

Uloga proteina GAP43 u neuro-oporavku nakon degenerativnog i traumatskog oštećenja živčanog tkiva

Jagoić, Tin

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:036508>

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

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



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI
STUDIJ MEDICINA

Tin Jagoić

ULOGA PROTEINA GAP43 U NEURO-OPORAVKU NAKON DEGENERATIVNOG I
TRAUMATSKOG OŠTEĆENJA ŽIVČANOG TKIVA

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI
STUDIJ MEDICINA

Tin Jagoić

ULOGA PROTEINA GAP43 U NEURO-OPORAVKU NAKON DEGENERATIVNOG I
TRAUMATSKOG OŠTEĆENJA ŽIVČANOG TKIVA

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Kristina Grabušić, dipl. ing. biol.

Diplomski rad ocijenjen je dana 14.6.2024. u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Alen Protić, dr. med.
2. Prof. dr. sc. Darko Ledić, dr. med.
3. Prof. dr. sc. Vlatka Sotošek, dr. med.

Rad sadrži 27 stranica, 6 slika, 21 literaturnih navoda.

SADRŽAJ RADA

1. UVOD	1
2. SVRHA RADA	2
3. PREGLED LITERATURE NA ZADANU TEMU	3
3.1. Molekularna i stanična biologija GAP43 proteina	3
3.1.1. Sinteza i posttranslacijske modifikacije proteina GAP43	4
3.1.2. Transport i lokalizacija GAP43 proteina unutar neurona	6
3.1.3. Modulacija stanične membrane pomoću GAP43	7
3.2. GAP43 u središnjem živčanom sustavu	9
3.3. Traumatska ozljeda mozga i GAP43	10
3.4. GAP43 u neurodegenerativnim bolestima	16
4. RASPRAVA.....	19
5. ZAKLJUČAK.....	20
6. SAŽETAK	21
7. SUMMARY	22
8. LITERATURA	23
9. ŽIVOTOPIS	27

Popis kratica

Akt – protein kinaza B

BDNF – neurotrofni čimbenik koji potiče iz mozga (engl. *brain-derived neurotrophic factor*)

CA3 – regija hipokampusa 3 (lat. *Cornu Ammonis 3*)

cAMP – ciklički adenzin monofosfat

Cys – cistein

ELISA - imunoenzimski test (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

F – filament

GAP43 – protein povezan s rastom 43 (engl. *growth-associated protein 43*)

IL – interleukin

JAK – Janus kinaza

kDa – kilodalton

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *messenger ribonucleic acid*)

NGF – živčani faktor rasta (engl. *nerve growth factor*)

NMDA – N-metil-D-aspartat

PI3K – fosfoinozimid-3-kinaza (engl. *phosphoinositide 3-kinase*)

PIP2 – fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat

PKC – protein kinaza C

PTM – posttranslacijska modifikacija

Ser – serin

STAT – pretvarač signala i aktivator transkripcijskih proteina (engl. *signal transducer and activator of transcription proteins*)

TOM – traumatska ozljeda mozga

1. UVOD

GAP43 je protein koji je specifično izražen u živčanim stanicama. Snažno je izražen u cijelom mozgu tijekom razvoja živčanog sustava. U odraslom organizmu je prisutan u regijama mozga povezanim s učenjem i pamćenjem. Sudjeluje u produžavanju aksonskog završetka i sinaptogenezi, a njegovu ekspresiju može inducirati oštećenje živčanog tkiva. Stoga se GAP43 smatra potencijalnim biomarkerom oporavka živčanog tkiva.

Biomarkeri oporavka živčanog tkiva potrebni su za kliničku primjenu kod različitih oštećenja moždanog tkiva, bilo da se radi o traumatskim ozljedama ili neurodegenerativnim bolestima. Traumatska ozljeda mozga je naročito zastupljena u mlađoj dobnoj skupini zbog sve većeg prometa i s time povezanim učestalijim prometnim nesrećama. Starija populacija koju karakteriziraju česti padovi također je izložena traumatskoj ozljedi mozga. Sve veća odmakla dob povezana je s porastom neurodegenerativnih bolesti. Za navedena oštećenja funkcije mozga postoji samo simptomatsko liječenje gdje bi biomarkeri neurološkog oporavka bili od velike pomoći.

2. SVRHA RADA

Svrha rada je istražiti literaturu i predstaviti aktualno znanje o proteinu GAP43 u kontekstu fizioloških i patofizioloških procesa u živčanom tkivu. U prvom dijelu rada opisat će se njegova sinteza, posttranslacijske modifikacije i interakcije s drugim proteinima u sklopu unutarstaničnih procesa. U drugom dijelu rada fokus će biti na ulozi GAP43 tijekom oporavka nakon traumatske ozljede mozga te moguć utjecaj proteina GAP43 u nastanku neurodegenerativnih bolesti.

3. PREGLED LITERATURE NA ZADANU TEMU

3.1. Molekularna i stanična biologija GAP43 proteina

Neuroni su stanice odgovorne za stvaranje i provođenje akcijskih potencijala. Imaju specifičnu staničnu arhitekturu koja se sastoji od dendrita, staničnog tijela, aksona i sinaptičkih završetaka. Složene interakcije između različitih neurona omogućuju međusobnu komunikaciju živčanog tkiva i njegovo usklađeno djelovanje na ciljne organe. Funkcija neurona je stoga usko povezana sa strogo definiranom staničnom arhitekturom i pravilnim pozicioniranjem u odnosu na druge neurone. Iako je specifična stanična arhitektura preduvjet za pravilno funkcioniranje neurona, ona predstavlja limit za staničnu prilagodbu u slučaju oštećenja stanice. Potrebno je stoga detaljno razumijevanje mehanizama rasta i oporavka neurona, uključujući funkcije raznih neuron-specifičnih molekula, naročito onih koji su izravno uključeni u modeliranje stanične arhitekture poput proteina GAP43.

Protein povezan s rastom 43 (engl. *growth-associated protein 43*, GAP43) poznat je i pod nazivima neuromodulin, protein F1, kalmodulin-vezajući protein P57 te neuronski fosfoprotein B50 ovisno o studiji u kojoj je istražen. Prvi put se njegova funkcija spominje u radu Benowitza i suradnika 1981. godine, gdje je opisan kao protein prosječne molekularne mase od 43000 tj. 43 kilodalton (kDa), koji se inducira 8 dana nakon oštećenja optičkog živca zlatne ribice (1). Svoje aktualno ime dobiva 1987. godine kada se direktno povezuje s procesom aksonalne elongacije zbog svog nakupljanja u završecima rastućeg aksona (2).

GAP43 je intenzivno istraživan u različitim animalnim modelima, naročito na miševima i štakorima. Smatra se da je GAP43 važan u ranom razvoju neurona kada stanica stvara i razvija izdanke stanične membrane, takozvane filopodije, koji će

kasnije postati dendriti ili aksoni. GAP43 je isto tako bitan u kasnijoj fazi sazrijevanja neurona kada se odvija elongacija aksona i stvaranje sinapsi. Svi ovi procesi temelje se na modeliranju stanične membrane u kojem sudjeluje GAP43. GAP43 je smješten s unutrašnje strane stanične membrane gdje s jedne strane ostvaruje interakcije sa citoskeletom, a s druge strane s membranom uslijed kovalentno vezane masne kiseline kao specifične posttranslacijske modifikacije. Djelovanje GAP43 proteina na modeliranje stanične membrane je pod utjecajem kinaza i fosfataza koje diktiraju fosforilaciju GAP43 proteina i time njegove interakcije s drugim proteinima (3).

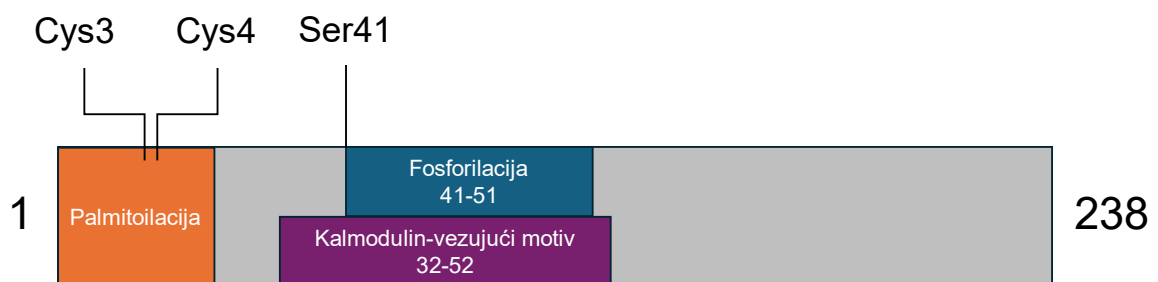
3.1.1. Sinteza i posttranslacijske modifikacije proteina GAP43

Ljudski gen za GAP43 nalazi se na q kraku 3. kromosoma na poziciji q13.31, sastoji se od 3 egzona i kodira protein od 238 aminokiselina (7). GAP43 gen je transkripcijski aktivan u neuronima, a transkripcija se smatra glavnim mehanizmom u reguliranju količine proteina u stanici. Razina ekspresije GAP43 gena mijenja se s razvojem neurona. Sve regije mozga sadrže visoke razine GAP43 mRNA tijekom rasta i razvoja, ali u odrasloj osobi, GAP43 je izražen u neuronima kore mozga te hipokampalnim neuronima (4).

Molekularna masa aminokiselinskog slijeda GAP43 je oko 25 000, tj. 25 kDa, što je mnogo manje od 43 i više kDa koliko se opaža u proteinskim analizama staničnih lizata. Ta razlika između predviđene i opažene molekularne mase ukazuju na značajan udio posttranslacijskih modifikacija (PTM) u ukupnoj masi proteina. GAP43 se posttranslacijski modificira na nekoliko načina, a neke od važnijih PTM-a su lipidacija i fosforilacija (slika 1). Lipidacija proteina GAP43 odvija se putem palmitoilacije odnosno prijenosa acilne skupine palmitinske kiseline na bočni ogranak cisteina. Palmitoiliraju se dva susjedna cisteina na amino-kraju čime GAP43 postaje protein tijesno asociran

s unutrašnjim dijelom stanične membrane iako nije transmembranski protein i njegov aminokiselinski slijed ne prolazi kroz lipidni dvosloj membrane. Interakcija proteina GAP43 s plazma membranom je bitna za modeliranje membrane.

GAP43 sadrži nekoliko serinskih i treoninskih ostataka koji mogu poslužiti za fosforilaciju. Najbolje je karakteriziran serin-41 koji je supstrat protein kinaze C (5). Fosforilirajuća regija sa Ser-41 obuhvaća aminokiseline 41-51 te se preklapa s kalmodulin-vezujućim motivom koji obuhvaća aminokiseline 32-52. Preklapanje ovih dviju regija je bitno za izmjenu između aktivnog i neaktivnog oblika GAP43 proteina. Kada je kalmodulin vezan za GAP43, tada fosforilirajuća regija nije dostupna za kinazu i fosforilacija proteina GAP43 nije moguća. Kalmodulin će se odvojiti od proteina GAP43 i time omogućiti pristup fosforilirajućoj regiji kada u citosolu poraste razina ionskog kalcija koji će se vezati za kalmodulin. Time razina unutarstaničnog kalcija predstavlja jedan od glavnih mehanizama regulacije aktivnosti GAP43 što je detaljnije opisano u nastavku (5).

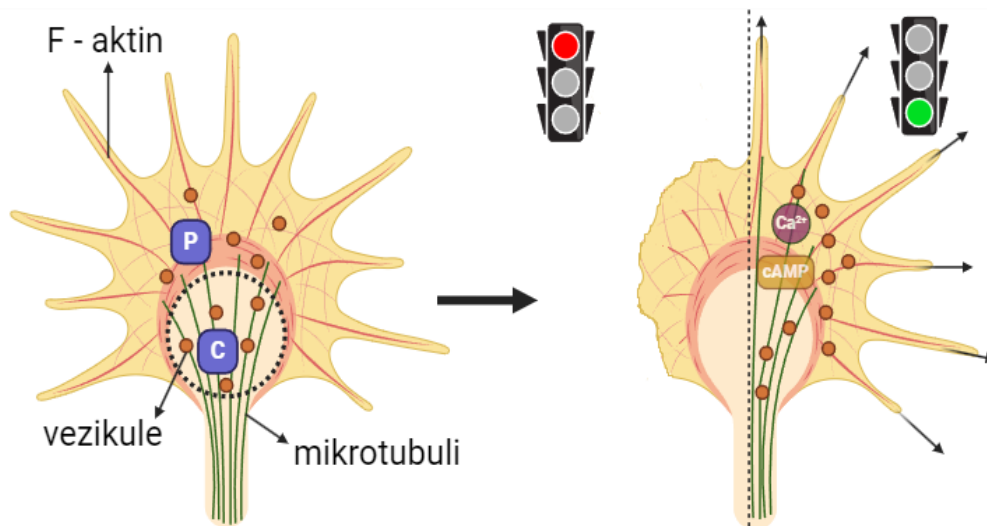


Slika 1. Primarna struktura GAP43 proteina s pozicijama glavnih posttranslacijskih modifikacija. GAP43 je palmitoiliran na dva cisteina (Cys) pozicioniranim na položajima 3 i 4 te je pomoću protein kinaze C fosforiliran na serinu (Ser) na poziciji 41 koja se nalazi u sklopu fosforilirajuće regije. Na amino-kraju nalazi se i kalmodulin-vezujući motiv koji se preklapa s fosforilirajućom regijom (4).

3.1.2. Transport i lokalizacija GAP43 proteina unutar neurona

Neuroni sintetiziraju proteine u tijelu stanice nakon čega se proteini prenose do svojih odgovarajućih odredišta u stanici. S obzirom na specifičnu građu neurona, koja često uključuje dugačak akson, transport kroz neuron je izrazito bitan za normalno funkcioniranje stanice i obuhvaća različite mehanizme, poput brzog aksonskog transporta posredovanog citoskeletom te prijenosnih vezikula koje se odvajaju s Golgijevog aparata i prenose različite makromolekule kao što su to proteini i lipidi (6).

Odredište novosintetiziranog GAP43 je plazma membrana rastućeg neurita tijekom razvoja odnosno plazma membrana završetka aksona tijekom njegove elongacije. Neuriti su mali izdanci na neuronima u razvoju koji konačno izrastaju u aksone ili dendrite. Rast neurita je pod kontrolom stimulirajućih i inhibirajućih faktora iz njihove izravne izvanstanične okoline koju osjete receptori u vrhu neurita. Konus rasta sastoji se od mikrotubula i aktinskih filamenata koji formiraju lamelipodije i filopodije (slika 2). Glavna uloga GAP43 proteina je elongacija i usmjeravanje konusa rasta putem interakcije citoskeleta i stanične membrane (6).

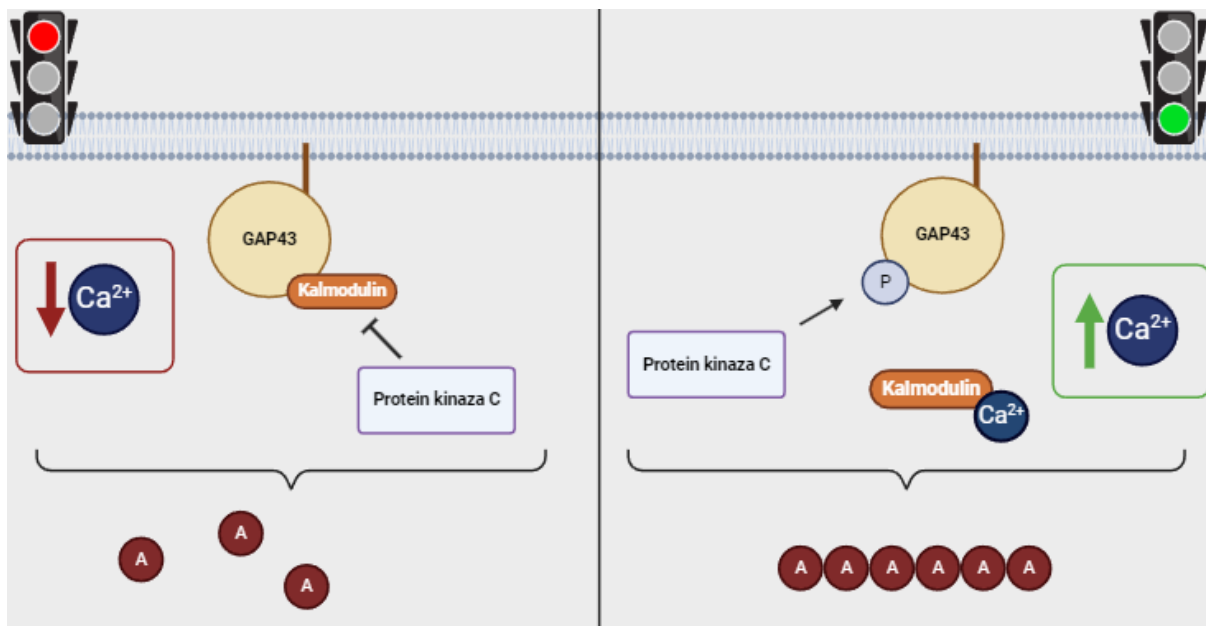


Slika 2. Konus rasta na neuronu sastoji se centralnog (C) područja koje je bogato mikrotubulima i vezikulama te perifernog (P) područja sa snopovima F-aktina koji formiraju lamelipodije i filopodije. Smjer rasta konusa određen je sekundarnim glasnicima kao što su kalcij (Ca^{2+}) i ciklički AMP (cAMP) (7).

3.1.3. Modulacija stanične membrane pomoću GAP43

GAP43 ostvaruje svoju funkciju kroz interakciju sa citoskeletom i plazma membranom. Interakcija sa citoskeletom je regulirana fosforilacijom GAP43 proteina. GAP43 je supstrat o kalciju ovisne protein kinaze C, koja fosforilira GAP43 na poziciji Ser-41. Ta je fosforilacija moguća nakon što se poveća razina unutarstaničnog kalcija koji veže kalmodulin i na taj način ga odvaja od GAP43 (slika 3). Fosforilacija GAP43 proteina osobito povećava interakciju GAP43 proteina i filamentnog aktina (F-aktin), linearnog polimera koji čini mikrofilamente i na taj način održava neuralni citoskelet. Područja konusa sadrže veliku količinu fosforiliranog GAP43 i pokazuju bolju adheziju i povećani broj filopodija, citoplazmatskih izdanaka koji usmjeravaju rast aksona odnosno neurona (8).

Osim interakcije s aktinom i utjecaja na citoskelet, GAP43 ostvaruje interakcije s komponentama stanične membrane. Povrh već prethodno spomenute palmitoilacije na N-kraju, GAP43 se svojom bazičnom regijom veže za fosfatidilinozitol-4,5-difosfat (PIP₂) i time potiče stvaranje aktinskog filameta (9). Naime, PIP₂ ima inhibicijski učinak na stvaranje aktinskog filameta, jer veže za sebe proteine koji potiču polimerizaciju aktina (10). GAP43-posredovana sekvestracija PIP₂ uklanja ovaj inhibični učinak. Interakcija GAP43 i PIP₂ je blokirana ako GAP43 veže kalmodulin, pa se PIP₂ time oslobađa (9).



Slika 3. Međudjelovanje koncentracije unutarstaničnog kalcija i fosforilacije GAP43. Kod niske koncentracije unutarstaničnog kalcija (Ca²⁺), kalmodulin je vezan za GAP43 i protein kinaza C (PKC) ne može fosforilirati GAP43 te je aktin (A) u monomernom obliku. Visoke koncentracije Ca²⁺ dovode do vezanja Ca²⁺ za kalmodulin i oslobađanja GAP43, pa PKC može fosforilirati GAP43 što dovodi do polimerizacije aktina (9).

3.2. GAP43 u središnjem živčanom sustavu

Najviše razine GAP43 pronađene su u perinatalnom mozgu u modelu štakora što ukazuje na potencijalnu funkciju u neurorazvoju i neuroplastičnosti. Dokazan je u svim stanicama središnjeg živčanog sustava na modelu štakora u embrionalnom i perinatalnom razvoju. Ali, potrebno je i naglasiti da postoji razlika u ekspresiji proteina jer postoje tvrdnje kako su veće koncentracije GAP43 na animalnom modelu pronađene u hipokampusu dok se u ljudima pretežito nalazi u asocijativnom području mozga (11).

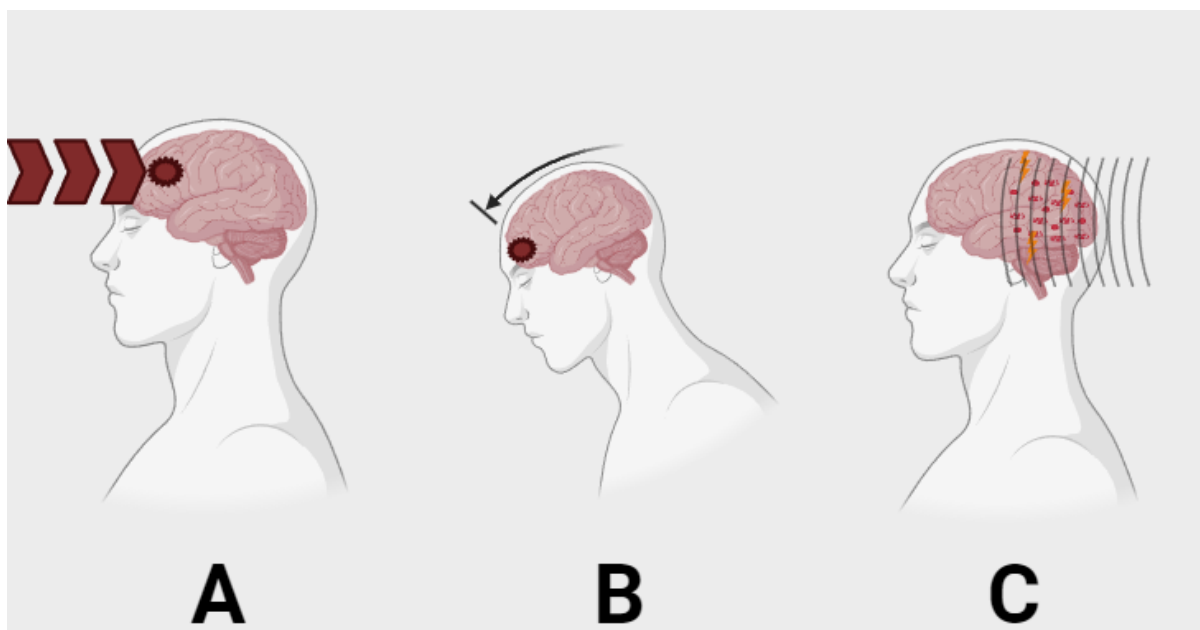
Koncentracija GAP43 opada u većini neurona kada su već formirane zrele sinapse, ali visoke razine proteina nastavljaju se izražavati u sinapsama limbičkog sustava i asocijativnim regijama neokorteksa tijekom cijelog života, dok su niske koncentracije proteina prisutne u primarnim osjetnim i motoričkim područjima. Ovaj obrazac sugerira da je GAP43 uključen u promjene koje vode k pohrani informacija. U istraživanju mozga odraslog štakora otkrivene su visoke razine GAP43 mRNA u hipokampusu, osobito u regiji CA3 odnosno granularnom sloju cerebelarnog korteksa. Dodatno je pronađen u locusu coeruleusu, mitralnim stanicama, vagalnoj motoričkoj jezgri, ali i drugim parasimpatičkim preganglionskim neuronima, inferiornoj olivarnoj jezgri, jezgri rafe, središnjim i intralaminarnim jezgrama talamusa, dopaminergičkim nigralnim i ventralnim tegmentalnim jezgrama, granularnom olfaktornom paleokorteksu, infragranularnom neokorteksu i nekoliko jezgri hipotalamusa i bazalnog prednjeg mozga. Mnogi neuroni koji pokazuju značajne razine GAP43 mRNA imaju relativno duge aksone i opsežnu razgranatost svojih završetaka. Na primjer, uočeno je da piramidalne stanice hipokampusu CA3 imaju široko područje ispunjeno pretežito aksonalnim dijelom neurona te ujedno i to može ukazivati na određene uloge GAP43 u hipokampalnom području. S druge strane, povećane razine GAP43 pronađene su

kod ljudi u asocijativnom području frontalnog korteksa kod shizofrenih pacijenata s pretežito vidnom halucinatornom simptomatologijom. Ovo upućuje da abnormalno visoka koncentracija GAP43 dovodi do sinaptičke disfunkcije te tako dovodi do određenih bolesti (8).

Drugi dijelovi središnjeg živčanog sustava kao što su leđna moždine i moždano deblo, nemijelinizirana ili umjereno mijelinizirana područja, kao što su substantia gelatinosa i jezgra solitarnog trakta, izražavaju visoke razine GAP43 u živčanim vlaknima manjeg promjera. Lokalizacija GAP43 u ovim malim mijeliniziranim i nemijeliniziranim vlaknima nalazi se u aksonalnim završecima koji čine pojedinačne aksodendritičke ili aksosomatske sinapse unutar motornih neurona moždanog debela i leđne moždine, a prisutan je na svim razinama kralježaka s većim koncentracijama u cervikalnoj i torakalnoj regiji (4).

3.3. Traumatska ozljeda mozga i GAP43

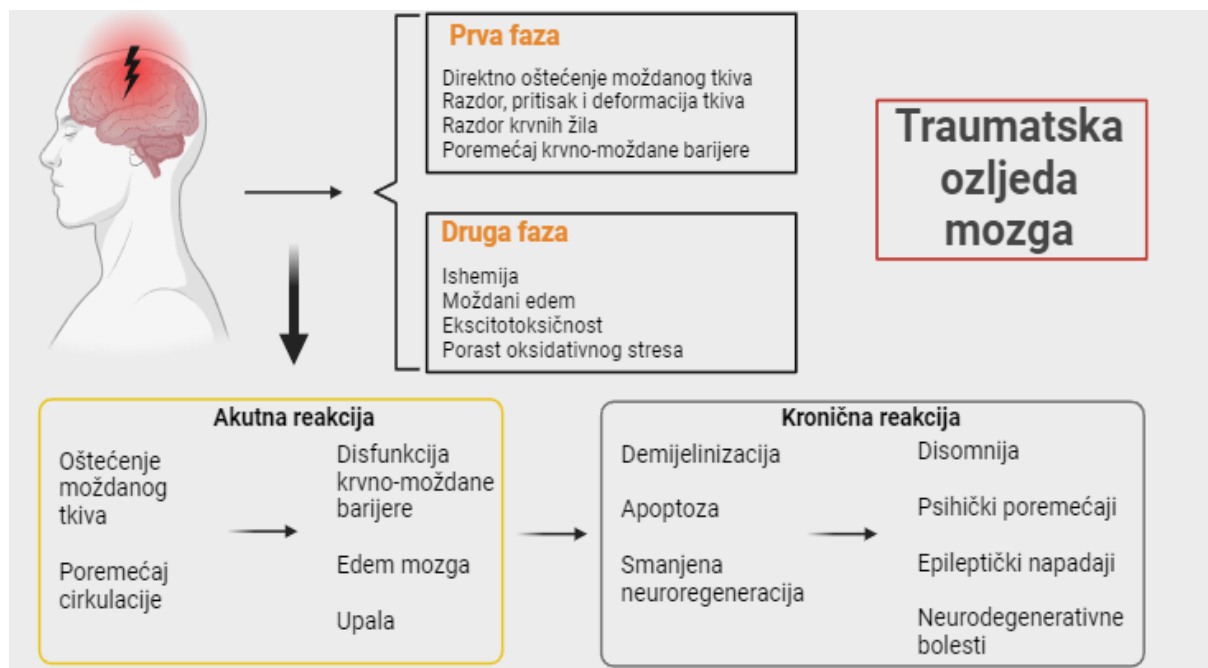
Traumatska ozljeda mozga (TOM) je posljedica djelovanja vanjske sile na mozak te je rezultat direktnog udarca, nagle akceleracije-deceleracije ili dovoljno jakog udarnog vala nakon npr. eksplozije (slika 4). Povezana je s prometnim nesrećama, padovima, kontaktnim sportom i fizičkim nasiljem (12). Klasificira se po Glasgow Coma ljestvici na blagu (13-15), umjerenu (9-12) i tešku (3-8) TOM. Danas značajan broj ljudi preživljava TOM zahvaljujući poboljšanjima u liječenju, ali trajna onesposobljenost nastupa i u blažim ozljedama mozga u roku od nekoliko tjedana nakon ozljeda koje često ostanu neprepoznate. TOM se obično javlja u osoba mlađe (0–24 godine) i starije životne dobi (<65 godina) (13).



Slika 4: Mehanizmi nastanka traumatske ozljede mozga: A) direktan udarac, B) nagla akceleracija-deceleracija, C) udarni val (12).

Nakon primarne mehaničke ozljede, sekundarni događaji uzrokuju daljnje neuralne, glijalne i vaskularne ozljede. Molekularni i stanični procesi započeti za vrijeme ozljede odvijaju se u kaskadnom nizu događaja. Stopa i distribucija ovih signalnih kaskada ovisi o ozbiljnosti ozljede ozlijeđenog pojedinca. Posttraumatski događaji započinju brzo kao što su to krvarenje uzrokovano razdorom krvnih žila, deformacija živčanog tkiva, poremećaj krvno-moždane barijere i stvaranje reaktivnih spojeva kisika. Nakon teške TOM-a, nastaju dugotrajni neurološki deficiti koji uključuju bihevioralne i psihološke posljedice povezane s oštećenom funkcijom i disregulacijom moždanih krugova, epilepsiju, probleme s kognicijom, senzornom obradom, komunikacijom i ponašanjem. Na staničnoj razini, patogeneza TOM-a napreduje tijekom produljenog vremenskog okvira u obliku apoptotičke stanične smrti i ekscitotoksičnosti. Stanična disregulacija se očituje u poremećaju krvotoka zbog strukturalnih i funkcionalnih oštećenja mozga (slika 5). Preživjeli bolesnici TOM

pokazuju raznolike obrasce neuralne aktivnosti i snalaženja u usporedbi s kontrolnim skupinama kada se pratila njihova funkcionalost za vrijeme kognitivnih zadataka što ukazuje na širok spektar mogućeg nastanka i posljedica TOM-a, ali i njegovu povezanost s načinom liječenja (12).



Slika 5. Kronologija patofizioloških procesa nakon traumatske ozljede mozga (14).

Sekundarna TOM nastaje kao odgovor na primarnu te ju karakterizira formacija edema mozga koji se obično pogoršava 24 do 48 sati nakon ozljede. Patofiziološki se dijeli na dva tipa, citotoksični (unutarstanični) i vazogeni (izvanstanični). Obje ove vrste javljaju se odmah nakon TOM-a i obje mogu dovesti do sekundarnih oštećenja (15).

Iako se vjeruje da je citotoksični edem češći u usporedbi s vazogenim edemom, oba tipa rezultiraju povišenim intrakranijalnim tlakom i sekundarnom ishemijom. Razlikuju se po tome što vazogeni edem mozga nastaje autodigestivnim poremećajem i mehaničkom/funkcionalnom dezintegracijom sloja endotelnih stanica (sustav krvno-moždane barijere) ili refleksnom dilatacijom moždanih krvnih žila. S druge strane,

citotoksični edem mozga nastaje intracelularnim nakupljanjem vode unutar astrocita, mikroglijalnih stanica te neurona bez obzira na očuvanost vaskularne endotelne stijenke te je posljedica promjena u staničnoj osmolalnosti zbog neuspjeha sposobnosti stanice u održavanju ionskog gradijenta (15).

Apoptozom stanica te disfunkcijom mitohondrija nastupa porast slobodnih radikala te je potrebno ciljano liječenje koje ograničava dodatno oštećenje živčanog tkiva putem sekundarne TOM. Sveukupno smanjenje proizvodnje stanične energije primjećuje se kod oboljelih od TOM, a sve te stanične promjene u mozgu oštećuju neurološke funkcije. Neurotoksičnost glutamata odnosno ekscitotoksičnost uzrokuje oštećenje mitohondrija u živčanim stanicama. Nakon TOM, vidljivo je otpuštanje glutamata zbog ekscitacije NMDA receptora koji potiče veliko intracelularno nakupljanje Ca^{2+} nakon čega slijedi preopterećenje mitohondrija s Ca^{2+} . Ovaj poremećaj koncentracije Ca^{2+} pojačava energijski deficit stanica što rezultira štetnim oštećenjem mitohondrija čija je glavna uloga proizvodnja energije. Rezultirajuće mitohondrijsko opterećenje Ca^{2+} također modulira mitohondrijsko stvaranje slobodnih radikala (15).

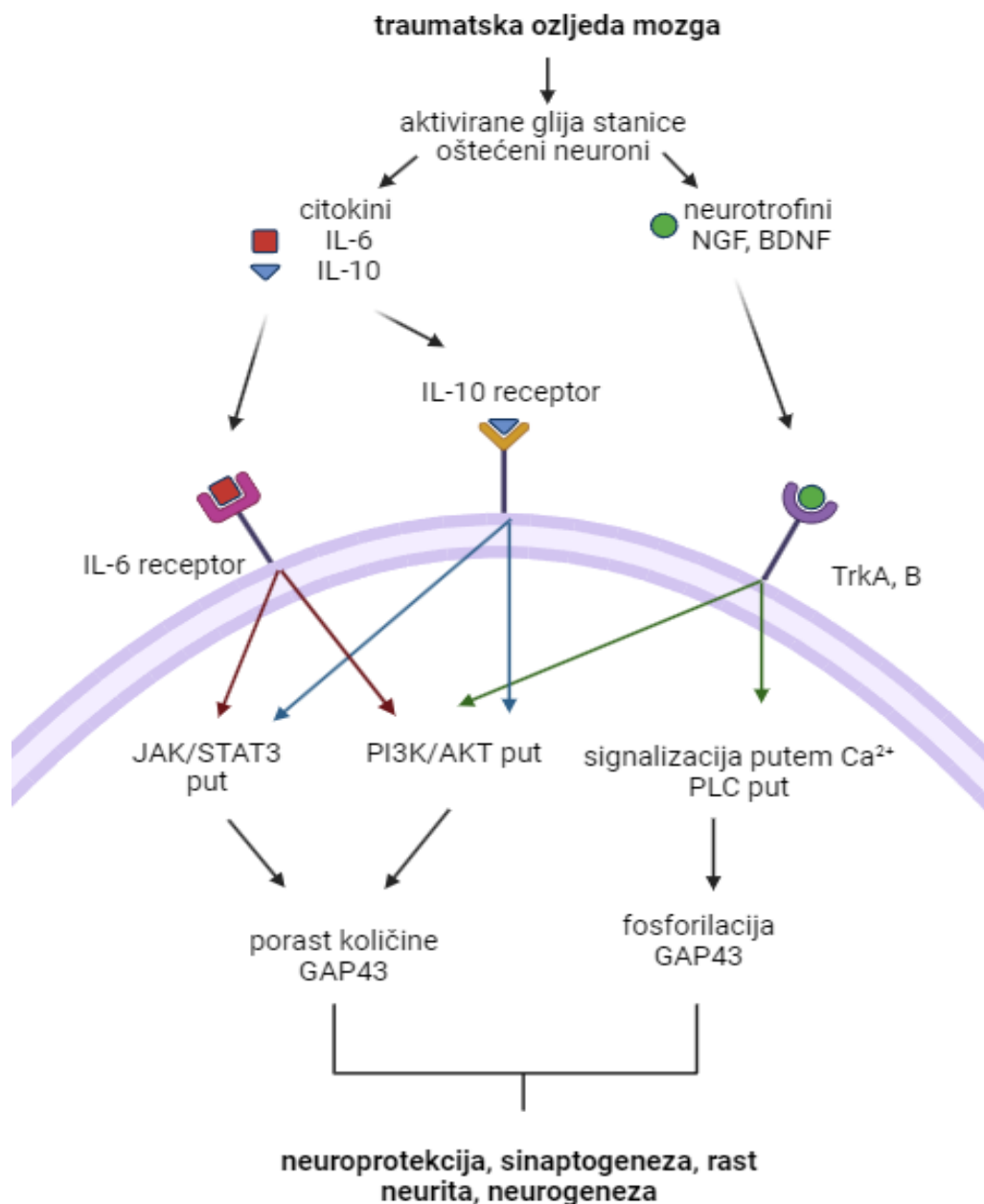
Oksidacijski stres opisuje se kao neravnoteža između proizvodnje slobodnih radikala i sposobnosti tijela da spriječi njihov štetni učinak putem neutralizacije antioksidansima kao što su to superoksid dismutaza, glutation peroksidaza i katalaza. Ovaj proces je nadalje odgovoran za oksidaciju proteina, cijepanje DNK, peroksidaciju staničnog i krvožilnog sustava te inhibiciju mitohondrijskog transportnog lanca elektrona (15).

Nakon ozljede, stanični sadržaj oštećenih ili umirućih stanica dovodi do porasta koncentracije glutamata u izvanstaničnom prostoru te lučenja neurotrofina (molekule neuroplastičnosti) kao što su NGF i BDNF. To stimulira astrocite, mikroglijalne stanice

i neurone na lučenje citokina kao što su interleukin-6 (IL-6) i -10 (IL-10). Sukladno tome, utvrđeno je da su IL-6 i -10 povišeni u cerebrospinalnoj tekućini i serumu pacijenata s teškom TOM. Prilikom deprivacije stanica kisikom i glukozom, istraživanjem se pokazalo kako IL-10 aktivira signalne puteve JAK/STAT3 i PI3K/Akt, što povećava koncentraciju GAP43 i olakšava neuroprotekciju, izrastanje neurita i sinaptogenezu *in vitro* (slika 6.). Ostaje nejasno u kojoj se mjeri izrastanje neurita promatrano *in vitro* pretvara u regeneraciju *in vivo* (16).

Neurotrofini kao odgovor na TOM i povezanu ekscitotoksičnost povezanu uz glutamat i citokine vežu tropomiozinsku receptor kinazu A i B, kako bi pokrenuli signaliziranje preživljavanja stanice putem PI3K/Akt puta. U animalnim modelima TOM pokazalo se da aktivacija i signalizacija putem neurotrofina potiče neuroprotekciju, sinaptogenezu i neurogenezu. Takva povećana aktivacija neurotrofina bila je popraćena povećanjem razina GAP43 pomoću optogenetske stimulacije (stimulacija neurona putem svjetlosti) pružene nakon moždanog udara. Ovi mehanizmi mogu sugerirati na to da je GAP43 bitan efektor neuroprotekcije koju pokreću neurotrofini (16).

Iako se koncentracija GAP43 povećava nakon TOM zbog gore navedenih razloga, postoje dokazi koji ukazuju na to da njegova dugotrajna i visoka koncentracija može uzrokovati i objasniti epileptogene poremećaje mozga nakon TOM. Istraživanja pokazuju vezu između epileptogeneze i pojačane regulacije GAP43 u modelu štakora. Trajna pojačana regulacija GAP43 može potaknuti abnormalnu sinaptogenezu te dovesti do razvoja i progresije kronične epilepsije (17).



Slika 6. Signalni putovi izazvani ozljedom koji reguliraju GAP43. Ozljede u središnjem živčanom sustavu dovode do oslobađanja citokina i neurotrofina iz oštećenih neurona i aktiviranih glija stanica. Citokini i neurotrofini putem receptora na preživjelim neuronima aktiviraju različite signalne kaskade koje reguliraju razinu ekspresije i fosforilaciju GAP43. Promjene u razinama GAP43 i njegovoj fosforilaciji povezane su s neuroprotekcijom, sinaptogenezom, izrastanjem neurita i neurogenezom (16).

3.4. GAP43 u neurodegenerativnim bolestima

Neurodegenerativne bolesti su heterogena skupina složenih bolesti karakterizirane gubitkom neurona i progresivnom degeneracijom različitih područja živčanog sustava što se pretežito odnosi na nakupljanje neuređenih proteina u duboke jezgre mozga. Ova skupina bolesti predstavlja značajan zdravstveni problem u cijelom svijetu, sa sve češćom stopom pojavnosti. Iako točna patogeneza neurodegenerativnih bolesti ostaje nejasna, vjeruje se da glavnu ulogu imaju genetski, epigenetski i okolišni čimbenici. Do danas, postoji samo uska količina lijekova i metoda koje bi samo potencijalno mogle usporiti progresiju ili smanjili mogućnost nastanka neurodegenerativnih bolesti, ali ne postoji potpuno efektivna terapija. Ova činjenica stvara potrebu istražiti saznanja o molekularnim mehanizmima koji leže u osnovi patogeneze neurodegenerativnih bolesti kako bi se potencijalno otkrili bolji modaliteti liječenja, ali i dijagnostika podliježećih neurodegenerativnih bolesti (18).

GAP43 je protein intrizično neuređene strukture te nema stabilnu terciarnu strukturu što se funkcionalno smatra uzrok nastanka i njegova povezanost s neurodegenerativnim bolestima. Značaj ovog svojstva ostaje nedovoljno istražena u fiziološkom i patološkom kontekstu. U mnogim neurodegenerativnim bolestima, njegovo nakupljanje uzrokuje pojavu nakupina topljivih fibrilnih agregata koji su ključni za nastanak neurodegenerativnih bolesti. Njihovi oligomeri su heterogene veličine i pokazuju određenu sličnost s oligomerima amiloidnog proteina (19).

Nedavna otkrića biomolekularne kondenzacije neuređenih proteina objašnjavanju potencijalni mehanizam patološke agregacije proteina. Naime, zbog svoje neuređene i nabijene strukture, GAP43 ima tendenciju koagulacije kao što je to slučaj u koloidnim otopinama te mu se u ovom kontekstu može pripisati uloga dispergirane faze. Nadalje, pokazalo se da proteini koji tvore agregate u

neurodegenerativnim bolestima kao što su tau i huntingtin prolaze kroz isti fenomen. Uključenost poremećenih proteina u neurodegenerativnim bolestima dovodi u pitanje ulazi li GAP43 i u isti proces odvajanja faza, odnosno ako se agregira na opisani način ili je njegov slučaj poseban te koje su funkcionalne posljedice (19).

Drugo istraživanje pokazuje korelaciju koncentracije GAP43 s frontotemporalnom demencijom, Alzheimerovom bolesti, Parkinsonovom bolesti te atipičnim parkinsonizmom pomoću kvantifikacije likvora specifično na GAP43 pomoću sendvič ELISA-e. Visoka koncentracija GAP43 u likvoru je uočena kod bolesnika s Alzheimerovom bolesti, koja korelira s težinom bolesti. Težina bolesti je dodatno bila određena visokim stupnjem neurofibrilarnih čvorova odnosno nakupina plakova tau proteina po Braaku i CERADu (polukvantitativna mjera neuritskih plakova). Dodatno je potvrđena i nešto viša razina GAP43 u bolesnika s umjerenom do teškom tau i A β sinuklein patologijom koji su se nalazili u hipokampusu, amigdali te temporalnom i okcipitalnom režnju mozga. Ovi nalazi sugeriraju da bi GAP43 iz likvora mogao biti biomarker specifičan za Alzheimerovu bolest jer koncentracije GAP43 slijede taloženje amiloida i tau depozita u mozgu. Ono što je dodatno karakteristično je to da razine GAP43 nisu nužno povećane do istih ekstrema ni u jednoj drugoj ovdje testiranoj neurodegenerativnoj bolesti osim u Alzheimerovoj bolesti. Budući da je GAP43 regulator sinaptičke plastičnosti i regenerativnog rasta aksona i induciran ozljedom i kognitivnom stimulacijom, također postoji mogućnost da se koncentracija GAP43 povećava s poboljšanjem mini mental testa koji se rabi za procjenu neurološkog kvantitativnog statusa. Koncentracija presinaptičkog proteina GAP43 u likvoru posebno je povećana kod tau i amiloidno pozitivnih osoba i stoga bi se mogao koristiti kao marker sinaptičke disfunkcije u Alzheimerovoj bolesti, pružiti dodatnu mjeru ishoda

u kliničkim ispitivanjima i pomoći u razlikovanju pacijenata s Alzheimerovom bolesti od pacijenata s drugim oblicima neurodegenerativnih bolesti (20).

Dodatna istraživanja povezuju ekspresiju GAP43 s Parkinsonovom bolesti koja je također neurodegenerativna bolest, ali koju karakterizira smrt neurona primarno u *substantii nigri pars compacta* koja svoju komunikaciju primarno ostvaruju putem dopamina koji se luči u neostriatumu (kojeg čine *nucleus caudatus* i *putamen*), a osnovno liječenje se sastoji od nadopune dopamina putem agonista dopamina koji su prva linija u liječenju ove bolesti (21).

Neuroni u regenerativnom stanju pokazuju već opisanu povećanu ekspresiju proteina GAP43, a prekomjerna ekspresija GAP43 potiče regenerativni rast opisanog nigrostrijatnog puta što može djelovati pozitivno u sklopu liječenja Parkinsonove bolesti. Ono što otežava ovu regeneraciju je glijalni ožiljak koji se formira zbog pretjerane upale u moždanom tkivu koji djeluje kao fiziološka barijera, djeluje dodatno propalno i koči ponovni rast neurona. Unutar glijalnog ožiljka nalazi se povećan broj oligodendrocita koji potiču signalni put inhibicije rasta u neuronima koji završava s rho kinazom, a to rezultira neuspjehom regeneracije. Sama rho kinaza ima razne funkcije uključujući regulaciju stanične kontrakcije, pokretljivosti, morfologije, polariteta, stanične diobe te genske ekspresije, a pomoću tih funkcija usmjeruje glija stanica na dodatno formiranje glijalnog ožiljka. GAP43 i rho kinaza stoga imaju recipročne uloge za regeneraciju, odnosno regenerativni neuspjeh te stoga poremećaj u njihovim razinama ekspresije vjerojatno doprinosi patologiji Parkinsonove bolesti (21).

4. RASPRAVA

Ovim radom opisani su osnovni molekularni mehanizmi proteina GAP43 kojima se ostvaruje rast neurona. Istaknuta je uloga fosforilacije i palmitoilacije kao posttranslacijskih modifikacija koje su bitne za doprinos proteina GAP43 u procesima sinaptogeneze. Međutim, saznanja o GAP43 kao proteinu važnom za neurooporavak nisu još našla primjenu u medicinskoj praksi.

Nova istraživanja fokusirana su na što precizniju karakterizaciju patofiziologije degenerativnog i traumatskog oštećenja živčanog tkiva. Time se žele pronaći bolji dijagnostički alati, ali i omogućiti razvoj novih terapija za navedena oštećenja živčanog tkiva. Medicina utemeljena na dokazima te s time povezani suvremeni dijagnostički i terapijski pristupi za oštećenja živčanog tkiva bit će sve veći prioritet zbog modernizacije društva i starenja populacije. GAP43 bi mogao imati primjenu u dijagnostici i prognostici opisanih bolesti, ali za ostvarenje tog obećavajućeg potencijala nužno je preciznije istražiti patofiziologiju traumatskog i neurodegenerativnog oštećenja mozga. Očekuje se da će daljnja istraživanja na većem broju pacijenata i uz primjenu suvremenih tehnologija za tekućinsku biopsiju omogućiti analize cirkulirajućih oblika proteina GAP43. Time bi istraživanje likvora i krvi moglo dati uvid u trenutne procese u živčanom tkivu i otkriti biomarkerski potencijal proteina GAP43.

5. ZAKLJUČAK

Dosadašnji rezultati ukazuju na višestruke uloge GAP43 proteina u fiziološkim i patološkim procesima živčanog tkiva. S jedne strane, GAP43 je uključen u rast neurita i time je bitan za razvoj, funkcioniranje i oporavak neurona. Pozitivan učinak GAP43 proteina na sinaptogenezu bi mogao biti naročito bitan za neurološki oporavak, primjerice nakon traumatske ozljede mozga. Stoga je GAP43 potencijalan biomarker neurooporavka. S druge strane, GAP43 je povezan s neurodegenerativnim bolestima. Nakupljanje GAP43 u područjima mozga poput hipokampusa, amigdale te temporalnog i okcipitalnog režnja mozga, korelira s težom kliničkom slikom Alzheimerove i Parkinsonove bolesti.

Ove raznovrsne uloge GAP43 proteina u fiziološkim i patološkim procesima dodatno naglašavaju potrebu za boljim poznavanjem staničnih i molekularnih mehanizama što uključuje detaljnu karakterizaciju dotičnog tkiva, odnosno pojedine anatomske lokacije i svih njenih tkivnih specifičnosti.

6. SAŽETAK

GAP43 je protein uključen u neurorazvoj, neuroplastičnost i neurooporavak središnjeg živčanog sustava te ima veliku ulogu u sinaptogenezi odgovornoj za učenje i pamćenje. Gen za GAP43 nalazi se na trećem kromosomu, a protein se sintetizira u tijelu neurona odakle se vezikulama transportira do svoje funkcionalne lokacije na konusima rasta i presinaptičkim završecima gdje se pričvršćuje uz membranu pomoću palmitinske kiseline. Fosforilirani GAP43 ispunjava svoju ulogu u rastu aksona i usmjeravanju konusa rasta tako što utječe na dinamiku aktinskih filamenata i time na oblikovanje membrana koje stvaraju sinaptičke veze. GAP43 također ostvaruje svoju ulogu modulirajući dostupnost fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfata (PIP2) u plazma membrani i omogućavajući signalne putove ključne za stanično funkcioniranje.

Na razinu ekspresije GAP43 utječu različita patološka stanja. Ekspresija GAP43 je povećana nakon traumatske ozljede mozga, što ukazuje na moguću ulogu u neurooporavku. GAP43 je također uključen u različita neurodegenerativna stanja, kao što su Alzheimerova bolest i Parkinsonova bolest. U Alzheimerovoj bolesti disregulacija i nakupljanje nefunkcionalnog GAP43 može doprinijeti temeljnim patofiziološkim procesima, dok s druge strane smanjena razina funkcionalnog GAP43 može pogoršati zdravstveno stanje bolesnika. Smanjena koncentracija funkcionalnog GAP43 također doprinosi patogenezi Parkinsonove bolesti zbog pojačanog stvaranja glijalnog ožiljka i naglašene patološke destrukcije stanica koje su dio nigrostrijatalnog puta.

Ključne riječi: GAP43 protein; konus rasta; neurodegenerativne bolesti; ozljeda mozga, traumatska

7. SUMMARY

GAP43 is a protein involved in neurodevelopment, neuroplasticity and neurorecovery of the central nervous system. It plays a significant role in synaptogenesis and is, therefore, responsible for learning and memory. The gene for GAP43 is located on the third chromosome, and the protein is synthesized in the body of the neuron, from where it is transported by vesicles to its functional location on growth cones and presynaptic terminals. The GAP43 protein is attached to the membrane by palmitic acid. Phosphorylated GAP43 fulfils its role in axon growth and growth cone guidance by influencing the dynamics of actin filaments and, thus, the patterning of the membrane that forms synaptic connections. GAP43 also exerts its role by modulating the availability of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) at the plasma membrane and provides the signalling pathways crucial for cellular functioning.

The expression level of GAP43 is affected by various pathological conditions. GAP43 expression is increased after traumatic brain injury, suggesting a possible role in neurorecovery. GAP43 is also involved in various neurodegenerative conditions, such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. In Alzheimer's disease, dysregulation and accumulation of non-functional GAP43 may contribute to the underlying pathophysiological processes. On the other hand, a reduced level of functional GAP43 may worsen the patient's health condition. Decreased concentration of functional GAP43 also contributes to the pathogenesis of Parkinson's disease due to the enhanced creation of glial scars and increased pathological destruction of cells that are part of the nigrostriatal pathway.

Keywords: Brain Injuries, Traumatic; GAP-43 Protein; Growth Cones;

Neurodegenerative Diseases

8. LITERATURA

1. Benowitz L, Shashoua V, Yoon M. Specific changes in rapidly transported proteins during regeneration of the goldfish optic nerve. *J Neurosci.* [Internet]. 1.3.1981. [citirano 19.4.2024.]; 1981;1(3):300–7. Dostupno na: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.01-03-00300.1981>
2. Benowitz LI, Routtenberg A. A membrane phosphoprotein associated with neural development, axonal regeneration, phospholipid metabolism, and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* [Internet]. 1987. [citirano 4.6.2024.]; 1987;10(12):527–32. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(87\)90135-4](https://doi.org/10.1016/0166-2236(87)90135-4)
3. Mosevitsky MI. Nerve Ending “Signal” Proteins GAP-43, MARCKS, and BASP1. U: *International Review of Cytology* [Internet]. Elsevier; 2005. [citirano 29.4.2024.]; p. 245–325. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007476960545007X>
4. Holahan MR. A Shift from a Pivotal to Supporting Role for the Growth-Associated Protein (GAP-43) in the Coordination of Axonal Structural and Functional Plasticity. *Front Cell Neurosci.* [Internet]. 31.8.2017. [citirano 10.5.2024.]; 2017;11:266. Dostupno na: <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00266>
5. Nguyen L, He Q, Meiri KF. Regulation of GAP-43 at serine 41 acts as a switch to modulate both intrinsic and extrinsic behaviors of growing neurons, via altered membrane distribution. *Mol Cell Neurosci.* [Internet]. 2009. [citirano 7.5.2024.]; 2009;41(1):62–73. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.01.011>

6. Nakata T, Terada S, Hirokawa N. Visualization of the Dynamics of Synaptic Vesicle and Plasma Membrane Proteins in Living Axons. *J Cell Biol.* [Internet]. 9.2.1998. [citirano 9.5.2024.]; 1998;140(3):659–74. Dostupno na: <https://doi.org/10.1083/jcb.140.3.659>
7. Igarashi M. Molecular basis of the functions of the mammalian neuronal growth cone revealed using new methods. *Proc Jpn Acad Ser B.* [Internet]. 31.7.2019 [citirano 11.6.2024.]; 2019;95(7):358–77. Dostupno na: <https://doi.org/10.2183/pjab.95.026>
8. Denny J. Molecular Mechanisms, Biological Actions, and Neuropharmacology of the Growth-Associated Protein GAP-43. *Curr Neuropharmacol.* [Internet]. 10.1.2006. [citirano 8.5.2024.]; 2006;4(4):293–304. Dostupno na: <https://doi.org/10.2174/157015906778520782>
9. Laux T, Fukami K, Thelen M, Golub T, Frey D, Caroni P. Gap43, Marcks, and Cap23 Modulate Pi(4,5)p2 at Plasmalemmal Rafts, and Regulate Cell Cortex Actin Dynamics through a Common Mechanism. *J Cell Biol.* [Internet]. 26.6.2000. [citirano 7.5.2024.]; 2000;149(7):1455–72. Dostupno na: <https://doi.org/10.1083/jcb.149.7.1455>
10. Mandal K. Review of PIP2 in Cellular Signaling, Functions and Diseases. *Int J Mol Sci.* [Internet]. 6.11.2020. [citirano 8.5.2024.]; 2020;21(21):8342. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/ijms21218342>
11. De La Monte SM, Federoff HJ, Ng SC, Grabczyk E, Fishman MC. GAP-43 gene expression during development: persistence in a distinctive set of neurons in the mature central nervous system. *Dev Brain Res.* [Internet]. 1989. [citirano 4.6.2024.]; 1989;46(2):161–8. Dostupno na: [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(89\)90279-4](https://doi.org/10.1016/0165-3806(89)90279-4)

12. Weber JT, Maas AIR, editors. Neurotrauma: New Insights Into Pathology and Treatment. Amsterdam: Elsevier; 2007.
13. Galgano M, Toshkezi G, Qiu X, Russell T, Chin L, Zhao LR. Traumatic Brain Injury: Current Treatment Strategies and Future Endeavors. Cell Transplant. [Internet]. 2017;26(7):1118–30. [citirano 11.6.2024.]; Dostupno na: <https://doi.org/10.1177/0963689717714102>
14. Javaid S, Farooq T, Rehman Z, Afzal A, Ashraf W, Rasool MF, et al. Dynamics of Choline-Containing Phospholipids in Traumatic Brain Injury and Associated Comorbidities. Int J Mol Sci. [Internet]. 2017. [citirano 11.6.2024.]; 2021;22(21):11313. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/ijms222111313>
15. Kaur P, Sharma S. Recent Advances in Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. Curr Neuropharmacol. [Internet]. 21.8.2018. [citirano 11.5.2024.]; 2018;16(8):1224–38. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.2174/1570159x15666170613083606>
16. Chung D, Shum A, Caraveo G. GAP-43 and BASP1 in Axon Regeneration: Implications for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. Front Cell Dev Biol. [Internet]. 3.9.2020. [citirano 12.4.2024.]; 2020;8:567537. Dostupno na: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.567537>
17. Nemes AD, Ayasoufi K, Ying Z, Zhou QG, Suh H, Najm IM. Growth Associated Protein 43 (GAP-43) as a Novel Target for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Epileptogenesis. Sci Rep. [Internet]. 18.12.2017. [citirano 11.5.2024.]; 2017;7(1):17702. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17377-z>

18. Lamptey R, Chaulagain B, Trivedi R, Gothwal A, Layek B, Singh J. A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics. ProQuest. [Internet]. 6.2.2022. [citirano 13.5.2024.]; 2022;23(3):1851. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/ijms23031851>
19. Forsova OS, Zakharov VV. High-order oligomers of intrinsically disordered brain proteins BASP1 and GAP-43 preserve the structural disorder. FEBS J. [Internet]. 2016. [citirano 18.4.2024.]; 2016;283(8):1550–69. Dostupno na: <https://doi.org/10.1111/febs.13692>
20. Sandelius Å, Portelius E, Källén Å, Zetterberg H, Rot U, Olsson B, et al. Elevated CSF GAP-43 is Alzheimer's disease specific and associated with tau and amyloid pathology. Alzheimers Dement. [Internet]. 2019. [citirano 13.5.2024.]; 2019;15(1):55–64. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.08.006>
21. Saal K, Galter D, Roeber S, Bähr M, Tönges L, Lingor P. Altered Expression of Growth Associated Protein-43 and Rho Kinase in Human Patients with Parkinson's Disease. Brain Pathol. [Internet]. 2017. [citirano 16.5.2024.]; 2017;27(1):13–25. Dostupno na: <https://doi.org/10.1111/bpa.12346>

9. ŽIVOTOPIS

Tin Jagoić rođen je 20. studenog 1999. godine u Koprivnici. Završio je osnovnu školu Ljudevita Modeca u Križevcima i prirodoslovno-matematičku gimnaziju Ivana Zakmardija Dijankovečkog u Križevcima. Završio je i osnovnu i srednju glazbenu školu Alberta Štrige u Križevcima instrumentalnog odjela na tamburi. Godine 2018. upisao je studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Tijekom viših godina studija sudjelovao je u znanstveno-istraživačkom radu na Zavodu za fiziologiju, patofiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci gdje savladava western i slot blot, kromatografiju isključivanja po veličini te određivanje veličine i broja nanočestica metodom opažanja podesivog otpornog pulsa (engl. *tunable resistive pulse sensing*, TRPS). Sudjelovao je na 11., 12., i 13. Studentskom kongresu neuroznanosti u Rijeci (2022.-2024. godine) na kojima osvaja nagradu za najbolje konferencijsko priopćenje, od toga na prva dva kongresa prema odluci uredništva časopisa *Medicina Fluminensis*, a na posljednjem kongresu prema odluci časopisa *Anamnesis*. Sudjelovao je na 8. Međunarodnom Studentskom Kongresu u Grazu, Austrija (2022. godine). Stječe vještinu recenziranja sažetaka kao član znanstvenog odbora na konferenciji „*First International Conference on Teaching and Learning in Medical Education*“ koja je održana u Lovranu 2023. godine te je suosnivatelj studentske sekcije za neurokirurgiju. Godine 2024. dodijeljena mu je Rektorova nagrada za znanstveni rad.