

# Lipidom mozga miša s isključenim genom ST8Sia1

---

**Grbavac, Josip**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:653769>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-07**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I**  
**DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINE**

**Josip Grbavac**

**LIPIDOM MOZGA MIŠA S**  
**ISKLJUČENIM GENOM ST8SIA1**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I**  
**DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINE**

**Josip Grbavac**

**LIPIDOM MOZGA MIŠA S**  
**ISKLJUČENIM GENOM ST8SIA1**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

Rad je ostvaren u Laboratoriju za neurobiologiju pri Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku te dijelom u Kliničkom bolničkom centru Osijek

Mentor rada: prof. dr. sc. Marija Heffer

Rad ima 45 listova, 2 tablice i 15 slika.

## **Predgovor radu**

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Mariji Heffer na pruženoj prilici, strpljenju i volji. Bilo mi je jedno lijepo iskustvo raditi s Vama, puno novih izazova i još kreativnijih načina kako ih zaobići.*

*Također se zahvaljujem cijelom laboratoriju za neuroznanost i biologiju, a posebno dr.sc. Miloradu Zjaliću na strpljivom vođenju te mojim kolegama Nataliji i Adrianu, bez njih ovo ne bi išlo. S njima isto nije išlo najlakše.*

*Najveće hvala dugujem svojim roditeljima koji su me vodili kroz cijelo moje obrazovanje i odgoj. Nisam im priuštio jednostavno i bezbrižno vrijeme to je sigurno, ali također sam siguran da im nikada nije bilo dosadno.*

*Možda najveće hvala dugujem svojoj Heci kako zbog pomoći u izradi diplomskog tako i zbog podrške tijekom cijelog akademskog obrazovanja. Nikad nisam osjećao da je neki problem samo moj, nikad nisam bio sam u nečemu. Bez njene podrške vjerojatno bi ovaj diplomski bio upola lošiji, a studiranje za još toliko manje zabavno.*

*Veliko hvala i mojim prijateljima. Da mi sada neko ponudi bi li ponovio cijelo studiranje, svaku pogrešku, lošu odluku, kao i svaki dobar provod i lijepe trenutke, prihvatio bi bez razmišljanja i ne bi ništa mijenjao. Voli vas vaš Domaćin.*

*Za kraj posveta.*

*Cijeli ovaj rad kao i završetak studija posvećujem svome didi. Nikad me nije prestao podržavati, sve dobro i sve loše što sam radio. Pazio je na mene najbolje što je znao i sve što je radio, činio je da meni bude bolje i lakše u životu. Hvala mu na tome.*

*Siguran sam da si ponosan na mene, tvoj Mile.*

## Sadržaj

Popis kratica .....	III
Popis slika .....	V
Popis tablica .....	VI
1. Uvod.....	1
1.1 Lipidom .....	1
1.2 Lipidi središnjeg živčanog sustava .....	1
1.3 Lipidne splavi .....	2
1.4 Glikosfingolipidi.....	2
1.5 Gangliozidi .....	3
1.6 Biosinteza gangliozida.....	5
1.7 <i>St8sial</i> gen.....	7
1.8 Nedostatak <i>St8sial</i> gena u patogenezi bolesti živčanog sustava.....	7
2. Hipoteza .....	9
3. Ciljevi.....	10
4. Materijali i metode .....	11
4.1 Ustroj studije.....	11
4.2 Materijali .....	11
4.3 Metode .....	11
4.3.1 Postupak želatiniziranja predmetnih stakala .....	12
4.3.2 MALDI-TOF-MS.....	12
4.3.3 Enzimaska aktivnost alkalne fosfataze na rezovima tkiva mozga .....	13
4.3.4 Enzimaska aktivnost sukcinat dehidrogenaze na rezovima mozga .....	13
4.3.5 Tkivna raspodjela kolesterola.....	14
4.3.6 Tkivna raspodjela fosfolipida.....	14
4.3.7 Tkiva raspodjela aktinskih mikrofilamenata .....	15
4.3.8 Kvantifikacija obojenja .....	16
4.4 Statističke metode.....	16
5. Rezultati .....	17
5.1 Rezultati MSI.....	17
5.1.1 Analiza glavnih komponenti .....	17
5.1.2 Promijenjenost <i>m/z</i> signala.....	18
5.1.3 Identifikacija spojeva i zahvaćenih metaboličkih puteva.....	19
5.2 Rezultati histoloških bojenja .....	21
5.2.1 Rezultati bojenja enzimatske aktivnosti alkalne fosfataze.....	21

5.2.2	Rezultati bojenja enzimatske aktivnosti sukcinat dehidrogenaze .....	24
5.2.3	Rezultati bojenja tkivne raspodjele kolesterola.....	26
5.2.4	Rezultati bojenja tkivne raspodjele fosfolipida.....	27
5.2.5	Rezultati bojenja tkivne raspodjele aktinskih mikrofilamenata .....	29
6.	Rasprava.....	32
7.	Zaključci .....	36
8.	Sažetak .....	37
9.	Summary .....	38
10.	Literatura .....	39
11.	Životopis.....	45

## Popis kratica

<b>9-AA</b>	9-aminoakridin (engl. <i>9-Aminoacridine</i> )
<b>AP</b>	alkalna fosfataza (engl. <i>alkaline phosphatase</i> )
<b>CC</b>	žuljevito tijelo (lat. <i>corpus calosum</i> )
<b>Cer</b>	ceramid, (engl. <i>Ceramide</i> )
<b>CI</b>	unutarnja kapsula (lat. <i>capsula interna</i> )
<b>CNS</b>	središnji živčani sustav (engl. <i>central nervous system</i> )
<b>CPu</b>	stražnji putamen (lat. <i>nucleus caudatus et putamen</i> )
<b>FA</b>	mravlja kiselina (engl. <i>formic acid</i> )
<b>FRET</b>	fluorescentni prijenos energije rezonancijom (engl. <i>fluorescence resonance energy transfer</i> )
<b>Gal</b>	galaktoza
<b>GalCer</b>	galaktozilceramid
<b>GSL</b>	glikosfingolipidi
<b>HRZZ</b>	Hrvatska zaklada za znanost
<b>IUPAC</b>	Međunarodna zajednica za čistu i primjenjenu kemiju (engl. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
<b>KEGG</b>	Kyoto enciklopedija gena i genoma (engl. <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> )
<b>KO</b>	miševi s isključenim <i>St8sial</i> genom (engl. <i>knock-out</i> )
<b>LacCer</b>	laktozilceramid
<b>m/z</b>	omjer mase i naboja
<b>MAG</b>	glikoprotein povezan s mijelinom (engl. <i>myelin-associated glycoprotein</i> )
<b>MALDI-TOF</b>	Metoda analize masenim spektrometrom (engl. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight</i> )
<b>MS</b>	masena spektrometrija
<b>MSI</b>	slikovna masena spektrometrija (engl. <i>Mass spectrometry imaging</i> )
<b>MTT</b>	membrana permeabilno obojenje (engl. <i>thiazolyl blue tetrazolium bromide</i> )
<b>NANA</b>	sijalinska kiselina, N-acetilneuraminska kiselina
<b>PBS</b>	Pufer za otopine (engl. <i>Phosphate-buffered saline</i> )
<b>PC1</b>	prva osnovna komponenta
<b>PC2</b>	druga osnovna komponenta
<b>PCA</b>	analiza glavnih komponenti (engl. <i>primary component analysis</i> )



<b>PFA</b>	paraformaldehid (engl. <i>paraformaldehyde</i> )
<b>PNS</b>	periferni živčani sustav (engl. <i>peripheral nervous system</i> )
<b>RTK</b>	receptorske tirozin kinaze
<b>SDH</b>	sukcinat dehidrogenaza (engl. <i>succinic dehydrogenase</i> )
<b>Tiff</b>	Format spremanja slika (engl. <i>Tagged image file format</i> )
<b>WT</b>	divlji tip (engl. <i>wild type</i> )

## Popis slika

<b>Slika 1.</b> Varijacije u strukturi glikosfingolipida.....	3
<b>Slika 2.</b> Biosinteza ganglio-serije gangliozida.....	6
<b>Slika 3.</b> Prikaz rezultata dviju osnovnih komponenti masenih spektara miševa s isključenim <i>St8sial</i> genom i miševa divljeg tipa.....	18
<b>Slika 4.</b> Prikaz usporedbe postotka promijenjenosti m/z signala u <i>corpus calosum</i> , <i>capsula interna</i> i <i>nucleus caudatus et putamen</i> regijama miševa s isključenim <i>St8sial</i> genom i miševa divljeg tipa.....	19
<b>Slika 5.</b> Histološki prikaz obojenja enzimatske aktivnosti alkalne fosfataze tkiva mozga miševa s isključenim <i>St8sial</i> genom i miševa divljeg tipa u tri regije.....	22
<b>Slika 6.</b> Rezultati obojenja enzimatske aktivnosti alkalne fosfataze na tkivu mozga miševa s isključenim <i>St8sial</i> genom i miševa divljeg tipa u tri regije. ....	23
<b>Slika 7.</b> Rezultait kvantifikacije površine krvnih žila na obojenju enzimatske aktivnosti alkalne fosfataze, tkiva mozga miševa s isključenim <i>St8sial</i> genom i miševa divljeg tipa u tri regije. ....	23
<b>Slika 8.</b> Histološki prikaz obojenja enzimatske aktivnosti sukcinat dehidrogenaze tkiva mozga miševa s isključenim <i>St8sial</i> genom i miševa divljeg tipa u tri regije. ....	24
<b>Slika 9.</b> Rezultati obojenja enzimatske aktivnosti sukcinat dehidrogenaze tkiva mozga miševa s isključenim <i>St8sial</i> genom i miševa divljeg tipa u tri regije.....	25
<b>Slika 10.</b> Histološki prikaz obojenja tkivne raspodjele kolesterola u tkivu mozga miševa s isključenim <i>St8sial</i> genom i miševa divljeg tipa u tri regije. ....	26
<b>Slika 11.</b> Rezultati obojenja tkivne raspodjele kolesterola tri regije mozga miševa s isključenim <i>St8sial</i> genom i miševa divljeg tipa.....	27
<b>Slika 12.</b> Histološki prikaz obojenja tkivne raspodjele fosfolipida u tkivu mozga miševa s isključenim <i>St8sial</i> genom i miševa divljeg tipa u tri regije. ....	28
<b>Slika 13.</b> Rezultati obojenja tkivne raspodjele fosfolipida tri regije mozga miševa s isključenim <i>St8sial</i> genom i miševa divljeg tipa.....	29
<b>Slika 14.</b> Histološki prikaz obojenja tkivne raspodjele aktinskih mikrofilamenata u tkivu mozga miševa.....	30
<b>Slika 15.</b> Rezultati obojenja tkivne raspodjele aktinskih mikrofilamenata u tkivu mozga miševa .....	31

## Popis tablica

**Tablica 1.** Jednoznačno identificirani spojevi prema m/z kvocijentima detektiranih masenom spektrometrijom u *nucleus caudatus et putamen* regiji miševa s isključenim *St8sia1* genom u odnosu na miševe divljeg tipa. .... 20

**Tablica 2.** Metabolički putevi u kojima sudjeluju spojevi čija je ekspresija smanjena u *nucleus caudatus et putamen* regiji miševa s isključenim *St8sia1* genom. .... 21

## 1. Uvod

### 1.1 Lipidom

Lipidi su molekule netopive u vodi koje imaju širok spektar funkcija unutar stanica, uključujući: održavanje elektrokemijskih gradijenata, stanično i unutarstanično odjeljivanje, staničnu signalizaciju kroz funkciju prvog i drugog glasnika, skladištenje energije te sidrenje staničnih proteina za membrane. Nadalje, pokazalo se da lipidi djeluju kao modulatori u regulaciji proteina koji se vežu uz membranu, uključujući ionske kanale, zbog čega promjene lipida utječu na propusnost ionskih kanala. Fiziološka važnost lipida naglašena je u brojnim bolestima čijoj patogenezi pridonose, uključujući aterosklerozu, dijabetes, pretilost i Alzheimerovu bolest (1, 2).

Lipidomika je grana metabolomike koja se bavi sistemskom biologijom lipida - istražuje njihov sastav, funkciju i molekule s kojima su u interakciji (3). Cjelokupni sastav lipida nekog uzorka ili organizma, njihov sadržaj i brojnost, opisuje se kao lipidom. Lipidomika, integrirana s genomikom, proteomikom i metabolomikom, pridonosi razumijevanju bioloških sustava i pruža moćan alat za rasvjetljavanje mehanizma bolesti čija patogeneza počiva na lipidima (4).

### 1.2 Lipidi središnjeg živčanog sustava

Živčani sustav sastoji se od središnjeg živčanog sustava (engl. *central nervous system*, CNS) i perifernog živčanog sustava (engl. *peripheral nervous system*, PNS). CNS se sastoji od mozga i leđne moždine. Mozak se dalje dijeli na moždano stablo (što uključuje produljenu moždinu, pons i srednji mozak), mali mozak kao zasebna struktura i veliki mozak (koji se sastoji od telencefalona i diencefalona). Telencefalon uključuje moždani korteks, bazalne ganglije i olfaktorne lukovice, a diencefalon uključuje talamus, hipotalamus i epitalamus. PNS sastoji se od ganglija koji su građeni od tijela živčanih stanica i živčanih snopova. Živčani snopovi su pak građeni od aksona, mijelinskih ovojnica, krvnih žila, kolagena i drugih elemenata vezivnih tkiva (5). Nagada se da je lipidom svake strukture ili regije živčanog sustava različit u svrhu obavljanja različitih funkcija. U usporedbi s drugim organima i/ili sustavima sisavaca, živčani sustav sadrži najveću raznolikost klasa lipida i molekularnih vrsta lipida. Lipidi u mozgu dijele se uglavnom na 3 glavne kategorije: kolesterol i njegovi derivati, sfingolipidi (sfingomijelin, cerebrozidi, sulfatidi, gangliozi) i glicerofosfolipidi (fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinozitol). Uz prisutnost različitih klasa glicerofosfolipida i obilje kolesterola, živčani sustav također sadrži velik dio glikoziliranih sfingolipidnih klasa koje su toliko složene da je ovaj podskup lipidoma sada nazvan „sfingolipidom“ (6). U sfingolipidom ubrajaju se tisuće

molekularnih vrsta sfingolipida, a većina tih vrsta prisutna je upravo u živčanom sustavu. Nekih od njih u drugim tkivima uopće nema ili su prisutni u vrlo maloj količini (7). U ovom radu najveću pozornost posvećujemo sfingolipidima, točnije podskupini glikosfingolipida među koje spadaju i gangliozidi koji će biti podrobnije objašnjeni.

### 1.3 Lipidne splavi

U membranama živčanih stanica kao i u membranama svih stanica eukariota, lipidi i proteini nisu jednoliko raspoređeni. Na određenim područjima membrane dolazi do nakupljanja lipida u lipidne mikrodomene koje su organizirane oko glikolipida i proteina. Te lipidne mikrodomene, koje su pretežno građene od kolesterola i sfingomijelina, moguće je izolirati od ostatka membrane upotrebom detergenta. Radi svoje relativne netopljivosti u detergentima, a koja je odraz njihova sastava, dobile su naziv lipidne splavi ili uređene mikrodomene za razliku od ostatka membrane koji je neuređena i spada u nesplavi (8, 9).

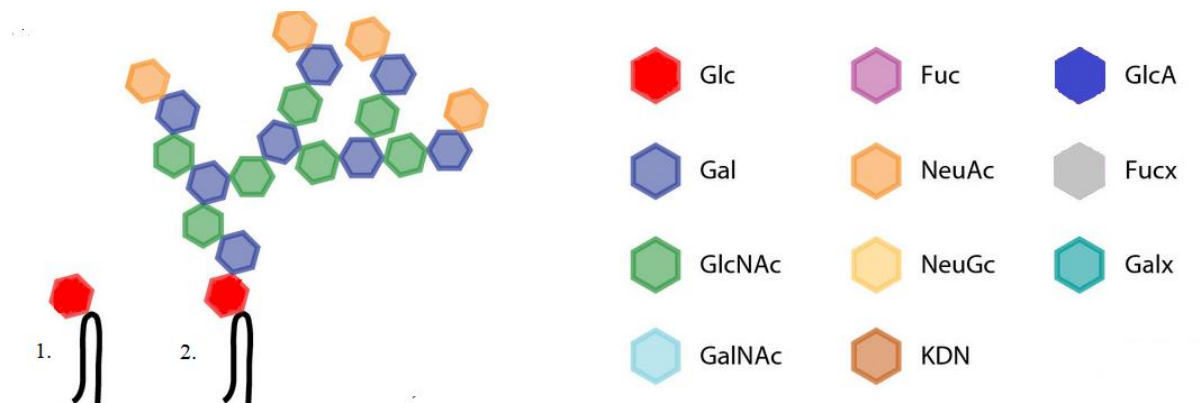
Iako se u početku smatralo da je glavna uloga lipidnih splavi transport proteina i lipida, danas se pretpostavlja da služe kao središta za oblikovanje signalnih domena. Također, imaju značajnu ulogu u regulaciji neurotransmisije, apoptoze, endocitoze i reguliranju proteolize (8, 10). Karakteristični element lipidnih splavi su glikolipidi, a u živčanim tkivima su osobito zastupljeni gangliozidi – klasa negativno nabijenih glikosfingolipida koji sadržavaju sijalinsku kiselinu.

### 1.4 Glikosfingolipidi

Glikolipidi su biomolekule koje sadrže jedan ili više ugljikohidratnih ostataka povezanih s hidrofobnim lipidnim sidrom pomoću glikozidne veze. Glikolipidi imaju ceramidno lipidno sidro koje je građeno od masne kiseline i aminoalkohola sfingozina vezanih na amnokiselinu serin te se zbog toga još nazivaju i glikosfingolipidi (GSL). GSL čini heterogena skupina molekula koje se međusobno razlikuju po duljini i zasićenosti masnih kiselina, odnosno sastavu i međusobnom povezivanju monosaharida (prikazano na **sluci 1.**) koje nalazimo u ugljikohidratnim lancima. Na temelju sastava ugljikohidratnog lanca, glikosfingolipidi se klasificiraju u sljedeće serije: ganglio, izoganglio, lakto, neolakto, laktoganglio, globo, izoglobo, muko, gala, neogala, molu, artro, schisto i spirometo serija (11 – 13).

GSL su prisutni na svim staničnim membranama sisavaca, a procjenjuje se da je njihov broj veći od 400 (14). GSL koji u sastavu oligosaharidnog lanca, sadrže jednu ili više sijalinsku kiselinu nazivaju se gangliozidima. Sijalinska ili neuraminska kiselina na osnovni šećerni lanac veže se preko galaktoze  $\alpha$ -2,3-vezom, ili se veže na prethodno dodanu sijalinsku kiselinu  $\alpha$ -2,8-

vezom. Ganglioziidi su osobito brojni u živčanom sustavu gdje čine oko 10 % ukupnih lipida. To sugerira njihovu vitalnu ulogu u funkcijama i procesima stvaranja tih tkiva (12).



**Slika 1.** Varijacije u strukturi glikosfingolipida

Lijevi dio slike prikazuje shematski jednostavan GSL (GlcCer) pod brojem 1. i najkompleksniji među poznatim GSL-ovima (tetrasialosilpoli-N-acetilactosaminil ganglioziid) pod brojem 2. Desni dio slike predstavlja moguće glikane vezane u strukturi GSL-a. (Sliku izradio autor prema radu D'Angelo i sur. (13))

## 1.5 Ganglioziidi

Ganglioziidi su glikosfingolipidi koji sadrže sijalinsku kiselinu. U mozgu čovjeka prisutna je samo jedna sijalinska kiselina, N-acetilneuraminska kiselina (Neu5Ac ili NANA), za razliku od N-glikolineuraminske kiseline koja je za čovjeka uvijek unesena izvana te može izazvati imunološki odgovor (15). Ganglioziidi su amfipatske molekule čiji hidrofobni dio čini ceramid – lipidno sidro koje se sastoji od aminoalkohola sfingozina i masne kiseline (najčešće stearinske). Ceramidno sidro nosi kovalentno vezani hidrofilni ugljikohidratni lanac okrenut prema izvanstaničnom okolišu. Samo vanjski list stanične membrane sadržava ganglioziide (16). Heterogenost i raznolikost struktura ugljikohidratnog lanca karakteristično su obilježje glikosfingolipida mozga te je do sada kod kralježnjaka identificirano 188 vrsta ganglioziida na temelju različitih ugljikohidratnih strukturama (14). Razlika je još veća ako se u obzir uzmu razlike u duljini i zasićenosti masne kiseline unutar ceramidnog sidra. Sijalinska kiselina (NANA) se  $\alpha$ 2,3-glikozidnom vezom veže na galaktozu osnovnog ugljikohidratnog lanca i to tako da se enzimatski dodaju prvo sijalinske kiseline na unutrašnju galaktozu (Gal), a zatim i na vanjsku. Sijalinska NANA se može vezati  $\alpha$ 2,8 vezom na prethodno dodane NANA ostatke

pa se tako tri paralelna puta sinteze gangliozida međusobno razlikuju prema tome je li na unutarnjem Gal ostatku vezano tri, dvije, jedna ili niti jedna NANA (17). Nekoliko najrasprostranjenijih gangliozidnih struktura prikazano je na **slici 2**. Njihova formalna nomenklatura je kompleksna i neintuitivna, pa se široko koristi nesistematična stenografska nomenklatura koju je uveo Svennerholm (18), prikazano **na slici 2**. Također je u uporabi međunarodno prihvaćena nomenklatura simbola za glikane (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) koja pruža intuitivniju osnovu za imenovanje struktura (19). Svennerholmovo nazivlje i IUPAC se koriste ravnopravno. Svennerholmovo nazivlje, u kratkim crtama, izgleda tako da slovo "G" označava gangliozid, broj ukupnih sijalinskih kiselina u strukturi označava se velikim slovima ("M" (mono), "D" (di), "T" (tri) "Q" (tetra), "P" (penta), "H" (heksa), a duljina ugljikohidratnog lanca brojevima (1, 2, 3). Duljina ugljikohidratnog lanca računa se tako da se od broja 5 oduzme stvarni broj šećera u lancu. Malim slovima označavaju se serije gangliozida koje odgovaraju biosintetskim putevima gdje gangliozidi serije „0“ nemaju NANA ostatke na unutarnjem Gal ostatku, serija "a" ima jedan, "b" dva, a „c“ tri NANA ostatka (18). Seriji „0“ pripadaju GA2 , GA1, GM1b, GD1a $\alpha$ ; a-seriji pripadaju GM3, GM2, GM1, GD1 $\alpha$ , GT1 $\alpha$ , GTx ; b-seriji pripadaju GD3, GD2, GD1b, GT1b, GQ1b, GQ1b $\alpha$ ; a c-seriji pripadaju GT3, GT2, GT1c, GQ1c, GP1c, GP1c $\alpha$ ). Prikazano na **slici 2**.

Gangliozidi se nalaze svugdje u tkivima i tjelesnim tekućinama, a čak deseterostruko obilnije su izraženi u živčanom sustavu (14). Neke funkcije gangliozida specifične su za stanični tip u kojem se izražavaju i uključuju gangliozide koji su usko izraženi samo na tom tipu stanica. Druge su pak skupine gangliozida šire raspoređene između tipova stanica i uključuju jednostavne gangliozide poput GM3 (20). To je gangliozid koji kvantitativno prevladava u mnogim perifernim tkivima sisavaca. Primjerice, predstavlja više od polovice ukupnih gangliozida u ljudskom srcu, koštanim mišićima, bubrežima, jetri i masnom tkivu. Nasuprot tome, četiri složenija gangliozida: GM1, GD1a, GD1b i GT1b, predstavljaju više od 90 % gangliozida u mozgu svih sisavaca (96 % kod ljudi) (21).

U embrionalnom mozgu miševa divljeg tipa dominantni gangliozidi su GM3 i GD3, dok u odraslom mozgu prevladavaju GM1, GD1a, GD1b i GT1b (14). Gangliozidi GD1b i GT1b široko su izraženi u sivoj i bijeloj tvari mišjeg mozga. GM1 se pretežno nalazi u bijeloj tvari, a GD1a u sivoj tvari te se posebno eksprimira u određenim moždanim jezgrama te slojevima mozga i leđne moždine (molekularni sloj malog mozga i *substantia gelatinosa* leđne moždine) (22).

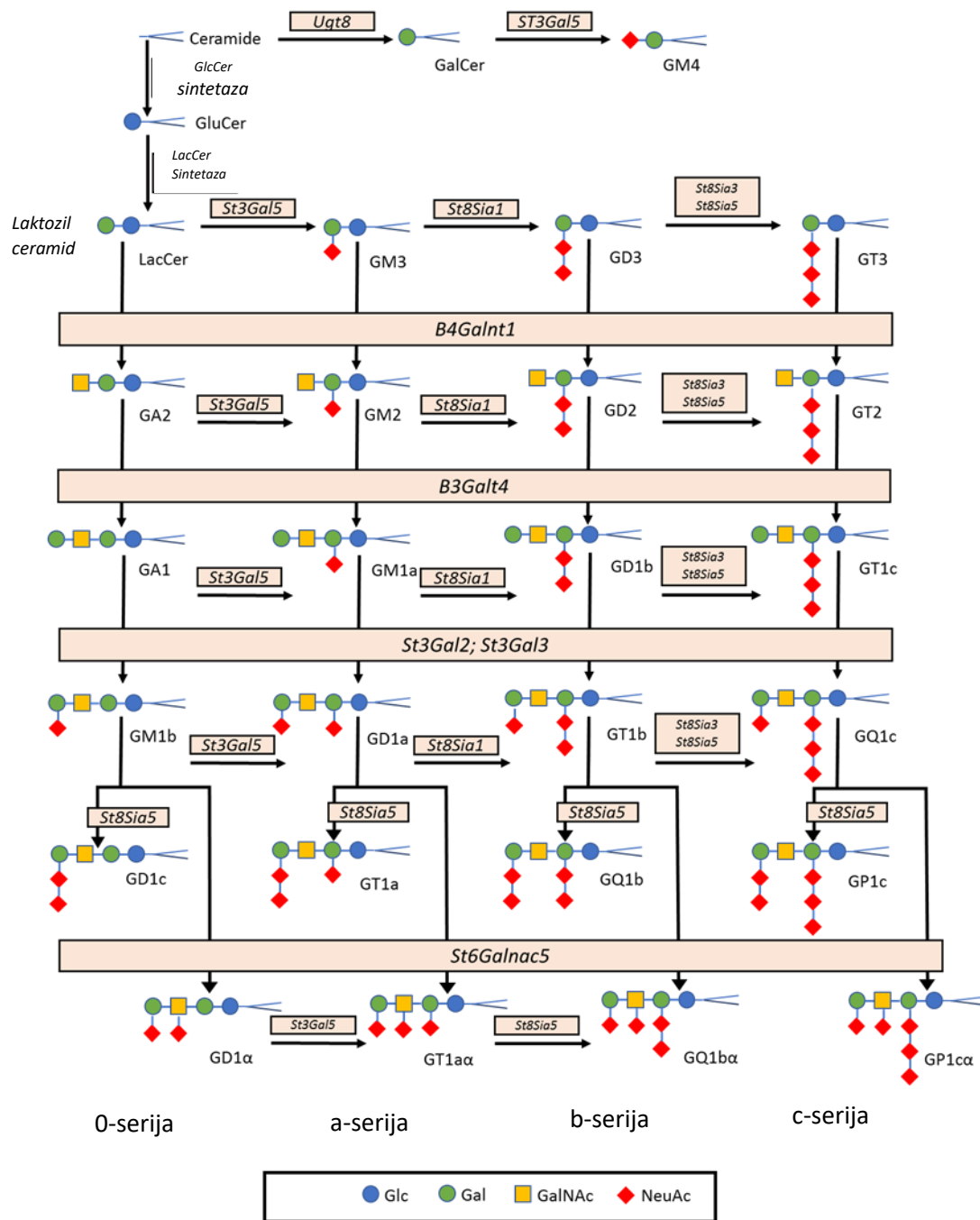
U vanjskom sloju stanične membrane gangliozidi se spontano udružuju s ostalim sfingolipidima, kolesterolom, glikozilfosfatidilinozitolom i određenim transmembranskim proteinima (23). Na površini stanice gangliozidi sudjeluju u dva tipa reakcija asocijacije preko kojih obavljaju svoju funkciju. Jedno su cis-asocijacije koje se događaju unutar iste membrane i u pravilu pojačavaju kontakt gangliozida s proteinima na čiju funkciju utječu (21). Izvrstan primjer regulatorne cis-interakcije je utjecaj gangliozida na aktivnost različitih receptorskih tirozin kinaza (RTK) s implikacijama u patogenezi dijabetesa, raka te fiziologiji regeneracije neurona (20, 24, 25). Drugi tip asocijacije su trans-asocijacije. One se odnose na vezanje gangliozida na visoko specifične proteine bilo u izvanstaničnoj okolini ili na nasuprotnim stanicama. Primjeri trans-interakcija su vezanje bakterijskih toksina na GM1 s posljedičnom paralizom te receptorsko vezanje GD1a i GT1b izraženih na aksonima s MAG (engl. *myelin-associated glycoprotein*) proteinom oligodendrocita, što se pokazalo ključnim za dugoročno održavanje kompaktnosti mijelina (26, 27).

### 1.6 Biosinteza gangliozida

Glikosfingolipidi, uključujući gangliozide, primarno se sintetiziraju u endoplazmatskom retikulumu te se dalje modificiraju u Golgijevom aparatu postupnim dodavanjem ugljikohidratnih ostataka na postojeću molekulu akceptorskog lipida. Reakcija je katalizirana nizom glikoziltransferaza. S izuzetkom GM4, koji je dobiven iz galaktozilceramida (GalCer), većina gangliozida sintetizira se iz laktozilceramida (LacCer) na slijedeći način: Prvo se jednostavni gangliozid, GM3, sintetizira dodavanjem sijalinske kiseline na LacCer pomoću LacCer  $\alpha$ 2–3 sijaliltransferaza (ST-I ili GM3 sintetaza). GD3 i GT3 sintetiziraju se uzastopnim dodavanjem sijalinskih kiselina na GM3 (GM3  $\alpha$ 2–8 sijaliltransferaza, ST-II ili GD3 sintetaza; EC 2.4.99.8) odnosno GD3 ( $\alpha$ 2–8 sijaliltransferaza, ST-III ili GT3 sintetaza; EC 2.4.1.92). GM3, GD3 i GT3 nadalje služe kao prekursori složenijih gangliozida (14).

Mutacije u genima za enzime koji sudjeluju u biosintezi gangliozida, primjerice *ST3GAL5* (GM3 sintetaza), *ST8SIA1* (GD3 sintetaza) i *B4GALNT1* (GM2/GD2 sintetaza) predmet su translacijskih genetskih studija na miševima koje otkrivaju funkcije specifičnih gangliozida i samim time omogućuju bolji uvid u patogenezu ljudskih bolesti koje su posljedica istih mutacija (21). U ovom radu poseban naglasak stavljen je na mutaciju u *ST8SIA1* genu.





**Slika 2.** Biosinteza ganglio-serije gangliozida.

Nomenklatura gangliozida navedena prema Svennerholmu.

(Slika preuzeta i prilagođena iz doktorske disertacije autora dr.sc. Milorada Zjalića s dopuštanjem autora (28))

### 1.7 *St8sial1* gen

*St8sial1* gen nalazi se na kratkom (p) kraku 12. kromosoma u čovjeka te na 6. kromosomu u miševa. Kao što je već u prethodnom odjeljku navedeno, ovaj gen kodira enzim GD3 sintetazu koji je zaslužan za sintezu gangliozida GD3 i GT3, a koji su preteče ostalih gangliozida b i c serija (**Slika 2.**). Ključni korak u njihovoj sintezi je prijenos NANA-e na GM3 (29). Enzim se, kako je već navedeno, nalazi u Golgijevom aparatu te osim u metabolizmu sfingolipida, sudjeluje i u reakcijama posttranslacijskih modifikacija proteina, točnije u reakcijama proteinske glikozilacije (30).

### 1.8 Nedostatak *St8sial1* gena u patogenezi bolesti živčanog sustava

Unatoč odsutnosti normalno istaknutih gangliozida b-serije u mozgu, brisanje gena *St8sial1* ne uzrokuje očite razvojne abnormalnosti u živčanom sustavu (31 – 33). Miševi bez gangliozida b-serije pokazali su normalan refleks stražnjih udova, normalan posturalni stav, spontanu motoričku aktivnost, plivačke sposobnosti, trzajni refleks na slušni podražaj i nije bilo znakova ataksije. Analize pamćenja i učenja pomoću Morrisovog testa, vodenog labirinta, testa pasivnog izbjegavanja, Y-labirinta itd. također nisu pokazale abnormalne nalaze. U makroskopskoj i histološkoj analizi moždanih tkiva, miševi sa isključenim (engl. *knock-out*, KO) *St8sial1* genom imali su normalnu veličinu, oblik i težinu mozga kao i miševi divljeg tipa (engl. *wild type*, WT). Sljedeća mjesta pažljivo su ispitana i pokazala su normalnu morfologiju: korteks, *striatum*, *corpus calosum*, hipokampus, moždane komore, koroidni pleksus, mali mozak i moždano stablo. Mrežnica također nije pokazala abnormalnosti u laminarnoj arhitekturi i broju neurona, iako je jedno od mjesta na kojem je gen GD3 sintetaze najsnažnije izražen (32). U istraživanju Okada i sur. (32) pokazalo se da KO miševi imaju smanjenu sposobnost regeneracije hipoglosalnog živca, pokazujući manje preživjelih neurona nakon resekcije živca. Točnije, za 50 % smanjen je broj preživjelih neurona u odnosu na WT miševe. Uz to, Handa i sur. (34) su pokazali kako *St8sial1* KO miševi imaju povećanu reakciju na toplinski i mehanički podražaj, te smanjeni odgovor na potkožnu injekciju formalina, što je klinička mjera za osjet boli. To govori u prilog da gangliozidi GD3 posreduju u prenošenju boli te bi se njihov nedostatak više mogao odraziti na funkcije osjetilnog nego motoričkog sustava (12). Također su primijećene promjene u razini ekspresije gena zaduženih za biosintezu kolesterola. Upravo taj poremećaj u metabolizmu kolesterola mogao bi voditi u poremećaj signalnih puteva mozga, te razvojni poremećaj mozga (35). Uloga gangliozida u patogenezi bolesti se temelji na neuravnoteženosti

u sintezi gangliozida, što se događa i u slučaju nedostatka *St8siaI* gena, a dovodi do poremećaja raspodjele proteina unutar lipidnih splavi (14).

**2. Hipoteza**

Miševi sa isključenim *ST8Sial* genom imaju poremećaj metabolizma lipida mozga, koji se može utvrditi analizom lipidoma.

### 3. Ciljevi

Ciljevi ovog rada su:

1. Pomoću slikovne masene spektrometrije (engl. *Mass spectrometry imaging*, MSI) pokušati utvrditi postoji li poremećaj u metabolizmu lipida u različitim regijama mozga KO miševa, u usporedbi s WT miševima iste dobi.
2. Pomoću KEGG (engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) baze ispitati podlogu potencijalnih metaboličkih promjena, odnosno utvrditi točan metabolički put potencijalnog poremećaja
3. Rezultate dodatno potvrditi histološkim metodama usmjerenim na sastav lipida, metabolizam mitohondrija te strukturne stanične elemente

### 4. Materijali i metode

#### 4.1 Ustroj studije

Provedena je studija parova – životinje divljeg tipa u odnosu na životinje s isključenim genom *St8sial*. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva za istraživanja Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Medicinskog fakulteta Osijek (klasa: 602-04/21-08/07, broj: 2158-61-07-21-22).

#### 4.2 Materijali

U ispitivanju su se koristila dvije grupe miševa: KO miševi kojima je isključen *St8sial* gen te WT miševi kojima gen nije isključen. Ukupno je korišteno 8 miševa muškog spola te dobi od 4,5 mjeseci, po 4 miša od svakog genotipa. Istraživanje je dio projekta „Patofiziološke posljedice promjene sastava lipidnih splavi“ (IP-2014-09-2324) Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) voditeljice prof. dr. sc. Marije Heffer te ima etičko dopuštenje Ministarstva poljoprivrede, Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane (klasa 641-01/15-01/49, broj: 525-61-07-15-07).

#### 4.3 Metode

Svježe smrznuto tkivo mozga (iz arhive navedenog HRZZ projekta) izrezano je na kriostatu (LEICA, CM3050 S, Wetzlar, Njemačka) pri temperaturi od -16 °C. Rezano je u koronarnom smjeru, a debljina rezova bila je 16 µm. Kako bi se napravila histološka bojenja, rezovi su zalijepljeni na predmetna stakalca presvučena želatinom. Za potrebe MALDI-TOF (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight*) masene spektrometrije uzorci su nalijepljeni na stakalca presvučena indij-kositar oksidom (engl. *indium tin oxide*, ITO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Na rezovima su napravljena sljedeća histološka bojenja: enzimska aktivnost alkalne fosfataze (engl. *alkaline phosphatase*, AP), enzimska aktivnost sukcinat dehidrogenaze (engl. *Succinic dehydrogenase*, SDH), tkivna raspodjela kolesterola i fosfolipida uz pomoć fluorescentnih proba, te tkivna raspodjela aktinskih mikrofilamenata uz pomoć fluorescentog faloidina. Svi preparati slikani su digitalnim fotoaparatom (Olympus D70, Tokio, Japan) spojenim na svjetlosni mikroskop Axioskop Carl Zeiss 2 MOT (Oberkochen, Njemačka). Kvantifikacija histoloških bojenja, spremljenih u tiff (engl. *Tagged image file format*) formatu,

učinjena je pomoću Fiji računalnog programa (program otvorenog pristupa, 64-bitna verzija za Windows operativni sustav Java 1.8\_172) (36, 37)

### 4.3.1 Postupak želatiniziranja predmetnih stakala

- 300 mL destilirane vode zagrije se na 50 °C
- Priredi se 2 % otopina želatine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dodavanjem 6 g želatine u zagrijanu vodu
- Nakon potpunog otapanja u vodi doda se 0,075 g kromove stipse (0,00025 g/L)
- Dobro oprana predmetna stakalca uranjaju se u pripremljenu otopinu želatine u trajanju od 10 s.

### 4.3.2 MALDI-TOF-MS

Analiza uzoraka pomoću slikovne masene spektrometrije (MSI) provedena je uređajem iMScope Trio (Shimadzu, Kyoto, Japan). Priprema uzoraka uključivala je odmrzavanje uzoraka tkiva na ITO stakalcima tijekom 30 min na sobnoj temperaturi u tubama koje su sadržavale silika-gel za adsorpciju vlage. Potom je na uzorke nanesen pufer 50 mM amonijevog formijata u trajanju od 5 s. Rezovi su nakon toga sušeni 15 min u sušioniku. Matrica 9-AA (engl. *9-Aminoacridine*) nanescna je na uzorke pomoću iMLayer uređaja (Shimadzu, Kyoto, Japan) što je uključivalo sublimaciju na 180 °C u trajanju od 15 min, rekristalizaciju na 37 °C s 5 % otopinom metanola u trajanju od 5 min. Snimanje je provedeno u negativnom načinu snimanja, u rasponu masa od 1500-1900  $m/z$ . Broj piksela iznosio je 3000. Promjer točke lasera iznosio je 25  $\mu\text{m}$  (postavka 2), intenzitet lasera bio je postavljen na 46 %, a količina laserskih snimaka/piksel bila je 100. Analiza podataka rađena je s R softverom ver. 4.0.1. (R Foundation for Statistical Computing, Beč, Austrija) (38). koristeći FELLA paket2 (39), resample paket3 (40). KEGGREST paket4 (41) i prilagođeni program. U svrhe identifikacije metabolita čiji su  $m/z$  kvocijenti statistički značajno različiti između ispitivanih grupa korištena je KEGG baza podataka. Kao filter pretraživanja baza korišten je negativni način snimanja, uz slijedeće vrste adukata: "M-H", "M-H<sub>2</sub>O-H", "M+Cl", "M+FA (engl. *formic acid*)-H". Veličina intervala signala (engl. *Bin size*) iznosila je 0,02 Da.

### 4.3.3 Enzimska aktivnost alkalne fosfataze na rezovima tkiva mozga

AP (EC 3.1.3.1) je enzim izražen na staničnoj membrani. Posebno je prisutan u matičnim i pluripotentnim stanicama te u endotelu krvnih žila. Prilikom bojanja enzim djeluje na kromogeni supstrat tako da ga izmjeni i ostavlja crvenkasto obojenje. Postupak je sljedeći:

- Preparati su posloženi na stakalca i fiksirani 15 min u 4 % otopini PFA (engl. *paraformaldehyde*)
- Pripravak u obliku tablete NBT/BCIP (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Njemačka, kataloški broj: 13894500) otopi se u 10 ml vode
- Otopina se nanese na fiksirane preparate i ostavi 5 min na sobnoj temperaturi
- Preparati se isperu 5 min u 1xPBS (engl. *Phosphate-buffered saline*) otopini
- Ispiranje u rastućem gradijentu alkohola kroz 2 min po otopini u sljedećem nizu:
  - 70 % otopina etanola (Biognost (H100-1L, H100-116/19), Zagreb, Hrvatska)
  - 96 % otopina etanola (Biognost (H100-1L, H100-116/19), Zagreb, Hrvatska)
  - 96 % otopina etanola (Biognost (H100-1L, H100-116/19), Zagreb, Hrvatska)
  - 100 % otopina etanola (Biognost (H100-1L, H100-116/19), Zagreb, Hrvatska)
  - 100 % otopina etanola (Biognost (H100-1L, H100-116/19), Zagreb, Hrvatska)
  - Otopina ksilena (T.T.T. Zagreb, Hrvatska)
  - Otopina ksilena (T.T.T. Zagreb, Hrvatska).

Nakon završenog bojenja na predmetna stakalca stavlja se medij za uklapanje (*Histological Mounting Medium* -National Diagnostics, Atlanta, Georgia, SAD; kataloški broj HS-103) i stakalca se pokrivaju pokrovnica.

### 4.3.4 Enzimska aktivnost sukcinat dehidrogenaze na rezovima mozga

SDH (EC 1.3.5.1) je enzim koji se nalazi na unutarnjoj mitohondrijskoj membrani. Obavlja ključnu funkciju u respiracijskom lancu. Kemijskom reakcijom sukcinat se pretvara u fumarat i elektron se prebacuje na kromogeni supstrat kojega dodajemo u procesu bojanja. Prilikom tog procesa nastaje obojenje na preparatu. Za pripremu radne otopine koristi se:

- 50 mM fosfatni pufer (pH 7,6)
- 0,3 mM MTT reagens (engl. *thiazolyl blue tetrazolium bromide*) (Cruz Chemicals, Dallas, Texas, SAD, Kataloški broj: SC-359848)



- 0,05 M natrijev sukcinat (Merck KGaA, Darmstadt, Germany kataloški broj 6106-21-4).

Protokol bojenja je sljedeći:

- Na preparate se nanosi radna otopina koja se inkubira 40 min u inkubatoru na 37 °C
- Slijedi fiksacija 15 min u 4 % ili 2 % otopini PFA
- Kratko ispiranje u destiliranoj vodi.

Nakon završenog bojenja na predmetna stakalca stavljen je medij za uklapanje (*Crystal/Mount* – Biomedica corp. Foster City, Kanada, Kataloški broj: M03) te se stakalca pokrivaju pokrovnica.

### 4.3.5 Tkivna raspodjela kolesterola

Kao fluorescentna proba na kolesterol koristio se TopFluor Cholesterol (Avanti Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, SAD, Kataloški broj: 810255P-5MG). Molekule spoja se prilikom procesa bojanja grupiraju u staničnoj membrani skupa sa kolesterolom gdje prilikom FRET (engl. *fluorescence resonance energy transfer*) mikroskopiranja djeluju kao primatelji energije koju pak prenose kao vidljivo obojenje. Postupak obrade preparata navedenom probom je sljedeći:

- Razrjeđuje se TopFluor Cholesterol u 1xPBS-u u omjeru 1:10000 i nanosi na rezove tkiva;
- Preparati se fiksiraju u trajanju od 15 min u 4 % PFA na 4 °C;
- Slijedi ispiranje preparata, tri puta po 10 min u 1xPBS-u;
- Preparati se pokrivaju pokrivalom za fluorescentne preparate (*Mounting Medium with DAPI* - Abcam, Cambridge, United Kingdom, kataloški broj: ab104139) i stakalca se pokrivaju pokrovnica.

### 4.3.6 Tkivna raspodjela fosfolipida

Kao fluorescentnu probu na fosfolipide koristio se Sulforhodamine 101 DHPE (Cruz Chemicals, Dallas, Texas, SAD, kataloški broj 187099-99-6). Molekule spoja se prilikom procesa bojanja smjeste u fosfolipidni dvosloj stanične membrane gdje prilikom FRET

mikroskopiranja djeluju kao primatelji energije koju pak prenose kao crvenkasto obojenje. Postupak obrade preparata navedenom probom je sljedeći:

- Sulforhodamine 101 DHPE se razrjeđuje u 1xPBS-u u omjeru 1:10000 i nanosi na tkiva
- Preparati se fiksiraju u trajanju od 15 min u 4 % PFA na 4 °C
- Slijedi ispiranje preparata, tri puta po 10 min u 1xPBS-u
- Preparati se pokrivaju pokrivalom za fluorescentne preparate (*Mounting Medium with DAPI* - Abcam, Cambridge, United Kingdom, kataloški broj: ab104139) i stakalca se pokrivaju pokrovnica.

### 4.3.7 Tkiva raspodjela aktinskih mikrofilamenata

Aktinski mikrofilamenti su proteinske strukture koje čine osnovu citoskeleta neurona. Imaju značajnu funkciju u uspostavljanju i održavanju stanične strukture i polarosti (42, 43). Kao fluorescentnu probu koristio se Rhodamine Phalloidin Reagent (Abcam, Cambridge, United Kingdom, kataloški broj: ab235138). Molekule spoja se prilikom procesa bojanja smjeste na mikrofilamentne strukture gdje prilikom FRET mikroskopiranja djeluju kao primatelji energije koju pak prenose kao crvenkasto obojenje. Postupak obrade preparata navedenom probom je sljedeći:

- Preparati su posloženi na stakalca i fiksirani 15 min u 4 % otopini PFA
- Slijedi ispiranje preparata, tri puta po 10 min u 1xPBS-u
- Nakon toga nanosena je 1 % otopina detergenta Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, kataloški broj: 9002-93-1), čija je uloga povećanje permeabilnosti stanične membrane kako bi se fluorescentna proba lakše vezala za mikrofilamente
- Preparati se kratko isperu u 1xPBS-u
- Nanesen je Rhodamine Phalloidin Reagent i ostavljen 2 sata
- Slijedi ispiranje tri puta po 10 min u 1xPBS-u
- Preparati se pokrivaju pokrivalom za fluorescentne preparate (*Mounting Medium with DAPI* - Abcam, Cambridge, United Kingdom, kataloški broj: ab104139) i stakalca se pokrivaju pokrovnica.

### 4.3.8 Kvantifikacija obojenja

Fotografije su prvo obrađene na dva načina. Fotografije enzimske aktivnosti SDH-e i AP-e su dekonvoluirane naredbom *Image/Color/Color Denonvolution*. Nakon dekonvoluiranja fotografija se razdvaja na 3 boje ovisno o zastupljenosti boja iz RGB spektra. Za navedena bojanja odabrana je 2. boja. Drugi način se odnosi na fluorescentne probe za prikazivanje tkivne prisutnosti kolesterola, fosfolipida i aktinskih mikrofilamenata. U njemu su slike dobivene FRET mikroskopiranjem razdvojene na kanale naredbom *Image/Color/Split Channels*. Skupine fotografije mozгова nastale dekonvolucijom su obrađene na isti način kao i one nastale naredbom *Split Cahnnels*. Odabran je kvadrat veličine 400x400 piksela za enzimatsko bojanje SDH-e i kvadrat veličine 2000x1000 piksela za sve ostale fotografije. Nakon toga je kvantificirana srednja vrijednost intenziteta obojenja koja se kreće između 0 i 255, gdje 0 predstavlja najtamnije, a 255 najsvjetlije obojenje. Kvantificiranje svakog kvadrata nakon pretvorbe je obavljeno pomoću naredbe *Analyze/measure* s postavkama mjerenja za: *area, standard deviation, min i max gray value, integrated density i mean gray value*. U svim bojenjima su kvantificirane 3 regije: *corpus calosum (CC), capsula interna (CI), nucleus caudatus et putamen (CPu)*. U sve tri strukture, ovisno o izgledu i očuvanosti uzorka, kvantificirano je područje od interesa, u 3 kvadrata, s lijeva na desno u nepravilnim razmacima. Prilikom bojanja enzimske aktivnosti AP-e napravljena je i kvantifikacija intenziteta obojenja površine krvnih žila. Ono je učinjeno uz pomoć naredbe *adjust/Threshold/BnW* te je potom analizirano naredbom *image/analyze particle* gdje je prag prepoznavanja namješten na *250-infinity*.

## 4.4 Statističke metode

Računalni program Statistica 13 (inačica 12.5, Dell, SAD) korišten je za statističku analizu, a Shapiro-Wilkovim testom testirana je normalnost raspodjele podataka. O raspodjeli dobivenih podataka i modelu uzorka ovisio je daljnji odabir statističke metode. U slučaju normalne raspodjele rezultata korišteni su parametrijski testovi, točnije t-test za testiranje značajnosti razlike između dva uzorka. Odabir vrste t-testa ovisio je o veličini samog uzorka i o tome jesu li uzorci zavisni ili nezavisni. Ako raspodjela podataka nije bila normalna, koristio se neparametrijski Mann-Whitney U test. Rezultati dobiveni u obliku višedimenzionalne baze podataka su reducirani s pomoću analize glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis, PCA*). Za svaku statističku analizu koristio se uzorak u minimalnom biološkom triplikatu, a razina značajnosti je u svim analizama bila određena s  $p < 0,05$ .

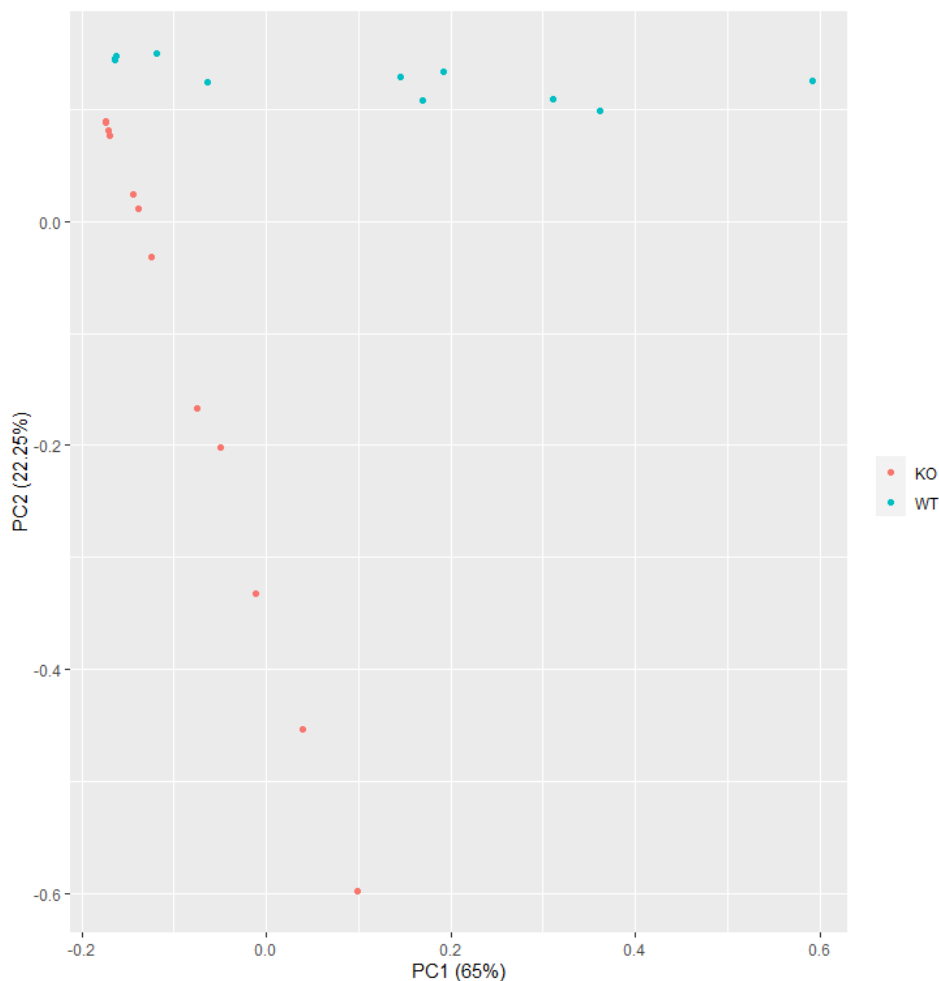
## 5. Rezultati

### 5.1 Rezultati MSI

MSI analiza provodila se u CC, CI i CPu regijama mozga KO i WT miševa iste dobi. Snimanje se provelo u negativnom načinu rada  $m/z$  raspona od 1500-1900 daltona. Po svakom rezu mozga određeno je 4 ROI koji su snimani, a dobiveni spektri su korišteni za daljnju obradu podataka kako bi uvidjeli razlike u lipidomu između KO i WT miševa.

#### 5.1.1 Analiza glavnih komponenti

Kako bi se dobivena višedimenzionalna baza podataka reducirala i uvidjela razlika između  $m/z$  signala uspoređivanih skupina, koristila se PCA. Reducirani podaci prikazani su grafom, na **slici 3.**, na čijoj je osi x jedna osnovna komponenta (PC1), a na y osi druga osnovna komponentna (PC2). Uspoređivanjem KO i WT miševa, PCA je pokazala jasnu razliku između skupina. PC1 komponentom, objašnjeno je 65 % varijacije rezultata, a PC2 komponentom je objašnjeno 22,25 %. Zajedno, PC1 i PC2 komponentama objašnjeno je 87,25 % ukupne varijacije rezultata.



**Slika 3.** Prikaz rezultata dviju osnovnih komponenti masenih spektara miševa s isključenim *St8sial* genom i miševa divljeg tipa.

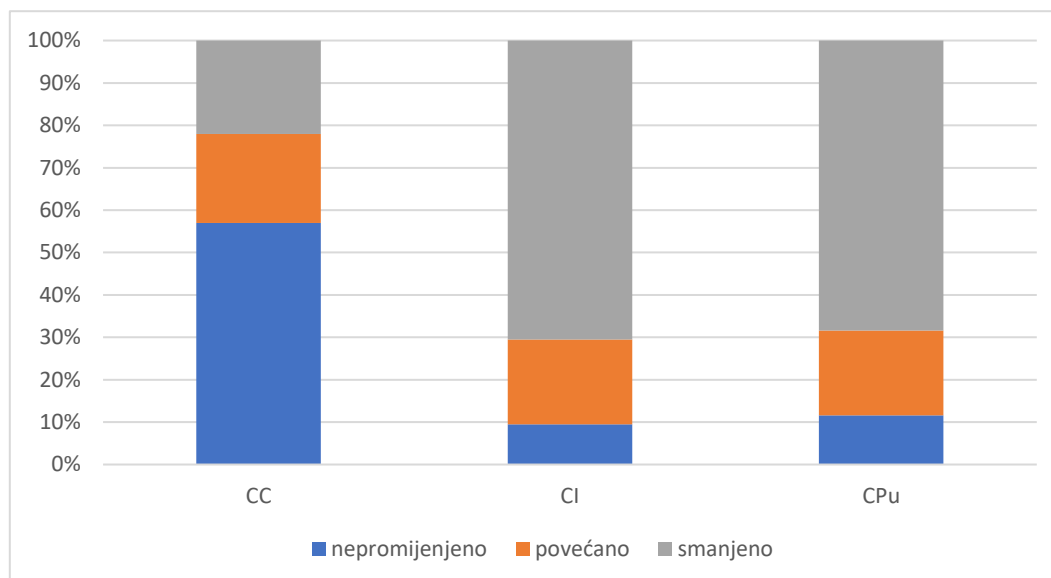
Svaka točkica je prikaz rezultata za jednu životinju odgovarajućeg genotipa.

Opis kratica: PC1 – osnovna komponenta 1, PC2 – osnovna komponenta 2, KO – miš s isključenim *St8sial* genom, WT – miš divljeg tipa.

### 5.1.2 Promijenjenost *m/z* signala

Promijenjenost *m/z* signala u KO miševa u odnosu na WT miševe ispitala se primjenom log<sub>2</sub> FoldChange pristupa. Na **slici 4.** je prikazan udio povišenih, sniženih i nepromijenjenih signala ispitivanih struktura za konkretni *m/z* bin: bin\_size < - 0,02; SignalSumCutOff < - 0,001. Usporedbom signala CC regije dobiveno je 43 % promijenjenih *m/z* signala i 57 % nepromijenjenih *m/z* signala. Analizom signala CI regije dobiveno je 90,5 % promijenjenih, a

9,5 % nepromijenjenih  $m/z$  signala. U CPu regiji dobiveno je 88,4 % promijenjenih  $m/z$  signala i 11,6 % nepromijenjenih  $m/z$  signala.



**Slika 4.** Prikaz usporedbe postotka promijenjenosti  $m/z$  signala u *corpus calosum*, *capsula interna* i *nucleus caudatus et putamen* regijama miševa s isključenim *Stδsial* genom i miševa divljeg tipa.

Opis kratica: KO – miš s isključenim *Stδsial* genom, WT – miš divljeg tipa, CC – *corpus calosum*, CI – *capsula interna*, CPu – *nucleus caudates et putamen*

### 5.1.3 Identifikacija spojeva i zahvaćenih metaboličkih puteva

Statistički značajne razlike uočene su samo u CPu regiji. Usporedbom KO i WT genotipa pronađeno je 15 spojeva čija je ekspresija statistički značajno smanjena u CPu regiji. U **tablici 1.** navedeni su spojevi čija je ekspresija statistički značajno smanjena u KO genotipu u CPu regiji, a u **tablici 2.** navedeni su metabolički putevi u kojima identificirani spojevi sudjeluju.

**Tablica 1.** Jednoznačno identificirani spojevi prema m/z kvocijentima detektiranih masenom spektrometrijom u *nucleus caudatus et putamen* regiji miševa s isključenim *St8sial* genom u odnosu na miševe divljeg tipa.

Ekspresija pojedinog spoja je smanjena u CPU regiji KO miševa ukoliko je vrijednost njegovog t-score negativan broj.

KO – miševi s isključenim *St8sial* genom, WT – miševi divljeg tipa, \* –  $p < 0,05$

KEGG ID	m/z	Adukt	Naziv spoja	KO vs WT
				p vrijednost
C04145	1580,02	2M-H	all-trans-Nonaprenyl diphosphate	0,03*
C00894	1641,26	2M-H	Propenoyl-CoA, Acryloyl-CoA	0,03*
C05989	1673,22	2M-H	3-Oxopropionyl-CoA, Malonyl semialdehyde-CoA	0,03*
C15670	1703,7	2M-H	Heme A	0,04*
C11378	1724,36	2M-H	Ubiquinone-10, Coenzyme Q10	0,04*
C20870	1737,24	2M-H	3-(Methylthio)propanoyl-CoA	0,05*
C05268	1761,34	2M-H	(S)-Hydroxyhexanoyl-CoA	0,04*
C05798	1776,14	2M-H	Bacteriopheophytin	0,04*
C21217	1807,98	2M-H	Geranylgeranyl bacteriochlorophyllide a	0,05*
C00223	1825,28	2M-H	p-Coumaroyl-CoA, 4-Hydroxycinnamoyl-CoA	0,03*
C21511	1831,48	2M-H	Nickel-sirohydrochlorin a	0,05*
C19946	1837,32	2M-H	6-dehydrosuberil-CoA semialdehyde	0,04*
C11538	1837,4	2M-H	Cobalt-sirohydrochlorin, Cobalt-factor II	0,03*
C05265	1869,46	2M-H	3-Oxodecanoyl-CoA	0,04*
C00406	1885,3	2M-H	Feruloyl-CoA, 4-Hydroxy-3-methoxycinnamoyl-CoA	0,04*

**Tablica 2.** Metabolički putevi u kojima sudjeluju spojevi čija je ekspresija smanjena u *nucleus caudatus et putamen* regiji miševa s isključenim *St8sial1* genom.

KEGG naziv metaboličkog puta	Broj identificiranih spojeva u putu
Elongacija masnih kiselina	2
Biosinteza ubikinona	2
Metabolizam propanoata	2
Metabolizam porfirina	5
Feroptoza	1
Metabolizam arginina i prolina	1
Metabolizam sumpora	1
Metabolizam fenilalanina	1

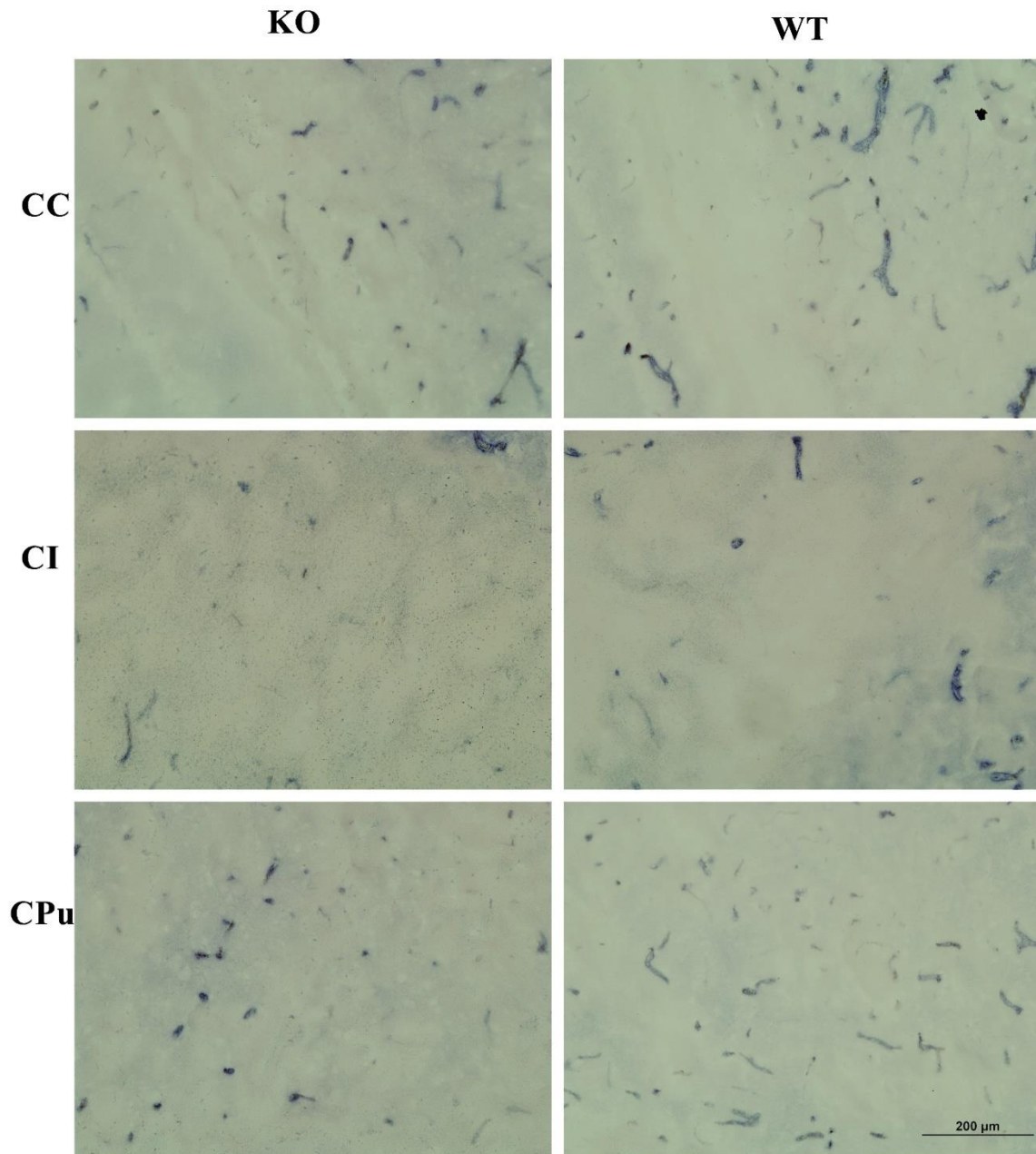
## 5.2 Rezultati histoloških bojenja

Kako bi promjene lipodoma bile prikazane, učinjena su sljedeća histološka bojenja tkiva mozga KO i WT miševa: enzimaska aktivnost AP-e, enzimaska aktivnost SDH-e, tkivna raspodjela kolesterola, tkivna raspodjela fosfolipida i tkivna raspodjela aktinskih mikrofilamenata. Za kvantifikaciju slika korišten je program Fiji.

### 5.2.1 Rezultati bojenja enzimatske aktivnosti alkalne fosfataze

Analiza enzimatske aktivnosti AP-e provela se na CC, CI i CPu regijama mozga miševa oba genotipa. Ni u jednoj od tri regije nije primijećena statistički značajna promjena u enzimatskoj aktivnosti AP-e između KO i WT genotipa. To je histološki prikazano na **slici 5**. te grafički na **slici 6**. Budući da je AP biljeg prisutnosti krvnih žila napravljena je kvantifikacija površine krvnih žila gdje također nije primijećena statistički značajna razlika između dva genotipa, što je prikazano na grafu na **slici 7**. To ukazuje na to da nema značajne razlike u vaskularizaciji te tri regije mozga između KO i WT miševa.

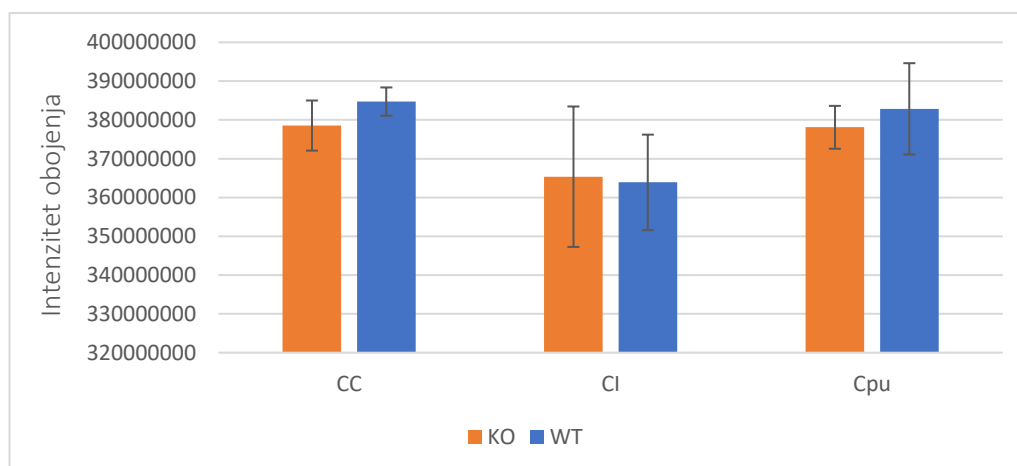




**Slika 5.** Histološki prikaz obojenja enzimatske aktivnosti alkalne fosfataze tkiva mozga miševa s isključenim *St8sial* genom i miševa divljeg tipa u tri regije.

Ukupno povećanje 200 x, skala 200  $\mu\text{m}$ .

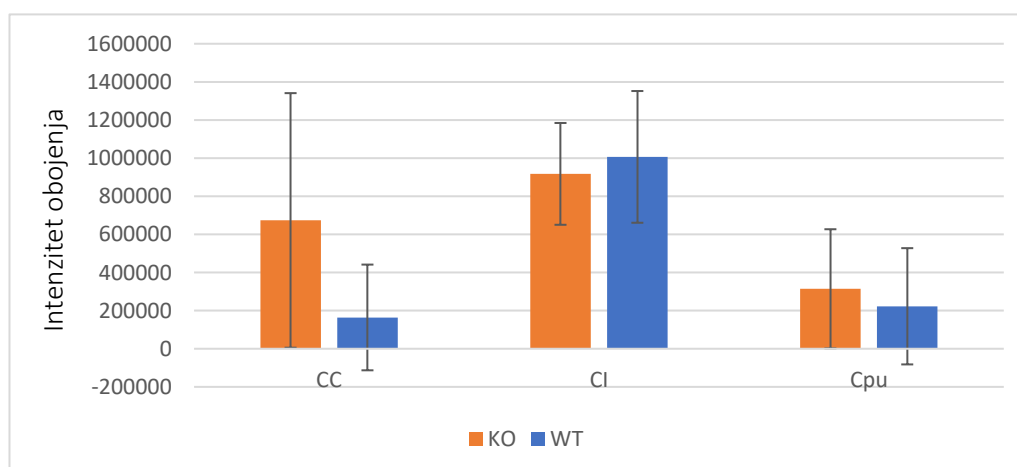
Opis kratica: KO – miš sa isključenim *St8sial* genom, WT – miš divljeg tipa, CC – *corpus callosum*, CI – *capsula interna*, CPu – *nucleus caudatus et putamen*.



**Slika 6.** Rezultati obojenja enzimatske aktivnosti alkalne fosfataze na tkivu mozga miševa s isključenim *St8sial1* genom i miševa divljeg tipa u tri regije.

Srednje vrijednosti intenziteta obojenja su prikazane stupčastim grafikonom sa izraženim standardnim devijacijama. Statistička obrada podataka provedena je Studentovim T testom.

Opis kratica: KO – miš sa isključenim *St8sial1* genom, WT – miš divljeg tipa, CC – *corpus callosum*, CI – *capsula interna*, CPu – *nucleus caudatus et putamen*.



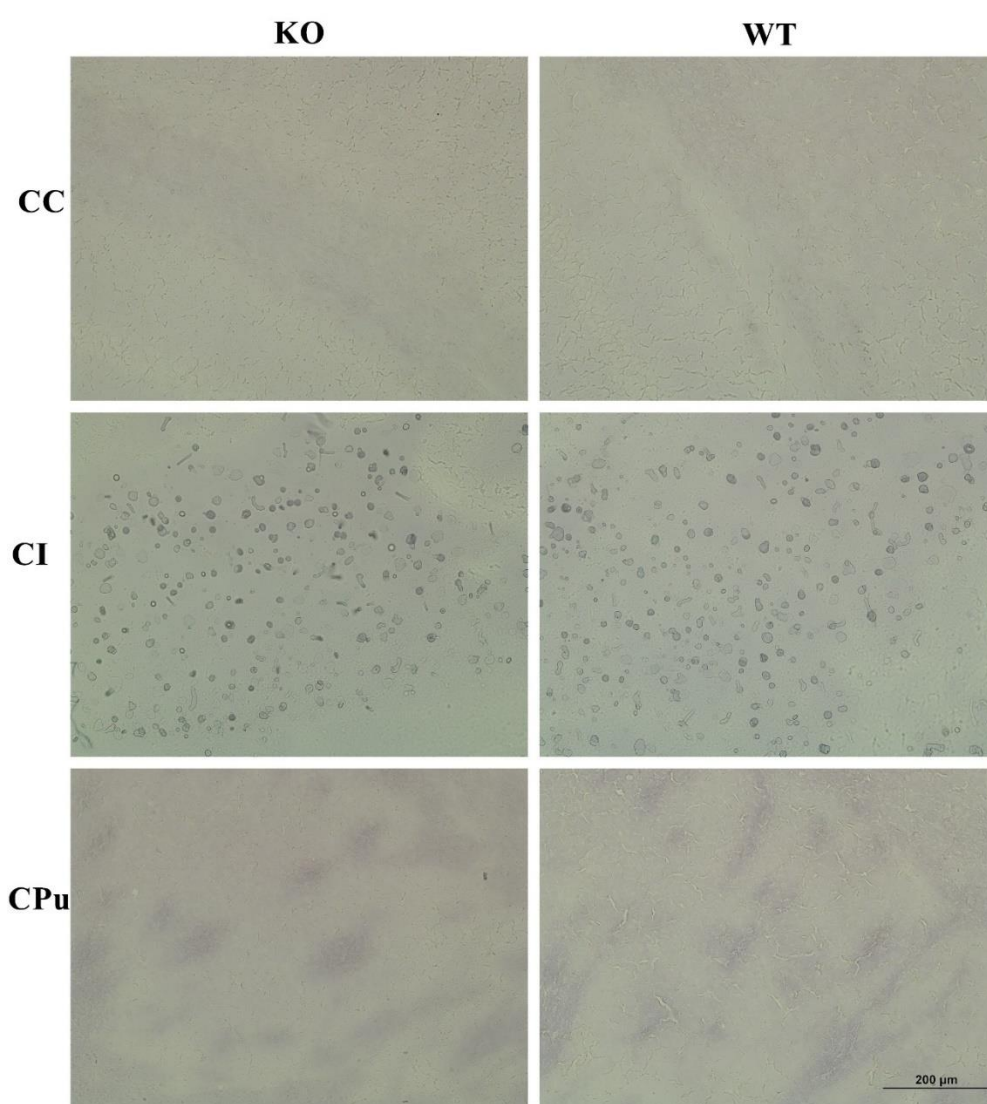
**Slika 7.** Rezultait kvantifikacije površine krvnih žila na obojenju enzimatske aktivnosti alkalne fosfataze, tkiva mozga miševa s isključenim *St8sial1* genom i miševa divljeg tipa u tri regije.

Srednje vrijednosti površine krvnih žila su prikazane stupčastim grafikonom sa izraženom standardnim devijacijama. Statistička obrada podataka provedena je Studentovim T testom.

Opis kratica: KO – miš sa isključenim *St8sial1* genom, WT – miš divljeg tipa, CC – *corpus callosum*, CI – *capsula interna*, CPu – *nucleus caudatus et putamen*.

### 5.2.2 Rezultati bojenja enzimatske aktivnosti sukcinat dehidrogenaze

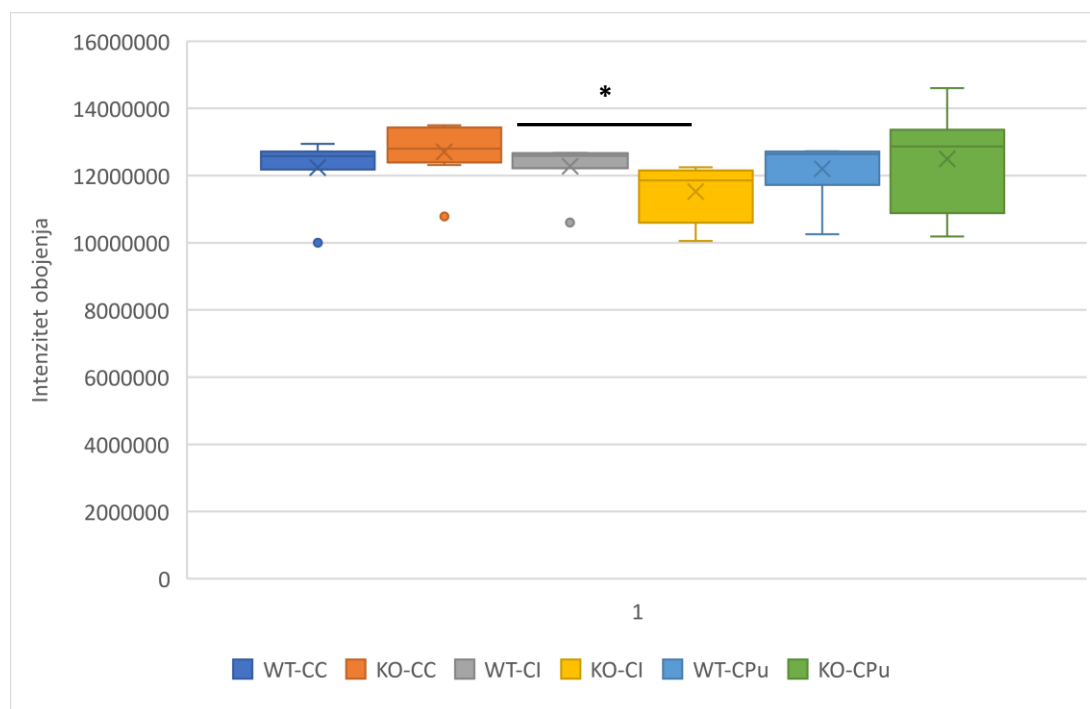
Analiza enzimatske aktivnosti SDH-e provela se na CC, CI i CPu regijama mozga miševa oba genotipa. U CI regiji primijećena je statistički značajna razlika intenziteta obojenja KO miševa u odnosu na WT miševе ( $p = 0,01$ ). Na **slici 8.** i grafu na **slici 9.** vidljivo je slabije obojenje enzimatske aktivnosti SDH-e u CI regiji KO genotipa. Statistika je napravljena uz pomoć Mann Whitney U testa. U CC i CPu regijama statistički značajne razlike u intenzitetu obojenja enzimatske aktivnosti SDH-e između dva genotipa nisu primijećene.



**Slika 8.** Histološki prikaz obojenja enzimatske aktivnosti sukcinat dehidrogenaze tkiva mozga miševa s isključenim *St8sia1* genom i miševa divljeg tipa u tri regije.

Ukupno povećanje 200 x, skala 200  $\mu\text{m}$ .

Opis kratica: KO – miš sa isključenim *St8sia1* genom, WT – miš divljeg tipa, CC – *corpus callosum*, CI – *capsula interna*, CPu – *nucleus caudatus et putamen*.



**Slika 9.** Rezultati obojenja enzimatske aktivnosti sukcinat dehidrogenaze tkiva mozga miševa s isključenim *St8sial1* genom i miševa divljeg tipa u tri regije.

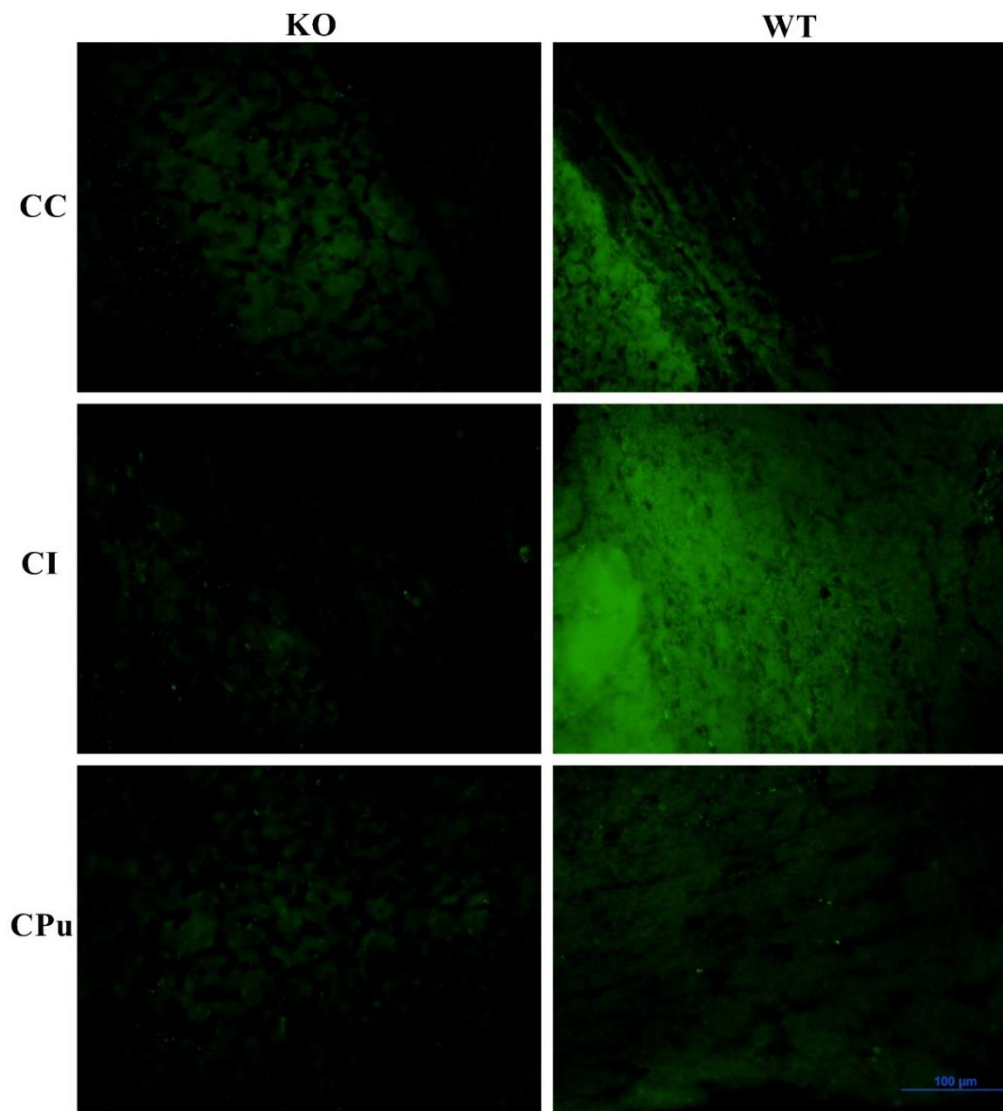
Prikazana je vrsta grafa koja se naziva „kutija s brkovima“ te prikazuje sljedeće podatke: maksimum – vrh gornjeg brka, minimum – donja granica donjeg brka, srednja vrijednost – X unutar kutije, medijan – crta unutar kutije, gornja kvartila – gornji rub kutije, donja kvartila – donji rub kutije.

Statistička obrada podataka provedena je Mann Whitney U testom.

Opis kratica: KO – miš sa isključenim *St8sial1* genom, WT – miš divljeg tipa, CC – *corpus callosum*, CI – *capsula interna*, CPu – *nucleus caudatus et putamen*, \* –  $p < 0,05$

### 5.2.3 Rezultati bojenja tkivne raspodjele kolesterola

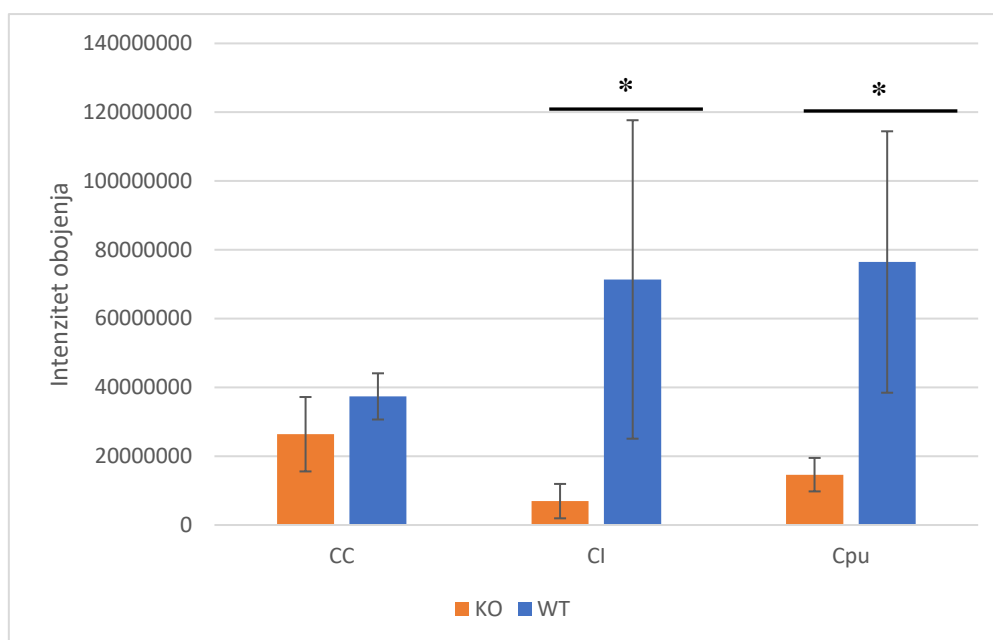
Analiza tkivne raspodjele kolesterola provela se na CC, CI i CPu regijama mozga miševa oba genotipa. Statistički značajno smanjenje u intenzitetu obojenja između KO i WT miševa primijećeno je u CI ( $p = 0,03$ ) i CPu ( $p = 0,02$ ) regijama. Histološki prikaz bojenja vidljiv je na **slici 10.**, a grafički prikaz rezultata na **slici 11.**



**Slika 10.** Histološki prikaz obojenja tkivne raspodjele kolesterola u tkivu mozga miševa s isključenim *St8sial* genom i miševa divljeg tipa u tri regije.

Ukupno povećanje 400 x, skala 100 µm.

Opis kratica: KO – miš sa isključenim *St8sial* genom, WT – miš divljeg tipa, CC – *corpus callosum*, CI – *capsula interna*, CPu – *nucleus caudatus et putamen*.



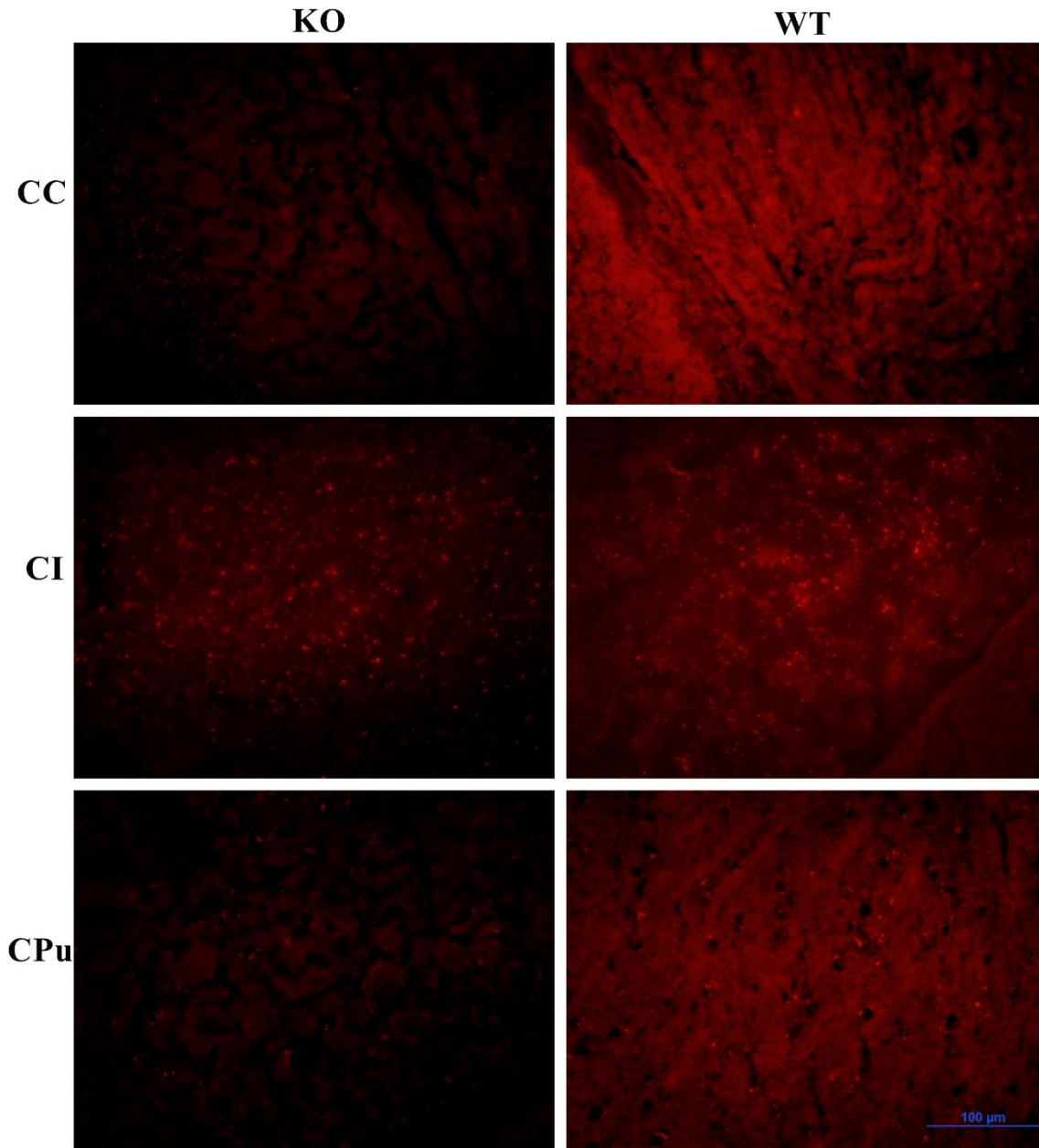
**Slika 11.** Rezultati obojenja tkivne raspodjele kolesterola tri regije mozga miševa s isključenim *St8sia1* genom i miševa divljeg tipa.

Srednje vrijednosti intenziteta obojenja su prikazane stupčastim grafikonom sa izraženim standardnim devijacijama. Statistička obrada podataka provedena je Studentovim T testom.

Opis kratica: KO – miš sa isključenim *St8sia1* genom, WT – miš divljeg tipa, CC – *corpus callosum*, CI – *capsula interna*, CPu – *nucleus caudatus et putamen*, \* –  $p < 0,05$

#### 5.2.4 Rezultati bojenja tkivne raspodjele fosfolipida

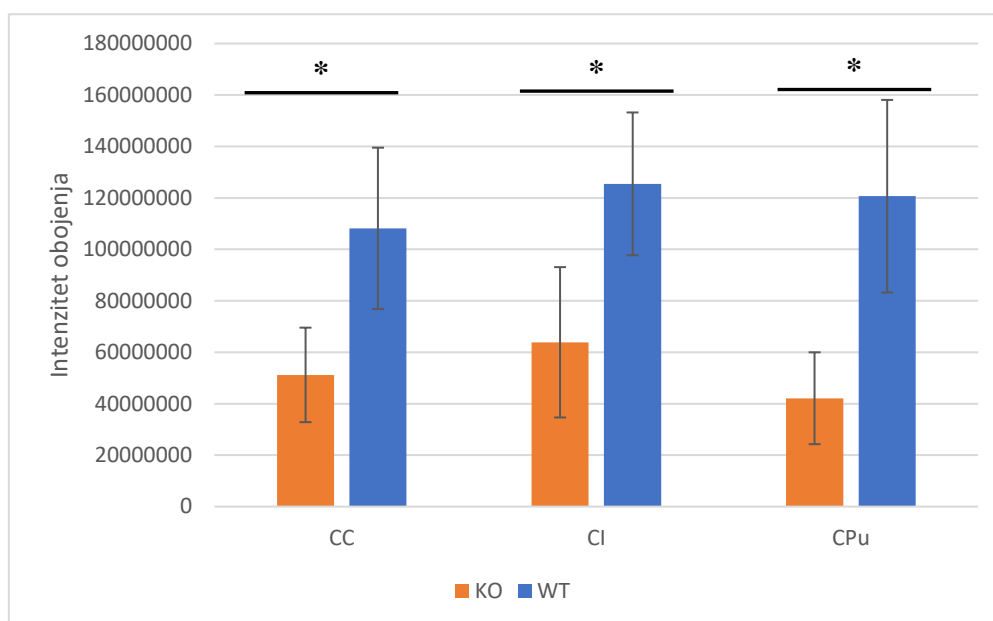
Analiza tkivne raspodjele fosfolipida provela se na CC, CI i CPu regijama mozga miševa oba genotipa. Statistički značajno smanjenje u intenzitetu obojenja primijećeno je u sve tri analizirane regije – CC regiji ( $p = 0,02$ ), CI regiji ( $p = 0,03$ ) te CPu regiji ( $p = 0,01$ ). Histološki prikaz bojenja vidljivo je na **slici 12.**, a grafički prikaz rezultata na **slici 13.**



**Slika 12.** Histološki prikaz obojenja tkivne raspodjele fosfolipida u tkivu mozga miševa s isključenim *St8sial* genom i miševa divljeg tipa u tri regije.

Ukupno povećanje 400 x, skala 100 µm.

Opis kratica: KO – miš sa isključenim *St8sial* genom, WT – miš divljeg tipa, CC – *corpus callosum*, CI – *capsula interna*, CPu – *nucleus caudatus et putamen*.



**Slika 13.** Rezultati obojenja tkivne raspodjele fosfolipida tri regije mozga miševa s isključenim *St8sial* genom i miševa divljeg tipa.

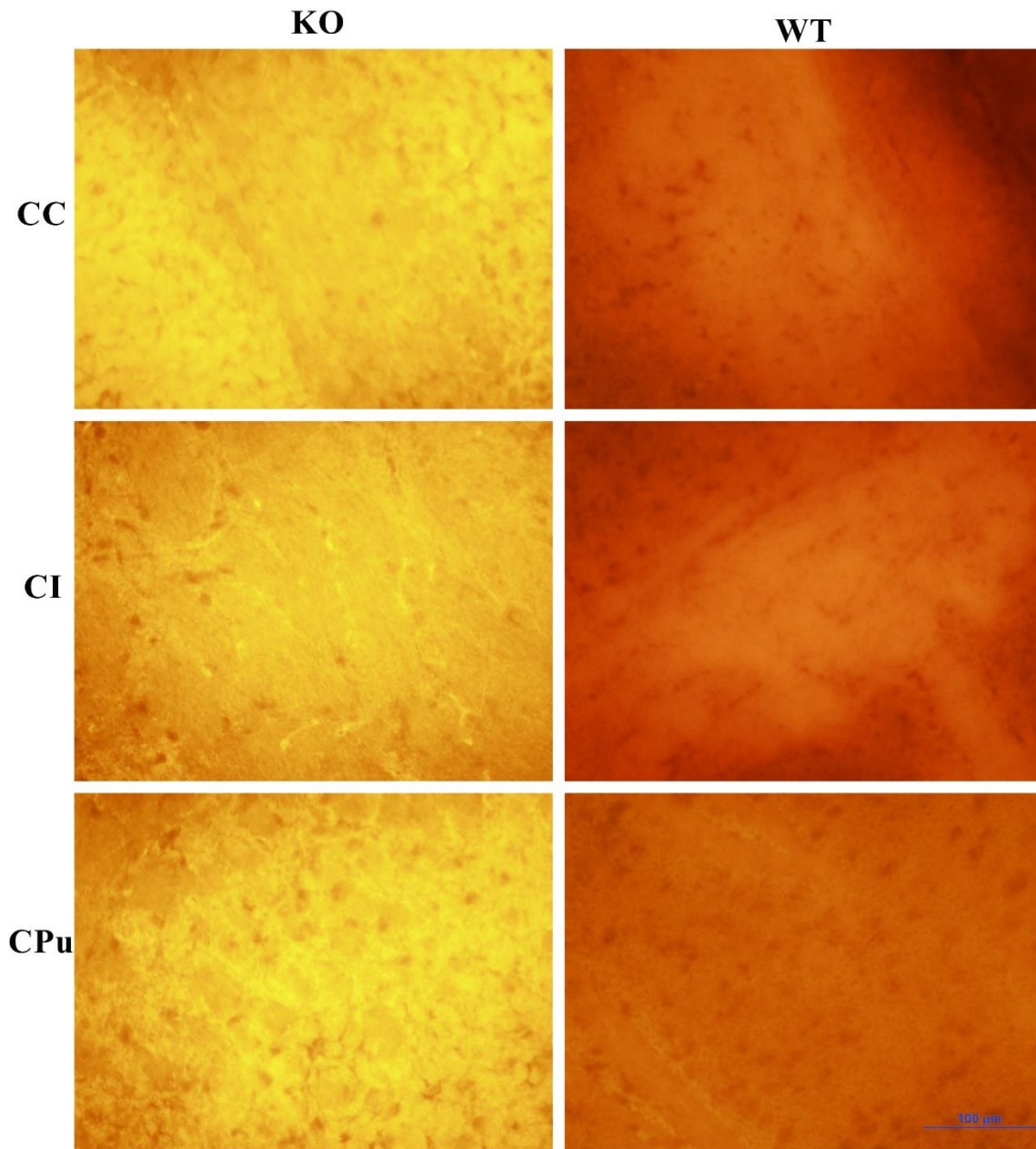
Srednje vrijednosti intenziteta obojenja su prikazane stupčastim grafikonom sa izraženim standardnim devijacijama. Statistička obrada podataka provedena je Studentovim T testom.

Opis kratica: KO – miš sa isključenim *St8sial* genom, WT – miš divljeg tipa, CC – *corpus callosum*, CI – *capsula interna*, CPu – *nucleus caudatus et putamen*, \* –  $p < 0,05$

### 5.2.5 Rezultati bojenja tkivne raspodjele aktinskih mikrofilamenata

Analiza tkivne raspodjele aktinskih mikrofilamenata provela se na CC, CI i CPu regijama mozga miševa oba genotipa. Statistički značajna razlika u intenzitetu obojenja primijećena je u sve tri analizirane regije regije – CC regiji ( $p = 0,003$ ), CI regiji ( $p < 0,001$ ) te CPu regiji ( $p = 0,009$ ). Intenzitet bojenja sve tri regije u KO miševa je pojačan u odnosu na WT miševe, što je histološki prikazano **slikom 14.**, a grafom na **slici 15.**

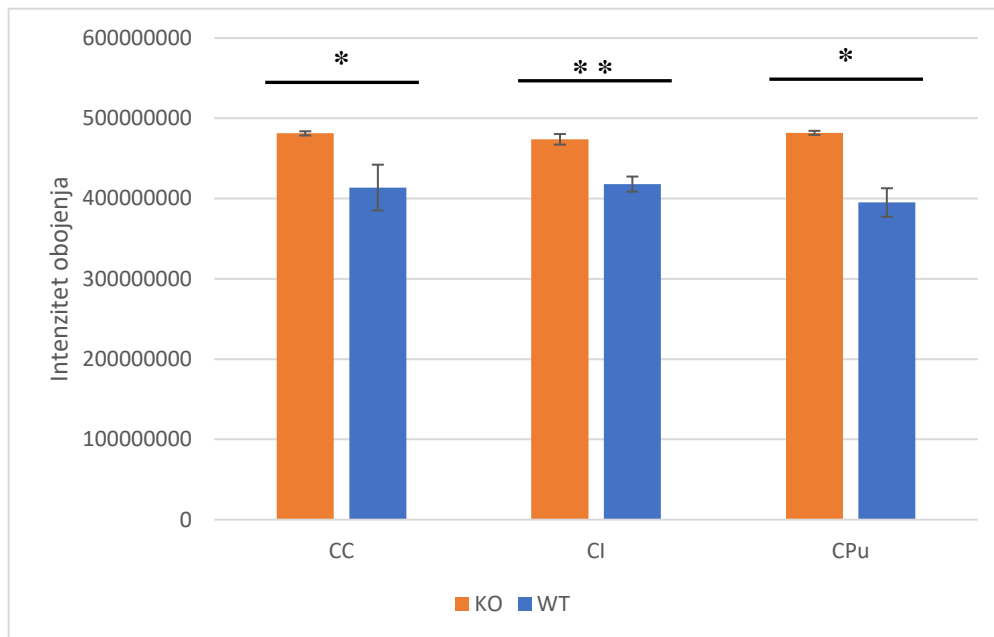




**Slika 14.** Histološki prikaz obojenja tkivne raspodjele aktinskih mikrofilamenata u tkivu mozga miševa s isključenim *St8sial* genom i miševa divljeg tipa u tri regije.

Ukupno povećanje 400 x, skala 100  $\mu\text{m}$ .

Opis kratica: KO – miš sa isključenim *St8sial* genom, WT – miš divljeg tipa, CC – *corpus callosum*, CI – *capsula interna*, CPu – *nucleus caudatus et putamen*.



**Slika 15.** Rezultati obojenja tkivne raspodjele aktinskih mikrofilamenata u tkivu mozga miševa s isključenim *St8sial1* genom i miševa divljeg tipa u tri regije.

Srednje vrijednosti intenziteta obojenja su prikazane stupčastim grafikonom sa izraženim standardnim devijacijama. Statistička obrada podataka provedena je Studentovim T testom.

Opis kratica: KO – miš sa isključenim *St8sial1* genom, WT – miš divljeg tipa, CC – *corpus callosum*, CI – *capsula interna*, CPu – *nucleus caudatus et putamen*, \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,001$

## 6. Rasprava

Ovaj je rad u usporedbu stavio dva genotipa miševa, neizmijenjeni, WT genotip, i KO genotip kojemu nedostaje gangliozid GD3 sintaza, čiju sintezu kodira gen *St8sial1*. Enzim GD3 sintaza ključan je u sintezu GD3 tako što posreduje prijenos sijalinske kiseline na GM3. Gangliozid GD3 pak služi kao preteča seriji GT3, kao što je ranije opisano (14). Posljedice nedostatka ili smanjene aktivnosti GD3 sintaze rezultiraju nedostatkom gangliozida b- i c-serije, od kojih je b-serija posebno važna za diferencijaciju neurona i regeneraciju aksona. Nedostatak b- i c-serije kompenziran je nakupljanjem GM3 i njegovih preteča (44). Unatoč odsutnosti normalno izraženih gangliozida b-serije, brisanje gena *St8sial1* ne uzrokuje očite razvojne abnormalnosti u živčanom sustavu (31 – 33). Miševi bez gangliozida b-serije nisu pokazali promjene ponašanja, snalaženja ni kognicije (32). U makroskopskoj i histološkoj analizi moždanih tkiva KO miševi su imali normalnu veličinu, oblik i težinu mozga kao i WT miševi. Također detaljna usporedna analiza različitih regija mozga nije pokazala morfološke promjene između dva genotipa (32). Navedena odsutnost očitih morfoloških promjena u mozgu KO miševa prikazana kroz dosadašnje analize dovela je do premise ovog rada, da bi se promjene mogle dokazati analizom i usporedbom lipidoma KO i WT miševa.

MALDI-TOF masena spektrometrija prva je u nizu metoda kojima se pokušalo dokazati promjena lipidoma. Gledano samo analizu glavnih komponenti razvidno je da postoji značajna razlika između dva genotipa. Ono što se pokušalo postići KEGG analizom je definirati specifičan metabolit sa pripadajućim metaboličkim putem koji čine lipidom različitim. Statistički značajna razlika u 15 metabolita se našla na uzorcima CPu regije. Bitno je naglasiti kako se svi ovi metaboliti eksprimiraju u WT miševa i odsutni su u KO miševa. Jasnog objašnjenja zašto su navedene promjene primijećene samo u CPu regiji nema. Mogući uzroci su općenita predispozicija bazalnih ganglija prema metaboličkim deficitima ili prisutnost drugačijeg omjera neurona u odnosu na glija stanice. Svaka daljnja analiza i potvrda dobivenih rezultata svakako mora sadržavati bolje strukturirane regije od interesa u kojima bi se jasno mogao ispoljiti metabolički deficit KO miševa u odnosu na WT. Grupiranjem metabolita u pripadajuće metaboličke puteve ne dobivamo obrazac deficita koji predstavlja jasnu uzročno-posljedičnu povezanost sa značajnostima iz histoloških bojanja. Međutim detaljnijom analizom, uz pretpostavke proizašle iz dosadašnjih istraživanja, mogla bi se povući jasnija paralela između jednih i drugih rezultata. Tako npr. nedostatak u metabolizmu arginina i prolina sam po sebi ima jasnu patofiziološku povezanost sa amiotrofičnom lateralnom sklerozom, što ukazuje na to da poremećaji u njihovom metabolizmu dovode do patologije na razini neurona (45). Prolin kao

aminokiselina može se sintetizirati iz glutamata, arginina i ornitina. Prolin ima također bitnu ulogu u procesu apoptoze stanice (46). Mehanizam apoptoze bi se mogao povezanosti sa procesom ferroptoze, mehanizmom programirane stanične smrti jedinstvenom po lipidnoj peroksidaciji i nakupljanju unutarstaničnog željeza (47, 48). Bitno je naglasiti kako pretjerana količina glutamata u izvanstaničnoj okolini djeluje kao pokretač procesa ferroptoze (49). Metabolit koji u našem slučaju nedostaje u procesu ferroptoze je koenzim Q10. On se nalazi na unutarnjoj membrani mitohondrija i sudjeluje u procesu oksidativne fosforilacije. Njegovoj biosintezi posreduju metaboliti čiji nedostatak također primjećujemo u KO miševa, a to su oni iz puta biosinteze ubikinona (50). Povezanost između metabolita porfirina i oksidativnih procesa unutar stanice jasno objašnjavaju radovi Chang i sur., i Know i sur. (51, 52). U ovim radovima autori utvrđuju mehanizam s kojim hem-oksigenaza posreduje u ferroptozu. Tako je zatvoren krug gdje sve metabolite odsutne u KO miševa možemo svrstati u one zadužene za oksidativni metabolizam stanice. Također bitan metabolički put koji bi se mogao potkrijepiti histološkim rezultatima jest onaj elongacije masnih kiselina. Sličan nedostatak masnih kiselina doveo je u istraživanju Innis et Dyer (53) do izmjenjene biosinteze fosfolipida od strane astrocita.

Jedna od statistički značajnih promjena koje su u ovom radu uočene je ona na CI regiji prilikom prikazivanja enzimatske aktivnosti SDH-e, pri čemu je uočen slabiji intenzitet obojenja u CI regiji miševa KO genotipa u odnosu na miševe WT genotipa. Budući da se mjerenjem aktivnosti SDH-e posredno mjeri mitohondrijska aktivnost, ovi rezultati upućuju na manjak mitohondrija u aksonima te regije KO miševa. Druge dvije promatrane regije, CC i CPu, bile su bez značajnijih promjena u odnosu na miševe WT genotipa. CI regija punim nazivom *capsula interna* je histološki promatrano gust snop mijeliniziranih aksona. Vlakna snopa su funkcionalno projekcijska te gotovo svi ascedentni i descendentni putevi iz cerebralnog korteksa prolaze kroz CI-u (54). Kao takav, snop čine neuroni višeg reda sa značajno dužim aksonima koji su samim time podložniji promjenama u mitohondrijskom broju i sastavu. U istraživanju Tang i sur. (55) su uspjeli povezati nedostatak GD3 sintaze s poremećenim mehanizmom mitohondrijske fizije. Mitohondrijska fizija je proces razdvajanja mitohondrija pri čemu se broj mitohondrija povećava (56). Upravo bi taj nedostatak zajedno sa deficitom metabolita potvrđenim MS-om mogao objasniti statistički značajno smanjenje intenziteta obojenja aktivnosti SDH-e u dugim vlaknima CI-e koje je prikazano u ovom radu.

Također je značajna promjena primijećena u intenzitetu obojenja tkivne raspodjele kolesterola. U mozgovima KO miševa utvrđeno je statistički značajno smanjenje intenziteta obojenja u CI i CPu regijama. Rezultati ukazuju na izmijenjenost lipidoma u miševa KO

genotipa. Detaljniji uvid u mehanizam nastanka promjena i njegovu lokalizaciju ostaje nejasan. Moguće objašnjene može se izvući iz rada Mlinac i sur. (35), gdje je primijećena izmijenjena ekspresija svih gena zaduženih za biosintezu i regulaciju metabolizma kolesterola u mozgu. Kako bi se sa većom sigurnošću dokazala sukladnost sa rezultatima ovog rada mogla bi se provesti analiza tkivne raspodjele kolesterola u više regija i usporediti ih sa rezultatima navedenog rada.

Promjene primijećene histološkim bojanjem tkivne raspodjele fosfolipida pokazuju statistički značajno smanjenje intenziteta obojenja u sve tri promatrane regije. Ovi rezultati također upućuju na izmijenjenost lipidoma u KO miševa. Jasno objašnjenje ovakve pojave u dosadašnjoj literaturi nema. Da bi se ušlo u detaljniju analizu potrebno je prvo raščlaniti u kojem tipu stanica dolazi do značajnijeg smanjenja intenziteta obojenja. U promatranim regijama imamo neurone, točnije aksone te stanice astrocita i oligodendrocita koje pripadaju obitelji glija stanica. Lipidomska analiza pojedinačnih stanica u različitim regijama mozga pokazuje da su kolesterol i fosfolipidi podjednako zastupljeni u sve tri vrste stanica (57). Ono gdje se nailazi na razlike je put biosinteze koji je izraženiji u regijama bijele moždane tvari u odnosu na sivu. Također je puno izraženiji u glijalnim stanicama, specifično oligodendrocitima (58). Bolja raspodjela odabranih regija, pokrijepljena rezultatima MS-e o nedostatku u metaboličkom putu elongacije masnih kiselina trebala bi u idućim istraživanjima pružiti jasniji odgovor zašto je zabilježena promjena nastala.

Nadalje, statistički je značajna i promjena obojenja tkivne raspodjele aktinskih mikrofilamenata. Za razliku od prethodnih obojenja, ovdje je primijećen pojačan intenzitet obojenja što upućuje na povećanje količine aktinskih mikrofilamenata u sve tri promatrane regije u KO miševa. Budući da se bojanje korišteno u ovom radu, *Rhodamine Phalloidin*, specifično veže za F-aktin koji čini osnovnu strukturu citoskeleta pokušaj objašnjenja primijećenih pojava bi se mogao naći u radu Abad-Rodriguez and Robotti, 2007 (59). U tom je radu postavljena pozitivna korelacija između jednostavnog gangliozida a-serije GM1 i fosforilacijske kaskade unutarstaničnog sustava kontrole citoskeletnog razvoja, gdje GM1 potiče rast aksona. Miševi KO genotipa korišteni u ovom radu imaju pojačanu ekspresiju GM1 gangliozida kao i ostalih jednostavnijih gangliozida kao posljedica nedostataka kompleksnijih serija. Višak GM1 i nedostatak b-serije mogao bi utjecati na jedan od unutarstaničnih mehanizama uzrokujući pojačan rasta aksona, a posljedično tome i aktinskog citoskeleta.

Ograničenja ove studije su mali broj životinja na kojima se provelo istraživanje, te bi za buduća istraživanja bilo dobro povećati broj životinja u svakoj ispitivanoj skupini. Također je bitno naglasiti kako svaka pronađena značajnost tek sugerira moguću promjenu koju bi trebalo

detaljnije proučiti. U budućim istraživanjima mogao bi se povećati broj ispitivanih regija mozga te bi se mogao povećati broj histoloških i imunohistokemijskih metoda. Mogao bi se također uvesti biljeg za astrocite te bi se mogla napraviti kolokalizacijska analiza kako bi se vidjelo je li mehanizam nastale promijene glijalnog ili neuronskog podrijetla. MALDI-TOF-MS bi se svakako trebao provesti na regijama mozga drugačije histološke građe od ovih promatranih u ovom radu.

## 7. Zaključci

Glavni zaključci ove studije su:

- 1) Slikovna masena spektrometrija je pokazala promjenu lipidoma u miševa s isključenim *St8sial* genom u odnosu na miševe divljeg tipa.
- 2) Pomoću KEGG baze u *nucleus caudatus et putamen* regiji izdvojeno je 15 metabolita koji sudjeluju u različitim metaboličkim putevima koji nedostaju u miševa s isključenim *St8sial* genom u odnosu na miševe divljeg tipa.
- 3) U *capsula interna* i *nucleus caudatus et putamen* regijama utvrđeno je smanjenje količine kolesterola.
- 4) U sve tri promatrane regije utvrđeno je smanjenje količine fosfolipida.
- 5) U *capsula interna* regiji utvrđena je smanjena aktivnosti sukcinat dehidrogenaze.
- 6) U sve tri regije utvrđena je povećana količina aktinskih mikrofilamenata.

## 8. Sažetak

**Ciljevi:** Pomoću slikovne masene spektrometrije istražiti postoji li poremećaj u metabolizmu lipida mozga miševa s isključenim *St8sial1* genom (engl. *knock-out*, KO) u usporedbi s miševima divljeg tipa (engl. *wild type*, WT) iste dobi. Definirati metabolite čiji je metabolizam izmijenjen i rezultate dodatno potvrditi histološkim metodama bojenja.

**Nacrt studije:** Studija parova

**Materijali i metode:** Korištene su dvije grupe miševa: KO i WT. Korišteno je 8 miševa muškog spola, dobi od 4,5 mjeseci, 4 miša od svakog genotipa. Na rezovima svježeg tkiva napravljena je slikovna masena spektrometrija i sljedeća histološka bojenja: enzimska aktivnost alkalne fosfataze, enzimska aktivnost sukcinat dehidrogenaze, tkivna raspodjela kolesterola, fosfolipida i tkivna raspodjela aktinskih. Kvantifikacija histoloških bojenja učinjena je pomoću Fiji računalnog programa.

**Rezultati:** Masena spektrometrija pokazuje jasnu razliku između KO i WT miševa analizom osnovnih komponenti. Statistički značajna promjena metabolita je pronađena na *nucleus caudatus et putamen* regiji u različitim metaboličkim putevima. Bojenje enzimatske aktivnosti sukcinat dehidrogenaze pokazalo je značajno smanjenje obojenja u *capsula interna* regiji. Bojenjem tkivne raspodjele kolesterola utvrđeno je slabije obojenje *capsula interna* i *nucleus caudatus et putamen* regija, a bojenjem fosfolipida slabije obojenje je utvrđeno u svim regijama. Suprotno, bojenja aktinskih mikrofilamenata bilo je značajno pojačano u svim regijama KO miševa.

**Zaključak:** Rezultati sugeriraju da KO miševi imaju promjene u lipidomu mozgu koje bi mogle imati funkcionalne posljedice.

**Ključne riječi:** *St8sial1*, lipidom, MALDI-TOF-MS, gangliozidi, GD3 sintaza



## 9. Summary

### Brain lipidomics of *St8sia1* knock-out mice

**Objectives:** Using mass spectrometry imaging to try to determine if there is a disturbance in the lipid metabolism of the brain regions of mice with *St8sia1* gene turned off (knock-out, KO) compared to wild type mice (WT) of the same age. Define lipidoma metabolites whose metabolism has been altered. Confirm the results with histological staining methods.

**Study design:** Study of pairs

**Materials and methods:** Two groups of mice were used: KO and WT. 8 male mice, 4,5 months old, 4 mice of each genotype were used. Imaging mass spectrometry and the following histological staining were performed on fresh tissue sections: alkaline phosphatase enzyme activity, succinate dehydrogenase enzyme activity, cholesterol, phospholipid tissue distribution, and actin tissue distribution. Quantification of histological staining was done using a computer program Fiji.

**Results:** Mass spectrometry shows a clear difference between KO and WT mice by analyzing the basic components. A statistically significant change in metabolites was found on the *nucleus caudatus et putamen* region in different metabolic pathways. Staining of the enzymatic activity of succinate dehydrogenase showed a significant reduction in staining in the *capsula interna* region. By staining the tissue distribution of cholesterol, a weaker staining of the *capsula interna* and *nucleus caudatus et putamen* regions was found, and by staining of phospholipids, a weaker staining was found in all regions. In contrast, actin microfilament staining was significantly enhanced in all regions of KO mice.

**Conclusion:** The results suggest that KO mice have changes in brain lipidoma that could have functional consequences.

**Keywords:** *St8sia1*, lipidoma, MALDI-TOF-MS, gangliosides, GD3 synthase

**10. Literatura**

1. Watson AD. Thematic review series: Systems Biology Approaches to Metabolic and Cardiovascular Disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *Journal of Lipid Research*. 01. listopad 2006.;47(10):2101–11.
2. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC, i ostali. A comprehensive classification system for lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2005.;107(5):337–64.
3. Sparvero LJ, Amoscato AA, Kochanek PM, Pitt BR, Kagan VE, Bayır H. Mass-spectrometry based oxidative lipidomics and lipid imaging: applications in traumatic brain injury. *Journal of Neurochemistry*. 2010.;115(6):1322–36.
4. Zhuo C, Hou W, Tian H, Wang L, Li R. Lipidomics of the brain, retina, and biofluids: from the biological landscape to potential clinical application in schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2020.;10(1):391.
5. Dale Purves, George J. Augustine, David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthony-Samuel LaMantia, Leonard E. White. *Neuroscience 5th Edition*. Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press; 2011.
6. Merrill AH, Sullards MC, Allegood JC, Kelly S, Wang E. Sphingolipidomics: high-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Methods*. lipanj 2005.;36(2):207–24.
7. Neurolipidomics: challenges and developments [Internet]. [citirano 05. lipanj 2021.]. Dostupno na: <https://fbscience.com/Landmark/articles/10.2741/2258>
8. Danielsen EM, Hansen GH. Lipid raft organization and function in brush borders of epithelial cells (Review). *Molecular Membrane Biology*. 01. siječanj 2006.;23(1):71–9.
9. Patra SK. Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 01. travanj 2008.;1785(2):182–206.
10. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000.;1(1):31–9.

11. Dwek RA, Butters TD, Platt FM, Cox TM, Proia RL. Glycosphingolipid functions: insights from engineered mouse models. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 29. svibanj 2003.;358(1433):879–83.
12. Allende ML, Proia RL. Simplifying complexity: genetically resculpting glycosphingolipid synthesis pathways in mice to reveal function. *Glycoconj J*. 2014.;31(9):613–22.
13. D'Angelo G, Capasso S, Sticco L, Russo D. Glycosphingolipids: synthesis and functions. *The FEBS Journal*. 2013.;280(24):6338–53.
14. Yu RK, Tsai Y-T, Ariga T, Yanagisawa M. Structures, Biosynthesis, and Functions of Gangliosides-an Overview. *Journal of Oleo Science*. 2011.;60(10):537–44.
15. Lundblad A. Gunnar Blix and his discovery of sialic acids. Fascinating molecules in glycobiology. *Ups J Med Sci*. 2015.;120(2):104–12.
16. Schnaar RL. Brain gangliosides in axon-myelin stability and axon regeneration. *FEBS Lett*. 03. svibanj 2010.;584(9):1741–7.
17. Schnaar RL. Gangliosides of the vertebrate nervous system. *J Mol Biol*. 2016.;428(16):3325–36.
18. Svennerholm L. Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids. Svennerholm L, Asbury AK, Reisfeld RA, Sandhoff K, Suzuki K, Tettamanti G, i ostali, urednici. *Prog Brain Res*. 1994.;101:XI–XIV.
19. Varki A, Cummings RD, Aebi M, Packer NH, Seeberger PH, Esko JD, i ostali. Symbol nomenclature for graphical representations of glycans. *Glycobiology*. 2015.;25(12):1323–4.
20. Inokuchi J-I, Inamori K-I, Kabayama K, Nagafuku M, Uemura S, Go S, i ostali. Biology of GM3 ganglioside. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2018.;156:151–95.
21. Schnaar RL. The biology of gangliosides. *Adv Carbohydr Chem Biochem*. 2019.;76:113–48.
22. 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]. 30. rujana 2013. [citirano 08. lipanja 2021.];8(9). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3787110/>

23. Lu SM, Fairn GD. Mesoscale organization of domains in the plasma membrane – beyond the lipid raft. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2018.;53(2):192–207.
24. Groux-Degroote S, Rodríguez-Walker M, Dewald JH, Daniotti JL, Delannoy P. Gangliosides in cancer cell signaling. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2018.;156:197–227.
25. Chiricozzi E, Pomè DY, Maggioni M, Di Biase E, Parravicini C, Palazzolo L, i ostali. Role of the GM1 ganglioside oligosaccharide portion in the TrkA-dependent neurite sprouting in neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 2017.;143(6):645–59.
26. Pronker MF, Lemstra S, Snijder J, Heck AJR, Thies-Weesie DME, Pasterkamp RJ, i ostali. Structural basis of myelin-associated glycoprotein adhesion and signalling. *Nat Commun.* 2016.;7:13584.
27. Zuverink M, Barbieri JT. Protein toxins that utilize gangliosides as host receptors. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2018.;156:325–54.
28. Milorad Zjalić. Effects of changes in glycolipid cell membrane composition on the composition of lipid rafts in SH-SY5Y human neuroblastoma cell line\_V5. 2021.
29. Human gene database - St8sia1 Gene [Internet]. GeneCards. Dostupno na: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ST8SIA1>
30. UniProtKB - Q92185 (SIA8A\_HUMAN) [Internet]. UniProt. Dostupno na: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q92185>
31. Sandhoff K, Kolter T. Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003.;358(1433):847–61.
32. Okada M, Itoh Mi M-I, Haraguchi M, Okajima T, Inoue M, Oishi H, i ostali. b-series Ganglioside deficiency exhibits no definite changes in the neurogenesis and the sensitivity to Fas-mediated apoptosis but impairs regeneration of the lesioned hypoglossal nerve. *J Biol Chem.* 2002.;277(3):1633–6.
33. Kawai H, Allende ML, Wada R, Kono M, Sango K, Deng C, i ostali. Mice expressing only monosialoganglioside GM3 exhibit lethal audiogenic seizures. *J Biol Chem.* 2001.;276(10):6885–8.

34. Handa Y, Ozaki N, Honda T, Furukawa K, Tomita Y, Inoue M, i ostali. GD3 synthase gene knockout mice exhibit thermal hyperalgesia and mechanical allodynia but decreased response to formalin-induced prolonged noxious stimulation. *Pain*. 2005.;117(3):271–9.
35. Mlinac K, Fon Tacer K, Heffer M, Rozman D, Kalanj Bogar S. GD3 synthase deficient mice exhibit altered cholesterologenic genes expression in the brain. *Neurogenomics and neuroimaging of developmental disorders Abstract book*. 2009.;76.
36. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, i ostali. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. srpanj 2012.;9(7):676–82.
37. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, i ostali. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*. 29. studeni 2017.;18(1):529.
38. R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. [citirano 09. kolovoz 2021.]. Dostupno na: <https://www.r-project.org/>
39. Picart-Armada S, Fernández-Albert F, Vinaixa M, Yanes O, Perera-Lluna A. FELLA: an R package to enrich metabolomics data. *BMC Bioinformatics*. 22. prosinac 2018.;19(1):538.
40. *Mathematical Statistics with Resampling and R, 2nd Edition | Wiley* [Internet]. Wiley.com. [citirano 09. kolovoz 2021.]. Dostupno na: <https://www.wiley.com/en-us/Mathematical+Statistics+with+Resampling+and+R+%2C+2nd+Edition-p-9781119416531>
41. Tenenbaum D, Volkening J, Maintainer BP. KEGGREST: Client-side REST access to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [Internet]. Bioconductor version: Release (3.13); 2021 [citirano 09. kolovoz 2021.]. Dostupno na: <https://bioconductor.org/packages/KEGGREST/>
42. Konietzny A, Bär J, Mikhaylova M. Dendritic Actin Cytoskeleton: Structure, Functions, and Regulations. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017.;11:147.
43. Fifková E. Actin in the nervous system. *Brain Res*. lipanj 1985.;356(2):187–215.
44. Ribeiro-Resende VT, Araújo Gomes T, de Lima S, Nascimento-Lima M, Bargas-Rega M, Santiago MF, i ostali. Mice lacking GD3 synthase display morphological abnormalities in the sciatic nerve and neuronal disturbances during peripheral nerve regeneration. *PLoS One*. 2014.;9(10):e108919.

45. Patin F, Corcia P, Vourc'h P, Nadal-Desbarats L, Baranek T, Goossens J-F, i ostali. Omics to Explore Amyotrophic Lateral Sclerosis Evolution: the Central Role of Arginine and Proline Metabolism. *Mol Neurobiol.* 01. rujan 2017.;54(7):5361–74.
46. Phang JM, Donald SP, Pandhare J, Liu Y. The metabolism of proline, a stress substrate, modulates carcinogenic pathways. *Amino Acids.* 01. studeni 2008.;35(4):681–90.
47. Reichert CO, de Freitas FA, Sampaio-Silva J, Rokita-Rosa L, Barros P de L, Levy D, i ostali. Ferroptosis Mechanisms Involved in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 20. studeni 2020.;21(22):8765.
48. Weiland A, Wang Y, Wu W, Lan X, Han X, Li Q, i ostali. Ferroptosis and its Role in Diverse Brain Diseases. *Mol Neurobiol.* srpanj 2019.;56(7):4880–93.
49. Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: death by lipid peroxidation. *Trends Cell Biol.* ožujak 2016.;26(3):165–76.
50. Wang Y, Hekimi S. Understanding Ubiquinone. *Trends in Cell Biology.* 01. svibanj 2016.;26(5):367–78.
51. Chang L-C, Chiang S-K, Chen S-E, Yu Y-L, Chou R-H, Chang W-C. Heme oxygenase-1 mediates BAY 11-7085 induced ferroptosis. *Cancer Lett.* 01. ožujak 2018.;416:124–37.
52. Kwon M-Y, Park E, Lee S-J, Chung SW. Heme oxygenase-1 accelerates erastin-induced ferroptotic cell death. *Oncotarget.* 10. rujan 2015.;6(27):24393–403.
53. Innis SM, Dyer RA. Brain astrocyte synthesis of docosahexaenoic acid from n-3 fatty acids is limited at the elongation of docosapentaenoic acid. *Journal of Lipid Research.* 01. rujan 2002.;43(9):1529–36.
54. Moini J, Piran P. Chapter 3 - Gross anatomy of the brain. U: Moini J, Piran P, urednici. *Functional and Clinical Neuroanatomy* [Internet]. Academic Press; 2020 [citirano 26. kolovoz 2021.]. str. 77–94. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128174241000033>
55. Tang F-L, Wang J, Itokazu Y, Yu RK. Ganglioside GD3 regulates dendritic growth in newborn neurons in adult mouse hippocampus via modulation of mitochondrial dynamics. *Journal of Neurochemistry.* 2021.;156(6):819–33.

56. Liu YJ, McIntyre RL, Janssens GE, Houtkooper RH. Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease. *Mechanisms of Ageing and Development*. 01. ožujak 2020.;186:111212.
57. Fitzner D, Bader JM, Penkert H, Bergner CG, Su M, Weil M-T, i ostali. Cell-Type- and Brain-Region-Resolved Mouse Brain Lipidome. *Cell Reports*. rujan 2020.;32(11):108132.
58. Hofmann K, Rodriguez-Rodriguez R, Gaebler A, Casals N, Scheller A, Kuerschner L. Astrocytes and oligodendrocytes in grey and white matter regions of the brain metabolize fatty acids. *Sci Rep*. 07. rujan 2017.;7(1):10779.
59. Abad-Rodriguez J, Robotti A. Regulation of axonal development by plasma membrane gangliosides. *Journal of Neurochemistry*. 2007.;103(s1):47–55.

## 11. Životopis

### OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Josip Grbavac

Adresa: Certisa 12, 31 400 Đakovo

e-mail: jgrbavadj@gmail.com

Datum i mjesto rođenja: 26. listopada 1996., Zagreb

### OBRAZOVANJE

2015. – 2021. Sveučilišni integrirani preddiplomski i diplomski studij medicine,

Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku

2011. – 2015. Gimnazija Antuna Gustava Matoša, Đakovo

2003. – 2011. Osnovna škola "Vladimir Nazor" u Đakovu

### OSTALE AKTIVNOSTI

2017. – Festival znanosti u Osijeku, aktivni sudionik

2018. – 2019. demonstrator na Katedri za anatomiju i neuroznanost

2019. – sudjelovao u *Ljetnoj školi intervencijske radiologije* u Rijeci

2019. – Završio školu stručnog njemačkog jezika za medicinare na *SLI* sveučilišta u Freiburgu

2020. – Tjedan mozga u Osijeku, aktivni sudionik

2021. – Erasmus+ studentska praksa u Milanu, Italija