

# Procjena stupnja mijelinizacije u mozgu genetički izmijenjenih miševa St3Gal2, St3Gal3 i St3Gal2/3

---

Imeri, Aida

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:501301>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U  
OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Aida Imeri**

**PROCJENA STUPNJA MIJELINIZACIJE  
U MOZGU GENETIČKI IZMIJENJENIH  
MIŠEVA *St3Gal2*, *St3Gal3* I *St3Gal2/3***

**Diplomski rad**

**Osijek, 2024.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U  
OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Aida Imeri**

**PROCJENA STUPNJA MIJELINIZACIJE  
U MOZGU GENETIČKI IZMIJENJENIH  
MIŠEVA *St3Gal2*, *St3Gal3* I *St3Gal2/3***

**Diplomski rad**

**Osijek, 2024.**

Rad je ostvaren u Laboratoriju za neurobiologiju pri Katedri za medicinsku biologiju i genetiku  
Medicinskog fakulteta Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Barbara Vilječić

Rad ima 44 listova, 4 tablice i 16 slika.

## *Zahvale*

*Hvala mentorici doc. dr. sc. Barbari Viljetić na prijedlogu teme te pomoći da se sve ovo izrealizira.*

*Hvala mojim najbližima – roditeljima što su mi omogućili 5 godina ovog školovanja i bili tu uvijek uz mene, bratu što se trudio nasmijati me kada je bilo teško, mom I. koji je bio uz mene kao najveća podrška i mojim prijateljima s kojima je sve bilo puno lakše i zabavnije.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Mijelin i proces mijelinizacije.....	1
1.1.1. Građa mijelina.....	1
1.1.2. Uloga mijelina i mijelinizacije.....	2
1.2. Demijelinizacija i remijelinizacija.....	3
1.3. Poremećaji mijelinizacije.....	4
1.3.1. Dismijelinizacijske bolesti.....	5
1.3.2. Demijelinizacijske bolesti.....	6
1.4. Lipidne splavi.....	7
1.5. Kompleksni gangliozidi.....	9
1.6. Sijalotransferaze.....	10
1.6.1. Regulacija genske ekspresije sijalotransferaza.....	11
1.7. Genetički izmijenjeni miševi <i>St3Gal2</i> , <i>St3Gal3</i> i <i>St3Gal2/3</i> .....	12
<b>2. HIPOTEZA.....</b>	<b>13</b>
<b>3. CILJEVI.....</b>	<b>14</b>
<b>4. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>15</b>
4.1. Ustroj studije.....	15
4.2. Materijali.....	15
4.2.1. Pokusne životinje.....	15
4.2.2. Kemikalije.....	15
4.3. Metode.....	17
4.3.1. Žrtvovanje miševa.....	17
4.3.2. Krioprotekcija uzoraka.....	17
4.3.3. Rezanje na kriostatu i priprema rezova.....	18
4.3.4. Imunohistokemijska analiza.....	18
4.3.5. Analiza uzoraka.....	19
4.3.6. Statistička analiza.....	19
<b>5. REZULTATI.....</b>	<b>20</b>
5.1. Analiza izražaja markera GFAP u hipokampusu i moždanoj kori.....	22
5.2. Analiza izražaja markera Cux1 u hipokampusu i moždanoj kori.....	24
5.3. Analiza izražaja markera SMI312 u hipokampusu i moždanoj kori.....	26
5.4. Analiza izražaja markera S100 u hipokampusu i moždanoj kori.....	28
<b>6. RASPRAVA.....</b>	<b>30</b>

6.1.	Izražaj GFAP markera.....	30
6.2.	Izražaj Cux1 markera .....	31
6.3.	Izražaj SMI312 markera.....	31
6.4.	Izražaj S100 markera.....	32
6.5.	Procjena stupnja mijelinizacije.....	32
<b>7.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>34</b>
<b>8.</b>	<b>SAŽETAK .....</b>	<b>35</b>
<b>9.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>36</b>
<b>10.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>37</b>
<b>11.</b>	<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>43</b>

## POPIS KRATICA

**BSA** – goveđi serum albumina (engl. *albumin bovine serum*)

**Cux1** – gen koji pripada obitelji CUT homeodomena transkripcijskih faktora (engl. *cut-like homeobox 1*)

**GFAP** – glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. *glial fibrillary acidic protein*)

**GPI** – glikofosfatidilinozitol (engl. *glycosylphosphatidylinositol*)

**HRP** – hrenova peroksidaza (engl. *horseradish peroxidase*)

**Neu5Ac** – N-acetilneuraminska kiselina (engl. *N-acetylneuraminic acid*)

**NCAM1** – molekula neuralne stanične adhezije (engl. *neural cell adhesion molecule 1*)

**MBP** – bazični mijelinski protein (engl. *myelin basic protein*)

**PBS** – fosfatni pufer (engl. *phosphate buffer saline*)

**PIP2** – fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (engl. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)

**PŽS** – periferni živčani sustav

**St3Gal2** – genetički modificiran miš s isključenim genom za sintezu ST  $\beta$ -galaktozid  $\alpha$ 2,3-sijalotransferaze 2

**St3Gal3** – genetički modificiran miš s isključenim genom za sintezu ST  $\beta$ -galaktozid  $\alpha$ 2,3-sijalotransferaze 3

**St3Gal2/3** – genetički modificiran miš s isključenim genom za sintezu ST  $\beta$ -galaktozid  $\alpha$ 2,3-sijalotransferaze 2 i 3

**SŽS** – središnji živčani sustav

**WT** – divlji tip (engl. *wild type*)



## 1. UVOD

### 1.1. Mijelin i proces mijelinizacije

Mijelin predstavlja značajnu evolucijsku prilagodbu ključnu za razvoj kompleksnih živčanih sustava (1). To je modificirana stanična membrana koja se višestruko obavija oko aksona (2). Proces mijelinizacije uključuje uzastopno omotavanje četrdeset ili više mijelinskih slojeva oko aksona (3). Mijelinizacija aksona neophodna je za motoričke, senzorne i kognitivne funkcije višeg reda te se smatra jednim od najvažnijih procesa za normalan razvoj mozga (4). Proces mijelinizacije započinje prije rođenja u kaudalnom moždanom deblu i napreduje prema prednjem mozgu te se do druge godine života događaju najveće i najizraženije promijene (5). Mijelin je kompleksne građe te ima brojne uloge neophodne za normalno funkcioniranje živčanog sustava (6).

#### 1.1.1. Građa mijelina

Mijelinizirana vlakna opisao je još 1717. van Leeuwenhoek, no struktura mijelina koja je danas poznata, otkrivena je zahvaljujući Schultzeovom specifičnom bojenju s osmijem 1865. godine (7). Ovisno o tome nalazi li se u središnjem živčanom sustavu (SŽS) ili perifernom živčanom sustavu (PŽS), mijelin može biti građen od oligodendrocita ili Schwannovih stanica (6). Za razliku od Schwannovih stanica koje mijeliniziraju samo jedan akson, oligodendrociti mijeliniziraju čak 40-60 aksona (8, 9). Navedene stanice obavijaju akson produžecima svoje citoplazmatske membrane te na taj način oblikuju omotač (10). Također, oslobađaju sve potrebne lipide i proteine za izgradnju mijelina te pružaju potporu i hranjive tvari za živčana vlakna (11).

Što se tiče strukture mijeliniziranih aksona, ona se sastoji od četiri različita područja: Ranvierovog čvora, paranoda, jukstaparanoda i internodija. Internodij je obavijen mijelinom, a s obje strane se nalaze jukstaparanode, dok paranodalne petlje graniče s Ranvierovim čvorom (10).

Kao i sve druge stanične membrane, mijelinska ovojnica je građena od proteina, lipida i vode. Lipidi čine veći dio mijelina, 70 % – 85 % suhe mase, a proteini manji dio, 15 % – 30 % (2). Udio lipidnih komponentni je nešto drugačiji od ostalih bioloških membrana, a čini ga

40 % kolesterola, 40 % fosfolipida (najviše sfingomijelini i fosfatidilkolini ) i 20 % glikolipida (najviše galaktocerebrozid i galaktosulfatid) (6).

Iako udio proteina nije velik, oni su vrlo raznoliki (12). Mijelin sadrži specifične proteine poput bazičnog mijelinskog proteina (engl. *myelin basic protein*, MBP), proteina proteolipida (PLP) i nultog mijelinskog proteina (P0) (13). U središnjem živčanom sustavu dominantni su MBP i PLP, dok u perifernom živčanom sustavu prevladava P0 (14). PLP je najzastupljeniji protein u središnjem živčanom sustavu (15). On ima vrlo bitnu ulogu u stabilnosti mijelina i potpori aksona jer spaja mijelinske membrane i potiče njihovo međusobno zbijanje (16). Nakon njega slijedi drugi najzastupljeniji protein – MBP koji čini čak 30 % ukupnog mijelinskog proteina u središnjem živčanom sustavu. MBP je intrinzično neuređen protein bez definirane globularne strukture te formira kratke strukturirane segmente (17). Što se tiče perifernog živčanog sustava, tu se ističe P0, transmembranski protein tipa I, lokaliziran na plazma membrani. Njegova glavna uloga je formiranje intraperinodalne linije, uskog odjeljka gdje se spajaju dvije mijelinske membrane (14). Osim ovih proteina, u mijelinu se nalazi i glikoprotein pridružen mijelinu (engl. *myelin-associated glycoprotein*, MAG) koji čini 1 % mijelinskih proteina u SŽS-u i 0,1 % u PŽS-u te je također uključen u stvaranje i održavanje mijelina (18, 19). Specifičnije, ovaj protein ima važnu ulogu u staničnoj signalizaciji i adheziji te održava razmak između mijelina i aksona. Navedeni proteini često se koriste u svrhu istraživanja mijelinizacije, no osim njih, mogu se koristiti i manje specifična protutijela za mijelin poput Cux-1, SMI312, S100 i GFAP (2, 6).

Sveukupno, građa mijelina je kompleksna i dinamična, pružajući optimalne uvjete za brz i učinkovit prijenos živčanih impulsa. Lipidni omotač osigurava izolaciju i stabilnost, dok proteini mijelina sudjeluju u održavanju strukture i funkcije mijelina (6). Međusobna interakcija lipida i proteina ključna je za stvaranje i održavanje strukture mijelina (20).

### **1.1.2. Uloga mijelina i mijelinizacije**

Mijelin, ključna struktura u procesu mijelinizacije, ima brojne uloge za normalno funkcioniranje i održavanje zdravlja živčanog sustava. Kao glavna nezamjenjiva uloga ističe se brzo i učinkovito prenošenje živčanih signala (8). Poboljšanje brzine provođenja živčanih signala kroz evoluciju omogućilo je brzo praćenje i odgovaranje na vanjsko okruženje (1). Velika mijelinizirana živčana vlakna omogućuju najbrži unutarnji prijenos signala u živim organizmima, čak pri brzinama većim od 200 metara u sekundi (21). Ključnu ulogu u brzom

širenju akcijskog potencijala ima tzv. saltatorno provođenje (1). Naime, mijelinska ovojnica sadrži pravilno raspoređena, nemijelinizirana područja, poznata kao Ranvierovi čvorovi (22). Ranvierovi čvorovi djeluju kao ponavljači, revitalizirajući akcijski potencijal dok putuje, drastično ubrzavajući njegovu brzinu širenja (23). Akcijski potencijal se regenerira u svakom čvoru, gdje je gustoća natrijevih i kalijevih kanala vrlo visoka, što se opisuje kao „skakanje“ impulsa s čvora na čvor (22). Na taj način, štedi se energija, jer se impulsi provode depolarizacijom i repolarizacijom samo određenih segmenata membrane, umjesto cijele površine aksona (24). Za razliku od mijeliniziranih aksona, nemijelinizirani imaju ravnomjerno raspoređene ionske kanale što rezultira sporim širenjem akcijskog potencijala. Također, brzom prijenosu impulsa pridonosi i činjenica da je mijelin odličan električni izolator. Naime, mijelinska ovojnica obogaćena lipidima sprječava raspršenje električnih impulsa s aksona te omogućuje brže punjenje čvorova (25). Osim izolacije, mijelinska ovojnica djeluje i kao zaštitni omotač neuronskih stanica, pruža strukturnu potporu i mehaničku krutost mozgu u cjelini (3, 26). Tako se sprječava degeneracija živčanih impulsa te se pomaže u očuvanju strukture i funkcije živčanih vlakana (6). Zbog toga, mijelin se smatra ključnim dijelom živčanog sustava osiguravajući normalno funkcioniranje organizma, omogućujući precizan prijenos informacija, zaštitu živčanih vlakana te brže motoričke i senzorne reakcije (6).

## 1.2. Demijelinizacija i remijelinizacija

Mijelinska ovojnica ključna je za razvoj i održavanje zdravlja živčanog sustava, stoga je razumijevanje mehanizma njezinog oštećivanja i popravka vrlo bitno (27).

Demijelinizacija označava sustavno uništavanje mijelina i njegove izolacijske ultrastrukture, a može biti primarna i sekundarna (14, 28). Primarna demijelinizacija se odnosi na proces razaranja mijelina, odnosno nastaje izravnom smrću stanica oligodendroglije, dok do sekundarne demijelinizacije dolazi zbog gubitka neurona (29). Mehanizmi kojima se postiže demijelinizacija uključuju mehaničku kompresiju, nutritivne nedostatke (npr. vitamin B12), izloženost toksinima, virusne infekcije i imunološke reakcije (28). Demijelinizacija nastaje kao posljedica bolesti koje oštećuju mijelinske ovojnice ili stanice koje ih tvore (30).

Oporavku oštećenog tkiva pomaže proces remijelinizacije. Remijelinizacija je primjer spontanog popravka u SŽS-u, gdje se oko demijeliniziranog aksona stvara novi sloj mijelinske ovojnice (31). Određena istraživanja su pokazala da remijelinizacija ne samo da olakšava

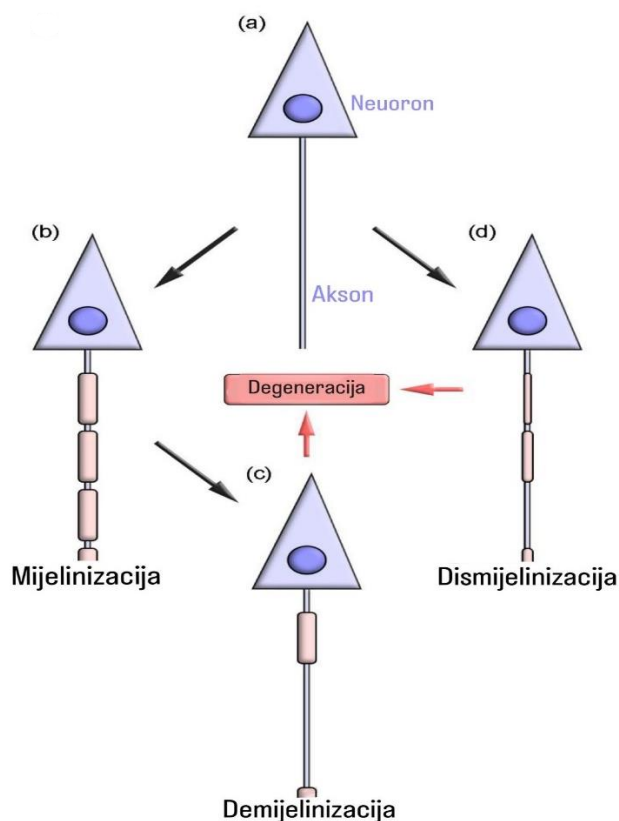
strukturni oporavak aksona, već im pomaže da povrate svoja prijašnja svojstva, poput provodljivosti i drugih neuroloških funkcija (32). Također, remijelinizacija igra bitnu ulogu u živčanoj zaštiti, pružajući mehaničku i metaboličku potporu (33). Osim toga, remijelinizacija sudjeluje u popravku lezija, zaštiti aksona od upalnih medijatora i imunoloških efektorskih stanica, te obnavljanju brzine provođenja impulsa (34).

Postoje dva potencijalna izvora za stvaranje novog mijelina: mijelinske ovojnice koje proizvode novostvoreni oligodendrociti i one koje stvaraju preživjeli oligodendrociti nakon demijelinizacije. Preživjeli oligodendrociti imaju sposobnost proliferacije i migracije te mogu pridonijeti stvaranju mijelina, ali ako se tijekom demijelinizacije izgubio značajni broj oligodendrocita, oni neće moći biti glavni izvor stvaranja nove mijelinske ovojnice (35).

Shvaćanje procesa remijelinizacije ima vrlo bitnu ulogu u razvitku novih terapijskih mogućnosti u svrhu liječenja bolesti koje izazivaju demijelinizaciju. Zbog toga su istraživanja sve više usredotočena na razvoj novih terapija za promicanje remijelinizacije i njezinih dobrobiti (36).

### **1.3. Poremećaji mijelinizacije**

Poremećaji povezani s mijelinom mogu biti podijeljeni ovisno o tome radi li se o neadekvatnoj, abnormalnoj proizvodnji mijelina, odnosno dismijelinizirajućim bolestima, ili se radi o demijelinizirajućim bolestima gdje dolazi do stvaranja mijelina no on biva uništen samom demijelinizacijom (27) (Slika 1). Različiti poremećaji mijelinizacije obuhvaćaju tri glavna mehanizma: zaustavljeni ili abnormalni razvoj preteče oligodendrocita, nepravilnu funkciju oligodendroglije koja dovodi do razgradnje mijelina te primarne poremećaje aksona koji uzrokuju nenormalnu signalizaciju i poremećene trofičke interakcije s oligodendrocitima u razvoju. Poremećaji u mijelinizaciji mogu biti brojni, od leukodistrofija, aminokiselinske i organske acidopatije do različitih neuronskih degeneracija i infekcija (5).



**Slika 1.** Shematski prikaz nemijeliziranog (a), mijeliniziranog (b), demijeliniziranog (c) i dismijeliniziranog (d) aksona. Mijelinizirani akson je normalno obavijen mijelinom, demijelinizacijom dolazi do patološkog gubitka formiranog mijelina, a dismijelinizacija uključuje formiranje abnormalnog mijelina. I demijelinizacija i dismijelinizacija mogu dovesti do degeneracije aksona (slika preuzeta iz rada autora Ohno, N. i Ikenaka, K. i prilagođena (37)).

### 1.3.1. Dismijelinizacijske bolesti

Kod dismijelinizacijskih bolesti dolazi do poremećaja u normalnom procesu stvaranja mijelina, što dovodi do strukturnih abnormalnosti ili nedostataka mijelinske ovojnice. To može biti posljedica genetičkih mutacija koje utječu na proteine uključene u sintezu ili održavanje mijelina, abnormalnih signalnih puteva ili čimbenika okoliša koji ometaju pravilnu mijelinizaciju. Dismijelinizacija može utjecati i na SŽS i na PŽS i može rezultirati nizom neuroloških simptoma ovisno o opsegu i lokaciji abnormalnosti mijelina (37). Kada se govori o dismijelinizacijskim bolestima, najčešće se podrazumijevaju leukodistrofije i nasljedni metabolički poremećaji kod kojih nedostatak enzima sprječava normalnu sintezu ili održavanje

mijelina (38). Najčešća leukodistrofija koja nastaje zbog smanjenog stvaranja mijelina je Pelizaeus-Merzbacherova bolest (PMD) (39). PMD je rijedak genetički poremećaj karakteriziran abnormalnim stvaranjem mijelina u SŽS-u (40). Uzrokovan je različitim vrstama mutacija u genu proteolipidnog proteina 1 (PLP1), a najčešće se nasljeđuje po X-vezanom recesivnom obrascu (40, 41). Leukodistrofije povezane s RNA polimerazom III/4-H i hipomijelinizacija s bazalnim ganglijima i atrofijom malog mozga također su povezane s neadekvatnim stvaranjem mijelina, no ovi poremećaji su nešto rjeđi (39).

### 1.3.2. Demijelizacijske bolesti

Demijelinizacijske bolesti karakterizira oštećenje primarno usmjereno na mijelin, što je dokazano različitim neuroradiološkim, neuropatološkim, neurokemijskim i genetičkim ispitivanjima (10). Što se tiče demijelinizacijskih bolesti SŽS-a one se mogu podijeliti ovisno o tome jesu li uzrokovane upalom, virusnom infekcijom (npr. progresivna multifokalna leukoencefalopatija uzrokovana papovavirusom), žarišnom kompresijom (npr. kompresija trigeminalnog živca) ili se pak radi o stečenom metaboličkom poremećaju (centralna pontinska mijelinoliza) ili hipoksično-ishemičnom stanju. U demijelinizacijske bolesti uzrokovane upalnim procesima pripadaju tri bolesti: multipla skleroza, akutni diseminirani encefalomijelitis i akutni hemoragični leukoencefalitis (30). Jedna od najčešće proučavanih bolesti u ovoj kategoriji je upravo multipla skleroza od koje oboljeva više od 2,5 milijuna ljudi diljem svijeta i koja je povezana sa značajnim morbiditetom (27, 42). To je autoimuna demijelinizirajuća i neurodegenerativna bolest i kao takva, vodeći je uzrok netraumatske neurološke invalidnosti u mladih odraslih osoba (43). Potaknuta je kombinacijom više čimbenika kao što su okolišni čimbenici (UV zrake), infekcija Epstein-Barrovim virusom te samim utjecajem genetičkih čimbenika (44). Karakteriziraju ju razni neurološki simptomi zbog oštećenja živčanih vlakana, slabost mišića, poremećaji vida i problemi s ravnotežom (45).

Osim demijelinizacijskih bolesti u SŽS-u, javljaju se i one u PŽS-u. Periferne demijelinizirajuće bolesti obuhvaćaju niz poremećaja koji uključuju prvenstveno oštećenje Schwannovih stanica što stvaraju mijelinsku ovojnicu, najčešće zbog čimbenika poput infekcija, autoimunih odgovora, genetičkih mutacija i oksidativnog stresa (46). Jedna od najčešćih bolesti je Guillain-Barréov sindrom s oko 100.000 novih slučajeva godišnje (47). U većini slučajeva, ova bolest je uzrokovana infekcijom bakterijom *Campylobacter jejuni*, a

simptomi počinju kao slabost udova koja napreduje tijekom četiri tjedna (48). Ovaj sindrom se smatra vodećim uzrokom akutne paralize te su stope morbiditeta i mortaliteta još uvijek vrlo visoke (49).

Osim ovog sindroma, vrlo često se spominje i Charcot-Marie-Toothova bolest. Ona pripada u skupinu najčešćih neuromuskularnih nasljednih bolesti, a karakterizirana je distalnom atrofijom mišića, često s deformitetom stopala, slabošću i gubitkom osjeta (50). Pogađa otprilike 1 od 2.500 ljudi diljem svijeta, što ga čini jednim od najčešćih nasljednih neuroloških poremećaja (51).

Također, osim spomenutih demijelinizirajućih leukodistrofija, postoje i demijelinizirajuće leukodistrofije koje uključuju Krabbeovu bolest, X-vezanu adrenoleukodistrofiju i metakromatsku leukodistrofiju (39).

## 1.4. Lipidne splavi

Stanične membrane nisu uniformne, već su organizirane u mikrodomene koje se nazivaju lipidne splavi (52). Još 1997. godine Simons i sur. predložili su model dinamičkog grupiranja sfingolipida i kolesterola u obliku pokretnih splavi unutar dvosloja tekućine koje bi služile kao platforme za pričvršćivanje raznih proteina. Predloženi model opisivao je organizaciju lipidnih splavi i sugerirao da se proteini mogu selektivno povezivati ili odvajati od njih (53). Proteini koji se nalaze na splavi često posjeduju specifične lipidne modifikacije, kao što je palmitoilacija ili dodatak glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) sidra te se stoga pričvršćuju za splav (Slika 2) (54). Lipidne splavi sadrže visoke udjele kolesterola, sfingomijelina i glikosfingolipida, posebice ganglioizida (55). Van der Waalsove veze čine glavnu poveznicu između sfingolipida i kolesterola, što je dodatno stabilizirano vodikovim vezama (56).

Također, jedan važan biološki aktivan medijator je i sfingozin 1-fosfat, uključen u brojne stanične funkcije kao što su transdukcija i prijenos signala. Receptori za sfingozin 1-fosfat mogu aktivno komunicirati s drugim receptorskim sustavima (57).

Još jedna od karakteristika lipidnih splavi jest to da su mikrodomene otporne na otapanje neionskim deterdžentima pri niskim temperaturama, što je svojstvo koje se koristi u njihovoj izolaciji i karakterizaciji (58).

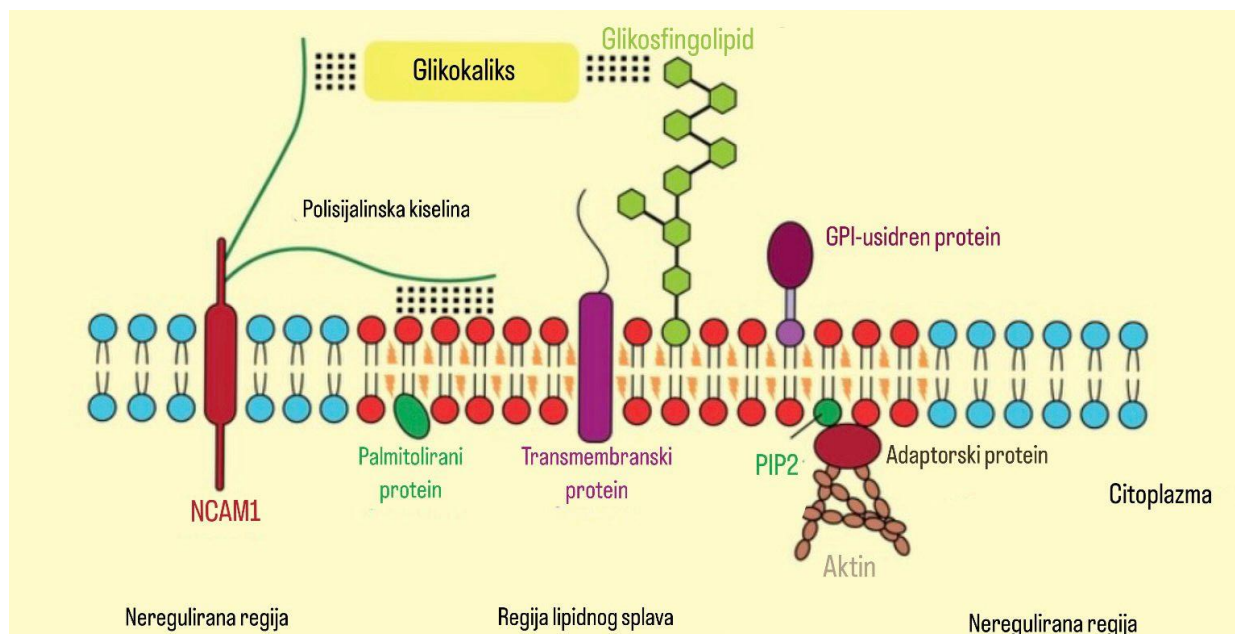
Kada se govori o ulozi lipidnih splavi, ove specijalizirane membranske domene prvenstveno sudjeluju u prijenosu signala. Kako lipidne splavi sadrže brojne membranske i

signalne proteine, upravo njihovim regrutiranjem ili isključenjem može se pojačati ili prigušiti prenošenje signala (59). Prenošnje signala se također može kontrolirati preko citokinskog receptora. Naime, oni mogu odrediti specifičnost signalizacije koncentriranjem signalnih molekula, uključujući receptore, kinaze i adaptore, pa tako primjerice prekidom lipidne splavi, dolazi do promjena u citokinskom odgovoru i staničnoj signalizaciji (60).

Nadalje, lipidne splavi sudjeluju u organiziranju i određivanju funkcije multiproteinskih kompleksa te regulaciji homeostaze (61). Prostornim organiziranjem lipida i proteina unutar stanične membrane, lipidne splavi reguliraju transdukciju signala, promet kroz membranu i razvrstavanje proteina (60). Također, služe kao ključne platforme u procesu mijelinizacije, gdje uključuju nekoliko temeljnih procesa u neurogenezi, neuronskoj migraciji i diferencijaciji stanica. Zbog njihove važne uloge u mozgu i brojnim procesima koji se tamo događaju, uključujući i mijelinizaciju, disfunkcije lipidnih splavi mogu rezultirati demijelinizacijom te uzrokovati brojne neurodegenerativne bolesti poput Alzheimerera ili Parkinsonove bolesti (20). Osim neuroloških poremećaja, abnormalna regulacija lipidnih splavi često je povezana s pojavom karcinoma zbog nereguliranog signaliziranja čime se potiče proliferacija tumorskih stanica, preživljavanje i metastaze (62).

Razumijevanje strukture i funkcije lipidnih splavi ključno je za daljnji razvoj ciljanih terapijskih intervencija za različite bolesti.





**Slika 2.** Lipidne splavi sadrže gusto zbijene lipide, obogaćene kolesterolom i glikolipidima. One selektivno stupaju u interakciju sa specifičnim proteinima, uključujući palmitoilirane proteine i transmembranske proteine koji vežu kolesterol i GPI-usidrene proteine te citoskeletnim aktinom koji posjeduju domene za vezanje PIP2 i aktina. Glikoproteini izvan regija splavi, kao što je polisijalizirani NCAM1, mogu se povezati sa splavima ili izravno preko njihovih oligosaharidnih lanaca (polisijalinske kiseline), ili neizravnim putem (glikosfingolipidima) (slika preuzeta iz rada autora Sapoń, K. i sur. i prilagođena (54)).

## 1.5. Kompleksni gangliozi

Nakon kolesterola i sfingomijelina, ključne strukture moždanih lipidnih splavi su gangliozi, glikosfingolipidi koji sadrže sijalinsku kiselinu. Iako dominiraju u mozgu, oni se mogu pronaći i u ostalim tkivima kralježnjaka (63). Gangliozi su, uz cerebrozide i sulfatide, podklasa glikosfingolipida koji se sastoje od sijaliziranog glikana vezanog za ceramidni lipid (20). Četiri su glavne strukture moždanih gangliozi koje čine 97 % svih gangliozi u normalnom ljudskom mozgu, GM1, GD1a, GD1b i GT1b (64). Oni služe prvenstveno za bočno povezivanje s drugim gangliozidima, sfingomijelinima, kolesterolom i proteinima u lipidnim splavima te kao takvi čine jednu od glavnih komponenti lipidnih splavi (20). Također, gangliozi igraju ključnu ulogu u regulaciji različitih staničnih procesa u mozgu uključujući već spomenutu signalnu transdukciju, adheziju i stanično prepoznavanje (55). Njihov

hidrofobni ceramidni rep nalazi se u fosfolipidnom dijelu dok je glikanski dio okrenut prema van i sudjeluje u cis i trans interakcijama. To omogućuje staničnu komunikaciju i signalizaciju. Osim toga, gangliozidi su ključni za organizaciju čvorova i paranoda u mijeliniziranim vlaknima i za osiguravanje pravilne organizacije adhezijskih molekula. Oni služe i kao receptori, primjerice GM1 služi kao ko-receptor za faktor rasta fibroblasta 2 (FGF2, engl. *fibroblast growth factor 2*) na stanicama koje nemaju heparan sulfat proteoglikane (65).

Zbog brojnih uloga gangliozida, bilo kakve nepravilnosti u njihovoj ekspresiji, koncentraciji ili metabolizmu mogu pridonijeti slijedu događaja koji kulminira neurodegeneracijom. Oni su ključni za neuralni razvoj i regeneraciju te njihova disregulacija može dovesti do različitih neuroloških poremećaja (66).

## 1.6. Sijalotransferaze

Sijalotransferaze su transmembranski glikoproteini tipa II te predstavljaju ključnu skupinu enzima uključenih u biosintezu oligosaharida i glikokonjugata koji sadrže sijalinsku kiselinu (67, 68). Osim što sudjeluju u raznim biološkim funkcijama kao što su stanična komunikacija i adhezija, sijalotransferaze kataliziraju prijenos sijalinskih kiselina iz CMP-Sia1 (citidin monofosfat sijalinske kiseline) na terminalne položaje glikoproteina i glikolipida (69). Svaki od gena sijalotransferaze različito se eksprimira te može biti specifičan za određeno tkivo ili tip stanice, a razlikuju se po specifičnosti supstrata, distribuciji u tkivima i različitim biokemijskim parametrima (67).

Na temelju homologije proteinske sekvence, sijalotransferaze klasificirane su u pet obitelji glikoziltransferaza (GT) (GT29, GT38, GT42, GT52 i GT80), enzima aktivnih ugljikohidrata (CAZy). Eukariotske sijalotransferaze pripadaju obitelji CAZy GT29, a nesisavci pripadaju CAZy GT38, GT42, GT52 i GT80 (68).

Na temelju specifičnosti supstrata, postoji jedan tip galaktozid  $\alpha$ 2,6-sijalotransferaze (*St6Gal I*), šest tipova N-acetilgalaktozaminid  $\alpha$ 2,6-sijalotransferaza (*St6GalNAc I-VI*), šest tipova galaktozid  $\alpha$ 2,3-sijalotransferaza (*St3Gal I-VI*), te pet tipova  $\alpha$ 2,8-sijalotransferaza (*St8Sia I-VI*) (68).

Primarna sekvenca sijalotransferaza (ST) sastoji se od četiri glavne regije. Započinje kratkom N-terminalnom domenom smještenom u citoplazmi, usidrenom u Golgijevom aparatu. Nakon toga slijedi transmembranska regija, zatim regija „stabla“ unutar lumena Golgijevog

aparata, a završava velikom C-terminalnom katalitičkom domenom (70).

Strukture koje sadrže sijalinsku kiselinu u eukariotskim sustavima igraju važnu ulogu u raznim fiziološkim i patološkim procesima (71). Poremećaji u regulaciji gena za sijalotransferazu povezani su s brojnim bolestima, uključujući rak, neurodegenerativne poremećaje i autoimune bolesti. Zbog toga se istražuju sijalotransferaze kao potencijalne terapijske mete za prilagođavanje obrazaca sijalinizacije za liječenje ili prevenciju određenih bolesti (72).

### 1.6.1. Regulacija genske ekspresije sijalotransferaza

Aktivnost sijalotransferaza ima značajan utjecaj na ekspresiju sijaliziranih spojeva na površini stanica, utječući na obrasce glikozilacije i normalnih i tumorskih stanica. Ekspresija se razlikuje među različitim tkivima, pa čak i unutar njih (73). Ova je aktivnost primarno regulirana na razini transkripcije, što je dokazano Northern blotom i *in situ* hibridizacijom, gdje se pokazala jaka korelacija između razina ekspresije mRNA i aktivnosti enzima (67).

Molekularna osnova ekspresije gena ljudske sijalotransferaze objašnjava se kroz izolaciju i funkcionalnu karakterizaciju genomskih promotorskih regija za *hSt6Gal I* i *hSt3Gal IV* gene. Ovi geni pokazuju heterogena početna mjesta transkripcije i nemaju kanonske TATA i CCAAT okvire. Nadalje, transkripcija gena *St3Gal IV* rezultira višestrukim oblicima mRNA zbog alternativnog spajanja i upotrebe promotora (67). Regulacija specifična za epitelne stanice te diferencijacija gena *hSt3Gal IV* ukazuju na mehanizme kontrole transkripcije specifične za tkivo. (73). Primjerice, gen koji kodira *St6Gal I* proizvodi višestruke izoforme mRNA korištenjem alternativnih promotora. Ove izoforme, iako dijele identičnu regiju kodiranja, razlikuju se u svojim netranslatiranim regijama. Studije su otkrile obrasce ekspresije specifične za stanični tip i diferencijalnu regulaciju tijekom stanične diferencijacije i neoplastične transformacije. Također, dokazano je da inaktivacija određenih gena ključnih za sijalotransferazu uzrokuje niz fizioloških promjena u miševa. Na primjer, inaktivacija gena *St6Gal I* u miševa je istaknula njegovu bitnu ulogu u imunološkoj funkciji B limfocita, dok je nulta mutacija *St3Gal I* pokazala njegovu važnost u homeostazi CD8<sup>+</sup> T limfocita (67).

Sveobuhvatno gledano, u obitelji *St3Gal*, različiti transkripti *St3Gal1* i *St3Gal2* nastaju alternativnim spajanjem i različitim promotorima, dok *St3Gal3* i *St3Gal4* pokazuju jedinstvene regulacijske mehanizme. *St3Gal5* i *St3Gal6* također imaju različite regulatorne elemente.

Unutar obitelji *St6Gal*, regulacija *St6Gal1* uključuje višestruke promotore pod utjecajem onkogeni i transkripcijskih faktora. *St6Gal2*, primarno izražen u mozgu, reguliran je transkripcijskim čimbenicima koji se odnose na razvoj neurona. Transkripcije obitelji *St6GalNAc* aktiviraju specifični proteini poput CDX2 i Sp1, s dodatnim regulatornim elementima kao što su nuklearni proteini MZF1. U obitelji *St8Sia*, regulacija je pod utjecajem kemijskih spojeva, uvjeta okoline i čimbenika poput temperature i pH, koji utječu i na transkripciju i na katalitičku aktivnost (74).

### 1.7. Genetički izmijenjeni miševi *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*

Genetički izmijenjeni miševi su ključni modeli u istraživanju funkcija gena i razumijevanju bolesti. Na meti čestih istraživanja nalaze se upravo *St3Gal* ( $\beta$ -galaktozid  $\alpha$ 2,3-sijalotransferaze), velika obitelj sijalotransferaza koja obuhvaća šest podobitelji, od *ST3Gal1* do *St3Gal6*. Ovi enzimi imaju ulogu dodavanja N-acetilneuraminske kiseline (Neu5Ac) na terminalne ostatke galaktoze (Gal) N-glikana, O-glikana ili glikolipida preko  $\alpha$ 2,3-veze (75).

*St3Gal2* katalizira sijalizaciju u glikoproteinima i nekim gangliozidima, te je uključena u sintezu disaharida tipa III Gal $\beta$ 1-3GalNAc, koji se pretežno nalazi u O-glikanima i glikolipidima. *St3Gal3* radi modificiranja Lewisovog antigena tipa 1 lanca (Gal- $\beta$ 1,3-GlcNAc) te je zajedno sa *St3Gal4* i *ST3Gal6*, uključen je u sintezu N-glikana koji završavaju s Neu5Ac( $\alpha$ 2,3)Gal (75, 76).

U istraživanju kojeg su proveli Yoo i sur, 2015. godine, dokazali su da *St3Gal2/3* miševi pokazuju dismijelinizaciju obilježenu 40 % smanjenjem glavnih mijelinskih proteina, 30 % smanjenjem mijeliziranih aksona, 33 % smanjenjem debljine mijelina i molekularnim poremećajima u Ranvierovim čvorovima (77).

U cjelini, genetički izmijenjeni miševi *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* predstavljaju moćne alate za istraživanje uloge sijalotransferaza tipa 3 u fiziologiji i patofiziologiji. Njihova primjena može proširiti razumijevanje kompleksnih bioloških procesa i identificirati nove terapijske ciljeve za različite bolesti (76,77).

## 2. HIPOTEZA

- Utišavanje gena za sijalotransferaze (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) rezultirat će promjenom stupnja mijelinizacije u genetički izmijenjenim mišjim modelima u usporedbi s kontrolnim miševima divljeg tipa.

### 3. CILJEVI

- Ispitati stupanj mijelinizacije u određenim regijama genetički izmijenjenih miševa *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*.
- Ispitati razlike u stupnju mijelinizacije genetički izmijenjenih miševa i miševa divljeg tipa (WT).
- Ispitati povezanost utišavanja gena za sijalotransferaze i stupnja mijelinizacije u genetički izmijenjenim mišjim modelima.

## 4. MATERIJALI I METODE

Rad je napravljen u sklopu projekta „Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi“ za što je dobiveno rješenje Ministarstva poljoprivrede, Uprave za veterinarstvo (klasa: UP/I-322-01/14-01/96, ur. broj: 525-10/0255-15-3). Za rad s eksperimentalnim životinjama dobiveno je odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

### 4.1. Ustroj studije

Ova znanstvenoistraživačka studija pripada eksperimentalnom istraživanju slučajeva i kontrola. Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta Osijek.

### 4.2. Materijali

#### 4.2.1. Pokusne životinje

Istraživanje je provedeno na moždanim uzorcima genetički izmijenjenih miševa *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* te na mišu divljeg tipa (engl. *wild type*, WT) koji nema nikakve genetičke izmjene. Analizirana su po dva reza od svakog miša te na svakom od tih rezova obje hemisfere mozga miša.

Svi uzorci moždanog tkiva dobiveni su ljubaznošću prof. dr. sc. Ronalda L. Schnaara, School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, SAD.

#### 4.2.2. Kemikalije

U istraživanju su korištene sljedeće kemikalije:

- Izofluran (Forane, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, SAD)

- Fosfatni pufer (PBS):
  - NaCl (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD)
  - KCl (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD)
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD)
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD)
- Paraformaldehid (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, SAD)
- D (+) – saharoza (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD) pripremljena u 1x PBS puferu
- Izopentan (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD)
- Medij za kriostatsko rezanje (Tissue-Tek OCT Compound, Sakura Finetek, Tokyo, Japan)
- DeOlmos otopina:
  - 500 mL 100 mM 1×PBS (pH 7,2)
  - 300 g saharoze
  - 10 g polivinilpirolidona (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, SAD)
  - 300 ml etilenglikola (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, SAD)
  - dH<sub>2</sub>O
- Vodikov peroksid (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, SAD)
- Otopina za blokiranje – korištena tijekom imunohistokemijskog bojanja
  - 0,5g BSA (engl. *bovine serum albumine*, BSA) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD)
  - 2,5 ml kozjeg seruma
  - 125 µl tritona X-100 (Bio-Rad Hercules, CA, SAD)
  - 1×PBS
- Primarna protutijela (organizam porijekla: miš, klasa: monoklonska)
  - anti-Cux1 (Santa Cruz Biotechnology, Texas, SAD)
  - anti-SMI312 (Stenberg Monoclonals, Baltimore, MD, SAD)
  - anti-S100 (Stenberg Monoclonals, Baltimore, MD, SAD)
  - anti-GFAP (Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- Sekundarno protutijelo
  - biotinizirani kozji anti-mišji IgG (Jackson Immunoresearch lab., West Grove, PA, SAD)
- Vectastain ABC Kit Elite (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD)
- Set kemikalija za vizualizaciju (*Peroxidase Substrate System Kit* (Vector Lab,



- Burlingame, CA, SAD) koji sadrži diaminobenzidin (DAB)
- Vectamount pokrivalo (Vector Lab, Burlingame, CA, SAD)

### 4.3. Metode

#### 4.3.1. Žrtvovanje miševa

Tkiva svih miševa, osim od WT, korištena su iz arhive moždanih tkiva Laboratorija za neurobiologiju, dok su tkiva WT miševa pripremljena na način da su miševi eutanazirani u skladu s etičkim smjernicama, a prije eutanazije primijenjena je duboka anestezija izofluranom čime je osiguran izostanak patnje. Tijekom anestezije, provedena je transkardijalna perfuzija koristeći fosfatni pufer i 4 %-tni paraformaldehid. Ova tehnika služila je kako bi se isprala krv iz krvožilnog sustava i zamijenila fiksativom. Fosfatni pufer održavao je osmotsku ravnotežu, a 4 %-tni paraformaldehid korišten je za fiksaciju tkiva. Korišteno je 50 mL 1×PBS-a te se postupak ubrizgavanja ponavljao dok PBS nije zamijenio krv, zatim je kroz istu iglu ubrizgano 50 mL 4 %-tnog paraformaldehida, pH = 7,4. Nakon toga provedena je disekcija mozga koji je dodatno fiksiran u 4 %-tnom paraformaldehidu tijekom 24 sata kako bi se osigurala potpuna fiksacija svih staničnih komponenti.

#### 4.3.2. Krioprotekcija uzoraka

Krioprotekcija uzoraka je ključni postupak u očuvanju i pripremi uzoraka za daljnju analizu. Mozak miša stavljen je u 30 %-tnu otopinu saharoze, 24 sata. Saharoza djeluje kao krioprotektant koji štiti stanice i tkiva od stvaranja leda i posljedičnih oštećenja tijekom smrzavanja. Zatim su uzorci zamrznuti u pothlađenom izopentanu čija svojstva omogućuju brzo smrzavanje uzoraka, smanjujući mogućnost stvaranja velikih kristala leda koji mogu oštetiti stanične strukture. Nakon smrzavanja, uzorci su pohranjeni na temperaturi od -80 °C do daljnje obrade na kriostatu, a rezovi koji su čuvani duži period, stavljeni su u DeOlmos otopinu i pohranjeni na -20 °C.

### 4.3.3. Rezanje na kriostatu i priprema rezova

Prije rezanja uzorci su se morali uklopiti u medij za kriostatsko rezanje kako bi se stabiliziralo tkivo i olakšalo precizno rezanje na vrlo niskim temperaturama. Korištenjem kriostata (Leica, CM3050S, Germany) tanki uzorci mozga debljine 35  $\mu\text{m}$  rezani su pri  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakon rezanja, rezovi su prikupljeni u otopinu  $1\times\text{PBS}$ -a u polistirenskim pločicama s 24 jažice (Costar 24-well Plates, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i čuvani na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  kako bi se napravila imunohistokemijska analiza na plutajućim rezovima (engl. *free-floating*). Ova metoda omogućuje detaljnu analizu tkiva uz očuvanje njihove strukture i funkcionalnosti.

### 4.3.4. Imunohistokemijska analiza

Za imunohistokemijsku analizu korišteni su slobodno plutajući rezovi koji su stavljeni u 0,2 % otopinu vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) u  $1\times\text{PBS}$ -u 30 min kako bi se blokirale aktivnosti endogenih peroksidaza u tkivu mozga. Zatim je uslijedilo blokiranje (engl. *blocking*) u otopini 1 %-tnog BSA i 5 %-tnog kozjeg seruma u  $1\times\text{PBS}$ -u tijekom dva sata na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  kako bi se smanjilo nespecifično vezanje. Nakon blokiranja rezovi su inkubirani u primarnim protutijelima (u razrjeđenjima: Cux1 1:500, SMI312 1:5000, S100 1:500, GFAP 1:1000) preko noći na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  uz blago miješanje.

Nakon inkubacije s primarnim protutijelima, uzorci su isprani tri puta po deset minuta u  $1\times\text{PBS}$ -u na sobnoj temperaturi kako bi se uklonio višak primarnog protutijela. Potom je uslijedila inkubacija sekundarnim protutijelom (biotinilirani kozji anti-mišji IgG) razrijeđenim u otopini za blokiranje. Inkubiranje je trajalo dva sata na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  uz blago miješanje te su nakon toga uzorci ponovno isprani tri puta po deset minuta u  $1\times\text{PBS}$ -u na sobnoj temperaturi. Nakon toga, rezovi su inkubirani u "ABC" reagensu iz seta kemikalija "Vectastain ABC Kit Elite" dva sata na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  uz stalno miješanje kako bi se omogućila vizualizacija antitijela. Ovaj tercijarni kompleks sastoji se od avidina i biotiniliranog HRP-a pa se tijekom inkubacije avidin veže na biotinilirano sekundarno protutijelo što omogućuje detekciju specifičnih antigensko-protutijelskih reakcija. Nakon inkubacije, rezovi su ponovno ispirani tri puta po 10 minuta u  $1\times\text{PBS}$ -u kako bi se uklonio višak reagensa. Potom su rezovi inkubirani pet minuta sustavom supstrata peroksidaze, koji sadrži diaminobenzidin (DAB) kao supstrat za peroksidazu. Peroksidaza katalizira reakciju koja proizvodi netopljivi sivo obojeni produkt, što ukazuje na

prisutnost reaktivnih protutijela. Opet slijedi ispiranje tri puta po 10 minuta u  $1\times$ PBS-u. Zatim slijedi postupak stavljanja na stakalca gdje su rezovi stavljeni na sijalizirana stakalca, osušeni i pokriveni pokrivalom.

#### 4.3.5. Analiza uzoraka

Dobiveni uzorci su nakon imunohistokemije fotografirani koristeći mikroskop (Carl Zeiss, Axioskop 2 MOT, Jena, Germany) s pripadajućim aparatom za fotografiranje (Olympus DP70, Optical Olympus, Japan). Analiza snimljenih fotografija provela se pomoću računalnog programa Image J 1.48v, koji je slobodno dostupan na mrežnoj stranici <http://imagej.nih.gov/ij>. Postupak koji je korišten za ImageJ je kako slijedi:

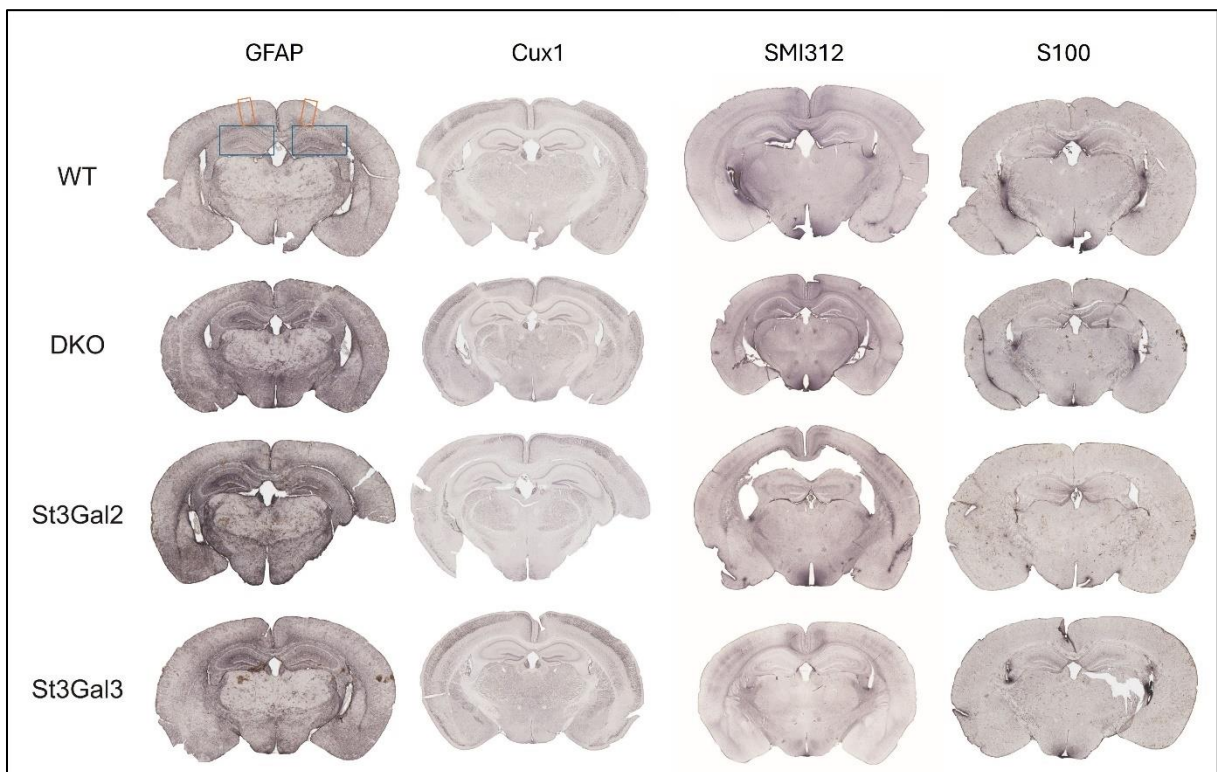
- Otvaranje željene fotografije u programu (File > Open)
  - Pretvorba slike u 8-bitni zapis (Image > Type > 8-bit)
  - Podešavanje praga intenziteta obojenosti (engl. *threshold*) (Image > Adjust > Threshold) gdje je za najmanji prag odabrana vrijednost 0, dok se najveći prag prilagođavao dok se ne označe sva željena područja gdje se nalazi protutijelo
  - Na temelju odabranog „thresholda“ postavljena je crna pozadina (Apply)
  - Izmjerena su svojstva slike, odnosno „Area“ (količina piksela koja odgovara površini pozitivnog obojenja protutijelom) (Analyze > Measure)
  - Dobiveni rezultati kao i fotografija nakon obrade su spremljeni (File > Save As)
- Kvantifikacijom uzoraka dobiveni rezultati su međusobno uspoređivani i obrađeni statističkim metodama.

#### 4.3.6. Statistička analiza

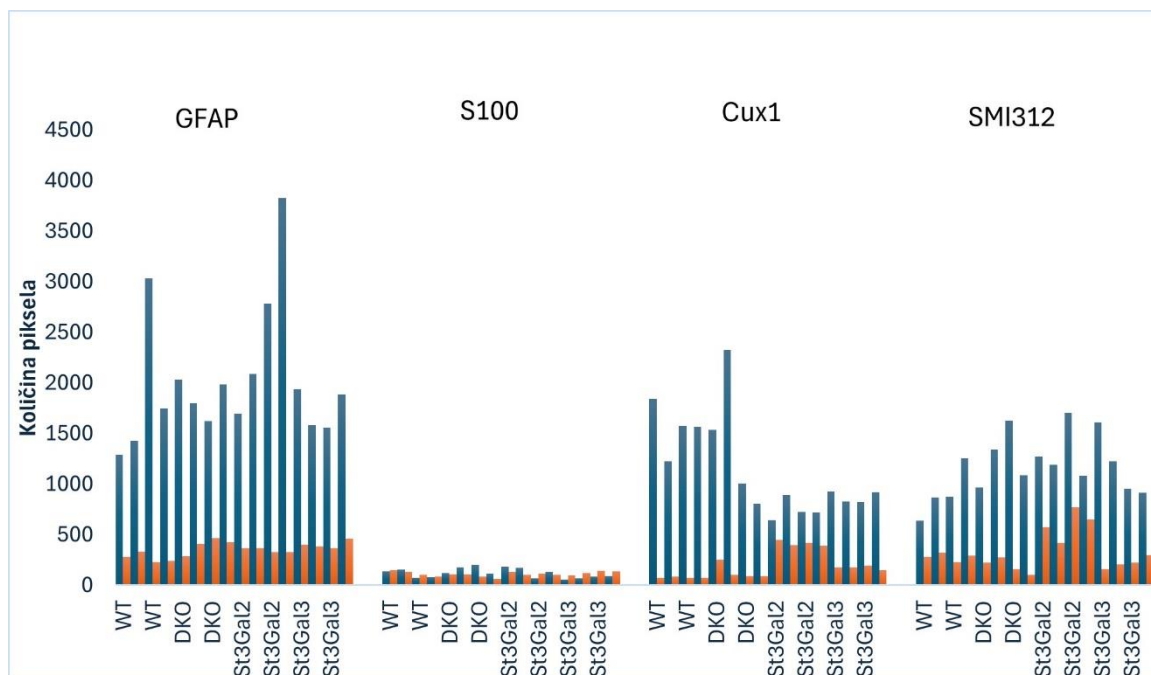
Pomoću računalnog programa Statistica 14 (v14.1.0; TIBCO Software Inc, SAD) napravljene su statističke analize. Zbog male količine podataka u uzorku, za testiranje razlike između skupina koristio se Mann-Whitney U test. Statistička značajnost određena je na  $p < 0,05$ .

## 5. REZULTATI

Mikroskopski snimljene fotografije prikazane na slici 3. predstavljaju primjere fotografija za svaki marker (protutijela koja su korištena) i svaki tip miša koje su analizirane. Za statističku obradu, analizirana su po dva reza od svakog miša te na svakom od tih rezova obje hemisfere mozga miša (hipokampus i moždana kora). Svi dobiveni podaci kvantifikacije prikazani su u na slici 4. kako bi se vizualno predočila razlika između markera.



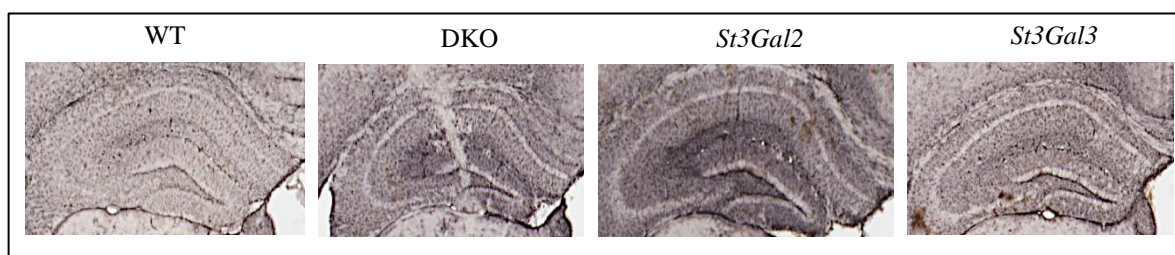
**Slika 3.** Prikaz reprezentativnih fotografija za svakog miša i za svako protutijelo. Na prvoj slici počevši s lijeve strane označena su područja koja su uzeta za kvantifikaciju (označena područja pripadaju hipokampusu i moždanoj kori). U gornjem dijelu slike su nazivi protutijela (GFAP, S100, Cux1, SMI312), dok su s lijeve strane navedeni tipovi miševa (WT – divlji tip miša, DKO, *St3Gal2* i *St3Gal3* – genetički izmijenjeni miševi).



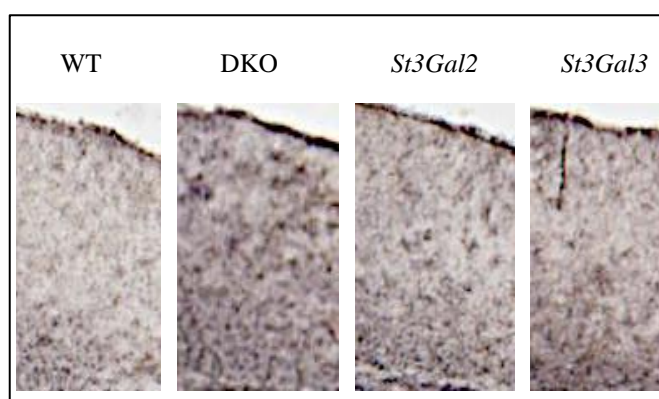
**Slika 4.** Grafički prikaz svih podataka dobivenih kvantifikacijom kako bi se postigla vizualna predodžba razlika između pojedinih markera. Količina piksela odgovara površini pozitivnog obojenja protutijelima. U gornjem dijelu grafa su nazivi protutijela (GFAP, S100, Cux1, SMI312), dok su donjem dijelu navedeni tipovi miševa (WT – divlji tip miša, DKO, *St3Gal2* i *St3Gal3* – genetički izmijenjeni miševi).

## 5.1. Analiza izražaja markera GFAP u hipokampusu i moždanoj kori

Imunohistokemijski obrađene te mikroskopski snimljene fotografije prikazane na slici 5. i slici 6. analizirane su pomoću programa ImageJ te su dobiveni podaci (prikazani kao aritmetička sredina vrijednosti količine piksela) i njima pripadajući medijani i standardne devijacije navedeni u tablici 5.1. Kako bi se međusobno usporedili podaci, korišten je Mann-Whitney U test gdje su uspoređivani prvo genetički izmijenjeni miševi s WT mišem, a zatim i sami genetički izmijenjeni miševi međusobno te su statističke značajnosti među miševima (ukoliko postoje) prikazane na Slici 7.



**Slika 5.** Imunohistokemijsko bojanje GFAP markera u dijelu hipokampusa kod divljeg tipa (WT) i genetički izmijenjenih mišjih modela (DKO, *St3Gal2*, *St3Gal3*).

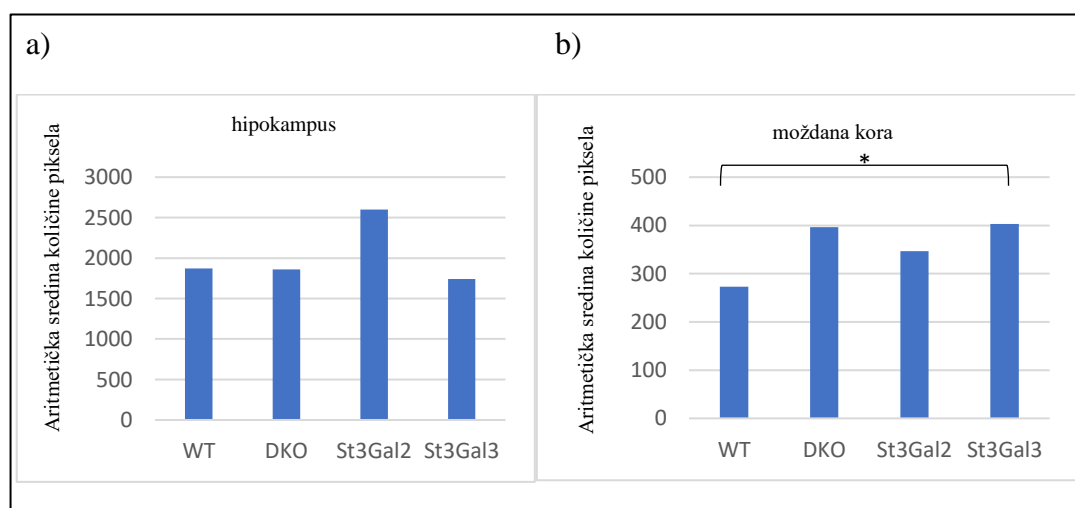


**Slika 6.** Imunohistokemijsko bojanje GFAP markera u moždanoj kori kod divljeg tipa (WT) i genetički izmijenjenih mišjih modela (DKO, *St3Gal2*, *St3Gal3*).

**Tablica 5.1.** Deskriptivna statistika vrijednosti količine piksela koje odgovaraju površini pozitivnog obojenja protutijelom GFAP u hipokampusu i u moždanoj kori različitih vrsta miševa dobivene ImageJ-om.

Regija	Skupina miša	Aritmetička sredina količine piksela	Medijan	Standardna devijacija
hipokampus	WT	1873,50	1586,50	794,50
	DKO	1858,50	1892,00	187,43
	<i>St3Gal2</i>	2600,00	2438,50	932,36
	<i>St3Gal3</i>	1741,75	1735,00	197,23
moždana kora	WT	273,00	263,00	46,49
	DKO	396,25	416,50	77,36
	<i>St3Gal2</i>	346,75	346,50	24,01
	<i>St3Gal3</i>	402,75	392,50	39,08

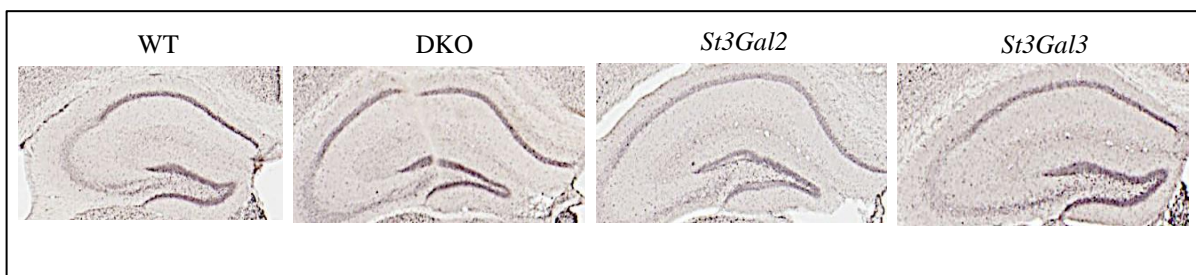
WT - divlji tip, DKO - dvostruki knockout, *St3Gal2* i *St3Gal3* – genetički modificirani miševi sa isključenim genom za sintezu ST  $\beta$ -galaktozid  $\alpha$ 2,3-sijalotransferaze 2, odnosno 3.



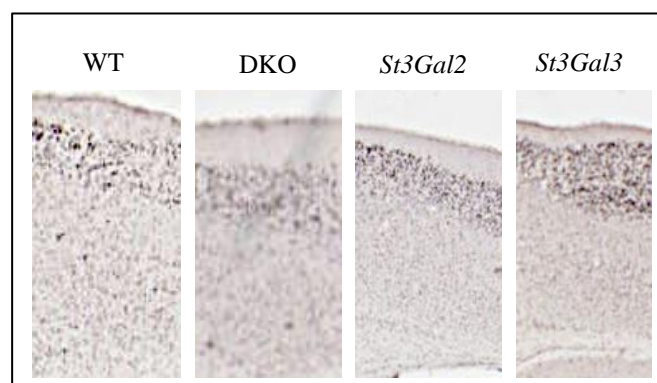
**Slika 7.** Grafički prikaz GFAP markera u hipokampusu (a) i u moždanoj kori (b). Na slici je stavljena zvjezdica (\*) između skupina ukoliko postoji statistički značajna razlika čija je p vrijednost manja od 0,05.

## 5.2. Analiza izražaja markera Cux1 u hipokampusu i moždanoj kori

Imunohistokemijski obrađene te mikroskopski snimljene fotografije prikazane na slici 8. i slici 9. analizirane su pomoću programa ImageJ te su dobiveni podaci (prikazani kao aritmetička sredina vrijednosti količine piksela) i njima pripadajući medijani i standardne devijacije navedeni u tablici 5.2. Kako bi se međusobno usporedili podaci, korišten je Mann-Whitney U test gdje su uspoređivani prvo genetički izmijenjeni miševi s WT mišem, a zatim i sami genetički miševi međusobno te su statističke značajnosti među miševima (ukoliko postoje) prikazane na slici 10.



**Slika 8.** Imunohistokemijsko bojanje Cux1 markera u dijelu hipokampusu kod divljeg tipa (WT) i genetički izmijenjenih mišjih modela (DKO, *St3Gal2*, *St3Gal3*).



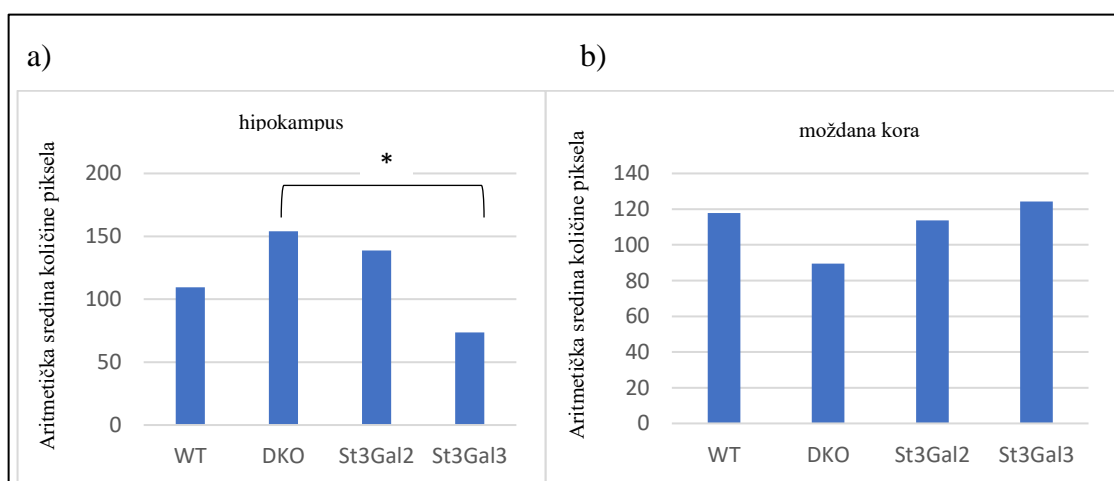
**Slika 9.** Imunohistokemijska bojanje Cux1 markera u moždanoj kori kod divljeg tipa (WT) i genetički izmijenjenih mišjih modela (DKO, *St3Gal2*, *St3Gal3*).



**Tablica 5.2.** Deskriptivna statistika vrijednosti količine piksela koje odgovaraju površini pozitivnog obojenja protutijelom Cux1 u hipokampusu i u moždanoj kori različitih vrsta miševa dobivene ImageJ-om.

Regija	Skupina miša	Aritmetička sredina količine piksela	Medijan	Standardna devijacija
hipokampus	WT	109,50	106,50	40,58
	DKO	154,00	150,00	42,15
	<i>St3Gal2</i>	138,75	151,00	53,69
	<i>St3Gal3</i>	73,50	74,50	16,66
moždana kora	WT	117,75	119,50	28,76
	DKO	89,50	95,00	22,81
	<i>St3Gal2</i>	113,75	110,50	13,57
	<i>St3Gal3</i>	124,25	128,00	20,56

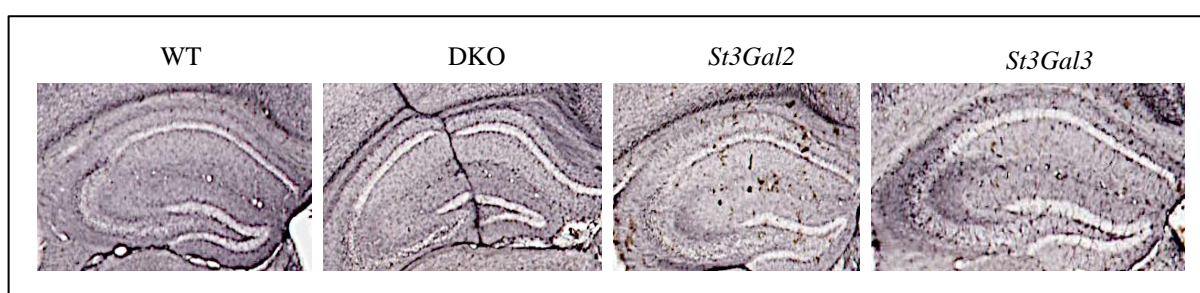
WT - divlji tip, DKO - dvostruki knockout, *St3Gal2* i *St3Gal3* – genetički modificirani miševi sa isključenim genom za sintezu ST  $\beta$ -galaktozid  $\alpha$ 2,3-sijalotransferaze 2, odnosno 3.



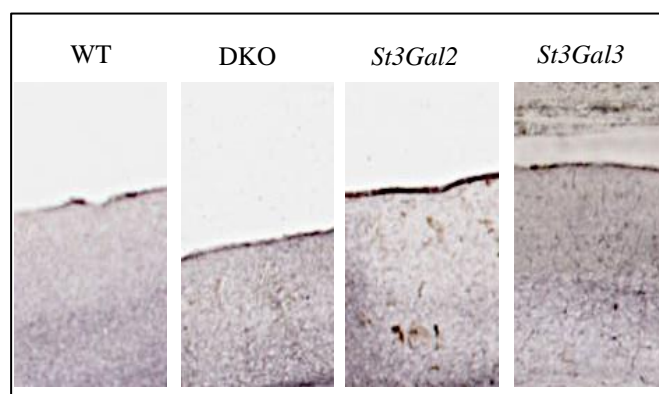
**Slika 10.** Grafički prikaz Cux1 markera u hipokampusu (a) i u moždanoj kori (b). Na slici je stavljena zvjezdica (\*) između skupina ukoliko postoji statistički značajna razlika čija je p vrijednost manja od 0,05.

### 5.3. Analiza izražaja markera SMI312 u hipokampusu i moždanoj kori

Imunohistokemijski obrađene te mikroskopski snimljene fotografije prikazane na Slici 11. i Slici 12. analizirane su pomoću programa ImageJ te su dobiveni podaci (prikazani kao aritmetička sredina vrijednosti količine piksela) i njima pripadajući medijani i standardne devijacije navedeni u Tablici 5.3. Kako bi se međusobno usporedili podaci, korišten je Mann-Whitney U test gdje su uspoređivani prvo genetički izmijenjeni miševi s WT mišem, a zatim i sami genetički miševi međusobno te su statističke značajnosti među miševima (ukoliko postoje) prikazane na Slici 13.



**Slika 11.** Imunohistokemijsko bojanje SMI312 markera u dijelu hipokampusa kod divljeg tipa (WT) i genetički izmijenjenih mišjih modela (DKO, *St3Gal2*, *St3Gal3*).

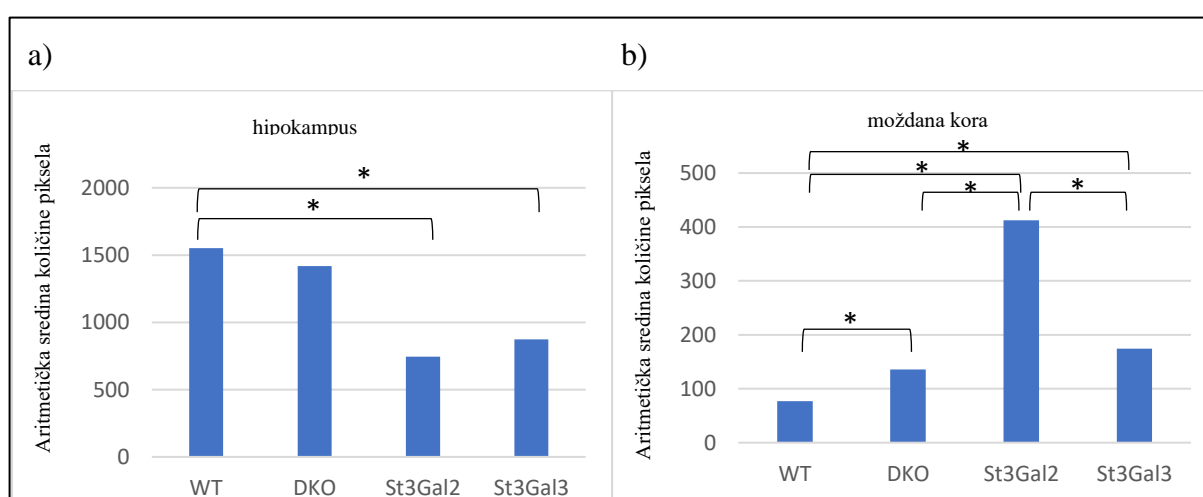


**Slika 12.** Imunohistokemijsko bojanje SMI312 markera u moždanoj kori kod divljeg tipa (WT) i genetički izmijenjenih mišjih modela (DKO, *St3Gal2*, *St3Gal3*).

**Tablica 5.3.** Deskriptivna statistika vrijednosti količine piksela koje odgovaraju površini pozitivnog obojenja protutijelom SMI312 u hipokampusu i u moždanoj kori različitih vrsta miševa dobivene ImageJ-om.

Regija	Skupina miša	Aritmetička sredina količine piksela	Medijan	Standardna devijacija
hipokampus	WT	1552,00	1569,00	251,48
	DKO	1418,00	1271,00	677,78
	<i>St3Gal2</i>	745,75	723,00	103,46
	<i>St3Gal3</i>	873,50	874,00	57,784
moždana kora	WT	77,25	74,50	7,27
	DKO	135,50	99,00	77,89
	<i>St3Gal2</i>	412,50	406,00	26,41
	<i>St3Gal3</i>	174,25	177,50	19,99

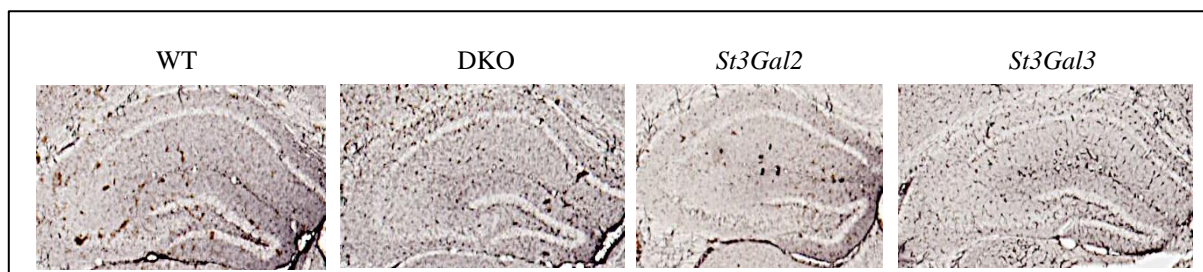
WT - divlji tip, DKO - dvostruki knockout, *St3Gal2* i *St3Gal3* – genetički modificirani miševi sa isključenim genom za sintezu ST  $\beta$ -galaktozid  $\alpha$ 2,3-sijalotransferaze 2, odnosno 3.



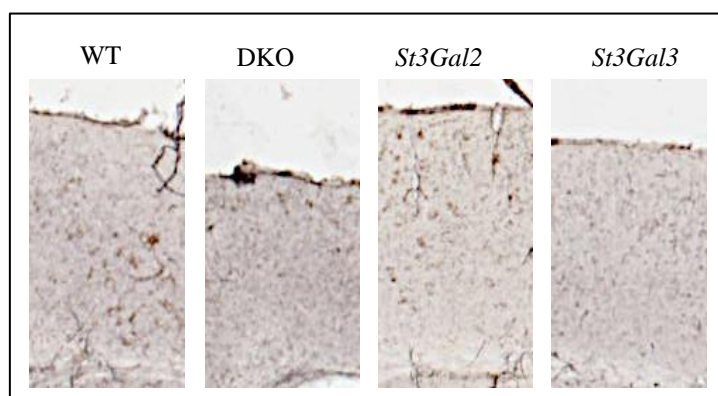
**Slika 13.** Grafički prikaz SMI312 markera u hipokampusu (a) i u moždanoj kori (b). Na slici je stavljena zvjezdica (\*) između skupina ukoliko postoji statistički značajna razlika čija je p vrijednost manja od 0,05.

#### 5.4. Analiza izražaja markera S100 u hipokampusu i moždanoj kori

Imunohistokemijski obrađene te mikroskopski snimljene fotografije prikazane na Slici 14. i Slici 15. analizirane su pomoću programa ImageJ te su dobiveni podaci (prikazani kao aritmetička sredina vrijednosti količine piksela) i njima pripadajući medijani i standardne devijacije navedeni u Tablici 5.4. Kako bi se međusobno usporedili podaci, korišten je Mann-Whitney U test gdje su uspoređivani prvo genetički izmijenjeni miševi s WT mišem, a zatim i sami genetički miševi međusobno te su statističke značajnosti među miševima (ukoliko postoje) prikazane na Slici 16.



**Slika 14.** Imunohistokemijsko bojanje S100 markera u dijelu hipokampusa kod divljeg tipa (WT) i genetički izmijenjenih mišjih modela (DKO, *St3Gal2*, *St3Gal3*).

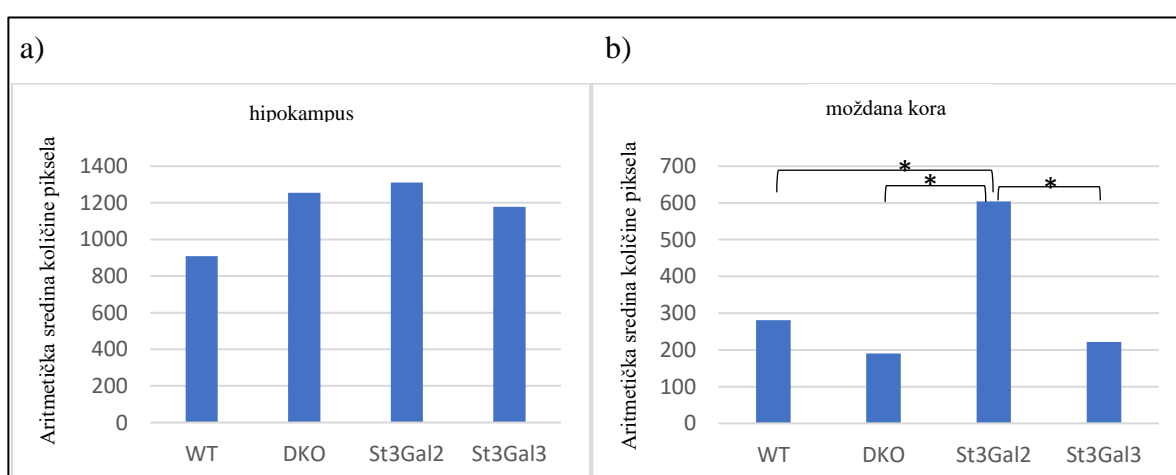


**Slika 15.** Imunohistokemijsko bojanje S100 markera u moždanoj kori kod divljeg tipa (WT) i genetički izmijenjenih mišjih modela (DKO, *St3Gal2*, *St3Gal3*).

**Tablica 5.4.** Deskriptivna statistika vrijednosti količine piksela koje odgovaraju površini pozitivnog obojenja protutijelom S100 u hipokampusu i u moždanoj kori različitih vrsta miševa dobivene ImageJ-om.

Regija	Skupina miša	Aritmetička sredina količine piksela	Medijan	Standardna devijacija
hipokampus	WT	909,00	871,50	253,98
	DKO	1255,50	1213,50	293,27
	<i>St3Gal2</i>	1309,75	1229,00	271,43
	<i>St3Gal3</i>	1177,50	1091,00	319,72
moždana kora	WT	281,00	286,00	37,51
	DKO	190,50	193,00	76,03
	<i>St3Gal2</i>	604,00	613,50	146,77
	<i>St3Gal3</i>	222,00	214,50	55,24

WT - divlji tip, DKO - dvostruki knockout, *St3Gal2* i *St3Gal3* – genetički modificirani miševi sa isključenim genom za sintezu ST  $\beta$ -galaktozid  $\alpha$ 2,3-sijalotransferaze 2, odnosno 3.



**Slika 16.** Grafički prikaz S100 markera u hipokampusu (a) i u moždanoj kori (b). Na slici je stavljena zvjezdica (\*) između skupina ukoliko postoji statistički značajna razlika čija je p vrijednost manja od 0,05.

## 6. RASPRAVA

Genetički izmijenjeni mišji modeli, kao što su *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* često su korišteni u istraživanjima zbog njihove povezanosti s dismijelinizirajućim i demijelinizirajućim bolestima (75, 77). Dosadašnja saznanja pokazuju da ove genetičke izmjene mogu utjecati na brojne procese u mijelinu, uključujući njegovu građu i stvaranje (77). Zbog ozbiljnosti bolesti do kojih mogu dovesti poremećaji mijelinizacije, nužna su daljnja istraživanja kako bi se otkrili uzroci i pronašle adekvatne terapije (72).

U ovom istraživanju korišteni su markeri GFAP, Cux1, SMI312 i S100. U fokusu je bilo ispitati izražaj tih markera u hipokampusu i moždanoj kori te na taj način ispitati mijenja li se stupanj mijelinizacije u određenim regijama genetički izmijenjenih miševa *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*. Miševi su međusobno uspoređivani, prvenstveno WT sa svakim genetički izmijenjenim mišem, no radi dodatnog analiziranja, uspoređivani su i genetički izmijenjeni miševi međusobno kako bi se utvrdilo postoji li razlika između njih. Na taj način može se pretpostaviti povezanost utišavanja gena za sijalotransferaze i izražaja pojedinih markera te povezati ga sa stupnjem mijelinizacije. Naravno, kako bi istraživanje bilo pouzdanije, potrebno je uzeti veći broj miševa da bi se povećala točnost i otklonila moguća slučajnost rezultata. Također, moguće poboljšanje rada na temu mijelinizacije uključivalo bi markere koji su specifičniji za mijelin kao što su to MAG, MBP ili PLP.

### 6.1. Izražaj GFAP markera

GFAP je često korišten marker za astrocitnu aktivaciju, a njegova se ekspresija snažno povećava u patološkim stanjima kao što su neurodegeneracija i ozljede moždanog tkiva. GFAP je prisutan u većini astrocita SŽS-a, ali se njegova ekspresija razlikuje između različitih regija mozga. Osnovna funkcija mu je mehanička podrška astrocitima omogućujući im da zadrže svoj oblik i integritet te na taj način pružaju podršku oligodendrocitima, stanicama koje stvaraju mijelin. Druga važna uloga ovog proteina je održavanje strukture krvno-moždane barijere koja štiti mijelin od oštećenja (78). Stoga, iako GFAP nema direktnu ulogu u procesu mijelinizacije, on je zbog ovih razloga vrlo bitan dio u formiranju i stvaranju mijelina.

Analizirajući izražaj ovog markera u hipokampusu nisu primijećene statističke značajnosti među miševima. No, u moždanoj kori je primijećena statistička značajnost između

WT i *St3Gal3* genetički izmijenjenog miša (povećanje izražaja GFAP kod *St3Gal3*) što govori u prilog tome da ovaj gen može utjecati na ekspresiju glijalnog fibrilarnog proteina. Između ostalih miševa u moždanoj kori nije uočena statistička značajnost. Razlog tome može biti što je ovaj marker varijabilan u mozgu odnosno njegova prisutnost se razlikuje između različitih struktura mozga i čak unutar istog područja (79).

## 6.2. Izražaj Cux1 markera

Cux1 marker je ključan transkripcijski faktor koji ima bitnu ulogu u razvoju i funkciji kortikalnih neurona, kao i u procesima tumorigeneze. Brojna istraživanja su pokazala uključenost Cux1 gena u raznolike razvojne procese kao što su organogeneza i neuronska specifikacija (80). Iako nije uočena direktna povezanost s mijelinizacijom, poznato je da Cux1 sudjeluje u diferencijaciji neurona i razvoju aksona što može indirektno utjecati na proces mijelinizacije (81).

Analizom izražaja ovog markera u hipokampusu i moždanoj kori različitih vrsta miševa primijećeno je da je puno manji broj pozitivno obojenih stanica u usporedbi s drugim markerima te da razlike među miševima nisu velike. Ipak, postoji statistička značajnost u hipokampusu između DKO i *St3Gal2* (smanjenje izražaja Cux1 kod *St3Gal2*), dok među ostalim miševima ne postoji značajna razlika, kako u hipokampusu tako i u moždanoj kori. Razlog tome se može pripisati manjem utjecaju ovog markera na proces mijelinizacije.

## 6.3. Izražaj SMI312 markera

Iako SMI312 nije izravno povezan s mijelinizacijom, to je protutijelo koje je specifično za aksonske neurofilamente, a aksoni su povezani s mijelinizacijom, odnosno obavijanjem mijelina oko njega (2, 82). SMI312 se prvenstveno koristi za identifikaciju i analizu neurofilamenata i proučavanje morfologije aksona, no može biti od značenja i u istraživanju mijelinizacije upravo zbog važnosti strukture i stabilnosti aksona u ovom procesu (82).

U usporedbi s ostalim markerima koji su istraživani u ovom radu, može se reći da je kod ovog markera primijećeno najviše statistički značajnih razlika između miševa. Konkretno, u hipokampusu postoji statistički značajna razlika između WT i *St3Gal2*, kao i između WT i

*St3Gal3* (smanjenje izražaja SMI312 kod *St3Gal2* i *St3Gal3*). U moždanoj kori postoji statistički značajna razlika između WT i svih genetički izmijenjenih miševa (povećanje izražaja SMI312 kod DKO, *St3Gal2*, *St3Gal3*) te, s obzirom na značajan odskok rezultata u *St3Gal2*, postoji značajna razlika između *St3Gal2* i svih ostalih miševa (WT, DKO, *St3Gal3*). Stoga, može se pretpostaviti kako sve navedene genetičke izmijene u sijalotransferazama utječu na ekspresiju SMI312 markera, a najviše utječe gen *St3Gal2*.

#### 6.4. Izražaj S100 markera

S100 obitelj pripada niskomolekularnim proteinima te su glavna komponenta citosola u SŽS-u, a pretežno se nalaze u glija stanicama. Upravo zato što su prisutni u glija stanicama, kao što su primjerice oligodendrociti (a mijelin je građen od oligodendrocita u SŽS-u) oni mogu biti usko povezani s procesom mijelinizacije (83).

Analizom ovog markera u hipokampusu nisu zabilježene nikakve statistički značajne razlike. Uspoređujući WT u moždanoj kori s ostalim miševima primijećena je statistički značajna razlika sa *St3Gal2* genetički izmijenjenim mišem (povećanje izražaja S100 kod *St3Gal2*). Međusobnom usporedbom genetički izmijenjenih miševa pronašla se razlika između DKO i *St3Gal2* te *St3Gal2* i *St3Gal3*. Najveće promjene su u *St3Gal2* genu te se može pretpostaviti kako on ima najveći utjecaj na izražaj S100 markera u usporedbi s ostalim genima za sijalotransferazu.

#### 6.5. Procjena stupnja mijelinizacije

Iako se stupanj mijelinizacije ne može direktno odrediti, analiza izražaja specifičnih markera može pružiti vrijedne informacije koje nam pomažu u razumijevanju ovog procesa. U ovom radu su predstavljeni podaci o izražaju nekoliko markera (GFAP, Cux1, SMI312 i S100) koji indirektno mogu ukazivati na promjene u procesu mijelinizacije. Primjerice, značajnost koja je zabilježena između WT i *St3Gal3* u GFAP markeru može ukazivati na povećanje stupnja mijelinizacije u moždanoj kori zbog genetičkih izmjena u *St3Gal3* miševima (veća ekspresija GFAP markera može značiti bolju podršku oligodendrocitima i poboljšanu mijelinizaciju). Suprotno tome, u Cux1 markeru nije zabilježena razlika između divljih tipova i genetičkih



izmijenjenih miševa te se može zaključiti da nije došlo do značajnih promjena u stupnju mijelinizacije. Kod SMI312 markera postoje razlike između divljih tipova i genetički izmijenjenih miševa i u hipokampusu i u moždanoj kori, pa se može pretpostaviti kako se stupanj mijelinizacije promijenio u usporedbi s kontrolnim mišem. U hipokampusu dolazi do smanjenja izražaja SMI312 kod *St3Gal2* i *St3Gal3*, pa se može pretpostaviti da se stupanj mijelinizacije smanjio, dok u korteksu dolazi do povećanja izražaja kod DKO, *St3Gal2*, *St3Gal3* pa se pretpostavlja da se povećava i stupanj mijelinizacije zbog poboljšane stabilnosti i strukture aksona, a time i potencijalno bolji proces mijelinizacije. Kod S100 markera u usporedbi s WT mišem, postoji značajnost kod *St3Gal2* što također ukazuje na promjenu u stupnju mijelinizacije kod ovog genetički izmijenjenog miša (može se pretpostaviti da se radi o povećanju).

U svrhu boljeg razumijevanja ovih promjena preporučuje se korištenje preciznije kvantitativne analize izražaja markera. Kako bi se istraživanje poboljšalo, moguće je praćenje funkcionalnih posljedica promjena u izražaju ovih markera na neuronsku aktivnost i ponašanje kroz duži vremenski period pomoću naprednih tehnika oslikavanja poput IMS-a (engl. *imaging mass spectrometry*). Također, preporučuje se uključivanje drugih markera mijelinizacije (npr. MBP, MAG) za potvrdu rezultata.

## 7. ZAKLJUČAK

- U usporedbi genetički izmijenjenih miševa s mišem divljeg tipa GFAP marker pokazao je statistički značajnu razliku sa *St3Gal3* u moždanoj kori. Cux1 nije pokazao nikakve statističke značajnosti u usporedbi s divljim tipom. SMI312 u usporedbi s divljim tipom pokazao je značajnosti sa *St3Gal2* i *St3Gal3* u hipokampusu te s DKO, *St3Gal2* i *St3Gal3* u moždanoj kori, a S100 samo sa *St3Gal2* u moždanoj kori.
- Pretpostavlja se da kod miševa kod kojih je došlo do promjene u ekspresiji markera postoji i promjena u stupnju mijelinizacije.
- Izražaj markera varira ovisno o regijama u kojoj je isti zastupljen.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Ispitati kako genetičke izmjene u miševima, konkretno u genima *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*, utječu na ekspresiju markera povezanih s mijelinizacijom u hipokampusu i moždanoj kori mozga. Usporediti ekspresiju tih markera između divljeg tipa i genetički izmijenjenih miševa, utvrditi postoji li statistička značajnost te na temelju toga procijeniti stupanj mijelinizacije kod različitih genetički izmijenjenih miševa.

**Nacrt studije:** Studija je provedena kao eksperimentalno istraživanje slučajeva i kontrola.

**Materijali i metode:** Ispitanici u ovom istraživanju bili su genetički izmijenjeni miševi (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i miš divljeg tipa. Analiza je provedena na moždanim uzorcima, gdje su analizirana po dva reza iz obje hemisfere svakog miša, konkretno hipokampus i moždana kora. Upotrijebljeni markeri su GFAP, Cux1, SMI312 i S100. Statistička analiza je provedena pomoću Mann-Whitney U testa, s razinom značajnosti postavljenom na  $p < 0,05$ .

**Rezultati:** Genetički izmijenjeni miševi pokazali su promjene u ekspresiji GFAP, SMI312 i S100 markera u usporedbi s mišem divljeg tipa, dok je u Cux1 vidljiva promjena samo u usporedbi DKO sa *St3Gal3*. Najviše promjena uočeno je kod SMI312 markera. Ovi rezultati pokazuju da genske modifikacije mogu utjecati na neurološke procese povezane s mijelinizacijom, no kod svakog markera drugačije.

**Zaključak:** Genetičke izmjene u miševima *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* mogu utjecati na ekspresiju GFAP, Cux1, SMI312 i S100 markera, što može dovesti do promjena u mijelinizaciji.

**Ključne riječi:** genetičke izmjene, mijelinizacija, hipokampus, moždana kora

## 9. SUMMARY

### Assessment of myelination in the brains of genetically modified mice

#### *St3Gal2, St3Gal3 and St3Gal2/3*

**Research objective:** To examine how genetic changes in mice, specifically in the genes *St3Gal2*, *St3Gal3* and *St3Gal2/3*, affect the expression of markers related to myelination in the hippocampus and cerebral cortex. To compare the expression of these markers between wild-type mouse and genetically modified mice, to determine whether there is statistical significance, and based on this to assess myelination in different genetically modified mice.

**Study design:** The study was conducted as an experimental case-control study.

**Materials and methods:** Subjects in this study were genetically modified mice (*St3Gal2*, *St3Gal3* and *St3Gal2/3*) and wild-type mouse. The analysis was performed on brain samples, where two section from both hemispheres of each mouse were analyzed, specifically the hippocampus and the cortex. The used markers are GFAP, Cux1, SMI312 and S100. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test, with the significance level set at  $p < 0.05$ .

**Results:** Genetically modified mice showed changes in the expression of GFAP, SMI312 and S100 compared to wild-type mouse, while a change in Cux1 was visible only in the comparison of DKO and *St3Gal3*. The most changes were noticed in the SMI312 marker. These results show that genetic modifications may affect the neurological processes associated with myelination, but differently for each marker.

**Conclusion:** Genetic alterations in *St3Gal2*, *St3Gal3* and *St3Gal2/3* mice can affect the expression of GFAP, Cux1, SMI312 and S100 markers, which can lead to changes in myelination.

**Key words:** genetic variation, myelination, hippocampus, cortex

## 10. LITERATURA

1. Salzer JL, Zalc B. Myelination. *Curr Biol*. 2016;24;26(20):R971-5.
2. Kister A, Kister I. Overview of myelin, major myelin lipids, and myelin-associated proteins. *Front Chem*. 2023;21;10:1041961.
3. Maliha F, Adnan A. Mechanical responses of a single myelin layer: A molecular simulation study. *Biomolecules*. 2023;4;13(10):1525.
4. Bercury KK, Macklin WB. Dynamics and mechanisms of CNS myelination. *Dev Cell*. 2015;23;32(4):447-58.
5. Kinney HC, Volpe JJ. Myelination events. In *Volpe's neurology of the newborn*. Elsevier; 2018.;176-188.
6. Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, Simons M. Myelin in the central nervous system: structure, function, and pathology. *Physiol Rev*. 2019;1;99(3):1381-431.
7. Boullerne AI. The history of myelin. *Exp Neurol*. 2016;1;283:431-45.
8. Simons M, Nave KA. Oligodendrocytes: myelination and axonal support. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;1;8(1):a020479.
9. Chen CZ, Neumann B, Förster S, Franklin RJ. Schwann cell remyelination of the central nervous system: why does it happen and what are the benefits?. *Open Biol*. 2021;27;11(1):200352.
10. Pham-Dinh D, Baumann N. *Biology of demyelinating diseases. Neurochemical mechanisms in disease*. Springer. 2011;537-83.
11. Mishra SK, Tiwari SP. Bioenergetics of axon integrity and its regulation by oligodendrocytes and Schwann cells. *Mol Neurobiol*. 2024;22:1-7.
12. Jahn O, Siems SB, Kusch K, Hesse D, Jung RB, Liepold T, Uecker M, Sun T, Werner HB. The CNS myelin proteome: deep profile and persistence after post-mortem delay. *Front Cell Neurosci*. 2020;19;14:239.
13. Chrast R, Saher G, Nave KA, Verheijen MH. Lipid metabolism in myelinating glial cells: lessons from human inherited disorders and mouse models. *J Lipid Res*. 2011;1;52(3):419-34.
14. Raasakka A, Kursula P. How does protein zero assemble compact myelin? *Cells*, 2020;9,1832.
15. Lüders KA, Nessler S, Kusch K, Patzig J, Jung RB, Möbius W, Nave KA, Werner HB. Maintenance of high proteolipid protein level in adult central nervous system myelin is required to preserve the integrity of myelin and axons. *Glia*. 2019;67(4):634-49.

16. Ruskamo S, Raasakka A, Pedersen JS, Martel A, Škubník K, Darwish T, Porcar L, Kursula P. Human myelin proteolipid protein structure and lipid bilayer stacking. *Cell Mol Life Sci.* 2022;79(8):419.
17. Martinsen V, Kursula P. Multiple sclerosis and myelin basic protein: Insights into protein disorder and disease. *Amino Acids.* 2022;54(1):99-109.
18. Lopez PH. Role of myelin-associated glycoprotein (siglec-4a) in the nervous system. *Glycobiology of the Nervous System.* Springer, 2014;245-62.
19. Schachner M, Bartsch U. Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin. *Glia.* 2000;15;29(2):154-65.
20. Viljetić B, Blažetić S, Labak I, Ivić V, Zjalić M, Heffer M, Balog M. Lipid Rafts: The Maestros of Normal Brain Development. *Biomolecules.* 2024;18;14(3):362.
21. Castelfranco AM, Hartline DK. Evolution of rapid nerve conduction. *Brain Res.* 2016;15;1641:11-33.
22. Coggan JS, Bittner S, Stiefel KM, Meuth SG, Prescott SA. Physiological dynamics in demyelinating diseases: unraveling complex relationships through computer modeling. *Int J Mol Sci.* 2015;7;16(9):21215-36.
23. Rasband MN, Peles E. Mechanisms of node of Ranvier assembly. *Nat Rev Neurosci.* 2021;;22:7.
24. Debanne D, Campanac E, Bialowas A, Carlier E, Alcaraz G. Axon physiology. *Physiol Rev.* 2011;91(2):555-602.
25. Suminaite D, Lyons DA, Livesey MR. Myelinated axon physiology and regulation of neural circuit function. *Glia.* 2019;67(11):2050-62.
26. Weickenmeier J, de Rooij R, Budday S, Ovaert TC, Kuhl E. The mechanical importance of myelination in the central nervous system. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2017;76:119-24.
27. Osorio-Querejeta I, Sáenz-Cuesta M, Muñoz-Culla M, Otaegui D. Models for studying myelination, demyelination and remyelination. *Neuromolecular Med.* 2017;19:181-92.
28. Seil FJ. Demyelination. In *Advances in Cellular Neurobiology.* Elsevier; 1982;235-274.
29. Stohlman SA, Hinton DR. Viral induced demyelination. *Brain Pathol.* 2001;11(1):92-106.
30. Love S. Demyelinating diseases. *J Clin Pathol.* 2006;59(11):1151-9.
31. Papastefanaki F, Matsas R. From demyelination to remyelination: the road toward therapies for spinal cord injury. *Glia.* 2015;63(7):1101-25.

32. Chari DM. Remyelination in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol.* 2007;79:589-620.
33. Lubetzki C, Zalc B, Williams A, Stadelmann C, Stankoff B. Remyelination in multiple sclerosis: from basic science to clinical translation. *Lancet Neurol.* 2020;19(8):678-88.
34. Klistorner A, Barnett M. Remyelination trials: are we expecting the unexpected?. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2021;8(6):e1066.
35. Franklin RJ, Frisén J, Lyons DA. Revisiting remyelination: towards a consensus on the regeneration of CNS myelin. *Semin Cell Dev Biol.* 2021;116:3-9.
36. Wooliscroft L, Silbermann E, Cameron M, Bourdette D. Approaches to remyelination therapies in multiple sclerosis. *Curr Treat Options Neurol.* 2019;21:1-6.
37. Ohno N, Ikenaka K. Axonal and neuronal degeneration in myelin diseases. *Neurosci Res.* 2019;139:48-57.
38. Medina E. Demyelinating and dysmyelinating diseases. *Riv Neuroradiol.* 1993;6(2\_suppl):33-8.
39. Bonkowsky JL, Keller S, Capal JK, Lotze T, Shellhaas RA, Urion DK, Chen E, Trotter TL, Berry SA, Burke LW, Geleske TA. Leukodystrophies in children: diagnosis, care, and treatment. *Pediatrics.* 2021;148(3).
40. Inoue K. Pelizaeus-Merzbacher disease: molecular and cellular pathologies and associated phenotypes. *Myelin: Basic and Clinical Advances.* 2019:201-16.
41. Llaci L, Ramsey K, Belnap N, Claasen AM, Balak CD, Szelinger S, Jepsen WM, Siniard AL, Richholt R, Izat T, Naymik M. Compound heterozygous mutations in SNAP29 is associated with Pelizaeus-Merzbacher-like disorder (PMLD). *Hum Genet.* 2019;138:1409-17.
42. McDonell J, Costello K, Laurson-Doube J, Rijke N, Giovannoni G, Banwell B, Baneke P. World Health Organization essential medicines list: Multiple sclerosis disease-modifying therapies application. *Mult Scler J.* 2020;26(2):153-8.
43. Hauser SL, Cree BA. Treatment of multiple sclerosis: a review. *Am J Med.* 2020;133(12):1380-90.
44. Bando Y. Mechanism of demyelination and remyelination in multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunol.* 2020;11:14-21.
45. Leary S, Brownlee W, Barker N, Chard D, Chataway J, Chung K, Ciccarelli O, Giovannoni G, John N, Khaleeli Z, Swanton J. Multiple sclerosis and demyelinating diseases. *Neurology: a Queen square textbook.* 2024;603-54.
46. Kamil K, Yazid MD, Idrus RB, Das S, Kumar J. Peripheral demyelinating diseases: from biology to translational medicine. *Front Neurol.* 2019;19;10:87.
47. Gaspar BL. Immune-mediated demyelinating neuropathies. *Immune-mediated*

myopathies and neuropathies: Current trends and future prospects. Springer Nature Singapore; 2023;209-226.

48. Shahrizaila N, Lehmann HC, Kuwabara S. Guillain-Barré syndrome. *Lancet*. 2021;27;397(10280):1214-28.
49. Malek E, Salameh J. Guillain–barre syndrome. *Semin Neurol*. 2019;39(05):589-595.
50. Pipis M, Rossor AM, Laura M, Reilly MM. Next-generation sequencing in Charcot–Marie–Tooth disease: opportunities and challenges. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(11):644-56.
51. Ma M, Li Y, Dai S, Chu M, Sun L, Liu L, Zhou JC. A meta-analysis on the prevalence of Charcot–Marie–Tooth disease and related inherited peripheral neuropathies. *J Neurol*. 2023;270(5):2468-82.
52. Ilić K, Mlinac Jerković K, Habek N, Balog M, Kalanj Bogonar S, Heffer M, et al. Lipid raft isolation from mouse brain tissue under conditions that retain submembrane distribution of gangliosides and proteins. *Book of Abstracts*. 2017.
53. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997;387(6633):569-72.
54. Sapoń K, Mańka R, Janas T, Janas T. The role of lipid rafts in vesicle formation. *J Cell Sci*. 2023;136(9):jcs260887.
55. Ilić K, Mlinac Jerković K, Heffer M, Schnaar RL, Kalanj Bogonar S. Compositional changes of brain gangliosides lead to dispersal of cell adhesion molecule neuropilin from the lipid raft fractions. *FENS Regional Meeting*. 2017.
56. Hirano K, Kinoshita M, Matsumori N. Impact of sphingomyelin acyl chain heterogeneity upon properties of raft-like membranes. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2022;1864(12):184036.
57. D'Aprile C, Prioni S, Mauri L, Prinetti A, Grassi S. Lipid rafts as platforms for sphingosine 1-phosphate metabolism and signalling. *Cell Signal*. 2021;1;80:109929.
58. Chen X, Jen A, Warley A, Lawrence MJ, Quinn PJ, Morris RJ. Isolation at physiological temperature of detergent-resistant membranes with properties expected of lipid rafts: the influence of buffer composition. *Biochem J*. 2009;417(2):525-33.
59. Vona R, Iessi E, Matarrese P. Role of cholesterol and lipid rafts in cancer signaling: a promising therapeutic opportunity *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:622908.
60. Cheng X, Smith JC. Biological membrane organization and cellular signaling. *Chem Rev*. 2019;119(9):5849-80.
61. Grassi S, Giussani P, Mauri L, Prioni S, Sonnino S, Prinetti A. Lipid rafts and neurodegeneration: Structural and functional roles in physiologic aging and



- neurodegenerative diseases: Thematic Review Series: Biology of Lipid Rafts. *J Lipid Res.* 2020;61(5):636-54.
62. Murai T. The role of lipid rafts in cancer cell adhesion and migration. *Int J Cell Biol.* 2012;18:19.
63. Blažetić S. Distribucija osnovnih kemijskih fenotipova interneurona u mozgu tri genetički preinačena mišja modela s isključenim genima St3Gal2, St3Gal3 i St3Gal2/St3Gal3 [doktorska disertacija]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju; 2015.
64. Vajn K, Viljetić B, Degmečić IV, Schnaar RL, Heffer M. Differential distribution of major brain gangliosides in the adult mouse central nervous system. *PLoS One.* 2013;8(9):e75720.
65. Sipione S, Monyror J, Galleguillos D, Steinberg N, Kadam V. Gangliosides in the brain: physiology, pathophysiology and therapeutic applications. *Front Neurosci.* 2020;14:572965.
66. Ariga T. Pathogenic role of ganglioside metabolism in neurodegenerative diseases. *J Neurosci Res.* 2014;92(10):1227-42.
67. Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P. The human sialyltransferase family. *Biochimie.* 2001;83(8):727-37.
68. Pei C, Peng X, Wu Y, Jiao R, Li T, Jiao S, Zhou L, Li J, Du Y, Qian EW. Characterization and application of active human  $\alpha 2, 6$ -sialyltransferases ST6GalNAc V and ST6GalNAc VI recombined in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol.* 2024;177:110426.
69. Lee YC, Kaufmann M, Kitazume-Kawaguchi S, Kono M, Takashima S, Kurosawa N, Liu H, Pircher H, Tsuji S. Molecular cloning and functional expression of two members of mouse NeuAc $\alpha 2, 3$ Gal $\beta 1, 3$ GalNAc GalNAc $\alpha 2, 6$ -sialyltransferase family, ST6GalNAc III and IV. *J Biol Chem.* 1999;274(17):11958-67.
70. Al Saoud R, Hamrouni A, Idris A, Mousa WK, Izneid TA. Recent advances in the development of sialyltransferase inhibitors to control cancer metastasis: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother.* 2023;165:115091.
71. Ding L, Zhao C, Qu J, Li Y, Sugiarto G, Yu H, Wang J, Chen X. A *Photobacterium* sp.  $\alpha 2$ -6-sialyltransferase (Psp2, 6ST) mutant with an increased expression level and improved activities in sialylating Tn antigens. *Carbohydr Res.* 2015;408:127-33.
72. Glanz VY, Myasoedova VA, Grechko AV, Orekhov AN. Sialidase activity in human pathologies. *Eur J Pharmacol.* 2019;842:345-50.
73. Taniguchi A, Hasegawa Y, Higai K, Matsumoto K. Transcriptional regulation of

- human  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2, 6-sialyltransferase (hST6Gal I) gene during differentiation of the HL-60 cell line. *Glycobiology*. 2000;10(6):623-8.
74. Zhang Y, Wang R, Feng Y, Ma F. The role of sialyltransferases in gynecological malignant tumors. *Life Sci*. 2020;263:118670.
75. Zhang SZ, Lobo A, Li PF, Zhang YF. Sialylated glycoproteins and sialyltransferases in digestive cancers: mechanisms, diagnostic biomarkers, and therapeutic targets. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2024;197:104330.
76. Qi F, Isaji T, Duan C, Yang J, Wang Y, Fukuda T, Gu J. ST3GAL3, ST3GAL4, and ST3GAL6 differ in their regulation of biological functions via the specificities for the  $\alpha$ 2, 3-sialylation of target proteins. *FASEB J*. 2020;34(1):881-97
77. Yoo SW, Motari MG, Susuki K, Prendergast J, Mountney A, Hurtado A, Schnaar RL. Sialylation regulates brain structure and function. *FASEB J*. 2015;29(7):3040.
78. Jurga AM, Paleczna M, Kadluczka J, Kuter KZ. Beyond the GFAP-astrocyte protein markers in the brain. *Biomolecules*. 2021 Sep 14;11(9):1361.
79. Ganne A, Balasubramaniam M, Griffin WS, Shmookler Reis RJ, Ayyadevara S. Glial fibrillary acidic protein: a biomarker and drug target for alzheimer's disease. *Pharmaceutics*. 2022 Jun 26;14(7):1354.
80. Leyva-Díaz E. CUT homeobox genes: transcriptional regulation of neuronal specification and beyond. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2023 Sep 8;17:1233830.
81. Rodríguez-Tornos FM, Briz CG, Weiss LA, Sebastián-Serrano A, Ares S, Navarrete M, Frangeul L, Galazo M, Jabaudon D, Esteban JA, Nieto M. Cux1 enables interhemispheric connections of layer II/III neurons by regulating Kv1-dependent firing. *Neuron*. 2016 Feb 3;89(3):494-506.
82. Wiatr, K., Marczak, Ł., Pérot, J.B., Brouillet, E., Flament, J. and Figiel, M., 2021. Broad influence of mutant ataxin-3 on the proteome of the adult brain, young neurons, and axons reveals central molecular processes and biomarkers in SCA3/MJD using knock-in mouse model. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14, p.658339.
83. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microscopy research and technique*. 2003 Apr 15;60(6):540-51.

## 11. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Aida Imeri

Datum i mjesto rođenja: 27.05.2000., Đakovo, Hrvatska

Adresa stanovanja: S.S. Kranjčevićeva 11, Đakovo

E-mail: [aidaimeri7@gmail.com](mailto:aidaimeri7@gmail.com)

### OBRAZOVANJE

2015. – 2019. – Zdravstvena gimnazija, Medicinska škola Osijek

2019. – 2022. – Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet, Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2022. – 2024. – Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet, Sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

### AKTIVNOSTI TIJEKOM STUDIJA

Radionice:

- Osnove znanstvenog istraživanja (4.-5. prosinca 2020.)
- Hematologija (15. travnja 2021.)
- Prva pomoć (18. siječnja 2023.)
- Okrugli stol “Radni dan MLD-ovca” (12. travnja 2023.)
- Venepunkcija (18. travnja 2023.)
- Prva pomoć (23. siječnja 2024.)

Festival znanosti:

- Festival znanosti 2022. – voditeljica radionice „Život“ (2.-7. svibnja 2022.)
- Festival znanosti 2023. – voditeljica radionice „Priroda i društvo“ (24.-28. travnja 2023.)
- Festival znanosti 2024. – voditeljica radionice „Pametni laboratorij“ (22. – 26. travnja 2024.)

Tjedan mozga:

- Tjedan mozga 2023. - predavač: “Milky way for our brain” (13.-19. ožujka 2023.)
- Tjedan mozga 2024. – predavač: „Nemam fibru, a u meni antibiotik“ (11. – 15. ožujka 2024.)

Javne akcije:

- Mjerenje glukoze u krvi i krvnog tlaka u sklopu obilježavanja Dana medicinsko laboratorijskih djelatnika (13. travnja 2023.)
- Mjerenje glukoze u krvi i krvnog tlaka u sklopu obilježavanja dana medicinsko laboratorijskih djelatnika (15. travnja 2024.)

Kongresi:

- Pasivni sudionik „3rd Student Congress OSCON“ (19.-20. ožujka 2021.)
- Volonter „5rd Student Congress OSCON“ ( 30. ožujka-1.travnja 2023.)

Udruge:

- Član udruge CMLDSA