

Sveučilište u Zagrebu  
Veterinarski fakultet

Ana Družeta

Utjecaj trisomije kromosoma 21 na razvoj i morfologiju staničnih organela u izogeničnim  
živčanim matičnim stanicama

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Hrvatskom institutu za istraživanje mozga (HIIM) Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom mentora doc. dr. sc. Ivana Alića i Ante Plećaša, dr. med. vet. i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2023./2024.

**Popis i objašnjenje kratica korištenih u radu:**

**AD** (*engl.* Alzheimer Disease) – Alzheimerova bolest

**AIF** (*engl.* Apoptosis Inducing Factor) - faktor indukcije apoptoze

**ATP** (*engl.* Adenosine triphosphate) – adenzin trifosfat

**D21** (*engl.* Disomy 21) – disomija kromosoma 21

**DAPI** (*engl.* 4',6-diamidino-2-phenylindole) - fluorescentna boja koja boji jezgre

**DMSO** (*engl.* Dimethyl sulfoxide) - dimetil sulfoksid

**DS** (*engl.* Down Syndrome) - Downov sindrom

**EE** (*engl.* EEs- early endosomes) – rani endosomi

**ESCs** (*engl.* Embryonic Stem Cells) - embrionalne matične stanice

**ICC** (*engl.* Immunocytochemistry) – imunocitokemija

**iPSCs** (*engl.* induced Pluripotent Stem Cells) – inducirane pluripotentne matične stanice

**LC3A** (*engl.* Autophagy marker Light Chain 3) – marker autofagije laki lanac 3

**LE** (*engl.* LEs- late endosomes) – kasni endosomi

**NSCs** (*engl.* Neural Stem Cells) – živčane matične stanice

**PBS** (*engl.* Phosphate Buffered Saline) – puferirana otopina fosfatnih soli

**PFA** (*engl.* Paraformaldehyde) – paraformaldehid

**PSCs** (*engl.* Pluripotent Stem Cells) – pluripotentne matične stanice

**pT21** (*engl.* partial Trisomy 21) – parcijalna trisomija kromosoma 21

**RE** (*engl.* REs- recycling endosomes) – reciklažni endosomi

**T21** (*engl.* Trisomy 21) – trisomija kromosoma 21

**TOMM20** (*engl.* Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20) – translokaza vanjske mitohondrijske membrane 20

# Sadržaj rada

Uvod .....	1
Hipoteza .....	4
Materijali i metode.....	5
Inducirane pluripotentne matične stanice (iPSCs).....	5
Živčane matične stanice (NSCs).....	5
Imunocitokemija .....	7
Konfokalna mikroskopija i IMARIS analiza .....	8
Statistička analiza .....	8
Rezultati .....	9
Rasprava .....	15
Zaključci.....	17
Zahvale .....	18
Popis literature.....	19
Sažetak .....	23
Summary .....	24
Životopis.....	25

## Uvod

Downov sindrom (DS) je najčešći genetski poremećaj koji se razvija tijekom trudnoće, a očituje se zbog potpune ili djelomične (parcijalne) trisomije 21. kromosoma. Kliničku sliku je prvi put opisao dr. John Langdon Down 1866 godine. Gotovo 100 godina kasnije (1959.) francuski liječnik, Jérôme Lejeune opisao je uzrok DS-a, a to je trisomija kromosoma 21 (ANTONARAKIS i sur., 2020.). Karakteristike Downovog sindroma su zakašnjeni razvoj, blaga do umjerena mentalna zaostalost i specifične fizičke osobitosti poput kratkog i širokog vrata, ruku i nogu, šaka, viši položaj očiju, nizak rast te slabiji mišićni tonus. Prate ih bolesti kardiovaskularnog sustava te problemi s respiratornim sustavom i sluhom. Osobe s Downovim sindromom imaju povećan rizik od nastanka leukemije u odnosu na opću populaciju (HASLE i sur., 2000.). Također, uz slab imunosni sustav, predisponirane su i za razvoj epilepsije, strabizma, hipotireoidizma i Alzheimerove bolesti (*engl.* Alzheimer Disease, AD). Downov sindrom se može javiti i kao tzv. djelomična trisomija kromosoma 21 (*engl.* partial Trisomy 21, pT21) kod koje samo određeni geni na kromosomu 21 imaju dodatnu kopiju, dok ostatak gena kromosoma 21 ima dvije kopije (euploidan broj). Osim toga, iako rijetko, postoje i osobe s DS-om koje su tzv. strukturni mozaik, što znači da osoba ima sva fenotipska obilježja DS-a, ali u svom tijelu ima i trisomične i disomične (euploidne) stanice, a smatra se da zahvaća 1,3-5% svjetske populacije (PAPPAVASILOU i sur., 2015.). Ovakav oblik DS-a je prvi put opisan 1961. (CLARKE i sur., 1963.).

Tijekom posljednjih dvadesetak godina, istraživanja u području neuroznanosti su usmjerena prema matičnim stanicama koje se mogu dobiti iz različitih izvora. Iz ranih stadija embrija se mogu dobiti embrionalne matične stanice (*engl.* Embryonic Stem Cells, ESCs) i pluripotentne matične stanice (*engl.* Pluripotent Stem Cells, PSCs). Pluripotentne matične stanice su stanice koje imaju mogućnost diferencijacije u gotovo sve stanice u tijelu. Drugi način dobivanja matičnih stanica uključuje reprogramiranje odraslih somatskih stanica, uvođenjem specifičnih transkripcijskih čimbenika koji stanice vraćaju u stanje pluripotentnosti i takve stanice se nazivaju inducirane pluripotentne matične stanice (*engl.* induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs). Inducirane pluripotentne matične stanice, korištene u ovom istraživanju dobivene su reprogramiranjem fibroblasta iz kože mlade osobe s konstitucionalnim mozaicizmom za DS u laboratoriju profesora Nižetića u Londonu (MURRAY i sur., 2015.). Drugim riječima, osoba koja je donirala stanice u sebi je imala disomične (D21) i trisomične

(T21) stanice koje su reprogramirane u iPSCs. Kasnije, u laboratoriju te stanice su odvojene na D21 klonove (n=3) i T21 klonove (n=3) koji čine izogenični sustav, odnosno biološki savršen model u kojem stanice potječu od iste osobe, napravljene na isti način, a jedina razlika je dodatni kromosom u T21 stanicama. Prednost iPSCs je što imaju sposobnost samoobnavljanja i mogućnost diferencijacije u bilo koju stanicu podrijetla iz sva tri zametna listića (ektoderm, mezoderm i endoderm) (LIU i sur., 2022.), što ih čini izrazito vrijednim instrumentom u proučavanju i istraživanju modela raznih bolesti, tkivnog inženjeringa i testiranja lijekova (GOUGH i sur., 2020.) Ove stanice su već puno doprinijele u istraživanjima u kojima je opisana zaštitna uloga *BACE2* gena u razvoju AD u ljudi s Downovim sindromom (ALIĆ i sur., 2021.; FERTAN i sur., 2023.; MURRAY i sur. 2024.), kod opisa razlike u morfologiji mitohondrija zrelih neurona (MURRAY i sur., 2015.), nanofibrila za inženjering neuralnog tkiva (ZHANG i sur., 2020.), endosoma u zrelih neuronima (BOTTE i sur., 2020.) te uloge *DYRK1A* gena (MURRAY i sur., 2023.).

Mitohondriji su organeli koji imaju dvostruku membranu s enzimima specijaliziranim za aerobno disanje i proizvodnju adenzin trifosfata (ATP), s visokim energetske fosfatne veze, koje omogućuju energiju za većinu staničnih aktivnosti (MESCHER, 2016.) u procesima oksidativne fosforilacije i Krebsovog ciklusa. Mitohondriji su obično izduženog oblika, promjera 0,5-1  $\mu\text{m}$ . Brzo mijenjaju oblik te se međusobno spajaju i dijele kroz citoplazmu. Broj mitohondrija ovisi o energetske metabolizmu stanice, stanice s visokim energetske potrebama poput stanica miokarda ili epitelne stanice bubrežnih tubula imaju velik broj mitohondrija. Ovi organeli posjeduju vlastitu (mitohondrijsku) DNA koja se nasljeđuje isključivo od majke i sadrži gene koji su potrebni za fiziološko funkcioniranje mitohondrija. Novi mitohondriji nastaju rastom i diobom (fisijom) već postojećih mitohondrija (MESCHER, 2016.). Tijekom staničnog stresa, s unutarnje membrane mitohondrija se oslobađa protein citokrom C. On aktivira određene proteaze koje razgrađuju stanične komponente (uklanjanje starih ili oštećenih stanica) u reguliranom procesu nazvanom apoptoza tj. programirana smrt stanice.

Lizosomi su vezikule u citoplazmi eukariotskih stanica, promjera 0,05- 0,5  $\mu\text{m}$  u kojima se odvija unutarstanična probava i obnova staničnih komponenti. Sadrže četrdesetak različitih hidrolitičkih enzima poput proteaza, nukleaza, fosfataza, fosfolipaza, itd. koji su posebno obilni u stanicama s velikom fagocitnom aktivnošću (npr. makrofagi, neutrofilni), a služe za razgradnju makromolekula. Citosolske komponente su zaštićene od ovih enzima putem membrane koja

okružuje lizosome i zato što enzimi imaju optimalnu aktivnost u kiselom pH ~5,0 (MESCHER, 2016.). U golgijevom aparatu se enzimi modificiraju i pakiraju u vakuole koje formiraju primarni lizosom. Spajanjem s fagosomom dolazi do stvaranja sekundarnog lizosoma koji probavlja sadržaj fagolizosoma te se često proizvodi razgradnje koriste u sintezi novih staničnih dijelova.

Endosomi su membranske vezikule koje nastaju tijekom procesa unošenja vanjskih molekula u stanicu koji se naziva endocitoza. Oni imaju ključnu ulogu u unutarstaničnom transportu, omogućavajući stanici da odluči koje će molekule biti razgrađene, reciklirane ili prenesene u druge dijelove stanice. Nakon endocitnog unosa, molekule prvo idu do ranih endosoma (*engl.* EEs- early endosomes) otkuda mogu ići na razgradnju do kasnih endosoma (*engl.* LEs- late endosomes) i naposljetku lizosoma. Također, unesene molekule mogu proći kroz recikliranje neizravnim putem kroz reciklažne endosome (*engl.* REs- recycling endosomes) i vratiti se natrag do membrane (TAGUCHI, 2013.). Uz sve navedeno, sudjeluju i u staničnoj signalizaciji i prezentaciji antigena. Endosomske abnormalnosti su česte kod nekih bolesti središnjeg živčanog sustava, uključujući i AD. Istraživanja su pokazala da većina osoba s Downovim sindromom razvija patologiju povezanu s AD i manifestira izmijenjenu morfologiju i broj endosoma (WISEMAN i sur., 2015.; FILIPPONE i sur., 2021.)

U ovom radu napravljena je detaljna analiza staničnih organela na izogeničnim živčanim matičnim stanicama. Rezultati ovog istraživanja pokazali su statistički značajno veće vrijednosti mitohondrija, lizosoma i endosoma u trisomičnim stanicama u odnosu na disomične stanice.

## Hipoteza

Trisomija kromosoma 21 utječe na razvoj i morfologiju staničnih organela.

Kako bi se potvrdila ili odbacila hipoteza, postavljeni su sljedeći ciljevi:

- 1) Opisati razvoj i diferencijaciju izogeničnih živčanih matičnih stanica
- 2) Pomoću IMARIS softvera analizirati će se površina i volumen organela u disomičnim i trisomičnim stanicama
- 3) Opisati izražaj neoepitop specifičnog biljega organela te stupanj njihove kolokalizacije



## Materijali i metode

### Inducirane pluripotentne matične stanice (iPSCs)

Izogenične inducirane pluripotentne matične stanice korištene u ovom istraživanju prvi put su objavljene 2015 godine (MURRAY i sur., 2015.) i donirane su u Laboratorij za matične stanice na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga u Zagrebu, u sklopu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U ovom istraživanju korištena su dva klon, D21-C7 i T21-C6. Stanice su uzgajane u E8 mediju (Essential 8™ Medium, Gibco, A15169-01) na Geltrexom (Gibco, A14133-02) presvučenim podlogama, uz dodatak streptomicina i penicilina (Gibco, 15140-122). Nužno je vršiti redovite provjere tijekom rasta stanica kako bi utvrdili broj kromosoma i moguće mutacije te biljege pluripotencije (ALIĆ i sur., 2021.). Nakon određenog vremena kada su stanice dosegnule 70-80% gustoće pasažirane su, smrznute u mediju za smrzavanje stanica (Bambanker, GC LYMPHOTEC, BB02) i pohranjene u tekućem dušiku. Od ovih stanica uzgojene su živčane matične stanice (*engl.* Neural Stem Cells, NSCs).

### Živčane matične stanice (NSCs)

Živčane matične stanice su stanice koje imaju sposobnost diferencijacije u sve stanice koje čine živčani sustav, dakle neurone i glija-stanice. Živčane stanice su uzgojene prema protokolu ANONYMOUS (2013.), Gibco Life Technologies. Kada su iPSCs dosegnule gustoću od 15-25%, E8 medij zamijenjen je s medijem za indukciju NSCs (Neurobasal, Gibco, 21103-049). Medij je redovito mijenjan tijekom sljedećih tjedan dana. Nakon sedam dana, stanice su isprane PBS-om i na njih je naslojen enzim Akutaza (Gibco, A11105-01) kako bi se dobile pojedinačne stanice, nakon čega su stanice prošle kroz sito od 70  $\mu\text{m}$  te su prebrojane pomoću Neubauerove komorice. Stanice su nasađene u gustoći od  $5 \times 10^5$  u pločama za diferencijaciju stanica u mediju za umnažanje NSCs (Neurobasal® Medium (IX), Gibco, 21103-049 + Advanced DMEM/F12, Gibco, 12634010 + NIS, Gibco, A16477-01) uz dodatak 5  $\mu\text{M}$  ROCK inhibitora (Millipore Sigma, SCM075). Dokazano je da ROCK inhibitor (inhibitor Rho-kinaze) pospješuje preživljavanje i potiče proliferaciju matičnih stanica tijekom

stresnih razdoblja kada se suočavaju s visokim stopama apoptoze (RUNGSIWIWUT i sur., 2013.).

## Obilježavanje živčanih matičnih stanica fluorescentnim bojama

Peta pasaža izogeničnih živčanih matičnih stanica, neposredno prije fiksacije obilježena je fluorescentnim bojama prema uputama proizvođača. U ovom istraživanju korištene su dvije fluorescentne boje:

- 1) MitoTracker (Molecular probes by Life Technologies, Red, M7512) (ANNONYMOUS, 2008.)

Fluorescentna boja koja boji mitohondrije nalazi se u crvenom spektru i dolazi u obliku praha te ju je potrebno pripremiti za bojanje. Kako bi se napravila 1mM boja u originalnu tubicu dodana su 94  $\mu$ L dimetilsulfoksida (DMSO) (Sigma-Aldrich, D2650) te je boja pohranjena na  $-20^{\circ}\text{C}$  do korištenja. Neposredno prije korištenja, boja je razrijeđena u mediju kako bi se dobila konačna koncentracija 100 nM. Kako bi se to postiglo najprije je napravljeno 1 mL medija (1 $\mu$ M koncentracija boje) u koji je potom dodano 9 mL medija kako bi se postigla konačna koncentracija (100 nM). Ovako pripremljena boja, dobro je promiješana i dodana na stanice. Stanice su inkubirane bojom kroz 45 minuta u inkubatoru. Nakon toga stanice su isprane PBS-om, fiksirane i pohranjene na  $+4^{\circ}\text{C}$  do bojanja s protutijelima.

- 2) LysoTracker (Molecular probes by Life Technologies, Deep Red, L12492) (ANNONYMOUS, 2024.)

Fluorescentna boja koja boji lizosome nalazi se u daleko crvenom spektru i budući da potječe od istog proizvođača, pripremljena je i inkubirana na isti način kao i MitoTracker.

## Fiksacija stanica

Po završetku pokusa, stanice su fiksirane 4% otopinom paraformaldehida (PFA) kroz 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su isprane tri puta s PBS-om i pohranjene na  $+4^{\circ}\text{C}$  do bojanja s protutijelima, odnosno imunocitokemije.

## Imunocitokemija

Imunocitokemija (*engl.* Immunocytochemistry, ICC) je proces lokalizacije antigena proteina putem točno određenih protutijela koja se specifično vežu samo za ciljni antigen. Korištene su stanice koje su prethodno fiksirane paraformaldehidom te im je permeabilizirana membrana korištenjem 0,2% Tritona u PBS-u s dodatkom 3% seruma (magareći / kozji) tijekom 1h na sobnoj temperaturi i to se naziva “blocking”. Dodana su primarna protutijela u otopini 0,2% Triton u PBS-u + 1% serum i ostavljena preko noći u hladnjaku na +4 °C. Primarna protutijela se specifično vežu za određene proteine u ili na stanici. Primarna protutijela koja nisu vezana za proteine su sljedeći dan isprana sa PBS-om (3x10 min) te su potom dodana sekundarna protutijela obilježena fluorescentnom bojom Alexa Fluor. Inkubirana su tijekom 2 sata u mračnom prostoru na sobnoj temperaturi. Po završetku su sekundarna protutijela isprana PBS-om tri puta po pet minuta. Zatim je dodana fluorescentna boja za jezgre; 0,2 mL DAPI 1:8000 razrijeđene otopine pa je ponovno inkubirano tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Za kraj su stanice isprane tri puta po pet minuta s PBS-om, prekrivene s Dako Fluorescent Mounting Medium, S3023 i puštene da se lagano osuše tijekom noći. Protutijela korištena u ovom istraživanju prikazana su u Tablicama 1 i 2.

Tablica 1. Primarna protutijela korištena u istraživanju.

PRIMARNO PROTUTIJELO	PODRIJETLO	RAZRJEĐENJE	PROIZVOĐAČ
AIF	Kunić IgG monoklonalno	1:400	Cell Signaling (5318S)
LAMP1	Štakor IgG2a monoklonalno	1:200	Abcam (ab25245)
LC3A	Kunić IgG monoklonalno	1:400	Cell Signaling (4599S)
Nestin	Miš IgG1 monoklonalno	1:200	Abcam (ab6320)
PAX6	Kunić-IgG poliklonalno	1:200	Biolegend (#901301)
SOX2	Koza-IgG poliklonalno	1:200	Santa Cruz (sc-17320)
TOMM20	Kunić IgG monoklonalno	1:250	Abcam (ab186735)

Tablica 2. Sekundarna protutijela korištena u istraživanju.

SEKUNDARNO PROTUTIJELO	FLUORESCENCIJA	RAZRJEĐENJE	PROIZVOĐAČ
Magarac anti-Kunić IgG (H+L)	Alexa Fluor 488	1:1000	TermoFisher SCIENTIFIC (A21206)
Magarac anti-Koza IgG (H+L)	Alexa Fluor 488	1:1000	TermoFisher SCIENTIFIC (A11055)
Magarac anti-Miš IgG (H+L)	Alexa Fluor 555	1:1000	TermoFisher SCIENTIFIC (A31570)
Koza anti-Štakor IgG (H+L)	Alexa Fluor 555	1:1000	TermoFisher SCIENTIFIC (A21434)
Koza anti-Kunić IgG (H+L)	Alexa Fluor 633	1:500	TermoFisher SCIENTIFIC (A21070)

## Konfokalna mikroskopija i IMARIS analiza

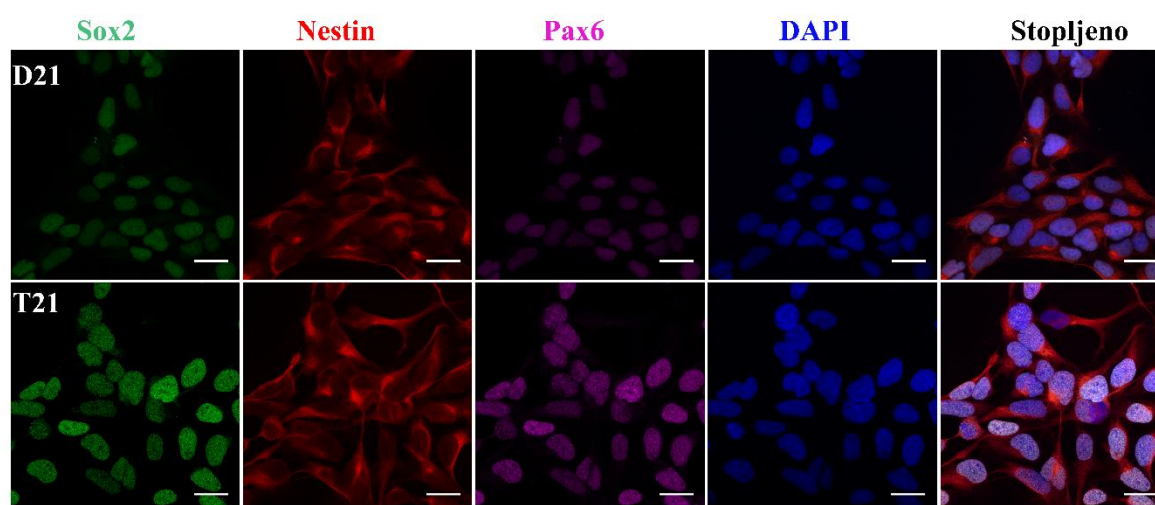
Nakon odrađene imunocitokemije (ICC), stanice su slikane konfokalnim mikroskopom Olympus FV300 pri maksimalnoj projekciji koristeći objektiv 60x. Ovako dobivene slike prenesene su u softver IMARIS 9.9.1. (ANNONYMOUS, 2018.), gdje su analizirani sljedeći parametri: kolokalizacija između dva ili više biljega, ukupna površina pojedinih signala, ukupna površina i prosječan volumen organela (mitohondriji, lizosomi i endosomi).

## Statistička analiza

Svi pokusi napravljeni su u triplikatu. Za svako pokrovno stakalce s imunocitokemijski obojanim živčanim matičnim stanicama napravljeno je pet do osam slika u maksimalnoj projekciji pomoću konfokalnog mikroskopa Olympus FV300. Za statističku analizu korišten je studentski T-test jer je istraživanje provedeno na dvije skupine stanica odnosno na disomičnim i trisomičnim ljudskim NSCs. IMARIS softver je također korišten i za izračun Pearsonovog koeficijenta kolokalizacije. Statistička značajnost je određena na razini  $p < 0,05$ , a svi rezultati su prikazani kao srednja vrijednost uz standardnu pogrešku standardne devijacije (SEM).

## Rezultati

U ovom istraživanju korištene su izogenične NSCs koje su u prvom redu validirane s biljezima karakterističnim za NSCs: Nestin – citoplazmatski biljeg NSCs te SOX2 i PAX6, nuklearni biljezi (Slika 1). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da su sve stanice pozitivne na sva tri biljega što upućuje na čistu NSCs populaciju koje su kasnije korištene za analizu staničnih organela. Važno je naglasiti da u ovom stadiju nema razlike između D21 i T21 stanica, što je važno za nastavak pokusa odnosno za analizu dobivenih rezultata.

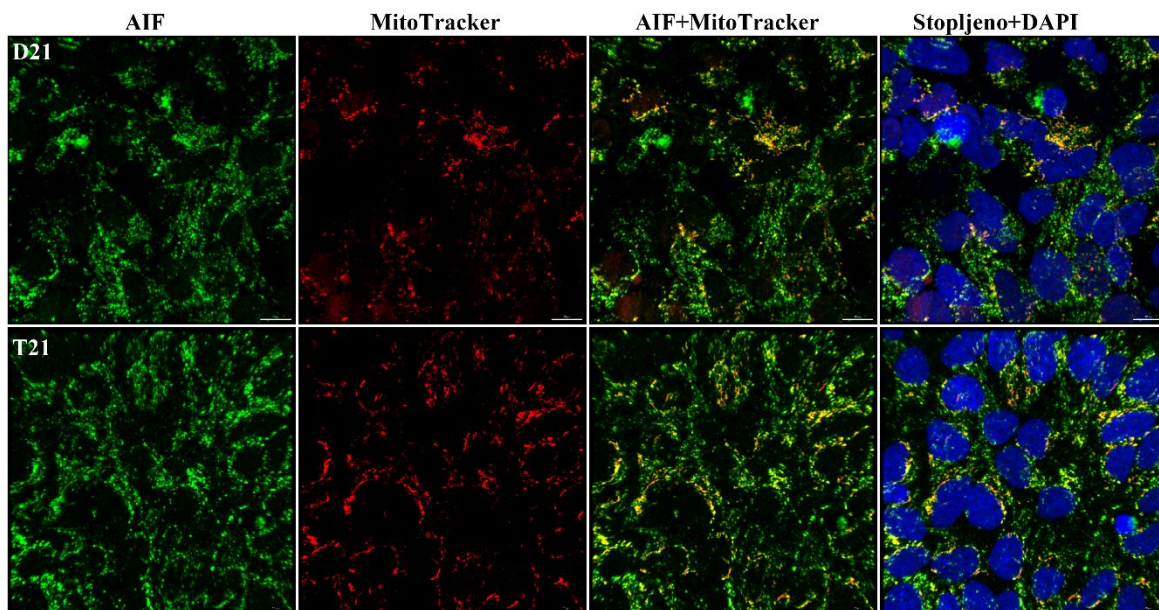


Slika 1. Imunocitokemijsko bojanje izogeničnih NSCs specifičnim biljezima: Sox2 (zeleno), Nestin (crveno), Pax6 (ljubičasto) i DAPI (plavo). Na stopljenim slikama vidi se da su sve stanice pozitivne na sva tri biljega NSCs. Mjerka 20  $\mu$ m.

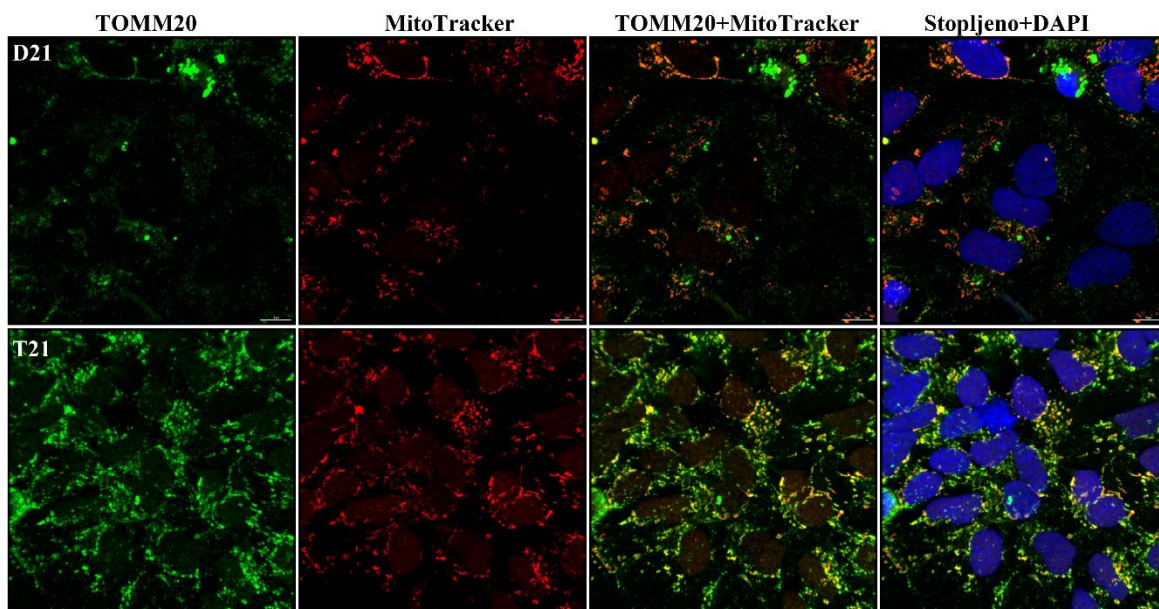
## Mitochondriji

Za potrebe ovog istraživanja korištena je fluorescentna boja MitoTracker (Slika 2 i Slika 3) koja se nalazi u crvenom spektru. Ovom bojom obojani su svi mitochondriji na živim stanicama. Rezultati ovog istraživanja pokazuju statistički značajnu razliku između T21 i D21 stanica ( $p < 0.0001$ ) (Slika 5) pri čemu su veće vrijednosti u trisomičnim stanicama. Osim ovom bojom, stanice su obojane i s dva neo-epitop specifična protutijela, AIF protutijelom (Slika 2) koji boji unutrašnju membranu mitochondrija i TOMM20 (Slika 3) koji boji vanjsku membranu mitochondrija. Oba protutijela pokazala su veće vrijednosti trisomičnih stanica u odnosu na disomične stanice pri čemu je razlika u slučaju AIF statistički značajna ( $p < 0.0001$ ) dok u slučaju TOMM20 razlika nije značajna ( $p = 0.0553$ ), ali je isti trend kao i u slučaju AIF. Osim

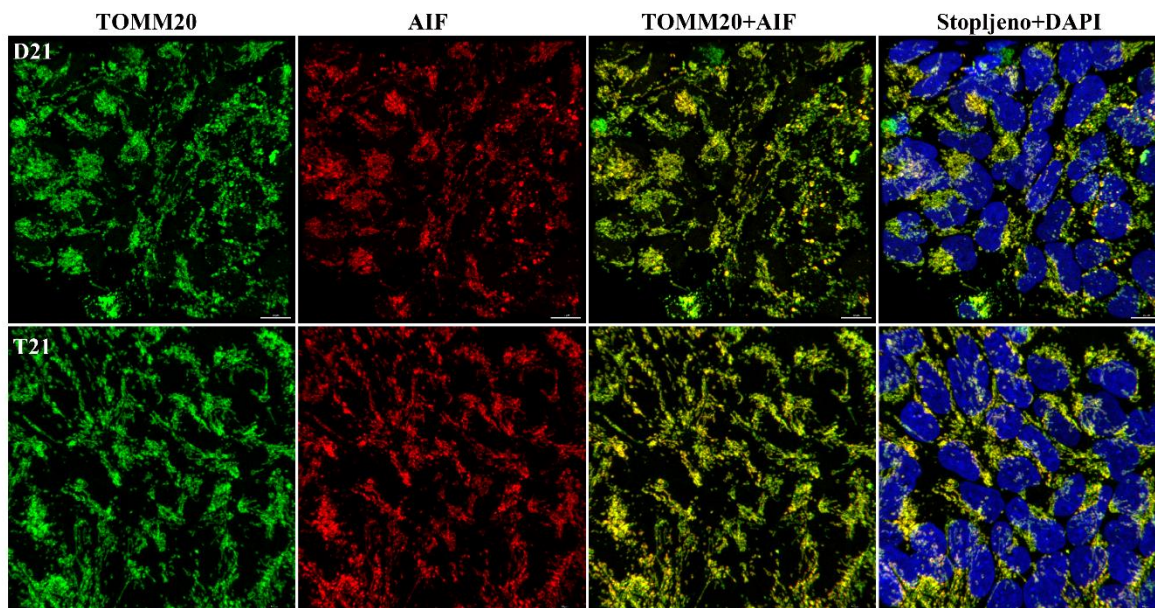
analize površina, biljega mitohondrija, na istima je izračunat i Pearsonov koeficijent kolokalizacije i iznosi visokih 0,7 (Slika 4).



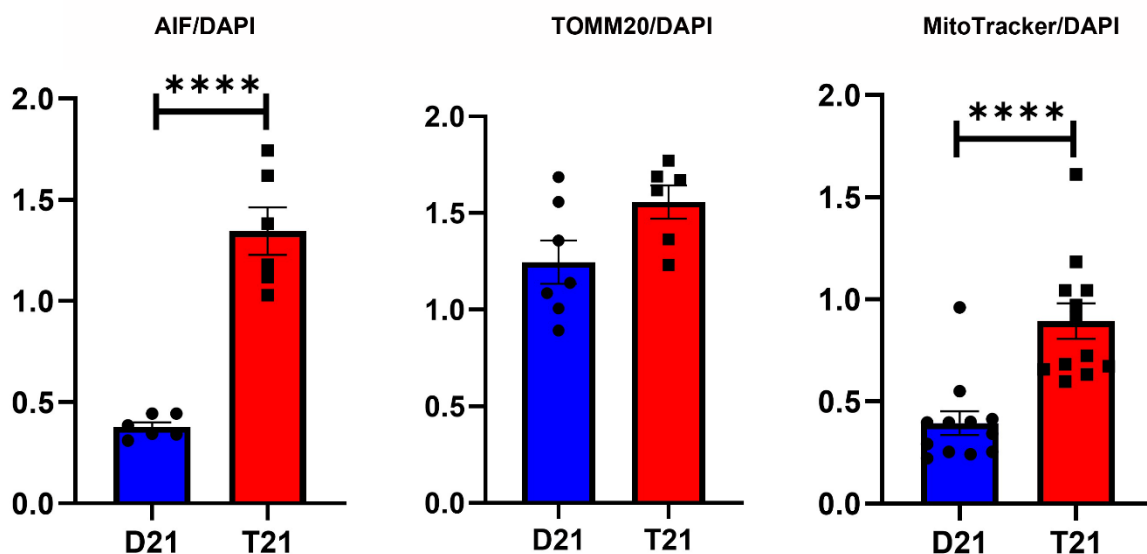
Slika 2. Reprezentativne slike bojanja mitohondrija s AIF protutijelom (zeleno), fluorescentnom bojom za mitohondrije (MitoTracker, crveno) te fluorescentnom bojom za jezgre (DAPI, plavo). Mjerka 10  $\mu\text{m}$ .



Slika 3. Reprezentativne slike bojanja mitohondrija s TOMM20 protutijelom (zeleno), fluorescentnom bojom za mitohondrije (MitoTracker, crveno) te fluorescentnom bojom za jezgre (DAPI, plavo). Mjerka 10  $\mu\text{m}$ .



Slika 4. Reprezentativne slike bojanja mitohondrija s TOMM20 protutijelom (zeleno), AIF protutijelom (crveno) te fluorescentnom bojom za jezgre (DAPI, plavo). Mjerka 10  $\mu$ m.



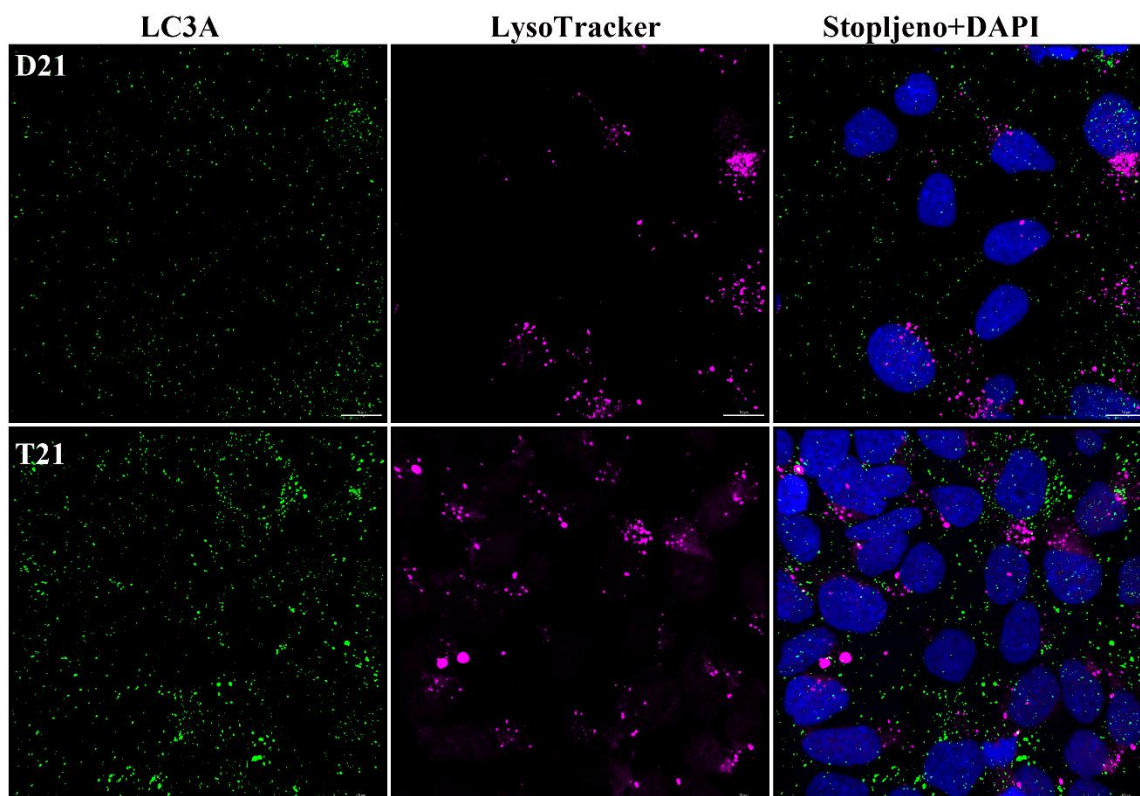
Slika 5. Kvantifikacija biljega mitohondrija. Na slici se vide normalizirane vrijednosti površine i volumena mitohondrija s ukupnom površinom jezgara po vidnom polju. Analiza je napravljena na 6 odnosno 12 slika (točkice na pojedinom stupcu, predstavljaju pojedinačne slike) budući da je MitoTracker bojan s oba protutijela. Na slici se vidi razlika između D21 i T21 stanica kako slijedi: AIF/DAPI ( $p < 0.0001$ ), TOMM20/DAPI ( $p = 0.0553$ ) i MitoTracker/DAPI ( $p < 0.0001$ ). Grafovi predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM.

## Lizosomi

Za potrebe ovog istraživanja korištena je fluorescentna boja LysoTracker koja se nalazi u daleko crvenom spektru. Ovom bojom obojani su svi lizosomi na živim stanicama (Slika 6). Osim toga stanice su obojane i s neoepitop specifičnim protutijelom LC3A (Slika 6). Rezultati ovog istraživanja pokazuju veće vrijednosti u trisomičnim stanicama s time da je razlika u LC3A statistički značajna ( $p=0.001$ ) (Slika 8). Razlika između LysoTracker je također vidljiva, iako nije statistički značajna ( $p=0.1232$ ) (Slika 8) pokazuje trend, odnosno veće vrijednosti u trisomičnim stanicama u odnosu na disomične stanice.

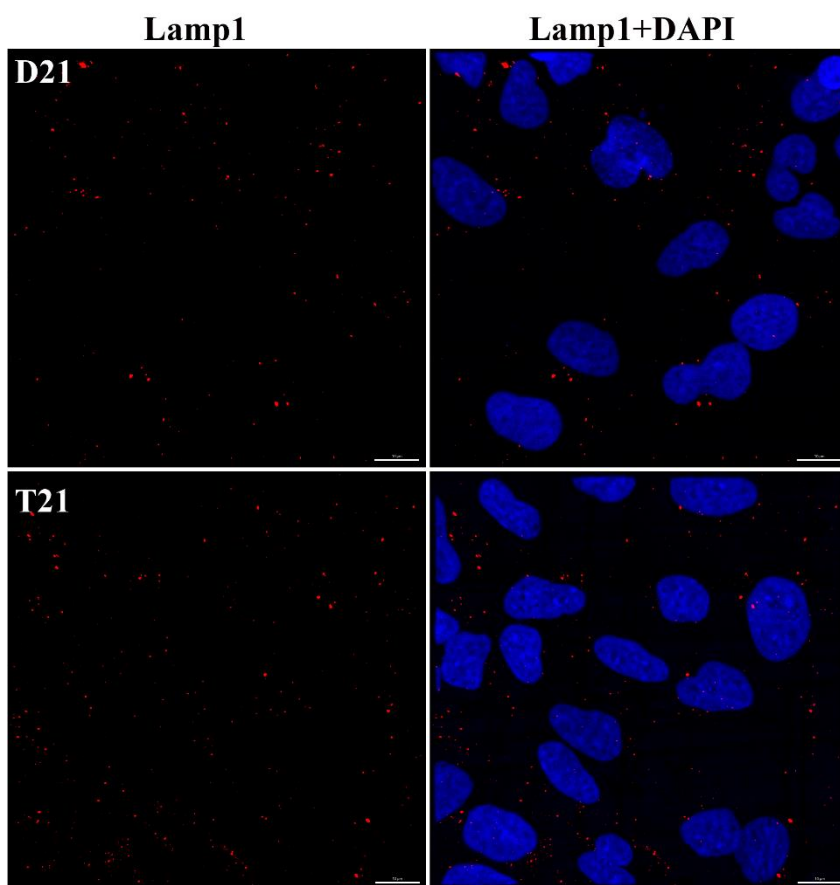
## Endosomi

Endosomi u ovom istraživanju bojani su s Lamp1 protutijelom (Slika 7). Rezultati ovog istraživanja pokazali su statistički značajnu ( $p=0.004$ ) razliku između disomičnih i trisomičnih stanica (Slika 8), pri čemu su veće vrijednosti u trisomičnim stanicama u odnosu na disomične stanice.

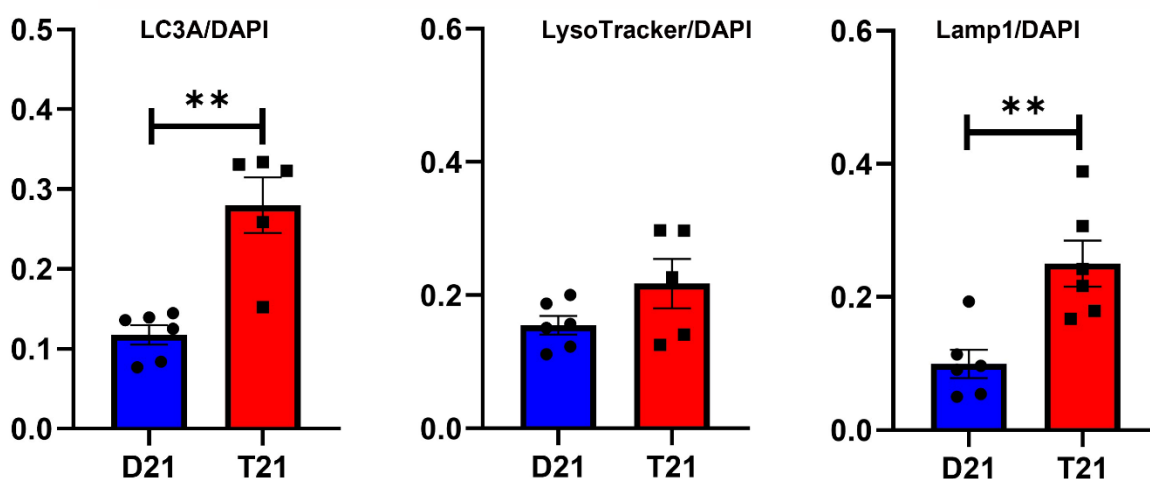


Slika 6. Reprezentativne slike bojanja lizosoma s LC3A protutijelom (zeleno), fluorescentnom bojom za lizosome (LysoTracker, ljubičasto) te fluorescentnom bojom za jezgre (DAPI, plavo). Mjerka 10  $\mu\text{m}$ .





Slika 7. Reprezentativne slike bojanja endosoma s Lamp1 protutijelom (crveno) te fluorescentnom bojom za jezgre (DAPI, plavo). Mjerka 10 $\mu$ m.



Slika 8. Kvantifikacija lizozoma i endosoma. Na slici se vide normalizirane vrijednosti površine i volumena lizozoma i endosoma s ukupnom površinom jezgara po vidnom polju.

Analiza je napravljena na 6 slika (točkice na pojedinom stupcu predstavljaju pojedinačne slike). Na slici se vidi razlika između D21 i T21 stanica kako slijedi: LC3A/DAPI ( $p=0.001$ ), LysoTracker/DAPI ( $p=0.1232$ ) i Lamp1/DAPI ( $p=0.004$ ). Grafovi predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM.

## Rasprava

U ovom istraživanju napravljena je detaljna analiza staničnih organela na izogeničnom modelu živčanih matičnih stanica uzgojenih od iPSCs. Rezultati ovog istraživanja pokazuju statistički značajnu razliku u izražaju biljega mitohondrija u trisomičnim stanicama. Zanimljivo je da mitohondriji obilježeni s fluorescentnom bojom MitoTracker-om koja boji sve mitohondrije unutar stanica pokazuju veliku statističku značajnost isto kao i mitohondriji bojani s primarnim protutijelom AIF (Slika 2) koje boji unutrašnju membranu mitohondrija, dok mitohondriji bojani s TOMM20 protutijelom (Slika 3) koje boji vanjsku membranu mitohondrija ne pokazuju statistički značajnu razliku, ali pokazuju isti trend. Ovaj rezultat može se objasniti na dva sljedeća načina: U navedenom istraživanju korišten je jedan D21 i jedan T21 klon, stoga bi se u nastavku ovog istraživanja trebalo uključiti i ostale D21 i T21 klonove kako bi se povećao broj slika i klonova stanica po bojanju. Druga mogućnost je koristiti drugo TOMM20 protutijelo kako bi se dodatno potvrdio rezultat. Osim same analize izražaja pojedinih biljega na stanicama je izračunat i Pearsonov koeficijent kolokalizacije između AIF i TOMM20 (Slika 4), te iznosi visokih 0,7, od maksimalnih 1,0, što nam govori o visokoj kolokalizaciji odnosno koliko se pojedina protutijela preklapaju i nalaze u istoj staničnoj strukturi. Upravo ovaj rezultat bi mogao biti razlog zašto s TOMM20 nije dobivena značajnost, jer protutijelo osim vanjske membrane mitohondrija boji i dio unutrašnje membrane mitohondrija bojane s AIF. Značajna razlika između D21 i T21 mitohondrija opisana je ranije na zrelih, diferenciranim neuronima korištenjem JC-10 boje (MURRAY i sur., 2015.) što je u skladu s rezultatima ovog rada na NSCs.

Osim mitohondrija, u ovom istraživanju napravljena je i analiza lizosoma pomoću protutijela LC3A i fluorescentne boje LysoTracker (Slika 6 i Slika 8). Rezultati ovog istraživanja pokazali su statistički značajnu razliku korištenjem LC3A protutijela, dok bojanje s LysoTracker-om pokazuje isti trend, ali rezultat nije značajan. Ovaj rezultat može se objasniti većom specifičnošću protutijela u odnosu na fluorescentnu boju. Osim toga isto protutijelo korišteno je i ranije u istraživanju na cerebralnim organoidima (ALIĆ i sur., 2021.) gdje je također opisan izražaj lizosoma u T21 stanicama gdje je opisan izražaj LC3A u organoidima, ali da nema kolokalizacije s BACE2. Isto tako, osim ovog protutijela postoje komercijalno dostupna i druga protutijela, kao što je LC3B koji specifično boji drugu sub-populaciju lizosoma.

Konačno u ovom istraživanju napravljena je i detaljna analiza lizosoma pomoću Lamp1 protutijela (Slika 7 i Slika 8). Rezultati ovog istraživanja pokazali su značajnu razliku u

lizosomima pri čemu su veće vrijednosti u T21 stanica u odnosu na D21 stanice. Rezultati ovog istraživanja u skladu su s ranijim istraživanjima objavljenim na diferenciranim neuronima uzgajanim u 2D strukturi (BOTTE i sur., 2020.), u kojem su lizosomi obilježeni s dva protutijela, Lamp1 i EEA1 te pokazuju slične vrijednosti. Osim na zrelim neuronima, ova dva lizosomalna protutijela korištena su i u analizi izražaja BACE2 na cerebralnim organoidima te su pokazala sličan rezultat pri čemu je pokazano da ne kolokaliziraju s BACE2 niti da su lizosomi uključeni u procese cijepanja A $\beta$  bjelančevine (ALIĆ i sur., 2021.).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju značajne vrijednosti u T21 stanica za sve ispitivane organele: mitohondrije, lizosome i endosome na modelu izogeničnih živčanih matičnih stanica. Drugim riječima trisomija kromosoma 21 dovodi do pojačanog izražaja svih ispitivanih organela te utječe na njihov razvoj, sazrijevanje i funkciju.

## Zaključci

Na temelju ovog istraživanja proizašli su sljedeći zaključci:

- 1) Trisomija kromosoma 21 utječe na razvoj i izražaj biljega mitohondrija, lizosoma i endosoma
- 2) T21 mitohondriji imaju značajno veću površinu i volumen u odnosu na D21 mitohondrije
- 3) Pearsonov koeficijent kolokalizacije između AIF i TOMM20 iznosi visokih 0,7
- 4) T21 lizosomi imaju značajno veću površinu i volumen u odnosu na D21 lizosome
- 5) T21 endosomi imaju značajno veću površinu i volumen u odnosu na D21 endosome

## Zahvale

Zahvaljujem svojim mentorima doc. dr. sc. Ivanu Aliću, Anti Plećašu, dr. med. vet. i Ivi Šimunić, dr. med., što su mi pružili priliku za širenjem vidika i što su me uveli u prekrasan svijet znanosti i istraživanja. Hvala što ste bili tako strpljivi i uvijek sa smiješkom odgovarali na nebrojena pitanja. Zaista ste mi pružili prekrasno iskustvo iz kojeg sam izašla s novim poznanstvima i novim pogledom na neuroznanost, na tome sam vam beskrajno zahvalna. Također veliko hvala Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na iskazanoj ljubaznosti i gostoprimstvu. Za kraj se zahvaljujem i svojoj obitelji i prijateljima bez čije podrške i ljubavi ovaj rad ne bi bio ono što jest.

## Literatura

ALIĆ, I., P. A. GOH, A. MURRAY, E. PORTELIUS, E. GKANATSIOU, G. GOUGH, K. Y. MOK, D. KOSCHUT, R. BRUNMEIR, Y. J. YEAP, N. L. O'BRIEN, J. GROET, X. SHAO, S. HAVLICEK, N. R. DUNN, H. KVARTSBERG, G. BRINKMALM, R. HITHERSAY, C. STARTIN, S. HAMBURG, M. PHILLIPS, K. PERVUSHIN, M. TURMAINE, D. WALLON, A. ROVELET-LECRUX, H. SOININEN, E. VOLPI, J. E. MARTIN, J. N. FOO, D. L. BECKER, A. ROSTAGNO, J. GHISO, Ž. KRSNIK, G. ŠIMIĆ, I. KOSTOVIĆ, D. MITREČIĆ, LonDownS Consortium, P. T. FRANCIS, K. BLENNOW, A. STRYDOM, J. HARDY, H. ZETTEBERG, D. NIŽETIĆ (2021): Patient-specific Alzheimer-like pathology in trisomy 21 cerebral organoids reveals BACE2 as a gene dose-sensitive AD suppressor in human brain. *Mol Psychiatry* 26, 5766–5788.

ANNONYMOUS (2008): MitoTracker® Mitochondrion-Selective Probes. Invitrogen detection technologies.

ANNONYMOUS (2013): Induction of Neural Stem Cells from Human Pluripotent Stem Cells Using PSC Neural Induction Medium. Gibco by life technologies.

ANNONYMOUS (2018): Imaris-Reference Manual. Bitplane an Oxford Instruments Company.

ANNONYMOUS (2024): LysoTracker® and LysoSensor™ Probes. Molecular probes by life technologies.

ANTONARAKIS, S. E., B. G. SKOTKO, M. S. RAFII, A. STRYDOM, S. E. PAPE, D. W. BIANCHI, S. L. SHERMAN, R. H. REEVES (2020): Down syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 6, 9.

BOTTÉ, A., J. LAINÉ, L. XICOTA, X. HEILIGENSTEIN, G. FONTAINE, A. KASRI, I. RIVALS, P. GOH, O. FAKLARIS, J. C. COSSEC, E. MOREL, A. S. REBILLAT, D. NIZETIC, G. RAPOSO, M. C. POTIER (2020): Ultrastructural and dynamic studies of the endosomal

compartment in Down syndrome. *Acta Neuropathol Commun.* 8, 89. doi: 10.1186/s40478-020-00956-z.

CLARKE, C. M., C. E. FORD, J. H. EDWARDS, V. SMALLPEICE (1963): 21 trisomy/normal mosaicism in an intelligent child with some mongoloid characters. *Lancet* 2, 1229.

FERTAN, E., D. BOEKEN, A. MURRAY, J. S. H. DANIAL, J. Y. L. LAM, Y. WU, P. A. GOH, I. ALIĆ, M. R. CHEETHAM, E. LOBANOVA, Y. P. ZHANG, D. NIŽETIĆ, D. KLENERMAN (2023): Cerebral organoids with chromosome 21 trisomy secrete Alzheimer's disease related soluble aggregates detectable by single-molecule-fluorescence and super-resolution microscopy. *Mol Psychiatry* 29, 369–386.

FILIPPONE A., PRATICÒ D. (2021): Endosome Dysregulation in Down Syndrome: A Potential Contributor to Alzheimer Disease Pathology. *Ann Neurol.* 90, 4-14.

GOUGH, G., N. L. O'BRIEN, I. ALIĆ, P. A. GOH, Y. J. YEAP, J. GROET, D. NIŽETIĆ A. MURRAY (2020): Modeling Down syndrome in cells: From stem cells to organoids. *Prog Brain Res.* 251, 55–90.

HASLE, H., I. H. CLEMMENSEN, M. MIKKELSEN (2000): Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *The Lancet* 355, 165–169.

LIU, H., S. HUANG, W. WANG, H. WANG, W. HUANG, Z. ZHAI, D. WANG, Y. FAN, J. SUN, D. LI, W. CHIU, X. LAI, J. ZENG, Q. KE, T. WANG,, A. P. XIANG, Y. YUAN, X. ZHANG, W. LI (2022): Migration deficits of the neural crest caused by CXADR triplication in a human Down syndrome stem cell model. *Cell Death Dis.* 13, 1018. doi: 10.1038/s41419-022-05481-6

MESCHER, O. (2016): Junqueira's Basic Histology Text and Atlas, 14th edition, McGraw Hill Education. New York.

MURRAY, A., A. LETOURNEAU, C. CANZONETTA, E. STATHAKI, S. GIMELLI, F. SLOAN-BENA, R. ABREHART, P. GOH, S. LIM, C. BALDO, F. DAGNA-BRICARELLI, S. HANNAN, M. MORTENSEN, D. BALLARD, D. SYNDERCOMBE COURT, N. FUSAKI,



M. HASEGAWA, T. G. SMART, C. BISHOP, S. E. ANTONARAKIS, J. GROET, D. NIŽETIĆ (2015): Brief report: isogenic induced pluripotent stem cell lines from an adult with mosaic down syndrome model accelerated neuronal ageing and neurodegeneration. *Stem Cells* 33, 2077-2084.

MURRAY, A., G. GOUGH, A. CINDRIĆ, F. VUČKOVIĆ, D. KOSCHUT, V. BORELLI, D. J. PETROVIĆ, A. BEKAVAC, A. PLEČAŠ, V. HRIBLJAN, R. BRUNMEIR, J. JURIĆ, M. PUČIĆ-BAKOVIĆ, A. SLANA, H. DERIŠ, A. FRKATOVIĆ, J. GROET, N. L. O'BRIEN, C. H. YU, Y. J. YEAP, F. DELOM, S. HAVLICEK, L. GAMMON, S. HAMBURG, C. STARTIN, R. HITHERSAY, H. D'SOUZA, D. MITREČIĆ, M. KERO, LJ. ODAK, B. KRUŠLIN, Ž. KRSNIK, I. KOSTOVIĆ, J. N. FOO, Y.-H. LOH, N. RAY DUNN, S. DE LA LUNA, T. SPECTOR, I. BARIŠIĆ, M. S. C. THOMAS, A. STRYDOM, C. FRANCESCHI, G. LAUC, J. KRIŠTIĆ, I. ALIĆ, D. NIŽETIĆ (2023): Dose imbalance of DYRK1A kinase causes systemic progeroid status in Down syndrome by increasing the un-repaired DNA damage and reducing LaminB1 levels. *eBioMedicine* 94, 1–26.  
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104692>

MURRAY, A., A. MUÑIZ-GARCÍA, I. ALIĆ, D. NIŽETIĆ (2024): It's good to know what to BACE the specificity of your inhibitors on. *J Clin Invest.* doi: 10.1172/JCI183677

PAPAVASSILIOU, P., C. CHARALSAWADI, K. RAFFERTY, C. JACKSON-COOK (2015): Mosaicism for trisomy 21: a review. *Am J Med Genet A.* 167A, 26-39.

RUNGSIWIWUT, R., C. MANOLERTTHEWAN, P. NUMCHAIKRIKA, V. AHNONKITPANIT, P. VIRUTAMASEN, M. TECHAKUMPHU, K. PRUKSANANONDA (2013): The ROCK Inhibitor Y-26732 Enhances the Survival and Proliferation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Progenitor Cells upon Dissociation. *Cells Tissues Organs* 198, 127–138.

TAGUCHI, T. (2013): Emerging roles of recycling endosomes. *The Journal of Biochemistry* 153, 505–510.

WISEMAN, F. K., AL-JANABI, T., J. HARDY, A. KARMILOFF-SMITH, D. NIZETIC, V. LJ. TYBULEWICZ, E. M. C. FISHER, A. STRYDOM (2015): A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nat Rev Neurosci.* 16, 564-574.

ZHANG, K., C. CHOOI, L. SHUANG, J. S. CHIN, A. MURRAY, D. NIZETIC, D. CHENG, S. Y. CHEW (2020): Localized delivery of CRISPR/dCas9 via layer-by-layer self-assembling peptide coating on nanofibers for neural tissue engineering. *Biomaterials* e120225.

## Sažetak

### **Utjecaj trisomije kromosoma 21 na razvoj i morfologiju staničnih organela u izogeničnim živčanim matičnim stanicama**

Ana Družeta

Downov sindrom (DS) je najčešći genetski poremećaj u ljudi uzrokovan trisomijom kromosoma 21. Trisomija može biti potpuna ili parcijalna, a postoji i tzv. strukturni mozaicizam kojeg karakterizira prisustvo disomičnih (D21) i trisomičnih (T21) stanica. Od osobe koja je strukturni mozaik za DS napravljene su izogenične iPSCs od kojih su potom uzgojene NSCs korištene u ovom istraživanju. Glavni cilj ovog istraživanja bio je opisati utjecaj trisomije kromosoma 21 na razvoj i morfologiju staničnih organela. Žive stanice obojane su fluorescentnom bojom MitoTracker koja boji mitohondrije i LysoTracker koja boji lizosome. Stanice su potom fiksirane i obojane neo-epitop specifičnim protutijelima za mitohondrije (AIF i TOMM20), lizosome (LC3A) i endosome (Lamp1). Rezultati ovog istraživanja pokazali su veće vrijednosti svih protutijela i boja u T21 stanica. Pearsonov koeficijent kolokalizacije između AIF i TOMM20 iznosi visokih 0,7. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da trisomija kromosoma 21 utječe na razvoj i morfologiju mitohondrija, lizosoma i endosoma.

Ključne riječi: Downov sindrom, iPSCs, NSCs, mitohondriji, lizosomi, endosomi

## Summary

### **The Impact of Trisomy of Chromosome 21 on the Development and Morphology of Cellular Organelles in Isogenic Neural Stem Cells**

Ana Družeta

Down syndrome (DS) is the most common genetic disorder in humans caused by trisomy of chromosome 21. Trisomy can be complete or partial, and there is also a structural mosaicism characterized by the presence of disomic (D21) and trisomic (T21) cells. Isogenic iPSCs were derived from a person who is a structural mosaic for DS, from which NSCs were then cultured and used in this study. The main goal of this study was to describe the impact of trisomy of chromosome 21 on the development and morphology of cellular organelles. Live cells were stained with the fluorescent dye MitoTracker, which stains mitochondria, and LysoTracker, which stains lysosomes. The cells were then fixed and stained with neo-epitope-specific antibodies for mitochondria (AIF and TOMM20), lysosomes (LC3A), and endosomes (Lamp1). The results of this study showed higher values for all antibodies and dyes in T21 cells. Pearson's colocalization coefficient between AIF and TOMM20 is a high 0.7. The results of this study demonstrated that trisomy of chromosome 21 affects the development and morphology of mitochondria, lysosomes, and endosomes.

Keywords: Down syndrome, iPSCs, NSCs, mitochondria, lysosomes, endosomes

## Životopis

Ana Družeta studentica je 3. godine Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, rođena je u Puli, 16. studenog 2002. Pohađala je Opću gimnaziju u Puli i 2021. upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Na drugoj godini je postala demonstrator na nastavi iz Anatomije s organogenezom domaćih životinja I, II i III na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju te otada pomaže studentima tijekom nastave. Također je sudjelovala u izradi anatomskih preparata za plastinaciju koji se koriste na nastavi. Od ljeta 2023. volontira u Veterinarskoj ambulanti Pula. Godine 2023. i 2024. se priključila manifestaciji Noć muzeja kao volonterka na fakultetu i na 3. međunarodnom znanstveno-stručnom skupu o gmazovima i egzotičnim životinjama Reptilia 2024 u Zagrebu. Sudjelovala je organizaciji radionice „Putovanje kroz mozak uz umjetnu inteligenciju“ u sklopu Festivala znanosti 22.-24. travnja 2024. Bila je članica Organizacijskog odbora 12<sup>th</sup> Young Generation of Veterinary Anatomists koji se održao u Zagrebu od 17. do 19. srpnja 2024.

Popis radova:

KUNŠTEK, S., A. PLEĆAŠ, A. DRUŽETA, I. ALIĆ (2024): Modelling of myelination in vitro – Preliminary study. *Anat Histol Embryol.* 53, 21-21.