

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Tea Markulak

EKSPRESIJA KOMPLEKSNIH
GANGLIOZIDA PRIJE I NAKON
PROCESA MIJELINIZACIJE U MOZGU
GENETIČKI IZMIJENJENOG MIŠA

St8sia1

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Tea Markulak

EKSPRESIJA KOMPLEKSNIH
GANGLIOZIDA PRIJE I NAKON
PROCESA MIJELINIZACIJE U MOZGU
GENETIČKI IZMIJENJENOG MIŠA
St8sia1

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je izrađen u Laboratoriju za neurobiologiju na Medicinskom fakultetu u Osijeku.

Mentor rada: doc. dr. sc. Barbara Vilječić.

Rad ima 37 stranica, 11 tablica i 13 slika.

Beskrajno hvala mojoj mentorici, doc. dr. sc. Barbari Viljetić na strpljivosti, savjetima i pomoći tijekom cijelog procesa izrade ovog diplomskog rada.

Hvala Marini Vinaj i Vlatki Ivić na lektoriranju ovoga rada.

Mojim kolegicama Martini i Jeleni, hvala za sve pružene savjete i poruke kasno u noć.

Hvala Sandi na strpljenju, pomoći i prijateljstvu tijekom svih ovih godina.

Mome dečku Luki, zahvaljujem na potpori i ohrabivanju te smijehu u najgorim trenucima.

Osobita zahvala mojoj obitelji što je bila uz mene tijekom cijelog mog obrazovanja i pružala mi bezuvjetnu potporu.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA	II
1. UVOD	1
1.1. Živčani sustav	1
1.2. Mijelin	2
1.2.1. Mijelinizacija u mozgu.....	3
1.2.2. Demijelinizacijske bolesti	3
1.3. Lipidne splavi	4
1.4. Gangliozidi	5
1.4.1 Sinteza i razgradnja gangliozida	6
1.4.2. Distribucija gangliozida	7
1.4.3. Bolesti vezane uz metabolizam gangliozida	7
2. HIPOTEZA	8
3. CILJEVI	9
4. MATERIJALI I METODE	10
4.1. Materijali	10
4.2. Kemikalije	10
4.3. Metode	11
4.3.1. Genotipizacija	11
4.3.2. Žrtvovanje miševa.....	12
4.3.3. Imunohistokemija	12
4.3.4. Analiza.....	13
5. REZULTATI.....	14
6. RASPRAVA.....	26
7. ZAKLJUČAK	29
8. SAŽETAK.....	30
9. SUMMARY	31
10. LITERATURA.....	32
11. ŽIVOTOPIS	37

POPIS KRATICA

5D - 5 dana stari miševi

15D - 15 dana stari miševi

30D - 30 dana stari miševi

ABC - avidin-biotin kompleks

B4galnt1 - gen za GM3 sintazu (engl. *Beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1*)

CC - žuljevito tijelo (lat. *corpus callosum*)

CNPaza - 2',3'-ciklični-nukleotid 3'-fosfodiesteraza (engl. *2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase*)

DAB - diaminobenzidin

GPI - glikozilfosfatidilinozitol (engl. *glycosylphosphatidylinositol*)

ICP - donji cerebelarni pedunkul (lat. *pedunculus cerebellaris inferior*)

KO - genetički izmijenjen miš (engl. *knock out*)

MAG - glikoprotein povezan s mijelinom (engl. *myelin-associated glycoprotein*)

MAG-KO - genetički izmijenjeni miševi s nedostatkom u sintezi MAG (engl. *myelin-associated glycoprotein-knock out*)

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

MOG - mijelinski oligodendrocitni glikoprotein (engl. *myelin oligodendrocyte glycoprotein*)

PBS - fosfatni pufer (engl. *phosphate-buffered saline*)

PCR - lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PFA - paraformaldehid

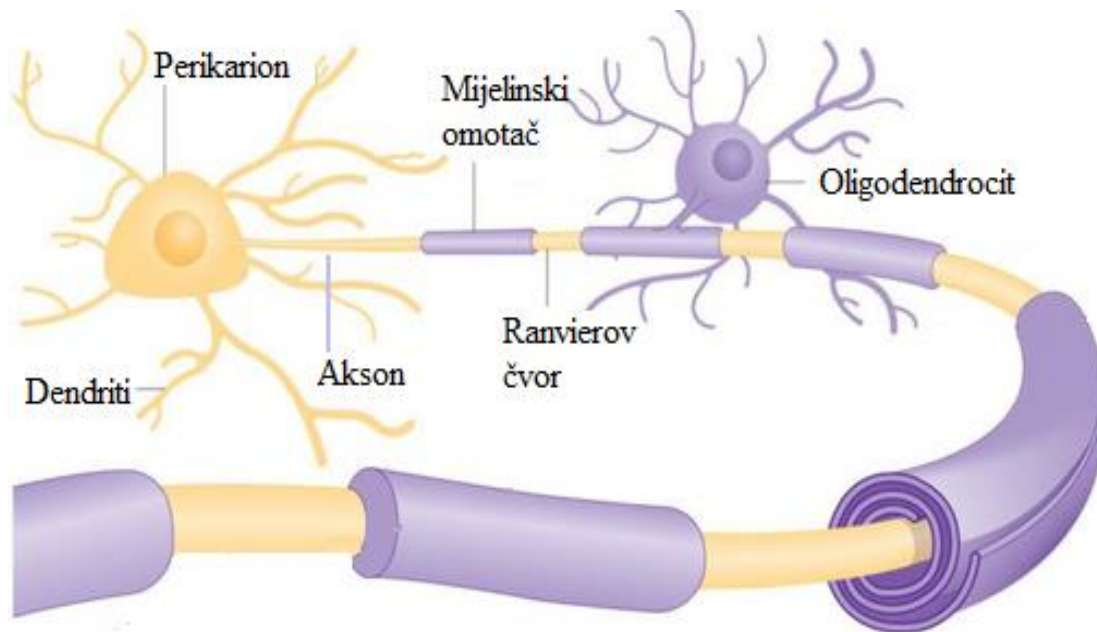
PLP - proteolipidni protein (engl. *proteolipid protein*)

St8sia1 - gen za GD3 sintazu (engl. *ST8 Alpha-N-Acetyl-Neuraminide Alpha-2,8-Sialyltransferase 1*)

1. UVOD

1.1. Živčani sustav

Živčani sustav ima ulogu u primanju osjetilnih podražaja s periferije, analizi i slanju odgovarajućih podražaja natrag koji će potaknuti odgovor organizma (1). Komunikacijom s ostalim složenim sustavima u tijelu, živčani sustav pridonosi cjelovitosti organizma (2). Dijeli se na središnji živčani sustav, koji uključuje mozak i kralježničku moždinu te periferni kojeg tvore živci i gangliji. Živčano tkivo se sastoji od živčanih stanica (neurona) i potpornih stanica (glija). Neuron se sastoji od staničnog tijela (perikarion) te aksona i dendrita. Dendriti čine izdanke koji se protežu iz staničnog tijela i prikupljaju signale ostalih neurona. Primljeni signali tada putuju duž aksona, koji se također proteže iz staničnog tijela, do sinapse kojom se signal prenosi do ostalih neurona (2). Potporne stanice uključuju astrocite, mikroglije, oligodendrocite i endotelne stanice. Neuron se također sastoji od mijelinskog omotača kojeg stvaraju oligodendrociti oko aksona te Ranvierovih čvoreva (1, 2) (Slika 1.1.).



Slika 1.1. Prikaz neurona s mijelinskim omotačem i oligodendrocita (Slika preuzeta i prilagođena iz rada autora Douglas Fields R (3)).

Mozak čini dio središnjeg živčanog sustava i podijeljen je na mali (lat. *cerebellum*) i veliki mozak (lat. *cerebrum*). Veliki mozak se sastoji od desne i lijeve hemisfere koje su spojene snopovima živčanih vlakana nazvane komisuroma. Glavna komisura između dviju hemisfera naziva se žuljevitim tijelom (lat. *corpus callosum*), a ono omogućuje prenošenje informacija

između obiju strana mozga (1, 4). Mali mozak povezan je s ostatkom središnjeg živčanog sustava pomoću skupa vlakana koji se zovu krakovi malog mozga (lat. *pedunculus cerebellaris*), a uključuju donji, gornji i srednji krak. Donji krak malog mozga (lat. *inferior pedunculus cerebellaris*) povezuje mali mozak s kralježničkom i produženom moždinom (1). Budući da mali mozak upravlja ravnotežom i finom motorikom, a veliki mozak upravlja senzornim, motoričkim i kognitivnim funkcijama, od iznimne važnosti je ispravna građa puteva prijenosa signala i osiguravanje međusobne komunikacije (1).

1.2. Mijelin

Zastupljen u perifernom i središnjem živčanom sustavu, mijelin tvori omotač oko aksona i doprinosi većoj brzini prenošenja signala između neurona (5). U središnjem živčanom sustavu njegova prisutnost daje boju bijeloj tvari mozga, a u znatno manjim količinama je nađen i u sivoj tvari mozga (6). Mijelin stvaraju Schwannove stanice u perifernom živčanom sustavu, dok u središnjem živčanom sustavu to čine oligodendrociti. Za razliku od Schwanovih stanica, koje mogu stvoriti samo jedan mijelinski omotač oko aksona, oligodendrociti mogu stvoriti i do 30 omotača oko više različitih aksona (7). Mijelinizacija je proces od iznimne važnosti za ispravnu funkciju mozga koja brzim prijenosom živčanog signala omogućuje izvođenje raznih kognitivnih, motoričkih i senzornih funkcija (8).

Mijelinska membrana u svom sastavu sadrži 70-80% lipida i po tome se razlikuje od svih ostalih bioloških membrana (7). U lipidnom sastavu prevladavaju zasićene dugolančane kiseline, kolesterol te glikosfingolipidi od kojih dominiraju galaktocerebrozid i galaktosulfocerebrozid. Osim lipida, sastoji se u manjem postotku (20-30%) od specifičnih proteina koji čine mijelinski bazični protein (engl. *myelin basic protein*, MBP), proteolipidni protein (engl. *proteolipid protein*, PLP) i 2',3'-ciklički nukleotid 3'-fosfodiesteraza (engl. *2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase*, CNPaza) koji su zastupljeni u većem postotku te mijelinski oligodendrocitni glikoprotein (engl. *myelin oligodendrocyte glycoprotein*, MOG) i glikoprotein povezan s mijelinom (engl. *myelin associated glycoprotein*, MAG) (7, 9).

Membrana nije omotana oko aksona cijelom dužinom već je isprekidana mjestima kojima je akson izložen izvanstaničnom okolišu, a takve šupljine se nazivaju Ranvierovim čvorovima (8). Nemijelirani čvorovi smješteni su između segmenata aksona prekrivenim kompaktnim mijelinom, a nazivaju se internodima. Ranvierovi čvorovi bogati su naponom reguliranim natrijevim kanalima (10). Otvaranjem natrijevih kanala i ulaskom natrijevih iona proizvodi se

akcijski potencijal u jednom čvoru koji stvara struju. Dio nastale struje pasivno putuje kroz izolirane dijelove aksona koji spriječavaju curenje struje preko membrane sve dok ne dođe do sljedećeg čvora gdje će izazvati ponovnu regeneraciju akcijskog potencijala (11). Ovakva vrsta provođenja ponavlja se kroz cijeli akson i naziva se saltatornom, a obilježena je "skakanjem" akcijskog potencijala s jednog čvora na drugi koji omogućuje učinkovitiji i do 100 puta brži prijenos signala u usporedbi s nemijeliniziranim aksonima (5, 6). Budući da mijelin smanjuje kapacitet membrane, smanjuju se i energetske potrebe aksona koje reguliraju oligodendrociti (slično i Schwannove stanice), doprimajući energetske metabolite kao što su laktat i piruvat (10).

1.2.1. Mijelinizacija u mozgu

Tijekom razvoja mozga pojedina područja mozga mijeliniziraju se u različito vrijeme. Mijelinizacija započinje u četvrtom embrionalnom mjesecu i nastavlja se do tridesetih ili četrdesetih godina života (12). Proizvodnja mijelina najveća je u prvom desetljeću života, dok je volumen bijele tvari u odnosu na volumen mozga najveći u pedesetim godinama života. Regije posvećene osnovnim funkcijama o kojima nam ovisi život mijeliniziraju se ranije, dok se regije posvećene složenijim funkcijama kao što su više kognitivne funkcije mijeliniziraju kasnije (10). Mijelinizacija se odvija po patentu kojim napreduje od stražnjih prema prednjim regijama, centralno prema perifernom i kaudalno prema rostralnom smjeru (8). Mijelinizacija započinje prije rođenja u mostu (lat. *pons*), krakovima malog mozga (lat. *pedunculus cerebellaris*) i u ploči bijele tvari (lat. *capsula interna*) koja povezuje koru mozga s periferijom. Nadalje, u prvoj godini života mijeliniziraju žuljevito tijelo (lat. *corpus callosum*), a zatim zatiljni režanj (lat. *lobus occipitalis*), tjemeni režanj (lat. *lobus parietalis*) te čeonni režanj (lat. *lobus frontalis*) koji se nastavlja jače mijelinizirati u ranoj odrasloj dobi (13). Budući da se mijelinizacija nastavlja u odrasloj dobi, volumen bijele tvari se mijenja tijekom vremena. Također, pokazalo se kako učenje vještina, poput sviranja klavira i učenja novog jezika, pridonosi povećanju bijele tvari u odgovarajućim regijama. Osim toga, na mijelinizaciju utječe i socijalna interaktivnost pojedinca, gdje socijalna izolacija uzrokuje smanjenje u sazrijevanju oligodendrocita te posljedično smanjenje stvaranja bijele tvari (14).

1.2.2. Demijelinizacijske bolesti

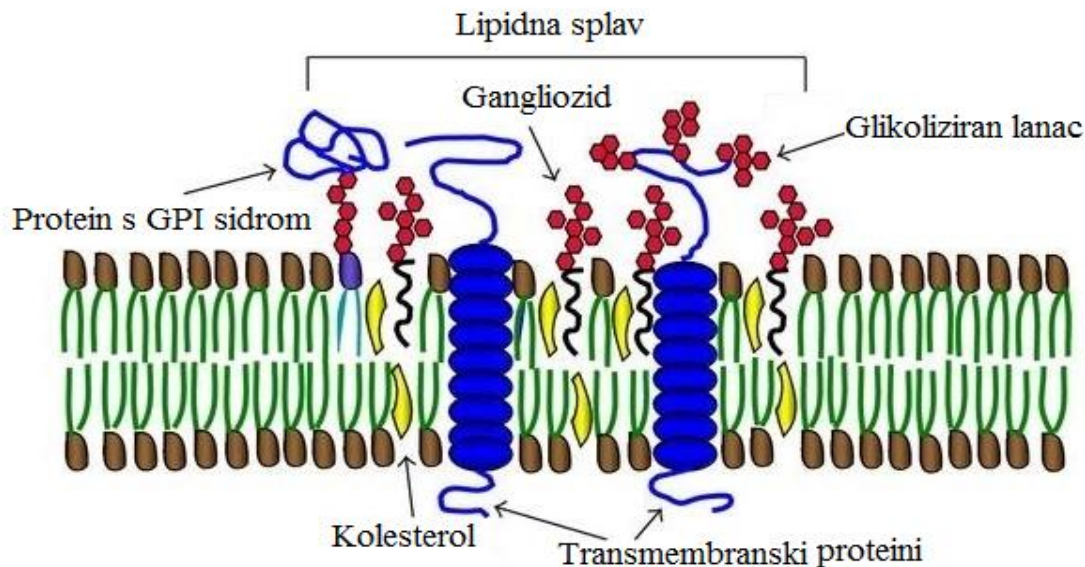
Budući da je mijelinski omotač od iznimne važnosti u brzom provođenju signala, njegovo oštećenje dovodi do nedostatne ili nepostojeće signalne komunikacije koja uzorkuje demijelinizacijske bolesti (15). Multipla skleroza je najčešća demijelinizacijska bolest čije

nastajanje nije posve utvrđeno, ali je poznato da oboljenju pridonosi skup genetskih i okolišnih čimbenika koji izazivaju imunološku reakciju organizma (16). Nastajanjem višestrukih lezija i nakupljanjem upalnih stanica dolazi do oštećenja mijelinske membrane, aksona te propadanja neurona (17). Također, promjene u mijelinizaciji dovode do psihijatrijskih poremećaja (shizofrenija, kronična depresija, bipolarni poremećaj), poremećaja u razvoju (spektralni poremećaj autizma, disleksija, poremećaj pozornosti s hiperaktivnošću) te neurodegenerativnih bolesti koje uključuju Alzheimerovu i Parkinsonovu bolest (12).

1.3. Lipidne splavi

Stanična membrana, koja se sastoji od lipida i proteina, odvaja unutarstanični i izvanstanični prostor te time regulira prolazak raznih bioloških molekula i omogućava staničnu komunikaciju (18, 19). Fluidnost nije ista duž cijele membrane, a dijelovi koji su uređeniji i manje fluidni od ostatka nazivaju se lipidnim splavima (19).

Lipidne splavi su dinamične mikrodomene koje su u svom sastavu obogaćene sfingolipidima (sfingomijelin i glikolipidi) i kolesterolom. Osim njih, nalazimo i fosfolipide, transmembranske proteine te proteine s glikozilfosfatidilinozitol (GPI) sidrima (20) (Slika 1.2.). Imaju važnu ulogu u raznim procesima kao što su upravljanje membranskim prometom, provođenju signala, endocitozi itd. (19). Budući da je mijelinska ovojnica sastavljena od glikosfingolipida i kolesterola, oni međusobno doprinose formaciji lipidnih splavi. Za normalnu funkciju živčanog sustava potrebna je tako ispravna građa lipidnih splavi. Imaju važnu ulogu u provođenju signalnih kaskada za događaje koji kontroliraju aktivnost oligodendrocita i organizaciju mijelinskih proteina te time pridonose mijelinskoj stabilnosti (21). Osim toga, značajne su za rast i razvoj aksona te preživljavanje neurona. Kod neurodegenerativnih bolesti dolazi do narušavanja lipidnog sastava koje dovodi do nepravilnog formiranja lipidnih splavi te posljedično, do nepotpunog provođenja staničnih signala (22).



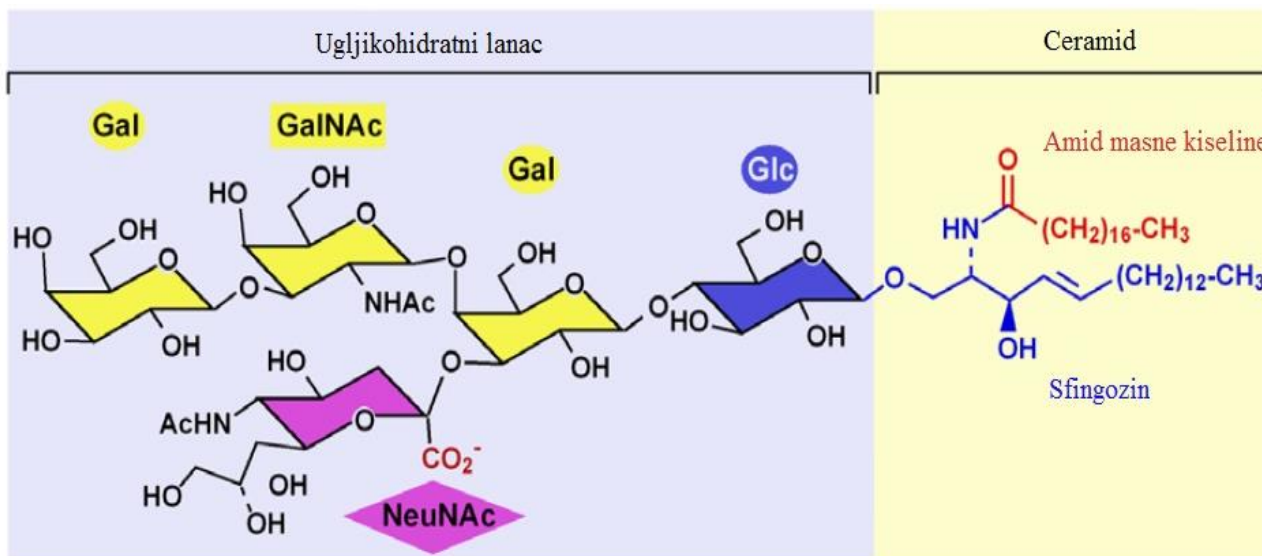
Slika 1.2. Prikaz lipidne splavi. (Slika preuzeta i prilagođena iz rada autora Malchiodi-Albedi F, Paradisi S, Matteucci A, Frank C, Diociaiuti M (23)).

1.4. Gangliozidi

U lipidnim splavima nalaze se glikosfingolipidi koji u svom sastavu imaju pridruženu jednu ili više sijalinskih kiselina od kojih je najčešća N-acetilneuraminska kiselina (18). Takvi glikosfingolipidi se nazivaju gangliozidima, a sastoje se od ceramida koji je hidrofoban i ugljikohidratnog lanca koji čini hidrofilni dio strukture (24). Lipidni ceramid se sastoji od sfingozida koji najčešće ima 18 ili 20 ugljikovih atoma i amida masne kiseline (najčešće stearinske kiseline) (25). U membrani su ceramidnim sidrom ugrađeni u lipidni dvosloj dok ugljikohidratni lanac izvire u izvanstaničnu okolinu (Slika 1.3.). Varijacije koje mogu postojati u ugljikohidratnome i ceramidnom djelu omogućuje razlikovanje čak i više od 100 struktura gangliozida (26).

Gangliozidi, zahvaljujući svojoj strukturi sudjeluju u cis i trans interakcijama i imaju različite funkcije (25). U cis (lateralnoj) interakciji gangliozidi u istoj membrani stupaju u reakcije s drugim molekulama kao što su stanični proteini i potiču staničnu signalizaciju. U trans (međustaničnoj) interakciji gangliozidi svojim ugljikohidratnim lancem, koji strši izvan membrane, vezanjem za proteine iz druge membrane omogućavaju stanično prepoznavanje (25).

Imenovanje gangliozida prate pojednostavljena pravila koja je odredio Svennerholm. Gangliozid se označuje "G" slovom, broj ukupnih sijalinskih kiselina označuje se prema velikim slovima "M" (mono), "D" (di), "T" (tri) "Q" (tetra), "P" (penta), "H" (heksa), duljinu ugljikohidratnog lanca označujemo brojevima (1, 2, 3), a računa se tako da se od broja 5 oduzme stvarni broj šećera u lancu. Malim slovima označuju se sijalinske kiseline povezane s unutarnjim ostatkom galaktoze gdje "a" predstavlja jednu kiselinu, "b" dvije kiseline itd (27, 28).



Slika 1.3. Prikaz GM1 gangliozida. (Slika preuzeta i prilagođena iz rada autora Krengel U, Bousquet PA (18)).

1.4.1 Sinteza i razgradnja gangliozida

Prvi korak je sinteza ceramida u endoplazmatskom retikulumu. Pomoću transfernog proteina ceramid se dalje prenosi u Golgijevo tijelo. Specifična glukoziltransferaza katalizira prijenos glukoznog ostatka na ceramid pri čemu nastaje glukozilceramid (GlcCer). Nadalje, galaktoziltransferaza katalizira prenošenje galaktoznog ostatka na glukozilceramid te se time stvara laktozilceramid. Sijalinizacijom laktozilceramida pomoću sijaliltransferaza tvore se jednostavni gangliozidi koji čine GM3, GD3 i GT3. Iz laktozilceramida i jednostavnih gangliozida nastaju složeniji gangliozidi -0-, -a-, -b-, ili -c serije koje se razlikuju po broju sijalinskih kiselina na unutrašnjoj galaktozi (0 - nema niti jednu, a - ima jednu, b - ima dvije i c - ima tri vezane kiseline). Kompleksni gangliozidi GM1 i GD1a nastaju iz gangliozida GM3, a GD1b i GT1b iz gangliozida GD3 (29).

Razgradnja gangliozida započinje u endosomima i lizosomima. Gangliozidi se otklanjaju s membrana endocitozom. U lizosome dolaze u obliku vezikula te se djelovanjem lizosomskih hidrolaza, sijalidaza i aktivatorskih proteina razgrađuju na manje strukture. Nakon što se otklone sijalinske kiseline i monosahardi specifičnim enzimima, ostaje ceramid koji se dalje degradira u sfingozin i masnu kiselinu koji odlaze iz lizosoma (30).

1.4.2. Distribucija gangliozida

Gangliozidi su zastupljeni u svim tkivima, a posebno u središnjem živčanom sustavu kralježnjaka gdje u neuronima čine i do 10% ukupnog sastava lipida (24, 31). Sastav gangliozida mijenja se ovisno o funkciji stanica i staničnoj diferencijaciji, morfologiji, te malignim pojavama (32). Distribucija gangliozida iz jednostavnijih u složenije se mijenja tijekom razvoja mozga (25). Gangliozidi GM3 i GD3 su, tako, najzastupljeniji u ranom embrionalnom razvoju, a u odraslom mozgu to postaju GM1, GD1a, GD1b i GT1b koji čine i do 97% ukupnih gangliozida (25, 31). Također, osim u razvojnom pogledu, ekspresija pojedinih gangliozida ovisi o područjima u mozgu. U odraslom mišu u bijeloj tvari mozga ekspresiran je GM1, gangliozid GD1a u sivoj tvari dok su GT1b i GD1b nađeni i u bijeloj i u sivoj tvari mozga (33). Glavnu ulogu u ranoj mijelinizaciji i regulaciji stanične komunikacije ima GM1, GT1b karakterističan je za zrele neurone, a GD1a je marker sinaptogeneze (34). Gangliozid GD1a i GT1b također vežu MAG protein koji sudjeluje u procesu mijelinizacije (25).

1.4.3. Bolesti vezane uz metabolizam gangliozida

Defekti u enzimima koji sudjeluju u reakcijama razgradnje gangliozida u lizosomima uzrokuju bolesti nazvane bolestima lizosomskog skladištenja, a u koje pripadaju nasljedna Tay-Sachova i Sandhoffova bolest (35). Nastaju zbog primarnog nedostatka enzima heksozaminidaze koja sudjeluje u razgradnji GM2 gangliozida. Budući da je enzim odsutan, dolazi do akumulacije GM2 u neuronima. U Tay-Sachsovoj i Sandhoffovoj bolesti prva godina života djeteta obilježena je napadajima, sljepoćom, psihomotornim oštećenjima te smrću koja nastupi u razmaku od 3 do 5 godina (32, 35). Gangliozidi u membrani mogu djelovati kao ligandi za vezanje bakterijskih toksina (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*) i virusa (influenza A virus, poliomavirus) i tako im omogućiti ulazak u stanice i oboljenje. U Alzheimerovoj, Huntingtonovoj i Parkinsonovoj bolesti ekspresija gangliozida je također promijenjena (18).

2. HIPOTEZA

Nedostatak kompleksnih gangliozida b-serije u genetički izmijenjenim miševima *St8sial* dovesti će do promjena u sastavu lipidnih splavi, što će za posljedicu imati i poremećaj u procesu mijelinizacije.

3. CILJEVI

1. Odrediti ekspresiju kompleksnih gangliozida i markera mijelina u mozgu genetički izmijenjenog miša *St8sial1* s nedostatkom sinteze b-serije gangliozida prije, tijekom i nakon mijelinizacije.
2. Proučiti kako nedostatak kompleksnih gangliozida b-serije u *St8sial1* mišu djeluje na mijelinizaciju u svim fazama procesa.

4. MATERIJALI I METODE

Ovaj rad je napravljen u sklopu HRZZ projekta "Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi" (IP-09-2014-2324). Za rad s odabranim životinjama dobiveno je dopuštenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek.

4.1. Materijali

Za istraživanje koristila su se moždana tkiva genetički izmijenjenog miša *St8sial* (engl. *knock out*, KO) s nedostatkom u sintezi b-serije kompleksnih gangliozida. Miševi su bili stari 5, 15 i 30 dana, a za istraživanje su uzeta po tri miša iz svake navedene dobne skupine.

4.2. Kemikalije

- NaOH (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- AE pufer (Qiagen, Hilden, D-40724)
- agaroza (Lonza, Rockland, ME, USA)
- TBE pufer (Gibco, Life Technologies, Paisley, Scotland)
- SYBR Safe (Invitrogen, Van Allen Way, Carlsbad CA, USA)
- izofluran (Forane, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, USA)
- PBS:
 - NaCl (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA),
 - KCl (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA),
 - Na₂HPO₄·7H₂O (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
 - KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- paraformaldehid (PFA) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- saharoza (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- 2-metilbutan (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- medij za kriostatsko rezanje (Tissue Freezing Medium; Leica, Nussloch, Germany)
- 30% vodikov peroksid (H₂O₂) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- goveđi serum (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- kozji serum (Gibco, Invitrogen Auckland, NZ)
- Triton (X-100) (Acros Organics, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

- primarna protutijela:
 - GM1 (Mišje IgG, Zavod za farmakologiju Medicinskog fakulteta Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, SAD)
 - GD1a (Mišje IgG, Zavod za farmakologiju Medicinskog fakulteta Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, SAD)
 - GD1b (Mišje IgG, Zavod za farmakologiju Medicinskog fakulteta Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, SAD)
 - GT1b (Mišje IgG, Zavod za farmakologiju Medicinskog fakulteta Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, SAD)
 - CNPaza (Chemicon, Temecula, CA, SAD)
 - MAG (Milipore, Temecula, CA, SAD)
 - MBP (QED Bioscience Inc., San Diego, CA, SAD)
- sekundarno protutijelo: biotinizirano kozje anti-mišje IgG (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD)
- tercijski kompleks ABC koji sadrži kompleks avidina i biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- TBS pufer (pH=7,4):
 - Tris (Fisher Bioreagents, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
 - HCl (Fisher Bioreagents, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
 - NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- diaminobenzidin (DAB) (Peroxidase Substrate System, Vector Lab, Burlingame, CA, USA)
- Vectamount pokrivalo (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

4.3. Metode

4.3.1. Genotipizacija

Genotipizacija uzoraka mišjih repova provedena je kako bi potvrdili genotip životinja. Izolacija DNA napravljena je dodavanjem NaOH (50 mM) visokih koncentracija izravno na uzorke koji su potom inkubirani 30 minuta na 95°C. Nakon centrifugiranja, odvojen je NaOH i dodan AE pufer. Metodom lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) i korištenjem specifičnih početnica SA269 (GCA AGA CGT TGT CAT AGT AGT), SA270 (CAC AGT TAC ATC TAC ATG CCT) te SA271 (TCG CCT TCT TGA CGA GTT CTT CTG AG) umnoženi su fragmenti izolirane DNA. Agaroznom gel elektroforezom u koju

je dodana boja *SYBR safe* razdvojili su se fragmenti te analizirali pod UV svjetlom. Za utvrđivanje genotipa dobiveni fragmenti DNA uspoređivali su se s genotipom divljeg tipa miša *C57Bl6* (engl. *wild type*, WT).

4.3.2. Žrtvovanje miševa

Eutanazirana su po 3 miša iz svake dobne skupine (5 dana, 15 dana i 30 dana starosti) pridržavajući se svih etičkih principa. Duboko su anestetizirani izofuranom te je za miševе stare 30 dana rađena trankardijalna perfuzija. Nakon pričvršćivanja miša na podlogu i rastvaranja prsnog koša škarcama, perfuzija se radila iglom u lijevoj klijetki srca. Korištenjem 1xPBS isprana je krv iz organizma. Igla sa fiksativom (4% paraformaldehid) se uvodila u isto mjesto u srcu. Dobro napravljena fiksacija dovodi do grčenja mišića dok je ukočenost tijela miša pokazatelj uspješno izvršene perfuzije. Izdvojeni mozgovi miševa starosti 30 dana fiksirani su u 4% paraformaldehidu 24 sata na +4°C. Trankardijalna perfuzija nije rađena na miševima starim 5 i 15 dana već su nakon žrtvovanja njihovi uzorci mozgovа stavljeni u 4% paraformaldehid 24 sata na +4°C. Korištena je 10% i 20% saharoza za krioprotekciju uzoraka. Mozak je smrznut u pothlađenom izopentanu i pohranjen na -80°C. Prije rezanja mozgovi su uklopljeni u medij za kriostatsko rezanje (Tissue freezing medium; Leica, Nussloch, Germany). Tkivo debljine 35 µm rezalo se u koronarnom smjeru na kriostatu (Cryostat CM3050S, Leica, Nussloch, Germany) pri temperaturama CT -18°C i OT -16°C. Rezovi su prikupljeni u 1xPB u mikrotitarsku pločicu s 24 jažice te pohranjeni na +4°C.

4.3.3. Imunohistokemija

Na slobodno plutajućim rezovima u mikrotitarskim pločicama napravljena je imunohistokemija. Rezove smo premjestili u 1%-tni H₂O₂ u 1xPBS-u kako bi blokirali vezanje endogenih peroksidaza. Radi boljeg vezanja antitijela potrebno je inhibirati nespecifične reakcije vezanja protutijela te je zato stavljen bloking koji je napravljen dodavanjem 1% albumin govedeg seruma i 5% kozjeg seruma u 1xPBS, 2 sata na +4°C. Za markere mijelina koristi se bloking koji sadrži i 1%-tni Triton x-100. Idući korak bio je pripremanje primarnog protutijela u otopini blokingsa. Korištena su GM1, GD1a, GD1b i GT1b primarna protutijela za gangliozide. Priprema GM1 je bila u omjeru 1:500, GD1a 1:5000, GD1b 1:1000 i GT1b u omjeru 1:500. Korišteni su markeri mijelina koji su uključivali CNP-azu u omjeru 1:750 te MAG i MBP u omjeru 1:500. Inkubiranje u primarnom protutijelu se radilo na +4°C, na tresilici preko noći. Nakon toga, slijedio je niz ispiranja od 3 puta po 10 minuta u 1xPBS-u i inkubacija u sekundarnom protutijelu koje čini kozje anti-miše IgG s konjugatom biotina u razrjeđenju

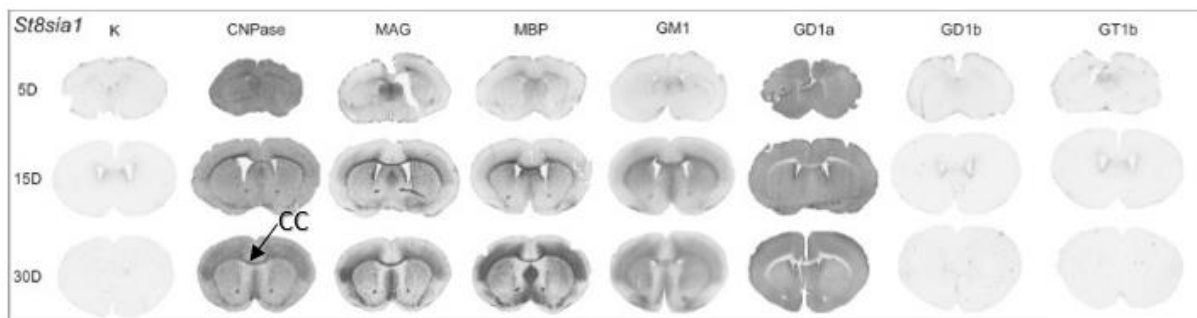
1:500. Inkubacija se odvijala na $+4^{\circ}\text{C}$, na tresalici 4 sata. Ponovljeno je ispiranje od 3 puta po 10 minuta u 1xPBS-u. Nakon toga slijedi inkubacija u tercijarnom kompleksu ABC (kompleks avidina i biotina) koji se priređuje u 1xPBS-u omjeru 1:250. Inkubacija se odvijala na $+4^{\circ}$, na tresilici 2 sata. Zadnje ispiranje se radilo 3 puta po 10 minuta u 1xTBS-u koji ima pH od 7,4. Poslje ispiranja primjenio se supstrat diaminobenzidina (DAB) koji je pripremljen prema uputama proizvođača. Vizualizacija se obavljala premještanjem rezova u otopinu DAB-a do pojave boje. Reakcija je zaustavljena vraćanjem rezova u 1xTBS. Nakon toga obojeni su se rezovi navlačili na predmetna stakalca i prekrili Vectamount pokrivalom i pokrovnim stakalcem.

4.3.4. Analiza

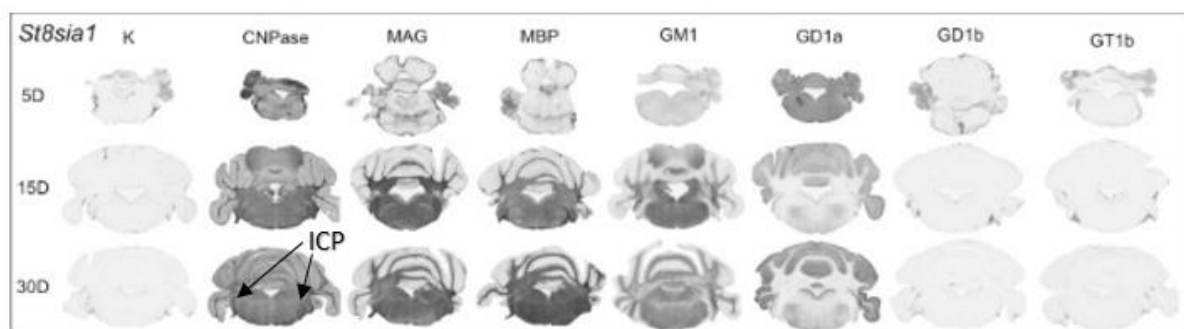
Preparati su prvo odskenirani pomoću skenera (Expression 11000XL, Epson, München, Germany), a zatim su slikani svjetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss, Axioskop 2 MOT, Jena, Germany) na koji je montirana kamera *Olympus DP70* (Olympus DP70, Optical Olympus, Japan). Korišteno povećanje pod kojim su slikani preparati je 100x i 200x, a veličina slikanog područja je $200 \times 200 \mu\text{m}$. Kvantifikacija slika se radila u računalnom programu *ImageJ (Fiji 101)* (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, SAD) prema modificiranom protokolu (36), a statistika je napravljena u programu *IBM SPSS Statistics verzija 22* (Quest Software Inc., Aliso Viejo, CA, SAD). Radi određivanja normalnosti distribucije podataka radio se Shapiro-Wilk test te, ovisno o distribuciji, birao se odgovarajući test. Budući da je distribucija bila nenormalna, koristili su se neparametrijski testovi. Mann-Whitney U test korišten je kako bismo utvrdili razlike dviju varijabli, a Kruskal Wallis test kako bismo utvrdili razlike između više varijabli. Razina značajnosti za oba testa je bila 0,05.

5. REZULTATI

Ekspresija markera mijelina i kompleksnih gangliozida proučavala se na dvijema regijama mozga: *Corpus callosum* (CC) te *Pedunculus cerebellaris inferior* (ICP). Koristili su se rezovi mozgovna genetički izmjenjenih *St8sia1* miševa koji ne ekspimiraju b-seriju gangliozida starosti 5 dana, 15 dana i 30 dana. Nakon provedenog imunohistokemijskog bojanja rezovi velikog i malog mozga su skenirani te je vidljiva pozitivna obojenost rezova na markere mijelina CNPaze, MAG i MBP i na kompleksne gangliozide GM1 i GD1a. Rezovi nisu pokazali imunokemijsko obojenje na kompleksne gangliozide GD1b i GT1b (Slika 5.1., Slika 5.2.).

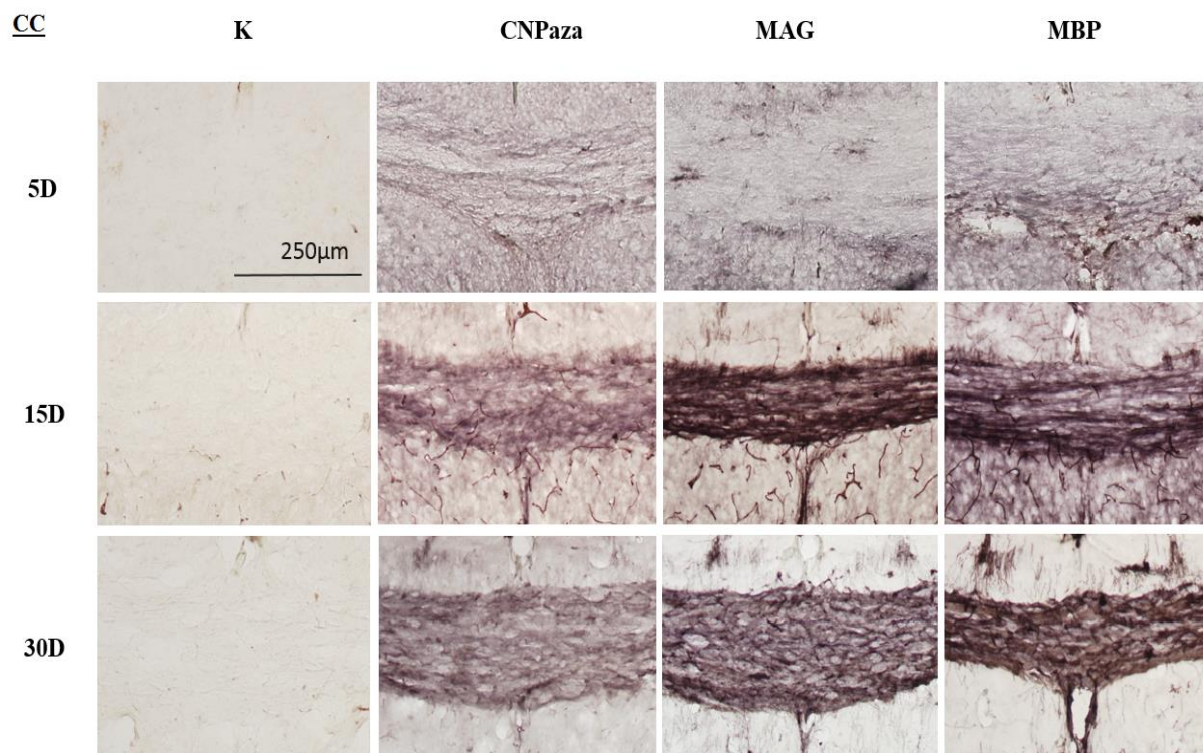


Slika 5.1. Prikaz imunohistokemijskog bojanja na markere mijelina CNPazu, MAG, MBP i kompleksne gangliozide GM1, GD1a, GD1b, GT1b na rezu velikog mozga genetički izmjenjenog *St8sia1* miša. Za analizu je korišteno označeno područje CC – *Corpus callosum*. K označava kontrolu.

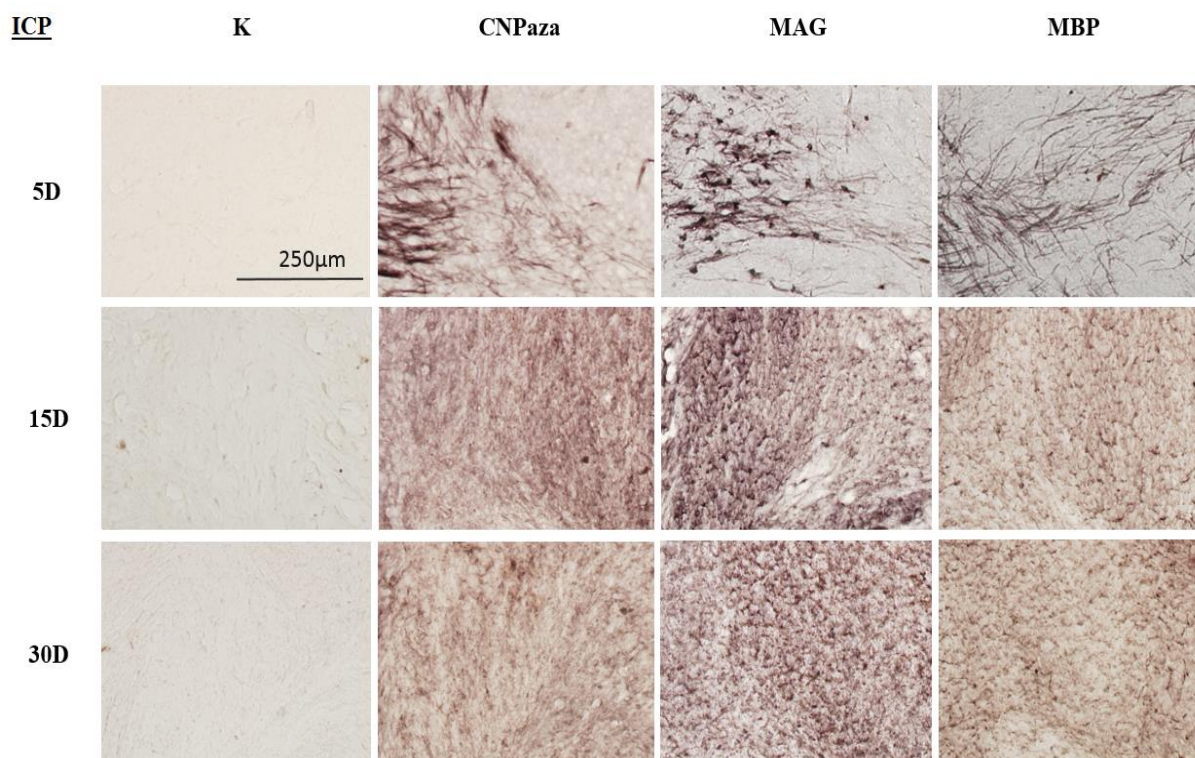


Slika 5.2. Prikaz imunohistokemijskog bojanja na markere mijelina CNP-azu, MAG, MBP i kompleksne gangliozide GM1, GD1a, GD1b, GT1b na rezu malog mozga genetički izmjenjenog *St8sia1* miša. Za analizu je korišteno označeno područje ICP - *Pedunculus cerebellaris inferior*. K označava kontrolu.

Koristeći svjetlosni mikroskop i kameru promatrale su se i slikale navedene regije mozgova detektirane protutijelima na CNP-azu, MAG i MBP. Dobivene su se slike (Slika 5.3., Slika 5.4.) nadalje analizirale u računalnom programu *Fiji*.



Slika 5.3. Prikaz imunohistokemijskog bojanja markera mijelina CNPaza, MAG i MBP u CC (*Corpus callosum*) regiji genetički izmjenjenog *St8sia1* miša starosti 5, 15 i 30 dana. K označuje kontrolu. Povećanje je 100x.



Slika 5.4. Prikaz imunohistokemijskog bojanja markera mijelina CNPaza, MAG i MBP u ICP (*Pedunculus cerebellaris inferior*) regiji genetički izmjenjenog *St8sia1* miša starosti 5, 15 i 30 dana. K označuje kontrolu. Povećanje je 100x.

Nakon provedene kvantifikacije slika u programu *Fiji*, dobiven je rezultat količine piksela koji odgovara pozitivnom obojenju stanica na CNPazu, MBP i MAG za svaku dobnu skupinu (Tablica 5.1., Tablica 5.2., i Tablica 5.3.).

Tablica 5.1. Srednje vrijednosti količine piksela koje odgovaraju količini pozitivnog obojenja markerima CNP-aza, MAG i MBP u analiziranim područjima CC i ICP kod miševa starosti 5 dana.

5D		
Analizirano područje		Srednja vrijednost količine piksela
CC	K	48,44
	CNPaza	72,31
	MAG	64,22
	MBP	70,90
ICP	K	48,72
	CNPaza	64,61
	MAG	66,40
	MBP	71,22

Tablica 5.2. Srednje vrijednosti količine piksela koje odgovaraju količini pozitivnog obojenja markerima CNPaza, MAG i MBP u analiziranim područjima CC i ICP kod miševa starosti 15 dana.

15D		
Analizirano područje		Srednja vrijednost količine piksela
CC	K	50,01
	CNPaza	114,75
	MAG	167,56
	MBP	123,10
ICP	K	52,07
	CNPaza	88,72
	MAG	114,17
	MBP	77,86

Tablica 5.3. Srednje vrijednosti količine piksela koje odgovaraju količini pozitivnog obojenja markerima CNPaza, MAG i MBP u analiziranim područjima CC i ICP kod miševa starosti 30 dana.

30D		
Analizirano područje		Srednja vrijednost količine piksela
CC	K	54,90
	CNPaza	106,85
	MAG	152,10
	MBP	117,45
ICP	K	45,17
	CNPaza	78,71
	MAG	95,27
	MBP	76,68

Statistika dobivenih rezultata radila se u programu *IBM SPSS Statistics v22*. Utvrđivanjem nenormalne raspodjele podataka Shapiro-Wilk testom, za daljnju analizu izabrani su neparametrijski Mann-Whitney test koji određuje razliku između dviju varijabli i Kruskal Wallis test koji određuje razlike između više varijabli.

Kruskal Wallis test se koristio za utvrđivanje razlike između starosti miševa (5D, 15D, 30D). Dobiveno je da postoji značajna razlika (prag značajnosti $p < 0,05$) s obzirom na starost miševa u analiziranim regijama mozga kod svih markera, osim za regiju ICP kod markera MBP (Tablica 5.4.).

Tablica 5.4. Prikaz rezultata statističke analize CNPaze, MAG-a i MBP-a u analiziranim regijama CC-a i ICP-a s obzirom na mišju starost.

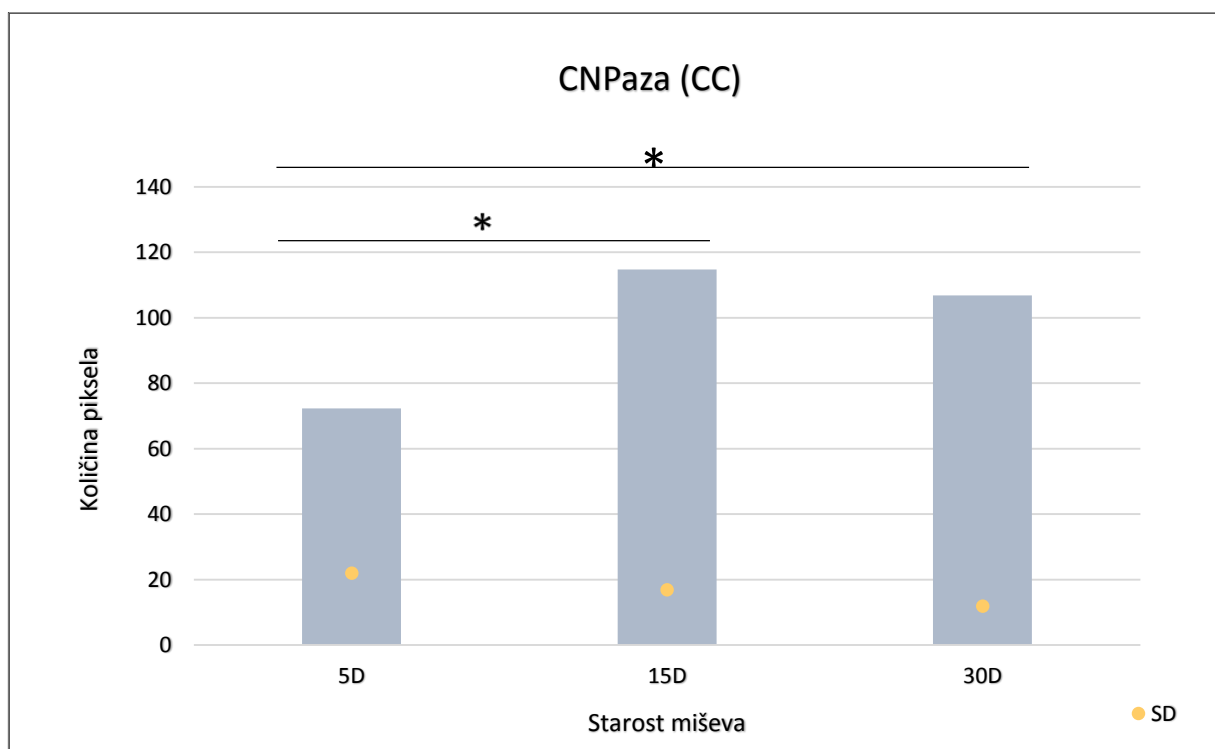
	CC CNPaza	ICP CNPaza	CC MAG	ICP MAG	CC MBP	ICP MBP
p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,744

Kruskal Wallis test se također koristio za utvrđivanje razlike između CC i ICP analiziranih regija mozga kod svih pojedinačnih markera mijelina. Utvrđena je statistički značajna razlika (Asymp.Sig.<0,05) između CC i ICP regije kod svih primjenjenih markera (Tablica 5.5.).

Tablica 5.5. Prikaz razlike između CC i ICP za CNPazu, MAG i MBP kod miševa svih dobnih skupina (5D,15D,30D).

	CNPaza			MAG			MBP		
	5D	15D	30D	5D	15D	30D	5D	15D	30D
p	0,025	0,025	0,025	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

Ekspresija CNP-aze u CC regiji najmanja je kod miševa starih 5 dana gdje količina piksela iznosi 72,31 (SD=21,91). Znanтно veća ekspresija je kod miševa starih 30 dana i iznosi 106,85 (SD=11,85), dok je kod miševa starih 15 dana najveća i iznosi 114,75 (SD=16,81) (Slika 5.5.).



Slika 5.5. Usporedba ekspresije CNP-aze u CC regiji kod miševa starih 5 (5D), 15 (15D) i 30 (30D) dana. Statistički značajna razlika označena je *.

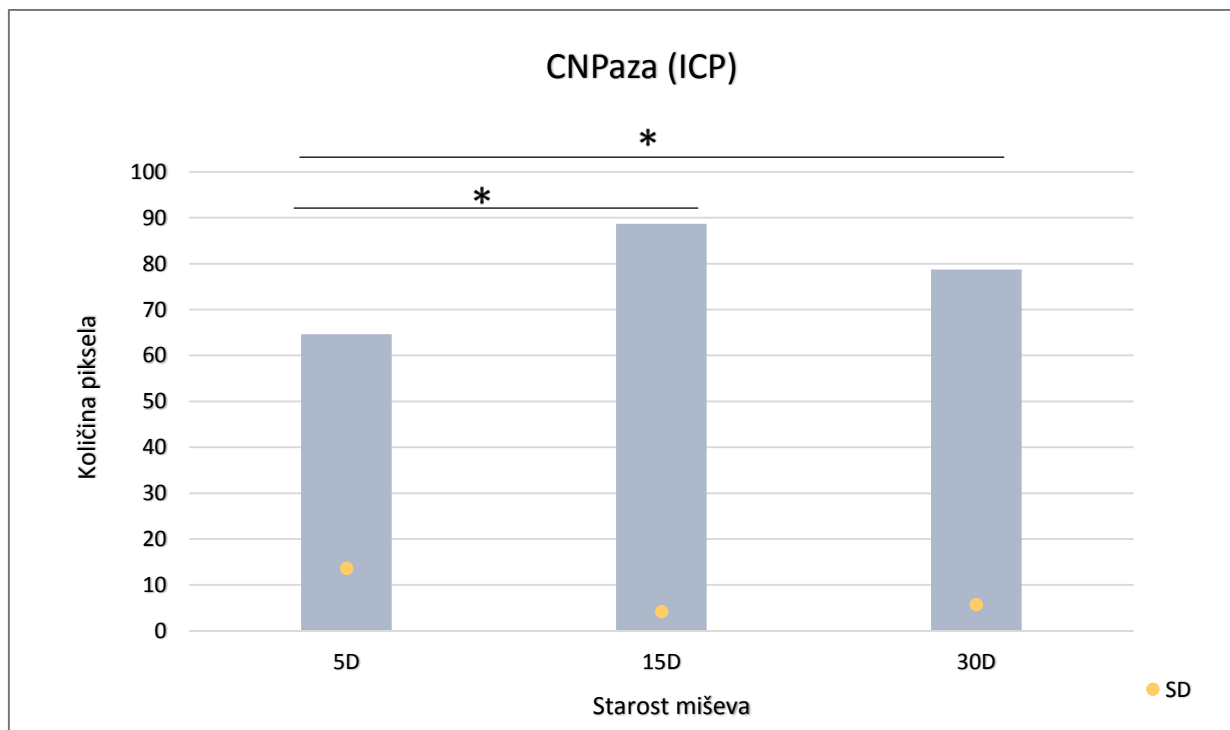
Utvrđivanje razlike između 5D i 15D, 5D i 30D i 15D i 30D starosti miševa za svaki marker u ICP i CC regiji provedeno je Mann Whitney U testom.

Statistički značajna razlika u ekspresiji za CNP-azu u CC regiji je utvrđena između 5 i 15 dana te 5 i 30 dana starih miševa (Tablica 5.6.).

Tablica 5.6. Prikaz razlike između 5D i 15D, 5D i 30D te 15D i 30D starih miševa za CNPazu u analiziranoj regiji CC.

CNPaza CC			
	5D i 15 D	5D i 30D	15 D i 30D
p	0,000	0,000	0,310

Izražaj CNPaze u ICP regiji, isto kao i u CC regiji, najmanja je kod miševa starih 5 dana, a količina piksela iznosi 64,61 (SD=13,59). Zatim veći izražaj imaju miševi stari 30 dana gdje količina piksela iznosi 78,72 (SD=5,70) i miševi od 15 dana gdje iznosi 88,72 (SD= 4,14) (Slika 5.6.).



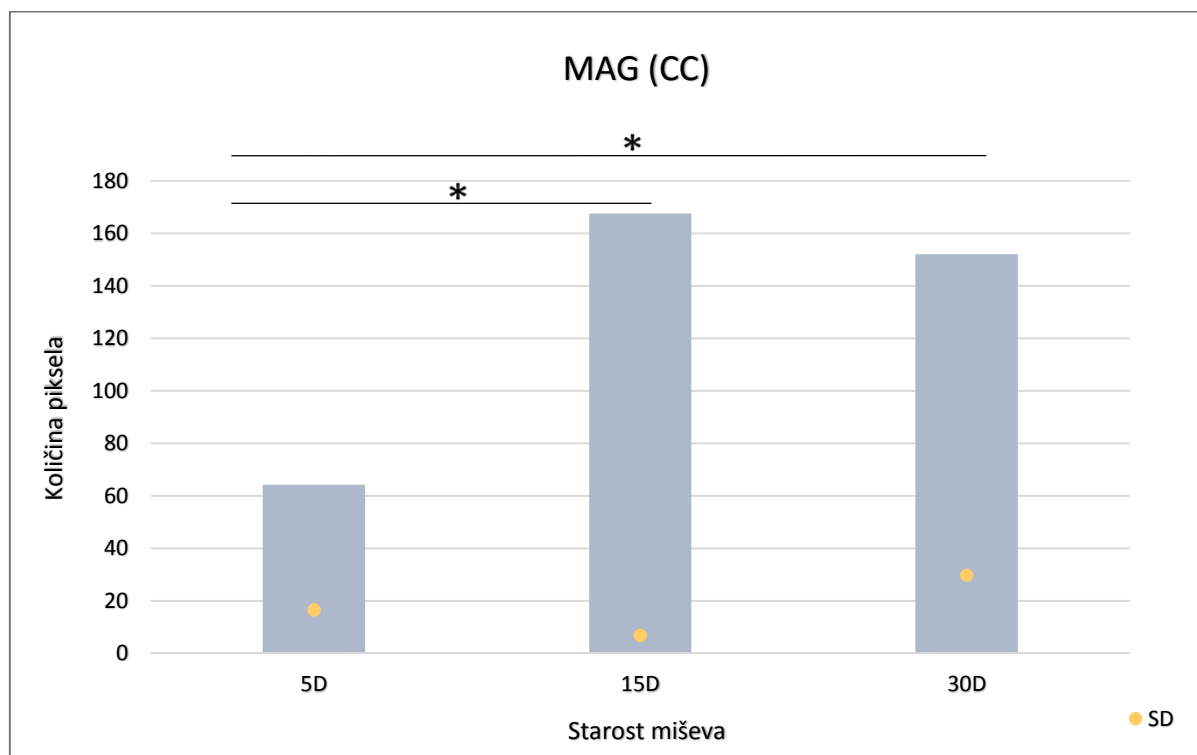
Slika 5.6. Usporedba ekspresije CNP-aze u ICP regiji kod miševa starih 5 (5D), 15 (15D) i 30 (30D) dana. Statistički značajna razlika označena je *.

Statistički značajna razlika za ekspresiju CNP-aze u ICP regiji je utvrđena između istih dobnih skupina kao i za CC regiju. (Tablica 5.7.)

Tablica 5.7. Prikaz razlike između 5D i 15D, 5D i 30D te 15D i 30D starih miševa za CNP-azu u analiziranoj regiji ICP.

CNPaza ICP			
	5D i 15 D	5D i 30D	15D i 30D
p	0,000	0,001	0,468

Najmanji izražaj MAG-a u CC regiji imaju miševi stari 5 dana, a količina piksela iznosi 64,22 (SD=16,47), veći izražaj imaju miševi stari 30 dana gdje je količina piksela 152,01 (SD=29,73), dok neznatno veći izražaj imaju miševi stari 15 dana gdje količina piksela iznosi 167,55 (SD=6,79) (Slika 5.7.).



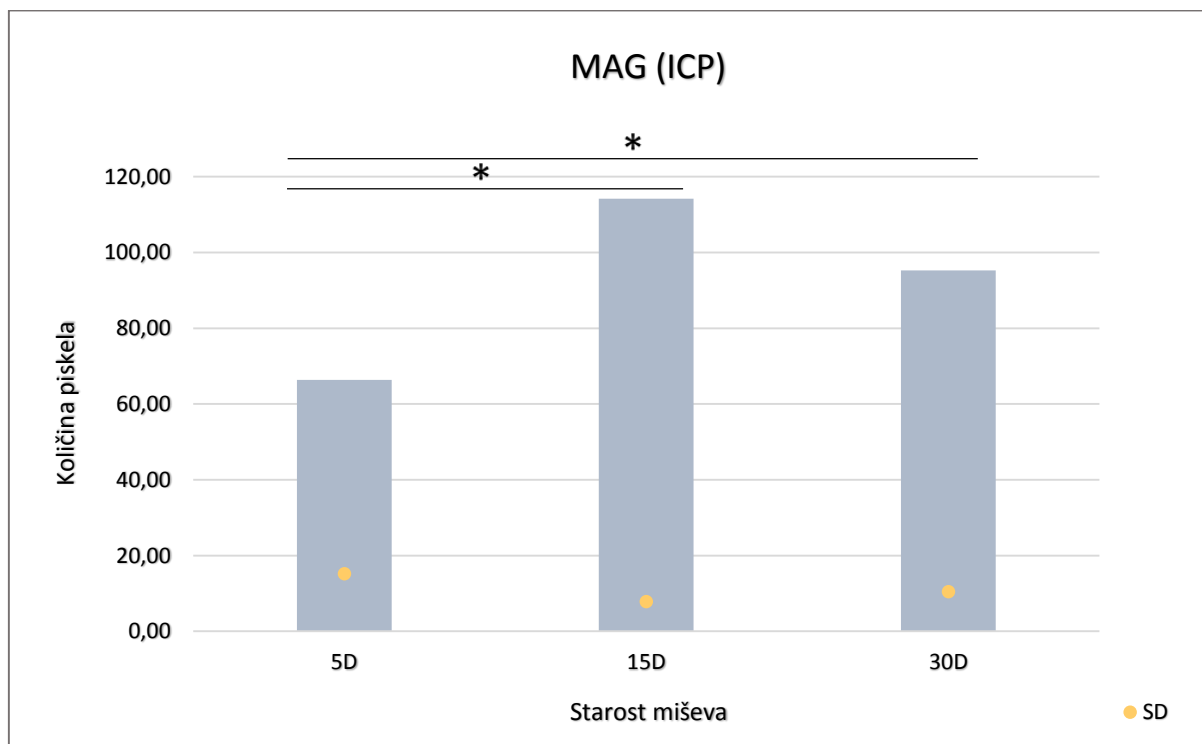
Slika 5.7. Usporedba ekspresije MAG-a u CC regiji kod miševa starih 5 (5D), 15 (15D) i 30 (30D) dana. Statistički značajna razlika označena je *.

Statistički značajna razlika u ekspresiji također je dobivena za MAG marker kod miševa starih 5 dana u usporedbi s miševima starim 15 i 30 u CC regiji (Tablica 5.8.).

Tablica 5.8. Prikaz razlike između 5D i 15D, 5D i 30D te 15D i 30D starih miševa za MAG u analiziranoj regiji CC.

MAG CC			
	5D i 15D	5D i 30D	15D i 30D
p	0,000	0,000	0,239

U ICP regiji ekspresija MAG-a je najmanja kod miševa starih 5 dana, a količina piksela iznosi 66,40 (SD=15,17). Nadalje, veća ekspresija bilježi se kod miševa starih 30 dana gdje iznosi 95,27 (SD=10,46) i 15 dana gdje iznosi 114,165 (SD=7,80) (Slika 5.8.).



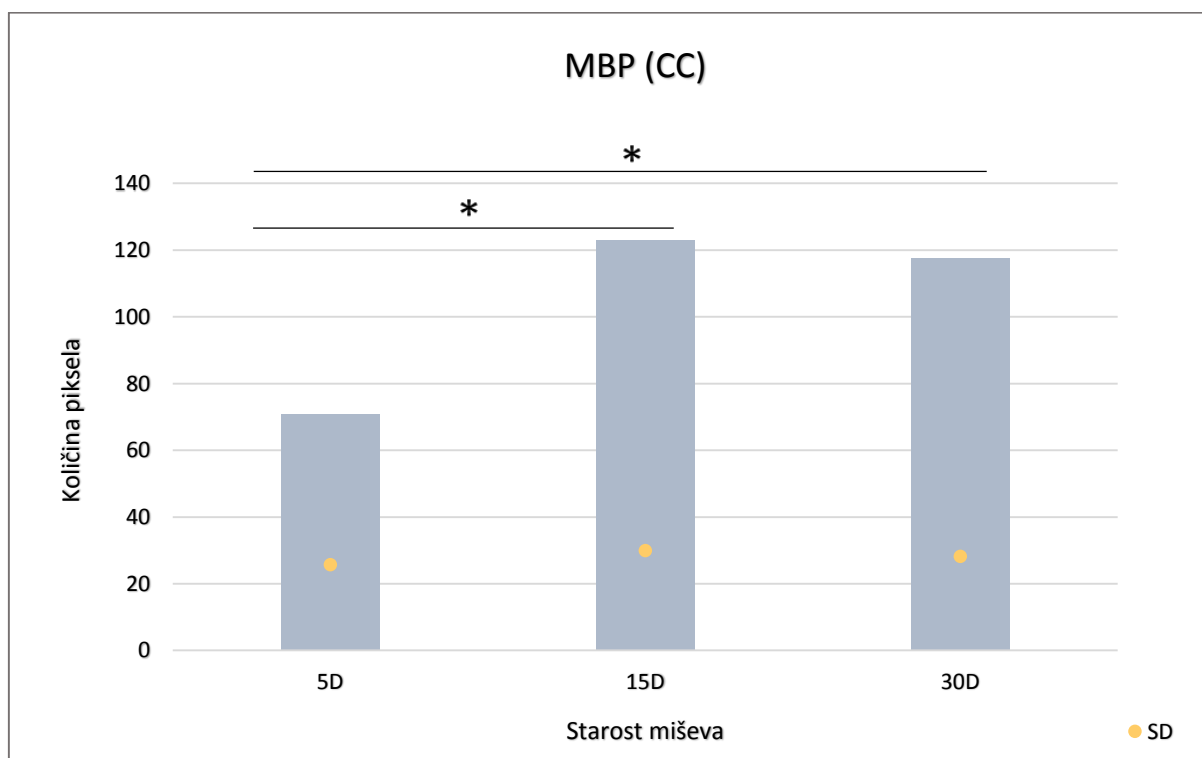
Slika 5.8. Usporedba ekspresije MAG-a u ICP regiji kod miševa starih 5 (5D), 15 (15D) i 30 dana (30D). Statistički značajna razlika označena je *.

Statistički značajna razlika u ekspresiji MAG-a postoji u ICP regiji između istih dobnih skupina kao i za CC regiju. (Tablica 5.9.)

Tablica 5.9. Prikaz razlike između 5D i 15D, 5D i 30D te 15D i 30D starih miševa za MAG protutijelo u analiziranoj regiji CC.

MAG ICP			
	5D i 15D	5D i 30D	15D i 30D
p	0,000	0,002	0,056

Isto kao i kod CNP-aze i MAG-a, ekspresija MBP-a u CC regiji najmanja je kod miševa starosti 5 dana gdje količina piksela iznosi 70,90 (SD=25,76). Veću ekspresiju bilježe miševi od 30 dana gdje iznosi 117,45 (SD=28,29), dok je najveća ekspresija kod 15 dana starih miševa i količina piksela iznosi 123,10 (SD=29,30) (Slika 5.9.).



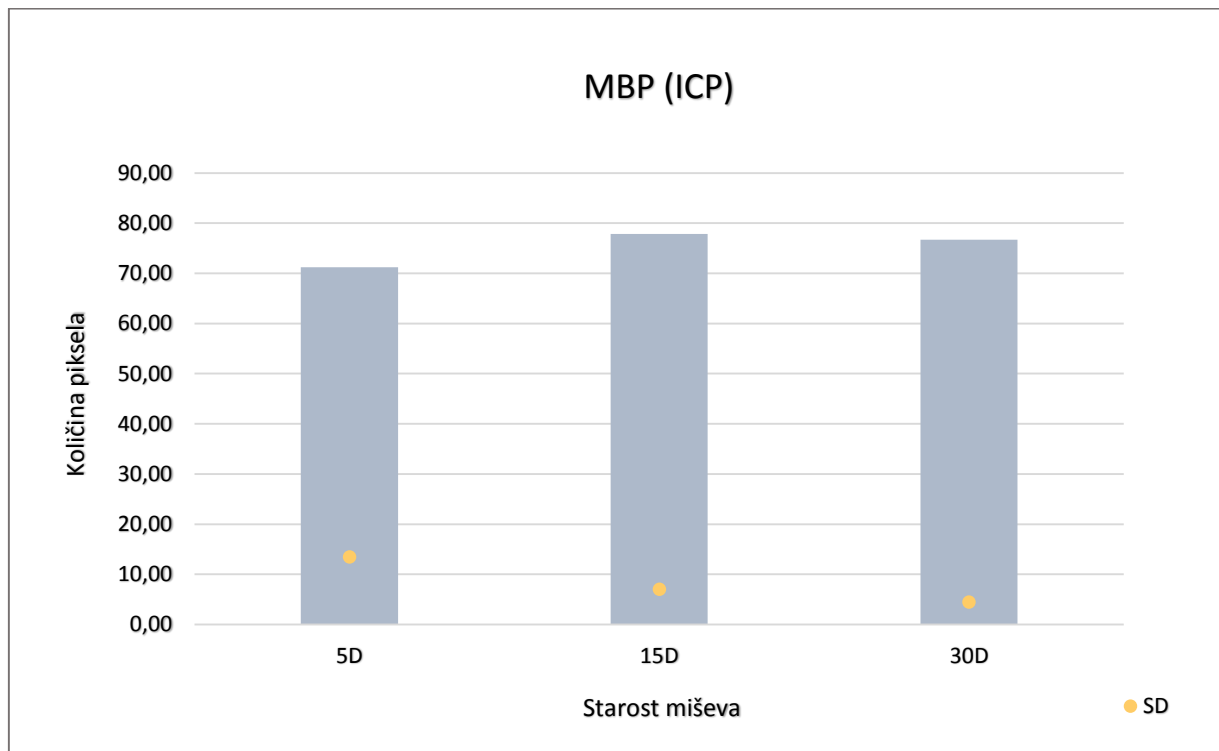
Slika 5.9. Usporedba ekspresije MBP-a u CC regiji kod miševa starih 5 (5D), 15 (15D) i 30 (30D) dana. Statistički značajna razlika označena je *.

Isto kao i za CNPazu i MAG, statistički značajna razlika u ekspresiji MBP-a u CC regiji je dobivena kod 5 dana starih miševa u odnosu na miševе stare 15 i 30 dana (Tablica 5.10.).

Tablica 5.10. Prikaz razlike između 5D i 15D, 5D i 30D te 15D i 30D starih miševa za MBP protutijelo u analiziranoj regiji CC.

MBP CC			
	5D i 15D	5D i 30D	15D i 30D
p	0,001	0,006	0,564

Ekspresija MBP-a u ICP regiji vrlo se malo razlikuje između miševa starih 5, 15 i 30 dana. Kod miševa starih 5 dana količina piksela iznosi 71,22 (SD=13,47), kod miševa starosti 30 dana iznosi 76,67 (SD=4,46), dok kod miševa starosti 15 dana iznosi 77,85 (SD=7,02) (Slika 5.10.).



Slika 5.10. Usporedba ekspresije MBP-a u ICP regiji kod miševa starih 5 (5D), 15 (15D) i 30 (30D) dana. Statistički značajna razlika označena je *.

Statistički značajna razlika u ekspresiji MBP-a u ICP regiji nije utvrđena između niti jedne dobne skupine budući da je ekspresija vrlo slična (Tablica 5.11.).

Tablica 5.11. Prikaz razlike između 5D i 15D, 5D i 30D te 15D i 30D starih miševa za MBP protutijelo u analiziranoj regiji ICP.

MBP ICP			
	5D i 15D	5D i 30D	15D i 30D
p	0,880	0,450	0,597

6. RASPRAVA

Mijelinska membrana koja izolira aksone doprinosi bržoj provodljivosti signala i time učinkovitoj funkciji živčanog sutava (8). Membranu oblikuju lipidi (glikolipidi, kolesterol i fosfolipidi) te mijelin specifični proteini (MAG, MBP i CNPaza) (7). Na mijelinskoj membrani, interakcijom kolesterola te glikosfingolipida (u koje ubrajamo gangliozide) stvaraju se uređeni dijelovi membrane nazvane lipidnim splavima, a koje sudjeluju u signalizaciji procesa vezanih za mijelinizaciju i stabilnost mijelinske membrane (21). Poremećaj u sastavu lipidnih splavi dovodi do njihovog neispravnog formiranja i nepotpunog održavanja funkcije mijelinske membrane (22). Promjene u procesima mijelinizacije uzrokuju ili pridonose raznim neurološkim bolestima u koje ubrajamo multiplu sklerozu, Alzheimerovu bolest, Parkinsonovu bolest, spektralni poremećaj autizma, shizofreniju. Sve ove bolesti bilježe smanjenu ekspresiju mijelin specifičnih proteina i ukazuju na važnosti ispravne funkcije ovih proteina u održavanju normalne interakcije akona i mijelina u mozgu (12).

Za ovo istraživanje su se koristili genetički izmjenjeni *St8sia1* miševi s poremećenim biosintetskim putem gangliozida. Ovakvi miševi imaju deficit u sintezi GD3 gangliozida, koji je prekursor b-serije gangliozida (37). Budući da su složeni gangliozidi a-serije (GM1 i GD1a) i b-serije (GD1b i GT1b) iznimno važni za akonsko-mijelinsku povezanost i dugoročnu stabilnost aksona, proučavao se utjecaj nedostatka ekspresije b-serije gangliozida. Ekspresija gangliozida postupno se mijenja iz jednostavnih gangliozida, kao što su GM3 i GD3 koji su zastupljeni u embrionalnom razvoju, u složenije gangliozide kao što su GM1, GD1a, GD1b i GT1b koji se pojavljuju tijekom samog razvoja mozga (25). U ovom istraživanju ekspresija GM1 i GD1a je zato očekivano više izražena u razvijenijim miševima starosti od 15 i 30 dana, u odnosu na miševe stare 5 dana.

Speifični protein mijelina, MAG djeluje kao ligand koji veže GD1a i GT1b gangliozide u lipidnim splavima u mijelinskoj membrani. Proučavanjem *MAG-KO* miša koji ne ekspimiraju MAG protein, utvrdile su se njegove važne uloge u mijelinizaciji. Potvrdilo se kako je *MAG-KO* miš nakon mijelinizacije pokazivao razna oštećenja u akson-mijelin interakciji koja su uključivala tanji promjera aksona, odgađanje razvijanja Ranvierovih čvorova, smanjenu zaštitu aksona od neuroloških toksina te progresivno degradiranje aksona, a sve to dovodi do smanjene provodljivosti signala. Zaključeno je kako MAG protein doprinosi pravilnom razvoju aksona, stabilizaciji i funkcionalnosti akson-mijelin interakcija (37, 38).

Proučavanjem *B4galnt*-KO miševa koji ne ekspimiraju kompleksne gangliozide, utvrđeno je da njihov nedostatak dovodi do nestabilnosti aksona, poremećaja u stvaranju mijelina i internoda, nepravilne organizacije natrijevih kanala, a što se više razvijaju pokazuju razne neurološke patologije. Genetički izmijenjeni miševi *St8sial1* nasuprot njima, nisu pokazali nikakve abnormalnosti u aksonu i mijelinu, a razlog tome je njihova povećana ekspresija a-serije gangliozida koja nadomješta nedostatak b-serije gangliozida (37). U istraživanju (33) koje proučava distribuciju gangliozida u mozgu korištenjem imunohistokemijske analize, u *corpus callosum-u* utvrđena je ekspresija sva četiri kompleksna gangliozida, dok je u *pedunculus cerebellaris inferior* regiji zamijećena ekspresija GM1 i GT1b gangliozida. U ovom navedenom istraživanju je, tako, potvrđeno da usprkos nedostatku GT1b, obilna ekspresija GD1a može održati vezanje MAG-a u *corpus callosum-u* i omogućiti učinkovit aktin-mijelinski sustav i provodljivost signala. Iako u *pedunculus cerebellaris inferior* nema ekspresije GD1a, MAG se, osim preko gangliozida, može vezati i s drugim ligandima što objašnjava i njegovu ekspresiju u toj regiji (39). Budući da je ekspresija MAG-a manja u toj regiji, moguće je da se MAG veže za gangliozide visokim afinitetom. Povećanje ekspresije GM1 u ovom slučaju može doprinijeti stvaranju amiloidnih plakova karakterističnih za Alzheimerovu bolest koja je obilježena postupnim gubitkom pamćenja s pogoršanjem stanja tijekom godina. Utvrđeno je da se amiloidni protein, koji stvara plakove, veže za gangliozid GM1 u lipidnim splavima te tako doprinosi njihovom nakupljanju u mozgu i utječe na progresiju same bolesti (40).

Osim MAG-a, MBP i CNP-aza pripadaju specifičnim proteinima koji doprinose mijelinizaciji. MBP protein omogućava spajanje nasuprotnih citoplazmatskih lica mijelinske ovojnice te stvaranjem mreže i njihovim spajanjem sudjeluje u njihovom zbijanju i stvaranju kompaktne mijelinske membrane izgurujući citoplazmatski prostor (41). Protein koji sprječava preveliko zbijanje putem MBP-a je protein CNP-aza pronađen u citoplazmi koja se nalazi između slojeva kompaktnog mijelina. To je dokazano miševima kojima nedostaje CNPaza, a koji su pokazivali bitno smanjenje citoplazmatskih područja u mijelinskoj membrani i previše zbijene mijelinske komponente (42). Osim toga, CNP protein ima ulogu u reguliranju i održavanju citoplazmatskih kanala kojim osigurava energijski metabolizam u mijelinskoj membrani. Utvrđeno je da miševi kojima nedostaje CNP-aza pokazuju razne patološke promjene aksona, koje se mogu objasniti nepravilnim radom kanala i nedostatnim doprimanjima energetske metabolita. U Alzheimerovoj bolesti, tako, smanjena metabolička potpora mozga dovodi do ubrzanog razvitka bolesti i daljnjeg oštećenja kognitivnih funkcija (43).

Utvrđeno je da se ekspresija MBP-a pojavljuje oko 6.-7. dana kada mijelinizacija započinje, a obilnu ekspresiju pokazuje u 14. danu mijelinizacije, dok se u 27. danu ekspresija u manjoj mjeri smanjuje (14). Osim toga, otkriveno je da marker CNPaza pojavljuje čak i prije samog početka mijelinizacije te nastavlja rasti (44). Ovim istraživanjem u *corpus callosum* regiji utvrdili smo da je najveća zastupljenost svih markera mijelina u 15. danu mijelinizacije te da zajedno djeluju u organiziranju mijelinske membrane i kompaktnog mijelina te osiguravanju učinkovite akson-mijelinske interakcije. Ne dolazi do većih promjena u ekspresiji markera mijelina u 30 dana starim miševima u odnosu na 15 dana stare miševе, što znači da se mijelinska membrana značajno razvila. U *pedunculus cerebellaris inferior* regiji ekspresija MBP-a u miševim starim 5, 15 i 30 dana se neznatno razlikuje te nam takvi rezultati ukazuju na nekompaktan mijelin i nedovoljno razvijanje mijelinske membrane.

Nedostatak ovog istraživanja je što nisu promatrani, odnosno analizirani i stariji miševi s obzirom na to da se mijelinizacija ne prestaje odvijati tijekom života. Osim što gangliozid GT1b veže MAG, utvrđeno je da gangliozidi b-serije također sudjeluju u adheziji aksona i glija stanica te u rastu i razvijanju neurona u zrele stanice (45). Trebalo bi se zato detaljnije proučiti utjecaj b-serije gangliozda u procesu mijelinizacije zbog mogućih neuroloških nedostataka koji bi se možda pojavili kasnije u životu.

7. ZAKLJUČAK

Provedbom istraživanja i razmatranjem rezultata dolazi se do sljedećih zaključaka:

1. Nedostak b-serije gangliozida u mozgu genetički izmijenjenog *St8sial1* miša dovodi do povećane ekspresije a-serije gangliozida, posebice u mozgovima miševa starih 15 i 30 dana
2. Postoji statistički značajna razlika u ekspresiji markera mijelina CNPaze, MAG i MBP kod 5 dana starih miševa u usporedbi s miševima starim 15 i 30 dana u regiji *corpus callosum*
3. Statistički značajna razlika u ekspresiji markera mijelina CNPaze i MAG-a utvrđena je kod 5 dana starih miševa u odnosu na miševe stare 15 i 30 dana u regiji *pedunculus cerebellaris inferior*, dok za MBP marker ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji između tih dobnih skupina
4. Razlika u ekspresiji CNPaze, MAG-a i MBP-a postoji između 15 dana starih miševa i 30 dana starih miševa u obje analizirane regije mozga, ali je ona statistički zanemariva

8. SAŽETAK

Uvod: Mijelinska membrana, koja u svojem sastavu sadrži glikolipide i kolesterol te specifične proteine MAG, MBP i CNPazu, omatanjem oko aksona sudjeluje u boljoj provodljivosti signala u živčanom tkivu. Na mijelinskoj membrani nalazimo lipidne splavi, manje fluidne dijelove membrane koji sudjeluju u procesima vezanim uz rast i razvoj neurona te stvaranje mijelina.

Ciljevi: Odrediti ekspresiju kompleksnih gangliozida i markera mijelina u mozgu genetički izmijenjenog miša *St8sia1* s nedostatkom sinteze b-serije gangliozida u svim fazama procesa mijelinizacije.

Materijali i metode: Za istraživanje su se koristili mozgovi genetički izmijenjenih miševa *St8sia1* starosti 5, 15 i 30 dana. Radila se genotipizacija nakon koje su životinje žrtvovane, njihovi mozgovi fiksirani, krioprotektirani te smrznuti. Korištenjem primarnih protutijela CNPaze, MAG, MBP, GM1, GD1a, GD1b i GT1b provedena je imunohistokemijska analiza. Rezultati su kvantificirani u programu *Fiji* i analizirani u programu IBM SPSS Statistics 22.

Rezultati: Statistički značajna razlika u ekspresiji je pronađena kod 5 dana starih miševa u usporedbi na 15 i 30 dana stare miševe u obje analizirane regije (CC i ICP) za sve markere mijelina osim za MBP u ICP regiji. Izražaj a-serije gangliozida povećan je u 15 i 30 dana starim miševima.

Zaključak: Ekspresija svih markera mijelina i kompleksnih gangliozida GM1 i GD1a prije mijelinizacije je smanjena u odnosu na ekspresiju tijekom i nakon procesa mijelinizacije u genetički izmijenjenom mišu *St8sia1*.

Ključne riječi: gangliozidi; lipidne splavi; mijelinizacija; *Corpus callosum*; *Pedunculus cerebellaris inferior*

9. SUMMARY

Expression of complex gangliosides before and after myelination process in brain of genetically modified mouse *St8sia1*

Introduction: The myelin membrane, which contains glycolipids, cholesterol and specific proteins MAG, MBP and CNPase in its composition, wraps around the axon contributing to better signaling in the nerve tissue. The less fluid parts of the membrane called lipid rafts are located on the myelin membrane. Lipid rafts participate in the processes related to the growth and development of neurons and myelin.

Goals: To determine the expression of the complex gangliosides and myelin markers in the brain of the genetically modified mouse *St8sia1* that lacks b-series ganglioside synthesis at all stages of the myelination process.

Materials and methods: The brains of genetically modified *St8sia1* mice aged 5, 15 and 30 days were used for the study. After the genotyping has been performed, animals were sacrificed, their brains fixed, cryoprotected and frozen. Immunohistochemical analysis was performed using primary antibodies CNPase, MAG, MBP, GM1, GD1a, GD1b and GT1b. The results were quantified in the program *Fiji* and analyzed in the program IBM SPSS Statistics 22.

Results: A statistically significant difference in expression was found in 5 days old mice compared to 15 and 30 days old mice in both regions for all myelin markers except MBP in the ICP region. Ganglioside a-series expression was increased in 15 and 30 days old mice.

Conclusion: Expression of all myelin markers and complex gangliosides GM1 and GD1a before myelination was reduced compared to their expression during and after the myelination process in the genetically modified mouse *St8sia1*.

Key words: gangliosides; lipid rafts; myelination; *Corpus callosum*; *Pedunculus cerebellaris inferior*

10. LITERATURA

1. Bajek S, Bobinac D, Jerković R, Malnar D, Marić I. Sustavna anatomija čovjeka. 1. izd. Rijeka: Digital Point tiskara d.o.o.; 2007.
2. Chiu L (Editor). Brain Facts: A Primer On The Brain And Nervous System [Internet]. 8. izd. Washington, D.C.: Society for Neuroscience; 2018. Available from: www.brainfacts.org
3. Fields DR. A new mechanism of nervous system plasticity: activity-dependent myelination. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2015;16(12):756–67. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6310485/>
4. Sakai T, Mikami A, Suzuki J, Miyabe-Nishiwaki T, Matsui M, Tomonaga M, et al. Developmental trajectory of the corpus callosum from infancy to the juvenile stage: Comparative MRI between chimpanzees and humans. *PLoS One* [Internet]. 2017;12(6):1–22. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5487015/>
5. 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* [Internet]. 2015;16(9):21215–36. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4613250/>
6. Branson HM. Normal Myelination: A Practical Pictorial Review. *Neuroimaging Clin N Am* [Internet]. 2013;23(2):183–95. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1052514912002055?via%3Dihub>
7. Salzer JL, Zalc B. Myelination. *Curr Biol* [Internet]. 2016;26(20):R971–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27780071>
8. Guleria S, Kelly TG. Myelin, Myelination, and Corresponding Magnetic Resonance Imaging Changes. *Radiol Clin North Am* [Internet]. 2014;52(2):227–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rcl.2013.11.009>
9. Simons M, Nave KA. Oligodendrocytes: Myelination and axonal support. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2016;8(1):1–16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4691794/>

10. Purger D, Gibson EM, Monje M. Myelin plasticity in the central nervous system. *Neuropharmacology* [Internet]. 2016;110:563–73. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390815300472?via%3Dihub>
11. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, White LE. *Neuroznanost*. 5.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2016.
12. Nasrabady SE, Rizvi B, Goldman JE, Brickman AM. White matter changes in Alzheimer's disease: a focus on myelin and oligodendrocytes. *Acta Neuropathol Commun* [Internet]. 2018;6(1):22. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5834839/>
13. Gilmore JH, Knickmeyer RC, Gao W. Imaging structural and functional brain development in early childhood. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2018;19(3):123–37. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5987539/>
14. Birey F, Kokkosis AG, Aguirre A. Oligodendroglia-lineage cells in brain plasticity, homeostasis and psychiatric disorders. *Curr Opin Neurobiol*. 2017;47:93–103.
15. Fields RD. White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends Neurosci* [Internet]. 2008;31(7):361–70. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18538868>
16. Esposito S, Bonavita S, Sparaco M, Gallo A, Tedeschi G. The role of diet in multiple sclerosis: A review. *Nutr Neurosci* [Internet]. 2018;21(6):377–90. Available from: <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1303016>
17. Hartley MD, Banerji T, Tagge IJ, Kirkemo LL, Chaudhary P, Calkins E, et al. Myelin repair stimulated by CNS-selective thyroid hormone action. *JCI Insight* [Internet]. 2019;4(8). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6538346/>
18. Kregel U, Bousquet PA. Molecular recognition of gangliosides and their potential for cancer immunotherapies. *Front Immunol* [Internet]. 2014;5(JUL):1–11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4104838/>
19. Appadu AR. Lipid raft formation and peptide-lipid interactions in myelin model membranes [Internet]. *Theses and Dissertations (Comprehensive)*. 2012. Available from: <https://scholars.wlu.ca/etd/1124>
20. Cooper GM, Hausman RE, Lauc G, Zoldoš V. Stanica: molekularni pristup [Internet].

- 5.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. Available from:
<http://www.ljevak.hr/knjige/knjiga-3285>
21. Ozgen H, Baron W, Hoekstra D, Kahya N. Oligodendroglial membrane dynamics in relation to myelin biogenesis. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2016;73(17):3291–310. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4967101/>
 22. Sonnino S, Aureli M, Mauri L, Ciampa MG, Prinetti A. Membrane lipid domains in the nervous system. *Front Biosci (Landmark Ed)* [Internet]. 2015;20(2):280–302. Available from: <https://www.bioscience.org/2015/v20/af/4309/fulltext.htm>
 23. Malchiodi-Albedi F, Paradisi S, Matteucci A, Frank C, Diociaiuti M. Amyloid oligomer neurotoxicity, calcium dysregulation, and lipid rafts. *Int J Alzheimers Dis* [Internet]. 2011;2011. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ijad/2011/906964/>
 24. Allende ML, Proia RL. Simplifying complexity: Genetically resculpting glycosphingolipid synthesis pathways in mice to reveal function. *Glycoconj J* [Internet]. 2014;31(9):613–22. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4245496/>
 25. Schnaar RL. Brain gangliosides in axon-myelin stability and axon regeneration. *FEBS Lett* [Internet]. 2010;584(9):1741–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19822144>
 26. Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology* [Internet]. 2007;17(1):1–13. Available from: <https://academic.oup.com/glycob/article/17/1/1R/715963>
 27. Lauc G, Heffer-Lauc M. Shedding and uptake of gangliosides and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2006;1760(4):584–602. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416505003788?via%3Dihub>
 28. Kolter T. Ganglioside Biochemistry. *ISRN Biochem* [Internet]. 2012;2012:1–36. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25969757>
 29. Daniotti JL, Iglesias-Bartolomé R. Metabolic pathways and intracellular trafficking of gangliosides. *IUBMB Life* [Internet]. 2011;63(7):513–20. Available from:

- <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/iub.477>
30. Sandhoff R, Sandhoff K. Emerging concepts of ganglioside metabolism. *FEBS Lett* [Internet]. 2018;592(23):3835–64. Available from:
<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1873-3468.13114>
 31. Yu RK, Tsai Y, Ariga T. Functional roles of gangliosides in neurodevelopment. 2014;37(6):1230–44. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3895947/>
 32. Zhang X, Kiechle FL. Review: Glycosphingolipids in Health and Disease. *Ann Clin Lab Sci* [Internet]. 2004;34(1):3–13. Available from:
<http://www.annclinlabsci.org/content/34/1/3.long>
 33. 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* [Internet]. 2013;8(9):1–11. Available from:
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0075720>
 34. Rösner H. Developmental Expression and possible roles of gangliosides. *Prog Mol Subcell Biol* [Internet]. 2003;32:49–73. Available from:
http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-55557-2_3
 35. Ferreira CR, Gahl WA. Lysosomal storage diseases. *Metab Dis Found Clin Manag Genet Pathol* [Internet]. 2017;2:367–440. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5685203/>
 36. Ivić V. Poveznica upale niskog stupnja i razvoja rezistencije na leptin i inzulin u mozgu odraslih pretilih Sprague-Dawley štakora liječenih metforminom i liraglutidom. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; 2017.
 37. Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Sialic acids in the brain: Gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol Rev* [Internet]. 2014;94(2):461–518. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4044301/>
 38. Boghdadi AG, Teo L, Bourne JA. The Involvement of the Myelin-Associated Inhibitors and Their Receptors in CNS Plasticity and Injury. *Mol Neurobiol*. 2018;55(3):1831–46.

39. Baldwin KT, Giger RJ. Insights into the physiological role of CNS regeneration inhibitors. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2015;8(June):1–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4462676/>
40. Olsen ASB, Færgeman NJ. Sphingolipids: Membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases. *Open Biol* [Internet]. 2017;7(5). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5451547/>
41. Snaidero N, Velte C, Myllykoski M, Raasakka A, Ignatev A, Werner HB, et al. Antagonistic Functions of MBP and CNP Establish Cytosolic Channels in CNS Myelin. *Cell Rep* [Internet]. 2017;18(2):314–23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5263235/>
42. Snaidero N, Möbius W, Czopka T, Hekking LHP, Mathisen C, Verkleij D, et al. Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell* [Internet]. 2014;156(1–2):277–90. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4862569/>
43. Saab AS, Nave KA. Myelin dynamics: protecting and shaping neuronal functions. *Curr Opin Neurobiol* [Internet]. 2017;47:104–12. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S095943881730168X?via%3Dihub>
44. Braun PE, Sandillon F, Edwards A, Matthieu JM, Privat A. Immunocytochemical localization by electron microscopy of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in developing oligodendrocytes of normal and mutant brain. *J Neurosci* [Internet]. 1988;8(8):3057–66. Available from: <https://www.jneurosci.org/content/8/8/3057.long>
45. McGonigal R, Barrie JA, Yao D, McLaughlin M, Cunningham ME, Rowan EG, et al. Glial sulfatides and neuronal complex gangliosides are functionally interdependent in maintaining myelinating axon integrity. *J Neurosci* [Internet]. 2019;39(1):63–77. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6325269/?fbclid=IwAR1HWb5FeThim2kzW76hXMWhkEeJajxCpA4u-cUUP6x3xezYclt2dt91h80>

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Tea Markulak

Datum i mjesto rođenja:

2. srpnja 1995., Osijek

Obrazovanje:

- 2017. - 2019. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku
- 2014. - 2017. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku
- 2010. - 2014. Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku
- 2002. - 2010. Osnovna škola "Dobriša Cesarić"