KI B-KO signal je znatno snižen u somi Purkinjeovih neurona u srednjim i stražnjim režnjevima malog mozga već u dobi od četiri tjedna. Sukladno odumiranju Purkinjeovih neurona, u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET dolazi do progresivnog gubitka signala za protein APP u dobi od 9 (**Slika 34 E**), odnosno 15 tjedana (**Slika 34 F**) u odnosu na jedinke divljeg tipa. Pritom je u jedinki N-KI B-HET zabilježena viša razina signala za protein APP u srednjim režnjevima (zbog sporijeg gubitka Purkinjeovih neurona) u dobi od 9 tjedana (**Slika 34 E**).

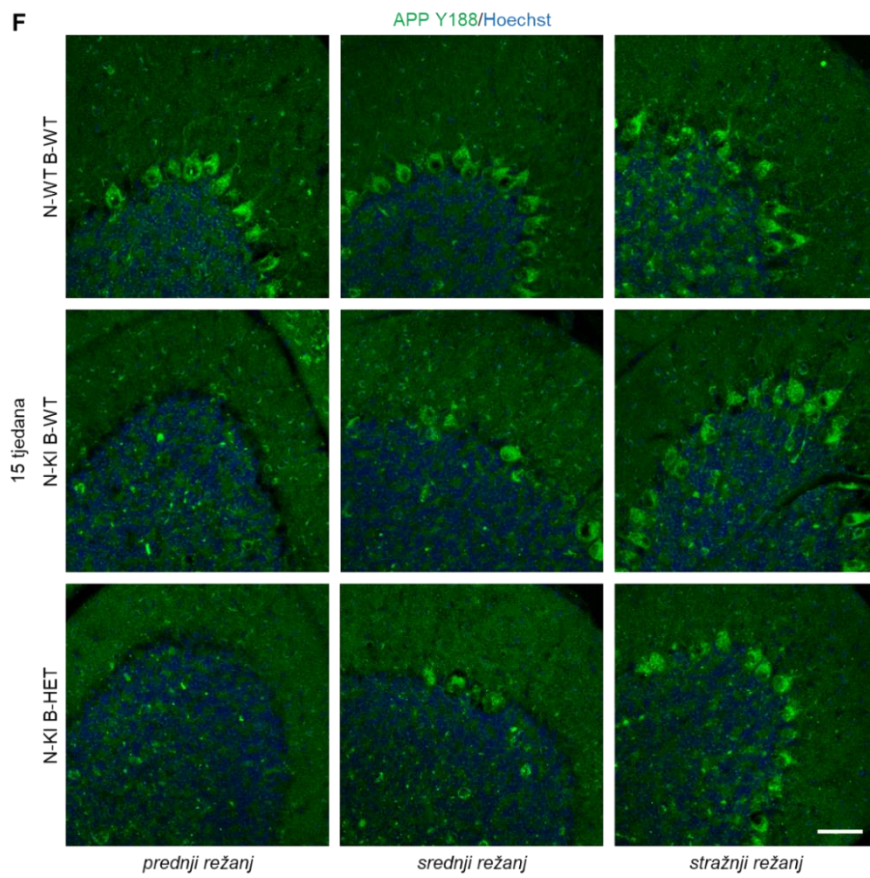
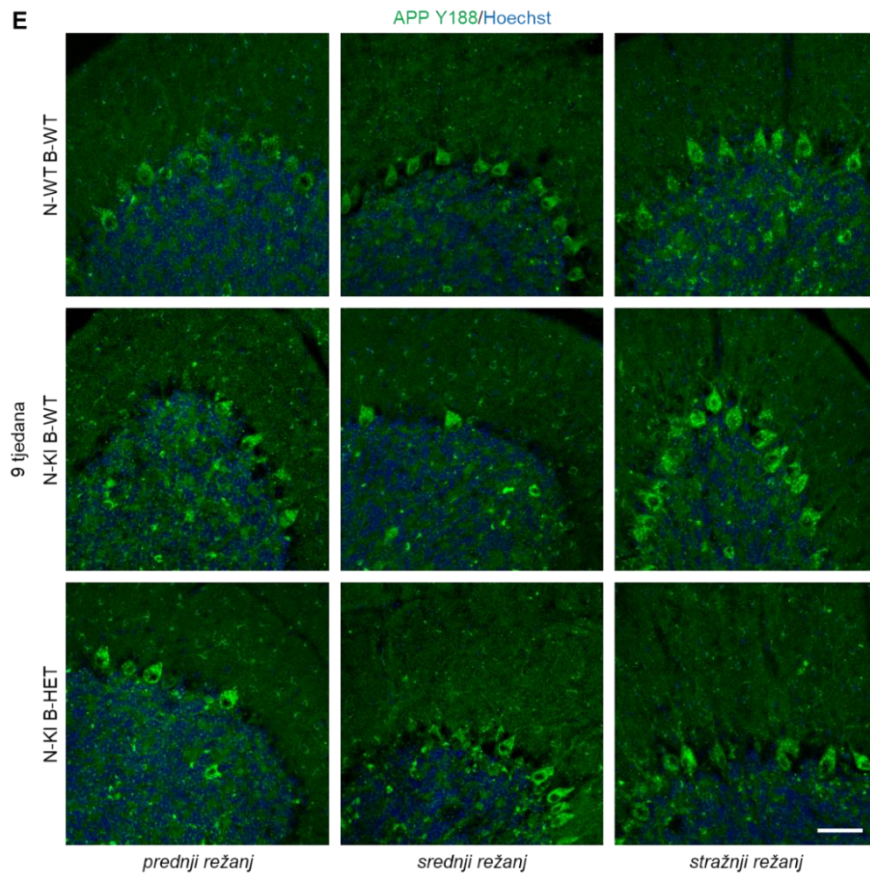








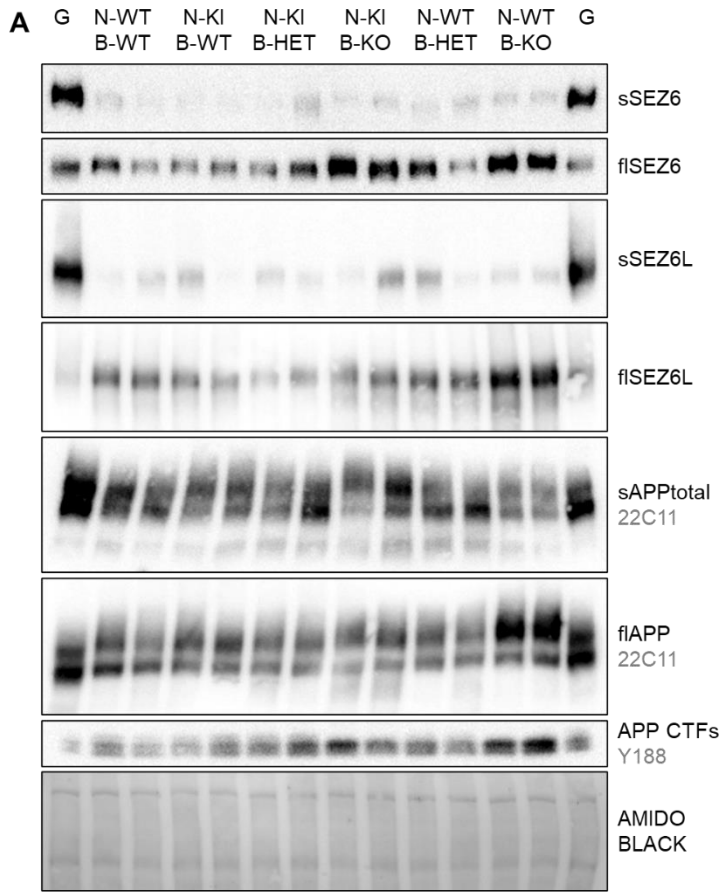




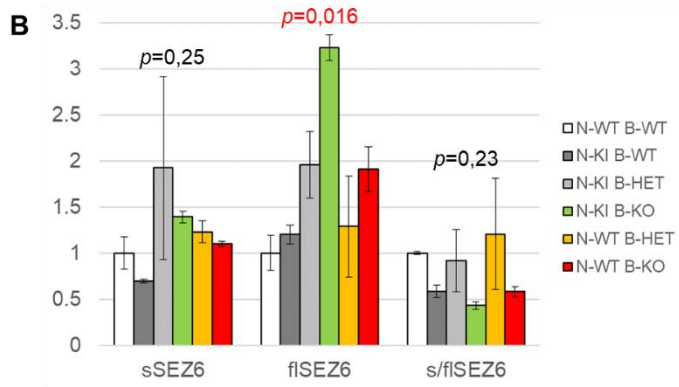


◀ **Slika 34. Analiza raspodjele supstrata enzima BACE1 u malom mozgu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.** Imunohistokemijska analiza supstrata SEZ6L u malom mozgu miševa u dobi od četiri (A), 9 (B) i 15 tjedana (C). Imunohistokemijska analiza supstrata APP u malom mozgu miševa u dobi od četiri (D), 9 (E) i 15 tjedana (F). Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). SEZ6L (tirkizno) – protein SEZ6L, APP Y188 (zeleno) – protein APP. Skala 50  $\mu$ m.

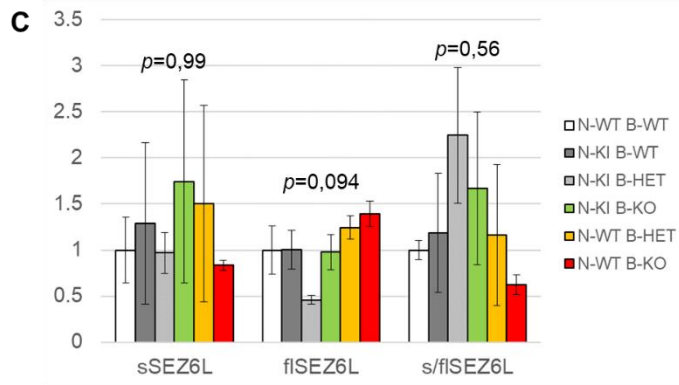
Analiza homogenata malog mozga metodom WB pokazala je da je u jedinki N-WT B-KO razina cijepanja svih ispitivanih supstrata enzima BACE1 smanjena u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od četiri tjedna (s/flSEZ6, s/flSEZ6L, sAPPtotal/flAPP; **Slika 35 A-D**). U jedinki N-KI B-WT nije zabilježena povišena razina cijepanja proteina SEZ6 i SEZ6L u odnosu na jedinke divljeg tipa (**Slika 35 A-C**). Međutim, razina cijepanja proteina SEZ6L povišena je u jedinki N-KI B-HET u odnosu na jedinke divljeg tipa te jedinke N-KI B-WT (**Slika 35 A, C**). Također, nije zabilježena razlika u razini cijepanja proteina APP u preostalim ispitivanim skupinama u odnosu na jedinke divljeg tipa (**Slika 35 A, D**). U dobi od 9 tjedana, u odnosu na jedinke divljeg tipa, uočena je povećana razina cijepanja proteina SEZ6L i APP u jedinki N-KI B-WT (**Slika 35 D, F, G**), ali nije bilo razlike u razini cijepanja proteina SEZ6 (**Slika 35 D, E**). Zanimljivo, razina cijepanja svih ispitivanih supstrata povišena je u jedinki N-KI B-HET u odnosu na jedinke divljeg tipa, ali i u odnosu na jedinke N-KI B-WT (**Slika 35 E-H**). U dobi od 15 tjedana, uočena je povećana razina cijepanja proteina SEZ6L u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET u odnosu na jedinke divljeg tipa (**Slika 35 I, K**), dok je razina cijepanja proteina SEZ6 i APP snižena (**Slika 35 I, J, L**). U dobi od četiri tjedna, razina odsječaka APP CTFs u jedinki N-KI B-HET povišena je u odnosu na jedinke N-KI B-WT (**Slika 35 A, D**), dok u dobi od 9 (**Slika 35 E, H**) i 15 tjedana (**Slika 35 I, L**) nije zabilježena značajna razlika u razini ovog C-terminalnog produkta cijepanja enzimom BACE1 između ova dva genotipa, ali je značajno povišena u odnosu na jedinke divljeg tipa.



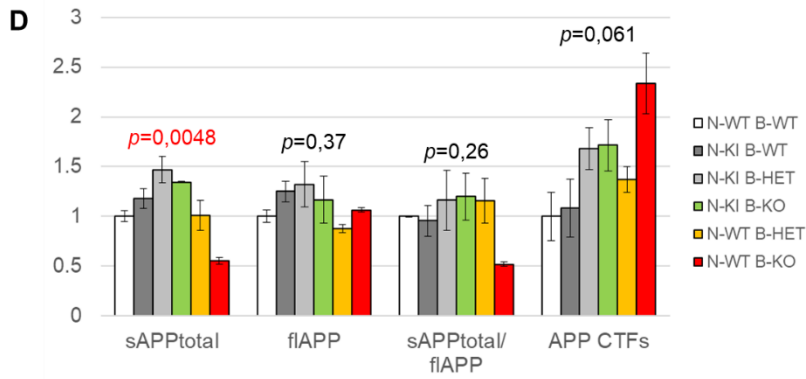
*mali mozak, 4 tjedna*



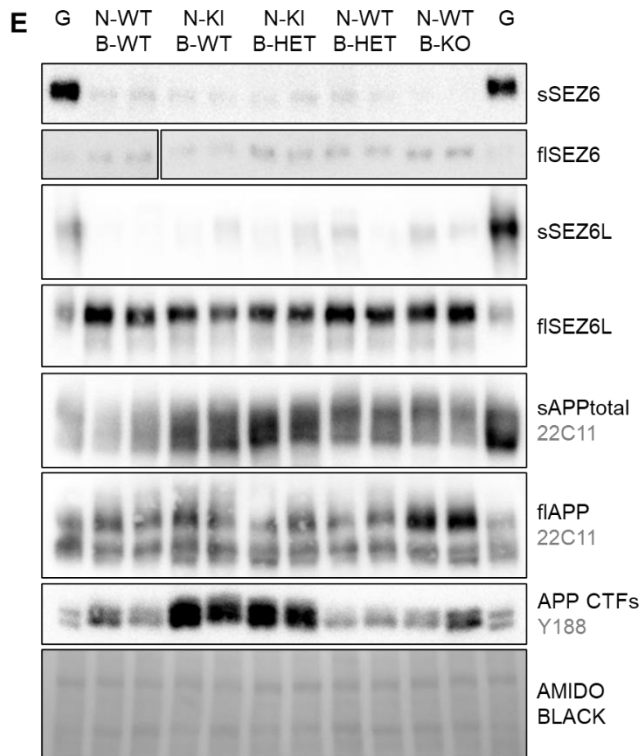
*mali mozak, 4 tjedna*



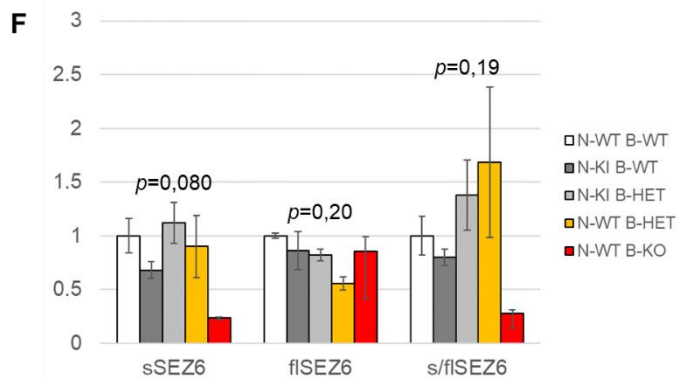
*mali mozak, 4 tjedna*



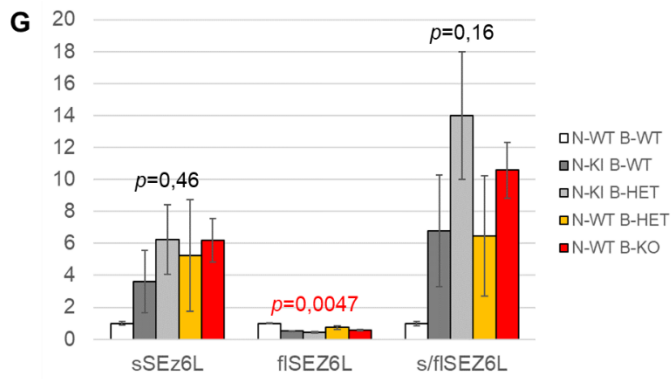
*mali mozak, 4 tjedna*



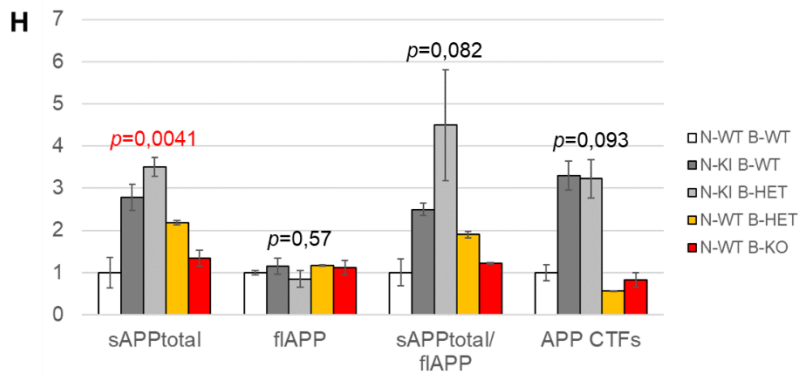
*mali mozak, 9 tjedana*



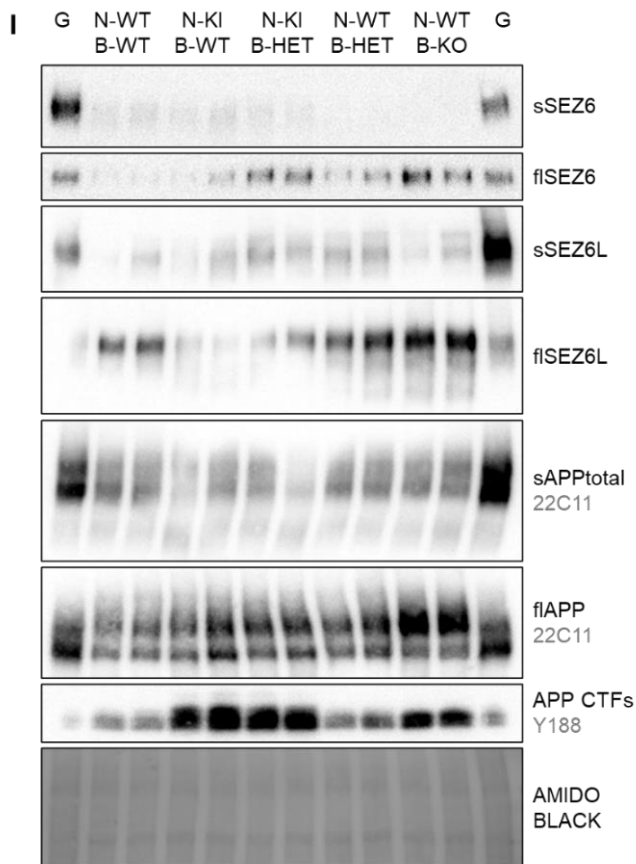
*mali mozak, 9 tjedana*

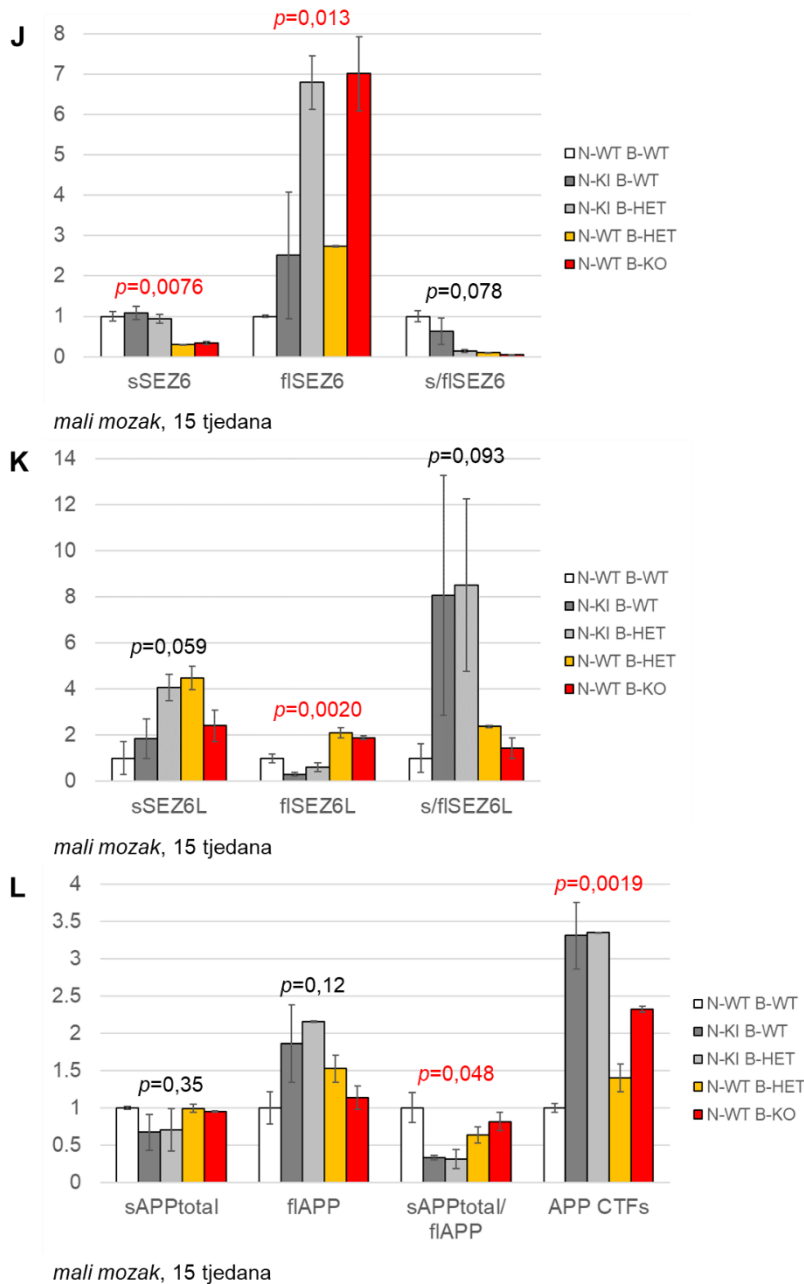


*mali mozak, 9 tjedana*



*mali mozak, 9 tjedana*

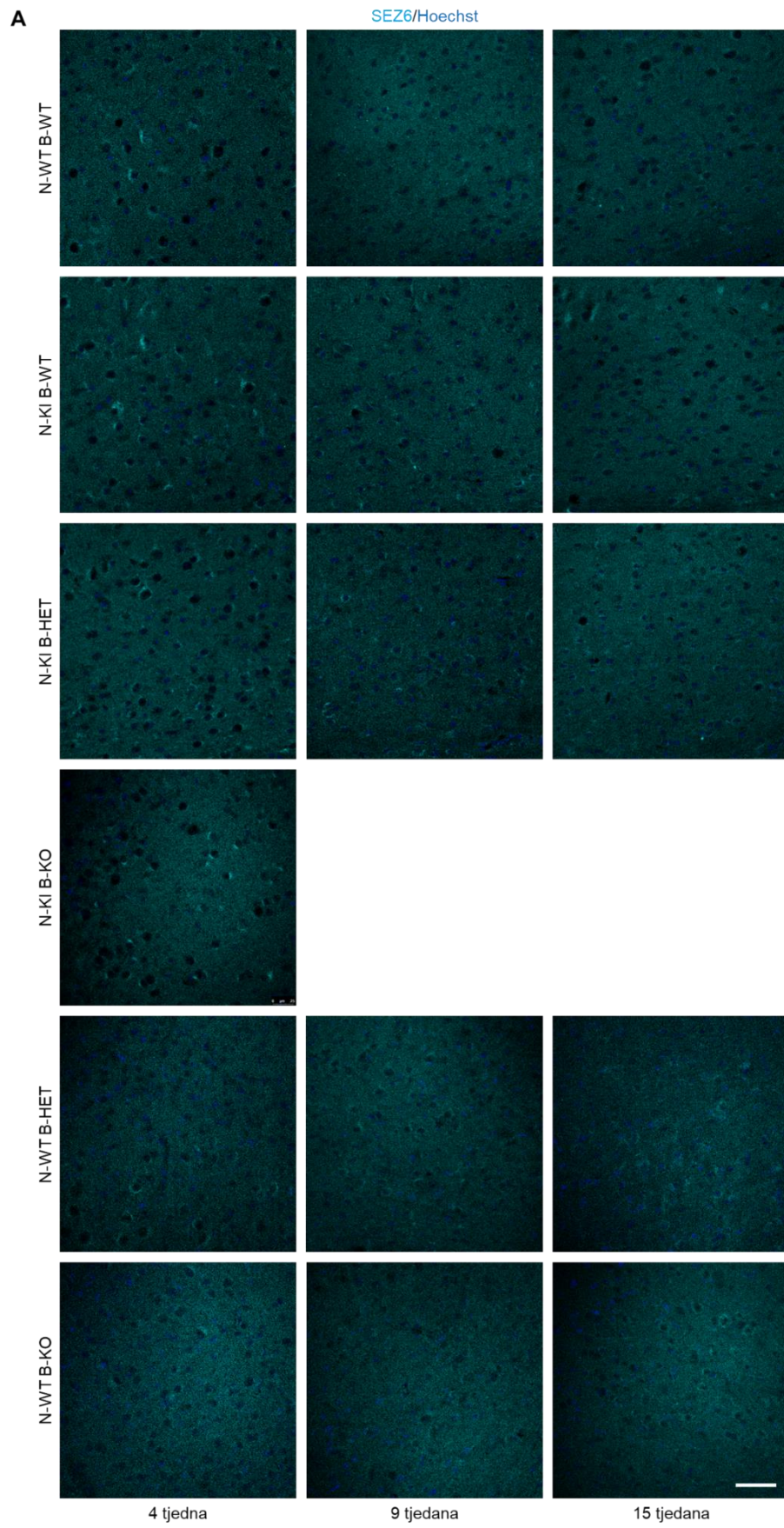




**Slika 35. Analiza proteolitičkog cijepanja supstrata enzima BACE1 u malom mozgu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*. Analiza razine proteina SEZ6, SEZ6L i APP metodom WB u malom mozgu miševa u dobi od četiri (A), 9 (E) i 15 tjedana (I). sSEZ6 – topivi N-terminalni odsječak proteina SEZ6, flSEZ6 – cjeloviti protein SEZ6, sSEZ6L – topivi N-terminalni odsječak proteina SEZ6L, flSEZ6L – cjeloviti protein SEZ6L, sAPPTotal – ukupni topivi N-terminalni odsječci proteina APP, flAPP – cjeloviti protein APP, APP CTFs – C-terminalni odsječci proteina APP. Kvantitativni prikaz razine supstrata SEZ6 (B), SEZ6L (C) i APP (D) u malom mozgu miševa u dobi od četiri tjedna. Kvantitativni prikaz razine supstrata SEZ6 (F), SEZ6L (G) i APP (H) u malom mozgu miševa u dobi od 9 tjedana. Kvantitativni prikaz razine supstrata SEZ6 (J), SEZ6L (K) i APP (L) u malom mozgu miševa u dobi od 15 tjedana. Na grafovima su prikazane *p* vrijednosti dobivene ukupnom statističkom analizom, dok je *post-hoc* analiza, odnosno usporedba srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina prikazana u Pravitcima 16-25.**

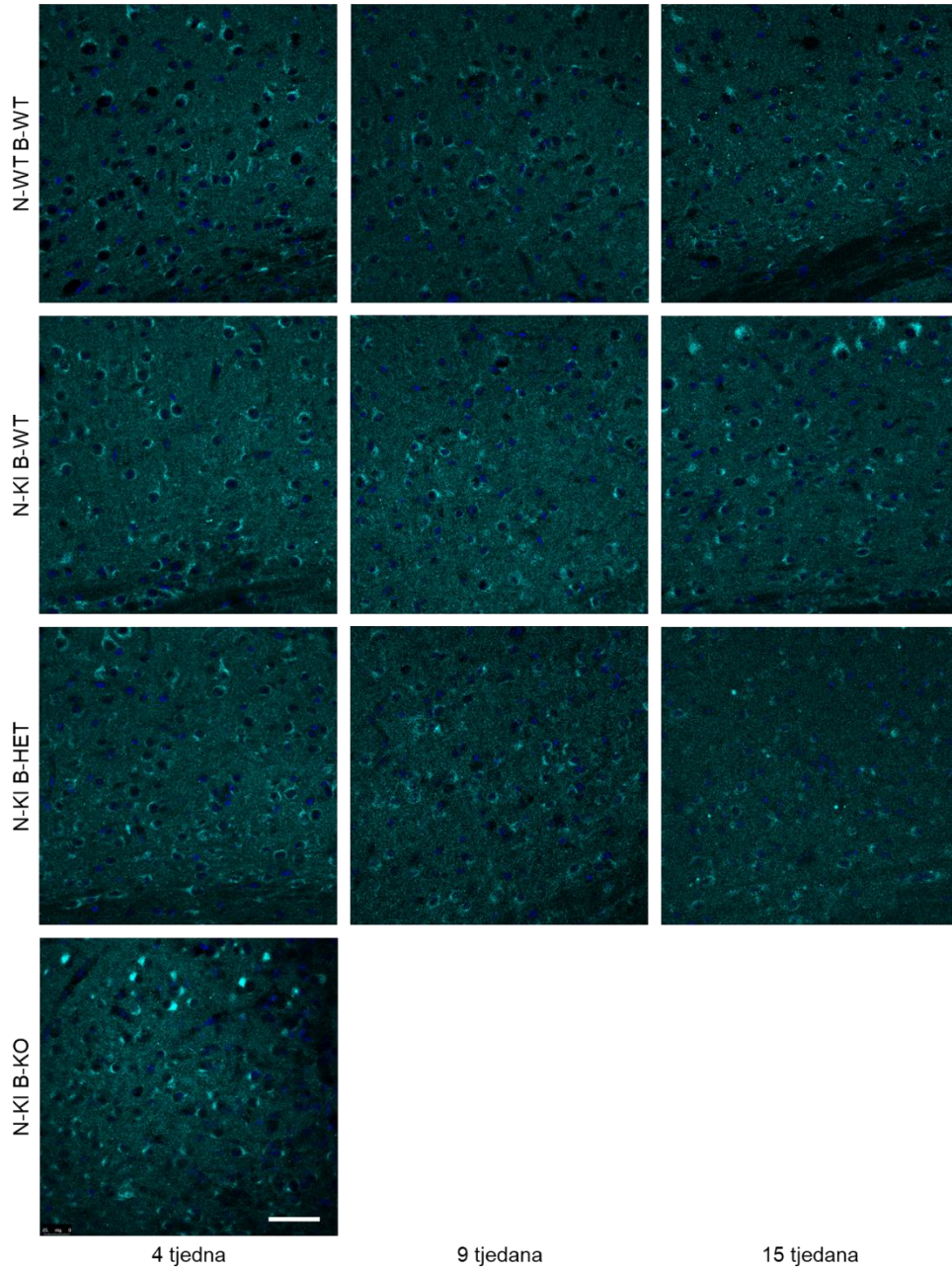


Imunohistokemijskom analizom raspodjele proteina SEZ6 u kori velikog mozga zabilježen je povećani intenzitet bojanja i nakupljanje ovog supstrata enzima BACE1 u somi neurona jedinki N-KI B-WT u odnosu na jedinke divljeg tipa i dodatne kontrole (N-WT B-HET i N-WT B-KO) u svim ispitivanim dobnim skupinama (**Slika 36 A**). U dobi od četiri tjedna, nakupljanje proteina SEZ6 zabilježeno je i u jedinki N-KI B-KO u odnosu na jedinke divljeg tipa i jedinke N-KI B-HET. Jedinke N-KI B-HET pokazuju nešto veće nakupljanje proteina SEZ6 u odnosu na jedinke divljeg tipa, ali je razina nakupljanja niža u usporedbi s jedinkama N-KI B-WT. Analiza raspodjele proteina SEZ6L pokazala je slične rezultate (**Slika 36 B**): jedinke N-KI B-WT u odnosu na jedinke divljeg tipa pokazuju povećani intenzitet bojanja i nakupljanje proteina SEZ6L u kori velikog mozga, posebno u dobi od 9 i 15 tjedana. Snažno nakupljanje ovog supstrata zabilježeno je i u jedinki N-KI B-KO u dobi od četiri tjedna. Razina proteina SEZ6L u jedinki N-KI B-HET u skladu je s razinom u jedinki divljeg tipa, dakle niža nego u jedinki N-KI B-WT, što je posebno izraženo u dobi od 15 tjedana. Raspodjela i intenzitet signala proteina APP ekvivalentan je u jedinki N-KI B-HET i jedinki divljeg tipa (**Slika 36 C**). U odnosu na ove dvije skupine, u jedinki N-KI B-WT zabilježen je povećani intenzitet bojanja i nakupljanje proteina APP u somi neurona u svim ispitivanim dobnim skupinama. Zanimljivo, u dobi od četiri tjedna, razina proteina APP u kori velikog mozga jedinki N-KI B-KO vrlo je niska, ali vidljivo je snažno nakupljanje u somi pojedinih neurona.

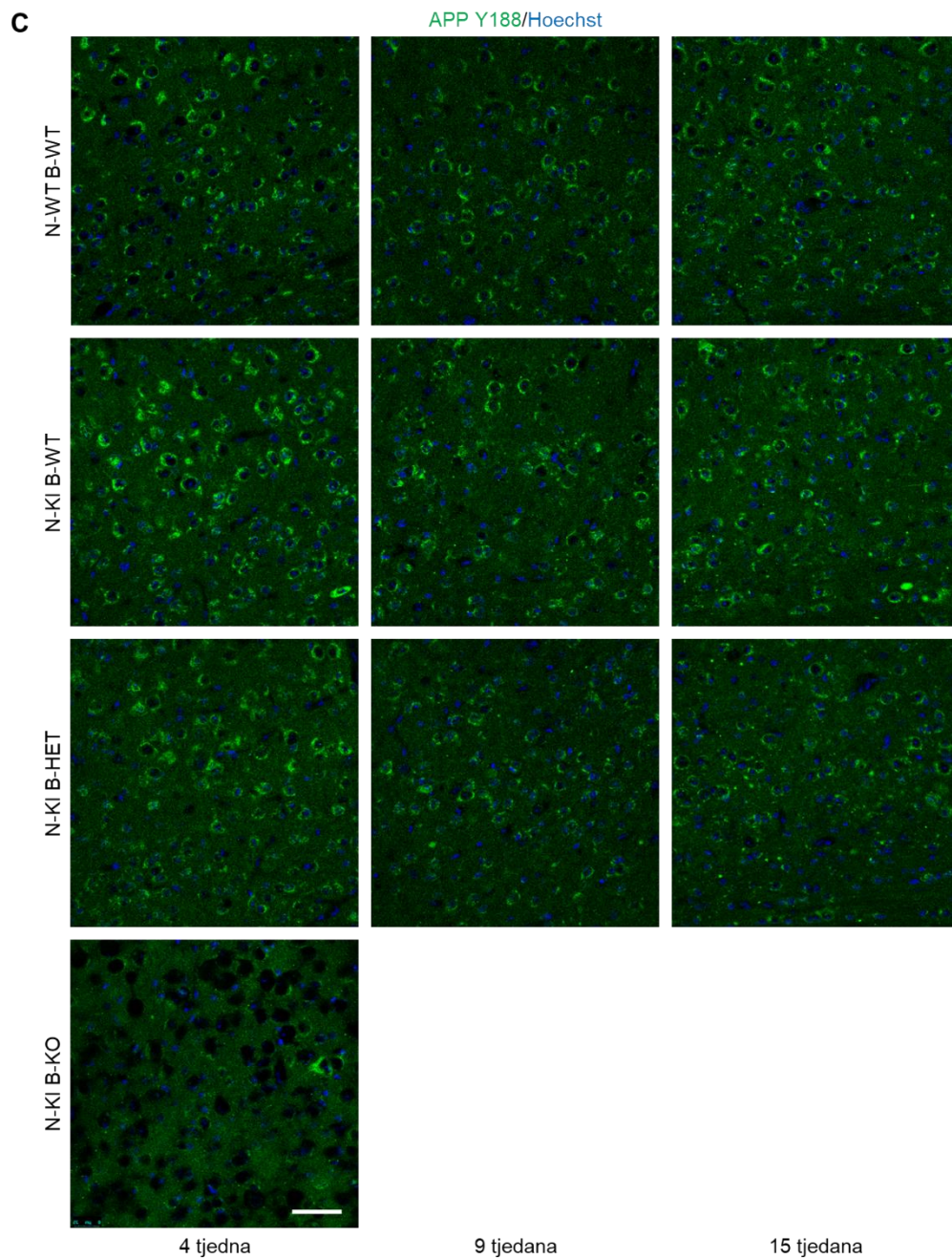


**B**

SEZ6L/Hoechst



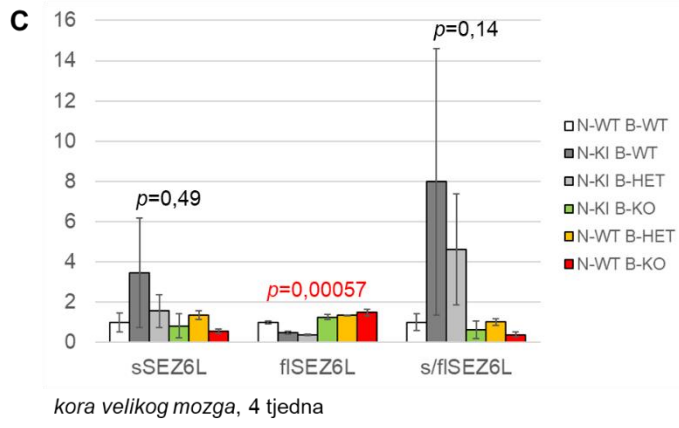
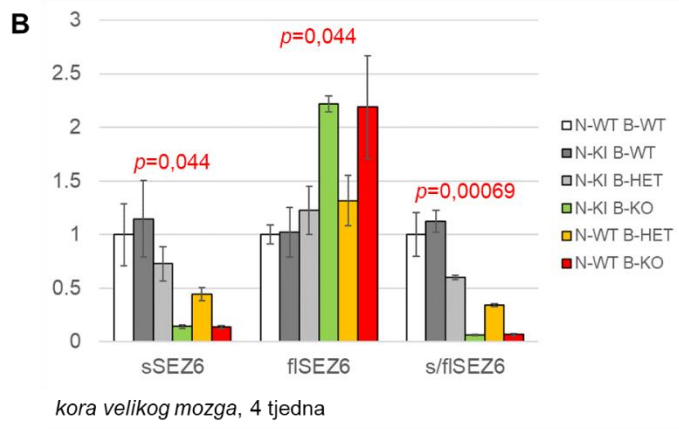
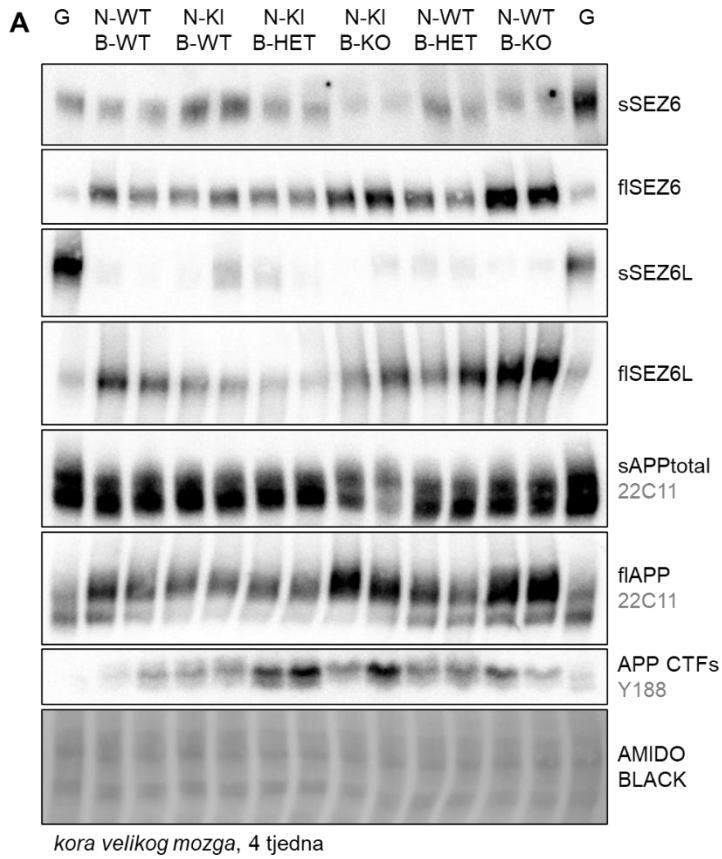


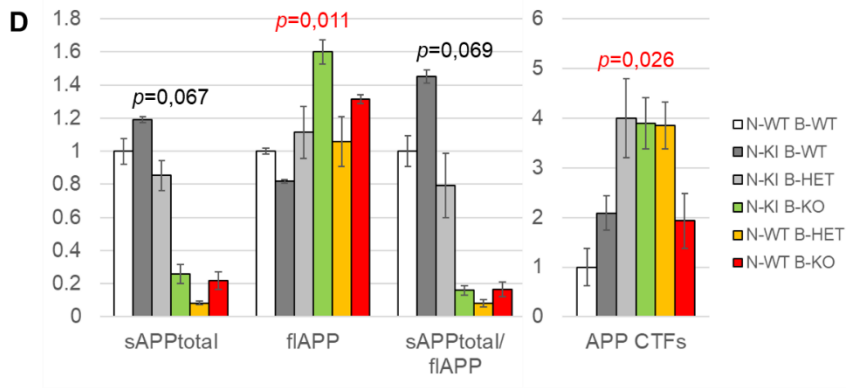


**Slika 36. Analiza raspodjele supstrata enzima BACE1 u kori velikog mozga miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*. Imunohistokemijska analiza supstrata SEZ6 (A), SEZ6L (B) i APP (C) u kori velikog mozga miševa u dobi od četiri, 9 i 15 tjedana. Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). SEZ6 (tirkizno) – protein SEZ6, SEZ6L (tirkizno) – protein SEZ6L, APP Y188 (zeleno) – protein APP. Skala 50  $\mu$ m.**

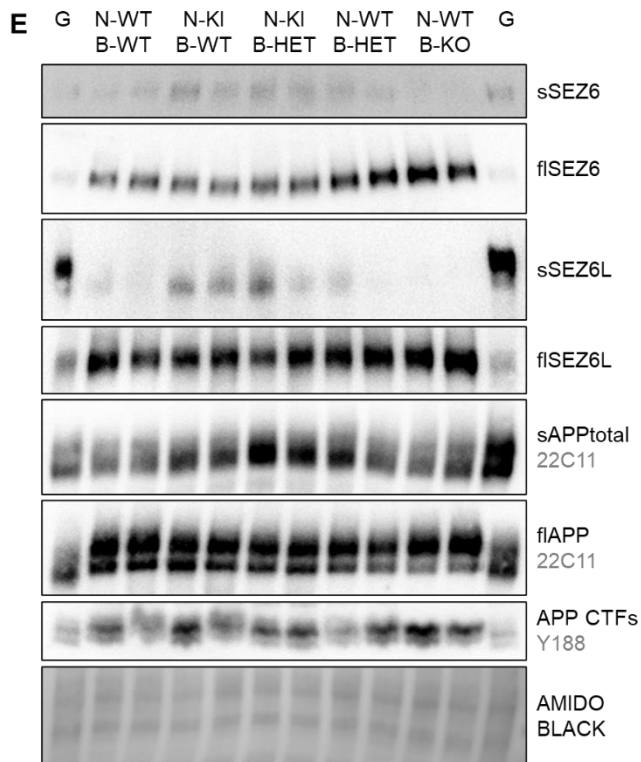
Analiza homogenata kore velikog mozga metodom WB pokazala je da je u jedinki N-KI B-KO i N-WT B-KO smanjena razina cijepanja svih ispitivanih supstrata u odnosu na jedinke divljeg tipa u svim ispitivanim dobnim skupinama (**Slika 37 A-L**), što je u skladu s genotipom: jedinke B-KO ne sadrže gen *BACE1*, odnosno enzim BACE1. U usporedbi s jedinkama divljeg tipa, jedinke N-KI B-WT pokazuju povišenu razinu cijepanja svih ispitivanih supstrata u dobi od četiri tjedna (**Slika 37 A-D**) te povišenu razinu cijepanja proteina SEZ6 i SEZ6L u dobi od 9 (**Slika 37 E-H**) i 15 tjedana (**Slika 37 I-L**). U svim ispitivanim dobnim skupinama, razina cijepanja svih ispitivanih supstrata snižena je u jedinki N-KI B-HET u odnosu na jedinke N-KI B-WT (**Slika 37 A-L**). Razina cijepanja pritom varira u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od četiri (**Slika 37 A-D**) i 9 tjedana ovisno o supstratu (**Slika 37 E-H**), ali je u dobi od 15 tjedana snižena za sve ispitivane supstrate (**Slika 37 I-L**). U dobi od četiri tjedna, razina odsječaka APP CTFs u jedinki N-KI B-HET značajno je povišena u odnosu na jedinke N-KI B-WT, kao i na jedinke divljeg tipa (**Slika 37 A, D**). U dobi od 9 tjedana nije zabilježena razlika između jedinki N-WT B-WT, N-KI B-WT i N-KI B-HET (**Slika 37 E, H**), dok u dobi od 15 tjedana nije zabilježena razlika u razini odsječaka APP CTFs između jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET, ali je u obje skupine značajno povišena u odnosu na jedinke divljeg tipa (**Slika 37 I, L**).



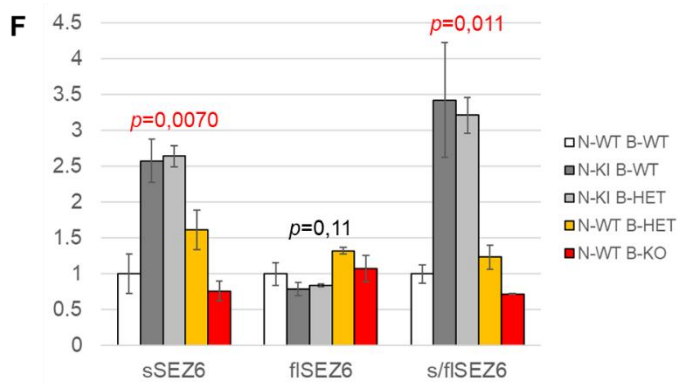




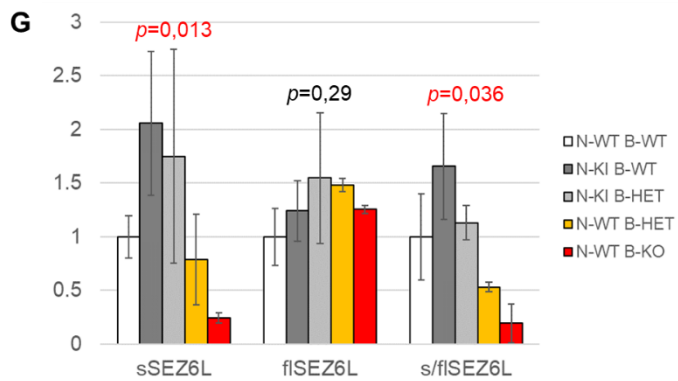
kora velikog mozga, 4 tjedna



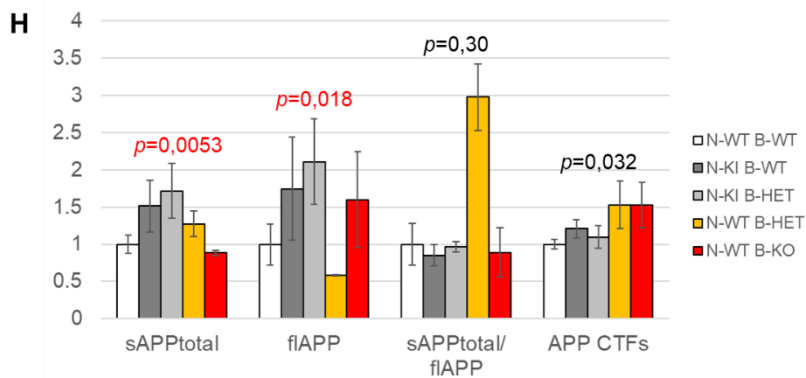
kora velikog mozga, 9 tjedana



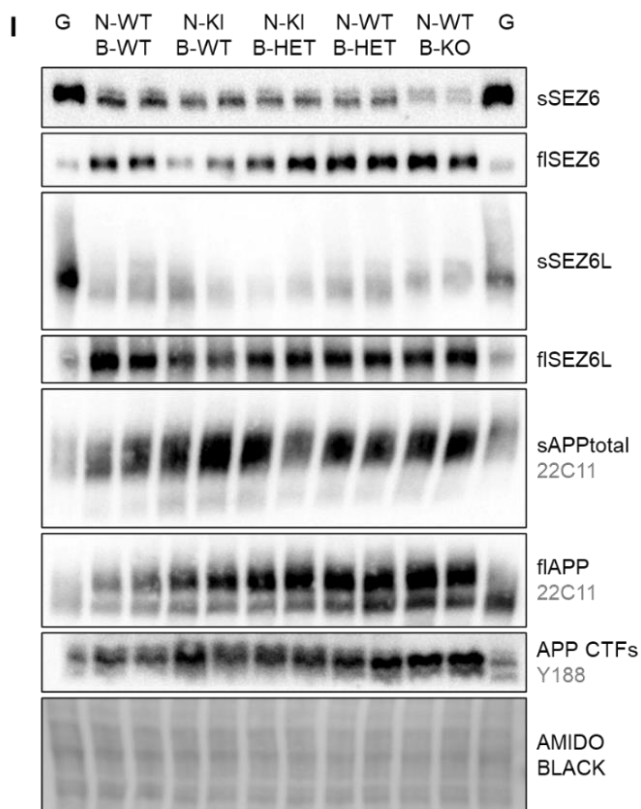
kora velikog mozga, 9 tjedana

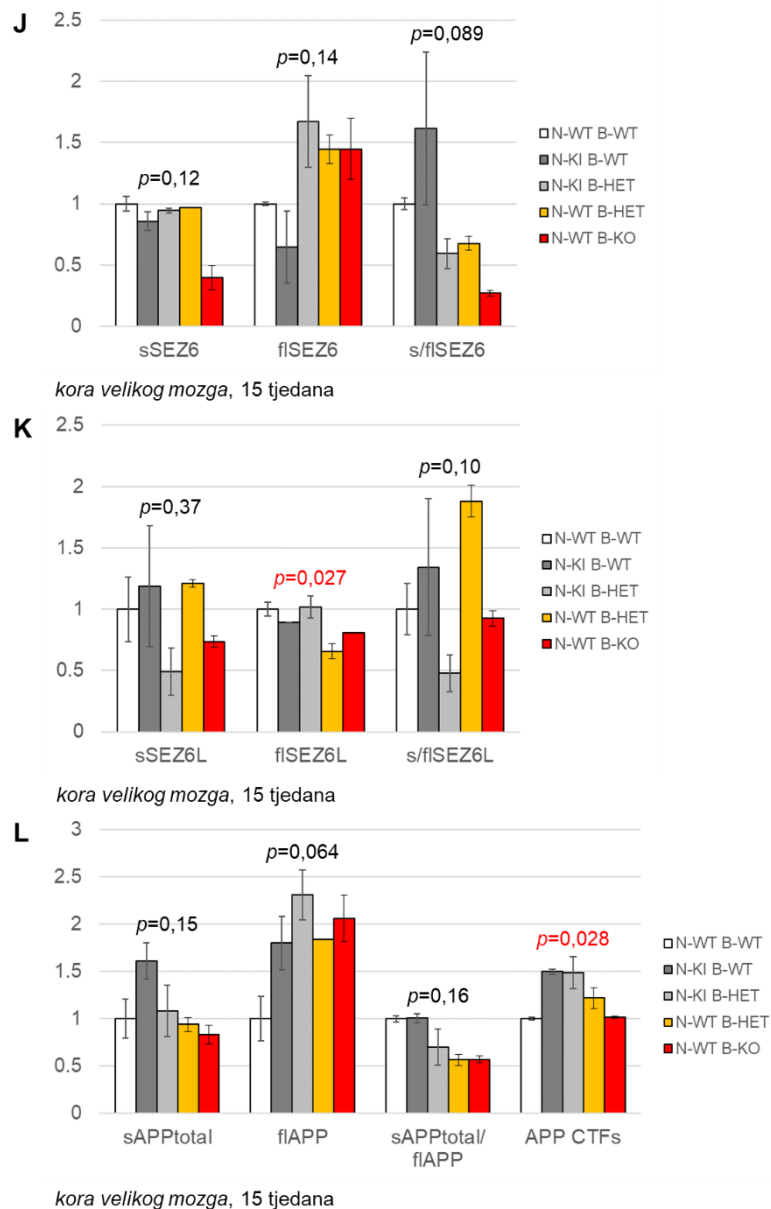


kora velikog mozga, 9 tjedana



kora velikog mozga, 9 tjedana





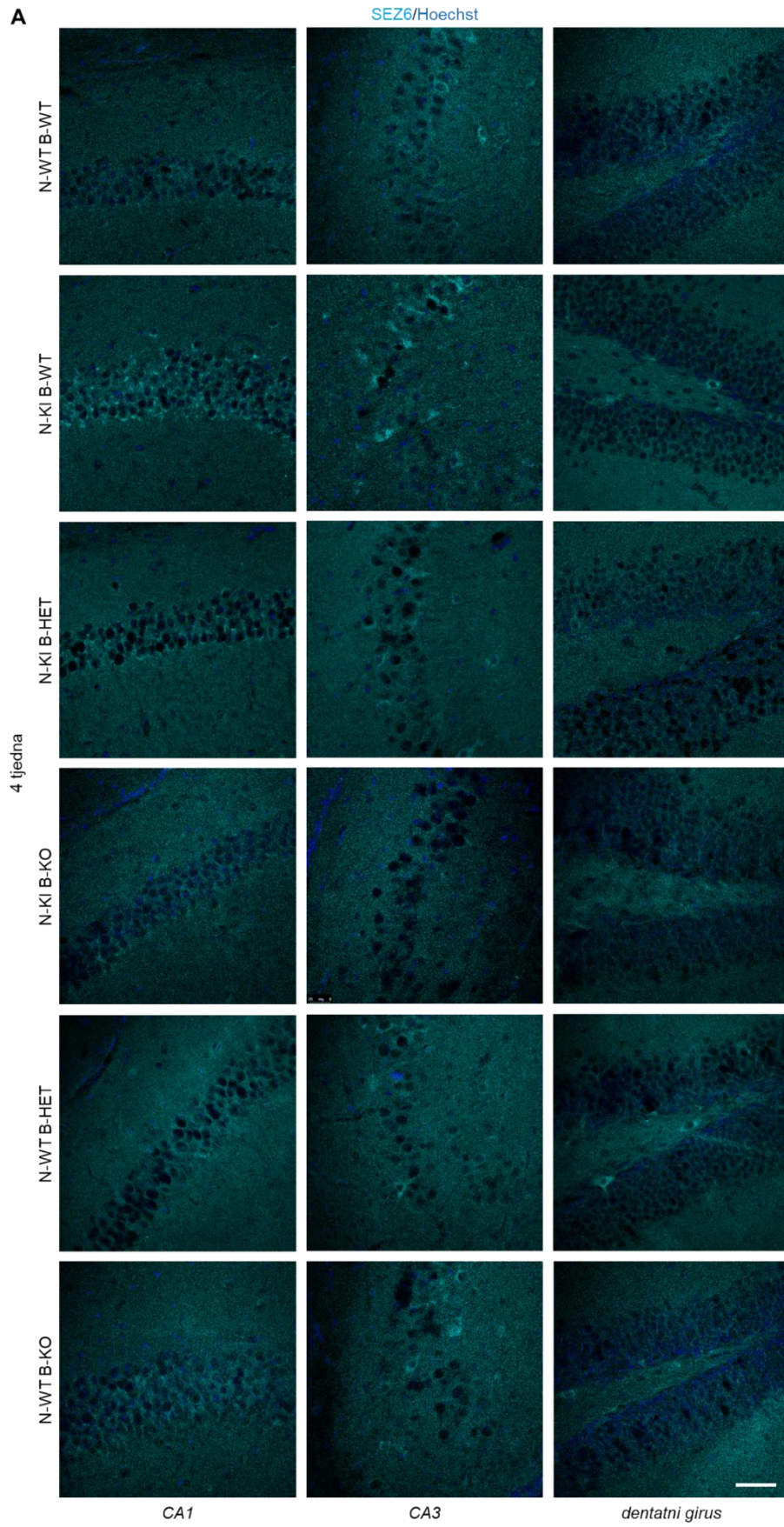
**Slika 37. Analiza proteolitičkog cijepanja supstrata enzima BACE1 u kori velikog mozga miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*. Analiza razine proteina SEZ6, SEZ6L i APP metodom WB u kori velikog mozga miševa u dobi od četiri (A), 9 (E) i 15 tjedana (I). sSEZ6 – topivi N-terminalni odsječak proteina SEZ6, flSEZ6 – cjeloviti protein SEZ6, sSEZ6L – topivi N-terminalni odsječak proteina SEZ6L, flSEZ6L – cjeloviti protein SEZ6L, sAPPTotal – ukupni topivi N-terminalni odsječci proteina APP, flAPP – cjeloviti protein APP, APP CTFs – C-terminalni odsječci proteina APP. Kvantitativni prikaz razine supstrata SEZ6 (B), SEZ6L (C) i APP (D) u kori velikog mozga miševa u dobi od četiri tjedna. Kvantitativni prikaz razine supstrata SEZ6 (F), SEZ6L (G) i APP (H) u kori velikog mozga miševa u dobi od 9 tjedana. Kvantitativni prikaz razine supstrata SEZ6 (J), SEZ6L (K) i APP (L) u kori velikog mozga miševa u dobi od 15 tjedana. Na grafovima su prikazane *p* vrijednosti dobivene ukupnom statističkom analizom, dok je *post-hoc* analiza, odnosno usporedba srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina prikazana u **Privtcima 16-25**.**

Imunohistokemijskom analizom hipokampusa miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1* nije uočena značajna razlika u intenzitetu i raspodjeli biljega proteina SEZ6 između jedinki divljeg tipa i dodatnih kontrola (N-WT B-HET i N-WT B-KO; **Slika 38 A-C**). U svim ispitivanim dobnim skupinama zabilježeno je nakupljanje proteina SEZ6 u somi neurona jedinki N-KI B-WT u odnosu na jedinke divljeg tipa (**Slika 38 A-C**), što je posebno izraženo u regijama *CA1* i *CA3* hipokampusa u dobi od četiri (**Slika 38 A**) i 9 tjedana (**Slika 38 B**), te u regiji *CA1* hipokampusa u dobi od 15 tjedana (**Slika 38 C**). Nakupljanje ovog supstrata u jedinki N-KI B-HET smanjeno je u odnosu na jedinke N-KI B-WT (**Slika 38 A-C**) u svim ispitivanim dobnim skupinama. Pritom je razina biljega SEZ6 u jedinki N-KI B-HET u regiji *CA1* hipokampusa slična razini u jedinki divljeg tipa, dok je u regiji *CA3* hipokampusa u dobi od 9 tjedana povišena u odnosu na jedinke divljeg tipa. U dobi od četiri tjedna, u jedinki N-KI B-KO nije zabilježena razlika u nakupljanju proteina SEZ6 u odnosu na jedinke divljeg tipa (**Slika 38 A**).

Imunohistokemijska analiza proteina SEZ6L pokazala je povišeni intenzitet signala, odnosno nakupljanje ovog supstrata u somi hipokampalnih neurona jedinki N-KI B-WT u odnosu na jedinke divljeg tipa u svim ispitivanim dobnim skupinama (**Slika 38 D-F**). Vrlo visok intenzitet bojanja, odnosno nakupljanje proteina SEZ6L uočeno je i u jedinki N-KI B-KO u dobi od četiri tjedna u svim ispitivanim regijama hipokampusa (**Slika 38 A**). Nakupljanje proteina SEZ6L u jedinki N-KI B-HET sniženo je u odnosu na jedinke N-KI B-WT, ali i dalje povišeno u odnosu na jedinke divljeg tipa, i to u svim ispitivanim regijama hipokampusa, kao i u svim dobnim skupinama (**Slika 38 D-F**).

Istovjetne rezultate dala je i imunohistokemijska analiza proteina APP (**Slika 38 G-I**): u odnosu na jedinke divljeg tipa, u svim ispitivanim dobnim skupinama i regijama hipokampusa, jedinke N-KI B-WT pokazuju povećani intenzitet bojanja proteina APP i njegovo nakupljanje u somi hipokampalnih neurona. Razina nakupljanja proteina APP u jedinki N-KI B-HET snižena je u odnosu na jedinke N-KI B-WT. Pritom je intenzitet signala u regiji *CA1* hipokampusa sukladan razini jedinki divljeg tipa, dok je povišen u regiji *CA3* hipokampusa. Međutim, kao i u kori velikog mozga, razina proteina APP značajno je snižena u jedinki N-KI B-KO u dobi od četiri tjedna (**Slika 38 G**), ali je izraženo nakupljanje ovog supstrata u somi hipokampalnih neurona, posebno u regiji *CA3* hipokampusa.

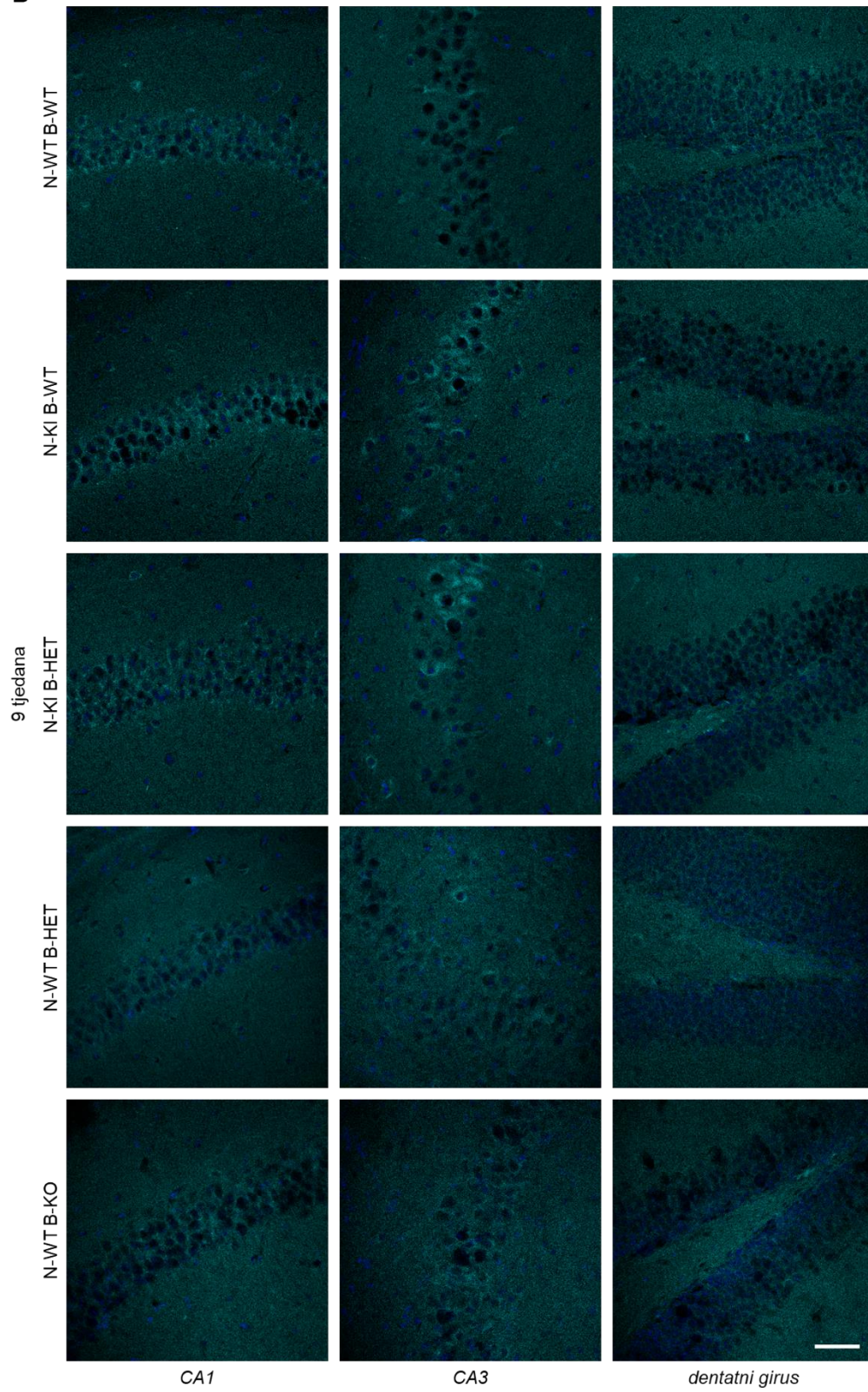






**B**

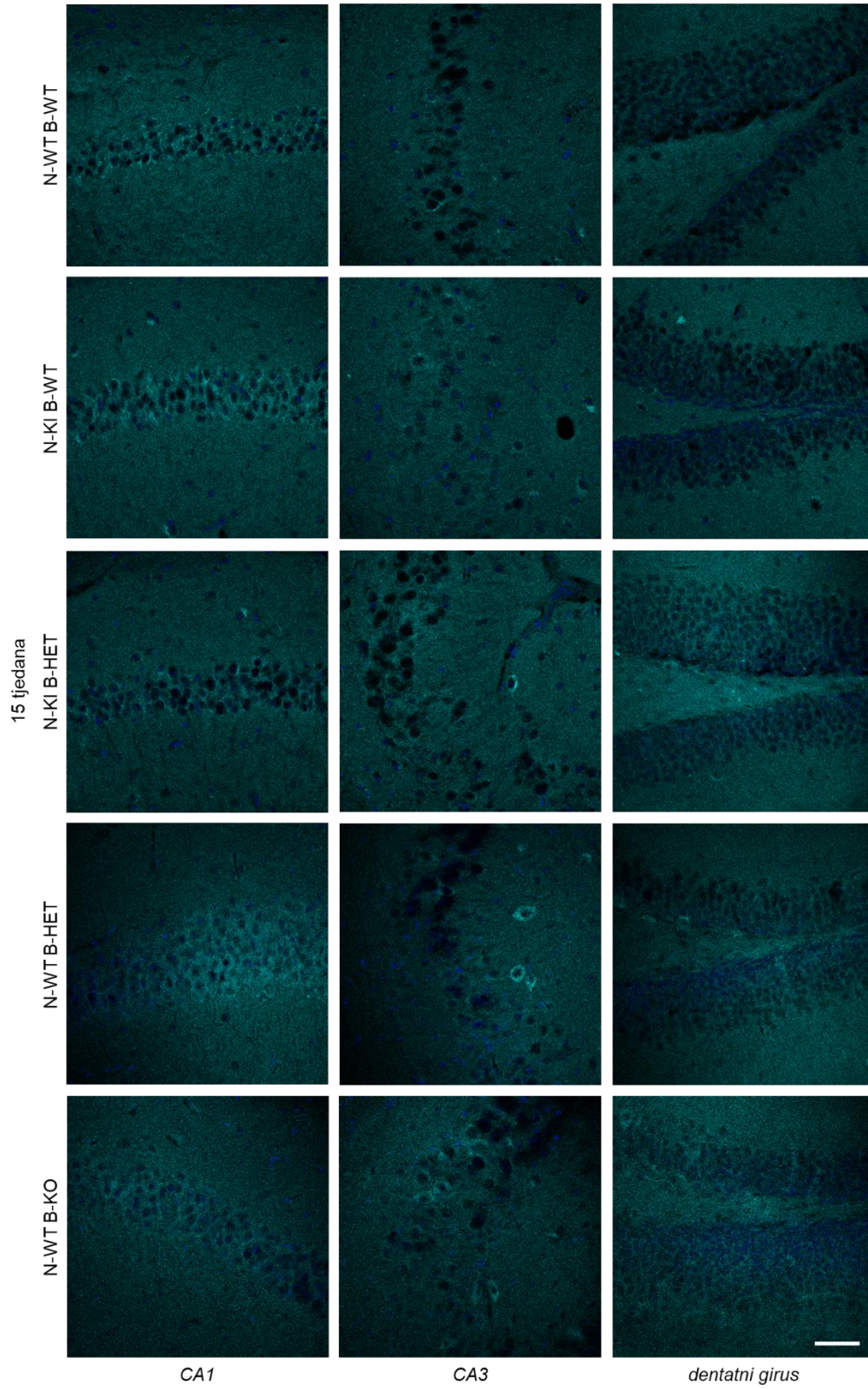
SEZ6/Hoechst

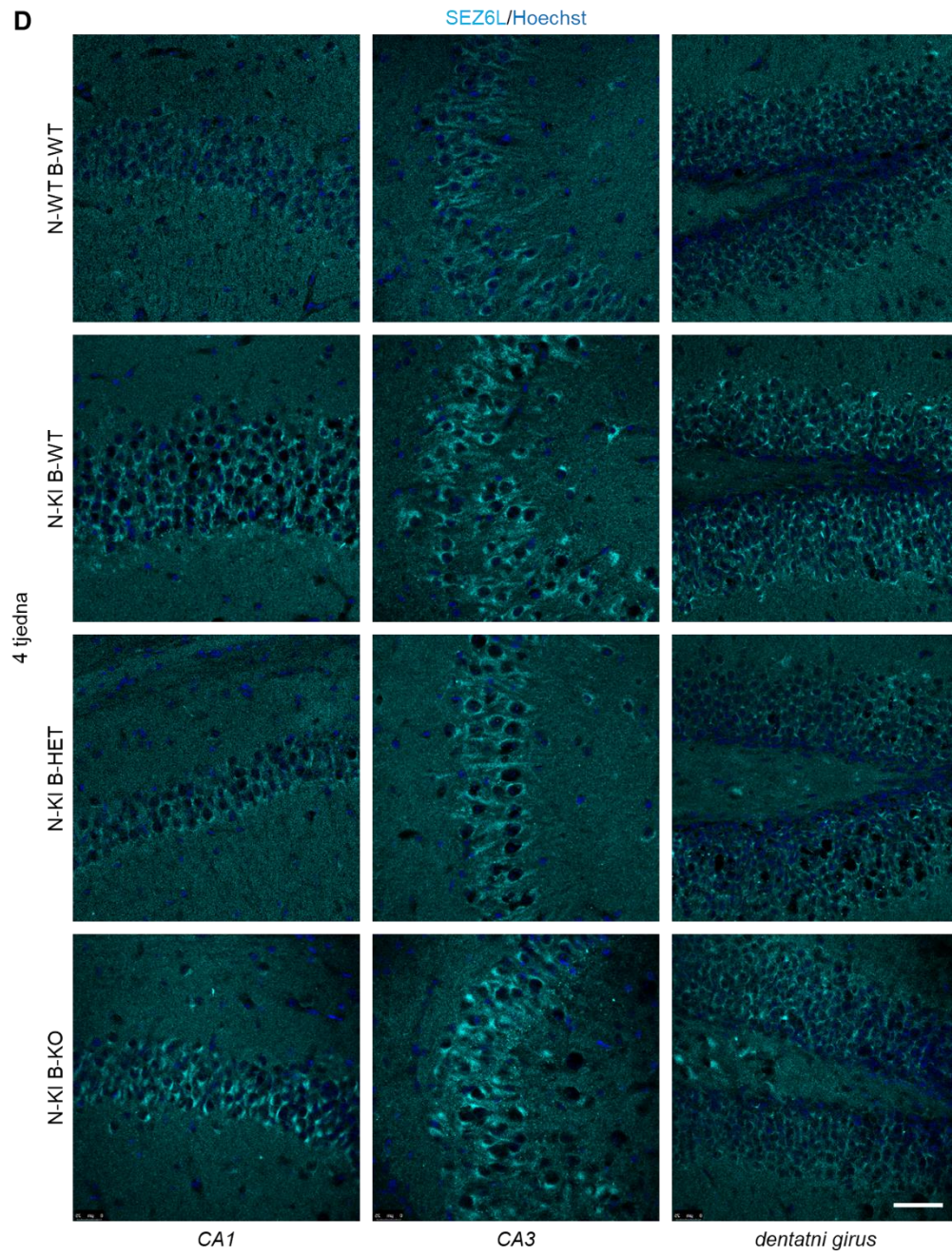




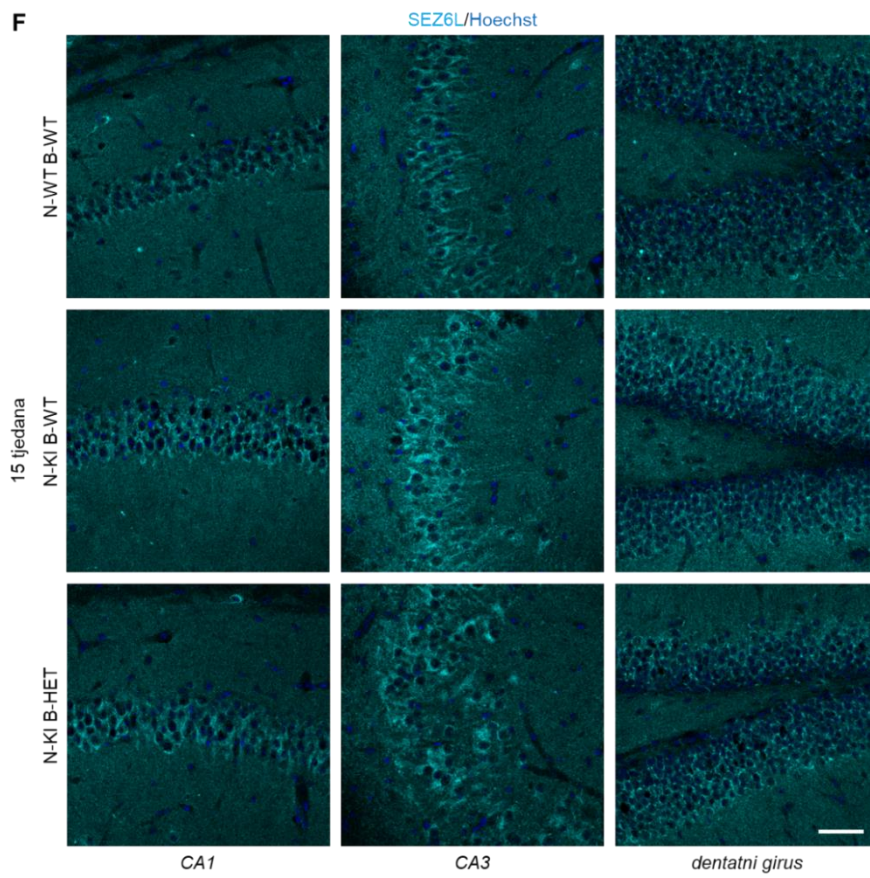
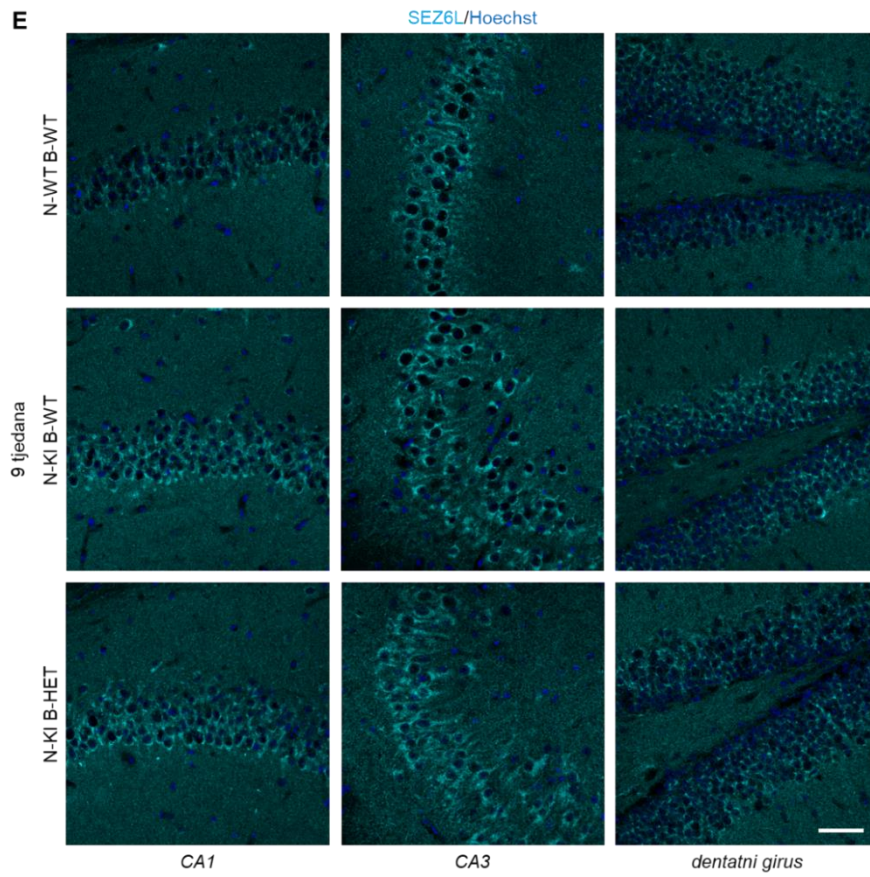
**C**

SEZ6/Hoechst

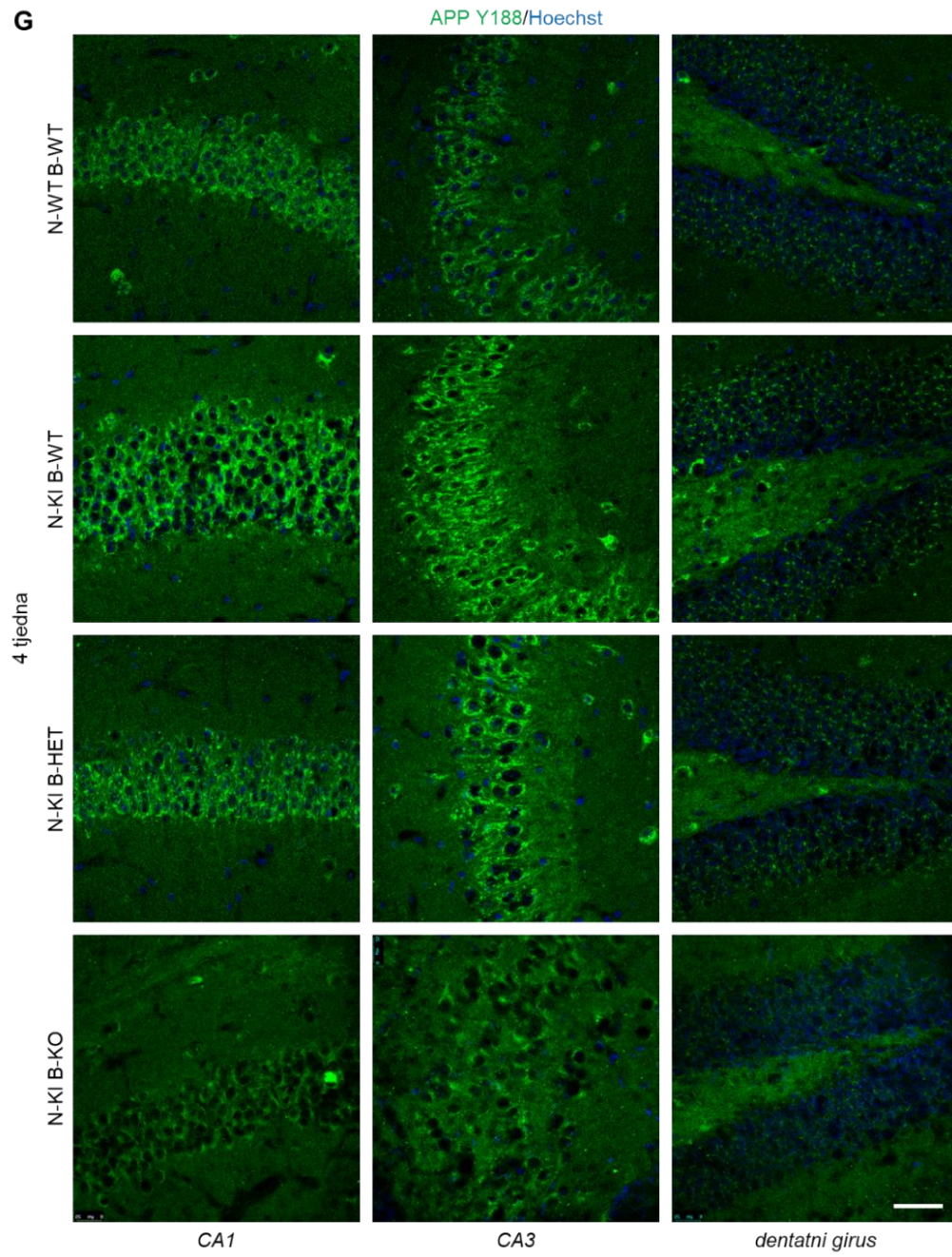


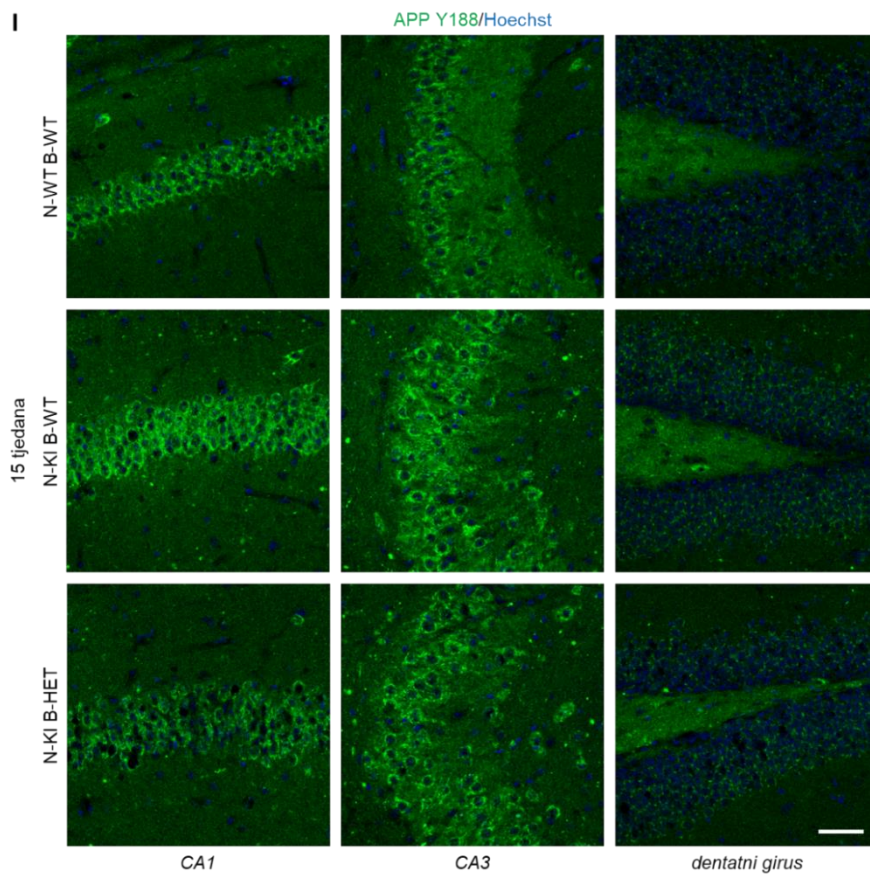
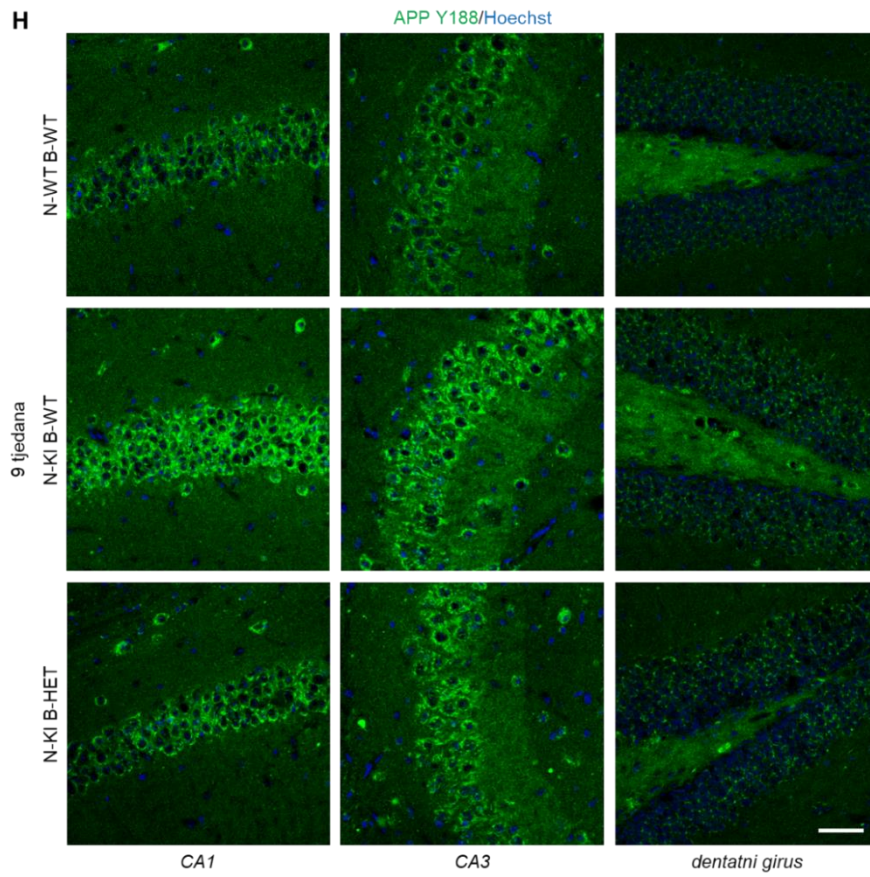








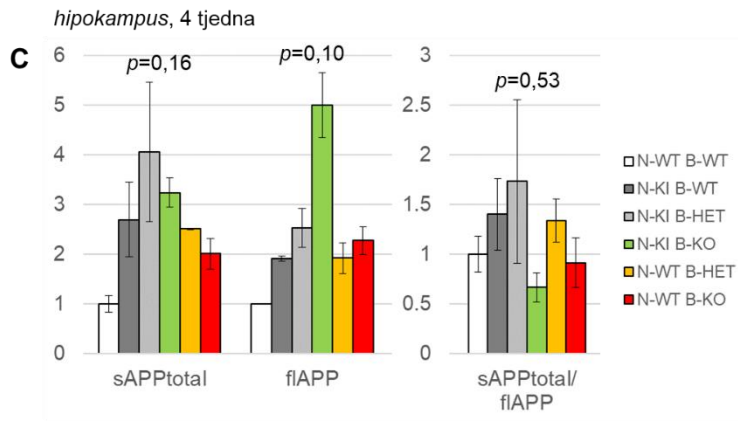
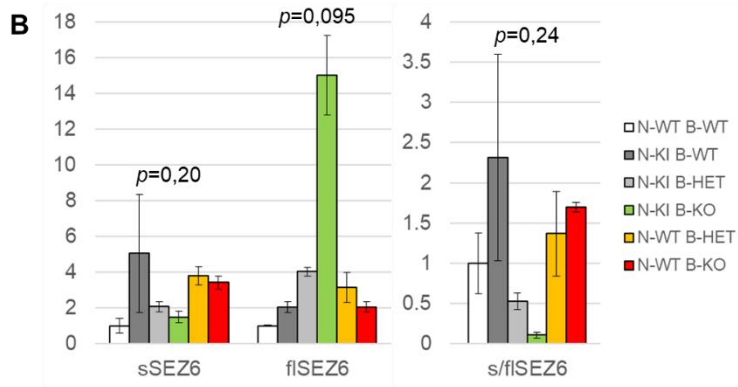
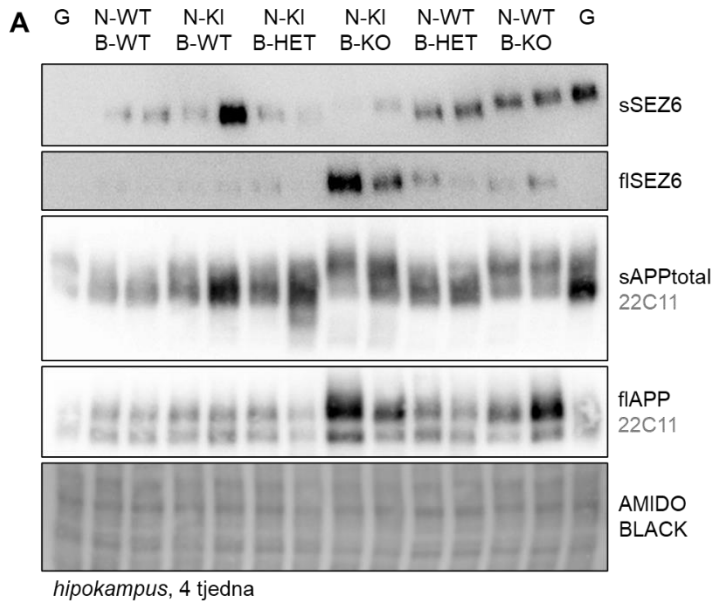


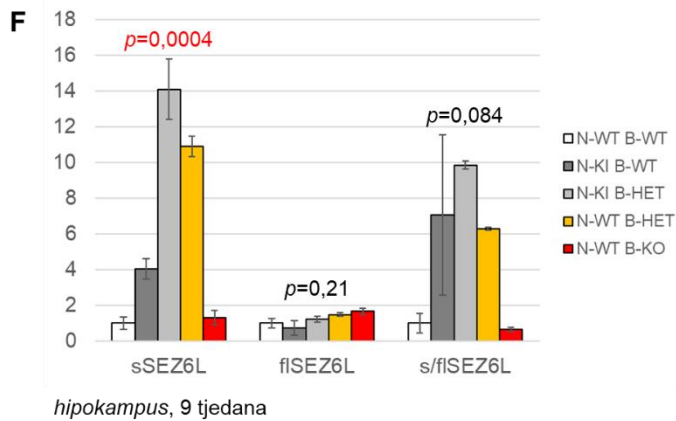
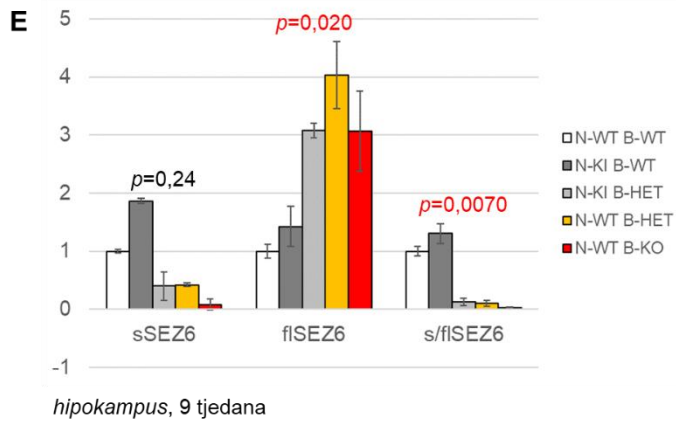
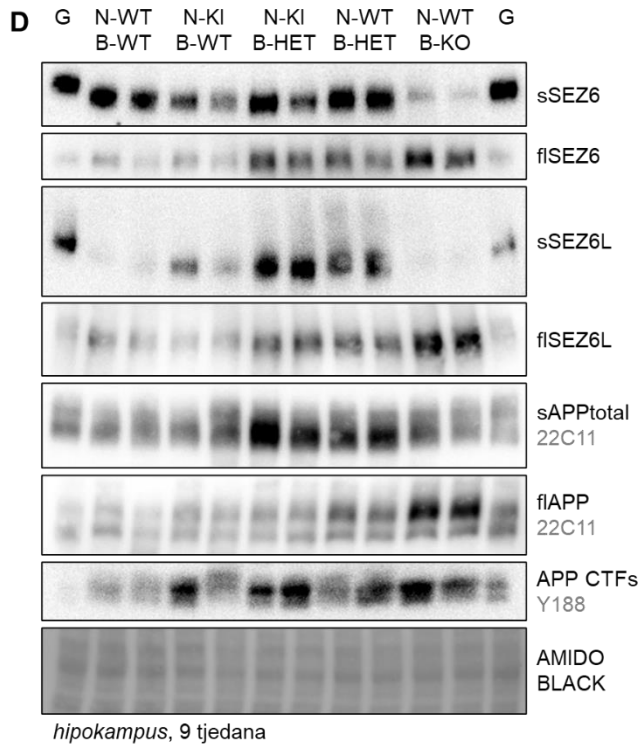


◀ **Slika 38. Analiza raspodjele supstrata enzima BACE1 u hipokampusu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.** Imunohistokemijska analiza supstrata SEZ6 u hipokampusu miševa u dobi od četiri (A), 9 (B) i 15 tjedana (C). Imunohistokemijska analiza supstrata SEZ6L u hipokampusu miševa u dobi od četiri (D), 9 (E) i 15 tjedana (F). Imunohistokemijska analiza supstrata APP u hipokampusu miševa u dobi od četiri (G), 9 (H) i 15 tjedana (I). Jezgre su obojene bojom za nukleinske kiseline Hoechst (plavo). SEZ6 (tirkizno) – protein SEZ6, SEZ6L (tirkizno) – protein SEZ6L, APP Y188 (zeleno) – protein APP. Skala 50 µm.

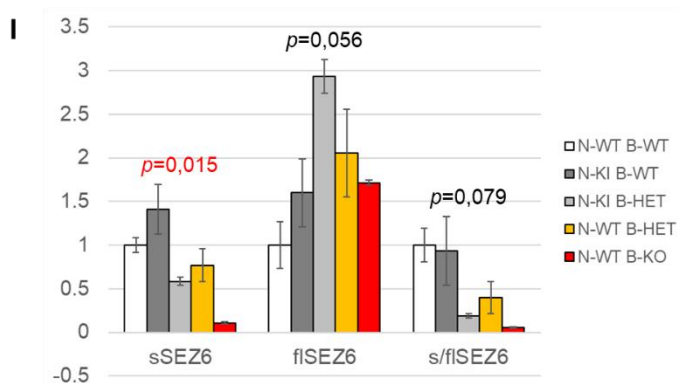
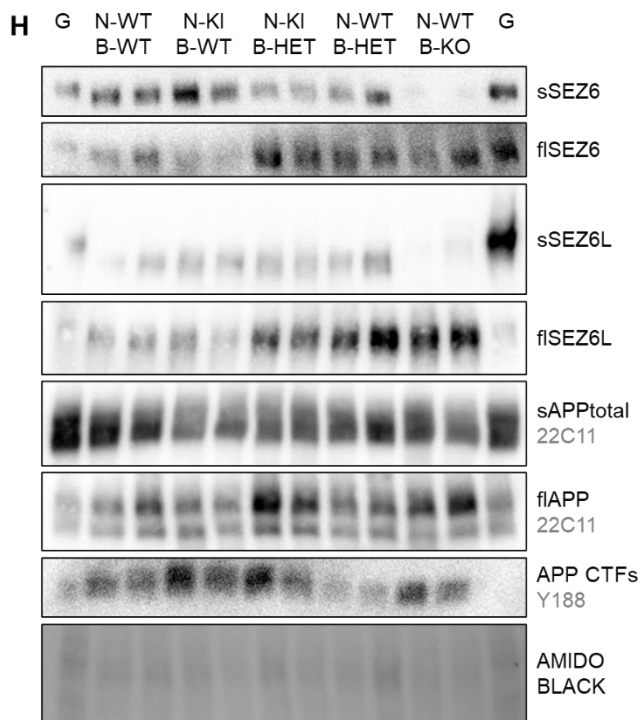
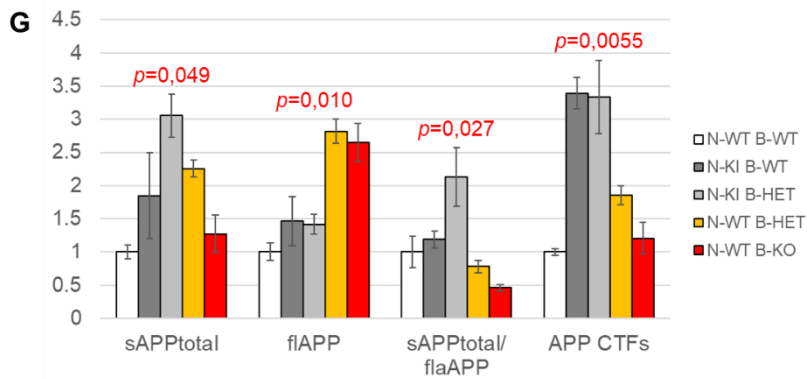
Analiza homogenata hipokampusu metodom WB pokazala je da je u jedinki N-KI B-KO smanjena razina cijepanja svih ispitivanih supstrata u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od četiri tjedna (Slika 39 A-C). Zanimljivo, u dobi od četiri tjedna, u jedinki N-WT B-KO razina cijepanja proteina SEZ6 povišena je (Slika 39 A, B), a razina cijepanja proteina APP jednaka u odnosu na razinu zabilježenu u jedinki divljeg tipa (Slika 39 A, C). U kasnijoj dobi, s navršenih 9 (Slika 39 D-G) ili 15 tjedana (Slika 39 H-K), razina cijepanja svih analiziranih supstrata snižena je u jedinki N-WT B-KO u odnosu na jedinke divljeg tipa. Smanjeno cijepanje supstrata enzima BACE1 u miševa s deletiranim genom *BACE1* (N-WT B-KO i N-KI B-KO) u skladu je s nedostatkom enzima BACE1 u ovih jedinki. Razina cijepanja svih ispitivanih supstrata povišena je u jedinki N-KI B-WT u odnosu na jedinke divljeg tipa u svim ispitivanim dobnim skupinama (Slika 39 A-K), izuzev razina cijepanja proteina APP u dobi od 15 tjedana kada nije zabilježena razlika (Slika 39 H, K). U hipokampusu jedinki N-KI B-HET uočena je varijabilnost u razini cijepanja ovisno o supstratu (Slika 39 A-K). U svim analiziranim dobnim skupinama, razina cijepanja proteina SEZ6 u hipokampusu jedinki N-KI B-HET snižena je u odnosu na jedinke N-KI B-WT, ali i u odnosu na jedinke divljeg tipa (Slika 39 A, C-E, H, I). Razina cijepanja proteina SEZ6L povišena je u jedinki N-KI B-HET u odnosu na jedinke N-KI B-WT, ali i u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od 9 tjedana (Slika 39 D, F), dok je u dobi od 15 tjedana niža u odnosu na jedinke N-KI B-WT, te slična razini cijepanja u jedinki divljeg tipa (Slika 39 H, J). Razina cijepanja proteina APP, tj. razina N-terminalnih odsječaka proteina APP, povišena je u jedinki N-KI B-HET u odnosu na jedinke N-KI B-WT, ali i u odnosu na jedinke divljeg tipa u svim ispitivanim dobnim skupinama (Slika 39 A, C, D, G, H, K). Razina odsječaka APP CTFs značajno je povišena u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET u odnosu na jedinke divljeg tipa u dobi od 9 (Slika 39 D, G) i 15 tjedana (Slika 39 H, K). Pritom nije zabilježena razlika između ove dvije skupine u dobi od 9 tjedana (Slika 39 D, G), dok je razina odsječaka APP CTFs značajno povišena u jedinki N-KI B-HET u odnosu na jedinke N-KI B-WT u dobi od 15 tjedana (Slika 39 H, K).

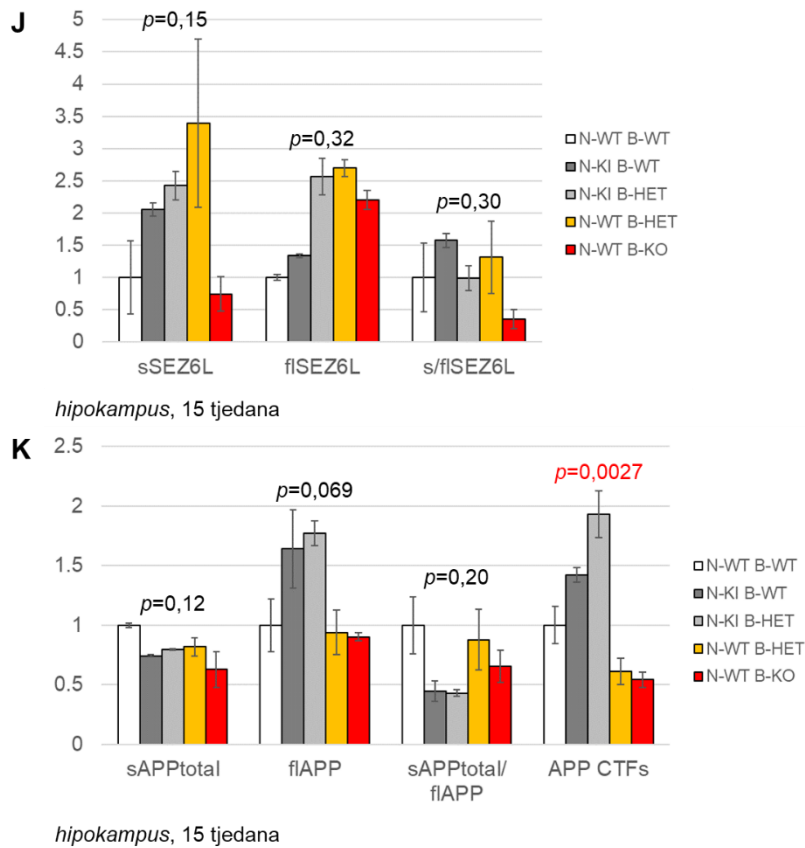












**Slika 39. Analiza proteolitičkog cijepanja supstrata enzima BACE1 u hipokampusu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*. Analiza razine proteina SEZ6, SEZ6L i APP metodom WB u hipokampusu miševa u dobi od četiri (A), 9 (D) i 15 tjedana (H). sSEZ6 – topivi N-terminalni odsječak proteina SEZ6, flSEZ6 – cjeloviti protein SEZ6, sSEZ6L – topivi N-terminalni odsječak proteina SEZ6L, flSEZ6L – cjeloviti protein SEZ6L, sAPPtotal – ukupni topivi N-terminalni odsječci proteina APP, flAPP – cjeloviti protein APP, APP CTFs – C-terminalni odsječci proteina APP. Kvantitativni prikaz razine supstrata SEZ6 (B) i APP (C) u hipokampusu miševa u dobi od četiri tjedna. Kvantitativni prikaz razine supstrata SEZ6 (E), SEZ6L (F) i APP (G) u hipokampusu miševa u dobi od 9 tjedana. Kvantitativni prikaz razine supstrata SEZ6 (I), SEZ6L (J) i APP (K) u hipokampusu miševa u dobi od 15 tjedana. Na grafovima su prikazane *p* vrijednosti dobivene ukupnom statističkom analizom, dok je *post-hoc* analiza, odnosno usporedba srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina prikazana u **Privtcima 16-25**.**

## 5. RASPRAVA

Prethodna istraživanja Laboratorija za istraživanje neurodegenerativnih bolesti pokazala su da molekularni mehanizam sličan fenotipu AB, tj. povećana razina peptida amiloida- $\beta$  koji se karakteristično nakuplja u mozgu pacijenata oboljelih od AB, kao i u nekih pacijenata oboljelih od bolesti NPC, uključuje povećano cijepanje proteina APP enzimom BACE1 (enzimom ključnim u patogenezi AB) uslijed promijenjenog prijenosa u endolizosomalnom putu, odnosno uslijed nakupljanja enzima BACE1 i njegovih supstrata u ranim endosomima. Istraživanje u sklopu ovog doktorskog rada stoga je usmjereno na ispitivanje uloge enzima BACE1 u patogenezi bolesti NPC. Točnije, cilj ovog doktorskog rada bio je ispitati učinak genetičkog moduliranja razine enzima BACE1 (odnosno delecije jednog ili oba alela gena *BACE1*) na neuropatološke značajke mišjeg modela bolesti NPC s najčešćom mutacijom u ljudi, *knock-in NPC1-I1061T*. S obzirom da je enzim BACE1 farmakološka meta za razvoj potencijalnih terapija za AB, rezultati ovog istraživanja bi mogli ukazati na potencijalnu korist terapeutika usmjerenih na enzim BACE1 u usporavanju progresije i/ili liječenju bolesti NPC.

### 5.1. Odabir mišjeg modela *knock-in NPC1-I1061T*

U ovom doktorskome radu korištena su dva mišja modela, linija *NPC1-I1061T* (soj B6.129-*Npc1*<sup>tm1Dso/J</sup>) te linija *BACE1* (soj B6.129-*Bace1*<sup>tm1Pcw/J</sup>). Novi mišji model *knock-in NPC1-I1061T* izabran je prvenstveno zbog iste genetičke podloge koju ima soj *BACE1*, kako bi se izbjegle dodatne genetičke promjene nastale uslijed križanja ova dva soja.

Međutim, model *knock-in NPC1-I1061T* ima još dvije prednosti u kontekstu ovog istraživanja. Dosad je zabilježeno više od 500 različitih mutacija u genu *NPC1* [1] što uvelike doprinosi varijabilnosti kliničke slike pacijenata. Varijabilnost fenotipa bolesti NPC (i u ljudi i u mišjih modela) pripisuje se nizu čimbenika, uključujući genetičku podlogu bolesti (mutaciju, ali i soj mišjih modela), spol, razinu funkcionalnog proteina NPC1, epigenetičke i okolišne čimbenike te mikrobiom [1, 187, 188]. Heterogenost je vidljiva i u pacijenata iz istih obitelji (dakle u pacijenata s istim mutacijama), kao i u mišjim modelima homozigotima [75]. Mutacija *NPC1-I1061T* najčešća je u ljudi (oko 20% ispitanih alela) [1, 78], stoga rezultati dobiveni ispitivanjem mišjeg modela *knock-in NPC1-I1061T* mogu biti relevantniji u kontekstu translacije novih saznanja, npr. u odnosu na dosad najčešće korišteni mišji model BALB/c *NPC1*<sup>-/-</sup> (soj BALB/cNctr-*Npc1*<sup>m1N/J</sup>) koji nosi spontanu mutaciju i pokazuje potpuni nedostatak proteina NPC1.

Također, bolest NPC je vrlo progresivna (kako u ljudi, tako i u životinjskih modela), što dodatno ukazuje na važnost rane dijagnoze i/ili pravovremene farmakološke intervencije. Spomenuti najčešće korišteni mišji model u istraživanjima bolesti NPC, model BALB/c *NPC1*<sup>-/-</sup>, predstavlja model progresivnog ranog dječjeg oblika bolesti NPC: u miševa

*NPCI*<sup>-/-</sup> prvi simptomi vidljivi su u dobi od 7 tjedana, a ugibaju već u dobi između 10 i 12 tjedana [181]. Za razliku od modela *NPCI*<sup>-/-</sup>, model *knock-in NPCI*-I1061T, zbog djelomično funkcionalnog proteina NPCI-I1061T [85], pokazuje usporenu progresiju bolesti, odnosno ima produljeni životni vijek. Prvi simptomi vidljivi su u dobi od 9 tjedana (dva tjedna kasnije u odnosu na miševe *NPCI*<sup>-/-</sup>), a ugibaju u dobi od 18 tjedana (šest-8 tjedana kasnije u odnosu na miševe *NPCI*<sup>-/-</sup>). Slična, usporena progresija opisana je i u modelu C57BL/6 *Npc1*<sup>nmf164</sup> [37]. Upravo zbog usporene progresije patoloških značajki bolesti NPC, u modelu *knock-in NPCI*-I1061T korištenom u ovom doktorskom radu moguće je ispitati utjecaj farmakološke ili genetičke intervencije, u ovom slučaju utjecaj genetičkog moduliranja razine enzima BACE1, na progresiju bolesti NPC.

## 5.2. Validacija mišjeg modela *knock-in NPCI*-I1061T

Prvi eksperimentalni korak u ovom doktorskom radu bio je uspostaviti liniju miševa *NPCI*-I1061T i liniju miševa *BACE1* u PLŽ-u IRB-a, a zatim u miševa *NPCI*-I1061T potvrditi prisutnost karakterističnih neuropatoloških značajki bolesti NPC [85] s ciljem validacije ovog mišjeg modela. Na temelju dobivenih rezultata, odabrane su neuropatološke značajke koje su kasnije praćene u generiranom novom modelu *knock-in NPCI*-I1061T s deletiranim jednim ili oba alela gena *BACE1* (poglavlje 5.3.). Ispitana je neurodegeneracija Purkinjeovih neurona, nakupljanje endosomalnih i lizosomalnih vezikula, neuroinflamacija (aktivacija astrocita i mikroglia) te hiperfosforilacija proteina tau. Za određivanje proteolize enzimom BACE1, ispitana je razina cijepanja tri supstrata ovog enzima, proteina APP (koji je uključen u patogenezu bolesti NPC i AB) [99, 177] te proteina SEZ6 i SEZ6L (supstrata koji se cijepaju isključivo enzimom BACE1) [164].

Na temelju dosadašnjih saznanja o tijeku neuropatoloških promjena u mišjem modelu *knock-in NPCI*-I1061T [85], za istraživanje su odabrane tri dobne skupine, miševi starosti četiri, 9 i 15 tjedana. Ove vremenske točke predstavljaju tri faze bolesti: asimptomatsku fazu bolesti (četiri tjedna), kada miševi *knock-in NPCI*-I1061T (N-KI) ne pokazuju fenotip, simptomatsku fazu bolesti (9 tjedana), kada počinje biti vidljiv tremor i gubitak tjelesne mase, tj. fenotip karakterističan za bolest NPC, i završnu fazu bolesti (15 tjedana), kada miševi imaju vrlo progresivan fenotip koji može otežavati normalne životne funkcije. Na razini tkiva, očekivano je da neuropatološke značajke prate isti obrazac pojavljivanja (da su odsutne u dobi od četiri tjedna, a slabe, odnosno jake u dobi od 9, odnosno 15 tjedana). Međutim, novija istraživanja (uključujući i ovaj doktorski rad) ukazuju na začetak, odnosno prisutnost određenih neuropatoloških značajki (npr. neuroinflamacije) već u asimptomatskoj fazi bolesti, ali i ranije (u dobi od jednog ili dva tjedna) [50, 59, 62, 181].

S obzirom na različitu osjetljivost i/ili odgovor pojedinih regija mozga na patološke promjene, ispitivanje neuropatoloških značajki u mišjem modelu *knock-in NPCI*-I1061T provedeno je u tri regije mozga: malom mozgu, kori velikog mozga i hipokampusu. Mali mozak odabran je kao primarno zahvaćena regija u pacijenata i modela bolesti NPC, a

karakterizira ga pravocrtno, progresivno odumiranje Purkinjeovih neurona [31, 85]. U prilog osjetljivosti malog mozga idu intrinzična svojstva Purkinjeovih neurona koja ih čine posebno osjetljivima na gubitak proteina NPC1, odnosno nakupljanje kolesterola [32–35]. Također, razina proteina NPC1 u fiziološki zdravom mozgu mišjih modela najviša je upravo u malom mozgu, a njegov razvoj odvija se i postnatalno [36, 37]. Kora velikog mozga jedno je od mjesta nakupljanja amiloidnih plakova i NFTs, proteinskih agregata karakterističnih za AB [106]. Pacijenti oboljeli od bolesti NPC imaju NFTs, a samo neki difuzne nakupine/plakove peptida amiloida- $\beta$ . Ovi agregati nisu prisutni u mozgu mišjih modela, ali su u cijelom mozgu povišene razine njihovih komponenti, peptida amiloida- $\beta$  i hiperfosforiliranog proteina tau [27, 136]. Kora velikog mozga stoga je odabrana s ciljem ispitivanja prisutnosti drugih patoloških značajki karakterističnih za patogenezu bolesti NPC. Hipokampus (regija primarno pogođena u AB) isprva se smatrao „zaštićenom“ regijom u patogenezi bolesti NPC, jer pacijenti, kao ni različiti modeli bolesti, ne pokazuju značajke karakteristične za neurodegeneraciju u ovoj regiji. Međutim, novija istraživanja, uključujući ovaj doktorski rad i prethodna istraživanja Laboratorija za istraživanje neurodegenerativnih bolesti, pokazuju da hipokampus nije zaštićena regija, odnosno da se i u ovoj regiji javlja niz neuropatoloških promjena karakterističnih za bolest NPC (npr. nakupljanje kolesterola, poremećaj endolizosomalnog sustava, neurodegeneracija, neuroinflamacija, hiperfosforilacija proteina tau) [113, 114, 181, 189, 190]. Pretpostavlja se da je nedostatak fenotipskih patoloških promjena uobičajenih za hipokampalnu neurodegeneraciju posljedica nedostatka čimbenika starenja u pacijenata i mišjih modela bolesti NPC. Zaista, ekspresijom proteina NPC1 u neuronima i/ili astrocitima mišjih modela *NPC1*<sup>-/-</sup> moguće je ublažiti progresiju bolesti NPC i tako produljiti životni vijek miševa, a u ovim modelima smrt ne nastupa samo uslijed odumiranja Purkinjeovih neurona u malom mozgu, već je uzrokovana i neuropatoloških promjenama u drugim regijama [30, 44–46, 48, 57, 60, 61]. Također, Colombo i sur. smatraju da bi izostanak amiloidnih plakova u patogenezi bolesti NPC mogao biti povezan sa povećanom fagocitnom aktivnošću mikroglia uslijed nedostatka proteina NPC1, odnosno da bi povećano uklanjanje peptida amiloida- $\beta$  mikroglijama moglo kompenzirati povećanu produkciju peptida amiloida- $\beta$  [50], kao što je opisano i uslijed delecije gena *BACE1* u mikroglijama mišjeg modela AB (5 $\times$ FAD) [191].

Životni vijek miševa N-KI iznosio je 18 tjedana. S ciljem dobre laboratorijske prakse u radu s laboratorijskim životinjama, vremenska točka od 15 tjedana odabrana je kao krajnja točka za utvrđivanje progresije neuropatoloških značajki, te kao *humane endpoint* za ovaj mišji model. Gubitak tjelesne mase zabilježen u miševa N-KI u odnosu na miševu divljeg tipa pratio je očekivane promjene: u dobi nakon 10 tjedana, miševi N-KI progresivno gube tjelesnu masu, a razlika je značajna od 12. tjedna. Smatra se da je ovaj gubitak uzrokovan otežanom konzumacijom hrane i vode uslijed neurodegeneracije Purkinjeovih neurona koja uzrokuje poremećaj u motorici, odnosno tremor (koji se fenotipski javlja oko 8. tjedna). Međutim, novija istraživanja ukazuju da bi i patološke promjene u asimptomatskoj fazi (poput neuroinflamacije) mogle prethoditi gubitku



tjelesne mase i tremoru, tako što doprinose neurodegeneraciji i/ili djeluju na enterički sustav [48]. Tijekom praćenja tjelesne mase miševa N-KI, zabilježen je pad u krivulji u dobi od 9 tjedana, uzrokovan smanjenjem broja jedinki u ispitivanoj skupini (uslijed žrtvovanja jedinki za ovu dobnu skupinu). Također, dio jedinki N-KI ugiba u ranijoj dobi, vjerojatno uslijed dodatne varijabilnosti uzrokovane epigenetičkim ili okolišnim čimbenicima [1, 187, 188].

Karakteristika bolesti NPC je gubitak funkcije proteina NPC1 (ili u 5% slučajeva gubitak funkcije proteina NPC2) uzrokovane mutacijom u genu koji ga kodira. U mišjem modelu *knock-in NPC1-I1061T*, mutantni protein NPC1-I1061T djelomično je funkcionalan [85]. Mali udio ovog pogrešno smotanog proteina uspijeva proći kontrolu i razgradnju u ER, nakon čega se ispravno smješta u kasnim endosomima i lizosomima, te u smanjenom obujmu vrši svoju funkciju u prijenosu kolesterola [28]. Sukladno literaturi [85], u mozgu jedinki N-KI zabilježena je značajno snižena razina proteina NPC1-I1061T, a iznosi oko 20-40% razine ovog proteina u jedinki divljeg tipa. Uočena varijabilnost razine proteina NPC1 u različitim regijama ili dobnim skupinama pritom može biti posljedica osjetljivosti metode WB, ali potencijalno i posljedica genetičke varijabilnosti uslijed križanja dva soja ili starenja linije [1]. Također, ekspresija proteina NPC1 različita je unutar pojedinih regija mozga, ovisno o vrsti, modelu i soju. Na primjer, u miševa BALB/c *NPC1<sup>-/-</sup>* razina proteina NPC1 najviša je u malom mozgu i mostu moždanog debla, dok je u malom mozgu majmuna i ljudi snižena u odnosu na koru velikog mozga i hipokampus [36, 47, 100, 192].

U podlozi patogeneze bolesti NPC je nakupljanje slobodnog, neesterificiranog kolesterola i drugih lipida (sfingomijelina, glikosfingolipida) u kasnim endosomima i lizosomima uslijed nedostatka ili smanjene razine prijenosnika kolesterola, proteina NPC1 (ili proteina NPC2), u ovim vezikulama [4, 5]. Nakupljanje kolesterola u jedinki N-KI u odnosu na jedinke divljeg tipa potvrđeno je imunohistokemijskom analizom, odnosno bojanjem kriorezova mozгова filipinom, u završnoj fazi bolesti, te u svim ispitivanim regijama mozga (malom mozgu, kori velikog mozga i hipokampusu). Ova značajka u nekih je modela bolesti NPC utvrđena već i u embrionalnoj fazi razvoja [47]. Sve više istraživanja povezuje razinu kolesterola i sa povišenom razinom hiperfosforilacije proteina tau i stvaranja NFTs u AB, ali i u bolesti NPC. Vrijedi istaknuti da je nakupljanje kolesterola vidljivo i u „zaštićenoj“ regiji, hipokampusu, čime je još jednom potvrđeno da ova regija nije pošteđena patoloških promjena. Treiber-Held i sur. čak su identificirali regiju *CA3* hipokampusa kao prvu koja pokazuje promjene u razini nakupljanja kolesterola. Ovakve razlike u razini nakupljanja kolesterola u pojedinim regijama mozga mogle bi biti povezane s različitom razinom ekspresije proteina NPC1, kao i s mogućom različitom funkcijom ovog proteina u različitim regijama mozga, odnosno različitim tipovima stanica [36, 47].

Odumiranje Purkinjeovih neurona u malom mozgu glavna je neuropatološka značajka bolesti NPC [31, 33]. Purkinjeovi neuroni imaju intrinzična svojstva koja ih čine posebno osjetljivima na gubitak proteina NPC1, odnosno na nakupljanje kolesterola [32–35]. Mišji

model *knock-in NPC1-I1061T* rekapitulira ovu značajku [85], što je potvrđeno i u ovom doktorskom radu. U asimptomatskoj fazi bolesti, u dobi od četiri tjedna, nije zabilježen razlika u razini Purkinjeovih neurona između jedinki N-KI i jedinki divljeg tipa. U simptomatskoj fazi bolesti, u dobi od 9 tjedana, započinje odumiranje Purkinjeovih neurona, što je posebno izraženo u prednjim režnjevima malog mozga, a u manjem opsegu događa se i u srednjim režnjevima malog mozga jedinki N-KI u odnosu na jedinke divljeg tipa. U završnoj fazi bolesti, u dobi od 15 tjedana, neurodegeneracija još je izraženija, s (gotovo) potpunim odumiranjem Purkinjeovih neurona u prednjim režnjevima malog mozga, praćena umjerenim odumiranjem neurona u srednjim režnjevima. Purkinjeovi neuroni u posljednjem režnju potpuno su očuvani i u jedinki divljeg tipa i u jedinki N-KI u svim ispitivanim dobnim skupinama. Otpornost posljednjeg, 10. režnja malog mozga na neurodegeneraciju nije u potpunosti razjašnjena. Iako nova istraživanja ukazuju na promijenjeni profil genske ekspresije u 10. režnju [193], smatra se da je ova „otpornost“ ponajviše posljedica brze progresije bolesti NPC. Naime, u 10. režnju zabilježena je i povišena razina kolesterola [35], a produljenjem životnog vijeka miševa BALB/c *NPC1<sup>-/-</sup>* uslijed ekspresije proteina NPC1 u astrocitima, zabilježeno je odumiranje Purkinjeovih neurona i u 10. režnju [35]. Ovakvo progresivno, pravocrtno odumiranje Purkinjeovih neurona od prednjih prema stražnjim režnjevima mozga vjerojatno je posljedica anatomskeg smještaja malog mozga, odnosno različite povezanosti pojedinih režnjeva s ostalim regijama mozga [24]. Neurodegeneracija drugih neurona analizirana je pomoću biljega jezgara zrelih neurona (NEUN), te je razlika između jedinki N-KI i jedinki divljeg tipa zabilježena samo u hipokampusu. U dentatnom girusu jedinki N-KI zabilježen je određeni strukturni gubitak neurona u odnosu na jedinke divljeg tipa, a prisutan je već u asimptomatskoj fazi bolesti. Hipokampus se u kontekstu neurodegeneracije u patogenezi bolesti NPC stoga ne može smatrati zaštićenom regijom mozga.

Uslijed disfunkcije proteina NPC1, kolesterol se nakuplja u kasnim endosomima i lizosomima, što predstavlja važnu patološku značajku bolesti NPC. Ove vezikule stoga su povećane i njihov prijenos kroz stanicu je usporen, što doprinosi promjeni proteostaze u stanici, nakupljanju makromolekula i drugih toksičnih tvari u lizosomima te dugoročno doprinosi neurodegeneraciji [12, 25, 26]. Purkinjeovi neuroni su zbog svoje specifične strukture i veličine posebno osjetljivi na disfunkciju anterogradnog i retrogradnog prijenosa vezikula kroz duge aksone između sinapsi i soma neurona [32–35]. U sklopu ovog dokorskog rada, poremećaj endolizosomalnog puta prvi puta je zabilježen u mozgu mišjeg modela *knock-in NPC1-I1061T in vivo*. U simptomatskoj i završnoj fazi bolesti, vidljivo je snažno nakupljanje lizosomalnog biljega LAMP1 u molekularnom sloju prednjih i srednjih režnjeva jedinki N-KI, dok je u jedinki divljeg tipa ovaj biljeg smješten samo u području soma Purkinjeovih neurona. Na proteinskoj razini, u malom mozgu miševa N-KI zabilježena je povišena razina biljega ranih endosoma (EEA1) i lizosoma (LAMP1), što dodatno ukazuje na poremećaj endolizosomalnog puta te nakupljanje ovih vezikula. Signal lizosomalnih vezikula zabilježen u molekularnom sloju malog mozga povezan je s povećanom infiltracijom mikroglia koje u modelima bolesti NPC imaju

profil ekspresije gena DAM, karakterističan za povećanu fagocitnu aktivnost [50]. U mišjem modelu C57BL/6 *NPC1<sup>nmf164</sup>* pokazana je kolokalizacija ovakvih fagocitno aktivnih mikroglija s distrofičnim dendritima Purkinjeovih neurona upravo u molekularnom sloju režnjeva malog mozga [62]. Nakupljanje vezikula endolizosomalnog puta u jedinki N-KI u odnosu na jedinke divljeg tipa zabilježeno je i u ostalim ispitivanim regijama, te je prisutno već u asimptomatskoj fazi bolesti. Činjenica da su uočene i promjene u razini, odnosno raspodjeli biljega ranih endosoma (EEA1), koji izravno nisu mjesto ekspresije proteina NPC1 [5], dodatno ukazuje na poremećaj u tijeku sazrijevanja i stapanja vezikula endolizosomalnog puta uslijed nakupljanja kolesterola, odnosno nedostatka proteina NPC1 u patogenezi bolesti NPC [88, 127]. Rani endosomi mjesto su kolokalizacije proteina APP i enzima BACE1, stoga nakupljanje i/ili stapanje ovih vezikula dovodi do povećane kolokalizacije navedenih proteina, odnosno do povećanog cijepanja proteina APP enzimom BACE1 [88, 127].

U patogenezi neurodegenerativnih bolesti, neuroinflamacija (aktivacija astrocita i mikroglija) isprva se smatrala samo odgovorom na neurodegeneraciju, tj. sekundarnim učinkom odumiranja neurona. Međutim, novija istraživanja ukazuju da bi neuroinflamacija mogla prethoditi neurodegeneraciji i/ili biti okidač neurodegeneracije [50]. Neuroinflamacija, kao i neurodegeneracija, zabilježena je u brojnim modelima bolesti NPC. U jedinki N-KI, u odnosu na jedinke divljeg tipa, aktivacija astrocita i mikroglija potvrđena je (iako u različitom intenzitetu) u svim ispitivanim regijama mozga. U malom mozgu miševa N-KI, aktivacija astrocita zabilježena je već u asimptomatskoj fazi bolesti, u dobi od četiri tjedna, a posebno je izražena u prednjim režnjevima malog mozga, gdje će u kasnijoj fazi bolesti započeti odumiranje Purkinjeovih neurona. U asimptomatskoj fazi bolesti NPC gubitak Purkinjeovih neurona nije zabilježen, stoga je potvrđeno da neuroinflamacija (u vidu aktivacija astrocita) prethodi neurodegeneraciji (odumiranju Purkinjeovih neurona) u malom mozgu miševa N-KI. U simptomatskoj i završnoj fazi bolesti zabilježena je snažna aktivacija astrocita kroz cijeli mali mozak, dakle i u prednjim režnjevima gdje počinje gubitak Purkinjeovih neurona, ali i u „očuvanom“ 10. režnju. Ovime je dodatno potvrđeno da zadnji režanj nije otporan na patogenezu bolesti NPC.

Aktivacija astrocita nije zabilježena u malom mozgu i kori velikog mozga jedinki divljeg tipa, ali, zanimljivo, prisutna je u svim ispitivanim regijama hipokampusa (*CA1*, *CA3*, dentatni girus) ovih jedinki, i to u svim ispitivanim dobnim skupinama. Astrociti su heterogena populacija stanica, s različitim profilom ekspresije gena, morfologijom, funkcijom i lokalizacijom u mozgu. Opažena razlika u razini aktivacije astrocita u hipokampusu jedinki divljeg tipa, ali i razlika u razini aktivacije između pojedinih regija mozga ispitivanih jedinki stoga može biti posljedica aktivacije različitih podvrsta astrocita, odnosno njihovog odgovora na različite promjene u pojedinim regijama mozga [194–198]. U ovom doktorskom radu ispitan je najčešće korišteni biljeg zrelih astrocita (GFAP) koji je povezan s morfološkom promjenom astrocita uslijed odgovora na ozlijede, patološke promjene ili starenje, ali on nije eksprimiran u svim astrocitima fiziološki zdravog središnjeg živčanog sustava [196, 197]. U svrhu boljeg razumijevanja prostorno

različite aktivacije astrocita potrebna su ispitivanja dodatnih biljega astrocita u mišjem modelu *knock-in NPC1-I1061T*. Također, analizama transkriptoma i/ili proteoma na razini pojedinačnih stanica astrocita (engl. *single-cell transcriptomics/proteomics*) mogla bi se utvrditi heterogenost populacija astrocita u različitim regijama mozga, posebno između hipokampusu i kore velikog mozga i/ili malog mozga. Povećana aktivacija astrocita u hipokampusu jedinki N-KI u odnosu na jedinke divljeg tipa još je jednom istaknula da ova regija mozga nije zaštićena u bolesti NPC. Pretpostavljamo da bi rana neuroinflamacija, tj. aktivacija astrocita u hipokampusu mogla biti odgovor na zabilježeno povećano nakupljanje endolizosomalnih vezikula i/ili promjenu u razini biljega zrelih neurona.

U odnosu na jedinke divljeg tipa, aktivacija mikroglia u jedinki N-KI također je prisutna u svim režnjevima malog mozga već u asimptomatskoj fazi bolesti. Aktivacija mikroglia u malom mozgu jedinki N-KI dodatno je povišena u simptomatskoj fazi bolesti (posebno u prednjim režnjevima), a posebno je izražena u završnoj fazi bolesti (i to u prednjim i srednjim režnjevima malog mozga). Razina biljega aktivnih mikroglia (CD68) povišena je na razini cijelog malog mozga, što potvrđuje povećanu fagocitnu aktivnost ovih mikroglia [50]. Zanimljivo, proširenom analizom zabilježena je i povišena razina strukturnog biljega mikroglia (IBA1) što bi moglo ukazivati na porast broja, odnosno infiltraciju mikroglia u mali mozak jedinki N-KI. Na temelju ovih rezultata vidljivo je da pojava fagocitno aktivnih mikroglia prati proces odumiranja Purkinjeovih neurona u malom mozgu jedinki N-KI, što upućuje na njihovu ulogu u neurodegeneraciji [35, 50]. Aktivnost mikroglia u znatno manjem opsegu zabilježena je i u ostalim ispitivanim regijama mozga jedinki N-KI u odnosu na jedinke divljeg tipa, što ukazuje da razina fagocitne aktivnosti mikroglia prati procese neurodegeneracije koji se primarno odvija u malom mozgu. Ovi rezultati također ukazuju da se u kori velikog mozga i u hipokampusu ne događa progresivna neurodegeneracija koja bi značajno doprinijela patogenezi bolesti NPC u modelu *knock-in NPC1-I1061T*.

Za preciznije definiranje vremena pojave neuroinflamacije i neurodegeneracije, potrebno je precizirati terminologiju. Neuroinflamacija se može definirati kao odgovor glia stanica na neurodegeneraciju s ciljem njenog zaustavljanja [44], ali ne treba zanemariti činjenicu da starenje te stresne i patološke promjene u organizmu ne utječu samo na neurone, već mogu utjecati i na glia stanice i potaknuti njihovu (de)aktivaciju nevezano za odumiranje neurona [50, 55]. U kontekstu bolesti NPC, Purkinjeovi neuroni odumiru zbog svojih intrinzičnih svojstava, a astrociti i mikroglie imaju promijenjen fenotip već uslijed samog nedostatka proteina NPC1 [50, 56, 57, 59, 62]. Iz rezultata ovog doktorskog rada stoga je vidljivo da je neuroinflamacija u malom mozgu prisutna prije početka odumiranja Purkinjeovih neurona, tj. prije neurodegeneracije. U skladu s ovim rezultatima, Baudry i sur. su na temelju istraživanja u mišjem modelu BALB/c *NPC1<sup>-/-</sup>* zaključili da aktivacija mikroglia prethodi neurodegeneraciji i možda je povezana s njom, a da aktivacija astrocita može biti posljedica neurodegeneracije [59].

U podlozi patogeneze bolesti NPC je i nakupljanje mikrotubulima pridruženog proteina tau. Iako u mišjih modela bolesti NPC ne dolazi do stvaranja NFTs, povećana je razina hiperfosforilacije proteina tau [27, 68, 70, 73], što se povezuje s težinom simptoma i brzinom progresije bolesti NPC [199]. Zanimljivo, mjesta fosforilacije proteina tau u bolesti NPC ista su kao ona u AB [68, 74]. U kontekstu AB, nakupljanje hiperfosforiliranog proteina tau povezano je s povišenom razinom cijepanja proteina APP amiloidogenim putem i nakupljanjem peptida amiloida- $\beta$  u mozgu, ali najrelevantnije je u kontekstu destabilizacije mikrotubula, što otežava prijenos vezikula kroz procese neurona [12, 67–69]. U ovom doktorskom radu prvi je puta ispitan profil fosforilacije proteina tau u mišjem modelu *knock-in NPC1-I1061T*, i to prateći ukupnu razinu proteina tau, ukupnu razinu fosforiliranog proteina tau, te razine četiri različita mjesta fosforilacije, pSer396/404 (biljeg PHF-1), pSer202 (biljeg CP13), pThr231 (biljeg RZ3) i pSer202/Thr205 (biljeg AT8). U odnosu na jedinke divljeg tipa, u jedinki N-KI nije zabilježena značajna razlika u ukupnoj razini proteina tau. Međutim, povišena je ukupna razina fosforiliranog proteina tau, odnosno razina fosforilacije na svim ispitivanim mjestima (povišena je razina biljega PHF-1, CP13, RZ3 i AT8), što je posebno izraženo u simptomatskoj i završnoj fazi bolesti. Ovakvi rezultati u skladu su s dosadašnjim saznanjima za druge mišje modele bolesti NPC [67, 73, 74, 200, 201]. Biljeg RZ3 predstavlja prvo mjesto hiperfosforilacije proteina tau koje potiče promjenu njegove konformacije [202], a biljezi PHF-1 i AT8 su biljezi rane hiperfosforilacije [203], stoga promjena njihove razine potvrđuje prisustvo rane hiperfosforilacije proteina tau u patogenezi bolesti NPC u modelu *knock-in NPC1-I1061T*.

Naša prethodna istraživanja pokazala su da je proteolitička aktivnost enzima BACE1 povećana u modelima bolesti NPC, i to u stanicama CHO *NPC1*-null te u mozgovima miševa BALB/c *NPC1*<sup>-/-</sup> [177, 181]. Sva komercijalno dostupna primarna protutijela za enzim BACE1 histološki ga detektiraju isključivo u mahovinastim vlaknima hipokampusu, što je potvrđeno i u ovom doktorskom radu; detekcija u malom mozgu i kori velikog mozga nije bila moguća (rezultati nisu prikazani). U hipokampusu jedinki N-KI u odnosu na jedinke divljeg tipa nije zabilježena razlika u intenzitetu i raspodjeli enzima BACE1. Tijekom proširene analize modela *knock-in NPC1-I1061T*, u pojedinim regijama mozga, odnosno pojedinim dobnim skupinama jedinki N-KI zabilježena je povišena razina enzima BACE1 za oko 30% u odnosu na jedinke divljeg tipa. Naime, enzim BACE1 podložan je brojnim (post)transkripcijskim i (post)translacijskim modifikacijama koje mogu modulirati njegovu razinu i proteolitičku aktivnost [204–208]. Ovi mehanizmi potaknuti su starenjem i stresnim promjenama u stanici, stoga prisutnost brojnih i različitih patoloških procesa u pojedinim regijama mozga mišjeg modela *knock-in NPC1-I1061T* može biti okidač za povećanje razine i nakupljanje proteina BACE1 [204]. U skladu s time, prethodna istraživanja su pokazala da je nakupljanje enzima BACE1 povezano s poremećajem funkcije lizosoma [209], što je jedna od ključnih patoloških karakteristika bolesti NPC.

U normalnim fiziološkim uvjetima, enzim BACE1 cijepa brojne supstrate, od kojih za protein APP ima vrlo nizak afinitet, dok za proteine SEZ6 i SEZ6L pokazuje visok afinitet



[153]. U svrhu praćenja proteolitičke aktivnosti enzima BACE1 u mozgu mišjeg modela *knock-in NPC1-I1061T* analizirana je razina produkata cijepanja njegovih isključivih supstrata, proteina SEZ6 i SEZ6L [156, 157]. Naše prethodno istraživanje u mišjem modelu BALB/c *NPC1<sup>-/-</sup>* pokazalo je povećano cijepanje svih navedenih supstrata u mozgu miševa *NPC1<sup>-/-</sup>* u odnosu na jedinke divljeg tipa u asimptomatskoj, kao i u završnoj fazi bolesti [181]. U ovom doktorskom radu također je zabilježeno povećano cijepanje proteina APP, SEZ6 i SEZ6L u mozgu mišjeg modela *knock-in NPC1-I1061T* u odnosu na jedinke divljeg tipa. Cijepanje proteina APP enzimom BACE1 značajno je za patogenezu bolesti NPC, jer neposredni produkt ovog cijepanja, odsječak CTF $\beta$ , osim što je supstrat za generiranje peptida amiloida- $\beta$  [88, 127], izravno doprinosi disfunkciji staničnih procesa, tako što potiče fosforilaciju proteina tau [135], dok aktivacijom endosomalnog biljega RAB5 doprinosi poremećaju funkcije ranih endosoma [133, 134]. Iznimno, te suprotno očekivanom rezultatu, u malom mozgu jedinki N-KI razina cijepanja proteina SEZ6 smanjena je u odnosu na jedinke divljeg tipa u svim ispitivanim dobnim skupinama. Drugačija razina cijepanja ovog proteina u malom mozgu može biti posljedica drugačije razine ekspresije proteina SEZ6 u različitim regijama mozga [159, 165]. U jedinki N-KI u dobi od 9 i 15 tjedana, paralelno s odumiranjem Purkinjeovih neurona, gubi se i detekcija signala za protein SEZ6L. Pritom je u preostalim Purkinjeovim neuronima jedinki N-KI moguće je utvrditi promjene u raspodjeli proteina SEZ6L: u odnosu na jedinke divljeg tipa, protein SEZ6L se u jedinki N-KI nakuplja u somi neurona, a u dendritičkim procesima smješten je u povećanim vezikulama. Ovaj nalaz u skladu je s rezultatima istraživanja primarnih neurona mišjeg modela BALB/c *NPC1<sup>-/-</sup>* [181]: uslijed nedostatka proteina NPC1 i poremećaja endolizosomalnog puta, supstrati enzima BACE1 (proteini SEZ6 i SEZ6L) nakupljaju se u endosomalnim vezikulama, gdje kolokaliziraju s enzimom BACE1, što može izravno doprinijeti njihovom povećanom cijepanju. Povećana razina cijepanja proteina SEZ6 i SEZ6L, kao isključivih supstrata enzima BACE1 [164], ukazuje na povećanu proteolitičku aktivnost enzima BACE1 u mozgu jedinki N-KI. Iako točna uloga proteina SEZ6 i SEZ6L još nije poznata, povezani su s procesima poput razvoja dendrita i plastičnosti sinapsi, stoga promjena u proteolizi ovih proteina može imati negativne posljedice na kognitivne i motoričke sposobnosti ovih jedinki [156, 158–161, 163, 210].

### **5.3. Karakterizacija novoga mišjeg modela *knock-in NPC1-I1061T* s deletiranim genom *BACE1***

#### **5.3.1. Karakterizacija miševa *knock-in NPC1-I1061T* s deletirana oba alela gena *BACE1***

U ovom doktorskom radu prvi je puta ispitan učinak genetičke modulacije razine enzima BACE1 (enzima ključnog u patogenezi AB) u mišjem modelu bolesti NPC. Delecija oba alela gena *BACE1* u mišjem modelu *knock-in NPC1-I1061T* (N-KI B-KO) rezultirala je vrlo snažnim fenotipom, koji je utjecao na stopu rađanja, odnosno preživljenje jedinki N-KI B-KO u odnosu na jedinke drugih ispitivanih genotipova. Tijekom ovog višegodišnjeg dokorskog istraživanja, prikupljene su samo četiri jedinke genotipa N-KI B-KO, a zbog loše morfološke slike žrtvovane su odmah po odbijanju od majki, u dobi od četiri tjedna. Samo jedna jedinka imala je nešto blažu morfološku sliku: tjelesna masa bila je veća u odnosu na preostale tri jedinke N-KI B-KO, ali je i dalje bila snižena u odnosu na jedinke svih drugih genotipova, anatomski nije bilo vidljivih patoloških promjena (poput hidrocefalusa), te se normalno kretala (nije pokazivala tremor ni ponašanje nalik epileptičkim napadajima).

Kao i u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET, u jedinki N-KI B-KO zabilježena je varijabilna razina proteina NPC1, a iznosi 20-40% razine ovog proteina u jedinki divljeg tipa. Sukladno genotipu *knock-out BACE1*, enzim BACE1 nije zabilježen u mahovinastim vlaknima hipokampusa niti u homogenatima mozga jedinki N-KI B-KO. Zbog nedostatka enzima BACE1, u jedinki N-KI B-KO zabilježeno je sniženo cijepanje proteina APP i SEZ6 u odnosu na jedinke divljeg tipa te jedinke N-KI B-WT i N-KI B-HET, u svim ispitivanim regijama mozga. Međutim, razina cijepanja proteina SEZ6L u malom mozgu jedinki N-KI B-KO nije snižena, što ukazuje na mogući kompenzacijski mehanizam cijepanja ovog proteina nekim drugim enzimom (potencijalno enzimom BACE2). Ekspresija i raspodjela proteina APP, SEZ6 i SEZ6L također je promijenjena u jedinki N-KI B-KO u odnosu na jedinke divljeg tipa te jedinke N-KI B-WT i N-KI B-HET. Pritom se ponovno ističe protein SEZ6L, koji se povećano nakuplja u somi neurona kore velikog mozga i hipokampusa jedinki N-KI B-KO, dok je u malom mozgu smješten u somi Purkinjeovih neurona, bez signala u procesima karakterističnog za jedinke svih drugih genotipova. Uočene razlike u razini i raspodjeli supstrata mogu biti posljedica njihove promijenjene lokalizacije uslijed nedostatka enzima BACE1 i/ili potencijalnog cijepanja ovih supstrata nekim drugim enzimima.

Analizom biljega neurodegeneracije u dobi od četiri tjedna, tj. u asimptomatskoj fazi bolesti, u jedinki N-KI B-KO nije uočeno odumiranje Purkinjeovih neurona u malom mozgu, niti gubitak zrelih neurona ni u jednoj od ispitivanih regija mozga, baš kao ni u jedinki drugih genotipova. Neurodegeneracija stoga nije uzrok ranog mortaliteta jedinki N-KI B-KO. Ipak, već u dobi od četiri tjedna, u jedinki N-KI B-KO prisutne su ostale neuropatološke značajke karakteristične za bolest NPC. U jedinki N-KI B-KO

zabilježeno je povećano nakupljanje ranih endosoma i lizosoma u somi neurona kore velikog mozga i hipokampusa u odnosu na jedinke divljeg tipa. Pritom je razina nakupljanja ranih endosoma (ali ne i lizosoma) u svim ispitivanim regijama mozga povećana i u odnosu na jedinke N-KI B-WT, što može biti posljedica poremećaja sazrijevanja vezikula unutar endolizosomalnog puta u ovom modelu, odnosno u patogenezi bolesti NPC [146, 211, 212]. Međutim, smještaj lizosoma u sloju soma Purkinjeovih neurona u malom mozgu jedinki N-KI B-KO nije promijenjen u odnosu na jedinke drugih genotipova, što također potvrđuje da u ovih jedinki nema gubitka Purkinjeovih neurona.

Ipak, aktivacija astrocita posebno je izražena u malom mozgu jedinki N-KI B-KO (kao i u jedinki N-KI B-WT) u odnosu na jedinke divljeg tipa i jedinke N-KI B-HET, a prisutna je u svim režnjevima malog mozga (dakle izraženija nego u jedinki N-KI B-WT, u kojih je aktivacija astrocita najснаžnija u prednjim režnjevima). Iako je razina biljega aktivacije astrocita u homogenatima kore velikog mozga i hipokampusa povišena u jedinki N-KI B-KO u odnosu na jedinke divljeg tipa, ali i jedinke N-KI B-WT, infiltracija astrocita vidljiva je samo u hipokampusu. Slični rezultati uočeni su i za aktivaciju mikroglija: razina biljega mikroglija povišena je u svim ispitivanim regijama jedinki N-KI B-KO u odnosu na jedinke divljeg tipa te jedinke N-KI B-WT i N-KI B-HET, ali je infiltracija mikroglija u koru velikog mozga i hipokampus jedinki N-KI B-KO slabija u odnosu na mali mozak. Ovi rezultati još jednom potvrđuju da neuroinflamacija prethodi neurodegeneraciji u kontekstu odgovora astrocita i mikroglija na stanične promjene koje prethode odumiranju Purkinjeovih neurona, ali i uslijed same promjene fenotipa glija stanica zbog nedostatka proteina NPC1 i/ili enzima BACE1 [59, 196].

U jedinki N-KI B-KO zabilježena je povišena ukupna razina fosforilacije proteina tau, kao i povišena razina fosforilacije svih ispitivanih biljega pTAU, i to u odnosu na jedinke divljeg tipa, ali i u odnosu na jedinke N-KI B-WT i N-KI B-HET. Ovakav profil hiperfosforilacije proteina tau sličan je fenotipu jedinki N-WT B-KO koje pokazuju povišenu razinu fosforilacije u odnosu na jedinke divljeg tipa (iako samo za određene biljege). Međutim, povišena razina fosforilacije proteina tau u jedinki N-WT B-KO zabilježena je samo u asimptomatskoj fazi bolesti (u dobi od četiri tjedna), ne i u kasnijoj dobi. Ova značajka upućuje na mogući doprinos hiperfosforilacije proteina tau karakterističnom povećanom mortalitetu jedinki N-WT B-KO i N-KI B-KO u ranom postnatalnom periodu (unutar prvih 30 dana) [167].

Hiperfosforilacija proteina tau mogla bi biti povezana i s nedostatkom enzima BACE1, odnosno s promijenjenom razinom njegovih supstrata, konkretno proteina APP. Istraživanje provedeno na miševima soja BALB/c *NPCI*<sup>-/-</sup> pokazalo je povećanu hiperfosforilaciju proteina tau u kori velikog mozga i malom mozgu uslijed delecije gena *APP* (*NPCI*<sup>-/-</sup>/*knock-out APP*) [200], dok je uslijed povećane ekspresije ljudskog mutantnog gena *APP* (*NPCI*<sup>-/-</sup>/*APP<sup>sw</sup>/APP-V717F*) zabilježena promijenjena funkcija proteina tau [213, 214]. Kumulativno, utvrđen je i progresivniji fenotip ovih hibridnih jedinki: smanjeno preživljenje, manja tjelesna masa pri rođenju, aktivacija astrocita,

povećano nakupljanje kolesterola, demijelinacija i ubrzana neurodegeneracija u malom mozgu te poremećaji u motorici i pamćenju u usporedbi s miševima *NPCI<sup>-/-</sup>*. Ove značajke ukazuju da promjene u razini proteina tau u patogenezi bolesti NPC možda nisu povezane s razinom stvaranja peptida amiloida- $\beta$  (što je karakteristično za amiloidnu hipotezu AB), već da potencijalno ovise o promijenjenom cijepanju proteina APP, tj. razini njegovog cjelovitog oblika i/ili razini odsječka CTF $\beta$ , za koje je prethodno pokazano da sudjeluju u regulaciji metabolizma kolesterola [27].

Povećani mortalitet jedinki N-KI B-KO u odnosu na jedinke N-KI B-WT mogao bi biti povezan s činjenicom da sam mišji model *knock-out BACE1* (B-KO) pokazuje veći mortalitet u odnosu na jedinke divljeg tipa za gen *BACE1*. Povećani mortalitet jedinki B-KO može biti uzrokovan djelovanjem različitih okolišnih čimbenika na modificirajuće gene povezane s proteinom BACE1. Naime, neki od mnogobrojnih supstrata enzima BACE1 su proteini uključeni u imunološki odgovor, pa rana smrt jedinki B-KO može biti posljedica promijenjenog imunološkog sustava u odgovoru na patogene iz okoliša [125]. Također, u kontekstu modela B-KO, isključen je čimbenik nebrige majki i komplikacija uslijed hranjenja [125], ali ovaj rizik za povećani mortalitet nije relevantan u slučaju jedinki N-KI B-KO s obzirom da su njihove majke heterozigoti za gene *NPCI-I1061T* i *BACE1*.

Jedinke N-KI B-KO dakle imaju fenotip koji je kombinacija zasebnih i preklapajućih neuropatoloških značajki miševa *knock-in NPCI-I1061T* i *knock-out BACE1*. Izostanak neurodegeneracije Purkinjeovih neurona u asimptomatskoj fazi bolesti u ovom vrlo progresivnom modelu dodatno ide u prilog intrinzičnim mehanizmima odumiranja Purkinjeovih neurona [32–35], a povećani mortalitet jedinki N-KI B-KO u odnosu na jedinke N-KI B-WT može biti uzrokovan nedostatkom enzima BACE1 i/ili uočenim dodatnim poremećajima u procesima endolizosomalnog sustava, neuroinflamacije i/ili hiperfosforilacije proteina tau.

### 5.3.2. Karakterizacija miševa *knock-in NPC1-I1061T* s deletiranim jednim alelom gena *BACE1*

S obzirom na snažan fenotip i rani mortalitet jedinki N-KI B-KO, od posebnog interesa bilo je ispitivanje jedinki *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran samo jedan alel gena *BACE1* (N-KI B-HET). Naime, prethodna istraživanja u mišjem modelu AB (5×FAD) pokazala su da već delecija samo jednog alela gena *BACE1* može doprinijeti smanjenoj progresiji AB, tj. smanjenju kognitivnih poremećaja uslijed smanjenog nakupljanja peptida amiloida- $\beta$  [172]. Jedinke N-KI B-HET rođene su u očekivanom udjelu, te su u trenutku odbijanja od majki, u dobi od četiri tjedna, imale čak bolju morfološku sliku u odnosu na jedinke N-KI B-WT (veću tjelesnu masu), što je trajalo do simptomatske faze bolesti (do dobi od 9 tjedana). Ovakav rezultat isprva nije bio iznenađujuć, s obzirom da se miševi heterozigoti za gen *BACE1* smatraju zdravima (kao i jedinke divljeg tipa za gen *BACE1*) [167]. Međutim, daljnjim ispitivanjem jedinki N-KI B-HET u odnosu na jedinke N-KI B-WT, zabilježen je i povoljan i štetan učinak delecije jednog alela gena *BACE1* na pojavu i progresiju neuropatoloških značajki bolesti NPC. Ukupne zabilježene promjene ovih značajki u jedinki N-KI B-HET rezultirale su njihovim ranijim mortalitetom u dobi od 15 tjedana, u odnosu na 18 tjedana karakterističnih za jedinke N-KI B-WT.

U mozgu jedinki N-KI B-HET zabilježena je razina proteina NPC1 u skladu s genotipom: kao i u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-KO, razina proteina NPC1 iznosila je 20-40% razine ovog proteina u jedinki divljeg tipa. Razina zabilježenog signala enzima BACE1 u mahovinastim vlaknima jedinki N-KI B-HET snižena je u odnosu na jedinke divljeg tipa i jedinke N-KI B-WT, te sukladno genotipu odgovara razini signala u jedinki N-WT B-HET. Međutim, analizom razine proteina BACE1 u homogenatima mozga jedinki N-KI B-HET nije zabilježeno očekivano smanjenje razine od 50%, već je razina varirala ovisno o regiji i dobnoj skupini, uglavnom između 60 i 80% razine proteina BACE1 u jedinki divljeg tipa i jedinki N-KI B-WT. Ukoliko ovaj rezultat nije samo posljedica osjetljivosti metode WB, zabilježena razina enzima BACE1 u jedinki N-KI B-HET viša od očekivanih 50% može upućivati na neophodnu ulogu enzima BACE1 u postnatalnoj fazi razvoja mozga te njegovo nakupljanje uslijed poremećaja funkcije lizosoma uzrokovane nedostatkom proteina NPC1 [118–120]. Također, s obzirom da je razina enzima BACE1 ispitana u homogenatu ukupnog tkiva, postavlja se pitanje doprinosa pojedinih tipova stanica, odnosno ekspresije ovog proteina u različitim stanicama mozga, uključujući neurone, glija stanica (astrociti i mikroglije), oligodendrocite i dr. Buduća istraživanja stoga bi trebala ispitati i moguću razliku u ekspresiji gena i/ili proteina BACE1 u pojedinim tipovima stanica. Kao što je spomenuto u poglavlju 5.2., promjena u razini i/ili aktivnosti enzima BACE1 može biti uzrokovana i (post)transkripcijskim i (post)translacijskim mehanizmima uslijed stresnih promjena [204] u mozgu jedinki N-KI B-HET. Istraživanja mišjeg modela AB (5×FAD), kao i uzoraka mozгова pacijenata oboljelih od AB, ukazala su na povećanu razinu, tj. nakupljanje enzima BACE1 u AB, što je posljedica njegove smanjenje razgradnje u autofagolizosomima. S obzirom da je



funkcija lizosoma narušena uslijed nakupljanja kolesterola i drugih lipida u bolesti NPC, pretpostavljamo da bi nakupljanje enzima BACE1 zabilježeno u jedinki N-KI B-WT i N-KI B-HET u odnosu na jedinke divljeg tipa moglo biti uzrokovano upravo poremećajem funkcije endolizosomalnog sustava, stavljajući ovaj prijenosni sustav u centar patobiologije bolesti NPC. Enzim BACE1 nije zabilježen u jedinki B-KO (preciznije, N-WT B-KO i N-KI B-KO), a njegova razina u heterozigota (N-KI B-HET i N-WT B-HET) potencijalno iznosi više od 50% razine enzima BACE1 u jedinkama divljeg tipa: ovo opažanje ukazuje da jedan alel gena *BACE1* možda kompenzira potrebe organizma. U prilog tome ide i izostanak fenotipa u jedinki heterozigotnih za gen *BACE1* [167]. Buduća istraživanja stoga bi mogla biti usmjerena i na ispitivanje razine enzima BACE1 u embrionalnom i ranom postnatalnom razvoju heterozigotnih jedinki.

Proteolitička aktivnost enzima BACE1 u jedinki N-KI B-HET u odnosu na jedinke N-KI B-WT ispitana je praćenjem razine cjelovitih supstrata APP, SEZ6 i SEZ6L te njihovih pocijepanih N-terminalnih odsječaka. U malom mozgu jedinki N-KI B-HET nije zabilježena razlika u razini i raspodjeli proteina SEZ6L u Purkinjeovim neuronima u odnosu na jedinke N-KI B-WT. Međutim, kao i u jedinki N-KI B-KO, cijepanje proteina SEZ6L u malom mozgu jedinki N-KI B-HET povišeno je u dobi od četiri i 9 tjedana u odnosu na jedinke divljeg tipa, ali, zanimljivo, i u odnosu na jedinke N-KI B-WT. S obzirom da se sazrijevanje malog mozga događa i postnatalno [36, 37], a protein SEZ6L povezan je s procesima razvoja dendrita i umrežavanja neurona [159, 160], povećano cijepanje proteina SEZ6L unatoč smanjenoj razini enzima BACE1 u jedinki N-KI B-HET i N-KI B-KO ukazuje na značajnu ulogu ovog proteina u razvoju malog mozga i/ili na njegovo cijepanje nekim drugim enzimima. Ispitivanjem raspodjele i razine cijepanja proteina APP u malom mozgu nije zabilježena razlika između jedinki N-KI B-HET i N-KI B-WT. Međutim, u kori velikog mozga i hipokampusu jedinki N-KI B-HET zabilježeno je smanjeno cijepanje, odnosno manje nakupljanje proteina APP, SEZ6 i SEZ6L u somi neurona u odnosu na jedinke N-KI B-WT, pogotovo u završnoj fazi bolesti, a razina i raspodjela proteina slična je jedinkama divljeg tipa.

Analizom biljega Purkinjeovih neurona u malom mozgu jedinki N-KI B-HET, kao ni u jedinki drugih ispitivanih genotipova, nije uočena neurodegeneracija u asimptomatskoj fazi bolesti. U simptomatskoj fazi bolesti, u dobi od 9 tjedana, u jedinki N-KI B-HET uočen je manji gubitak Purkinjeovih neurona u prednjim i srednjim reznjevima malog mozga u odnosu na jedinke N-KI B-WT. Međutim, ovaj profil usporene neurodegeneracije u jedinki N-KI B-HET nije utvrđen analizom ukupne razine biljega Purkinjeovih neurona u homogenatu malog mozgu u odnosu na jedinke N-KI B-WT, ni u simptomatskoj, ni u završnoj fazi bolesti. Štoviše, u dobi od 15 tjedana, gubitak Purkinjeovih neurona u prednjim i srednjim reznjevima malog mozga jedinki N-KI B-HET ne razlikuje se u odnosu na jedinke N-KI B-WT. Uzevši u obzir da jedinke N-KI B-HET ugibaju ranije, tj. u dobi od oko 15 tjedana (u odnosu na jedinke N-KI B-WT koje ugibaju u dobi oko 18 tjedana), kao i intrinzična svojstva Purkinjeovih neurona, ovakvo ubrzano odumiranje Purkinjeovih neurona između simptomatske i završne faze bolesti dalo je naslutiti da delecija jednog alela gena *BACE1* u miševa *knock-in NPC1-I1061T*

može uzrokovati dodatne patološke promjene u mozgu koje uzrokuju ubranu neurodegeneraciju Purkinjeovih neurona. Također, u dobi od 15 tjedana, u kori velikog mozga jedinki N-KI B-HET zabilježena je i smanjena razina biljega zrelih neurona u odnosu na jedinke divljeg tipa i jedinke N-KI B-WT, dakle neurodegeneracija u jedinki N-KI B-HET nije prisutna samo u malom mozgu, već se zbog ubrzane progresije bolesti u ovoj dobi može zamijetiti i u kori velikog mozga.

Ispitivanjem promjena u endolizosomalnom putu, u malom mozgu jedinki N-KI B-HET uočeno je slabije nakupljanje lizosomalnih vezikula u molekularnom sloju prednjih režnjeva u simptomatskoj fazi bolesti u odnosu na jedinke N-KI B-WT, u kojih je i u prednjim i u srednjim režnjevima već u ovoj dobi prisutno snažno nakupljanje lizosoma. U završnoj fazi bolesti, razlika između ove dvije skupine više nije vidljiva, stoga je moguće zaključiti da zabilježene manje promjene u nakupljanju lizosoma prate usporeno odumiranje Purkinjeovih neurona u jedinki N-KI B-HET do simptomatske faze bolesti, nakon čega progresivna neurodegeneracija rezultira fenotipom jednakim kao u jedinki N-KI B-WT. Nakupljanje ranih endosoma u kori velikog mozga jedinki N-KI B-HET jednako je onome u jedinki N-KI B-WT, te je u odnosu na jedinke divljeg tipa posebno izraženo u završnoj fazi bolesti. Međutim, nakupljanje lizosoma u kori velikog mozga, te ranih endosoma i lizosoma u hipokampusu jedinki N-KI B-HET smanjeno je u odnosu na jedinke N-KI B-WT u svim ispitivanim dobnim skupinama, ali je i dalje povišeno u odnosu na jedinke divljeg tipa. Zaključno, delecija jednog alela gena *BACE1* djelomično ublažava nakupljanje ranih endosoma i lizosoma u jedinki N-KI B-HET, stoga promjene u endolizosomalnom putu vjerojatno nisu odgovorne za progresivnu neurodegeneraciju uočenu u jedinki N-KI B-HET u kasnijoj fazi bolesti.

Točan mehanizam povoljnog djelovanja smanjenja razine enzima *BACE1* na smanjeno nakupljanje endolizosomalnih vezikula u ovom modelu zasad nije jasan. Poznato je da povećano stvaranje odsječka CTF $\beta$  uslijed amiloidogenog cijepanja proteina APP enzimom *BACE1* može doprinijeti poremećaju funkcije endolizosomalnog puta [132–134], stoga bi se ovaj mehanizam nametnuo kao moguće objašnjenje. Međutim, usprkos smanjenom cijepanju proteina APP u jedinki N-KI B-HET u odnosu na jedinke N-KI B-WT, razina ukupnih odsječaka APP CTFs zabilježenih u jedinki N-KI B-HET nije bila smanjena u odnosu na jedinke N-KI B-WT. Korištena metoda (WB) nije omogućila dovoljno osjetljivo utvrđivanje razine, odnosno razlikovanje odsječaka CTF $\alpha$  i CTF $\beta$ , stoga zasad nije moguće isključiti objašnjenje da je smanjena razina stvaranja odsječka CTF $\beta$  uzrokovala smanjeno nakupljanje endolizosomalnih vezikula. Potrebna je preciznija analiza produkata nastalih cijepanjem proteina APP s ciljem ispitivanja ovog mehanizma. Dominguez i sur. pokazali su da delecija oba alela gena *BACE1* rezultira potpunim smanjenjem stvaranja amiloida- $\beta$  u neuronima, ali ne i u glija stanicama, te smatraju da bi ovo mogao biti kompenzacijski doprinos enzima *BACE2* [125]. Još jedan od potencijalnih mehanizama u podlozi manjeg nakupljanja endolizosomalnih vezikula uslijed delecije jednog alela gena *BACE1* mogla bi biti činjenica da je lizosomalni biljeg LAMP1 jedan od supstrata enzima *BACE1* [153]. Međutim, ne postoje nikakva istraživanja o interakciji ove dvije molekule. Promjena u razini biljega LAMP1 mogla bi

biti posljedica njegovog smanjenog procesiranja enzimom BACE1, ali to ne objašnjava promjene zabilježene u biljezima drugih vezikula. Buduća istraživanja stoga bi trebala ispitati ulogu enzima BACE1 u različitim tipovima stanica, te razjasniti interakciju proteina LAMP1 i enzima BACE1, kao i detaljnije ispitati biogenezu vezikula endolizosomalnog sustava koji je promijenjen u bolesti NPC [212].

Križanjem miševa linije *NPC1-I1061T* i linije *BACE1*, deletirani su aleli gena *BACE1* u svim stanicama, ne samo u neuronima. S obzirom na vrlo progresivni patološki fenotip jedinki N-KI B-KO i analizu njihovih neuropatoloških značajki u samo jednoj dobnoj skupini (u dobi od četiri tjedna), nije bilo moguće povezati učinak delecije gena *BACE1* na interakciju različitih tipova stanica. Delecija jednog alela gena *BACE1* u jedinki *knock-in NPC1-I1061T* stoga je bila posebno značajna u kontekstu ispitivanja aktivacije astrocita i mikroglia. Fagocitno aktivne mikroglije ne eksprimiraju enzim BACE1 [122], dok je njegova ekspresija u astrocitima uvjetovana homeostatskim promjenama u stanici [122–124, 215]. Također, profil genske i proteinske ekspresije astrocita razlikuje se *in vivo* i *in vitro*, stoga mehanizmi ispitani u staničnim kulturama astrocita nisu uvijek u korelaciji s njihovim funkcijama u organizmu [123].

Aktivacija astrocita u kori velikog mozga jedinki N-KI B-HET progresivna je s dobi, ali je u svim ispitivanim dobnim skupinama manja u odnosu na jedinke N-KI B-WT, dok u hipokampusu nije uočena značajna razlika između jedinki N-KI B-HET i N-KI B-WT. U asimptomatskoj fazi bolesti, jedinke N-KI B-HET u malom mozgu pokazuju vrlo slabu aktivaciju astrocita u odnosu na jedinke divljeg tipa, a smanjena je i u odnosu na aktivaciju astrocita u jedinki N-KI B-WT. U simptomatskoj fazi bolesti, kada počinje odumiranje Purkinjeovih neurona, aktivacija astrocita prisutna je u prednjim i srednjim režnjevima jedinki N-KI B-HET, ali je ponovno smanjena u odnosu na jedinke N-KI B-WT. Smanjena aktivacija astrocita u jedinki N-KI B-HET u odnosu na jedinke N-KI B-WT može biti posljedica dva čimbenika: usporenog odumiranja Purkinjeovih neurona koje je zabilježeno do dobi od 9 tjedana, ili smanjene razine enzima BACE1. Naime, Chacón-Quintero i sur. pokazali su da aktivni astrociti u mozgu pacijenata oboljelih od AB imaju povišenu razinu enzima BACE1, odnosno da je uslijed inhibicije enzima BACE1 u primarnim astrocitima *in vitro* smanjena razina njihovih upalnih biljega, kao i razina aktivacije [215]. Snažna aktivacija astrocita prisutna je u jedinki N-KI B-HET i u dobi od 15 tjedana, te je i u ovoj dobnoj skupini snižena u odnosu na jedinke N-KI B-WT. S obzirom da u završnoj fazi bolesti nije zabilježena razlika u razini Purkinjeovih neurona između jedinki N-KI B-HET i N-KI B-WT, smanjena aktivnost astrocita uslijed delecije jednog alela gena *BACE1* nameće se kao moguće objašnjenje smanjene aktivacije astrocita u miševa *knock-in NPC1-I1061T*, ali otvara pitanje je li kronična smanjena aktivacija astrocita u patogenezi jedinki N-KI B-HET povoljna ili štetna za neurodegeneraciju, odnosno ukupnu patogenezu bolesti NPC u ovom modelu. Ispitivanje dodatnih biljega aktivacije astrocita u mozgu jedinki N-KI B-HET, kao i transkripcijskog i/ili proteomskog profila pojedinačnih stanica astrocita u različitim regijama mozga, moglo bi doprinijeti razumijevanju aktivacijskog statusa, odnosno funkcije različitih populacija astrocita uslijed delecije gena *BACE1* [196, 197].

Aktivacija mikroglia u kori velikog mozga jedinki N-KI B-HET vrlo je slaba u odnosu na jedinke divljeg tipa, ali se ne razlikuje od razine aktivacije mikroglia u jedinki N-KI B-WT. Međutim, aktivacija mikroglia u hipokampusu jedinki N-KI B-HET nešto je viša u simptomatskoj i završnoj fazi bolesti u odnosu na jedinke N-KI B-WT. Također, s progresivnim, pravocrtnim odumiranjem Purkinjeovih neurona od prednjih prema stražnjim režnjevima malog mozga, u jedinki N-KI B-HET javlja se snažna aktivacija mikroglia, a povišena je u odnosu na jedinke N-KI B-WT. Štoviše, u svim ispitivanim dobnim skupinama i regijama mozga, u jedinki N-KI B-HET povišena je i razina strukturnog biljega (IBA1) te biljega aktivacije mikroglia (CD68) u odnosu na jedinke N-KI B-WT, što ukazuje na povećanu fagocitnu aktivnost mikroglia u jedinki N-KI B-HET u odnosu na već aktivne mikroglie jedinki N-KI B-WT. Prethodna istraživanja proteomskog profila mikroglia miševa BALB/c *NPC1*<sup>-/-</sup> također pokazuju povećanu razinu lizosomalnih biljega, odnosno povećanu fagocitnu aktivnost mikroglia *NPC1*<sup>-/-</sup>. Ovakav profil fagocitne aktivacije (DAM) karakterističan je i za mikroglie u AB [50]. Mikroglie su dakle „osjetljive“ na gubitak proteina NPC1 [50]. Zanimljivo, ekspresija profila DAM zabilježena je i uslijed nedostatka enzima BACE1 u mikroglijama, delecijom gena *BACE1* u mišjem modelu AB (5×FAD) te farmakološkom inhibicijom enzima BACE1 u mikroglijama *in vitro* [191, 216]. Uslijed smanjenja razine enzima BACE1, odnosno delecije jednog alela gena *BACE1* u modelu *knock-in NPC1-I1061T* potencijalno se dodatno aktiviraju već aktivne mikroglie, što izaziva njihovu izrazito visoku fagocitnu aktivnost. Ova „dvostruka aktivacija“ mikroglia mogla bi doprinijeti ubrzanoj neurodegeneraciji u kasnijoj fazi bolesti u jedinki N-KI B-HET: „hiperaktivne“ mikroglie odgovaraju na promjene u Purkinjeovim neuronima koje vode do neurodegeneracije uslijed nedostatka proteina NPC1, a zbog vlastitog promijenjenog fenotipa, ove mikroglie potencijalno fagocitiraju i funkcionalne sinapse te zdrave stanice [35, 217].

Primjenom tretmana HPβCD koji uklanja nakupljeni kolesterol u mozgu miševa BALB/c *NPC1*<sup>-/-</sup>, Cougnoux i sur. ispravili su poremećaj aktivacije mikroglia [52]. Također, dvije istraživačke grupe pokazale su da protuupalni, nesteroidni lijek ibuprofen (u kombinaciji s i bez miglustata) inhibira fagocitičku aktivnost različitih fagocitnih stanica, uključujući mikroglie. Primjenom ibuprofena, u miševa BALB/c *NPC1*<sup>-/-</sup> smanjena je razina fagosoma (vezikula pozitivnih na biljeg CD68) u mikroglijama te je produljeno preživljenje miševa [62, 218]. Buduća istraživanja stoga bi mogla ispitati učinak farmakološke inhibicije fagocitno aktivnih mikroglia u modelu *knock-in NPC1-I1061T* s deletiranim genom *BACE1*.

Ispitivanje profila hiperfosforilacije proteina tau u simptomatskoj fazi bolesti pokazalo je povišenu razinu svih ispitivanih biljega fosforilacije (PHF-1, CP13, RZ3, AT8) u jedinki N-KI B-HET u odnosu na jedinke N-KI B-WT. Međutim, zanimljivo, u malom mozgu i hipokampusu jedinki N-KI B-HET razina svih ispitivanih biljega bila je smanjena u odnosu na jedinke N-KI B-WT u završnoj fazi bolesti. Ovakav različiti profil fosforilacije ukazuje na različitu osjetljivost pojedinih regija mozga [74], ali i moguću povezanost s razinom drugih neuropatoloških značajki. Povišena hiperfosforilacija proteina tau u

jedinki N-KI B-HET u dobi od 9 tjedana ističe ovu vremensku točku patogeneze bolesti NPC kao ključnu u kontekstu progresije neurodegeneracije ovog modela. Zaista, do dobi od 9 tjedana, jedinke N-KI B-HET imaju veću tjelesnu masu te sporije odumiranje Purkinjeovih neurona u odnosu na jedinke N-KI B-WT, nakon čega počinje progresivniji gubitak tjelesne mase te progresivnija neurodegeneracija, što rezultira ranijom smrću. U tom kontekstu, smanjena razina fosforilacije proteina tau vidljiva u malom mozgu i hipokampusu u dobi od 15 tjedana mogla bi biti posljedica gubika neurona u mozgu jedinki N-KI B-HET. Međutim, ako ova značajka nije povezana isključivo s neurodegeneracijom, vrijedilo bi ispitati mogući povoljan učinak dugoročnog ili kasnog smanjenja razine enzima BACE1 na fosforilaciju proteina tau u patogenezi bolesti NPC.



## 5.4. Potencijalna daljnja istraživanja uloge enzima BACE1 u funkciji mozga u drugim mišjim modelima

### 5.4.1. Heterozigoti za gen *NPCI*

Bolest NPC je vrlo progresivna, kako u pacijenata, tako i u mišjih modela. Unatoč korištenju modela *knock-in NPCI-I1061T*, koji ima usporenu progresiju bolesti u odnosu na najčešće korišteni mišji model BALB/c *NPCI<sup>-/-</sup>*, i dalje je teško pratiti blage promjene karakterističnih ranih i kasnih patoloških značajki. Kao mogući alternativni model za istraživanje patogeneze bolesti NPC mogli bi poslužiti heterozigoti za gen *NPCI*.

Kao i za brojne druge autosomne recesivne bolesti, postavlja se pitanje fiziološkog učinka mutacije u jednom alelu gena *NPCI*, što posebno može doći do izražaja tijekom starenja. Nova istraživanja obitelji pacijenata oboljelih od bolesti NPC otkrila su neurološku, neuropsihijatrijsku i neurodegenerativnu povijest bolesti u više od 50% slučajeva [219], dok je u samih heterozigota, odnosno prenositelja bolesti NPC, otkriven subklinički fenotip u kasnijoj životnoj dobi [220]. S obzirom na velik broj zajedničkih i preklapajućih mehanizama u podlozi neurodegenerativnih bolesti i LSDs [140, 141, 143], ovo otkriće ima važan značaj za zdravlje pojedinaca, tj. članova obitelji s rijetkim bolestima.

Dosad je objavljeno samo jedno istraživanje učinka gubitka jednog alela gena *NPCI* na neuropatološke značajke bolesti NPC u mišjem modelu (BALB/c *NPCI<sup>-/-</sup>*) [221]. U odnosu na divlji tip miševa, stari heterozigoti za gen *NPCI* (*NPCI<sup>+/-</sup>*) u dobi od 100 tjedana pokazuju povišenu razinu kolesterola, odumiranje Purkinjeovih neurona te hiperfosforilaciju proteina tau u kori velikog mozga i preostalim Purkinjeovim neuronima. U Laboratoriju za istraživanje neurodegenerativnih bolesti, ovo je istraživanje nastavljeno s ciljem pronalaska najranijih neuropatoloških promjena uslijed gubitka jednog alela gena *NPCI* (neobjavljeni rezultati). Za razliku od ranije spomenutog istraživanja, u odnosu na jedinke divljeg tipa, nije utvrđeno odumiranje Purkinjeovih neurona u miševa *NPCI<sup>+/-</sup>* u dobi od 100 tjedana, ali je zabilježena neuroinflamacija (u vidu aktivacije astrocita). Hiperfosforilacija proteina tau bila je povišena i vrlo varijabilna u oba ispitivana genotipa (vjerojatno zbog epigenetičkih i okolišnih čimbenika uslijed starenja), uz naznaku trenda povišene razine hiperfosforilacije proteina tau u mužjaka *NPCI<sup>+/-</sup>* [222]. Ispitivanjem mlađih miševa *NPCI<sup>+/-</sup>* u dobi od 20 tjedana zabilježeno je nakupljanje kolesterola te neuroinflamacija [223], čime je dodatno potvrđena rana aktivacija glija stanica u patogenezi bolesti NPC (uzrokovana nedostatkom proteina NPC1 u ovim stanicama, a ne odumiranjem Purkinjeovih neurona) [50].

U ovom doktoratu, u miševa N-KI B-HET u dobi od 15 tjedana uočen je potencijalni povoljni učinak delecije jednog alela gena *BACE1* na smanjenje razine hiperfosforilacije proteina tau. Uz pretpostavku da smanjena razina fosforilacije proteina tau nije samo posljedica neurodegeneracije, heterozigoti za gen *NPCI-I1061T* (koji u starijoj dobi moguće pokazuju određene ublažene, ali kronične neuropatološke značajke bolesti NPC) mogli bi poslužiti za ispitivanje dugoročnog učinka smanjenja razine enzima BACE1 na

hiperfosforilaciju proteina tau. Pacheco i sur. smatraju da je za patogenezu autofagije u bolesti NPC nedostatak proteina tau štetniji od visoko hiperfosforiliranog proteina tau [75]. S obzirom na različiti utjecaj (dis)funkcije proteina tau u različitim tauopatijama [27], smanjenje razine fosforilacije proteina tau uslijed smanjenja razine enzima BACE1 u ovom bi kontekstu moglo imati povoljan učinak i na promijenjeni proces autofagije u bolesti NPC.

U sklopu ovog doktorskog rada, križanjem dvostrukih heterozigota za gene *NPC1-I1061T* i *BACE1* dobiveno je i potomstvo genotipa N-HET B-KO. Za potrebe ovog istraživanja, navedeni genotip nije detaljno analiziran, ali relevantna su određena opažanja (neobjavljeni rezultati). Naime, jedinke genotipa N-HET B-KO rađaju se u odgovarajućem udjelu prema Mendelovom zakonu. Sukladno povećanom mortalitetu linije *BACE1* (odnosno miševa B-KO), oko 20% jedinki N-HET B-KO ugiba u ranoj postnatalnoj fazi, u dobi od oko 30 dana. Međutim, većina jedinki N-HET B-KO preživljava i dulje od dvije godine. Slično kao u miševa BALB/c *NPC1<sup>+/-</sup>* [223], preliminarnom histopatološkom analizom mozгова jedinki N-HET B-KO zabilježena je aktivacija astrocita te nakupljanje endosomalnih i lizosomalnih vezikula (progresivno s dobi, između četvrtog i 15. tjedna), ali ne i neurodegeneracija Purkinjeovih neurona.

Uloga enzima BACE1 važna je i u embrionalnom razvoju i u postnatalnoj fazi razvoja [120], ali još nije poznato zašto neke od jedinki B-KO ugibaju unutar prvih 30 dana nakon rođenja, dok neke žive i dulje od dvije godine [167], kao i jedinke N-HET B-KO. Također, miševi *knock-out* i za gen *BACE1* i za gen *BACE2* imaju stopu preživljenja od 40% (uz životni vijek oko jedne i pol godine) [125], što isključuje protektivnu kompenzacijsku ulogu enzima BACE2 u modelima *knock-out BACE1*. Preživljenje i dulji životni vijek miševa N-HET B-KO dodatno potvrđuje da je rani mortalitet miševa N-KI B-KO posljedica kombinacije fenotipova karakterističnih za oba genotipa, dakle i *knock-in NPC1-I1061T* i *knock-out BACE1*.

#### 5.4.2. Mišji model kondicionalni *knock-out BACE1*

Ekspresija proteina NPC1 u pojedinim tipovima stanica (neuronima ili astrocitima) mišjih modela *NPC1<sup>-/-</sup>* pokazala je povoljan učinak na ublažavanje simptoma bolesti (smanjeno nakupljanje kolesterola, ispravljanje mijelinacije) te produljenje životnog vijeka miševa *NPC1<sup>-/-</sup>* [44, 57, 61]. Suprotno ovakvom modelu ekspresije gena u jednom tipu stanica, važan model u budućim istraživanjima uloge enzima BACE1 mogao bi biti kondicionalni *knock-out BACE1*. Istraživanja *in vitro* dobra su početna točka za otkrivanje pojedinih mehanizama, ali ne moraju predstavljati stvarnu sliku ekspresije gena ili razine proteina u uvjetima interakcije različitih stanica te genetičkih i okolišnih čimbenika *in vivo* [224]. Kondicionalni *knock-out BACE1* stoga bi mogao dati točniji uvid u funkciju enzima BACE1, a razjasnio bi i razlike između potpunog, cjeloživotnog nedostatka enzima BACE1 i učinka (produljene) farmakološke inhibicije (koja potencijalno može djelovati i na druge mete) [167].

Delecija gena *BACE1* ili farmakološka inhibicija enzima BACE1 *in vitro* ukazuju i na različite odgovore ovisno o tipu ispitivanih stanica. Inhibicija enzima BACE1 u astrocitima pacijenata s obiteljskim oblikom AB smanjuje razinu njihovih upalnih biljega [215], delecija gena *BACE1* u astrocitima mišjeg modela 5×FAD pospješuje njihovu funkciju u uklanjanju amiloida- $\beta$  [225], a delecija gena ili inhibicija enzima BACE1 u mikroglijama povećava njihovu fagocitnu aktivnost [191, 216]. Genetičkim smanjenjem razine enzima BACE1 *in vivo* u ovom doktoratu zabilježen je sličan rezultat. Uzevši u obzir da se ekspresija enzima BACE1 razlikuje u astrocitima ovisno o njihovom (ne)aktivnom stanju [122–124], te da ekspresija enzima BACE1 nije zabilježena u aktivnim mikroglijama [122], potrebno je definirati funkciju enzima BACE1 u različitim tipovima stanica, i to ne samo u normalnim fiziološkim uvjetima, već i uslijed različitih oblika staničnog stresa ili patoloških promjena.

## 5.5. Završni komentar

Iako je monogenska bolest NPC uzrokovana promjenom samo jednog gena, odnosno jednog proteina (NPC1 ili NPC2), molekularni mehanizmi patogeneze bolesti NPC, ali i drugih neurodegenerativnih bolesti i LSDs, kompleksni su te isprepleteni procesi koji mogu uključivati promijenjeni metabolizam i/ili nakupljanje lipida, poremećaj funkcije endolizosomalnog i retromernog puta te autofagije, neurodegeneraciju, neuroinflamaciju te nakupljanje toksičnih proteinskih agregata poput peptida amiloida- $\beta$  i hiperfosforiliranog proteina tau [25, 141]. Glavna patološka promjena u podlozi bolesti NPC neosporivo je nakupljanje kolesterola uslijed gubitka proteina NPC1 (ili NPC2) [27, 226]. Razina kolesterola (ne)posredno je povezana i s ostalim neuropatološkim značajkama bolesti NPC, stoga se nadomještanje proteina NPC1 (ili NPC2) i ispravljanje protoka kolesterola nameću kao glavne farmakološke mete za liječenje ili usporavanje progresije bolesti NPC [227]. Ipak, u trenutku dijagnoze i potencijalne farmakološke intervencije u patogenezu ove progresivne bolesti (ili kroničnih bolesti poput AB), već su značajno (a možda i nepovratno) promijenjeni i brojni drugi stanični procesi. Optimalne strategije liječenja bolesti NPC, kao i drugih neurodegenerativnih bolesti i LSDs, stoga bi mogle podrazumijevati primjenu ciljane terapije temeljene na više meta (od engl. *multitargeted therapies*) koja bi se zasnivala na ispravljanju funkcije nekoliko molekularnih procesa, u nekoliko različitih tipova stanica [140, 228].

Na temelju rezultata ovog doktorskog rada, promjena razine enzima BACE1 od začetka ukazuje na povoljne učinke (usporava odumiranje Purkinjeovih neurona, smanjuje nakupljanje endolizosomalnih vezikula), ali i štetne učinke (aktivira mikroglije, uzrokuje raniju smrt) u patogenezi bolesti NPC. Buduća istraživanja trebala bi definirati ulogu enzima BACE1 u pojedinim tipovima stanica u mozgu, kao i definirati u kojoj fazi postnatalnog razvoja je funkcija ovog enzima neophodna, a kada može postati štetna. Potrebno je i bolje razumijevanje uloge brojnih supstrata enzima BACE1 i njihovih različitih oblika, tj. proteolitičkih odsječaka [206]. Enzim BACE1 ne predstavlja jedinstvenu farmakološku metu za liječenje bolesti NPC. Međutim, dosadašnja saznanja ukazuju da će enzim BACE1 i njegovi supstrati i dalje imati važnu ulogu u razumijevanju funkcije mozga, tj. različitih moždanih stanica, kao i neuropatoloških procesa u podlozi mnogih neurodegenerativnih bolesti i poremećaja nakupljanja lizosoma.

## 6. ZAKLJUČCI

Karakterizacijom miševa linije *NPC1-I1061T*, odnosno jedinki *knock-in NPC1-I1061T* u odnosu na jedinke divljeg tipa, u ovom doktorskom radu potvrđene su neuropatološke karakteristike bolesti NPC očekivane u ovom mišjem modelu. Definirane su fenotipske promjene (progresivni gubitak tjelesne mase, tremor, rani mortalitet) i histopatološke promjene (neurodegeneracija u vidu odumiranja Purkinjeovih neurona, nakupljanje kolesterola, povećanje i nakupljanje ranih endosoma i lizosoma, neuroinflamacija u vidu aktivacije astrocita i mikroglija, hiperfosforilacija proteina tau). Također, zabilježena je povećana proteolitička aktivnost enzima BACE1 (u vidu promijenjene razine cijepanja supstrata APP, SEZ6 i SEZ6L). Neuropatološke značajke jedinki *knock-in NPC1-I1061T* pratile su vremenski i prostorni uzorak karakterističan za modele bolesti NPC.

Križanjem heterozigotnih miševa linije *NPC1-I1061T* s heterozigotnim miševima linije *BACE1* uspješno je uspostavljena nova miješana linija, i to u svrhu ispitivanja hipoteze da će genetičko smanjenje razine enzima BACE1 (delecijom jednog ili oba alela gena *BACE1*) imati povoljan učinak na neuropatološke značajke ranije ispitane u liniji *NPC1-I1061T*.

Hipoteza ovog dokorskog rada opovrgnuta je u kontekstu konačnog očekivanog rezultata istraživanja, da će delecija gena *BACE1* imati povoljan učinak na produljenje životnog vijeka miševa *knock-in NPC1-I1061T*.

- Delecija oba alela gena *BACE1* uzrokovala je vrlo snažan fenotip u jedinki *knock-in NPC1-I1061T*. Jedinke N-KI B-KO rođene su u značajno smanjenom udjelu, uz preživljenje od svega četiri tjedna. Histopatološki, u odnosu na jedinke drugih genotipova, jedinke N-KI B-KO pokazuju nakupljanje vezikula endolizosomalnog puta, snažnu neuroinflamaciju te povišenu hiperfosforilaciju proteina tau već u dobi od četiri tjedna, ali odumiranje Purkinjeovih neurona nije zabilježeno. Rezultat da jedinke N-KI B-KO pokazuju snažnu progresiju bolesti NPC i povećan mortalitet u odnosu na jedinke N-KI B-WT ukazuje da se funkcije proteina NPC1 i BACE1 isprepliću i/ili da njihov nedostatak uzrokuje poremećaj funkcije istih ili sličnih molekularnih puteva.
- Delecija jednog alela gena *BACE1* rezultirala je ranijim mortalitetom jedinki N-KI B-HET (15 tjedana, u odnosu na 18 tjedana karakterističnih za jedinke N-KI B-WT).

Međutim, u ranoj fazi bolesti (od asimptomatske do simptomatske faze) uočen je višestruki učinak delecije jednog alela gena *BACE1* na neuropatološke značajke bolesti NPC u miševa *knock-in NPC1-I1061T*.

- Jedinke N-KI B-HET u odnosu na jedinke N-KI B-WT pokazuju usporeno odumiranje Purkinjeovih neurona u malom mozgu do simptomatske fazi bolesti, nakon čega slijedi progresivnija neurodegeneracija.



- Jedinke N-KI B-HET u odnosu na jedinke N-KI B-WT pokazuju smanjeno nakupljanje ranih endosoma i lizosoma, što je vidljivo u svim ispitivanim regijama mozga te u svim ispitivanim dobnim skupinama.
- Jedinke N-KI B-HET u odnosu na jedinke N-KI B-WT pokazuju smanjenu aktivaciju astrocita u malom mozgu i kori velikog mozga svih ispitivanih dobnih skupina.
- Jedinke N-KI B-HET u odnosu na jedinke N-KI B-WT pokazuju povećanu aktivaciju već aktivnih mikroglija u svim ispitivanim regijama mozga i dobnim skupinama. Ovakva „hiperaktivacija“ mikroglija vjerojatno doprinosi fagocitnoj razgradnji Purkinjeovih neurona, što pospješuje neurodegeneraciju i/ili mortalitet.
- Jedinke N-KI B-HET u odnosu na jedinke N-KI B-WT pokazuju povišenu razinu fosforilacije proteina tau u simptomatskoj fazi, ali sniženu razinu fosforilacije proteina tau u završnoj fazi bolesti.

Delecija jednog alela gena *BACE1* nije rezultirala smanjenjem razine proteina BACE1 za 50% u odnosu na jedinke divljeg tipa. Unatoč tome, smanjena je razina cijepanja supstrata APP, SEZ6 i SEZ6L, izuzev zabilježene povećane razine cijepanja proteina SEZ6L u malom mozgu svih ispitivanih dobnih skupina.

Genetičkim smanjenjem razine enzima BACE1 u mišjem modelu *knock-in NPC1-I1061T* utvrđen je povoljan, ali i štetan učinak na razinu i progresiju neuropatoloških značajki bolesti NPC. Ovo istraživanje ukazuje na značaj enzima BACE1 u ranoj fazi postnatalnog razvoja, i to ne samo u vidu funkcije  $\beta$ -sekretaze, već kao potencijalne farmakološke mete uključene u niz neuropatoloških molekularnih procesa (npr. neuroinflamaciju) u podlozi bolesti NPC.

Buduća istraživanja trebala bi razjasniti učinak smanjenja razine ili inhibicije enzima BACE1 nakon kritične postnatalne faze razvoja mozga, te utvrditi točnu ulogu ovog enzima i/ili njegovih supstrata u različitim tipovima moždanih stanica u patogenezi bolesti NPC, kao i u patogenezi mehanistički sličnih poremećaja lizosomalnog nakupljanja i neurodegenerativnih bolesti.

## 7. LITERATURA

1. Heras M Las, Szenfeld B, Ballout RA, Buratti E, Zanlungo S, Dardis A, Klein AD (2023) Understanding the phenotypic variability in Niemann-Pick disease type C (NPC): a need for precision medicine. *npj Genomic Medicine*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41525-023-00365-w>
2. Hammond N, Munkacsı AB, Sturley SL (2019) The complexity of a monogenic neurodegenerative disease: More than two decades of therapeutic driven research into Niemann-Pick type C disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(8):1109–1123. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.04.002>
3. Cvitanović-Šojat L, Malenica M, Kukuruzović M, Žigman T, Kužnik K, Bielen A (2014) Niemann-Pick disease type C: Mutations of NPC1 gene and the course of disease. *Paediatrica Croatica*, 58(4):255–261. <https://doi.org/10.13112/PC.2014.45>
4. Vanier MT (2010) Niemann-Pick disease type C. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-16>
5. Li X, Saha P, Lib J, Blobel G, Pfeffer SR (2016) Clues to the mechanism of cholesterol transfer from the structure of NPC1 middle luminal domain bound to NPC2. *PNAS*, 113(36):10079–10084. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611956113>
6. Infante RE, Wang ML, Radhakrishnan A, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL (2008) NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(40):15287–15292. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807328105>
7. Pfeffer SR (2016) Clues to NPC1-mediated cholesterol export from lysosomes. *PNAS*, 113(29):7941–7943. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608530113>
8. Li X, Lu F, Trinh MN, Schmiege P, Seemann J, Wang J, Blobel G (2017) 3.3 Å structure of Niemann-Pick C1 protein reveals insights into the function of the C-terminal luminal domain in cholesterol transport. *PNAS*, 114(34):9116–9121. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711716114>
9. Winkler MBL, Kidmose RT, Szomek M, Thaysen K, Rawson S, Muench SP, Wüstner D, Pedersen BP (2019) Structural Insight into Eukaryotic Sterol Transport through Niemann-Pick Type C Proteins. *Cell*, 179(2):485–497. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.038>
10. Saha P, Shumate JL, Caldwell JG, Elghobashi-Meinhardt N, Lu A, Zhang L, Olsson NE, Elias JE, Pfeffer SR (2020) Inter-domain dynamics drive cholesterol transport by NPC1 and NPC1L1 proteins. *eLife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.57089>
11. Nguyen Trinh M, Brown MS, Seemann J, Goldstein JL, Lu F (2018) Lysosomal cholesterol export reconstituted from fragments of Niemann-Pick C1. *eLIFE*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.38564.001>
12. Pacheco CD, Lieberman AP (2008) The pathogenesis of Niemann-Pick type C disease: A role for autophagy? *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 10(26). <https://doi.org/10.1017/S146239940800080X>
13. Shammaş H, Kuech EM, Rizk S, Das AM, Naim HY (2019) Different Niemann-Pick C1 Genotypes Generate Protein Phenotypes that Vary in their Intracellular Processing,

- Trafficking and Localization. *Nature Scientific Reports*, 9(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-41707-y>
14. Walterfang M, Fietz M, Fahey M, Sullivan D, Leane P, Lubman DI, Velakoulis D (2006) The Neuropsychiatry of Niemann-Pick Type C Disease in Adulthood. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 18(2):158–170.  
<https://doi.org/10.1176/jnp.2006.18.2.158>
  15. Vanier MT (2015) Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38(1):187–199. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9794-4>
  16. Fog CK, Kirkegaard T (2019) Animal models for Niemann-Pick type C: implications for drug discovery & development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14(5):499–509.  
<https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1588882>
  17. Cologna SM, Jiang XS, Backlund PS, Cluzeau CVM, Dail MK, Yanjanin NM, Siebel S, Toth CL, Jun H, Wassif CA, Yergey AL, Porter FD (2012) Quantitative Proteomic Analysis of Niemann-Pick Disease, Type C1 Cerebellum Identifies Protein Biomarkers and Provides Pathological Insight. *PLoS ONE*, 7(10).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047845>
  18. Hendriksz CJ, Anheim M, Bauer P, Bonnot O, Chakrapani A, Corvol J-C, Koning TJ De, Degtyareva A, Dionisi-Vici C, Doss S, Duning T, Giunti P, Iodice R, Johnston T, Kelly D, Klünemann H-H, Lorenzl S, Padovani A, Pocovi M, Synofzik M, Terblanche A, Then Bergh F, Topçu M, Walterfang M, Velten CE, Kolb SA (2017) The hidden Niemann-Pick type C patient: clinical niches for a rare inherited metabolic disease. *Current Medical Research and Opinion*, 33(5):877–890. <https://doi.org/10.1080/03007995.2017.1294054>
  19. Curelaru S, Zehavi Y, Almagor T, Spiegel R (2021) Favorable outcomes following early onset oral miglustat in early infantile Niemann Pick Type C. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 27. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2021.100739>
  20. Pineda M, Walterfang M, Patterson MC (2018) Miglustat in Niemann-Pick disease type C patients: A review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 13(1).  
<https://doi.org/10.1186/s13023-018-0844-0>
  21. Patterson MC, Mengel E, Vanier MT, Moneuse P, Rosenberg D, Pineda M (2020) Treatment outcomes following continuous miglustat therapy in patients with Niemann-Pick disease Type C: A final report of the NPC Registry. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 15(1).  
<https://doi.org/10.1186/s13023-020-01363-2>
  22. Peake KB, Vance JE (2012) Normalization of cholesterol homeostasis by 2-hydroxypropyl- $\beta$ - cyclodextrin in neurons and glia from Niemann-Pick C1 (NPC1)-deficient mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(12):9290–9298.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.326405>
  23. Berry-Kravis E, Chin J, Hoffmann A, Winston A, Stoner R, LaGorio L, Friedmann K, Hernandez M, Ory DS, Porter FD, O’Keefe JA (2018) Long-Term Treatment of Niemann-Pick Type C1 Disease With Intrathecal 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin. *Pediatric Neurology*, 80:24–34. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2017.12.014>
  24. Fiorenza MT, Rosa P La, Canterini S, Erickson RP (2023) The Cerebellum in Niemann-Pick C1 Disease: Mouse Versus Man. *The Cerebellum*, 22(1):102–119.  
<https://doi.org/10.1007/s12311-021-01347-3>

25. Weering JRT van, Scheper W (2019) Endolysosome and Autolysosome Dysfunction in Alzheimer's Disease: Where Intracellular and Extracellular Meet. *CNS Drugs*, 33(7):639–648. <https://doi.org/10.1007/s40263-019-00643-1>
26. Nixon RA (2013) The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, 19(8):983–997. <https://doi.org/10.1038/nm.3232>
27. Malnar M, Hecimovic S, Mattsson N, Zetterberg H (2014) Bidirectional links between Alzheimer's disease and Niemann-Pick type C disease. *Neurobiology of Disease*, 72:37–47. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.05.033>
28. Gelsthorpe ME, Baumann N, Millard E, Gale SE, Langmade SJ, Schaffer JE, Ory DS (2008) Niemann-Pick type C1 I1061T mutant encodes a functional protein that is selected for endoplasmic reticulum-associated degradation due to protein misfolding. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(13):8229–8236. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708735200>
29. Liao G, Wen Z, Irizarry K, Huang Y, Mitsouras K, Darmani M, Leon T, Shi L, Bi X (2010) Abnormal gene expression in cerebellum of Npc1<sup>-/-</sup> mice during postnatal development. *Brain Research*, 1325:128–140. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.02.019>
30. Yu T, Shakkottai VG, Chung C, Lieberman AP (2011) Temporal and cell-specific deletion establishes that neuronal Npc1 deficiency is sufficient to mediate neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*, 20(22):4440–4451. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr372>
31. Higashi Y, Murayama S, Pentchev G, Suzuki K (1993) Cerebellar degeneration in the Niemann-Pick type C mouse. *Acta Neuropathologica*, 85(2):175–184. <https://doi.org/10.1007/BF00227765>
32. Fu H, Hardy J, Duff KE (2018) Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience*, 21(10):1350–1358. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0221-2>
33. Sarna JR, Hawkes R (2003) Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. *Progress in Neurobiology*, 70(6):473–507. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(03\)00114-X](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00114-X)
34. Elrick MJ, Pacheco CD, Yu T, Dadgar N, Shakkottai VG, Ware C, Paulson HL, Lieberman AP (2010) Conditional Niemann-Pick C mice demonstrate cell autonomous Purkinje cell neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*, 19(5):837–847. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp552>
35. Ko DC, Milenkovic L, Beier SM, Manuel H, Buchanan JA, Scott MP (2005) Cell-autonomous death of cerebellar Purkinje neurons with autophagy in Niemann-Pick type C disease. *PLoS Genetics*, 1(1):0081–0095. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010007>
36. Prasad A, Fischer WA, Maue RA, Henderson LP (2000) Regional and Developmental Expression of the Npc1 mRNA in the Mouse Brain. *Journal of Neurochemistry*, 75(3):1250–1257. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0751250.x>
37. Boyle BR, Melli SE, Altreche RS, Padron ZM, Yousufzai FAK, Kim S, Vasquez MD, Carone DM, Carone BR, Soto I (2020) NPC1 deficiency impairs cerebellar postnatal development of microglia and climbing fiber refinement in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. *Development*, 147(21). <https://doi.org/10.1242/dev.189019>
38. Sarkar S, Carroll B, Buganim Y, Maetzel D, Ng AHM, Cassidy JP, Cohen MA, Chakraborty S, Wang H, Spooner E, Ploegh H, Gsponer J, Korolchuk VI, Jaenisch R (2013) Impaired autophagy in the lipid-storage disorder Niemann-Pick type C1 disease. *Cell Reports*, 5(5):1302–1315. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.042>

39. Elrick MJ, Yu T, Chung C, Lieberman AP (2012) Impaired proteolysis underlies autophagic dysfunction in Niemann-Pick type C disease. *Human Molecular Genetics*, 21(22):4876–4887. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds324>
40. Yu W, Gong JS, Ko M, Garver WS, Yanagisawa K, Michikawa M (2005) Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick type C1 mouse brains affects mitochondrial function. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(12):11731–11739. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412898200>
41. Torres S, García-Ruiz CM, Fernández-Checa JC (2019) Mitochondrial Cholesterol in Alzheimer’s Disease and Niemann-Pick Type C Disease. *Frontiers in Neurology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01168>
42. Paulina Ordonez M, Roberts EA, Kidwell CU, Yuan SH, Plaisted WC, Goldstein LSB (2012) Disruption and therapeutic rescue of autophagy in a human neuronal model of Niemann pick type C1. *Human Molecular Genetics*, 21(12):2651–2662. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds090>
43. Torres S, Balboa E, Zanlungo S, Enrich C, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC (2017) Lysosomal and mitochondrial liaisons in Niemann-Pick disease. *Frontiers in Physiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00982>
44. Lopez ME, Klein AD, Dimbil UJ, Scott MP (2011) Anatomically defined neuron-based rescue of neurodegenerative Niemann-Pick type C disorder. *The Journal of Neuroscience*, 31(12):4367–4378. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5981-10.2011>
45. Borbon I, Totenhagen J, Fiorenza MT, Canterini S, Ke W, Trouard T, Erickson RP (2012) Niemann-Pick C1 mice, a model of “juvenile Alzheimer’s disease”, with normal gene expression in neurons and fibrillary astrocytes show long term survival and delayed neurodegeneration. *Journal of Alzheimer’s Disease*, 30(4):875–887. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120199>
46. Loftus SK, Erickson RP, Walkley SU, Bryant MA, Incao A, Heidenreich RA, Pavan WJ (2002) Rescue of neurodegeneration in Niemann-Pick C mice by a prion-promoter-driven Npc1 cDNA transgene. *Human Molecular Genetics*, 11(24):3107–3114. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.24.3107>
47. Treiber-Held S, Distl R, Meske V, Albert F, Ohm TG (2003) Spatial and temporal distribution of intracellular free cholesterol in brains of a Niemann-Pick type C mouse model showing hyperphosphorylated tau protein. Implications for Alzheimer’s disease. *The Journal of Pathology*, 200(1):95–103. <https://doi.org/10.1002/path.1345>
48. Zhang M, Strnatka D, Donohue C, Hallows JL, Vincent I, Erickson RP (2008) Astrocyte-only Npc1 reduces neuronal cholesterol and triples life span of Npc1<sup>-/-</sup> mice. *Journal of Neuroscience Research*, 86(13):2848–2856. <https://doi.org/10.1002/jnr.21730>
49. Erickson RP (2013) Current controversies in Niemann-Pick C1 disease: Steroids or gangliosides; neurons or neurons and glia. *Journal of Applied Genetics*, 54(2):215–224. <https://doi.org/10.1007/s13353-012-0130-0>
50. Colombo A, Dinkel L, Müller SA, Sebastian Monasor L, Schifferer M, Cantuti-Castelvetri L, König J, Vidatic L, Bremova-Ertl T, Lieberman AP, Hecimovic S, Simons M, Lichtenthaler SF, Strupp M, Schneider SA, Tahirovic S (2021) Loss of NPC1 enhances phagocytic uptake and impairs lipid trafficking in microglia. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21428-5>



51. Yan X, Yang F, Lukas J, Witt M, Wree A, Rolfs A, Luo J (2014) Hyperactive glial cells contribute to axonal pathologies in the spinal cord of Npc1 mutant mice. *GLIA*, 62(7):1024–1040. <https://doi.org/10.1002/glia.22659>
52. Cougnoux A, Drummond RA, Collar AL, Iben JR, Salman A, Westgarth H, Wassif CA, Cawley NX, Farhat NY, Ozato K, Lionakis MS, Porter FD (2018) Microglia activation in Niemann-Pick disease, type C1 is amendable to therapeutic intervention. *Human Molecular Genetics*, 27(12):2076–2089. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy112>
53. Pressey SNR, Smith DA, Wong AMS, Platt FM, Cooper JD (2012) Early glial activation, synaptic changes and axonal pathology in the thalamocortical system of Niemann-Pick type C1 mice. *Neurobiology of Disease*, 45(3):1086–1100. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.027>
54. Barthelemy A, Demais V, Stancu I-C, Vasile E, Houben T, Reber M, Pallottini V, Perraut M, Reibel S, Pfrieder F, Pfrieder FW (2021) Glial contribution to cyclodextrin-mediated reversal of cholesterol accumulation in murine NPC1-deficient neurons in vivo. *Neurobiology of Disease*, 158. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105469>
55. Boisvert MM, Erikson GA, Shokhirev MN, Allen NJ (2018) The Aging Astrocyte Transcriptome from Multiple Regions of the Mouse Brain. *Cell Reports*, 22(1):269–285. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.039>
56. Patel SC, Suresh S, Kumar U, Hu CY, Cooney A, Blanchette-Mackie EJ, Neufeld EB, Patel RC, Brady RO, Patel YC, Pentchev PG, Ong WY (1999) Localization of Niemann-Pick C1 protein in astrocytes: Implications for neuronal degeneration in Niemann-Pick type C disease. *PNAS*, 96(4):1657–1662. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1657>
57. Buard I, Pfrieder FW (2014) Relevance of neuronal and glial NPC1 for synaptic input to cerebellar Purkinje cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 61:65–71. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2014.06.003>
58. Ong WY, Kumar U, Switzer RC, Sidhu A, Suresh G, Hu CY, Patel SC (2001) Neurodegeneration in Niemann-Pick type C disease mice. *Experimental Brain Research*, 141(2):218–231. <https://doi.org/10.1007/s002210100870>
59. Baudry M, Yao Y, Simmons D, Liu J, Bi X (2003) Postnatal development of inflammation in a murine model of Niemann-Pick type C disease: Immunohistochemical observations of microglia and astroglia. *Experimental Neurology*, 184(2):887–903. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00345-5](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00345-5)
60. Marshall CA, Watkins-Chow DE, Palladino G, Deutsch G, Chandran K, Pavan WJ, Erickson RP (2018) In Niemann-Pick C1 mouse models, glial-only expression of the normal gene extends survival much further than do changes in genetic background or treatment with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Gene*, 643:117–123. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.12.006>
61. Donohue C, Marion S, Erickson RP (2009) Expression of Npc1 in Glial Cells Corrects Sterility in Npc1<sup>-/-</sup> mice. *Journal of Applied Genetics*, 50(4):385–390. <https://doi.org/10.1007/BF03195698>
62. Kavetsky L, Green KK, Boyle BR, Yousufzai FAK, Padron ZM, Melli SE, Kuhnel VL, Jackson HM, Blanco RE, Howell GR, Soto I (2019) Increased interactions and engulfment of dendrites by microglia precede Purkinje cell degeneration in a mouse

model of Niemann Pick Type-C. *Nature Scientific Reports*, 9(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-51246-1>

63. Cougnoux A, Yerger JC, Fellmeth M, Serra-Vinardell J, Martin K, Navid F, Iben J, Wassif CA, Cawley NX, Porter FD (2020) Single cell transcriptome analysis of Niemann-Pick disease, type C1 cerebella. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15):1–23.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21155368>
64. Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, Khoury J El (2018) Microglia in neurodegeneration. *Nature Neuroscience*, 21(10):1359–1369. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x>
65. Huang Y, Mucke L (2012) Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*, 148(6):1204–1222. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.040>
66. Watwood C (2011) Alzheimer's Disease. *DLPS Faculty Publications*,  
[http://digitalcommons.wku.edu/dlps\\_fac\\_pub/39](http://digitalcommons.wku.edu/dlps_fac_pub/39) (pristupljeno 19. siječnja 2024.)
67. Pacheco CD, Elrick MJ, Lieberman AP (2009) Tau normal function influences Niemann-Pick type C disease pathogenesis in mice and modulates autophagy in NPC1-deficient cells. *Autophagy*, 5(4):548–550. <https://doi.org/10.4161/auto.5.4.8364>
68. Auer IA, Schmidt ML, Lee VM-Y, Curry B, Suzuki K, Shin R-W, Pentchev PG, Carstea ED, Trojanowski JQ (1995) Paired helical filament tau (PHFtau) in Niemann-Pick type C disease is similar to PHFtau in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 90:547–551.  
<https://doi.org/10.1007/BF00318566>
69. Zhang M, Li J, Chakrabarty P, Bu B, Vincent I (2004) Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Attenuate Protein Hyperphosphorylation, Cytoskeletal Lesion Formation, and Motor Defects in Niemann-Pick Type C Mice. *American Journal of Pathology*, 165(3):843–853.  
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63347-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63347-0)
70. Suzuki K, Parker CC, Pentchev PG, Katz D, Ghetti B, D'Agostino AN, Carstea ED (1995) Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. *Acta Neuropathologica*, 89:227–238. <https://doi.org/10.1007/BF00309338>
71. Tuck BJ, Miller LVC, Katsinelos T, Smith AE, Wilson EL, Keeling S, Cheng S, Vaysburd MJ, Knox C, Tredgett L, Metzakopian E, James LC, McEwan WA (2022) Cholesterol determines the cytosolic entry and seeded aggregation of tau. *Cell Reports*, 39(5).  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110776>
72. Fan Q-W, Yu W, Senda T, Yanagisawa K, Michikawa M (2001) Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons. *Journal of Neurochemistry*, 76:391–400. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00063.x>
73. Sawamura N, Gong JS, Garver WS, Heidenreich RA, Ninomiya H, Ohno K, Yanagisawa K, Michikawa M (2001) Site-specific Phosphorylation of Tau Accompanied by Activation of Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) in Brains of Niemann-Pick Type C Mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(13):10314–10319.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M009733200>
74. Bu B, Klunemann H, Suzuki K, Li J, Bird T, Jin LW, Vincent I (2002) Niemann-Pick disease type C yields possible clue for why cerebellar neurons do not form neurofibrillary tangles. *Neurobiology of Disease*, 11(2):285–297. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2002.0551>

75. Pacheco CD, Elrick MJ, Lieberman AP (2009) Tau deletion exacerbates the phenotype of Niemann-Pick type C mice and implicates autophagy in pathogenesis. *Human Molecular Genetics*, 18(5):956–965. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn423>
76. Park WD, O'Brien JF, Lundquist PA, Kraft DL, Vockley CW, Karnes PS, Patterson MC, Snow K (2003) Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: Correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. *Human Mutation*, 22(4):313–325. <https://doi.org/10.1002/humu.10255>
77. Garver WS, Jelinek D, Meaney FJ, Flynn J, Pettit KM, Shepherd G, Heidenreich RA, Walsh Vockley CM, Castro G, Francis GA (2010) The national Niemann-Pick type C1 disease database: Correlation of lipid profiles, mutations, and biochemical phenotypes. *Journal of Lipid Research*, 51(2):406–415. <https://doi.org/10.1194/jlr.P000331>
78. Millat G, Marçais C, Rafi MA, Yamamoto T, Morris JA, Pentchev PG, Ohno K, Wenger DA, Vanier MT (1999) Niemann-Pick C1 Disease: The I1061T Substitution Is a Frequent Mutant Allele in Patients of Western European Descent and Correlates with a Classic Juvenile Phenotype. *The American Journal of Human Genetics*, 65:1321–1329. <https://doi.org/10.1086/302626>
79. Schultz ML, Krus KL, Kaushik S, Dang D, Chopra R, Qi L, Shakkottai VG, Cuervo AM, Lieberman AP (2018) Coordinate regulation of mutant NPC1 degradation by selective ER autophagy and MARCH6-dependent ERAD. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06115-2>
80. Nakasone N, Nakamura YS, Higaki K, Oumi N, Ohno K, Ninomiya H (2014) Endoplasmic reticulum-associated degradation of Niemann-Pick C1: Evidence for the role of heat shock proteins and identification of lysine residues that accept ubiquitin. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(28):19714–19725. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.549915>
81. Yu T, Chung C, Shen D, Xu H, Lieberman AP (2012) Ryanodine receptor antagonists adapt NPC1 proteostasis to ameliorate lipid storage in Niemann-Pick type C disease fibroblasts. *Human Molecular Genetics*, 21(14):3205–3214. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds145>
82. Völkner C, Pantoom S, Liedtke M, Lukas J, Hermann A, Frech MJ (2022) Assessment of FDA-Approved Drugs as a Therapeutic Approach for Niemann-Pick Disease Type C1 Using Patient-Specific iPSC-Based Model Systems. *Cells*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/cells11030319>
83. Subramanian K, Hutt DM, Scott SM, Gupta V, Mao S, Balch WE (2020) Correction of Niemann-Pick type C1 trafficking and activity with the histone deacetylase inhibitor valproic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 295(23):8017–8035. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA119.010524>
84. Pipalia NH, Saad SZ, Subramanian K, Cross A, al-Motawa A, Garg K, Blagg BSJ, Neckers L, Helquist P, Wiest O, Ory DS, Maxfield FR (2021) HSP90 inhibitors reduce cholesterol storage in Niemann-Pick type C1 mutant fibroblasts. *Journal of Lipid Research*, 62. <https://doi.org/10.1016/J.JLR.2021.100114>
85. Praggastis M, Tortelli B, Zhang J, Fujiwara H, Sidhu R, Chacko A, Chen Z, Chung C, Lieberman AP, Sikora J, Davidson C, Walkley SU, Pipalia NH, Maxfield FR, Schaffer JE, Ory DS (2015) A murine Niemann-Pick C1 I1061T knock-In model recapitulates the pathological features of the most prevalent human disease allele. *The Journal of Neuroscience*, 35(21):8091–8106. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4173-14.2015>

86. WHO (2023) Dementia. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (pristupljeno 19. siječnja 2024.)
87. Elahi M, Hasan Z, Motoi Y, Matsumoto SE, Ishiguro K, Hattori N (2016) Region-specific vulnerability to oxidative stress, neuroinflammation, and tau hyperphosphorylation in experimental diabetes mellitus mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 51(4):1209–1224. <https://doi.org/10.3233/JAD-150820>
88. Sathya M, Premkumar P, Karthick C, Moorthi P, Jayachandran KS, Anusuyadevi M (2012) BACE1 in Alzheimer's disease. *Clinica Chimica Acta*, 414:171–178. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.08.013>
89. Esposito M, Sherr GL (2019) Epigenetic modifications in Alzheimer's neuropathology and therapeutics. *Frontiers in Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00476>
90. Breijyeh Z, Karaman R (2020) Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, 25(24). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245789>
91. Long S, Benoist C, Weidner W (2023) World Alzheimer Report 2023: Reducing dementia risk: never too early, never too late. *Alzheimer's Disease International*, <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2023/> (pristupljeno 16. siječnja 2024.)
92. Peters F, Salihoglu H, Rodrigues E, Herzog E, Blume T, Filser S, Dorostkar M, Shimshek DR, Brose N, Neumann U, Herms J (2018) BACE1 inhibition more effectively suppresses initiation than progression of  $\beta$ -amyloid pathology. *Acta Neuropathologica*, 135(5):695–710. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1804-9>
93. Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS, Cairns NJ, Xie X, Blazey TM, Holtzman DM, Santacruz A, Buckles V, Oliver A, Moulder K, Aisen PS, Ghetti B, Klunk WE, McDade E, Martins RN, Masters CL, Mayeux R, Ringman JM, Rossor MN, Schofield PR, Sperling RA, Salloway S, Morris JC (2012) Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 367(9):795–804. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1202753>
94. Wang HF, Shen XN, Li JQ, Suckling J, Tan CC, Wang YJ, Feng L, Zhang C, Tan L, Dong Q, Touchon J, Gauthier S, Yu JT (2020) Clinical and biomarker trajectories in sporadic Alzheimer's disease: A longitudinal study. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*, 12(1). <https://doi.org/10.1002/dad2.12095>
95. Theron D, Hopkins LN, Sutherland HG, Griffiths LR, Fernandez F (2023) Can Genetic Markers Predict the Sporadic Form of Alzheimer's Disease? An Updated Review on Genetic Peripheral Markers. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17). <https://doi.org/10.3390/ijms241713480>
96. Ausó E, Gómez-Vicente V, Esquivá G (2020) Biomarkers for alzheimer's disease early diagnosis. *Journal of Personalized Medicine*, 10(3):1–27. <https://doi.org/10.3390/jpm10030114>
97. Lista S, O'Bryant SE, Blennow K, Dubois B, Hugon J, Zetterberg H, Hampel H (2015) Biomarkers in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 47(2):291–317. <https://doi.org/10.3233/JAD-143006>

98. Reddy J V, Ganley IG, Pfeffer SR (2006) Clues to neuro-degeneration in Niemann-Pick type C disease from global gene expression profiling. *PLoS ONE*, 1(1):e19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000019>
99. Malnar M, Kosicek M, Lisica A, Posavec M, Krolo A, Njavro J, Omerbasic D, Tahirovic S, Hecimovic S (2012) Cholesterol-depletion corrects APP and BACE1 mistrafficking in NPC1-deficient cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(8):1270–1283. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.04.002>
100. Kågedal K, Kim WS, Appelqvist H, Chan S, Cheng D, Agholme L, Barnham K, McCann H, Halliday G, Garner B (2010) Increased expression of the lysosomal cholesterol transporter NPC1 in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(8):831–838. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.05.005>
101. Cupidi C, Frangipane F, Gallo M, Clodomiro A, Colao R, Bernardi L, Anfossi M, Conidi ME, Vasso F, Curcio SAM, Mirabelli M, Smirne N, Torchia G, Muraca MG, Puccio G, Lorenzo R Di, Zampieri S, Romanello M, Dardis A, Maletta RG, Bruni AC (2017) Role of niemann-pick Type C disease mutations in dementia. *Journal of Alzheimer's Disease*, 55(3):1249–1259. <https://doi.org/10.3233/JAD-160214>
102. Borbon IA, Erickson RP (2011) Interactions of Npc1 and amyloid accumulation/deposition in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's. *Journal of Applied Genetics*, 52(2):213–218. <https://doi.org/10.1007/s13353-010-0021-1>
103. Raghavan NS, Brickman AM, Andrews H, Manly JJ, Schupf N, Lantigua R, Wolock CJ, Kamalakaran S, Petrovski S, Tosto G, Vardarajan BN, Goldstein DB, Mayeux R (2018) Whole-exome sequencing in 20,197 persons for rare variants in Alzheimer's disease. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 5(7):832–842. <https://doi.org/10.1002/acn3.582>
104. Jansen IE, Savage JE, Watanabe K, Bryois J, Williams DM, Steinberg S, Sealock J, Karlsson IK, Hägg S, Athanasiu L, Voyle N, Proitsi P, Witoelar A, Stringer S, Aarsland D, Almdahl IS, Andersen F, Bergh S, Bettella F, Bjornsson S, Brækhus A, Bråthen G, Leeuw C de, Desikan RS, Djurovic S, Dumitrescu L, Fladby T, Hohman TJ, Jonsson P V, Kiddle SJ, Rongve A, Saltvedt I, Sando SB, Selbæk G, Shoai M, Skene NG, Snaedal J, Stordal E, Ulstein ID, Wang Y, White LR, Hardy J, Hjerling-Leffler J, Sullivan PF, Flier WM van der, Dobson R, Davis LK, Stefansson H, Stefansson K, Pedersen NL, Ripke S, Andreassen OA, Posthuma D (2019) Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nature Genetics*, 51(3):404–413. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0311-9>
105. Kunkle BW, Grenier-Boley B, Sims R, Bis JC, Damotte V, Naj AC, Boland A, Vronskaya M, Lee SJ van der, Amlie-Wolf A, et al. (2019) Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A $\beta$ , tau, immunity and lipid processing. *Nature Genetics*, 51(3):414–430. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0358-2>
106. Selkoe DJ, Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6):595–608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>
107. Tensaouti Y, Stephanz EP, Yu TS, Kernie SG (2018) ApoE regulates the development of adult newborn hippocampal neurons. *eNeuro*, 5(4). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0155-18.2018>



108. Tew J, Goate AM (2017) Genetics of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(6).  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024539>
109. Small SA, Petsko GA (2015) The  $\beta$ -secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 16:126–132.  
<https://doi.org/10.1038/nrn3896>
110. Small SA, Kent K, Pierce A, Leung C, Kang MS, Okada H, Honig L, Vonsattel JP, Kim TW (2005) Model-guided microarray implicates the retromer complex in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 58(6):909–919. <https://doi.org/10.1002/ana.20667>
111. Zhang H, Huang T, Hong Y, Yang W, Zhang X, Luo H, Xu H, Wang X (2018) The retromer complex and sorting nexins in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10:79. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00079>
112. Li JG, Chiu J, Ramanjulu M, Blass BE, Praticò D (2020) A pharmacological chaperone improves memory by reducing A $\beta$  and tau neuropathology in a mouse model with plaques and tangles. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1).  
<https://doi.org/10.1186/s13024-019-0350-4>
113. Dominko K, Rastija A, Sobocanec S, Vidatic L, Meglaj S, Babic AL, Hutter-Paier B, Colombo AV, Lichtenthaler SF, Tahirovic S, Hecimovic S (2021) Impaired retromer function in Niemann-Pick type C disease is dependent on intracellular cholesterol accumulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22:13256.  
<https://doi.org/10.3390/ijms222413256>
114. Dominko K (2020) Utjecaj unutarstaničnoga kolesterola i C-terminalnoga odsječka proteina prekursora amiloida  $\beta$  na funkciju retromera u modelima Alzheimerove bolesti. Doktorski rad (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu).  
<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:191606>
115. Mattsson N, Olsson M, Gustavsson MK, Kosicek M, Malnar M, Månsson JE, Blomqvist M, Gobom J, Andreasson U, Brinkmalm G, Vite C, Hecimovic S, Hastings C, Blennow K, Zetterberg H, Portelius E (2012) Amyloid- $\beta$  metabolism in Niemann-Pick C disease models and patients. *Metabolic Brain Disease*, 27(4):573–585.  
<https://doi.org/10.1007/s11011-012-9332-8>
116. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis J-C, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999)  $\beta$ -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane. *Science*, 286(5440):735–741. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.735>
117. Roberds SL, Anderson J, Basi G, Bienkowski MJ, Branstetter DG, Chen KS, Freedman SB, Frigon NL, Games D, Hu K, Johnson-Wood K, Kappenman KE, Kawabe TT, Kola I, Kuehn R, Lee M, Liu W, Motter R, Nichols NF, Power M, Robertson DW, Schenk D, Schoor M, Shopp GM, Shuck ME, Sinha S, Svensson KA, Tatsuno G, Tintrup H, Wijsman J, Wright S, Mcconlogue L (2001) BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary  $\beta$ -secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Human Molecular Genetics*, 10(12):1317–1324.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/10.12.1317>

118. Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis J-C, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's  $\beta$ -secretase, have normal phenotype and abolished  $\beta$ -amyloid generation. *Nature Neuroscience*, 4(3):231–232. <https://doi.org/10.1038/85059>
119. Syeda T, Cannon JR (2021) Environmental exposures and the etiopathogenesis of Alzheimer's disease: The potential role of BACE1 as a critical neurotoxic target. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(4). <https://doi.org/10.1002/jbt.22694>
120. Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, Rittger A, Destrooper B, Saftig P, Birchmeier C, Haass C (2006) Control of Peripheral Nerve Myelination by the  $\beta$ -Secretase BACE1. *Science*, 314(5799):664–666. <https://doi.org/10.1126/science.1132341>
121. Prabhu Y, Burgos P V, Schindler C, Fariás GG, Magadán JG, Bonifacino JS (2012) Adaptor protein 2-mediated endocytosis of the  $\beta$ -secretase BACE1 is dispensable for amyloid precursor protein processing. *Molecular Biology of the Cell*, 23(12):2339–2351. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-11-0944>
122. Hartlage-Rübsamen M, Zeitschel U, Apelt J, Gärtner U, Franke H, Stahl T, Günther A, Schliebs R, Penkowa M, Bigl V, Roßner S (2003) Astrocytic expression of the Alzheimer's disease  $\beta$ -secretase (BACE1) is stimulus-dependent. *GLIA*, 41(2):169–179. <https://doi.org/10.1002/glia.10178>
123. Roßner S, Lange-Dohna C, Zeitschel U, Perez-Polo JR (2005) Alzheimer's disease  $\beta$ -secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. *Journal of Neurochemistry*, 92(2):226–234. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02857.x>
124. Roßner S, Apelt J, Schliebs R, Regino Perez-Polo J, Bigl V (2001) Neuronal and Glial-Secretase (BACE) Protein Expression in Transgenic Tg2576 Mice With Amyloid Plaque Pathology. *Journal of Neuroscience Research*, 64:437–446. <https://doi.org/10.1002/jnr.1095>
125. Dominguez D, Tournoy J, Hartmann D, Huth T, Cryns K, Deforce S, Serneels L, Camacho IE, Marjaux E, Craessaerts K, Roebroek AJM, Schwake M, D'Hooge R, Bach P, Kalinke U, Moechars D, Alzheimer C, Reiss K, Saftig P, Strooper B De (2005) Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(35):30797–30806. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505249200>
126. Cai H, Wang Y, Mccarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC (2001) BACE1 is the major  $\beta$ -secretase for generation of A $\beta$  peptides by neurons. *Nature Neuroscience*, 4(3):233–234. <https://doi.org/10.1038/85064>
127. Müller UC, Deller T, Korte M (2017) Not just amyloid: Physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(5):281–298. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29>
128. Chami L, Checler F (2012) BACE1 is at the crossroad of a toxic vicious cycle involving cellular stress and beta-amyloid production in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 7(52). <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-52>
129. Habchi J, Chia S, Galvagnion C, Michaels TCT, Bellaiche MMJ, Ruggeri FS, Sanguanini M, Idini I, Kumita JR, Sparr E, Linse S, Dobson CM, Knowles TPJ, Vendruscolo M (2018) Cholesterol catalyses A $\beta$ 42 aggregation through a heterogeneous nucleation pathway in the presence of lipid membranes. *Nature Chemistry*, 10(6):673–683. <https://doi.org/10.1038/s41557-018-0031-x>

130. Tamayev R, Matsuda S, Arancio O, D'Adamio L (2012)  $\beta$ - but not  $\gamma$ -secretase proteolysis of APP causes synaptic and memory deficits in a mouse model of dementia. *EMBO Molecular Medicine*, 4(3):171–179. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100195>
131. Hu X, Das B, Hou H, He W, Yan R (2018) BACE1 deletion in the adult mouse reverses preformed amyloid deposition and improves cognitive functions. *Journal of Experimental Medicine*, 215(3):927–940. <https://doi.org/10.1084/jem.20171831>
132. Jiang Y, Rigoglioso A, Peterhoff CM, Pawlik M, Sato Y, Bleiwas C, Stavrides P, Smiley JF, Ginsberg SD, Mathews PM, Levy E, Nixon RA (2016) Partial BACE1 reduction in a Down syndrome mouse model blocks Alzheimer-related endosomal anomalies and cholinergic neurodegeneration: Role of APP-CTF. *Neurobiology of Aging*, 39:90–98. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.11.013>
133. Kim S, Sato Y, Mohan PS, Peterhoff C, Pensalfini A, Rigoglioso A, Jiang Y, Nixon RA (2016) Evidence that the rab5 effector APPL1 mediates APP- $\beta$ CTF-induced dysfunction of endosomes in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, 21(5):707–716. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.97>
134. Pensalfini A, Kim S, Subbanna S, Bleiwas C, Goulbourne CN, Stavrides PH, Jiang Y, Lee JH, Darji S, Pawlik M, Huo C, Peddy J, Berg MJ, Smiley JF, Basavarajappa BS, Nixon RA (2020) Endosomal Dysfunction Induced by Directly Overactivating Rab5 Recapitulates Prodromal and Neurodegenerative Features of Alzheimer's Disease. *Cell Reports*, 33(8). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108420>
135. Moore S, Evans LDB, Andersson T, Portelius E, Smith J, Dias TB, Saurat N, McGlade A, Kirwan P, Blennow K, Hardy J, Zetterberg H, Livesey FJ (2015) APP Metabolism Regulates Tau Proteostasis in Human Cerebral Cortex Neurons. *Cell Reports*, 11(5):689–696. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.068>
136. Jin L-W, Maezawa I, Vincent I, Bird T (2004) Intracellular Accumulation of Amyloidogenic Fragments of Amyloid-Precursor Protein in Neurons with Niemann-Pick Type C Defects Is Associated with Endosomal Abnormalities. *American Journal of Pathology*, 164(3):975–985. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63185-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63185-9)
137. Esposito M, Dubbioso R, Tozza S, Iodice R, Aiello M, Nicolai E, Cavaliere C, Salvatore M, Santoro L, Manganelli F (2019) In vivo evidence of cortical amyloid deposition in the adult form of Niemann Pick type C. *Heliyon*, 5(11):e02776. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02776>
138. Saito Y, Suzuki K, Nanba E, Yamamoto T, Ohno K, Murayama S (2002) Niemann-Pick type C disease: Accelerated neurofibrillary tangle formation and amyloid  $\beta$  deposition associated with apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 homozygosity. *Annals of Neurology*, 52(3):351–355. <https://doi.org/10.1002/ana.10266>
139. Saito Y, Suzuki K, Hulette CM, Murayama S (2004) Aberrant Phosphorylation of Alpha-Synuclein in Human Niemann-Pick Type C1 Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 63(4):323–328. <https://doi.org/10.1093/jnen/63.4.323>
140. Gan L, Cookson MR, Petrucelli L, Spada AR La (2018) Converging pathways in neurodegeneration, from genetics to mechanisms. *Nature Neuroscience*, 21(10):1300–1309. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0237-7>
141. Marchi F De, Munitic I, Vidatic L, Papić E, Rački V, Nimac J, Jurak I, Novotni G, Rogelj B, Vuletic V, Liscic RM, Cannon JR, Buratti E, Mazzini L, Hecimovic S (2023)

- Overlapping Neuroimmune Mechanisms and Therapeutic Targets in Neurodegenerative Disorders. *Biomedicines*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102793>
142. Marchi F De, Franjkic T, Schito P, Russo T, Nimac J, Chami AA, Mele A, Vidatic L, Kriz J, Julien JP, Apic G, Russell RB, Rogelj B, Cannon JR, Baralle M, Agosta F, Hecimovic S, Mazzini L, Buratti E, Munitic I (2023) Emerging Trends in the Field of Inflammation and Proteinopathy in ALS/FTD Spectrum Disorder. *Biomedicines*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11061599>
  143. Platt FM (2018) Emptying the stores: Lysosomal diseases and therapeutic strategies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(2):133–150. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.214>
  144. Kandalepas PC, Sadleir KR, Eimer WA, Zhao J, Nicholson DA, Vassar R (2013) The Alzheimer's  $\beta$ -secretase BACE1 localizes to normal presynaptic terminals and to dystrophic presynaptic terminals surrounding amyloid plaques. *Acta Neuropathologica*, 126(3):329–352. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1152-3>
  145. Wirths O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Moussaoui S, Tremp G, Pradier L, Beyreuther K, Bayer TA (2001) Intraneuronal A $\beta$  accumulation precedes plaque formation in  $\beta$ -amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neuroscience Letters*, 306(1–2):76–82. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)01876-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)01876-6)
  146. Gowrishankar S, Yuan P, Wu Y, Schrag M, Paradise S, Grutzendler J, Camilli P De, Ferguson SM (2015) Massive accumulation of luminal protease-deficient axonal lysosomes at Alzheimer's disease amyloid plaques. *PNAS*, 112(28):E3699–E3708. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510329112>
  147. Ye X, Feng T, Tammineni P, Chang Q, Jeong YY, Margolis DJ, Cai H, Kusnecov A, Cai Q (2017) Regulation of synaptic amyloid- $\beta$  generation through bace1 retrograde transport in a mouse model of alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*, 37(10):2639–2655. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2851-16.2017>
  148. Ye X, Cai Q (2014) Snapin-mediated BACE1 retrograde transport is essential for its degradation in lysosomes and regulation of app processing in neurons. *Cell Reports*, 6(1):24–31. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.008>
  149. Koh YH, Arim CAF Von, Hyman BT, Tanzi RE, Tesco G (2005) BACE is degraded via the lysosomal pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(37):32499–32504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506199200>
  150. Zhao J, Fu Y, Yasvoina M, Shao P, Hitt B, O'Connor T, Logan S, Maus E, Citron M, Berry R, Binder L, Vassar R (2007)  $\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 levels become elevated in neurons around amyloid plaques: Implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *The Journal of Neuroscience*, 27(14):3639–3649. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4396-06.2007>
  151. Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, Irizarry MC (2002) Secretase Protein and Activity Are Increased in the Neocortex in Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*, 59(9):1381–1389. <https://doi.org/10.1001/archneur.59.9.1381>
  152. Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, Lannfelt L, Selkoe DJ (1995) The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by  $\beta$ -secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature Medicine*, 1(12):1291–1296. <https://doi.org/10.1038/nm1295-1291>

153. Yan R, Vassar R (2014) Targeting the  $\beta$  secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *The Lancet Neurology*, 13(3):319–329. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70276-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70276-X)
154. Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson P V, Bjornsson S, Stefansson H, Sulem P, Gudbjartsson D, Maloney J, Hoyte K, Gustafson A, Liu Y, Lu Y, Bhangale T, Graham RR, Huttenlocher J, Bjornsdottir G, Andreassen OA, Jonsson EG, Palotie A, Behrens TW, Magnusson OT, Kong A, Thorsteinsdottir U, Watts RJ, Stefansson K (2012) A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*, 488(7409):96–99. <https://doi.org/10.1038/nature11283>
155. Vassar R, Kuhn PH, Haass C, Kennedy ME, Rajendran L, Wong PC, Lichtenthaler SF (2014) Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: Current status and future prospects. *Journal of Neurochemistry*, 130(1):4–28. <https://doi.org/10.1111/jnc.12715>
156. Kuhn PH, Koroniak K, Hogg S, Colombo A, Zeitschel U, Willem M, Volbracht C, Schepers U, Imhof A, Hoffmeister A, Haass C, Roner S, Bräse S, Lichtenthaler SF (2012) Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons. *The EMBO Journal*, 31(14):3157–3168. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.173>
157. Pignoni M, Wanngren J, Kuhn PH, Munro KM, Gunnensen JM, Takeshima H, Feederle R, Voytyuk I, Strooper B De, Levasseur MD, Hrupka BJ, Müller SA, Lichtenthaler SF (2016) Seizure protein 6 and its homolog seizure 6-like protein are physiological substrates of BACE1 in neurons. *Molecular Neurodegeneration*, 11:67. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0134-z>
158. Qiu WQ, Luo S, Ma SA, Saminathan P, Li H, Gunnensen J, Gelbard HA, Hammond JW (2021) The Sez6 Family Inhibits Complement by Facilitating Factor I Cleavage of C3b and Accelerating the Decay of C3 Convertases. *Frontiers in Immunology*, 12:607641. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.607641>
159. Nash A, Aumann TD, Pignoni M, Lichtenthaler SF, Takeshima H, Munro KM, Gunnensen JM (2020) Lack of Sez6 Family Proteins Impairs Motor Functions, Short-Term Memory, and Cognitive Flexibility and Alters Dendritic Spine Properties. *Cerebral Cortex*, 30(4):2167–2184. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz230>
160. Gunnensen JM, Kim MH, Fuller SJ, Silva M De, Britto JM, Hammond VE, Davies PJ, Petrou S, Faber ESL, Sah P, Tan SS (2007) Sez-6 Proteins Affect Dendritic Arborization Patterns and Excitability of Cortical Pyramidal Neurons. *Neuron*, 56(4):621–639. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.018>
161. Miyazaki T, Hashimoto K, Uda A, Sakagami H, Nakamura Y, Saito S ya, Nishi M, Kume H, Tohgo A, Kaneko I, Kondo H, Fukunaga K, Kano M, Watanabe M, Takeshima H (2006) Disturbance of cerebellar synaptic maturation in mutant mice lacking BSRPs, a novel brain-specific receptor-like protein family. *FEBS Letters*, 580(17):4057–4064. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.06.043>
162. Zhu K, Peters F, Filser S, Herms J (2018) Consequences of Pharmacological BACE Inhibition on Synaptic Structure and Function. *Biological Psychiatry*, 84(7):478–487. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.04.022>
163. Das B, Yan R (2017) Role of BACE1 in Alzheimer's synaptic function. *Translational Neurodegeneration*, 6:23. <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0093-5>



164. Pigoni M, Gunnensen JM, Lichtenthaler SF (2017) Seizure-6 proteins highlight BACE1 functions in neurobiology. *Oncotarget*, 8(5):7214–7215. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13801>
165. Osaki G, Mitsui S, Yuri K (2011) The distribution of the seizure-related gene 6 (Sez-6) protein during postnatal development of the mouse forebrain suggests multiple functions for this protein: An analysis using a new antibody. *Brain Research*, 1386:58–69. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.02.025>
166. Ohno M, Cole SL, Yasvoina M, Zhao J, Citron M, Berry R, Disterhoft JF, Vassar R (2007) BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mic. *Neurobiology of Disease*, 26(1):134–145. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.12.008>
167. Weber M, Wu T, Meilandt WJ, Dominguez SL, Solanoy HO, Maloney JA, Ngu H, Baca M, Kung C, Lima L, Earr TK, Fleck D, Shields SD, Forrest WF, Foreman O, Warming S, Watts RJ, Scearce-Levie K (2017) BACE1 across species: A comparison of the in vivo consequences of BACE1 deletion in mice and rats. *Nature Scientific Reports*, 7:44249. <https://doi.org/10.1038/srep44249>
168. Hu X, Zhou X, He W, Yang J, Xiong W, Wong P, Wilson CG, Yan R (2010) BACE1 deficiency causes altered neuronal activity and neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*, 30(26):8819–8829. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1334-10.2010>
169. Chatila ZK, Kim E, Berl e C, Bylykbashi E, Rompala A, Oram MK, Gupta D, Kwak SS, Kim YH, Kim DY, Choi SH, Tanzi RE (2018) BACE1 regulates proliferation and neuronal differentiation of newborn cells in the adult hippocampus in mice. *eNeuro*, 5(4). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0067-18.2018>
170. Hu X, He W, Luo X, Tsubota KE, Yan R (2013) BACE1 Regulates Hippocampal Astrogenesis via the Jagged1-Notch Pathway. *Cell Reports*, 4(1):40–49. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.005>
171. Das B, Singh N, Yao AY, Zhou J, He W, Hu X, Yan R (2021) BACE1 controls synaptic function through modulating release of synaptic vesicles. *Molecular Psychiatry*, 26(11):6394–6410. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01166-2>
172. Sadleir KR, Eimer WA, Cole SL, Vassar R (2015) A $\beta$  reduction in BACE1 heterozygous null 5XFAD mice is associated with transgenic APP level. *Molecular Neurodegeneration*, 10:1. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-10-1>
173. Filser S, Ovsepian S V, Masana M, Blazquez-Llorca L, Elvang AB, Volbracht C, Müller MB, Jung CKE, Herms J (2015) Pharmacological inhibition of BACE1 impairs synaptic plasticity and cognitive functions. *Biological Psychiatry*, 77(8):729–739. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.10.013>
174. Satir TM, Agholme L, Karlsson A, Karlsson M, Karila P, Illes S, Bergström P, Zetterberg H (2020) Partial reduction of amyloid  $\beta$  production by  $\beta$ -secretase inhibitors does not decrease synaptic transmission. *Alzheimer's Research and Therapy*, 12(1):63. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00635-0>
175. Neumann U, Rueeger H, MacHauer R, Veenstra SJ, Lueoend RM, Tintelnot-Blomley M, Laue G, Beltz K, Vogt B, Schmid P, Frieauff W, Shimshek DR, Staufenbiel M, Jacobson LH (2015) A novel BACE inhibitor NB-360 shows a superior pharmacological profile

- and robust reduction of amyloid- $\beta$  and neuroinflammation in APP transgenic mice. *Molecular Neurodegeneration*, 10:44. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0033-8>
176. Hrabínova M, Pejchal J, Kucera T, Jun D, Schmidt M, Soukup O (2020) Is It the Twilight of BACE1 Inhibitors? *Current Neuropharmacology*, 19(1):61–77. <https://doi.org/10.2174/1570159x18666200503023323>
177. Malnar M, Kosicek M, Mitterreiter S, Omerbasic D, Lichtenthaler SF, Goate A, Hecimovic S (2010) Niemann-Pick type C cells show cholesterol dependent decrease of APP expression at the cell surface and its increased processing through the  $\beta$ -secretase pathway. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1802(7–8):682–691. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.05.006>
178. Kosicek M, Malnar M, Goate A, Hecimovic S (2010) Cholesterol accumulation in Niemann Pick type C (NPC) model cells causes a shift in APP localization to lipid rafts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(3):404–409. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.007>
179. Cataldo AM, Peterhoff CM, Troncoso JC, Gomez-Isla T, Hyman BT, Nixon RA (2000) Endocytic Pathway Abnormalities Precede Amyloid Deposition in Sporadic Alzheimer's Disease and Down Syndrome: Differential Effects of APOE Genotype and Presenilin Mutations. *American Journal of Pathology*, 157(1):277–286. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64538-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64538-5)
180. Cataldo AM, Petanceska S, Terio NB, Peterhoff CM, Durham R, Mercken M, Mehta PD, Buxbaum J, Haroutunian V, Nixon RA (2004) A $\beta$  localization in abnormal endosomes: Association with earliest A $\beta$  elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiology of Aging*, 25(10):1263–1272. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.02.027>
181. Causevic M, Dominko K, Malnar M, Vidatic L, Cermak S, Pigoni M, Kuhn PH, Colombo A, Havas D, Flunkert S, McDonald J, Gunnensen JM, Hutter-Paier B, Tahirovic S, Windisch M, Krainc D, Lichtenthaler SF, Hecimovic S (2018) BACE1-cleavage of Sez6 and Sez6L is elevated in Niemann-Pick type C disease mouse brains. *PLoS ONE*, 13(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200344>
182. Rastija A (2023) Ispitivanje uloge proteaze BACE1 u patogenezi rijetke nasljedne neurodegenerativne Niemann-Pickove bolesti tipa C. Doktorski rad (Fakultet biotehnologije i razvoja lijekova Sveučilišta u Rijeci). <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:378704>
183. Gérvy NY, Lopes FL, Ledoux S, Murphy BD (2004) Aberrant intracellular cholesterol transport disrupts pituitary and ovarian function. *Molecular Endocrinology*, 18(7):1778–1786. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0323>
184. Fan J, Akabane H, Graham SN, Richardson LL, Zhu GZ (2006) Sperm defects in mice lacking a functional Niemann-Pick C1 protein. *Molecular Reproduction and Development*, 73(10):1284–1291. <https://doi.org/10.1002/mrd.20559>
185. Labno C Basic Intensity Quantification with ImageJ. <https://www.unige.ch/medecine/bioimaging/information/tutorials-1/image-j-fiji> (pristupljeno 15. studenog 2018.)
186. Ou-Yang M-H, Kurz JE, Nomura T, Popovic J, Rajapaksha TW, Dong H, Contractor A, Chetkovich DM, Tourtellotte WG, Vassar R (2018) Axonal organization defects in the

- hippocampus of adult conditional BACE1 knockout mice. *Science Translational Medicine*, 10(5620). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao5620>
187. Liu B, Li H, Repa JJ, Turley SD, Dietschy JM (2008) Genetic variations and treatments that affect the lifespan of the NPC1 mouse. *Journal of Lipid Research*, 49(3):663–669. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700525-JLR200>
  188. Coomans EM, Tomassen J, Ossenkuppele R, Golla SS V, den M, Collij LE, Weltings E, Landen S van der, Wolters EE, Windhorst AD, Barkhof F, Geus EJ de, Scheltens P, Jelle P, M van Berckel BN, Braber A den (2022) Genetically identical twins show comparable tau PET load 1 and spatial distribution 2. *Brain*, 145(10):3571–3581. <https://doi.org/10.1093/brain/awac004>
  189. Wibawa P, Kurth F, Luders E, Pantelis C, Copley VL, Biase MA Di, Velakoulis D, Walterfang M (2021) Differential involvement of hippocampal subfields in Niemann-Pick type C disease: a case–control study. *Metabolic Brain Disease*, 36(7):2071–2078. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00782-9>
  190. Nguyen TTA, Mohanty V, Yan Y, Francis KR, Cologna SM (2024) Comparative Hippocampal Proteome and Phosphoproteome in a Niemann-Pick, Type C1 Mouse Model Reveal Insights into Disease Mechanisms. *Journal of Proteome Research*, 23(1):84–94. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.3c00375>
  191. Singh N, Das B, Zhou J, Hu X, Yan R (2022) Targeted BACE-1 inhibition in microglia enhances amyloid clearance and improved cognitive performance. *Science Advances Cellular Neuroscience*, 8:3610. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abo3610>
  192. Hu CY, Ong WY, Patel SC (2000) Regional distribution of NPC1 protein in monkey brain. *Journal of Neurocytology*, 29(10):765–773. <https://doi.org/10.1023/a:1010942521671>
  193. Martin KB, Williams IM, Cluzeau C V, Cougnoux A, Dale RK, Iben JR, Cawley NX, Wassif CA, Porter FD (2020) Identification of novel pathways associated with patterned cerebellar purkinje neuron degeneration in niemann-pick disease, type C1. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010292>
  194. Rodríguez JJ, Yeh CY, Terzieva S, Olabarria M, Kulijewicz-Nawrot M, Verkhatsky A (2014) Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain. *Neurobiology of Aging*, 35(1):15–23. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.002>
  195. Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M (2012) Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods in Molecular Biology*, 814:23–45. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_3)
  196. Matias I, Morgado J, Gomes FCA (2019) Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11:59. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00059>
  197. Zhou B, Zuo YX, Jiang RT (2019) Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 25(6):665–673. <https://doi.org/10.1111/cns.13123>
  198. Kumar A, Fontana IC, Nordberg A (2023) Reactive astrogliosis: A friend or foe in the pathogenesis of Alzheimer’s disease. *Journal of Neurochemistry*, 164(3):309–324. <https://doi.org/10.1111/jnc.15565>

199. Bellaver B, Povala G, Ferreira PCL, Ferrari-Souza JP, Leffa DT, Lussier FZ, Benedet AL, Ashton NJ, Triana-Baltzer G, Kolb HC, Tissot C, Therriault J, Servaes S, Stevenson J, Rahmouni N, Lopez OL, Tudorascu DL, Villemagne VL, Ikonomic MD, Gauthier S, Zimmer ER, Zetterberg H, Blennow K, Aizenstein HJ, Klunk WE, Snitz BE, Maki P, Thurston RC, Cohen AD, Ganguli M, Karikari TK, Rosa-Neto P, Pascoal TA (2023) Astrocyte reactivity influences amyloid- $\beta$  effects on tau pathology in preclinical Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 29(7):1775–1781. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02380-x>
200. Nunes A, Pressey SNR, Cooper JD, Soriano S (2011) Loss of amyloid precursor protein in a mouse model of Niemann-Pick type C disease exacerbates its phenotype and disrupts tau homeostasis. *Neurobiology of Disease*, 42(3):349–359. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.01.028>
201. Smith AF, Vanderah TW, Erickson RP Haploinsufficiency of tau decreases survival of the mouse model of Niemann-Pick disease type C1 but does not alter tau phosphorylation. <https://doi.org/10.1007/s13353-020-00572-6/Published>
202. Nakamura K, Greenwood A, Binder L, Bigio EH, Denial S, Nicholson L, Zhou XZ, Lu KP (2012) Proline isomer-specific antibodies reveal the early pathogenic tau conformation in Alzheimer's disease. *Cell*, 149(1):232–244. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.016>
203. Guillozet-Bongaarts AL, Glajch KE, Libson EG, Cahill ME, Bigio E, Berry RW, Binder LI (2007) Phosphorylation and cleavage of tau in non-AD tauopathies. *Acta Neuropathologica*, 113(5):513–520. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0209-6>
204. Roßner S, Sastre M, Bourne K, Lichtenthaler SF (2006) Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression-Implications for Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 79(2):95–111. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.06.001>
205. Wen W, Li P, Liu P, Xu S, Wang F, Huang JH (2021) Post-Translational Modifications of BACE1 in Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology*, 20(1):211–222. <https://doi.org/10.2174/1570159x19666210121163224>
206. Hampel H, Vassar R, Strooper B De, Hardy J, Willem M, Singh N, Zhou J, Yan R, Vanmechelen E, Vos A De, Nisticò R, Corbo M, Imbimbo B Pietro, Streffer J, Voytyuk I, Timmers M, Tahami Monfared AA, Irizarry M, Albala B, Koyama A, Watanabe N, Kimura T, Yarenis L, Lista S, Kramer L, Vergallo A (2021) The  $\beta$ -Secretase BACE1 in Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry*, 89(8):745–756. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.02.001>
207. Araki W (2016) Post-translational regulation of the  $\beta$ -secretase BACE1. *Brain Research Bulletin*, 126:170–177. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.04.009>
208. Tamagno E, Guglielmotto M, Monteleone D, Vercelli A, Tabaton M (2012) Transcriptional and post-transcriptional regulation of  $\beta$ -secretase. *IUBMB Life*, 64(12):943–950. <https://doi.org/10.1002/iub.1099>
209. Sannerud R, Declerck I, Peric A, Raemaekers T, Menendez G, Zhou L, Veerle B, Coen K, Munck S, Strooper B De, Schiavo G, Annaert W (2011) ADP ribosylation factor 6 (ARF6) controls amyloid precursor protein (APP) processing by mediating the endosomal sorting of BACE1. *PNAS*, 108(34). <https://doi.org/10.1073/pnas.1100745108>
210. Zhu K, Xiang X, Filser S, Marinković P, Dorostkar MM, Crux S, Neumann U, Shimshek DR, Rammes G, Haass C, Lichtenthaler SF, Gunnarsen JM, Herms J (2018) Beta-Site

- Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 Inhibition Impairs Synaptic Plasticity via Seizure Protein 6. *Biological Psychiatry*, 83(5):428–437.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.12.023>
211. Martello A, Platt FM, Eden ER (2020) Staying in touch with the endocytic network: The importance of contacts for cholesterol transport. *Traffic*, 21(5):354–363.  
<https://doi.org/10.1111/tra.12726>
212. Huotari J, Helenius A (2011) Endosome maturation. *The EMBO Journal*, 30(17):3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
213. Maulik M, Ghoshal B, Kim J, Wang Y, Yang J, Westaway D, Kar S (2012) Mutant human APP exacerbates pathology in a mouse model of NPC and its reversal by a  $\beta$ -cyclodextrin. *Human Molecular Genetics*, 21(22):4857–4875.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/dds322>
214. Maulik M, Peake K, Chung JY, Wang Y, Vance JE, Kar S (2015) APP overexpression in the absence of NPC1 exacerbates metabolism of amyloidogenic proteins of Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 24(24):7132–7150.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddv413>
215. Chacón-Quintero MV, Pineda-López LG, Villegas-Lanau CA, Posada-Duque R, Cardona-Gómez GP (2021) Beta-Secretase 1 Underlies Reactive Astrocytes and Endothelial Disruption in Neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15:656832.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2021.656832>
216. Singh N, Benoit MR, Zhou J, Das B, Davila-Velderrain J, Kellis M, Tsai L-H, Hu X, Yan R (2022) BACE-1 inhibition facilitates the transition from homeostatic microglia to DAM-1. *Science Advances Neuroscience*, 8:1286. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abo1286>
217. Henstridge CM, Hyman BT, Spires-Jones TL (2019) Beyond the neuron-cellular interactions early in Alzheimer disease pathogenesis. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(2):94–108. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0113-1>
218. Smith D, Wallom KL, Williams IM, Jeyakumar M, Platt FM (2009) Beneficial effects of anti-inflammatory therapy in a mouse model of Niemann-Pick disease type C1. *Neurobiology of Disease*, 36(2):242–251. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.010>
219. Schneider SA, Tahirovic S, Hardy J, Strupp M, Bremova-Ertl T (2021) Do heterozygous mutations of Niemann-Pick type C predispose to late-onset neurodegeneration: a review of the literature. *Journal of Neurology*, 268(6):2055–2064.  
<https://doi.org/10.1007/s00415-019-09621-5>
220. Benussi A, Cotelli MS, Cantoni V, Bertasi V, Turla M, Dardis A, Biasizzo J, Manenti R, Cotelli M, Padovani A, Borroni B (2019) Clinical and neurophysiological characteristics of heterozygous NPC1 carriers. *JIMD Reports*, 49(1):80–88.  
<https://doi.org/10.1002/jmd2.12059>
221. Yu W, Ko M, Yanagisawa K, Michikawa M (2005) Neurodegeneration in heterozygous Niemann-Pick type C1 (NPC1) mouse: Implication of heterozygous NPC1 mutations being a risk for tauopathy. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(29):27296–27302.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M503922200>



222. Zovko A (2021) Patološke značajke u mozgu miševa nositelja bolesti Niemann-Pick tipa C. Diplomski rad (Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu). <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:538752>
223. Martinovic L (2023) Otkrivanje ranih neuropatoloških promjena u miševa prenositelja bolesti Niemann-Pick tipa C. Diplomski rad (Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu). <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:715744>
224. Pallottini V, Pfrieder FW (2020) Understanding and treating Niemann-Pick type C disease: Models matter. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23):1–37. <https://doi.org/10.3390/ijms21238979>
225. Zhou J, Singh N, Galske J, Hudobenko J, Hu X, Yan R (2023) BACE1 regulates expression of Clusterin in astrocytes for enhancing clearance of  $\beta$ -amyloid peptides. *Molecular Neurodegeneration*, 18:31. <https://doi.org/10.1186/s13024-023-00611-w>
226. Reid PC, Sakashita N, Sugii S, Ohno-Iwashita Y, Shimada Y, Hickey WF, Chang TY (2004) A novel cholesterol stain reveals early neuronal cholesterol accumulation in the Niemann-Pick type C1 mouse brain. *Journal of Lipid Research*, 45(3):582–591. <https://doi.org/10.1194/jlr.D300032-JLR200>
227. Subramanian K, Balch WE (2008) NPC1/NPC2 function as a tag team duo to mobilize cholesterol. *PNAS*, 105(40):15223–15224. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0808256105](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0808256105)
228. Sitarska D, Tyłki-Szymańska A, Ługowska A (2021) Treatment trials in Niemann-Pick type C disease. *Metabolic Brain Disease*, 36(8):2215–2221. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00842-0>

## 8. POPIS ILUSTRACIJA

### 8.1. Popis tablica

**Tablica 1.** Početnice korištene za genotipizaciju miševa linije *NPCI-I1061T* i linije *BACE1*.

**Tablica 2.** Sastav reakcijske smjese za PCR.

**Tablica 3.** PCR program za genotipizaciju miševa.

**Tablica 4.** Popis korištenih primarnih protutijela.

**Tablica 5.** Popis korištenih sekundarnih protutijela.

**Tablica 6.** Sastav Tris-glicin poliakrilamidnih gelova za vertikalnu elektroforezu.

### 8.2. Popis slika

**Slika 1.** Struktura proteina NPC1 i kooperativno djelovanje proteina NPC1 i NPC2 pri prijenosu kolesterola iz kasnih endosoma i lizosoma.

**Slika 2.** Prijenos kolesterola iz kasnih endosoma i lizosoma u fiziološki normalnim uvjetima te u bolesti Niemann-Pick tipa C.

**Slika 3.** Klinička slika različitih oblika bolesti Niemann-Pick tipa C.

**Slika 4.** Shematski prikaz cijepanja proteina APP (ne)amiloidogenim putem.

**Slika 5.** Supstrati enzima BACE1.

**Slika 6.** Genotipizacija i analiza razine proteina NPC1 i BACE1 u mozgu miševa linije *NPCI-I1061T*.

**Slika 7.** Analiza intenziteta i raspodjele bojanja enzima BACE1 u hipokampusu miševa linije *NPCI-I1061T*.

**Slika 8.** Analiza tjelesne mase miševa linije *NPCI-I1061T*.

**Slika 9.** Analiza neurodegeneracije Purkinjeovih neurona u malom mozgu miševa linije *NPCI-I1061T*.

**Slika 10.** Analiza nakupljanja slobodnog kolesterola u mozgu miševa linije *NPCI-I1061T*.

**Slika 11.** Analiza biljega endolizosomalnog puta u mozgu miševa linije *NPCI-I1061T*.

**Slika 12.** Analiza neuroinflamacije u mozgu miševa linije *NPCI-I1061T*.

**Slika 13.** Analiza razine i fosforilacije proteina tau u mozgu miševa linije *NPCI-I1061T*.

**Slika 14.** Analiza raspodjele proteina APP u mozgu miševa linije *NPCI-I1061T*.

**Slika 15.** Analiza raspodjele proteina SEZ6 u mozgu miševa linije *NPCI-I1061T*.

**Slika 16.** Analiza raspodjele proteina SEZ6L u mozgu miševa linije *NPCI-I1061T*.

**Slika 17.** Analiza razine supstrata enzima BACE1 u kori velikog mozga miševa linije *NPCI-I1061T*.

**Slika 18.** Genotipizacija miševa *knock-in NPCI-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 19.** Razina proteina NPC1 i BACE1 u mozgu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 20.** Analiza raspodjele i intenziteta biljega enzima BACE1 u hipokampusu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 21.** Analiza tjelesne mase miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 22.** Analiza biljega neurodegeneracije u malom mozgu miševa *knock-in NPC1-I10616T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 23.** Analiza biljega neurodegeneracije u kori velikog mozga miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 24.** Analiza biljega neurodegeneracije u hipokampusu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 25.** Analiza biljega endolizosomalnog puta u malom mozgu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 26.** Analiza biljega endolizosomalnog puta u kori velikog mozga miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 27.** Analiza biljega endolizosomalnog puta u hipokampusu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 28.** Analiza biljega neuroinflamacije u malom mozgu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 29.** Analiza biljega neuroinflamacije u kori velikog mozga miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 30.** Analiza biljega neuroinflamacije u hipokampusu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 31.** Analiza razine ukupnog i fosforiliranog proteina tau u malom mozgu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 32.** Analiza razine ukupnog i fosforiliranog proteina tau u kori velikog mozga miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 33.** Analiza razine ukupnog i fosforiliranog proteina tau u hipokampusu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 34.** Analiza raspodjele supstrata enzima BACE1 u malom mozgu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 35.** Analiza proteolitičkog cijepanja supstrata enzima BACE1 u malom mozgu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 36.** Analiza raspodjele supstrata enzima BACE1 u kori velikog mozga miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 37.** Analiza proteolitičkog cijepanja supstrata enzima BACE1 u kori velikog mozga miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 38.** Analiza raspodjele supstrata enzima BACE1 u hipokampusu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

**Slika 39.** Analiza proteolitičkog cijepanja supstrata enzima BACE1 u hipokampusu miševa *knock-in NPC1-I1061T* kojima je deletiran jedan ili oba alela gena *BACE1*.

## 9. ŽIVOTOPIS

Lea Vidatić rođena je 31. ožujka 1992. u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu, osnovnu glazbenu školu (smjer flauta), te gimnaziju (prirodoslovno-matematički smjer). Upisala je preddiplomski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2010. godine, a 2013. godine diplomski studij Eksperimentalne biologije (modul Fiziologija i imunobiologija). Diplomski rad izradila je na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka PMF-a. Rezultate diplomskog rada prezentirala je na 12. Hrvatskom biološkom kongresu s međunarodnim sudjelovanjem (usmeno izlaganje), te je na temelju rezultata diplomskog rada objavljena jedna publikacija. Diplomirala je 2015. godine i stekla titulu magistre eksperimentalne biologije. Od travnja 2016. do lipnja 2017. godine zaposlena je u sklopu programa Stručno osposobljavanje za rad bez zasnivanja radnog odnosa. Od veljače 2018. godine do kolovoza 2023. godine zaposlena je kao asistent na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, gdje je u Laboratoriju za istraživanje neurodegenerativnih bolesti, pod mentorstvom dr. sc. Silve Katušić, izradila doktorski rad. Tijekom radnog odnosa, bila je suradnik na tri istraživačka projekata, te se usavršavala u Njemačkom centru za neurodegenerativne bolesti (DZNE, Munchen, Njemačka). Dobitnica je stipendije u organizaciji akcije COST BM1402 (za radionicu MouseAGE Training School), te stipendije Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (za sudjelovanje na 45. FEBS kongresu). Kao (ko)autor, sudjelovala je i izlagala na 10 međunarodnih i domaćih kongresa (s tri usmene i 7 poster prezentacija). Kao koautor, publicirala je još tri znanstvena i dva revijalna rada u časopisima s međunarodnom recenzijom. Kao neposredni voditelj, sudjelovala je u mentorstvu tri diplomska rada obranjena pri Biološkom odsjeku PMF-a. Članica je nekoliko međunarodnih i domaćih znanstvenih organizacija.

## 10. POPIS PUBLIKACIJA

- De Marchi F, Munitic I, Vidatic L, Papic E, Racki V, Nimac J, Jurak I, Novotni G, Rogelj B, Vuletic V, Liscic RM, Cannon JR, Buratti E, Mazzini L, Hecimovic S (2023): Overlapping Neuroimmune Mechanisms and Therapeutic Targets in Neurodegenerative Disorders. *Biomedicines* 11(10):2793. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102793>
- De Marchi F, Franjkic T, Schito P, Russo T, Nimac J, Chami AA, Mele A, Vidatic L, Kriz J, Julien JP, Apic G, Russell RB, Rogelj B, Cannon JR, Baralle M, Agosta F, Hecimovic S, Mazzini L, Buratti E, Munitic I. (2023): Emerging Trends in the Field of Inflammation and Proteinopathy in ALS/FTD Spectrum Disorder. *Biomedicines* 11(6):1599. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11061599>
- Dominko K, Rastija A, Sobocanec S, Vidatic L, Meglaj S, Lovincic Babic A, Hutter-Paier B, Colombo AV, Lichtenthaler SF, Tahirovic S, Hecimovic S (2021): Impaired retromer function in Niemann-Pick type C disease is dependent on intracellular cholesterol accumulation. *International Journal of Molecular Sciences* 22(24):13256. <https://doi.org/10.3390/ijms222413256>
- Colombo A, Dinkel L, Muller SA, Sebastian Monasor L, Schifferer M, Cantuti-Castelvetri L, Konig J, Vidatic L, Bremova-Ertl T, Lieberman AP, Hecimovic S, Simons M, Lichtenthaler SF, Strupp M, Schneider SA, Tahirovic S (2021): Loss of NPC1 enhances phagocytic uptake and impairs lipid trafficking in microglia. *Nature Communications* 12(1):1158. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21428-5>
- Ljustina M, Vidatic L, Safner T, Ivanek I, Budinski I, Damjanovic M, Lukac M, Lisicic D (2018): Behavioral response of the endemic Martino's vole *Dinaromys bogdanovi* (Martino 1922) to environmental complexity. *Acta Ethologica* 22:29–38. <https://doi.org/10.1007/s10211-018-0304-9>
- Causevic M, Dominko K, Malnar M, Vidatic L, Cermak S, Pigoni M, Kuhn PH, Colombo A, Havas D, Flunkert S, McDonald J, Gunnensen JM, Hutter-Paier B, Tahirovic S, Windisch M, Krainc D, Lichtenthaler SF, Hecimovic S (2018): BACE1-cleavage of Sez6 and Sez6L is elevated in Niemann-Pick type C disease mouse brains. *PLoS One* 13(7):e0200344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200344>



## 11. PRIVITCI

**Privitak 1.** Statistička analiza za biljeg NPC1:  $p$  vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

|                    | 4 tjeđna      |              |               |              |               |              | 9 tjeđna     |              |               |              |               |              | 15 tjeđna    |              |               |              |               |              |
|--------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
|                    | N-WT<br>B-WT  | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |
| mali mozak         | N-WT<br>B-WT  | /            | 0.39750       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | /            | 0.04439      | 0.05847       | 1.00000      | 1.00000       | /            | 0.00005      | 0.00005      | 0.00005       | 0.00181      | 0.00144       |              |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 0.39750      | /             | 1.00000      | 1.00000       | 0.78306      | /            | 1.00000      | 1.00000       | 0.04229      | 1.00000       | 0.00005      | /            | 0.65737      | 0.00115       | 0.00144      |               |              |
|                    | N-KI<br>B-HET | 1.00000      | 1.00000       | /            | 1.00000       | 1.00000      | 0.05847      | 1.00000      | /             | 0.05147      | 1.00000       | 0.00005      | 0.65737      | /            | 0.00084       | 0.00104      |               |              |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | /             | 1.00000      | 0.04229      | 0.05147      | 1.00000       | /            | 1.00000       | 0.00084      | 0.00115      | 0.00084      | /             | 0.76416      |               |              |
|                    | N-WT<br>B-HET | 1.00000      | 0.18832       | 1.00000      | 0.78306       | /            | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 0.00144       | 0.00104      | 0.00144      | 0.76416      | /             |              |               |              |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 1.00000      | 0.78306       | 1.00000      | 1.00000       | /            | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | /             | /            | /            | /            | /             |              |               |              |
| kora velikog mozga | N-WT<br>B-WT  | /            | 0.24593       | 0.18629      | 0.32172       | 1.00000      | /            | 0.08719      | 0.02159       | 1.00000      | 1.00000       | /            | 0.00074      | 0.00169      | 0.58394       | 0.72288      |               |              |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 0.24593      | /             | 1.00000      | 1.00000       | 0.28160      | /            | 1.00000      | 1.00000       | 0.18393      | 1.00000       | 0.00074      | /            | 0.69185      | 0.00024       | 0.00036      |               |              |
|                    | N-KI<br>B-HET | 0.18629      | 1.00000       | /            | 1.00000       | 0.21428      | 0.16158      | 1.00000      | /             | 0.07541      | 1.00000       | 0.00169      | 0.69185      | /            | 0.00054       | 0.00081      |               |              |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 0.32172      | 1.00000       | 1.00000      | /             | 0.36673      | 0.28160      | 1.00000      | 0.07541       | /            | 0.90269       | 0.58394      | 0.00024      | 0.00054      | /             | 0.84542      |               |              |
|                    | N-WT<br>B-HET | 1.00000      | 0.21428       | 0.16158      | 0.28160       | /            | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 0.90269      | 1.00000       | 0.72288      | 0.00036      | 0.00081      | 0.84542       | /            |               |              |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 1.00000      | 0.28160       | 0.21428      | 0.36673       | 1.00000      | /            | 1.00000      | 1.00000       | 0.90269      | /             | /            | 0.84542      | 0.00036      | 0.00081       | /            |               |              |
| hipokampus         | N-WT<br>B-WT  | /            | 0.00381       | 0.01415      | 0.01703       | 0.25221      | /            | 0.00120      | 0.00101       | 0.02705      | 0.00844       | /            | 0.04109      | 0.04656      | 0.92754       | 0.85640      |               |              |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 0.00381      | /             | 0.29339      | 0.24101       | 0.00111      | /            | 0.80876      | 0.80876       | 0.01713      | 0.06195       | 0.04109      | /            | 0.92095      | 0.03669       | 0.05168      |               |              |
|                    | N-KI<br>B-HET | 0.01415      | 0.29339       | /            | 0.88601       | 0.00337      | /            | 0.80876      | /             | 0.01311      | 0.04538       | 0.04656      | 0.92095      | /            | 0.04152       | 0.05872      |               |              |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 0.01703      | 0.24101       | 0.88601      | /             | 0.00395      | 0.01713      | 0.01311      | /             | 0.31641      | 0.31641       | 0.92754      | 0.03669      | 0.04152      | /             | 0.78626      |               |              |
|                    | N-WT<br>B-HET | 0.00035      | 0.00002       | 0.00004      | 0.00004       | /            | 0.00099      | 0.00844      | 0.06195       | 0.04538      | 0.31641       | 0.85640      | 0.03669      | 0.04152      | 0.05872       | 0.78626      |               |              |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 0.25221      | 0.00111       | 0.00395      | 0.00099       | /            | 0.00099      | 0.00844      | 0.06195       | 0.04538      | 0.31641       | /            | 0.03669      | 0.04152      | 0.05872       | /            |               |              |

**Privitak 2.** Statistička analiza za biljeg BACE1: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

|                    | 4 pojedna     |              |               |              |               |              | 9 pojedna    |              |               |              |               |              | 15 pojedna   |              |               |              |               |              |
|--------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
|                    | N-WT<br>B-WT  | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |
| mali mozak         | N-WT<br>B-WT  | /            | 0.00629       | 0.00045      | 0.00014       | 0.00779      | 0.00015      |              |               |              |               |              |              |              |               |              |               |              |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 0.00629      | /             | 0.03074      | 0.00456       | 0.85642      | 0.00486      | 0.15766      | /             | 0.04604      | 0.00098       | 0.15766      | 0.37296      | 0.04604      | 0.00098       | 0.00098      | 0.00098       | 0.00098      |
|                    | N-KI<br>B-HET | 0.00045      | 0.03074       | /            | 0.15343       | 0.02403      | 0.17646      | 0.37296      | /             | /            | 0.00799       | 0.00799      | 0.04604      | /            | /             | 0.00799      | 0.00799       | 0.00799      |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 0.00014      | 0.00436       | 0.15343      | /             | 0.00357      | 0.92211      | 0.69450      | 0.09241       | 0.59848      | /             | 0.00478      | 0.69450      | 0.09241      | 0.59848       | /            | 0.00478       | 0.00478      |
|                    | N-WT<br>B-HET | 0.00779      | 0.85642       | 0.02403      | 0.00357       | /            | 0.00397      | 0.00335      | 0.00098       | 0.00799      | 0.00478       | /            | 0.00335      | 0.00098      | 0.00799       | 0.00478      | /             | /            |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 0.00015      | 0.00486       | 0.17646      | 0.92211       | 0.00397      | /            | 0.00397      | 0.00335       | 0.00098      | 0.00478       | /            | 0.00335      | 0.00098      | 0.00799       | 0.00478      | /             | /            |
| kora velikog mozga | N-WT<br>B-WT  | /            | 1.00000       | 1.00000      | 0.13984       | 1.00000      | 0.04050      |              |               |              |               |              |              |              |               |              |               |              |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 1.00000      | /             | 1.00000      | 0.04050       | 1.00000      | 0.01011      | 0.46704      | /             | 0.04227      | 0.00304       | 0.46704      | 0.11245      | 0.04227      | 0.00304       | 0.00304      | 0.00304       | 0.00304      |
|                    | N-KI<br>B-HET | 1.00000      | 1.00000       | /            | 1.00000       | 0.60547      | 1.00000      | 0.11245      | 0.04227       | /            | 0.75600       | 0.11245      | /            | /            | 0.04554       | 0.04554      | 0.04554       | 0.04554      |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 0.13984      | 0.04050       | 1.00000      | /             | 1.00000      | 1.00000      | 0.17159      | 0.06302       | 0.75600      | /             | 0.03094      | 0.17159      | 0.06302      | 0.75600       | /            | 0.03094       | 0.03094      |
|                    | N-WT<br>B-HET | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | /            | 0.76764      | 0.06302      | 0.00304       | 0.04554      | 0.03094       | /            | 0.06302      | 0.00304      | 0.04554       | 0.03094      | /             | /            |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 0.04050      | 0.01011       | 0.60547      | 1.00000       | 0.76764      | /            | 0.06302      | 0.00304       | 0.04554      | 0.03094       | /            | 0.00304      | 0.00304      | 0.04554       | 0.03094      | /             | /            |
| hipokampus         | N-WT<br>B-WT  | /            | 0.31066       | 0.08754      | 0.01625       | 0.99205      | 0.01504      |              |               |              |               |              |              |              |               |              |               |              |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 0.31066      | /             | 0.38723      | 0.00450       | 0.30653      | 0.00421      | 0.38038      | /             | 0.02248      | 0.00196       | 0.38038      | 0.07004      | 0.02248      | 0.00196       | 0.00196      | 0.00196       | 0.00196      |
|                    | N-KI<br>B-HET | 0.08754      | 0.38723       | /            | 0.00175       | 0.08629      | 0.00165      | 0.07004      | 0.02248       | /            | 0.18836       | 0.07004      | /            | /            | 0.04474       | 0.04474      | 0.04474       | 0.04474      |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 0.01625      | 0.00450       | 0.00175      | /             | 0.01646      | 0.95220      | 0.47374      | 0.14308       | 0.18836      | /             | 0.00861      | 0.47374      | 0.14308      | 0.18836       | /            | 0.00861       | 0.00861      |
|                    | N-WT<br>B-HET | 0.99205      | 0.30653       | 0.08629      | 0.01646       | /            | 0.01523      | 0.00425      | 0.00196       | 0.04474      | 0.00861       | /            | 0.00425      | 0.00196      | 0.04474       | 0.00861      | /             | /            |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 0.01504      | 0.00421       | 0.00165      | 0.95220       | 0.01523      | /            | 0.00425      | 0.00196       | 0.04474      | 0.00861       | /            | 0.00425      | 0.00196      | 0.04474       | 0.00861      | /             | /            |

**Privitak 3.** Statistička analiza za biljeg CALBINDIN: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

|            |               | 4 tjedna     |               |              |               |              |              | 9 tjedna     |               |              |               |              |              | 15 tjedna     |               |               |              |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |   |
|------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---|
|            |               | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO  | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |   |
| mali mozak |               | N-WT<br>B-WT | /             | 0.10111      | 0.04768       | 0.10111      | 0.24097      | 0.44555      | N-KI<br>B-WT  | /            | 0.12425       | 0.12675      | 0.12425      | 0.05607       | 0.93345       | N-WT<br>B-WT  | /            | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 0.48595 | 0.01886 | 0.04973 | 1.00000 | /       |         |   |
|            | N-KI<br>B-WT  | 0.10111      | /             | 0.69590      | 0.17001       | 0.35569      | 0.61257      | 0.35569      | N-KI<br>B-WT  | 0.12425      | /             | 0.98825      | 0.11101      | 0.11101       | N-KI<br>B-WT  | 1.00000       | /            | 1.00000 | 0.08551 | 0.08551 | 0.08551 | 0.08551 | 0.08551 | 0.08551 | 0.08551 | 0.01886 | 0.01886 | 0.04973 | 1.00000 | /       |         |   |
|            | N-KI<br>B-HET | 0.04768      | 0.69590       | /            | 0.31563       | 0.19527      | 0.37354      | 0.19527      | N-KI<br>B-HET | 0.12675      | 0.98825       | /            | 0.00767      | 0.11324       | N-KI<br>B-HET | 1.00000       | 1.00000      | /       | 0.19769 | 0.19769 | 0.19769 | 0.19769 | 0.19769 | 0.19769 | 0.19769 | 0.04973 | 0.04973 | 0.04973 | 1.00000 | /       |         |   |
|            | N-KI<br>B-KO  | 0.00545      | 0.17001       | 0.31563      | /             | 0.06759      | 0.06759      | 0.02873      | N-WT<br>B-HET | 0.05607      | 0.00756       | 0.00767      | /            | 0.06248       | N-WT<br>B-HET | 1.00000       | 0.08551      | 0.19769 | /       | /       | /       | /       | /       | /       | /       | /       | /       | /       | /       | /       |         |   |
|            | N-WT<br>B-HET | 0.24097      | 0.61257       | 0.37354      | 0.06759       | /            | /            | 0.67043      | N-WT<br>B-KO  | 0.93345      | 0.11101       | 0.11324      | 0.06248      | /             | N-WT<br>B-KO  | 0.48595       | 0.01886      | 0.04973 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | /       |   |
|            | N-WT<br>B-KO  | 0.44555      | 0.35569       | 0.19527      | 0.06759       | 0.67043      | 0.67043      | /            | N-WT<br>B-KO  | 0.93345      | 0.11101       | 0.11324      | 0.06248      | /             | N-WT<br>B-KO  | 0.48595       | 0.01886      | 0.04973 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | 1.00000 | / |

**Privitak 4.** Statistička analiza za biljeg NEUN: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

|               |         |         | 4 tjedna           |              |               |              |               |              | 15 tjedna    |              |               |              |               |              |         |         |         |
|---------------|---------|---------|--------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------|---------|---------|
|               |         |         | N-WT<br>B-WT       | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KO<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KO<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |         |         |         |
| mali mozak    |         |         | N-WT<br>B-WT       | /            | 0,17451       | 0,16579      | /             | 0,13122      | /            | 0,11746      | /             | 0,18993      | /             |              |         |         |         |
|               |         |         | N-KI<br>B-WT       | 0,97136      | /             | 0,16579      | 0,87079       | 0,09283      | 0,01172      | 0,08088      | 0,09283       | 0,01172      | 0,08088       | 0,62231      | 0,59802 |         |         |
|               |         |         | N-KI<br>B-HET      | 0,17451      | 0,16579       | /            | 0,13122       | 0,11746      | 0,73880      | 0,18993      | 0,09283       | 0,01172      | 0,08088       | 0,62231      | 0,59802 |         |         |
|               |         |         | N-KI<br>B-KO       | 0,84273      | 0,87079       | 0,13122      | /             | 0,11746      | 0,73880      | 0,18993      | 0,09283       | 0,01172      | 0,08088       | 0,62231      | 0,59802 |         |         |
|               |         |         | N-WT<br>B-HET      | 0,88814      | 0,09283       | 0,01172      | 0,11746       | /            | 0,18993      | /            | 0,09283       | 0,01172      | 0,08088       | 0,62231      | 0,59802 |         |         |
|               |         |         | N-WT<br>B-KO       | 0,59802      | 0,62231       | 0,08088      | 0,73880       | 0,18993      | /            | /            | 0,09283       | 0,01172      | 0,08088       | 0,62231      | 0,59802 |         |         |
|               |         |         | kora velikog mozga |              |               | N-WT<br>B-WT | /             | 0,36486      | 0,09851      | /            | 0,11955       | 0,19693      | 0,02818       | 0,10667      | 0,32892 | 0,20386 | /       |
|               |         |         |                    |              |               | N-KI<br>B-WT | 0,36486       | /            | 0,09851      | 0,43611      | 0,65426       | 0,10667      | 0,32892       | 0,20386      | 0,02818 | 0,10667 | 0,32892 |
| N-KI<br>B-HET | 0,02615 | 0,09851 |                    |              |               | /            | 0,30562       | 0,18860      | 0,95612      | 0,20386      | 0,02615       | 0,09851      | 0,30562       | 0,18860      | 0,95612 |         |         |
| N-KI<br>B-KO  | 0,11955 | 0,43611 |                    |              |               | 0,30562      | /             | 0,72891      | 0,32892      | 0,20386      | 0,11955       | 0,43611      | 0,30562       | 0,72891      | 0,32892 |         |         |
| N-WT<br>B-HET | 0,19693 | 0,65426 |                    |              |               | 0,18860      | 0,72891       | /            | 0,20386      | 0,20386      | 0,19693       | 0,65426      | 0,18860       | 0,72891      | 0,32892 |         |         |
| N-WT<br>B-KO  | 0,02818 | 0,10667 |                    |              |               | 0,95612      | 0,32892       | 0,20386      | /            | /            | 0,02818       | 0,10667      | 0,95612       | 0,32892      | 0,20386 |         |         |
| hipokampus    |         |         |                    |              |               | N-WT<br>B-WT | /             | 0,02388      | 0,01837      | 0,14220      | 0,09827       | 0,02388      | 0,01837       | 0,14220      | 0,09827 | 0,02388 | 0,01837 |
|               |         |         |                    |              |               | N-KI<br>B-WT | 0,02388       | /            | 0,01837      | 0,14220      | 0,09827       | 0,02388      | 0,01837       | 0,14220      | 0,09827 | 0,02388 | 0,01837 |
|               |         |         | N-KI<br>B-HET      | 0,01837      | 0,01837       | 0,00116      | 0,14937       | 0,00278      | 0,01303      | 0,01303      | 0,01837       | 0,01837      | 0,00116       | 0,14937      | 0,00278 |         |         |
|               |         |         | N-KI<br>B-KO       | 0,14220      | 0,00430       | 0,14937      | /             | 0,01303      | 0,01303      | 0,01303      | 0,14220       | 0,00430      | 0,14937       | /            | 0,01303 |         |         |
|               |         |         | N-WT<br>B-HET      | 0,09827      | 0,29267       | 0,00278      | 0,01303       | 0,01303      | /            | 0,01303      | 0,09827       | 0,29267      | 0,00278       | 0,01303      | 0,01303 |         |         |
|               |         |         | N-WT<br>B-KO       | 0,02388      | 0,01837       | 0,14220      | 0,09827       | 0,02388      | 0,01837      | 0,14220      | 0,02388       | 0,01837      | 0,14220       | 0,09827      | 0,02388 |         |         |
|               |         |         |                    |              |               | N-WT<br>B-WT | /             | 0,02388      | 0,01837      | 0,14220      | 0,09827       | 0,02388      | 0,01837       | 0,14220      | 0,09827 | 0,02388 | 0,01837 |
|               |         |         |                    |              |               | N-KI<br>B-WT | 0,02388       | /            | 0,01837      | 0,14220      | 0,09827       | 0,02388      | 0,01837       | 0,14220      | 0,09827 | 0,02388 | 0,01837 |



**Privitak 6.** Statistička analiza za biljeg RAB7: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

| 4. jedina          |              |                |                |                |                |                |               |              |              |               |              |
|--------------------|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
|                    | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT   | N-KI<br>B-HET  | N-KI<br>B-KO   | N-WT<br>B-HET  | N-WT<br>B-KO   |               | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |
| mali mozak         |              |                |                |                |                |                |               |              |              |               |              |
| N-WT<br>B-WT       | /            | 0,39954        | 0,19443        | 0,64611        | 0,33854        | 0,05705        |               | /            | 0,28222      | 0,15052       | 0,34151      |
| N-KI<br>B-WT       | 0,39954      | /              | 0,59963        | 0,68669        | 0,89849        | <b>0,01732</b> | N-KI<br>B-WT  | 0,28222      | /            | 0,64357       | 0,88362      |
| N-KI<br>B-HET      | 0,19443      | 0,59963        | /              | 0,36610        | 0,68850        | <b>0,00886</b> | N-KI<br>B-HET | 0,15052      | 0,64357      | /             | 0,54676      |
| N-KI<br>B-KO       | 0,64611      | 0,68669        | 0,36610        | /              | 0,59795        | <b>0,02983</b> | N-WT<br>B-HET | 0,31974      | 0,92395      | 0,57938       | 0,95930      |
| N-WT<br>B-HET      | 0,33854      | 0,89849        | 0,68850        | 0,59795        | /              | <b>0,01468</b> | N-WT<br>B-KO  | 0,34151      | 0,88362      | 0,54676       | /            |
| N-WT<br>B-KO       | 0,05705      | <b>0,01732</b> | <b>0,00886</b> | <b>0,02983</b> | <b>0,01468</b> | /              |               |              |              |               |              |
| kora velikog mozga |              |                |                |                |                |                |               |              |              |               |              |
| N-WT<br>B-WT       | /            | 1,00000        | 1,00000        | 1,00000        | 1,00000        | 1,00000        |               | /            | 0,75058      | 0,35664       | 0,51225      |
| N-KI<br>B-WT       | 1,00000      | /              | 1,00000        | 1,00000        | 1,00000        | 1,00000        | N-KI<br>B-WT  | 0,75058      | /            | 0,54062       | 0,66483      |
| N-KI<br>B-HET      | 1,00000      | 1,00000        | /              | 1,00000        | 1,00000        | 1,00000        | N-KI<br>B-HET | 0,35664      | 0,54062      | /             | 0,99950      |
| N-KI<br>B-KO       | 1,00000      | 1,00000        | 1,00000        | /              | 0,76764        | 0,41710        | N-WT<br>B-HET | 0,75927      | 0,93485      | 0,72432       | 0,77362      |
| N-WT<br>B-HET      | 1,00000      | 1,00000        | 1,00000        | 0,76764        | /              | 1,00000        | N-WT<br>B-KO  | 0,51225      | 0,66483      | 0,99950       | 0,77362      |
| N-WT<br>B-KO       | 1,00000      | 1,00000        | 1,00000        | 0,41710        | 1,00000        | /              |               |              |              |               |              |
| hipokampus         |              |                |                |                |                |                |               |              |              |               |              |
| N-WT<br>B-WT       | /            | 0,19270        | 0,51742        | 0,58651        | 0,19270        | 0,58651        |               | /            | 0,19270      | 0,51742       | 0,58651      |
| N-KI<br>B-WT       | 0,19270      | /              | 0,07900        | 0,39791        | 0,19270        | 0,39791        | N-KI<br>B-WT  | 0,19270      | /            | 0,07900       | 0,39791      |
| N-KI<br>B-HET      | 0,51742      | 0,07900        | /              | 0,25771        | 0,51742        | <b>0,02239</b> | N-KI<br>B-HET | 0,51742      | 0,07900      | /             | 0,25771      |
| N-KI<br>B-KO       | 0,58651      | 0,39791        | 0,25771        | /              | 0,10387        | /              | N-WT<br>B-HET | 0,58651      | 0,39791      | 0,25771       | 0,10387      |
| N-WT<br>B-HET      | 0,19270      | 0,58651        | 0,39791        | 0,10387        | /              | /              | N-WT<br>B-KO  | 0,05027      | 0,33709      | 0,02239       | /            |
| N-WT<br>B-KO       | 0,05027      | 0,33709        | 0,02239        | 0,10387        | /              | /              |               |              |              |               |              |



**Privitak 7.** Statistička analiza za biljag LAMP1: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

| 4 tjedna           |               |              | 15 tjedna     |              |               |              |               |         |         |         |               |               |              |         |
|--------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|---------|---------|---------|---------------|---------------|--------------|---------|
|                    | N-WT<br>B-WT  | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |               |         |         |         |               |               |              |         |
| mali mozak         | N-WT<br>B-WT  | /            | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | N-WT<br>B-WT  | /       | 0,98648 | 1,00000 | 0,47509       | 1,00000       | N-WT<br>B-KO | 1,00000 |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 1,00000      | /             | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | N-KI<br>B-WT  | 0,98648 | /       | 1,00000 | 0,69280       | N-KI<br>B-HET | 0,69280      | 1,00000 |
|                    | N-KI<br>B-HET | 1,00000      | 1,00000       | /            | 0,69280       | 1,00000      | N-KI<br>B-HET | 0,47509 | 1,00000 | /       | 0,31803       | N-KI<br>B-KO  | 0,31803      | 1,00000 |
| kora velikog mozga | N-WT<br>B-WT  | /            | 0,82831       | 0,97637      | 0,70210       | 0,97711      | N-WT<br>B-WT  | /       | 0,06685 | 0,99755 | 0,36185       | N-WT<br>B-KO  | 0,36185      | 0,37770 |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 0,82831      | /             | 0,85142      | 0,81834       | 0,90073      | N-KI<br>B-WT  | 0,06685 | /       | 0,06647 | 0,10663       | N-KI<br>B-HET | 0,10663      | 0,30288 |
|                    | N-KI<br>B-HET | 0,97637      | 0,85142       | /            | 0,71760       | 0,99382      | N-KI<br>B-HET | 0,99755 | 0,06647 | /       | 0,36341       | N-KI<br>B-KO  | 0,36341      | 0,37611 |
| hipokampus         | N-WT<br>B-WT  | /            | 0,12975       | 0,21799      | 0,70340       | 0,95480      | N-WT<br>B-WT  | /       | 0,10541 | 0,39242 | 0,34676       | N-WT<br>B-KO  | 0,34676      | 0,08923 |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 0,12975      | /             | 0,70340      | 0,43909       | 0,20198      | N-KI<br>B-WT  | 0,10541 | /       | 0,39242 | 0,04913       | N-KI<br>B-HET | 0,04913      | 0,00955 |
|                    | N-KI<br>B-HET | 0,21799      | 0,70340       | /            | 0,26880       | 0,20198      | N-KI<br>B-HET | 0,34676 | 0,39242 | /       | 0,15999       | N-KI<br>B-KO  | 0,15999      | 0,02559 |
|                    | N-WT<br>B-WT  | 0,95480      | 0,43909       | 0,26880      | /             | 0,04219      | N-WT<br>B-WT  | 0,56780 | 0,04913 | 0,00955 | N-WT<br>B-KO  | 0,00955       | 0,19554      |         |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | /            | N-WT<br>B-KO  | 0,08923 | 0,00955 | 0,02559 | N-WT<br>B-HET | 0,02559       | /            |         |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | N-KI<br>B-WT  | 0,08923 | 0,00955 | 0,02559 | N-KI<br>B-HET | 0,02559       | 0,19554      |         |
|                    | N-KI<br>B-HET | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | N-KI<br>B-HET | 0,08923 | 0,00955 | 0,02559 | N-KI<br>B-KO  | 0,02559       | /            |         |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | N-KI<br>B-KO  | 0,08923 | 0,00955 | 0,02559 | N-KI<br>B-HET | 0,02559       | 0,19554      |         |
|                    | N-WT<br>B-HET | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | N-WT<br>B-HET | 0,08923 | 0,00955 | 0,02559 | N-WT<br>B-KO  | 0,02559       | /            |         |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | N-WT<br>B-KO  | 0,08923 | 0,00955 | 0,02559 | N-WT<br>B-HET | 0,02559       | 0,19554      |         |

**Privitak 8.** Statistička analiza za biljeg GFAP: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

|                    | 4 tjedna      |              |               |              |               |              | 9 tjedna     |              |               |              |               |              | 15 tjedna    |              |               |              |              |              |               |              |               |              |         |
|--------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------|
|                    | N-WT<br>B-WT  | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KO<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KO<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KO<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KO<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |         |
| mali mozak         | N-WT<br>B-WT  | /            | 0.00682       | 0.74600      | 0.41643       | 0.84507      | /            | 0.47509      | 0.47509       | 1.00000      | 1.00000       | /            | 1.00000      | 1.00000      | 0.98648       | 0.98648      | /            | 1.00000      | 1.00000       | 0.98648      | 0.98648       | 1.00000      | 1.00000 |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 0.00682      | /             | 0.01011      | 0.02522       | 0.01945      | 0.47509      | /            | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 0.47509      | 1.00000      | 1.00000      | 0.98648       | 0.98648      | 0.47509      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000 |
|                    | N-KI<br>B-HET | 0.74600      | 0.01011       | /            | 0.48945       | 0.61294      | 0.47509      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000 |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 0.32356      | 0.02522       | 0.48945      | /             | 0.84606      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000 |
|                    | N-WT<br>B-HET | 0.41643      | 0.01945       | 0.61294      | 0.84606       | /            | 0.47509      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000 |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 0.84507      | 0.00682       | 0.60652      | 0.24802       | 0.32301      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000 |
| kora velikog mozga | N-WT<br>B-WT  | /            | 1.00000       | 1.00000      | 0.68250       | 1.00000      | /            | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | /            | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | /            | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000 |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 1.00000      | /             | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000 |
|                    | N-KI<br>B-HET | 1.00000      | 1.00000       | /            | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000 |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 0.68250      | 1.00000       | 1.00000      | /             | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000 |
|                    | N-WT<br>B-HET | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | /            | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000 |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000 |
| hipokampus         | N-WT<br>B-WT  | /            | 1.00000       | 0.56271      | 0.27600       | 1.00000      | /            | 1.00000      | 0.27600       | 1.00000      | 1.00000       | /            | 1.00000      | 0.27600      | 1.00000       | 1.00000      | /            | 1.00000      | 0.27600       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000 |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 1.00000      | /             | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000 |
|                    | N-KI<br>B-HET | 0.56271      | 1.00000       | /            | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000 |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 0.27600      | 1.00000       | 1.00000      | /             | 0.78306      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000 |
|                    | N-WT<br>B-HET | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 0.78306       | /            | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000 |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000 |

**Privitak 9.** Statistička analiza za biljeg IBA1: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

|                    |  |  | 4 pojedina    |              |               |              |               |              | 9 pojedina   |              |               |              |               |              | 15 pojedina  |              |               |              |               |              |
|--------------------|--|--|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
|                    |  |  | N-WT<br>B-WT  | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |
| mali mozak         |  |  | N-WT<br>B-WT  | /            | 0,01752       | 0,00136      | 0,00587       | 0,09373      | 0,58964      | /            | 0,05812       | 0,00539      | 0,19824       | 0,02816      | /            | 0,47509      | 0,08234       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |
|                    |  |  | N-KI<br>B-WT  | 0,01752      | /             | 0,05552      | 0,39109       | 0,25531      | 0,09373      | 0,58964      | 0,05812       | 0,00539      | 0,19824       | 0,02816      | 0,02816      | 0,47509      | 0,08234       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |
|                    |  |  | N-KI<br>B-HET | 0,00136      | /             | 0,19834      | 0,01100       | 0,00082      | 0,01107      | 0,00163      | 0,00057       | 0,01107      | 0,00270       | 0,00270      | 0,01107      | 0,00163      | /             | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |
|                    |  |  | N-KI<br>B-KO  | 0,00587      | 0,39109       | 0,19834      | /             | 0,07191      | 0,00319      | 0,01107      | 0,00163       | 0,00057      | 0,017598      | /            | /            | 0,01107      | 0,00163       | 0,00057      | 0,017598      | /            |
|                    |  |  | N-WT<br>B-HET | 0,09373      | 0,25531       | 0,01100      | /             | 0,04294      | 0,00270      | 0,00057      | 0,00270       | 0,00057      | 0,17598       | /            | 0,00270      | 0,00057      | 0,00057       | 0,17598      | /             | /            |
|                    |  |  | N-WT<br>B-KO  | 0,58964      | 0,00879       | 0,00082      | 0,00319       | 0,04294      | 0,00082      | 0,00319      | 0,00082       | 0,00319      | 0,04294       | /            | /            | 0,00319      | 0,00082       | 0,00082      | 0,04294       | /            |
| kora velikog mozga |  |  | N-WT<br>B-WT  | /            | 0,42620       | 0,84824      | 0,05881       | 0,13241      | 0,77977      | /            | 0,00358       | 0,00389      | 0,00798       | 0,28783      | /            | 0,85585      | 0,01991       | 0,85585      | 0,02519       | 0,19060      |
|                    |  |  | N-KI<br>B-WT  | 0,42620      | /             | 0,54302      | 0,1106        | 0,02798      | 0,28668      | 0,42620      | 0,00358       | 0,00389      | 0,00798       | 0,28783      | 0,28783      | 0,85585      | 0,01991       | 0,85585      | 0,02519       | 0,19060      |
|                    |  |  | N-KI<br>B-HET | 0,84824      | 0,54302       | /            | 0,04017       | 0,63842      | 0,09362      | 0,92605      | /             | 0,46001      | 0,00153       | 0,00153      | 0,92605      | 0,01375      | /             | 0,90722      | 0,90722       | 0,23625      |
|                    |  |  | N-KI<br>B-KO  | 0,54302      | 0,54302       | 0,04017      | /             | 0,66425      | 0,10009      | 0,00798      | 0,41054       | 0,46001      | 0,00282       | 0,00282      | 0,00282      | 0,41054      | 0,01745       | 0,01745      | 0,90722       | 0,90722      |
|                    |  |  | N-WT<br>B-HET | 0,13241      | 0,02798       | 0,09362      | /             | 0,21260      | 0,05881      | 0,00798      | 0,00798       | 0,00798      | 0,00282       | 0,00282      | 0,00798      | 0,02519      | 0,01745       | 0,02519      | 0,02519       | 0,28227      |
|                    |  |  | N-WT<br>B-KO  | 0,77977      | 0,28668       | 0,63842      | 0,10009       | 0,21260      | 0,05881      | 0,00798      | 0,00798       | 0,00798      | 0,00282       | 0,00282      | 0,00282      | 0,00798      | 0,02519       | 0,01745      | 0,02519       | 0,02519      |

**Privitak 10.** Statistička analiza za biljeg CD68: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

| 4. jedina    |              |               |              |                    |              |              |              |               |              |               |              | 9. jedina          |              |               |              |               |              |              |              |                    |              |               |              | 15. jedina   |              |               |              |                    |              |  |  |  |  |  |  |
|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------------|--------------|--|--|--|--|--|--|
| mali mozak   |              |               |              | kora velikog mozga |              |              |              | mali mozak    |              |               |              | kora velikog mozga |              |               |              | mali mozak    |              |              |              | kora velikog mozga |              |               |              | mali mozak   |              |               |              | kora velikog mozga |              |  |  |  |  |  |  |
| N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET      | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT       | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET      | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET      | N-WT<br>B-KO |  |  |  |  |  |  |
| /            | 0,09532      | 0,00015       | 0,00003      | 0,00226            | 0,03514      | /            | 0,00182      | 0,00001       | 0,00182      | 0,16755       | 0,16755      | /                  | 0,00197      | 0,00041       | 0,00197      | 0,1573        | 0,1573       | /            | 0,00284      | 0,00018            | 0,00284      | 0,21362       | 0,21362      | /            | 0,00284      | 0,00018       | 0,00284      | 0,21362            | 0,21362      |  |  |  |  |  |  |
| 0,09532      | /            | 0,00064       | 0,00008      | 0,02103            | 0,49206      | 0,00182      | /            | 0,00911       | 0,00182      | 0,25911       | 0,25911      | 0,00182            | /            | 0,00911       | 0,00182      | 0,95369       | 0,95369      | 0,04721      | 0,00182      | 0,00018            | 0,00182      | 0,16755       | 0,16755      | 0,47509      | /            | 0,00000       | 0,98648      | 1,00000            |              |  |  |  |  |  |  |
| 0,00015      | 0,00064      | /             | 0,02775      | 0,01477            | 0,00120      | 0,00001      | 0,00911      | /             | 0,04721      | 0,00473       | 0,00473      | 0,00001            | /            | 0,04721       | 0,00473      | 0,95369       | 0,95369      | /            | 0,00911      | 0,00018            | 0,00018      | 0,25911       | 0,25911      | 0,20776      | 1,00000      | 0,47509       | 0,98648      | 1,00000            |              |  |  |  |  |  |  |
| 0,00003      | 0,00008      | 0,02775       | /            | 0,00076            | 0,00013      | 0,00001      | 0,00911      | 0,04721       | 0,00473      | 0,00473       | 0,00473      | 0,00001            | 0,00911      | 0,04721       | 0,00473      | 0,95369       | 0,95369      | 0,04721      | 0,00911      | 0,00018            | 0,00018      | 0,25911       | 0,25911      | 0,20776      | 1,00000      | 0,47509       | 0,98648      | 1,00000            |              |  |  |  |  |  |  |
| 0,00226      | 0,02103      | 0,01477       | 0,00076      | /                  | 0,05538      | 0,00226      | 0,02103      | 0,01477       | 0,00076      | 0,00013       | 0,00013      | 0,00226            | 0,02103      | 0,01477       | 0,00076      | 0,00013       | 0,00013      | 0,00013      | 0,00013      | 0,00013            | 0,00013      | 0,00013       | 0,00013      | 0,00013      | 0,00013      | 0,00013       | 0,00013      | 0,00013            | 0,00013      |  |  |  |  |  |  |
| 0,03514      | 0,49206      | 0,00120       | 0,00013      | 0,05538            | /            | 0,03514      | 0,49206      | 0,00120       | 0,00013      | 0,05538       | 0,05538      | 0,03514            | 0,49206      | 0,00120       | 0,00013      | 0,05538       | 0,05538      | 0,00120      | 0,00013      | 0,00013            | 0,00013      | 0,00013       | 0,00013      | 0,00013      | 0,00013      | 0,00013       | 0,00013      | 0,00013            | 0,00013      |  |  |  |  |  |  |

**Privitak 11.** Statistička analiza za biljeg TOTAL TAU: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

| 15 tjedana    |                |                |               |              |                |              |                |              |              |
|---------------|----------------|----------------|---------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|--------------|
|               | N-WT<br>B-WT   | N-KI<br>B-WT   | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET  | N-WT<br>B-KO | N-KI<br>B-HET  | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-KO |
| N-WT<br>B-WT  | /              | <b>0.00511</b> | /             | 0.50642      | <b>0.00279</b> | 0.23637      | <b>0.00212</b> | 0.06049      | /            |
| N-KI<br>B-WT  | <b>0.00511</b> | /              | 0.50642       | /            | <b>0.00279</b> | 0.23637      | <b>0.00212</b> | 0.06049      | /            |
| N-KI<br>B-HET | /              | 0.50642        | /             | /            | <b>0.00279</b> | 0.23637      | <b>0.00212</b> | 0.06049      | /            |
| N-KI<br>B-KO  | 0.50642        | /              | /             | /            | <b>0.00279</b> | 0.23637      | <b>0.00212</b> | 0.06049      | /            |

| 9 tjedana     |                |              |                |              |               |              |                |              |              |
|---------------|----------------|--------------|----------------|--------------|---------------|--------------|----------------|--------------|--------------|
|               | N-WT<br>B-WT   | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET  | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-KI<br>B-HET  | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-KO |
| N-WT<br>B-WT  | /              | 0.07845      | <b>0.02225</b> | 0.33700      | 0.58915       | 0.71044      | <b>0.04325</b> | 0.86156      | /            |
| N-KI<br>B-WT  | 0.07845        | /            | 0.33700        | /            | 0.58915       | 0.71044      | <b>0.04325</b> | 0.86156      | /            |
| N-KI<br>B-HET | <b>0.02225</b> | 0.33700      | /              | 0.33700      | 0.58915       | 0.71044      | <b>0.04325</b> | 0.86156      | /            |
| N-KI<br>B-KO  | 0.33700        | /            | 0.33700        | /            | 0.58915       | 0.71044      | <b>0.04325</b> | 0.86156      | /            |

| 4 tjedna      |                |              |               |                |                |              |               |              |              |
|---------------|----------------|--------------|---------------|----------------|----------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
|               | N-WT<br>B-WT   | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO   | N-WT<br>B-HET  | N-WT<br>B-KO | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-KO |
| N-WT<br>B-WT  | /              | 0.38929      | 0.09868       | <b>0.03801</b> | 0.74660        | 0.78658      | 0.54297       | 0.14603      | 0.55712      |
| N-KI<br>B-WT  | 0.38929        | /            | 0.34492       | 0.13575        | 0.25237        | 0.54297      | 0.14603       | 0.55712      | /            |
| N-KI<br>B-HET | 0.09868        | 0.34492      | /             | 0.51155        | 0.06185        | 0.14603      | 0.55712       | /            | /            |
| N-KI<br>B-KO  | <b>0.03801</b> | 0.13575      | 0.51155       | /              | <b>0.02436</b> | 0.05573      | 0.55712       | /            | /            |
| N-WT<br>B-HET | 0.74660        | 0.25237      | 0.06185       | <b>0.02436</b> | /              | 0.55712      | /             | /            | /            |
| N-WT<br>B-KO  | 0.78658        | 0.54297      | 0.14603       | 0.05573        | 0.55712        | /            | /             | /            | /            |

|               | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-KO |
|---------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| N-WT<br>B-WT  | /            | 0.06788      | 0.07060       | 0.98323      | 0.78884       | 0.35441      | 0.11073       | 0.23827      | /            |
| N-KI<br>B-WT  | 0.06788      | /            | 0.98323       | /            | 0.78884       | 0.35441      | 0.11073       | 0.23827      | /            |
| N-KI<br>B-HET | 0.07060      | 0.98323      | /             | /            | 0.78884       | 0.35441      | 0.11073       | 0.23827      | /            |
| N-KI<br>B-KO  | 0.98323      | /            | /             | /            | 0.78884       | 0.35441      | 0.11073       | 0.23827      | /            |

|               | N-WT<br>B-WT   | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET  | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-KI<br>B-HET  | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-KO |
|---------------|----------------|--------------|----------------|--------------|---------------|--------------|----------------|--------------|--------------|
| N-WT<br>B-WT  | /              | 0.06347      | <b>0.01505</b> | 0.48222      | 0.65160       | 0.49125      | <b>0.02979</b> | 0.84452      | /            |
| N-KI<br>B-WT  | 0.06347        | /            | 0.48222        | /            | 0.65160       | 0.49125      | <b>0.02979</b> | 0.84452      | /            |
| N-KI<br>B-HET | <b>0.01505</b> | 0.48222      | /              | 0.48222      | 0.65160       | 0.49125      | <b>0.02979</b> | 0.84452      | /            |
| N-KI<br>B-KO  | 0.48222        | /            | 0.48222        | /            | 0.65160       | 0.49125      | <b>0.02979</b> | 0.84452      | /            |

|               | N-WT<br>B-WT   | N-KI<br>B-WT   | N-KI<br>B-HET  | N-KI<br>B-KO   | N-WT<br>B-HET  | N-WT<br>B-KO   | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-KO |
|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|--------------|--------------|
| N-WT<br>B-WT  | /              | 0.26912        | 0.49674        | <b>0.00024</b> | 0.41463        | 0.16649        | 0.76634       | 0.46395      | 0.55149      |
| N-KI<br>B-WT  | 0.26912        | /              | 0.66050        | <b>0.00306</b> | 0.76370        | 0.76634        | 0.46395       | 0.55149      | /            |
| N-KI<br>B-HET | 0.49674        | 0.66050        | /              | <b>0.00113</b> | 0.88915        | 0.46395        | 0.46395       | 0.55149      | /            |
| N-KI<br>B-KO  | <b>0.00024</b> | <b>0.00306</b> | <b>0.00113</b> | /              | <b>0.00155</b> | <b>0.00595</b> | 0.55149       | /            | /            |
| N-WT<br>B-HET | 0.41463        | 0.76370        | 0.88915        | <b>0.00155</b> | /              | 0.55149        | /             | /            | /            |
| N-WT<br>B-KO  | 0.16649        | 0.76634        | 0.46395        | <b>0.00595</b> | 0.55149        | /              | /             | /            | /            |

|               | N-WT<br>B-WT   | N-KI<br>B-WT   | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-KO |
|---------------|----------------|----------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| N-WT<br>B-WT  | /              | <b>0.00512</b> | 0.26674       | 0.49022      | 0.00293       | 0.00554      | 0.00293       | /            | /            |
| N-KI<br>B-WT  | <b>0.00512</b> | /              | 0.26674       | 0.49022      | 0.00293       | 0.00554      | 0.00293       | /            | /            |
| N-KI<br>B-HET | 0.26674        | 0.49022        | /             | 0.49022      | 0.00293       | 0.00554      | 0.00293       | /            | /            |
| N-KI<br>B-KO  | 0.49022        | 0.49022        | 0.49022       | /            | 0.00293       | 0.00554      | 0.00293       | /            | /            |

|               | N-WT<br>B-WT   | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET  | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-KI<br>B-HET  | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-KO |
|---------------|----------------|--------------|----------------|--------------|---------------|--------------|----------------|--------------|--------------|
| N-WT<br>B-WT  | /              | 0.33042      | <b>0.04239</b> | 0.16402      | 0.67775       | 0.82386      | <b>0.04239</b> | 0.43764      | /            |
| N-KI<br>B-WT  | 0.33042        | /            | 0.16402        | 0.16402      | 0.67775       | 0.82386      | <b>0.04239</b> | 0.43764      | /            |
| N-KI<br>B-HET | <b>0.04239</b> | 0.16402      | /              | 0.16402      | 0.67775       | 0.82386      | <b>0.04239</b> | 0.43764      | /            |
| N-KI<br>B-KO  | 0.16402        | 0.16402      | 0.16402        | /            | 0.67775       | 0.82386      | <b>0.04239</b> | 0.43764      | /            |

|               | N-WT<br>B-WT   | N-KI<br>B-WT   | N-KI<br>B-HET  | N-KI<br>B-KO   | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-KO |
|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| N-WT<br>B-WT  | /              | 0.46395        | 0.88915        | <b>0.00155</b> | 0.55149       | 0.55149      | 0.55149       | 0.55149      | /            |
| N-KI<br>B-WT  | 0.46395        | /              | 0.88915        | <b>0.00155</b> | 0.55149       | 0.55149      | 0.55149       | 0.55149      | /            |
| N-KI<br>B-HET | 0.88915        | 0.88915        | /              | <b>0.00155</b> | 0.55149       | 0.55149      | 0.55149       | 0.55149      | /            |
| N-KI<br>B-KO  | <b>0.00155</b> | <b>0.00155</b> | <b>0.00155</b> | /              | 0.55149       | 0.55149      | 0.55149       | 0.55149      | /            |
| N-WT<br>B-HET | 0.55149        | 0.55149        | 0.55149        | 0.55149        | /             | 0.55149      | 0.55149       | 0.55149      | /            |
| N-WT<br>B-KO  | 0.55149        | 0.55149        | 0.55149        | 0.55149        | 0.55149       | /            | 0.55149       | 0.55149      | /            |

**Privitak 12.** Statistička analiza za biljeg PHF-1: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

|                    | 4 pojedina    |              |               |              |               |              | 9 pojedina   |              |               |              |               |              | 15 pojedina  |              |               |              |              |              |               |              |               |              |         |
|--------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------|
|                    | N-WT<br>B-WT  | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |         |
| mali mozak         | N-WT<br>B-WT  | /            | 1,00000       | 1,00000      | 0,08319       | 1,00000      | /            | 0,03987      | 0,00572       | 0,12149      | 0,09930       | 0,49332      | /            | 0,01304      | 0,03852       | 0,10213      | 0,90692      | 0,01304      | 0,03852       | 0,10213      | 0,13693       | 0,13693      | 0,90692 |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 1,00000      | /             | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | /            | 0,03987      | 0,00572       | 0,12149      | 0,09930       | 0,49332      | 0,01304      | 0,03852      | 0,10213       | 0,13693      | 0,90692      | 0,01304      | 0,03852       | 0,10213      | 0,13693       | 0,13693      | 0,90692 |
|                    | N-KI<br>B-HET | 1,00000      | 1,00000       | /            | 1,00000       | 1,00000      | 0,08319      | 0,03987      | 0,00572       | 0,12149      | 0,09930       | 0,49332      | 0,01304      | 0,03852      | 0,10213       | 0,13693      | 0,90692      | 0,01304      | 0,03852       | 0,10213      | 0,13693       | 0,13693      | 0,90692 |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | /             | 1,00000      | 0,08319      | 0,03987      | 0,00572       | 0,12149      | 0,09930       | 0,49332      | 0,01304      | 0,03852      | 0,10213       | 0,13693      | 0,90692      | 0,01304      | 0,03852       | 0,10213      | 0,13693       | 0,13693      | 0,90692 |
|                    | N-WT<br>B-HET | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | /            | 1,00000      | 0,03987      | 0,00572       | 0,12149      | 0,09930       | 0,49332      | 0,01304      | 0,03852      | 0,10213       | 0,13693      | 0,90692      | 0,01304      | 0,03852       | 0,10213      | 0,13693       | 0,13693      | 0,90692 |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | /            | 0,03987      | 0,00572       | 0,12149      | 0,09930       | 0,49332      | 0,01304      | 0,03852      | 0,10213       | 0,13693      | 0,90692      | 0,01304      | 0,03852       | 0,10213      | 0,13693       | 0,13693      | 0,90692 |
| kora velikog mozga | N-WT<br>B-WT  | /            | 1,00000       | 1,00000      | 0,10401       | 1,00000      | /            | 0,02411      | 0,00405       | 0,41042      | 0,08521       | 0,93959      | /            | 0,00536      | 0,00134       | 0,13179      | 0,83453      | 0,00536      | 0,00134       | 0,13179      | 0,13179       | 0,13179      | 0,83453 |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 1,00000      | /             | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,10401      | 0,02411      | 0,00405       | 0,41042      | 0,08521       | 0,93959      | 0,00536      | 0,00134      | 0,13179       | 0,83453      | 0,00536      | 0,00134      | 0,13179       | 0,13179      | 0,13179       | 0,83453      |         |
|                    | N-KI<br>B-HET | 1,00000      | 1,00000       | /            | 1,00000       | 1,00000      | 0,10401      | 0,02411      | 0,00405       | 0,41042      | 0,08521       | 0,93959      | 0,00536      | 0,00134      | 0,13179       | 0,83453      | 0,00536      | 0,00134      | 0,13179       | 0,13179      | 0,13179       | 0,83453      |         |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | /             | 1,00000      | 0,10401      | 0,02411      | 0,00405       | 0,41042      | 0,08521       | 0,93959      | 0,00536      | 0,00134      | 0,13179       | 0,83453      | 0,00536      | 0,00134      | 0,13179       | 0,13179      | 0,13179       | 0,83453      |         |
|                    | N-WT<br>B-HET | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | /            | 1,00000      | 0,02411      | 0,00405       | 0,41042      | 0,08521       | 0,93959      | 0,00536      | 0,00134      | 0,13179       | 0,83453      | 0,00536      | 0,00134      | 0,13179       | 0,13179      | 0,13179       | 0,83453      |         |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | /            | 0,02411      | 0,00405       | 0,41042      | 0,08521       | 0,93959      | 0,00536      | 0,00134      | 0,13179       | 0,83453      | 0,00536      | 0,00134      | 0,13179       | 0,13179      | 0,13179       | 0,83453      |         |
| hipokampus         | N-WT<br>B-WT  | /            | 0,06487       | 0,87123      | 0,02461       | 0,29198      | 0,02841      | 0,00331      | 0,32278       | 0,11562      | 0,97218       | /            | 0,08544      | 0,08544      | 0,16331       | 0,07594      | 0,08544      | 0,08544      | 0,16331       | 0,16331      | 0,65473       | 0,07594      |         |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 0,06487      | /             | 0,08192      | 0,49607       | 0,31299      | 0,02841      | 0,00331      | 0,32278       | 0,11562      | 0,97218       | 0,08544      | 0,08544      | 0,16331      | 0,07594       | 0,08544      | 0,08544      | 0,16331      | 0,16331       | 0,65473      | 0,07594       |              |         |
|                    | N-KI<br>B-HET | 0,87123      | 0,08192       | /            | 0,03069       | 0,36225      | 0,03393      | 0,00331      | 0,32278       | 0,11562      | 0,97218       | 0,08544      | 0,08544      | 0,16331      | 0,07594       | 0,08544      | 0,08544      | 0,16331      | 0,16331       | 0,65473      | 0,07594       |              |         |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 0,02461      | 0,49607       | 0,03069      | /             | 0,11769      | 0,94193      | 0,00331      | 0,32278       | 0,11562      | 0,97218       | 0,08544      | 0,08544      | 0,16331      | 0,07594       | 0,08544      | 0,08544      | 0,16331      | 0,16331       | 0,65473      | 0,07594       |              |         |
|                    | N-WT<br>B-HET | 0,29198      | 0,31299       | 0,36225      | 0,11769       | /            | 0,13074      | 0,02841      | 0,00331       | 0,32278      | 0,11562       | 0,97218      | 0,08544      | 0,08544      | 0,16331       | 0,07594      | 0,08544      | 0,08544      | 0,16331       | 0,16331      | 0,65473       | 0,07594      |         |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 0,02716      | 0,54069       | 0,03393      | 0,13074       | 0,13074      | /            | 0,02841      | 0,00331       | 0,32278      | 0,11562       | 0,97218      | 0,08544      | 0,08544      | 0,16331       | 0,07594      | 0,08544      | 0,08544      | 0,16331       | 0,16331      | 0,65473       | 0,07594      |         |



**Privitak 13.** Statistička analiza za biljeg CP13: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

|                           | 4. tjedna    |              |               |              |               |              | 9. tjedna    |              |               |              |               |              | 15. tjedna   |              |               |              |               |              |              |              |               |              |         |
|---------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------|
|                           | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KO<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KO<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KO<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KO<br>B-KO |         |
| <b>mali mozak</b>         | /            | 0,77886      | 0,60370       | 0,21814      | 0,05333       | 0,81514      | /            | 0,98648      | 0,20776       | 1,00000      | 1,00000       | 0,69280      | /            | 0,98648      | 0,20776       | 1,00000      | 1,00000       | 0,98648      | /            | 0,69280      | 1,00000       | 1,00000      | 0,98648 |
|                           | 0,77886      | /            | 0,43238       | 0,32093      | 0,03590       | 0,60991      | 0,98648      | /            | 1,00000       | 1,00000      | 0,69280       | 1,00000      | 0,98648      | 0,20776      | 1,00000       | 1,00000      | 0,69280       | 0,98648      | 0,69280      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,98648 |
|                           | 0,60370      | 0,43238      | /             | 0,10283      | 0,11350       | 0,77187      | 0,20776      | 1,00000      | /             | 0,69280      | 1,00000       | 0,69280      | 1,00000      | 0,69280      | 1,00000       | 1,00000      | 0,69280       | 0,69280      | 0,69280      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,98648 |
|                           | 0,21814      | 0,32093      | 0,10283       | /            | 0,00924       | 0,15642      | 1,00000      | 1,00000      | 0,69280       | /            | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 0,69280      | 1,00000       | 1,00000      | 0,69280       | 0,69280      | 0,69280      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000 |
|                           | 0,05333      | 0,03590      | 0,11350       | 0,00924      | /             | 0,07457      | 1,00000      | 1,00000      | 0,69280       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 0,69280      | 1,00000       | 1,00000      | 0,69280       | 0,69280      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000 |
|                           | 0,81514      | 0,60991      | 0,77187       | 0,15642      | 0,07457       | /            | 1,00000      | 1,00000      | 0,69280       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 0,69280      | 1,00000       | 1,00000      | 0,69280       | 0,69280      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000 |
| <b>kora velikog mozga</b> | /            | 0,07010      | 0,50923       | 0,00748      | 0,49763       | 0,63844      | /            | 1,00000      | 1,00000       | 0,63646      | 0,95705       | /            | 0,48595      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,48595       | 1,00000      | 0,48595      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,02807 |
|                           | 0,07010      | /            | 0,18467       | 0,12951      | 0,18980       | 0,13900      | 1,00000      | /            | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,48595      | /            | 1,00000       | 1,00000      | 0,48595       | 1,00000      | 0,48595      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,02807 |
|                           | 0,50923      | 0,18467      | /             | 0,01736      | 0,98460       | 0,84290      | 0,50923      | 0,18467      | /             | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,08551 |
|                           | 0,00748      | 0,12951      | 0,01736       | /            | 0,01788       | 0,01344      | 0,63646      | 1,00000      | 1,00000       | /            | 1,00000       | 1,00000      | 0,63646      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,63646       | 1,00000      | 0,63646      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,08551 |
|                           | 0,49763      | 0,18980      | 0,98460       | 0,01788      | /             | 0,82792      | 0,95705      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,95705      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,95705       | 1,00000      | 0,95705      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,08551 |
|                           | 0,63844      | 0,13900      | 0,84290       | 0,01344      | 0,82792       | /            | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,08551 |
| <b>hipokampus</b>         | /            | 0,59845      | 0,55347       | 0,00320      | 0,12526       | 0,01852      | /            | 1,00000      | 0,47509       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,47509       | 1,00000      | 0,47509      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,74857 |
|                           | 0,59845      | /            | 0,94520       | 0,00580      | 0,26651       | 0,03815      | 1,00000      | /            | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,47509       | 1,00000      | 0,47509      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,74857 |
|                           | 0,55347      | 0,94520      | /             | 0,00628      | 0,29268       | 0,04200      | 0,47509      | 1,00000      | /             | 0,98648      | 0,47509       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,98648       | 0,47509      | 0,98648      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,74857 |
|                           | 0,00320      | 0,00580      | 0,00628       | /            | 0,02536       | 0,17567      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,98648       | 0,47509      | 0,98648      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,74857 |
|                           | 0,12526      | 0,26651      | 0,29268       | 0,02536      | /             | 0,20469      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,98648       | 0,47509      | 0,98648      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,74857 |
|                           | 0,01852      | 0,03815      | 0,04200       | 0,17567      | 0,20469       | /            | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,98648       | 0,47509      | 0,98648      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,74857 |

**Privitak 14.** Statistička analiza za biljeg RZ3: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

| 4. tjedna                 |              |              |               | 9. tjedna    |         |               |              | 15. tjedna    |              |  |              |              |               |              |  |
|---------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------|---------------|--------------|---------------|--------------|--|--------------|--------------|---------------|--------------|--|
|                           | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |         | N-WT<br>B-WT  | N-KI<br>B-WT | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |  | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |  |
| <b>malu mozak</b>         |              |              |               |              |         |               |              |               |              |  |              |              |               |              |  |
| N-WT<br>B-WT              | /            | 0,76376      | 0,56734       | 0,00176      | 0,01532 | /             | 0,18188      | 0,08639       | 0,98802      |  | /            | 0,00218      | 0,00713       | 0,49023      |  |
| N-KI<br>B-WT              | 0,76376      | /            | 0,39328       | 0,00238      | 0,02278 | /             | /            | 0,58684       | 0,18561      |  | 0,00218      | /            | 0,00650       | 0,00127      |  |
| N-KI<br>B-HET             | 0,56734      | 0,39328      | /             | 0,00101      | 0,00745 | N-KI<br>B-HET | 0,58684      | /             | 0,08813      |  | 0,22135      | /            | 0,02724       | 0,00368      |  |
| N-KI<br>B-KO              | 0,00176      | 0,00238      | 0,00101       | /            | 0,01171 | N-WT<br>B-HET | 0,83287      | 0,24173       | 0,84452      |  | 0,00650      | 0,02724      | /             | 0,09682      |  |
| N-WT<br>B-HET             | 0,12749      | 0,19634      | 0,05530       | 0,01171      | /       | N-WT<br>B-KO  | 0,98802      | 0,18561       | /            |  | 0,00650      | 0,02724      | 0,09682       | /            |  |
| N-WT<br>B-KO              | 0,01532      | 0,02278      | 0,00745       | 0,09404      | 0,16351 |               |              |               | /            |  | 0,00127      | 0,00368      | 0,09682       | /            |  |
| <b>kora velikog mozga</b> |              |              |               |              |         |               |              |               |              |  |              |              |               |              |  |
| N-WT<br>B-WT              | /            | 0,30416      | 0,72402       | 0,00100      | 0,05187 | N-WT<br>B-WT  | /            | 0,05511       | 0,63286      |  | /            | 0,01700      | 0,00617       | 0,87778      |  |
| N-KI<br>B-WT              | 0,30416      | /            | 0,49343       | 0,01036      | 0,31923 | N-KI<br>B-WT  | /            | /             | 0,06881      |  | 0,01700      | /            | 0,17907       | 0,01241      |  |
| N-KI<br>B-HET             | 0,72402      | 0,49343      | /             | 0,00223      | 0,10194 | N-KI<br>B-HET | 0,98423      | /             | 0,06699      |  | 0,62495      | /            | 0,07563       | 0,00448      |  |
| N-KI<br>B-KO              | 0,00100      | 0,01036      | 0,00223       | /            | 0,08269 | N-WT<br>B-HET | 0,81025      | 0,10733       | 0,84535      |  | 0,62495      | 0,17907      | /             | 0,17298      |  |
| N-WT<br>B-HET             | 0,40679      | 0,83733      | 0,62951       | 0,00659      | 0,23355 | N-WT<br>B-KO  | 0,63286      | 0,06881       | /            |  | 0,17907      | 0,07563      | 0,17298       | /            |  |
| N-WT<br>B-KO              | 0,05187      | 0,31923      | 0,10194       | 0,08269      | /       |               |              |               | /            |  | 0,87778      | 0,01241      | 0,17298       | /            |  |
| <b>hipokampus</b>         |              |              |               |              |         |               |              |               |              |  |              |              |               |              |  |
| N-WT<br>B-WT              | /            | 0,21783      | 0,94795       | 0,06057      | 0,72154 | N-WT<br>B-WT  | /            | 0,21783       | 0,72154      |  | /            | 0,04953      | 0,41587       | 0,79479      |  |
| N-KI<br>B-WT              | 0,21783      | /            | 0,36116       | 0,05567      | 0,13409 | N-KI<br>B-WT  | /            | /             | 0,13409      |  | 0,04953      | /            | 0,25946       | 0,03571      |  |
| N-KI<br>B-HET             | 0,94795      | 0,36116      | /             | 0,05567      | 0,03840 | N-KI<br>B-HET | 0,06057      | 0,94795       | 0,03840      |  | 0,15149      | /            | 0,69184       | 0,29806      |  |
| N-KI<br>B-KO              | 0,06057      | 0,19950      | 0,05567       | /            | 0,77012 | N-WT<br>B-HET | 0,94795      | 0,19950       | 0,77012      |  | 0,15149      | 0,25946      | /             | 0,17469      |  |
| N-WT<br>B-HET             | 0,72154      | 0,13409      | 0,03840       | 0,77012      | /       | N-WT<br>B-KO  | 0,72154      | 0,13409       | /            |  | 0,03571      | 0,25946      | 0,17469       | /            |  |
| N-WT<br>B-KO              | 0,23355      | 0,23355      | 0,23355       | 0,23355      | /       |               |              |               | /            |  | 0,03571      | 0,25946      | 0,17469       | /            |  |

**Privitak 15.** Statistička analiza za biljeg AT8: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

| 4 tjedna           |  |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              | 9 tjedna      |              |  |         |              |              | 15 tjedna     |              |               |              |  |  |
|--------------------|--|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--|---------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--|--|
|                    |  | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |  |         | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |  |  |
| mali mozak         |  |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |               |              |  |         |              |              |               |              |               |              |  |  |
| N-WT<br>B-WT       |  | /            | 1,00000      | 1,00000       | 0,39750      | 1,00000       | 1,00000      | /            | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  | /       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  |  |
| N-KI<br>B-WT       |  | 1,00000      | /            | 1,00000       | 0,39750      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | /            | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  | 1,00000 | /            | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  |  |
| N-KI<br>B-HET      |  | 1,00000      | 1,00000      | /             | 0,39750      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | /             | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  | 0,47509 | 1,00000      | /            | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 0,08234      |  |  |
| N-KI<br>B-KO       |  | 0,39750      | 0,39750      | 0,39750       | /            | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  | 1,00000 | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 0,69280      |  |  |
| N-WT<br>B-HET      |  | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | /             | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  | 1,00000 | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | /            |  |  |
| N-WT<br>B-KO       |  | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  | 1,00000 | 1,00000      | 0,08234      | 0,69280       | 1,00000      | 1,00000       | /            |  |  |
| kora velikog mozga |  |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |               |              |  |         |              |              |               |              |               |              |  |  |
| N-WT<br>B-WT       |  | /            | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  | /       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  |  |
| N-KI<br>B-WT       |  | 1,00000      | /            | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  | 1,00000 | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 0,10177      |  |  |
| N-KI<br>B-HET      |  | 1,00000      | 1,00000      | /             | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  | 0,31444 | 1,00000      | /            | 0,23151       | 1,00000      | 1,00000       | 0,04973      |  |  |
| N-KI<br>B-KO       |  | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  | 0,55829 | 1,00000      | 0,31444      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 0,10177      |  |  |
| N-WT<br>B-HET      |  | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  | 1,00000 | 1,00000      | 0,42165      | 0,23151       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  |  |
| N-WT<br>B-KO       |  | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  | 1,00000 | 1,00000      | 0,42165      | 0,23151       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  |  |
| hipokampus         |  |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |               |              |  |         |              |              |               |              |               |              |  |  |
| N-WT<br>B-WT       |  | /            | 0,69280      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  | /       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  |  |
| N-KI<br>B-WT       |  | 0,69280      | /            | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  | 0,13243 | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  |  |
| N-KI<br>B-HET      |  | 0,08234      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  | 0,98648 | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 0,31803      |  |  |
| N-KI<br>B-KO       |  | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  | 1,00000 | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  |  |
| N-WT<br>B-HET      |  | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  | 1,00000 | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  |  |
| N-WT<br>B-KO       |  | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  | 1,00000 | 1,00000      | 0,31803      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      |  |  |

**Privitak 16.** Statistička analiza za biljeg sSEZ6: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

|                    |  |  |  | 4 jedna |         |         |         |         |         | 9 jedna |         |         |         |         |         | 15 jedna |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
|--------------------|--|--|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                    |  |  |  | N-WT    | N-KI    | N-KI    | N-WT    | N-WT    | N-WT    | N-KI    | N-KI    | N-KI    | N-WT    | N-WT    | N-WT    | N-KI     | N-KI    | N-KI    | N-WT    | N-WT    | N-WT    | N-KI    | N-KI    | N-KI    |         |         |         |
|                    |  |  |  | B-WT    | B-WT    | B-HET   | B-KO    | B-HET   | B-KO    | B-WT    | B-WT    | B-HET   | B-KO    | B-HET   | B-KO    | B-WT     | B-WT    | B-HET   | B-KO    | B-HET   | B-KO    | B-WT    | B-WT    | B-HET   | B-KO    |         |         |
| mali mozak         |  |  |  | N-WT    | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000  | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 |         |         |
|                    |  |  |  | N-KI    | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000  | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 |
|                    |  |  |  | B-WT    | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000  | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 |
| kora velikog mozga |  |  |  | N-WT    | 0,62231 | 0,37075 | 0,18774 | 0,37075 | 0,09488 | 0,02280 | 0,18774 | 0,18774 | 0,18774 | 0,18774 | 0,18774 | 0,18774  | 0,18774 | 0,18774 | 0,18774 | 0,18774 | 0,18774 | 0,18774 | 0,18774 | 0,18774 | 0,18774 | 0,18774 |         |
|                    |  |  |  | N-KI    | 0,62231 | 0,18774 | 0,18774 | 0,18774 | 0,34981 | 0,04652 | 0,11194 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652  | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 |
|                    |  |  |  | B-WT    | 0,62231 | 0,18774 | 0,18774 | 0,18774 | 0,34981 | 0,04652 | 0,11194 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652  | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 | 0,04652 |
| hipokampus         |  |  |  | N-WT    | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750  | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 |         |
|                    |  |  |  | N-KI    | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750  | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 |
|                    |  |  |  | B-WT    | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750  | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 | 0,39750 |

**Privitak 17.** Statistička analiza za biljeg fISEZ6: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

|                           | 4 tjedna     |              |               |              |               |              | 9 tjedna     |              |               |              |               |              | 15 tjedna    |              |               |              |              |              |               |              |               |              |  |
|---------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--|
|                           | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |  |
| <b>mali mozak</b>         |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |              |              |               |              |               |              |  |
| N-WT<br>B-WT              | /            | 0.65300      | 0.06718       | 0.00203      | 0.52402       | 0.07797      | /            | 0.39588      | 0.29215       | 0.81341      | 0.96370       | /            | 0.39588      | 0.29215      | 0.81341       | 0.96370      | /            | 0.27104      | 0.000512      | 0.01711      | 0.86197       | 0.00436      |  |
| N-KI<br>B-WT              | 0.65300      | /            | 0.12924       | 0.00327      | 0.84550       | 0.15004      | 0.39588      | /            | 0.81341       | 0.10199      | 0.96370       | 0.39588      | /            | 0.81341      | 0.10199       | 0.96370      | 0.39588      | 0.27104      | /             | 0.01711      | 0.86197       | 0.01411      |  |
| N-KI<br>B-HET             | 0.06718      | 0.12924      | /             | 0.02531      | 0.17104       | 0.91748      | 0.29215      | 0.81341      | /             | 0.14038      | 0.84865       | 0.29215      | 0.81341      | /            | 0.14038       | 0.84865      | 0.29215      | 0.81341      | 0.00512       | /            | 0.02086       | 0.86183      |  |
| N-KI<br>B-KO              | 0.00203      | 0.00327      | 0.02531       | /            | 0.00404       | 0.02202      | 0.03271      | 0.10199      | 0.14038       | /            | 0.10842       | 0.03271      | 0.10199      | 0.14038      | /             | 0.10842      | 0.03271      | 0.10199      | 0.01711       | 0.02086      | /             | 0.01711      |  |
| N-WT<br>B-HET             | 0.52402      | 0.84550      | 0.17104       | 0.00404      | /             | 0.19817      | 0.37385      | 0.96370      | 0.84865       | 0.10842      | /             | 0.37385      | 0.96370      | 0.84865      | 0.10842       | /            | 0.37385      | 0.96370      | 0.00436       | 0.01411      | 0.86183       | /            |  |
| N-WT<br>B-KO              | 0.07797      | 0.15004      | 0.91748       | 0.02202      | 0.19817       | /            | 0.37385      | 0.96370      | 0.84865       | 0.10842      | /             | 0.37385      | 0.96370      | 0.84865      | 0.10842       | /            | 0.37385      | 0.96370      | 0.00436       | 0.01411      | 0.86183       | /            |  |
| <b>kora velikog mozga</b> |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |              |              |               |              |               |              |  |
| N-WT<br>B-WT              | /            | 0.95796      | 0.55938       | 0.01603      | 0.42271       | 0.01786      | /            | 0.26264      | 0.37913       | 0.7784       | 0.68474       | /            | 0.26264      | 0.37913      | 0.7784        | 0.68474      | /            | 0.35388      | 0.11126       | 0.03177      | 0.25567       | 0.25522      |  |
| N-KI<br>B-WT              | 0.95796      | /            | 0.59390       | 0.01717      | 0.45140       | 0.01914      | 0.26264      | /            | 0.7784        | 0.02387      | 0.15134       | 0.26264      | /            | 0.7784       | 0.02387       | 0.15134      | 0.26264      | 0.35388      | /             | 0.03177      | 0.06936       | 0.06924      |  |
| N-KI<br>B-HET             | 0.55938      | 0.59390      | /             | 0.03554      | 0.81657       | 0.03988      | 0.37913      | 0.7784       | /             | 0.03350      | 0.22183       | 0.37913      | 0.7784       | /            | 0.03350       | 0.22183      | 0.37913      | 0.11126      | 0.03177       | /            | 0.54533       | 0.54615      |  |
| N-KI<br>B-KO              | 0.01603      | 0.01717      | 0.03554       | /            | 0.04923       | 0.93401      | 0.10966      | 0.02387      | 0.03350       | /            | 0.19084       | 0.10966      | 0.02387      | 0.03350      | /             | 0.19084      | 0.10966      | 0.06936      | 0.06936       | /            | /             | 0.99895      |  |
| N-WT<br>B-HET             | 0.42271      | 0.45140      | 0.81657       | 0.04923      | /             | 0.05537      | 0.68474      | 0.15134      | 0.22183       | 0.19084      | /             | 0.68474      | 0.15134      | 0.22183      | 0.19084       | /            | 0.68474      | 0.25567      | 0.06936       | 0.06936      | 0.99895       | /            |  |
| N-WT<br>B-KO              | 0.01786      | 0.01914      | 0.03988       | 0.93401      | 0.05537       | /            | 0.68474      | 0.15134      | 0.22183       | 0.19084      | /             | 0.68474      | 0.15134      | 0.22183      | 0.19084       | /            | 0.68474      | 0.25522      | 0.06924       | 0.54615      | 0.99895       | /            |  |
| <b>hipokampus</b>         |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |              |              |               |              |               |              |  |
| N-WT<br>B-WT              | /            | 1.00000      | 0.56271       | 0.08319      | 1.00000       | 1.00000      | /            | 0.52199      | 0.02045       | 0.04507      | 0.98300       | /            | 0.52199      | 0.02045      | 0.04507       | 0.98300      | /            | 0.24444      | 0.00804       | 0.03232      | 0.06805       | 0.17652      |  |
| N-KI<br>B-WT              | 1.00000      | /            | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 0.52199      | /            | 0.04507       | 0.00855      | 0.04630       | 0.52199      | /            | 0.04507      | 0.00855       | 0.04630      | 0.52199      | 0.24444      | /             | 0.03232      | 0.36264       | 0.80936      |  |
| N-KI<br>B-HET             | 0.56271      | 1.00000      | /             | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 0.02045      | 0.04507      | /             | 0.18500      | 0.98300       | 0.02045      | 0.04507      | /            | 0.18500       | 0.98300      | 0.02045      | 0.04507      | 0.00804       | /            | 0.11051       | 0.04362      |  |
| N-KI<br>B-KO              | 0.08319      | 1.00000      | 1.00000       | /            | 1.00000       | 1.00000      | 0.04507      | 0.00855      | 0.04630       | /            | 0.17974       | 0.04507      | 0.00855      | 0.04630      | /             | 0.17974      | 0.04507      | 0.03232      | 0.03232       | /            | /             | 0.48870      |  |
| N-WT<br>B-HET             | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | /             | 1.00000      | 0.98300      | 0.98300      | 0.98300       | 0.17974      | /             | 0.98300      | 0.98300      | 0.98300      | 0.17974       | /            | 0.98300      | 0.80936      | 0.80936       | 0.04362      | 0.48870       | /            |  |
| N-WT<br>B-KO              | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | /            | 0.98300      | 0.98300      | 0.98300       | 0.17974      | /             | 0.98300      | 0.98300      | 0.98300      | 0.17974       | /            | 0.98300      | 0.80936      | 0.80936       | 0.04362      | 0.48870       | /            |  |

**Privitak 18.** Statistička analiza za biljeg s/flSEZ6: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

|                           | 4 pojedna    |              |               |              |               |              | 9 pojedna    |              |               |                |                |              | 15 pojedna   |              |                |                |               |              |
|---------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|----------------|----------------|--------------|--------------|--------------|----------------|----------------|---------------|--------------|
|                           | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO   | N-WT<br>B-HET  | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET  | N-KI<br>B-KO   | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |
| <b>mali mozak</b>         | /            | 1,00000      | 1,00000       | 0,39750      | 1,00000       | 1,00000      | /            | 0,71200      | 0,48553       | 0,23369        | 0,21771        | /            | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000        | 0,69280        | 0,13243       | /            |
| N-KI<br>B-WT              | 1,00000      | /            | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,71200      | /            | 0,30458       | 0,14144        | 0,34574        | 0,71200      | /            | 0,30458      | 0,14144        | 0,34574        | 0,71200       | /            |
| N-KI<br>B-HET             | 1,00000      | 1,00000      | /             | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,48553      | 0,30458      | /             | 0,57381        | 0,08069        | 0,48553      | 0,30458      | /            | 0,57381        | 0,08069        | 0,48553       | 0,30458      |
| N-KI<br>B-KO              | 0,39750      | 1,00000      | 1,00000       | /            | 0,56271       | 1,00000      | 0,23369      | 0,14144      | 0,57381       | /              | <b>0,03865</b> | 0,23369      | 0,14144      | 0,57381      | /              | <b>0,03865</b> | 0,23369       | 0,14144      |
| N-WT<br>B-HET             | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 0,56271      | /             | 1,00000      | 0,21771      | 0,34574      | 0,08069       | <b>0,03865</b> | /              | 0,21771      | 0,34574      | 0,08069      | <b>0,03865</b> | /              | 0,21771       | 0,34574      |
| N-WT<br>B-KO              | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | /            | 0,21771      | 0,34574      | 0,08069       | <b>0,03865</b> | /              | 0,21771      | 0,34574      | 0,08069      | <b>0,03865</b> | /              | 0,21771       | 0,34574      |
| <b>kora velikog mozga</b> | /            | 0,39427      | 0,02325       | 0,00041      | 0,00256       | 0,00041      | /            | 0,00688      | 0,00994       | 0,68366        | 0,63463        | /            | 0,00688      | 0,00994      | 0,68366        | 0,63463        | /             |              |
| N-KI<br>B-WT              | 0,39427      | /            | 0,00760       | 0,00021      | 0,01108       | 0,00021      | 0,00688      | /            | 0,71668       | 0,01042        | <b>0,00437</b> | 0,00688      | /            | 0,71668      | 0,01042        | <b>0,00437</b> | 0,00688       | /            |
| N-KI<br>B-HET             | 0,02325      | 0,00760      | /             | 0,00685      | 0,10168       | 0,00695      | 0,00994      | 0,71668      | /             | 0,01544        | 0,00615        | 0,00994      | 0,71668      | /            | 0,01544        | 0,00615        | 0,00994       | 0,71668      |
| N-KI<br>B-KO              | 0,00041      | 0,00021      | 0,00685       | /            | 0,08017       | 0,98992      | 0,68366      | 0,01042      | 0,01544       | /              | 0,39144        | 0,68366      | 0,01042      | 0,01544      | /              | 0,39144        | 0,68366       | 0,01042      |
| N-WT<br>B-HET             | 0,00256      | 0,00108      | 0,10168       | 0,08017      | /             | 0,08164      | 0,63463      | 0,00437      | 0,00615       | 0,39144        | /              | 0,63463      | 0,00437      | 0,00615      | 0,39144        | /              | 0,63463       | 0,00437      |
| N-WT<br>B-KO              | 0,00041      | 0,00021      | 0,00695       | 0,98992      | 0,08164       | /            | 0,63463      | 0,00437      | 0,00615       | 0,39144        | /              | 0,63463      | 0,00437      | 0,00615      | 0,39144        | /              | 0,63463       | 0,00437      |
| <b>hipokampus</b>         | /            | 0,16495      | 0,59243       | 0,32454      | 0,67236       | 0,43511      | /            | 0,01783      | 0,00584       | 0,00436        | 0,00089        | /            | 0,01783      | 0,00584      | 0,00436        | 0,00089        | /             |              |
| N-KI<br>B-WT              | 0,16495      | /            | 0,07550       | 0,03783      | 0,29902       | 0,48446      | 0,01783      | /            | 0,31035       | 0,20411        | 0,01590        | 0,01783      | /            | 0,31035      | 0,20411        | 0,01590        | 0,01783       | /            |
| N-KI<br>B-HET             | 0,59243      | 0,07550      | /             | 0,62975      | 0,35167       | 0,21066      | 0,00584      | 0,31035      | /             | 0,75365        | 0,05795        | 0,00584      | 0,31035      | /            | 0,75365        | 0,05795        | 0,00584       | 0,31035      |
| N-KI<br>B-KO              | 0,32454      | 0,03783      | 0,62975       | /            | 0,17998       | 0,10484      | 0,00436      | 0,20411      | 0,75365       | /              | 0,08770        | 0,00436      | 0,20411      | 0,75365      | /              | 0,08770        | 0,00436       | 0,20411      |
| N-WT<br>B-HET             | 0,67236      | 0,29902      | 0,35167       | 0,17998      | /             | 0,70876      | 0,00089      | 0,01590      | 0,05795       | 0,08770        | /              | 0,00089      | 0,01590      | 0,05795      | 0,08770        | /              | 0,00089       | 0,01590      |
| N-WT<br>B-KO              | 0,43511      | 0,48446      | 0,21066       | 0,10484      | 0,70876       | /            | 0,00089      | 0,01590      | 0,05795       | 0,08770        | /              | 0,00089      | 0,01590      | 0,05795      | 0,08770        | /              | 0,00089       | 0,01590      |



**Privitak 19.** Statistička analiza za biljeg sSEZ6L: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

|                    | 4 tjedna      |              |               |              |               |              | 9 tjedna     |              |               |              |               |              | 15 tjedna    |              |               |              |               |              |
|--------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
|                    | N-WT<br>B-WT  | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KO<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |
| mali mozak         | N-WT<br>B-WT  | /            | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | /            | 0,42420      | 0,14213       | 0,42338      | 0,43004       | /            | 0,41559      | 0,02373      | 0,01493       | 0,20070      | /             | 0,41559      |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 1,00000      | /             | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,42420      | /            | 0,42338       | 0,43004      | 0,43004       | 0,42420      | 0,41559      | 0,06785      | 0,04025       | 0,58337      | 0,41559       | 0,06785      |
|                    | N-KI<br>B-HET | 1,00000      | 1,00000       | /            | 1,00000       | 1,00000      | 0,14213      | 0,42338      | /             | 0,98989      | 0,98989       | 0,21831      | 0,06785      | /            | /             | 0,08263      | 0,21831       | 0,06785      |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | /             | 1,00000      | 0,42338      | 0,43004      | 0,75213       | 0,76162      | 0,76162       | 0,61384      | 0,04025      | 0,68588      | /             | 0,08263      | 0,61384       | 0,04025      |
|                    | N-WT<br>B-HET | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | /            | 0,21831      | 0,61384      | 0,75213       | /            | /             | 0,76162      | 0,01493      | 0,68588      | /             | 0,08263      | 0,76162       | 0,01493      |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,14459      | 0,43004      | 0,98989       | 0,76162      | /             | /            | 0,20070      | 0,14299      | 0,08263       | /            | 0,14459       | 0,20070      |
| kora velikog mozga | N-WT<br>B-WT  | /            | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | /            | 0,16369      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | /            | 0,64157      | 0,23557      | 0,59988       | 0,51531      | /             | 0,64157      |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 1,00000      | /             | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 0,16369      | /            | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 0,64157      | 0,23557      | 0,59988      | 0,51531       | 0,64157      | 0,23557       | 0,59988      |
|                    | N-KI<br>B-HET | 1,00000      | 1,00000       | /            | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | /             | 1,00000      | 1,00000       | 0,23557      | 0,12470      | /            | 0,11477       | 0,54553      | 0,23557       | 0,12470      |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | /             | 1,00000      | 0,51301      | 0,02824      | 0,21748       | 1,00000      | 1,00000       | 0,59988      | 0,95101      | 0,11477      | /             | 0,26350      | 0,59988       | 0,95101      |
|                    | N-WT<br>B-HET | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | /            | 1,00000      | 0,02824      | 0,21748       | 1,00000      | 1,00000       | 0,51531      | 0,28576      | 0,54553      | 0,26350       | 0,26350      | 0,51531       | 0,28576      |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000       | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000      | 1,00000       | /            | /             | 0,28576      | 0,54553      | 0,26350      | 0,26350       | /            | 0,28576       | 0,54553      |
| hipokampus         | N-WT<br>B-WT  | /            | 0,05885       | 0,00013      | 0,00046       | 0,00050      | 0,05885      | 0,00013      | 0,00046       | 0,00050      | 0,82047       | /            | 0,30580      | 0,18429      | 0,70622       | 0,79197      | /             | 0,30580      |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 0,05885      | /             | 0,00046      | 0,00050       | 0,00046      | 0,05885      | 0,00013      | 0,00046       | 0,00050      | 0,82047       | 0,05885      | 0,30580      | 0,18429      | 0,70622       | 0,79197      | 0,05885       | 0,30580      |
|                    | N-KI<br>B-HET | 0,00013      | 0,00046       | /            | 0,04963       | 0,00015      | 0,00046      | 0,00013      | /             | 0,04963      | 0,00015       | 0,18429      | 0,70622      | 0,34768      | 0,12877       | 0,18429      | 0,34768       | 0,12877      |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 0,00050      | 0,00046       | 0,04963      | /             | 0,00058      | 0,00046      | 0,04963      | 0,00058       | 0,00058      | 0,00058       | 0,04970      | 0,21070      | 0,34768      | 0,12877       | 0,04970      | 0,34768       | 0,12877      |
|                    | N-WT<br>B-HET | 0,82047      | 0,07929       | 0,00058      | 0,00058       | /            | 0,00058      | 0,07929      | 0,00058       | 0,00058      | 0,00058       | 0,04970      | 0,21070      | 0,34768      | 0,12877       | 0,04970      | 0,34768       | 0,12877      |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 0,82047      | 0,07929       | 0,00058      | 0,00058       | 0,00058      | 0,07929      | 0,00058      | 0,00058       | 0,00058      | 0,00058       | 0,04970      | 0,21070      | 0,34768      | 0,12877       | 0,04970      | 0,34768       | 0,12877      |

**Privitak 20.** Statistička analiza za biljeg fISEZ6L: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

|                           | 4. tjedna    |              |               |              |               |              | 9. tjedna    |              |               |              |               |              | 15. tjedna   |              |               |              |               |              |
|---------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
|                           | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KO<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |
| <b>malii mozak</b>        |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |               |              |
| N-WT<br>B-WT              | /            | 0.98642      | 0.07492       | 0.93428      | 0.36808       | 0.16929      | /            | 0.00172      | 0.00082       | 0.00306      | 0.00306       | /            | 0.03010      | 0.16035      | 0.00490       | 0.00490      | 0.01175       | 0.01175      |
| N-KI<br>B-WT              | 0.98642      | /            | 0.07311       | 0.92076      | 0.37628       | 0.17345      | 0.00172      | /            | 0.33183       | 0.03673      | 0.49160       | 0.00172      | /            | 0.33183      | 0.03673       | 0.49160      | 0.00172       | 0.00172      |
| N-KI<br>B-HET             | 0.07492      | 0.07311      | /             | 0.08437      | 0.02046       | 0.00992      | 0.00082      | /            | 0.01138       | 0.12909      | 0.12909       | 0.00082      | /            | 0.01138      | 0.12909       | 0.12909      | 0.00082       | 0.00082      |
| N-KI<br>B-KO              | 0.93428      | 0.92076      | 0.08437       | /            | 0.33032       | 0.15043      | 0.33183      | 0.03673      | 0.01138       | 0.09125      | 0.09125       | 0.03673      | 0.01138      | 0.09125      | 0.09125       | 0.09125      | 0.03673       | 0.03673      |
| N-WT<br>B-HET             | 0.36808      | 0.37628      | 0.02046       | 0.33032      | /             | 0.57736      | 0.02233      | 0.03673      | 0.01138       | /            | /             | 0.02233      | 0.03673      | 0.01138      | /             | /            | /             | /            |
| N-WT<br>B-KO              | 0.16929      | 0.17345      | 0.00992       | 0.15043      | 0.57736       | /            | 0.00306      | 0.49160      | 0.12909       | 0.09125      | /             | 0.00306      | 0.49160      | 0.12909      | 0.09125       | /            | /             | /            |
| <b>kora velikog mozga</b> |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |               |              |
| N-WT<br>B-WT              | /            | 0.00868      | 0.00298       | 0.09109      | 0.03093       | 0.00981      | /            | 0.33957      | 0.04100       | 0.47766      | 0.47766       | /            | 0.23626      | 0.81851      | 0.00738       | 0.00738      | 0.05769       | 0.05769      |
| N-KI<br>B-WT              | 0.00868      | /            | 0.36544       | 0.09109      | 0.00057       | 0.00028      | 0.33957      | /            | 0.23590       | 0.50875      | 0.97542       | 0.33957      | /            | 0.23590      | 0.50875       | 0.97542      | 0.33957       | 0.33957      |
| N-KI<br>B-HET             | 0.00298      | 0.00298      | /             | 0.00049      | 0.00027       | 0.00014      | 0.04100      | 0.23590      | /             | 0.84859      | 0.41388       | 0.04100      | 0.23590      | /            | 0.84859       | 0.41388      | 0.04100       | 0.04100      |
| N-KI<br>B-KO              | 0.09109      | 0.00111      | 0.00049       | /            | 0.45682       | 0.13748      | 0.23590      | 0.50875      | 0.84859       | /            | 0.60594       | 0.23590      | 0.50875      | 0.84859      | 0.60594       | 0.60594      | 0.60594       | 0.60594      |
| N-WT<br>B-HET             | 0.03093      | 0.00057      | 0.00027       | 0.45682      | /             | 0.39392      | 0.18856      | 0.50875      | 0.84859       | 0.60594      | /             | 0.18856      | 0.50875      | 0.84859      | 0.60594       | 0.60594      | 0.60594       | 0.60594      |
| N-WT<br>B-KO              | 0.00981      | 0.00028      | 0.00014       | 0.13748      | 0.39392       | /            | 0.47766      | 0.97542      | 0.41388       | 0.60594      | /             | 0.47766      | 0.97542      | 0.41388      | 0.60594       | 0.60594      | 0.60594       | 0.60594      |
| <b>hipokampus</b>         |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |               |              |
| N-WT<br>B-WT              | /            | 0.31689      | 0.98697       | 0.31023      | 0.56984       | 0.26836      | /            | 0.50612      | 0.54710       | 0.23105      | 0.11944       | /            | 0.31689      | 0.98697      | 0.31023       | 0.56984      | 0.26836       | 0.26836      |
| N-KI<br>B-WT              | 0.31689      | /            | 0.31023       | 0.56984      | 0.26836       | 0.26836      | 0.50612      | 0.54710      | 0.23105       | 0.23105      | 0.11944       | 0.31689      | 0.98697      | 0.31023      | 0.56984       | 0.26836      | 0.26836       | 0.26836      |
| N-KI<br>B-HET             | 0.98697      | 0.31023      | /             | 0.55937      | 0.63585       | 0.6504       | 0.23157      | 0.54710      | 0.23105       | 0.09220      | 0.04871       | 0.98697      | 0.31023      | /            | 0.55937       | 0.63585      | 0.6504        | 0.6504       |
| N-KI<br>B-KO              | 0.31023      | 0.56984      | 0.55937       | 0.63585      | 0.6504        | 0.26836      | 0.54710      | 0.23105      | 0.09220       | 0.50512      | 0.27311       | 0.31023      | 0.56984      | 0.55937      | 0.63585       | 0.6504       | 0.6504        | 0.6504       |
| N-WT<br>B-HET             | 0.56984      | 0.63585      | 0.6504        | 0.26836      | 0.26836       | 0.26836      | 0.23105      | 0.09220      | 0.50512       | /            | 0.62962       | 0.56984      | 0.63585      | 0.6504       | 0.26836       | 0.26836      | 0.26836       | 0.26836      |
| N-WT<br>B-KO              | 0.26836      | 0.26836      | 0.26836       | 0.26836      | 0.26836       | 0.26836      | 0.11944      | 0.04871      | 0.27311       | 0.62962      | /             | 0.26836      | 0.26836      | 0.26836      | 0.26836       | 0.26836      | 0.26836       | 0.26836      |



**Privitak 22.** Statistička analiza za biljeg sAPPTotal: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

|                           | 4 pojedna    |              |               |              |               |              | 9 pojedna    |              |               |              |               |              | 15 pojedna   |              |               |              |              |              |               |              |               |              |  |
|---------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--|
|                           | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KO<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KO<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KO<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KO<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |  |
| <b>malii mozak</b>        |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |              |              |               |              |               |              |  |
| N-WT<br>B-WT              | /            | 0.22707      | 0.01267       | 0.04221      | 0.93787       | 0.01541      | /            | 0.00386      | 0.00085       | 0.01988      | 0.38103       | /            | 0.00386      | 0.00085      | 0.01988       | 0.38103      | /            | 0.00386      | 0.00085       | 0.01988      | 0.38103       | 0.00926      |  |
| N-KI<br>B-WT              | 0.22707      | /            | 0.07359       | 0.26589      | 0.25302       | 0.00334      | 0.00386      | /            | 0.09703       | 0.14981      | 0.00926       | 0.00926      | 0.00386      | /            | 0.09703       | 0.14981      | 0.00926      | 0.00386      | /             | 0.09703      | 0.14981       | 0.00926      |  |
| N-KI<br>B-HET             | 0.01267      | 0.07359      | /             | 0.38439      | 0.01399       | 0.00047      | 0.00085      | 0.09703      | /             | 0.01345      | 0.00165       | 0.00165      | 0.00085      | 0.09703      | /             | 0.01345      | 0.00165      | 0.00165      | 0.00085       | 0.00165      | 0.00165       | 0.00165      |  |
| N-KI<br>B-KO              | 0.04221      | 0.26589      | 0.38439       | /            | 0.04710       | 0.00103      | 0.09703      | 0.14981      | 0.01345       | /            | 0.06084       | 0.06084      | 0.01988      | 0.14981      | 0.01345       | 0.06084      | 0.06084      | 0.01988      | 0.14981       | 0.01345      | 0.06084       | 0.06084      |  |
| N-WT<br>B-HET             | 0.93787      | 0.25302      | 0.01399       | 0.04710      | /             | 0.01394      | 0.00926      | 0.00926      | 0.00165       | 0.06084      | /             | 0.06084      | 0.00926      | 0.00165      | 0.06084       | /            | 0.06084      | 0.00926      | 0.00165       | 0.06084      | /             | /            |  |
| N-WT<br>B-KO              | 0.01541      | 0.00334      | 0.00047       | 0.00103      | 0.01394       | /            | 0.00926      | 0.00165      | 0.06084       | /            | /             | /            | 0.00926      | 0.00165      | 0.06084       | /            | 0.00926      | 0.00165      | 0.06084       | /            | /             | /            |  |
| <b>kora velikog mozga</b> |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |              |              |               |              |               |              |  |
| N-WT<br>B-WT              | /            | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 0.56271       | 1.00000      | /            | 0.01177      | 0.00104       | 0.30089      | 0.65985       | /            | 0.01177      | 0.00104      | 0.30089       | 0.65985      | /            | 0.01177      | 0.00104       | 0.30089      | 0.65985       | 0.02578      |  |
| N-KI<br>B-WT              | 1.00000      | /            | 1.00000       | 1.00000      | 0.08319       | 0.56271      | 0.01177      | /            | 0.27657       | 0.36642      | 0.02578       | 0.01177      | /            | 0.27657      | 0.36642       | 0.02578      | 0.01177      | /            | 0.27657       | 0.36642      | 0.02578       | 0.02578      |  |
| N-KI<br>B-HET             | 1.00000      | 1.00000      | /             | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 0.00104      | 0.27657      | /             | 0.10305      | 0.00484       | 0.00104      | 0.27657      | /            | 0.10305       | 0.00484      | 0.00104      | 0.27657      | /             | 0.10305      | 0.00484       | 0.00484      |  |
| N-KI<br>B-KO              | 1.00000      | 1.00000      | 1.00000       | /            | 1.00000       | 1.00000      | 0.30089      | 0.36642      | 0.10305       | /            | 0.23293       | 0.30089      | 0.36642      | 0.10305      | /             | 0.23293      | 0.30089      | 0.36642      | 0.10305       | /            | 0.23293       | 0.23293      |  |
| N-WT<br>B-HET             | 0.56271      | 0.08319      | 1.00000       | 1.00000      | /             | 1.00000      | 0.02578      | 0.02578      | 0.00484       | 0.23293      | /             | 0.02578      | 0.00484      | 0.23293      | /             | 0.02578      | 0.00484      | 0.23293      | 0.02578       | 0.00484      | 0.23293       | /            |  |
| N-WT<br>B-KO              | 1.00000      | 0.56271      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | /            | 0.02578      | 0.00484      | 0.23293       | 0.23293      | /             | 0.02578      | 0.00484      | 0.23293      | /             | 0.02578      | 0.00484      | 0.23293      | 0.02578       | 0.00484      | 0.23293       | /            |  |
| <b>hipokampus</b>         |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |               |              |              |              |               |              |              |              |               |              |               |              |  |
| N-WT<br>B-WT              | /            | 0.12761      | 0.01877       | 0.05837      | 0.16636       | 0.33252      | /            | 0.15377      | 0.00965       | 0.05507      | 0.61322       | /            | 0.15377      | 0.00965      | 0.05507       | 0.61322      | /            | 0.15377      | 0.00965       | 0.05507      | 0.61322       | 0.01873      |  |
| N-KI<br>B-WT              | 0.12761      | /            | 0.20391       | 0.59183      | 0.85377       | 0.50239      | 0.15377      | /            | 0.06249       | 0.45405      | 0.30539       | 0.15377      | /            | 0.06249      | 0.45405       | 0.30539      | 0.15377      | /            | 0.06249       | 0.45405      | 0.30539       | 0.33623      |  |
| N-KI<br>B-HET             | 0.01877      | 0.20391      | /             | 0.42316      | 0.15682       | 0.07627      | 0.00965      | 0.06249      | /             | 0.17554      | 0.01674       | 0.00965      | 0.06249      | /            | 0.17554       | 0.01674      | 0.00965      | 0.06249      | /             | 0.17554      | 0.01674       | 0.17745      |  |
| N-KI<br>B-KO              | 0.05837      | 0.59183      | 0.42316       | /            | 0.47686       | 0.24796      | 0.06249      | 0.45405      | 0.17554       | /            | 0.10829       | 0.05507      | 0.45405      | 0.17554      | /             | 0.10829      | 0.05507      | 0.45405      | 0.17554       | /            | 0.10829       | 0.13808      |  |
| N-WT<br>B-HET             | 0.16636      | 0.85377      | 0.15682       | 0.47686      | /             | 0.62103      | 0.61322      | 0.30539      | 0.01674       | 0.10829      | /             | 0.61322      | 0.30539      | 0.01674      | 0.10829       | /            | 0.61322      | 0.30539      | 0.01674       | 0.10829      | /             | 0.13808      |  |
| N-WT<br>B-KO              | 0.33252      | 0.50239      | 0.07627       | 0.24796      | 0.62103       | /            | 0.30539      | 0.01674      | 0.10829       | 0.10829      | /             | 0.30539      | 0.01674      | 0.10829      | 0.10829       | /            | 0.30539      | 0.01674      | 0.10829       | 0.10829      | /             | /            |  |

**Privitak 23.** Statistička analiza za biljeg flAPP: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

|                    | 4 pojedna     |              |               |              |               |              | 9 pojedna    |              |               |              |               |              | 15 pojedna   |              |               |              |              |              |               |              |               |              |         |         |
|--------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------|---------|
|                    | N-WT<br>B-WT  | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-WT | N-KI<br>B-WT | N-KI<br>B-HET | N-KI<br>B-KO | N-WT<br>B-HET | N-WT<br>B-KO |         |         |
| mali mozak         | N-WT<br>B-WT  | /            | 0.26775       | 0.16746      | 0.44590       | 0.76650      | /            | 0.51777      | /             | 0.21575      | 0.44721       | 0.59461      | /            | 0.07792      | /             | 0.07792      | /            | 0.07792      | 0.03147       | 0.48729      | 0.23651       | 0.74420      | 0.12088 |         |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 0.26775      | /             | 0.73925      | 0.69897       | 0.39760      | 0.51777      | /            | 0.21575       | 0.90237      | 0.90354       | 0.59461      | 0.51777      | /            | 0.21575       | 0.90354      | 0.90354      | 0.51777      | 0.50305       | 0.44721      | 0.90237       | 0.90354      | 0.59461 |         |
|                    | N-KI<br>B-HET | 0.16746      | 0.73925       | /            | 0.47913       | 0.25470      | 0.50305      | 0.21575      | /             | 0.18283      | 0.25373       | 0.25470      | 0.44721      | 0.90237      | 0.18283       | 0.25373      | 0.25373      | 0.44721      | 0.90237       | 0.18283      | 0.25373       | 0.25373      | 0.25373 | 0.25373 |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 0.44590      | 0.69897       | 0.47913      | /             | 0.63168      | 0.44721      | 0.90237      | 0.18283       | /            | 0.80779       | 0.80779      | 0.59461      | 0.90354      | 0.25373       | 0.80779      | 0.80779      | 0.59461      | 0.90354       | 0.25373      | 0.80779       | 0.80779      | 0.80779 | 0.80779 |
|                    | N-WT<br>B-HET | 0.57716      | 0.12016       | 0.07415      | 0.20966       | /            | 0.40277      | 0.44721      | 0.90237       | 0.18283      | /             | 0.80779      | 0.59461      | 0.90354      | 0.25373       | 0.80779      | 0.80779      | 0.59461      | 0.90354       | 0.25373      | 0.80779       | 0.80779      | 0.80779 | 0.80779 |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 0.76650      | 0.39760       | 0.25470      | 0.63168       | 0.40277      | /            | 0.59461      | 0.90354       | 0.25373      | 0.80779       | /            | 0.59461      | 0.90354      | 0.25373       | 0.80779      | 0.80779      | 0.59461      | 0.90354       | 0.25373      | 0.80779       | 0.80779      | 0.80779 | 0.80779 |
| kora velikog mozga | N-WT<br>B-WT  | /            | 0.22149       | 0.42754      | 0.00418       | 0.05758      | /            | 0.04602      | /             | 0.30959      | 0.24031       | 0.24031      | /            | 0.04602      | /             | 0.30959      | 0.24031      | 0.24031      | 0.00525       | 0.41194      | 0.24031       | 0.24031      | 0.24031 |         |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 0.22149      | /             | 0.06868      | 0.01111       | 0.01000      | 0.04602      | /            | 0.30959       | 0.03030      | 0.76393       | 0.24031      | 0.24031      | 0.04602      | /             | 0.30959      | 0.03030      | 0.76393      | 0.00525       | 0.41194      | 0.24031       | 0.24031      | 0.24031 |         |
|                    | N-KI<br>B-HET | 0.42754      | 0.06868       | /            | 0.01095       | 0.18615      | 0.00525      | 0.30959      | /             | 0.00645      | 0.31030       | 0.31030      | 0.24031      | 0.00525      | 0.30959       | 0.00645      | 0.31030      | 0.31030      | 0.00645       | 0.41194      | 0.24031       | 0.24031      | 0.24031 |         |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 0.00418      | 0.00111       | 0.01095      | /             | 0.07626      | 0.41194      | 0.03030      | 0.00645       | /            | 0.11118       | 0.11118      | 0.24031      | 0.00645      | 0.03030       | 0.00645      | 0.11118      | 0.11118      | 0.00645       | 0.41194      | 0.24031       | 0.24031      | 0.24031 |         |
|                    | N-WT<br>B-HET | 0.67177      | 0.12039       | 0.69914      | 0.00683       | /            | 0.10644      | 0.41194      | 0.03030       | 0.00645      | 0.11118       | 0.11118      | 0.24031      | 0.00645      | 0.03030       | 0.00645      | 0.11118      | 0.11118      | 0.00645       | 0.41194      | 0.24031       | 0.24031      | 0.24031 |         |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 0.05758      | 0.01000       | 0.18615      | 0.07626       | 0.10644      | /            | 0.24031      | 0.00645       | 0.11118      | 0.11118       | 0.11118      | 0.24031      | 0.00645      | 0.03030       | 0.00645      | 0.11118      | 0.11118      | 0.00645       | 0.41194      | 0.24031       | 0.24031      | 0.24031 |         |
| hipokampus         | N-WT<br>B-WT  | /            | 1.00000       | 0.78306      | 0.08319       | 1.00000      | /            | 0.23014      | /             | 0.89306      | 0.00472       | 0.64411      | 0.64411      | /            | 0.23014       | 0.89306      | 0.00472      | 0.64411      | 0.27524       | 0.00311      | 0.00472       | 0.64411      | 0.64411 |         |
|                    | N-KI<br>B-WT  | 1.00000      | /             | 1.00000      | 0.78306       | 1.00000      | 0.23014      | /            | 0.89306       | 0.01070      | 0.01780       | 0.64411      | 0.64411      | 0.64411      | 0.23014       | 0.89306      | 0.01070      | 0.01780      | 0.27524       | 0.00311      | 0.00472       | 0.64411      | 0.64411 |         |
|                    | N-KI<br>B-HET | 0.78306      | 1.00000       | /            | 1.00000       | 1.00000      | 0.00311      | 0.01070      | 0.00930       | /            | 0.01531       | 0.64411      | 0.64411      | 0.64411      | 0.00311       | 0.01070      | 0.00930      | 0.01531      | 0.00311       | 0.01070      | 0.00930       | 0.01531      | 0.01531 |         |
|                    | N-KI<br>B-KO  | 0.08319      | 0.78306       | 1.00000      | /             | 1.00000      | 0.00311      | 0.01070      | 0.00930       | /            | 0.01531       | 0.64411      | 0.64411      | 0.64411      | 0.00311       | 0.01070      | 0.00930      | 0.01531      | 0.00311       | 0.01070      | 0.00930       | 0.01531      | 0.01531 |         |
|                    | N-WT<br>B-HET | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | /            | 1.00000      | 0.00472      | 0.01780       | 0.01531      | 0.64411       | 0.64411      | 0.64411      | 0.64411      | 0.00472       | 0.01780      | 0.01531      | 0.64411      | 0.00472       | 0.01780      | 0.01531       | 0.64411      | 0.64411 |         |
|                    | N-WT<br>B-KO  | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | 1.00000       | 1.00000      | /            | 0.00472      | 0.01780       | 0.01531      | 0.64411       | 0.64411      | 0.64411      | 0.64411      | 0.00472       | 0.01780      | 0.01531      | 0.64411      | 0.00472       | 0.01780      | 0.01531       | 0.64411      | 0.64411 |         |

**Privitak 24.** Statistička analiza za biljeg sAPPtotal/flAPP: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

| 4. jedina          |       |         |         |         |         |         |         |       |      |       |      |
|--------------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|------|-------|------|
|                    |       | N-WT    | N-KI    | N-KI    | N-KI    | N-WT    | N-WT    | N-WT  | N-WT | N-WT  | N-WT |
|                    |       | B-WT    | B-WT    | B-HET   | B-KO    | B-HET   | B-KO    | B-HET | B-KO | B-HET | B-KO |
| mali mozak         |       |         |         |         |         |         |         |       |      |       |      |
| N-WT               |       | /       | 0,87618 | 0,57099 | 0,49223 | 0,57908 | 0,12707 |       |      |       |      |
| N-KI               |       | 0,87618 | /       | 0,47509 | 0,40587 | 0,48227 | 0,15902 |       |      |       |      |
| N-KI               | B-HET | 0,57099 | 0,47509 | /       | 0,89927 | 0,99013 | 0,05556 |       |      |       |      |
| N-KI               | B-KO  | 0,49223 | 0,40587 | 0,89927 | /       | 0,88951 | 0,04644 |       |      |       |      |
| N-WT               | B-HET | 0,57908 | 0,48227 | 0,99013 | 0,88951 | /       | 0,05655 |       |      |       |      |
| N-WT               | B-KO  | 0,12707 | 0,15902 | 0,05556 | 0,04644 | 0,05655 | /       |       |      |       |      |
| kora velikog mozga |       |         |         |         |         |         |         |       |      |       |      |
| N-WT               |       | /       | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 0,56271 | 1,00000 |       |      |       |      |
| N-KI               |       | 1,00000 | /       | 1,00000 | 0,78306 | 0,08319 | 0,78306 |       |      |       |      |
| N-KI               | B-HET | 1,00000 | 1,00000 | /       | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 |       |      |       |      |
| N-KI               | B-KO  | 1,00000 | 0,78306 | 1,00000 | /       | 1,00000 | 1,00000 |       |      |       |      |
| N-WT               | B-HET | 0,56271 | 0,08319 | 1,00000 | 1,00000 | /       | 1,00000 |       |      |       |      |
| N-WT               | B-KO  | 1,00000 | 0,78306 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | /       |       |      |       |      |
| hipokampus         |       |         |         |         |         |         |         |       |      |       |      |
| N-WT               |       | /       | 0,50734 | 0,24586 | 0,57999 | 0,57232 | 0,88563 |       |      |       |      |
| N-KI               |       | 0,50734 | /       | 0,58232 | 0,24466 | 0,91767 | 0,42543 |       |      |       |      |
| N-KI               | B-HET | 0,24586 | 0,58232 | /       | 0,11057 | 0,51662 | 0,20102 |       |      |       |      |
| N-KI               | B-KO  | 0,57999 | 0,24466 | 0,11057 | /       | 0,28198 | 0,67895 |       |      |       |      |
| N-WT               | B-HET | 0,57232 | 0,91767 | 0,51662 | 0,28198 | /       | 0,48325 |       |      |       |      |
| N-WT               | B-KO  | 0,88563 | 0,42543 | 0,20102 | 0,67895 | 0,48325 | /       |       |      |       |      |

| 9. jedina          |       |         |         |         |         |         |         |       |      |       |      |
|--------------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|------|-------|------|
|                    |       | N-WT    | N-KI    | N-KI    | N-KI    | N-WT    | N-WT    | N-WT  | N-WT | N-WT  | N-WT |
|                    |       | B-WT    | B-WT    | B-HET   | B-KO    | B-HET   | B-KO    | B-HET | B-KO | B-HET | B-KO |
| mali mozak         |       |         |         |         |         |         |         |       |      |       |      |
| N-WT               |       | /       | 0,98648 | 0,20776 | 1,00000 | 0,98648 | 1,00000 |       |      |       |      |
| N-KI               |       | 0,98648 | /       | 1,00000 | 0,98648 | 1,00000 | 0,98648 |       |      |       |      |
| N-KI               | B-HET | 0,20776 | 1,00000 | /       | 1,00000 | 0,20776 | 0,20776 |       |      |       |      |
| N-KI               | B-KO  | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | /       | 1,00000 |       |      |       |      |
| N-WT               | B-HET | 1,00000 | 0,98648 | 0,20776 | 1,00000 | 1,00000 | /       |       |      |       |      |
| N-WT               | B-KO  | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 |       |      |       |      |
| kora velikog mozga |       |         |         |         |         |         |         |       |      |       |      |
| N-WT               |       | /       | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 |       |      |       |      |
| N-KI               |       | 1,00000 | /       | 1,00000 | 0,47509 | 1,00000 | 1,00000 |       |      |       |      |
| N-KI               | B-HET | 1,00000 | 1,00000 | /       | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 |       |      |       |      |
| N-KI               | B-KO  | 1,00000 | 0,47509 | 1,00000 | /       | 0,69280 | 0,69280 |       |      |       |      |
| N-WT               | B-HET | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 0,69280 | /       |       |      |       |      |
| N-WT               | B-KO  | 1,00000 | 1,00000 | 1,00000 | 0,69280 | 0,69280 | 1,00000 |       |      |       |      |
| hipokampus         |       |         |         |         |         |         |         |       |      |       |      |
| N-WT               |       | /       | 0,59742 | 0,01957 | 0,54225 | 0,16617 | 0,16617 |       |      |       |      |
| N-KI               |       | 0,59742 | /       | 0,03704 | 0,27788 | 0,08076 | 0,08076 |       |      |       |      |
| N-KI               | B-HET | 0,01957 | 0,03704 | /       | 0,00994 | 0,00409 | 0,00409 |       |      |       |      |
| N-KI               | B-KO  | 0,54225 | 0,27788 | 0,00994 | /       | 0,37825 | 0,37825 |       |      |       |      |
| N-WT               | B-HET | 0,16617 | 0,08076 | 0,00409 | 0,37825 | /       | 0,37825 |       |      |       |      |
| N-WT               | B-KO  | 0,16617 | 0,08076 | 0,00409 | 0,37825 | 0,37825 | /       |       |      |       |      |

| 15. jedina         |       |         |         |         |         |         |         |       |      |       |      |
|--------------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|------|-------|------|
|                    |       | N-WT    | N-KI    | N-KI    | N-KI    | N-WT    | N-WT    | N-WT  | N-WT | N-WT  | N-WT |
|                    |       | B-WT    | B-WT    | B-HET   | B-KO    | B-HET   | B-KO    | B-HET | B-KO | B-HET | B-KO |
| mali mozak         |       |         |         |         |         |         |         |       |      |       |      |
| N-WT               |       | /       | 0,01531 | 0,01345 | 0,90594 | 0,10458 | 0,36180 |       |      |       |      |
| N-KI               |       | 0,01531 | /       | 0,90594 | 0,10458 | 0,16312 | 0,04761 |       |      |       |      |
| N-KI               | B-HET | 0,01345 | 0,90594 | /       | 0,13898 | 0,16312 | 0,04102 |       |      |       |      |
| N-KI               | B-KO  | 0,10458 | 0,16312 | 0,13898 | 0,16312 | 0,13898 | 0,37356 |       |      |       |      |
| N-WT               | B-HET | 0,36180 | 0,04761 | 0,04102 | 0,37356 | 0,37356 | /       |       |      |       |      |
| N-WT               | B-KO  | 0,36180 | 0,04761 | 0,04102 | 0,37356 | 0,37356 | 0,37356 |       |      |       |      |
| kora velikog mozga |       |         |         |         |         |         |         |       |      |       |      |
| N-WT               |       | /       | 0,05757 | 0,01021 | 0,18054 | 0,05757 | 0,02264 |       |      |       |      |
| N-KI               |       | 0,05757 | /       | 0,18054 | 0,90339 | 0,05757 | 0,46154 |       |      |       |      |
| N-KI               | B-HET | 0,01021 | 0,18054 | /       | 0,21269 | 0,21269 | 0,48241 |       |      |       |      |
| N-KI               | B-KO  | 0,04926 | 0,90339 | 0,21269 | 0,21269 | 0,21269 | 0,53287 |       |      |       |      |
| N-WT               | B-HET | 0,02264 | 0,46154 | 0,48241 | 0,53287 | 0,53287 | 0,53287 |       |      |       |      |
| N-WT               | B-KO  | 0,02264 | 0,46154 | 0,48241 | 0,53287 | 0,53287 | 0,53287 |       |      |       |      |
| hipokampus         |       |         |         |         |         |         |         |       |      |       |      |
| N-WT               |       | /       | 0,07137 | 0,06517 | 0,94462 | 0,63618 | 0,21207 |       |      |       |      |
| N-KI               |       | 0,07137 | /       | 0,94462 | 0,13544 | 0,13544 | 0,43329 |       |      |       |      |
| N-KI               | B-HET | 0,06517 | 0,94462 | /       | 0,12329 | 0,12329 | 0,39756 |       |      |       |      |
| N-KI               | B-KO  | 0,63618 | 0,13544 | 0,12329 | 0,12329 | 0,12329 | 0,39650 |       |      |       |      |
| N-WT               | B-HET | 0,21207 | 0,43329 | 0,39756 | 0,39650 | 0,39650 | 0,39650 |       |      |       |      |
| N-WT               | B-KO  | 0,21207 | 0,43329 | 0,39756 | 0,39650 | 0,39650 | 0,39650 |       |      |       |      |



**Privitak 25.** Statistička analiza za biljeg APP CTFs: *p* vrijednosti dobivene *post-hoc* analizom, odnosno usporedbom srednjih vrijednosti pojedinačnih skupina.

| 4 pojedina         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  | 9 pojedina |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  | 15 pojedina |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
|--------------------|--|--|--|---------|--|--|--|---------|--|--|--|------------|--|--|--|---------|--|--|--|---------|--|--|--|-------------|--|--|--|---------|--|--|--|---------|--|--|--|---------|--|--|--|---------|--|--|--|---|--|--|--|---|--|--|--|---|--|--|--|---|--|--|--|---|--|--|--|---|--|--|--|---|--|--|--|
| N-WT               |  |  |  | N-KI    |  |  |  | N-WT    |  |  |  | N-WT       |  |  |  | N-KI    |  |  |  | N-WT    |  |  |  | N-KI        |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
| B-WT               |  |  |  | B-WT    |  |  |  | B-WT    |  |  |  | B-WT       |  |  |  | B-WT    |  |  |  | B-WT    |  |  |  | B-WT        |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
| B-HET              |  |  |  | B-HET   |  |  |  | B-HET   |  |  |  | B-HET      |  |  |  | B-HET   |  |  |  | B-HET   |  |  |  | B-HET       |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
| B-KO               |  |  |  | B-KO    |  |  |  | B-KO    |  |  |  | B-KO       |  |  |  | B-KO    |  |  |  | B-KO    |  |  |  | B-KO        |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
| mali mozak         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |            |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |             |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.81726            |  |  |  | 0.13779 |  |  |  | 0.09863 |  |  |  | 0.08648    |  |  |  | 0.32924 |  |  |  | 0.00864 |  |  |  | 0.00071     |  |  |  | 0.00071 |  |  |  | 0.00071 |  |  |  | 0.00071 |  |  |  | 0.00071 |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.81726            |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /          |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.09863            |  |  |  | 0.13779 |  |  |  | /       |  |  |  | /          |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.08648            |  |  |  | 0.12084 |  |  |  | 0.92750 |  |  |  | /          |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.32924            |  |  |  | 0.44344 |  |  |  | 0.40700 |  |  |  | 0.36205    |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.00864            |  |  |  | 0.01150 |  |  |  | 0.10939 |  |  |  | 0.12476    |  |  |  | 0.03243 |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
| kora velikog mozga |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |            |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |             |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.19552            |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /          |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.19552            |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /          |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.00708            |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /          |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.00708            |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /          |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.00820            |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /          |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.00886            |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /          |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.26078            |  |  |  | 0.83686 |  |  |  | 0.03269 |  |  |  | 0.04240    |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
| hipokampus         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |            |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |             |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |         |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.06907            |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /          |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.06907            |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /          |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.00382            |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /          |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.00382            |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /          |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.06907            |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /          |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.00382            |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /          |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |
| 0.08722            |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /          |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |
| 0.05421            |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /          |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /           |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | /       |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  | / |  |  |  |   |  |  |  |