Ekspresija kalbindina-D28k i kalretinina u hipotalamusu St3Gal2, St3Gal3 i St3Gal2/3 mišjih modela

Grgac, Robert

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:193687

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija;
smjer: znanstveni

Robert Grgac

Ekspresija kalbindina-D28k i kalretinina u hipotalamusu *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* mišjih modela

Diplomski rad

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Ekspresija kalbindina-D28k i kalretinina u hipotalamusu *St3Gal2, St3Gal3* i *St3Gal2/3* mišjih modela

Robert Grgac

Rad je izrađen: na Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka
Mentor: Dr.sc. Senka Blažetić, docent

Kratak sažetak diplomskog rada :

Kalbindin-D28k i kalretinin pripadaju skupini kalcij vezujućih proteina koji se koriste kao markeri interneurona, koji su heterogeno izraženi unutar hipotalamusa. Hipotalamus je regija mozga odgovorna za funkcije hranjena i održavanje homeostaze organizma. Budući da miševi izražavaju vidljive fenotipske razlike, cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi postoji li statistički značajna razlika u ekspresiji navedenih proteina unutar hipotalamusa koja bi mogla rezultirati poremećajem homeostaze i poremećajem u ishrani. Imunohistokemijskom analizom dokazali smo značajne razlike u ekspresiji kalbindina D28k i kalretinina u mozgu genetski preinačenih mišjih modela *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* u usporedbi s miševima divljega tipa (WT).

Broj stranica: 35
Broj slika: 15
Broj tablica: 1
Broj literaturnih navoda: 73
Jezik izvornika: Hrvatski
Ključne riječi: gangliozidi, interneuroni, kalretinin, kalbindin, pretilost, miševi
Datum obrane: 29. listopada 2018.

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. Dr.sc. Irena Labak, doc., predsjednik
2. Dr.sc. Valentina Pavić, doc., član
3. Dr.sc. Senka Blažetić, doc., mentor i član
4. Dr.sc. Rosemary Vuković, doc., zamjena član

Rad je pohranjen u:
na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD

MS THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Department of Biology
Graduate university study programme in Biology
Scientific Area: Natural sciences
Scientific Field: Biology

Expression of calbindin-D28k and calretinin in the brain of *St3Gal2*, *St3Gal3* and *St3Gal2/3* mice models

Robert Grgac

Thesis performed at: Department of Biochemistry and Ecophysiology of plants
Supervisor: Senka Blažetić, PhD, Assistant professor

Short abstract:

Calbindin-D28k and calretinin belong to a group of calcium binding proteins commonly used as interneuronal markers, which are heterogeneously expressed within the hypothalamus. The hypothalamus is the region of the brain responsible for the functions of feeding and maintaining homeostasis. Since the observed mice models expressed visible phenotypic differences, the aim of this study was to determine whether there was any significant change in the expression of those proteins within the hypothalamus that could result in homeostatic imbalance and nutritional disorders. Immunohistochemistry analysis peformed in this research shows significant differences in the expression of calbindin-D28k and calretinin in the brains of studied *St3Gal2*, *St3Gal3* and *St3Gal2/3* genetically modified mice models when compared to the wild type (WT) mice.

Number of pages: 35
Number of figures: 15
Number of tables: 1
Number of references: 73
Original in: Croatian
Key words: gangliosides, interneurons, calretinin, calbidin, obesity, mice
Date of the thesis defence: 29th October 2018

Reviewers:
1. Irena Labak, PhD, Assistent professor, chair
2. Valentina Pavić, PhD, Assistent professor, member
3. Senka Blažetić, PhD, Assistent professor, mentor and member
4. Rosemary Vuković, PhD, Assistent professor, member

Thesis deposited in
on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

Ovaj rad je izrađen u okviru projekta "Uloga lipidnih splavi i glikokonjugata u razvoju i regeneraciji živčanog sustava" (219-0061194-2158) voditeljice prof. dr. sc. Marije Heffer.

Prije svega, zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Senki Blažetić na strpljenju, savjetima i vodstvu tokom izrade ovog diplomskog rada.
Također se zahvaljujem cijelome Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka te prof. dr. sc. Mariji Heffer na pruženom povjerenju i pristupu labosima.

Na kraju, zahvaljujem se svojoj obitelji na podršci tokom cijeloga školovanja te svojim prijateljima na mnoštvu uspomena stvorenih tokom godina i pomoći pri savladavanju svih prepreka na putu.

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. Gangliozidi **1**
1.1.1. Biosinteza i razgradnja gangliozida 2
1.1.2. Sijalotransferaze kod *St3Gal2* i *St3Gal3* mišjih modela 4
1.1.3. Uloga gangliozida 6
1.2. Interneuronski kalcij-vezujući proteini **7**
1.2.1. Uloga kalcij-vezujućih proteina u živčanom sustavu 7
1.2.2. Kalbindin-D28k 8
1.2.3. Kalretinin 9
1.3. Povezanost hipotalamusa, pretilosti i gangliozida **10**
1.4. Uloga interneurona u razvoju pretilosti **12**
1.4.1. Interneuroni arkuatne jezgre hipotalamusa 12
1.4.2. Interneuroni područja lateralnog hipotalamusa 13
1.5 Cilj rada 14

2. MATERIJALI I METODE **15**

2.1.Materijal **15**
2.1.1. Pokusne životinje 15
2.2.Metode **15**
2.2.1. Priprema rezova mozga za analizu 15
2.2.1. Imunohistokemija 16
2.3.Statistika **18**

3. REZULTATI **19**

3.1.Analiza kalbindina u hipotalamusu mišjih modela **20**
3.2.Analiza kalretinina u hipotalamusu mišjih modela **23**

4. RASPRAVA **26**

5. ZAKLJUČAK **29**

6. LITERATURA **30**

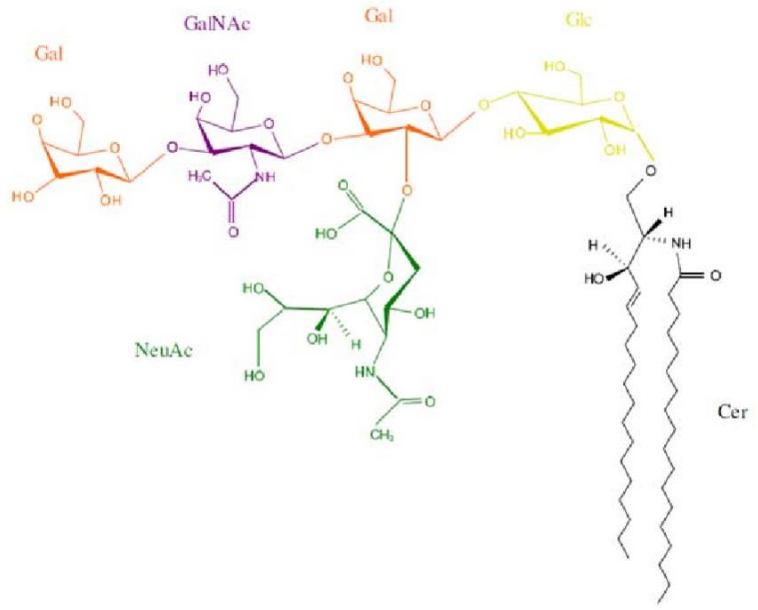
1. UVOD

1.1. Gangliozidi

Gangliozidi su strukturalno raznovrsna podskupina glikosfingolipida koji se nalaze na svim plazmatskim membranama sisavaca, čija je ekspresija najveća u mozgu.

Biološke uloge gangliozida su također mnogobrojne, a uključuju procese vezane uz staničnu adheziju, imunomodulaciju, kontrolu rasta te modulaciju aktivnosti receptora (Kono i sur. 1996).

Gangliozidi se klasificiraju kao kiseli glikosfingolipidi koji sadrže sijalinsku kiselinu (SA) vezanu za oligoglikozilnu okosnicu pričvršćenu na ceramidnu bazu (Slika 1) (Mocchetti 2005).

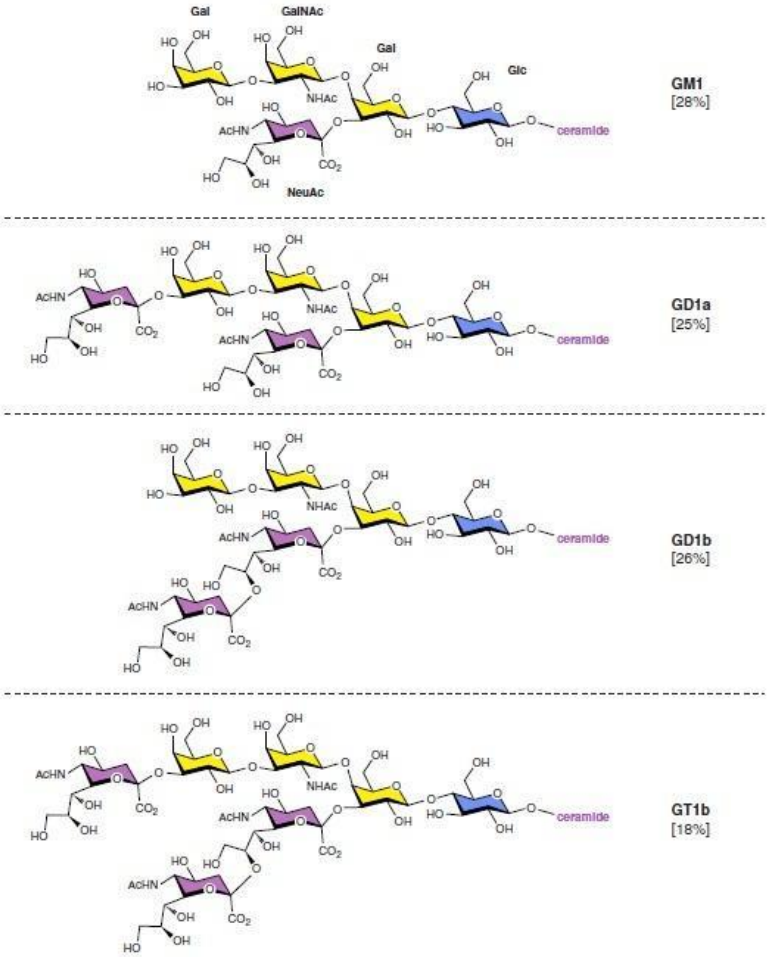


Slika 1: Kemijska struktura gangliozidnih derivata acetilneuraminske kiseline (sijalinske kiseline) i ceramida. U slučaju GM1 prisutna su četiri ugljikohidrata, jedna glukoza, dvije galaktoze i jedan N-acetilgalaktozamin. U slučaju GM2 i GM3, gube se prva galaktoza i acetilgalaktozamin.Cer (ceramid), Gal (galaktoza), GalNAC (N-acetilgalaktozamin), Glc (glukoza), NeuAC (N-acetilmuraminska kiselina) (Slika preuzeta iz Mlinac-Jerković i Kalanj-Bognar, 2010).

1.1.1. Biosinteza i razgradnja gangliozida

Gangliozidi se inicijalno sintetiziraju modifikacijom serina u 3-ketosfinganin, nakon čega slijedi dodavanje raznih šećernih skupina, uvijek uključujući najmanje jedan ostatak sijalinske kiseline (Ledeen i Yu 1982). Sijalinska kiselina je najčešće N-acetil-neuraminska kiselina, ali može također biti i N-glikolil-neuraminska kiselina (Tettamanti i Riboni 1994). Sinteza ceramida odvija se u endoplazmatskom retikulumu, dok se većina naknadnih glikozilacija odvija u različitim odjeljcima Golgijevog tijela. Nakon sinteze gangliozidi se prenose na vanjsku stranu plazmatske membrane i nalaze se gotovo isključivo u toj regiji stanice. Vrlo niske koncentracije gangliozida pronađene su i u endoplazmatskom retikulumu, Golgijevom tijelu i lizosomima (Zeller i Marchase 1992). Nabijena regija gangliozida koja sadrži sijalinsku kiselinu prolazi kroz izvanstanični prostor, dok nepolarna područja ostaju umetnuta u plazmatsku membranu. Stanice mogu potencijalno proizvesti različite vrste gangliozida, a njihova heterogenost rezultat je različitih kombinacija šećernih ostataka koji se vežu na ceramidnu bazu. Navedeni šećeri mogu uključivati glukozu, galaktozu, N-acetilgalaktozamin, acetilglukozamin i fruktozu (Svennerholm 1994). Karakteristične sekvence oligosaharida vezane na ceramidnu bazu mogu se upotrijebiti za identifikaciju pet kategorija gangliozida: ganglio, gala, globo, lacto i hemato. Prema nomenklaturi koju je uveo Lars Svennerholm broj ostataka sijalinske kiseline može se koristiti za razvrstavanje različitih vrsta gangliozida, označenih kao M (monosijalo), D (disijalo) i tako dalje (Mocchetti 2005).

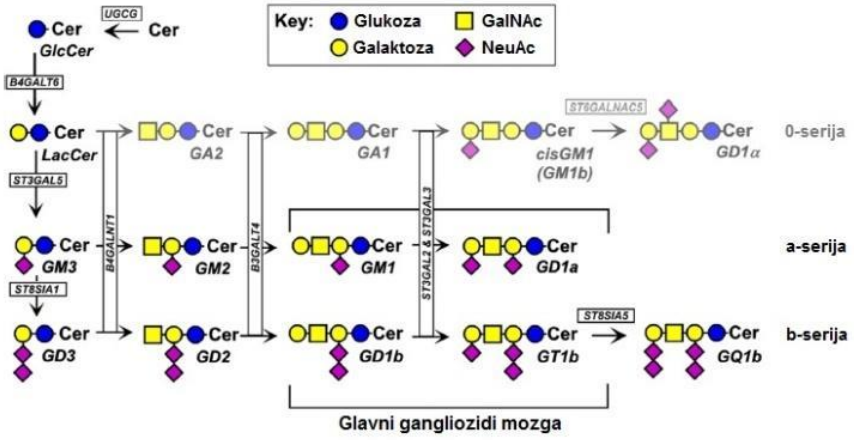
Usprkos velikom broju gangliozida identificiranih u različitim tkivima i organizmima, u mozgu odraslih sisavaca dominiraju četiri vrste: GM1, GD1a, GD1b i GT1b (Slika 2). Navedene vrste gangliozida zajedno predstavljaju veliku većinu (97%) gangliozida mozga (Tettamanti i sur. 1973). Ova četiri gangliozida dijele isti neutralni glikanski dio (Gal β1-3 GalNAc β1-4 Gal β1-4 Glc β1-1 Cer) s različitim brojem sijalinskih kiselina vezanih na unutrašnje i vanjske galaktoze.



Slika 2: Struktura glavnih gangliozida mozga: GM1, GD1a, GD1b i GT1b (Schnaar i sur. 2014).

Četiri glavna gangliozida mozga sintetiziraju se postupno uz pomoć glikoziltransferaza koje prenose svaki monosaharid iz njegovog aktiviranog oblika (UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GalNAc ili CMP-NeuAc) u rastući lanac glikana. Ključna granična točka u biosintetskom lancu je GM3, koji se može produžiti dodavanjem β2-8 vezanog NeuAc-a za formiranje GD3 ili s Gal-l-4 vezanim za formiranje GM2. Jednom kada se GalNAc prenese ne mogu se dodati interni 2-8-vezani NeuAc ostaci pri čemu nastaju GM1 i GD1a, također poznati kao gangliozidi "a-serije". GD3 se također može produžiti dodavanjem GalNAc i naknadnih šećera pri čemu nastaju GD1b i GT1b, gangliozidi "b-serije" (Slika 3).

Osim glavnih skupina, u mozgu postoje i drugi manje brojni gangliozidi koji bi mogli imati važne funkcije u fiziologiji i patologiji. Neki od navedenih su gangliozidi "0-serije" koji nastaju prijenosom GalNAc na laktozilceramid te gangliozidi "c-serije" koji imaju tri ili više sijalinskih skupina na unutarnjem Gal (Schnaar i sur. 2014).



Slika 3. Kompleksni gangliozidi mozga biosintezirani su postupno djelovanjem glikoziltransferaza (Schnaar i sur. 2014).

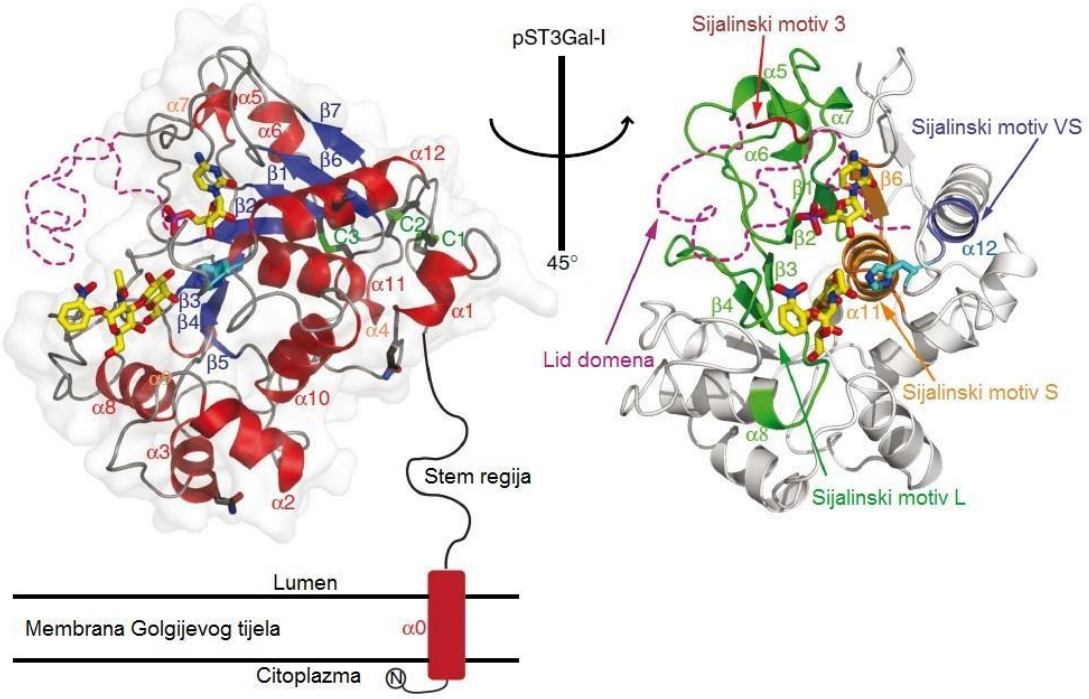
Razgradnja lizosomskog gangliozida odvija se nakon endocitoze dijelova plazma membrane na intraendosomskim i intralizosomskim membranama i srodnim lipidnim agregatima. Taj proces zahtijeva prisutnost odgovarajućih glikozidaza, odgovarajućeg pH, a u nekim slučajevima i proteina za prijenos lipida te odgovarajućeg sastava membrana koje sadrže gangliozid. (Sandhoff i Harzer, 2013). Proces razgradnje odvija se putem sijalidaza i egzoglikohidrolaza koje uklanjaju pojedinačne sijalinske kiseline s nereducirajućeg kraja glikanskog lanca gangliozida, pritom formirajući Cer koji se dalje razdvaja pomoću ceramidaza na dugi osnovni lanac i masne kiseline (Kolter 2012).

1.1.2. Sijalotransferaze kod *St3Gal2* i *St3gal3* mišjih modela

Da bi se razjasnila biosinteza gangliozida također je nužno okarakterizirati enzime sijalotransferaze, posrednike reakcijama koje se odvijaju u membranskim frakcijama Golgijevog tijela (Kono i sur. 1996).

Enzimi sijalotransferaze koji pripadaju skupini glikoziltransferaza kataliziraju prijenos CMP-aktiviranih molekula sijalinske kiseline na akceptorski supstrat u trans-Golgijevoj mreži nakon njihovog transporta kroz membranu Golgijevog tijela.

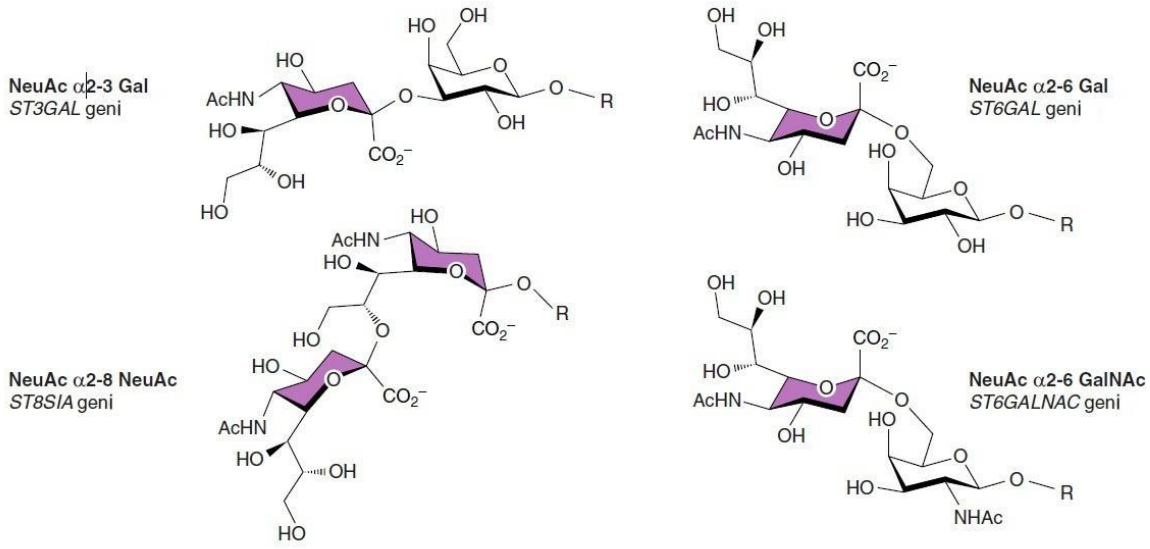
Sve do sada otkrivene životinjske sijalotransferaze imaju tip II transmembranske topologije i sadrže visoko očuvane motive nazvane sijalinski motivi L (*Long*, dugi), S (*Short*, kratki) i VS (*Very Short*, vrlo kratki). Smatra se da su lokalizirane isključivo u Golgijevom tijelu. Sve životinjske sijalotransferaze pripadaju CAZy (*carbohydrate-active enzymes*) obitelji glikoziltransferaza. Osim toga, životinjske sijaliltransferaze imaju uobičajene strukturne osobine sastavljene od kratkog N-terminalnog citoplazmatskog repa, transmembranske domene, stem regije i katalitičke domene. Ukupna dužina aminokiselinskog lanca ovih enzima varira od oko 300 do 600 ostataka, pri čemu su razlike uglavnom posljedica različitih duljina stem regija. Sijalinski motiv L karakterizira područje 45-60 aminokiselina u središtu proteina za koje se smatra da je uključeno u vezanje donorskog supstrata CMP-Sia. Sijalinski motiv S se nalazi na COOH-terminalnom području i sastoji se od slijeda od oko 20-30 aminokiselina. Pokazalo se da je motiv S uključen u vezanje donora i akceptorskih supstrata. Sijalinski motiv VS se također nalazi na COOH-terminalnoj regiji unutar koje se uvijek nalazi jedna glutaminska kiselina odijeljena s četiri aminokiselinska ostatka iz visoko očuvanog histidinskog ostatka. Smatra se da je ovaj motiv uključen u katalitički proces (Takashima 2008).



Slika 4: Model strukture svinjske sijalotransferaze ST3Gal1 na kojemu su dodatno prikazani šećer akceptor (žuto) katalitički centar enzima (modro). Preuzeto i prilagođeno prema Rao i sur. 2009.

Kod sisavca sijalotransferaze omogućavaju formiranje (α2-3, α2-6 α2-8 i α2-9) kovalentih veza između Neu5Ac i akceptorskog šećera, koje dijelimo u četiri osnovne skupine specifične u odnosu na supstrat: α2,3-sijalotransferaze (ST3Gal), α2,6-sijalotransferaze (ST6Gal), GalNAc α2,6-sijalotransferaze (ST6GalNAc) i α2,8- sijalotransferaze (ST8Sia) (Takashima 2008).

Geni sijalotransferaza građeni su od različitih egzona koje možemo pronaći u humanom i mišjem genomu, a koji kodiraju sveukupno šest α2-3 sijalotransferaza (ST3Gal1 do ST3GAL6) (Takashima i sur. 2003).



Slika 5: Struktura četiri osnovne skupine sijalotransferaza bazirana na temelju formiranja veza (Schnaar i sur., 2014).

1.1.3. Uloga gangliozida

Gangliozidi predstavljaju karakterističnu komponentu membrana živčanih stanica, ali se pojavljuju i u drugim membranama. Smatra se da gangliozidi putem modifikacije funkcije membranskih receptora utječu na stanični rast, proliferaciju i diferencijaciju te apoptozu. Osim navednim transmembranskim putem, gangliozidi na receptorske funkcije mogu utjecati i lateralno. Signalizacija specifičnih receptorskih tirozin kinaza može se modificirati lateralnom interakcijom receptorske kinaze s glikolipidima unutar membrane (Lingwood 2011).

Glavni gangliozidi mozga (GM1, GD1a, GD1b, GT1b) primijenjeni na životinjama s ishemijskim i neurodegenerativnim ozljedama mozga štite cerebralne neurone od stanične smrti, te osim toga poboljšavaju održivost neuronskih i glija staničnih linija izloženih glutamatu, H_2O_2 te drugim toksinima (Korotkov i sur. 2015).

Četiri glavne vrste gangliozida ujedno predstavljaju i glavne sijaloglikane u mozgu svih odraslih sisavaca i ptica, što ukazuje na selektivnu prednost za ekspresiju ovih specifičnih struktura (Schnaar i sur. 2014).

1.2. Interneuronski kalcij-vezujući proteini

1.2.1. Uloga kalcij-vezujućih proteina u živčanom sustavu

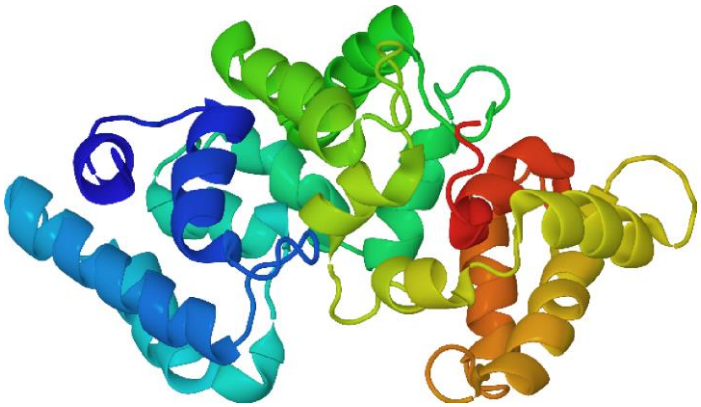
Kalcij-vezujući proteini imaju heterogenu raspodjelu u centralnom živčanom sustavu sisavaca te predstavljaju korisne markere za identifikaciju populacija neurona.

Proteini koji vežu kalcij, kalbindin-D28k (CBD24K), kalretinin i parvalbumin pripadaju *EF-hand* kalcij-vezujućoj skupini proteina (Andressen i sur. 1993; Baimbridge i sur. 1992; Heizmann i Hunziker 1991; Persechini i sur. 1989). Ovi proteini su uključeni u puferiranje (McMahon i sur. 1998; Fierro i Llano 1996) i transport kalcija, kao i regulaciju različitih enzimskih sustava (Heizmann 1992). Iako se u cerebralnom korteksu i hipokampusu kalcij-vezujući proteini eksprimiraju u velikom udjelu GABA-ergičkih stanica, oni su također na različite načine povezani s drugim neurotransmiterima. Na primjer, parvalbumin se nalazi u stanicama koje sadrže glicin i glutamat (Baimbridge i sur. 1992). Također, parvalbumin je često povezan s brzo okidajućim neuronima (Kawaguchi i sur. 1987), ali još uvijek nema takve fiziološke specifičnosti povezane s neuronima koji sadrže kalbindin ili kalretinin (Münkle i sur. 2000).

Kalbidin i kalretinin su prisutni u različitim subpopulacijama neurona, što ih čini vrlo korisnim morfološkim markerima za identificiranje specifičnih podskupina neurona (Andressen i sur. 1993).

1.2.2. Kalbindin-D28k

Kalbindin je kalcij vezujući protein građen od šest *EF-hand* domena od kojih četiri imaju sposobnost vezanja Ca^{2+} (Münkle i sur. 2000) (Slika 6). Sekvencu za CBD28K kodira *CALB1* koji je visoko očuvan među sisavcima i ponajviše izražen u neuronima. CBD28k čini do 1.5 % ukupnih topivih proteina mozga (Berggård i sur. 2002). Posebno ga često nalazimo u Purkinjeovim stanicama maloga mozga (Barski i sur. 2003), granularnim stanicama hipokampusa (Ikriti i sur. 2001) i neokortikalnim interneuronima, te u kostima, bubregu, gušterači i drugim tkivima (Christakos i sur. 1989).



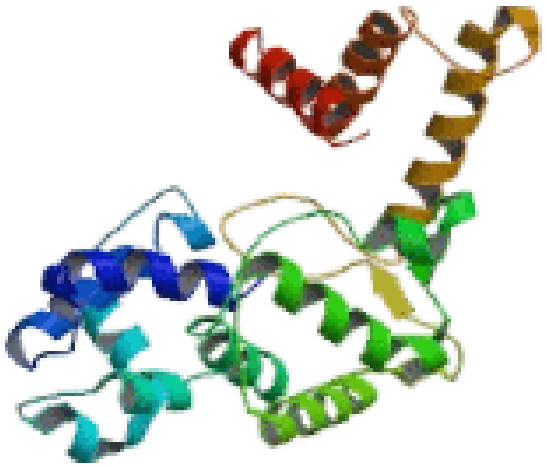
Slika 6: Struktura kalbindina-D28k s obojenim *EF-hand* domenama prikazana pomoću programa Jmol (Kojetin i sur. 2006).

Kalbindin-D28k nalazi se u ulozi senzora kalcija, pufera, transportera, regulatora nizvodnog signaliziranja ovisnog o Ca^{2+} te kontrolora prostorno-vremenske dinamike kalcija i homeostaze održane transportiranjem slobodnog kalcija unutar unutarstaničnih odjeljaka (Berggård i sur. 2002). Još neke od dokazanih uloga uključene su u širok raspon fizioloških procesa, kao što su dugoročna potencijacija (*long-term-potentiation,* LTP) (Molinari i sur. 1996) i cerebelarna motorička koordinacija (Airaksinen i sur. 1997). Protutijela na CB generalno označavaju stanice s tankim, nemijeliniziranim aksonima koje imaju difuznu projekciju. (Celio 1990)

Opaženo je da tokom starenja opada koncentracija CBD28k u cerebelumu miševa i štakora (Amenta i sur. 1994; Iacopino i sur. 1990).

1.2.3. Kalretinin

Kalretinin je po slijedu aminokiselina visoko homologan kalbindinu-D28k (Rogers 1987), no njihov se prostorni raspored u mozgu ne poklapa (Jacobowitz i Winsky 1991). Kalretinin je građen od šest *EF-hand* domena od kojih pet ima sposobnost vezanja Ca^{2+} i jedne domene koja je izgubila tu sposobnost (Stevens i Rogers 1997). Eksprimira se u različitim populacijama neurona, uključujući one u retini, granularnim stanicama malog mozga i slušnim neuronima moždanoga debla (Billing-Marczak i sur. 2004). Substanična lokalizacija kalretinina unutar neurona regulirana je tijekom razvoja. Pretpostavlja se da su promjene u lokalizaciji i ekspresiji kalretinina prilagodba koja daje prostornu kontrolu nad protokom Ca^{2+} (Schwaller 2009). Kod miševa kojima nedostaje kalretinin pojavljuje se oštećena indukcija dugoročne potencijacije (LTP) nakon tetaničke stimulacije hipokampusa. Budući da primjena bikultilina (blokator $GABA_A$ receptora) na istim miševima obnavlja indukciju LTP-a, zaključeno je da nedostatak kalretinina dovodi do otpuštanja suvišaka gama-aminomaslačne kiseline (GABA) na granulozne stanice, što je vjerojatno posljedica povećane ekscitacije inhibicijskih interneurona (Schurmans i sur. 1997). Za razliku od kalbindina, koncentracija kalretinina u mozgu starenjem opada u manjoj mjeri (Kishimoto i sur. 1997).



Slika 7: Struktura kalretinina s obojenim *EF-hand* domenama prikazana pomoću programa Jmol (Slika preuzeta s Web1.).

1.3. Povezanost hipotalamusa, pretilosti i gangliozida

Hipotalamus je primarni regulator unosa hrane u centralnom živčanom sustavu, koji osim toga djeluje kao homeostatski kontrolni centar za sustave regulacije tjelesne temperature, reprodukcije, bioloških ciklusa, hormonalnog balansa i regulacije energije. Arkuatna jezgra hipotalamusa posjeduje slabiju krvno-moždanu barijeru, što omogućava pristup molekulama prisutnima u krvi koje inače ne bi napuštale krvožili sustav. Neuroni hipotalamusa, a pogotovo oni u arkuatnoj jezgri imaju ulogu u detekciji razine hormona u krvi te praćenju općenitog metaboličkog stanja organizma signaliziranog glukozom, leptinom, grelinom i inzulinom. Osim toga, neuroni u medijalnom i lateralnom hipotalamusu djeluju u suradnji s moždanim deblom i drugim moždanim regijama pri kontroli unosa hrane (Van der Pol 2003). Injekcija norepinefrina u hipotalamus ili obližnji ventrikul kao fiziološki odgovor ima trenutno povećanje ili smanjenje ishrane, što ukazuje na modulaciju neuronske aktivnosti (Booth 1968). Osim norepinefrina, neki od spojeva koji utječu na promjenu ishrane su serotonin, dopamin, te samo za hipotalamus specifični hipokretin i oreksin. Većina navedenih spojeva su neuromodulatori, čija je funkcija duža regulacija stanične aktivnosti (Van der Pol 2003).

U arkuatnoj jezgri hipotalamusa nalazimo neuropeptid Y (NPY) i propiomelanokortinske (POMC) neurone, koji imaju suprotne uloge u regulaciji ishrane. (Schwartz i sur. 2000; Elias i sur. 1999)

Za razliku od NPY neurona koji su povezani s povećanjem ishrane, POMC neuronima se pripisuje efekt smanjivanja ishrane putem otpuštanja peptida kao što su α-MSH koji aktiviraju MC3/MC4 melanokortinske receptore. Promjena ishrane uzrokuje promjenu u ekspresiji POMC mRNA. Nedostatak leptina, koji signalizira niske zalihe masti smanjuje ekspresiju melanokortina, ali zato povećava ekspresiju NPY. Blokiranje MC4 receptora uzrokuje povećanje ishrane, a sukladno tome mutacije na istom receptoru uzrokuju pretilost kod ljudi i miševa (O'Rahilly i sur. 2003).

Ventromedialni (VMH) i lateralni hipotalamus (LH) također se smatraju centrima za sitost, odnosno hranjenje. Lezije na VMH povećavaju unos hrane, dok ga lezije na LH smanjuju (Sawchenko 1998). Po rezultatima dosadašnjih istraživanja NPY se generalno pokazao kao inhibitorni neuromodulator koji smanjuje strujanje Ca^{2+} i povećava strujanje K^{+}, smanjujući pritom sinaptičku aktivnost (van der Pol 2003).

Što se tiče gangliozida, kod divljeg tipa miša (WT, *wild type*) eksprimiraju se sva četiri osnovna gangliozida (GM1, GD1a, GD1b i GT1b). Osim divljeg tipa miša, u ovome istraživanju korišteni su genetski modificirani miševi koji imaju utišane gene za α2-3 sijalotransferaze, te iz tog razloga ne sintetiziraju specifične gangliozide. Geni *St3Gal1* do *St3Gal4* odgovorni su za sintezu enzima koji sudjeluju u sintezi GD1a i GT1b iz GM1 i GD1b. Analizom ekspresije gangliozida primjećeno je da se samo miševi s isključenim genom *St3Gal2* bitno razlikuju od divljega tipa, eksprimirajući samo pola od ukupnog broja GD1a i GT1b. Mutacije u sisavaca čija su posljedica nedostatak određenih gangliozida mogu varirati od blagih do letalnih fenotipa (Schnaar i sur. 2014). Fenotipski gledano, *St3Gal2* genetski preinačeni mišji modeli su robusni te relativno slični divljem tipu, dok su *St3Gal3* genetski preinačeni mišji modeli manji od njih, slabiji kod dojenja i lošiji roditelji. U usporedbi sa *St3Gal3* miševima, *St3Gal2/3* miševi su još manji i slabiji, a tek rijetki preživljavaju više od 8 tjedana zbog čega se vrlo teško razmnožavaju čak i ukoliko uspiju doseći reprodukcijsku dob (Sturgill 2012).

Osim navedenih osobina, miševi s ciljano isključenim *St3Gal2* pokazuju otpornost na inzulin i pretilost u kasnijoj dobi. Prema istraživanju koje su proveli Lopez i sur., pri dobi od 3 mjeseca *St3Gal2* miševi imaju jednaku težinu kao i divlji tip (WT). Međutim, nakon 13 mjeseci na standardnoj prehrani *St3Gal2* miševi postaju vidno pretili, točnije 22% teži i sa 37% većim udjelom masnoga tkiva od WT miševa. *St3Gal2* miševi počinju pokazivati znakove hiperglikemije i narušene tolerancije na glukozu u dobi od 9 mjeseci, te imaju smanjenu reakciju na inzulin usprkos morfologiji gušterače istovjetnoj onoj u WT miševa. Osim toga, smanjena im je inzulinom inducirana fosforilacija u adipoznom tkivu, ali ne i u jetrenim tkivima i skeletnim mišićima. Ujedno imaju i promijenjeni gangliozidni profil adipoznog tkiva. Metabolički gledano, *St3Gal2* miševi imaju niži omjer respiratorne izmjene što ukazuje na preferenciju za oksidaciju lipida pri odabiru izvora energije. *St3Gal2* miševi također pokazuju hiperaktivno ponašanje (Lopez i sur. 2016) te kod njih dolazi do pojave West sindroma i razvoja intelektualnih smetnji (Edvardson 2013).

1.4. Uloga interneurona u razvoju pretilosti

1.4.1. Interneuroni arkuatne jezgre hipotalamusa

Različite vrste neurona projiciraju puteve od arkuatne jezgre te posreduju s različitim područjima hipotalamusa i drugim udaljenim regijama mozga (Dudás 2013). Neuroni arkuatne jezgre imaju intrahipotalamusne projekcije prema neuroendrokrinim krugovima. Jedan takav primjer su projekcije koje utječu na ponašanje tokom ishrane koje dosežu do paraventrikularne (PVH) i dorzomedijalne (DMH) jezgre hipotalamusa te područja lateralnog hipotalamusa (LHA) (Bouret i sur. 2004). Populacije neurona iz lateralnoga dijela arkuatne jezgre pružaju svoje projekcije sve do hipofize te utječu na oslobađanje hormona (Dudás 2013; Bouret i sur. 2004).

Postoji nekoliko grupa neurona koji pružaju svoje projekcije iz hipotalamusa. Jedni od njih su neuroni koji pružaju svoje projekcije centralno te sadrže neuropeptid Y (NPY), aguoti-vezani protein (AGRP) i inhibitorni neurotransmiter gama-aminomaslačnu kiselinu (GABA). Navedeni neuroni nalaze se u ventromedijalnom dijelu arkuatne jezgre te snažno projiciraju prema LH i PVH i imaju vrlo važnu ulogu u kontroli apetita. Njihova aktivacija dovodi do snažnog poriva za hranjenjem. Inhibirani su leptinom, inzulinom i peptidom YY, a aktivirani djelovanjem grelina. Centralno projicirajući neuroni koji sadrže peptidne produkte pro-opimelanokortina (POMC) te kokainom i amfetaminom regulirane transkripte (CART) proiciraju prema brojnim područjima mozga, uključujući i sve jezgre hipotalamusa. Imaju važnu ulogu u kontroli apetita, te svojom aktivacijom inhibiraju poriv za hranjenjem. Aktiviraju ih cirkulacijske promjene leptina i inzulina, te su direktno povezani i inhibirani NPY neuronima. POMC neuroni koji projiciraju prema medialnoj preoptičkoj jezgri su također uključeni u regulaciju ponašanja vezanog uz razmnožavanje kod oba spola. Regulirani su gonadalnim steroidima. Otpuštanje beta-endorfina iz POMC regulirano je putem NPY (Arora i Anbhuti 2006). U PVH se također nalaze i centralno projicirajući neuroni koji luče somatostatin te reguliraju izlučivanje hormona rasta. Regulatorni neuroni za hranjenje također aktiviraju neurone PVN koji sadrže oksitocin, koji zauzvrat projiciraju aksone na jezgru Tractus solitarius u produženoj leđnoj moždini. U arkuatnoj jezgri također pronalazimo i neurone koji primaju izravne sinaptičke impulse iz područja izvan hipotalamusa koja projiciraju u amigdalu, hipokampus i entorhinalni dio kore mozga. Od ostalih tipova neurona koje nalazimo u arkuatnoj jezgri također je vrlo važno spomenuti astrocite koji imaju prijenosnike glukoze velikog kapaciteta te vrše ulogu senzora nutrijenata za kontrolu neurona regulatora apetita (Dudás 2013).

1.4.2. Interneuroni područja lateralnog hipotalamusa

U području lateralnog hipotalamusa vrlo su važni oreksinski neuroni koji pružaju velik broj projekcija te služe kao mediatori različith funkcija. Dvije najčešće navedene funkcije oreksinskih peptida u lateralnom hipotalamusu su promicanje ponašanja hranjenja i uzbuđenja (Li i sur. 2014, Messina i sur. 2014). Osim toga, oreksinergijske neuronske projekcije lateralnog hipotalamusa uključene se u termoregulaciju, regulirajući gastrointestinalnu pokretljivost i gastrointestinalnu funkciju putem dorzalne jezgre vagusnog živca, smanjujući bol i nocicepciju kroz nekoliko izlaznih struktura (npr. periakveduktalna siva tvar), modulirajući svojstva nagrade stečenih podražajima putem projekcija ventralnog tegmentalnog područja i drugih područja vezanih uz nagrade stečene podražajima, regulirajući energijsku homeostazu i neuroendokrine funkcije preko drugih projekcija hipotalamusa i regulirajući visceralne funkcija (npr. disanje, krvni tlak i mokrenje) preko skupine struktura u moždanom deblu (Okumura i sur. 2015; Li i sur. 2014a; Li i sur. 2014b). Smanjeni broj projekcija oreksinskih neurona iz lateralnog hipotalamusa povezan je s narkolepsijom (Malenka i sur. 2009).

1.5 CILJ RADA:

Cilj ovoga istraživanja bio je imunohistokemijskom analizom odrediti ekspresiju kalbindina-D28k i kalretinina, kao izabranih markera interneurona u hipotalamusu *St3Gal2, St3Gal3 i St3Gal2/3* preinačenih mišjih modela s ciljem utvrđivanja povezanosti između gangliozida, interneurona i fizioloških posljedica u vidu pretilosti i promjena u ishrani.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Materijal

2.1.1. Pokusne životinje

U istraživanju su korišteni uzorci moždanog tkiva tri genetski preinačena mišja modela s nedostatnom sintezom gangliozida (Ellies i sur. 2002a; Ellies i sur. 2002b; Priatel i sur. 2000). Osim genetski preinačenih miševa, u istraživanju su korišteni i kontrolni miševi divljega tipa (wild type, WT) bez genetskih preinaka.

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

2.2. Metode

2.2.1. Priprema rezova mozga za analizu

Za imunohistokemijsku analizu korišteni su koronarni rezovi mozga debljine 35 μm, rezani na kriostatu (Leica, CM3050S, Germany) pri -18˚C. Prije postupka rezovi su uklopljeni u medij za kriostatsko rezanje (Tissue-Tek OCT Compound, Sakura Finetek, Tokyo, Japan). Rezovi su prikupljani u otopinu 1xPBS-a u polistirenskim pločicama sa 24 jažice (Costar 24-well Plates, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) budući da je imunohistokemija izvedena na plutajućim rezovima (engl. *free-floating*). Prikupljeni rezovi čuvani su na +4˚ C u periodu od nekoliko dana. Rezovi koji su čuvani duži period prebačeni su u DeOlmos otopinu koja spriječava kontaminaciju i smrzavanje uzoraka te su pohranjeni na -20˚C.

2.2.2. Imunohistokemija

Imunohistokemijska analiza hipotalamusa provedena je na uzorcima mozga 12 životinja (3 iz svake grupe) u dobi od 6 do 12 tjedana. Na Slici 8 prikazan je izgled analiziranih arkuatnih jezgara hipotalamusa i područja lateralnog hipotalamusa u uzorcima mozga miševa. Regije mozga određene su prema Bergmann-u. Prikupljanje uzoraka, disekcija i krioprotekcija mozga provedna je prema protokolu opisanom u Blažetić (2015).

Imunohistokemijska analiza napravljena je metodom slobodno plutajućih rezova (engl. *free-floating*) na +4˚C (Heffer-Lauc 2007). Tokom analize korištena su visokospecifična primarna monoklonska protutijela IgG klase u svrhu detekcije interneurona. Popis i karakteristike primarnih protutijela prikazani su u Tablici 1.

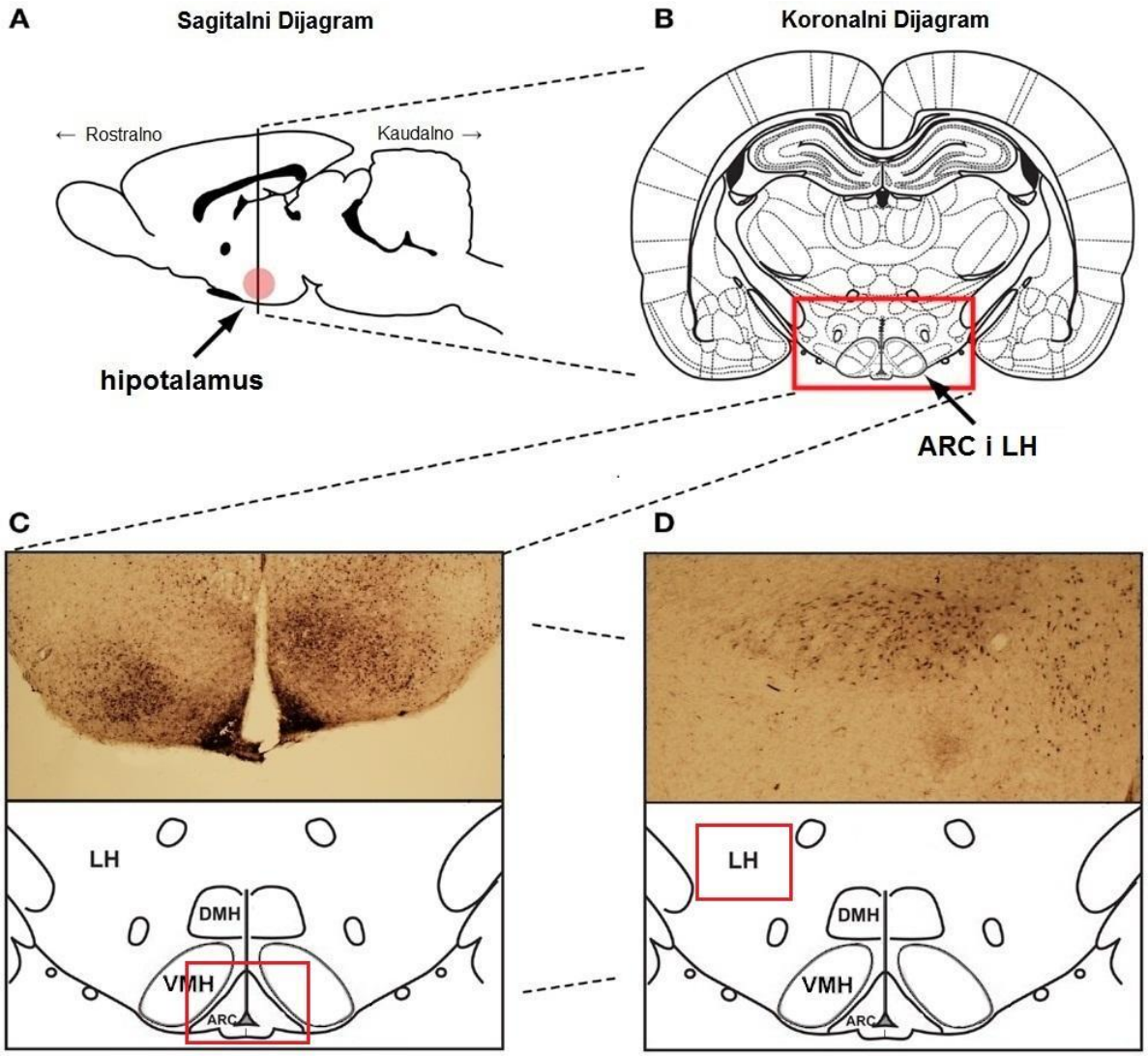
Tablica 1. Popis svih primarnih protutijela korištenih za imunohistokemijsku analizu

Naziv protutijela	**Organizam u kojem je napravljeno protutijelo**	**Klasa protutijela**	**Proizvođač**
Anti-Calbindin	Miš	IgG	Abcam
Anti-Calretinin	Miš	IgG	Abcam

Postupak imunohistokemijske analize proveden je u sljedećim koracima u trajanju od dva dana:

- Predtretman rezova izveden je u 0.2% otopini H_2O_2 u 1xPBS-u 30 min čime su blokirane aktivnosti endogenih peroksidaza u tkivu mozga.
- Rezovi su inkubirani u otopini za blokiranje (1% BSA, 5% kozji serum u 1×PBS-u) u trajanju od 2h na +4˚C uz stalno miješanje, čime su blokirana nespecifična vezna mjesta za proteine.
- Nakon blokiranja rezovi su inkubirani u visokospecifičnim primarnim monoklonskim protutijelima IgG klase preko noći na +4˚C uz stalno miješanje. Protutijela su pripremljena u otopini za blokiranje u prethodno određenim razrijeđenjima: Anti-CB (1:200) i Anti-CR (1:50).
- Sljedeći dan rezovi su ispirani 3 × 10 min u 1× PBS-u.

- Nakon ispiranja rezovi su inkubirani u sekundarnom protutijelu, u trajanju od 2h na +4˚ C uz stalno miješanje. Kao sekundarno protutijelo korišten je biotinilirani kozji anti-mišji IgG (Jackson Immunoresearch lab., West Grove, PA, USA), pripremljen u otopini za blokiranje u omjeru 1:500.
- Rezovi su ispirani 3 × 10 min u 1× PBS-u.
- Nakon ispiranja rezovi su inkubirani u trajanju od 2h na +4˚ C uz stalno mješanje u "ABC" reagensu iz seta kemikalija "Vectastain ABC Kit Elite" (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Navedeni tercijarni kompleks sastoji se od avidina i biotiniliranog HRP-a, koji je potrebno pripremiti 30 min prije korištenja. Avidin se tijekom inkubacije veže na biotinilirano sekundarno protutijelo.
- Nakon inkubacije rezovi su ispirani, 3 × 10 min u 1× PBS-u.
- Vizualizacija reaktivnih protutijela postignuta je inkubacijom rezova u setu kemikalija (Peroxidase Substrate System, Vector Lab, Burlingame, CA, USA) koji sadrži diaminobenzidin (DAB), substrat za peroksidazu. Peroksidaza stvara netopljivi sivo obojeni produkt, koji ukazuje na pozitivnu reakciju. Inkubacija traje 5 min.
- Obojeni rezovi su ispirani, 3 × 10 min u 1× PBS-u i jednom u destiliranoj vodi.
- Nakon ispiranja rezovi su navučeni na prethodno sijalizirana predmetna stakalca i osušeni nakon čega su skenirani u Super Coolscan 9000 skeneru (Nikon, Tokyo, Japan).
- Nakon skeniranja stakalca su pokrivena s Vectamount pokrivalom (Vector Lab, Burlingame, CA, USA) i analizirana na mikroskopu (Carl Zeiss, Axioskop 2 MOT, Jena, Germany) koji je spojen s aparatom za fotografiranje (Olympus DP70, Optical Olympus, Japan).
- Slike su analizirane i složene uz pomoć programa Image J i Photoshop CS6.



Slika 8: Sagitalni (A) i koronarni (B) presjek mišjeg mozga s označenim analiziranim regijama hipotalamusa arkuatnom jezgrom (ARC) (C) i lateralnim hipotalamusom (LH) (D). Slika preuzeta i preinačena iz Choi i sur. 2013.

2.2.3. Statistika

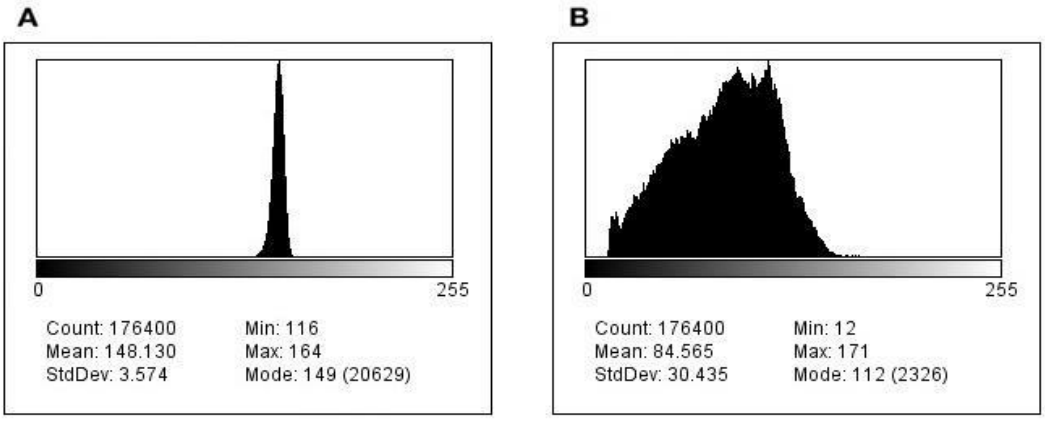
Zbog nepravilne distribucije podataka statistička analiza napravljena je korištenjem Mann-Whitney U testa. Razina značajnosti postavljena je na 0,05. Analiza je napravljena u programu Statistica 13.

3. REZULTATI

Imunohistokemijska analiza pokazala je različitu ekspresiju kalbindina D28k i kalretinina u mozgu genetski preinačenih mišjih modela *St3Gal2, St3Gal3* i *St3Gal2/3* u usporedbi s miševima divljega tipa (WT).

Vrijednosti obojenja nakon imunohistokemijske analize dobiveni su analizom histograma u programu ImageJ, koji izračunava i prikazuje distribucije sivih vrijednosti u odabranome području slike. Raspon intenziteta obojenja kreće se od 0-255, gdje 0 predstavlja najintenzivnije obojenje, a 255 znači da obojenja nema. Na x-osi su prikazane moguće sive vrijednosti, dok je na y-osi prikazan broj piksela pronađenih za svaku sivu vrijednost. Također se izračunava i prikazuje ukupni broj piksela te srednja, modalna, minimalna i maksimalna siva vrijednost (Slika 9).

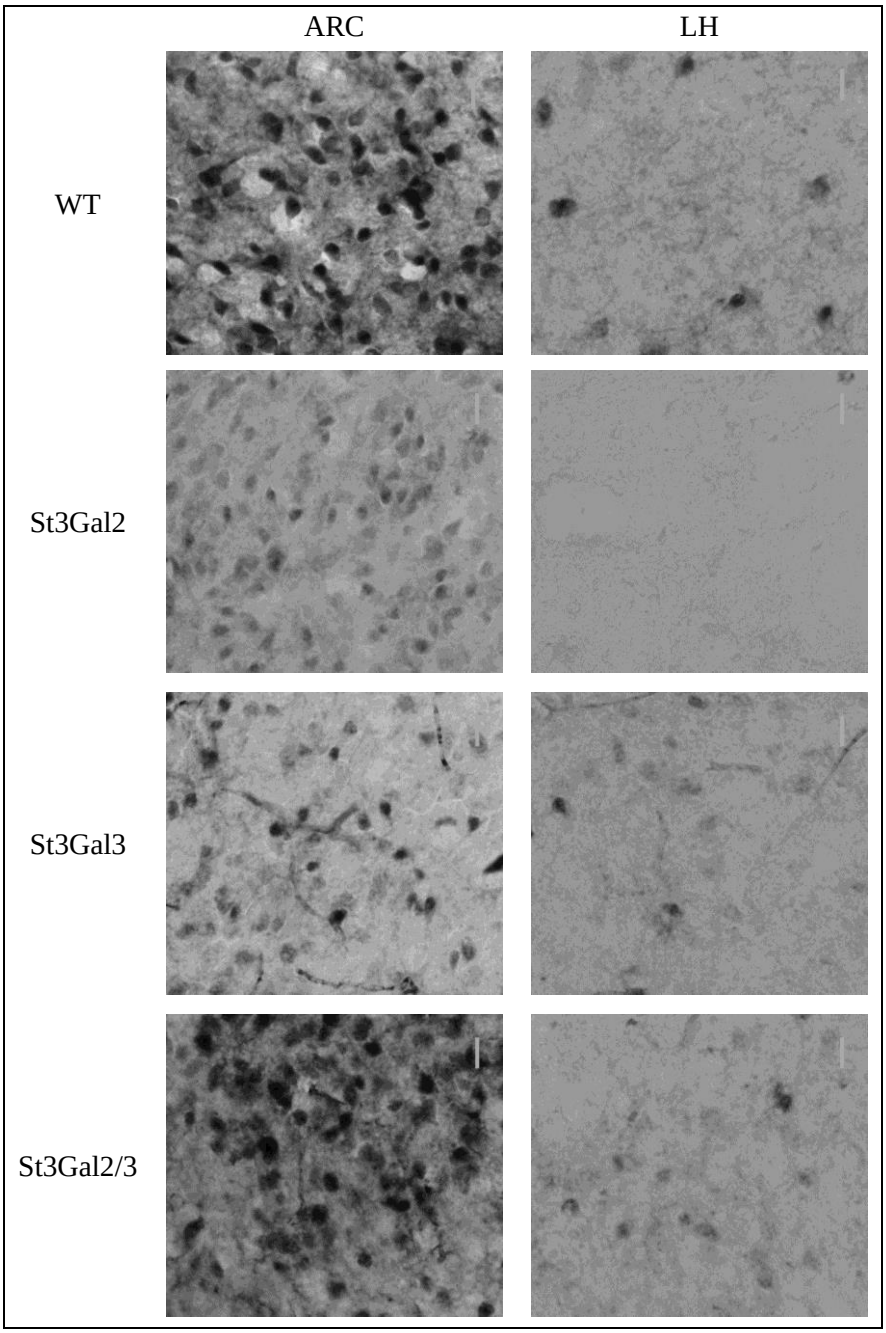
Važno je napomenuti da niže vrijednosti histograma ukazuju na veće obojenje i veće prisustvo odabranih funkcionalnih markera, budući da veći broj tamnih piksela na analiziranoj slici rezultira nižom srednjom vrijednosti histograma. Suprotno tome, veći broj svjetlih piksela rezultira višim srednjim vrijednostima analize histograma.



Slika 9: Slika prikazuje vrijednosti histograma dobivenih analizom uzorka iz kontrolne serije miševa (A) i uzorka iz arkuatne jezgre *St3Gal2/3* miša (B) koji je pokazivao povećanu ekspresiju kalbindina-D28k.

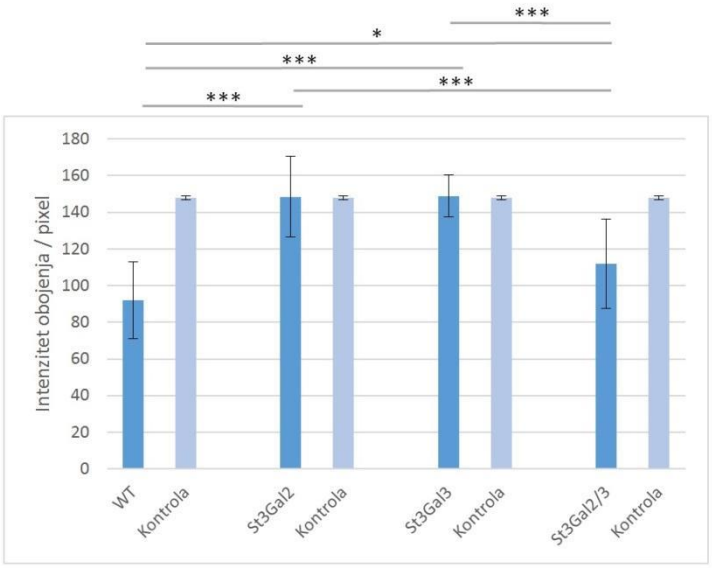
3.1. Analiza kalbindina u hipotalamusu mišjih modela

Ekspresija kalbindinskih interneurona u ARC i LH regijama mozga genetski preinačenih mišjih modela *St3Gal2, St3Gal3* i *St3Gal2/3* i WT miševa nakon imunohistokemijske analize prikazana je na slici 10.



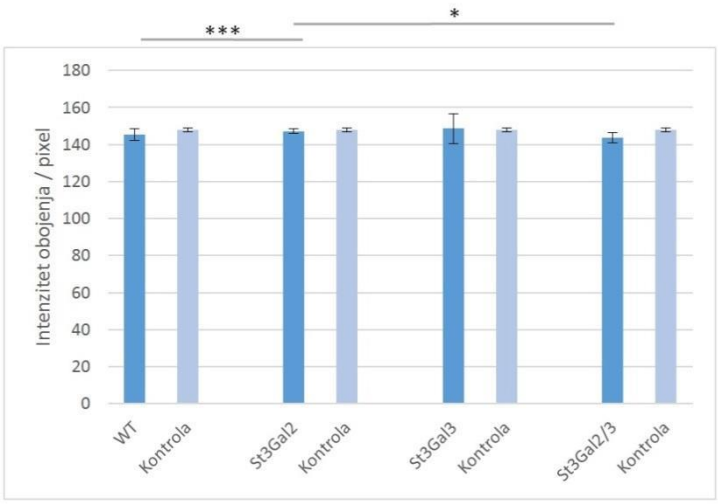
Slika 10: Imunohistokemijska analiza ekspresije kalbindina-D28k u arkuatnim jezgrama (ARC) i području lateralnog hipotalamusa (LH) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2, St3Gal3 i St3Gal2/3*) i divljega tipa (WT).

Dobiveni rezultati pokazuju da se svi genetski preinačeni mišji modeli statistički značajno razlikuju po ekspresiji kalbindinskih interneurona u arkuatnoj jezgri hipotalamusa od WT miševa (*St3Gal2* (p = 0,000003), *St3Gal3* (p = 0,000002), *St3Gal2/3* (p = 0,047858)). Značajna razlika također je utvrđena u usporedbi *St3Gal2/3* skupine sa *St3Gal2* (p = 0,000852) i *St3Gal3* (p = 0,000043) skupinama. Najveća ekspresija kalbindina-D28k u arkuatnim jezgrama primjećena je kod WT skupine, dok je *St3Gal2/3* skupina pokazivala srednju razinu ekspresije. Najniže razine ekspresije kalbindina-D28k u arkuatnim jezgrama imale su skupine *St3Gal2* i *St3Gal3* (Slika 11).



Slika 11: Grafički prikaz srednjih vrijednosti intenziteta obojenja kalbindina-D28k u arkuantnim jezgrama (ARC) kod divljega tipa (WT) i genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2, St3Gal3 i St3Gal2/3*) usporedno s kontrolom (rez tretiran bez primarnog protutijela). Statistički značajne razlike prikazane su *; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

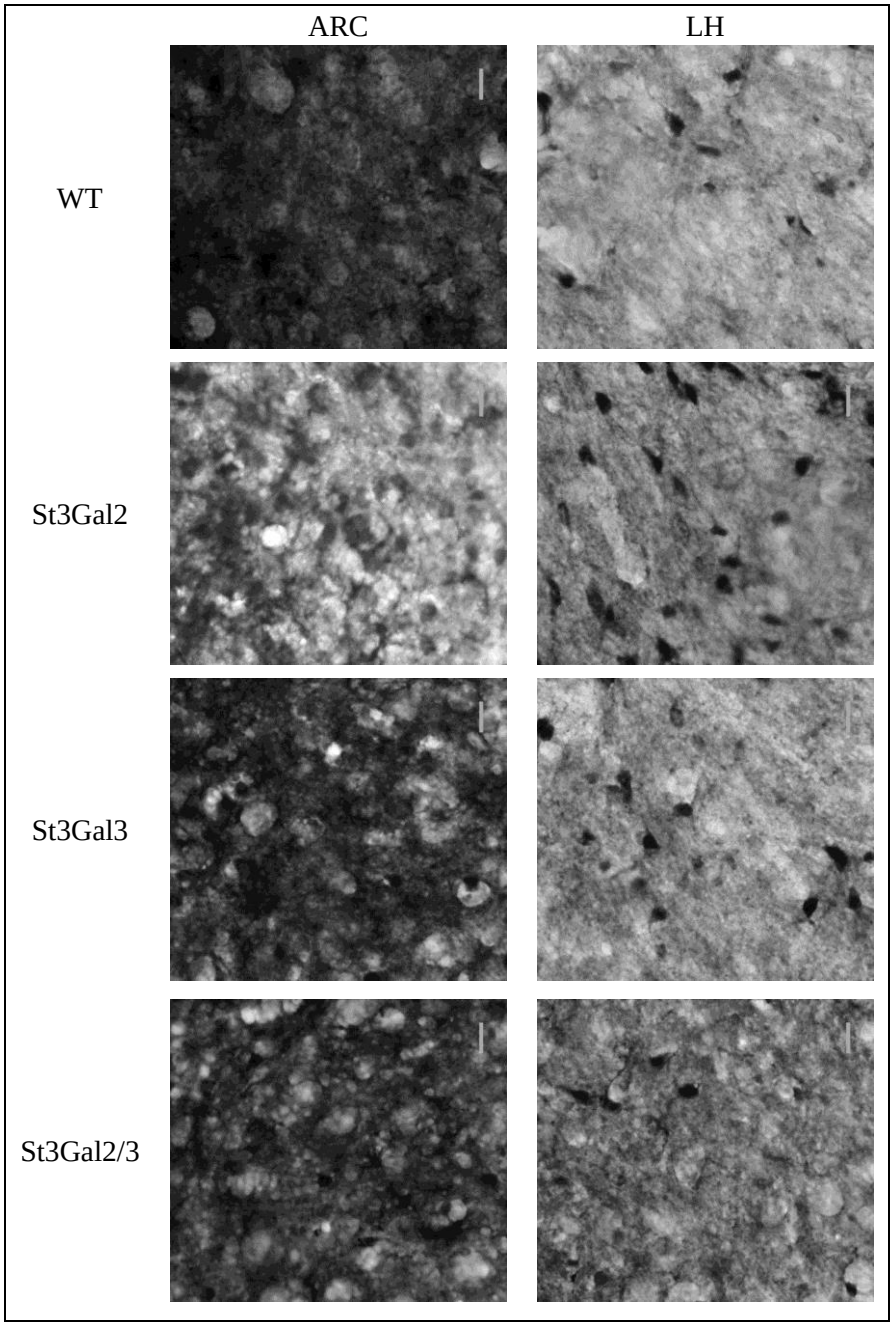
Rezultati dobiveni analizom ekspresije kalbindinskih interneurona u području lateralnog hipotalamusa pokazuju statistički značajnu razliku između WT miševa i *St3Gal2* skupine miševa (p = 0,000037), dok se ostala dva modela ne razlikuju od WT miševa. Statistički značajna razlika također je utvrđena između *St3Gal2/3* i *St3Gal2* (p = 0,33220) skupina. Razine ekspresija kalbindina-D28k u području laterlanog hipotalamusa pokazuju vrlo male razlike u vrijednostima (Slika 12).



Slika 12: Grafički prikaz srednjih vrijednosti intenziteta obojenja kalbindina-D28k u području lateralnog hipotalamusa (LH) kod divljega tipa (WT) i genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2, St3Gal3 i St3Gal2/3*) usporedno s kontrolom (rez tretiran bez primarnog protutijela). Statistički značajne razlike prikazane su *; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

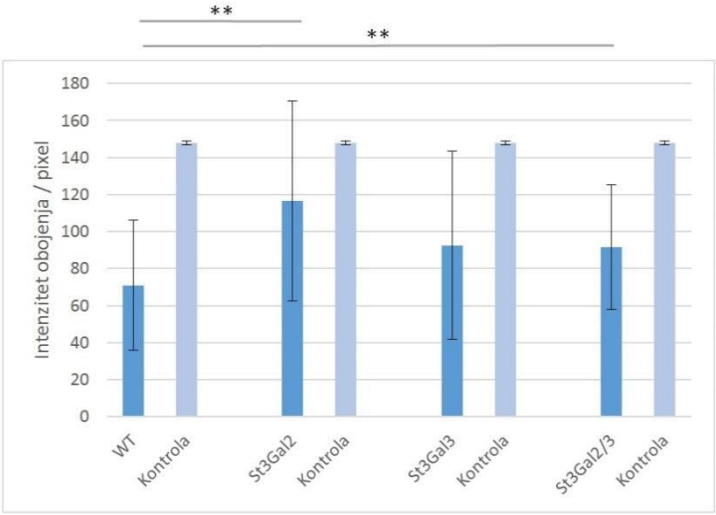
3.2. Analiza kalretinina u hipotalamusu mišjih modela

Ekspresija kalretininskih interneurona u ARC i LH regijama mozga genetski preinačenih mišjih modela *St3Gal2, St3Gal3* i *St3Gal2/3* i WT miševa nakon imunohistokemijske analize prikazana je na slici 13.



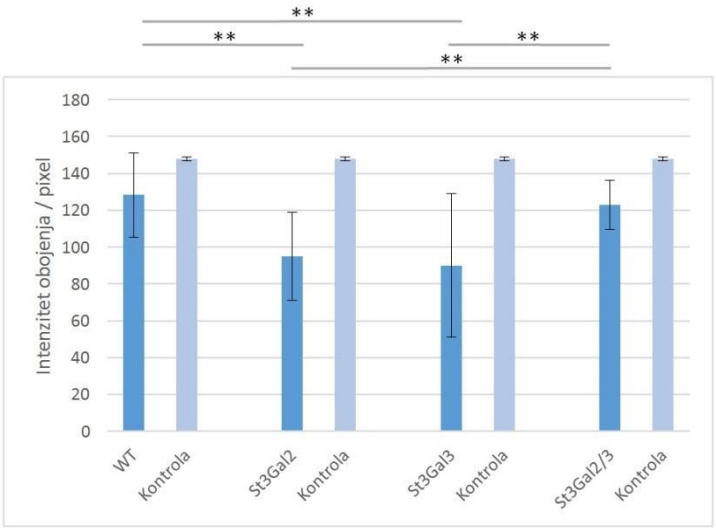
Slika 13: Imunohistokemijska analiza ekspresije kalretinina u arkuatnim jezgrama (ARC) i području lateralnog hipotalamusa (LH) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2, St3Gal3 i St3Gal2/3*) i divljega tipa (WT).

Rezultati dobiveni analizom ekspresije kalretininskih interneurona u arkuatnoj jezgri hipotalamusa između WT skupine i *St3Gal2* (p = 0,020457) i *St3Gal2/3* (p = 0,30227) skupina. Najveća ekspresija kalretinina u arkuatnim jezgrama primjećena je kod WT skupine, dok su *St3Gal3* i *St3Gal2/3* skupine pokazivale srednju razinu ekspresije. Najniža razina ekspresije kalretinina u arkuatnim jezgrama primjećena je kod skupine *St3Gal2* (Slika 14).



Slika 14: Grafički prikaz srednjih vrijednosti intenziteta obojenja kalretinina u području arkuatnih jezgara (ARC) kod divljega tipa (WT) i genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2, St3Gal3 i St3Gal2/3*) usporedno s kontrolom (rez tretiran bez primarnog protutijela). Statistički značajne razlike prikazane su *; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Rezultati dobiveni analizom ekspresije neurona povezanih s kalretininom u području lateralnog hipotalamusa pokazuju statistički značajnu razliku u usporedbi WT skupine sa *St3Gal2* (p = 0,001875) i *St3Gal3* (p = 0,003091) skupinama, te u usporedbi *St3Gal2/3* skupine miševa sa *St3Gal2* (p = 0,002129) i *St3Gal3* (p = 0,004434) skupinama. Najveća ekspresija kalretinina u području lateralnog hipotalamusa primjećena je kod WT skupine, dok je *St3Gal2/3* skupina pokazivala srednju razinu ekspresije. Najniže razine ekspresije kalretinina u području lateralnog hipotalamusa imale su skupine *St3Gal2* i *St3Gal3* (Slika 15).



Slika 15: Grafički prikaz srednjih vrijednosti intenziteta obojenja kalretinina u području lateralnog hipotalamusa (LH) kod divljega tipa (WT) i genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2, St3Gal3 i St3Gal2/3*) usporedno s kontrolom (rez tretiran bez primarnog protutijela). Statistički značajne razlike prikazane su *; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

4. RASPRAVA

Ovim istraživanjem dokazana je povezanost između sinteze kompleksnih gangliozida i distribucije interneurona koji eksprimiraju izabrane funkcionalne markere kalbindin-D28k i kalretinin te koji su mogući uzrok promjena u fenotipu i ponašanju tokom ishrane promatranih mišjih modela.

Gangliozidi su prisutni u različitim tipovima neurona kao što su eferentni i aferentni projekcijski, asocijacijski, komisuralni neuroni te interneuroni (Vajn i sur. 2013). Dokazano je da različite podvrste inhibicijskih interneurona možemo razlikovati na temelju prisustva parvalbumina, kalbindina i kalretinina, tri važna proteina s ulogom unutarstaničnih pufera Ca^{2+} (DeFelipe i sur. 2013).

Analiza dobivenih rezultata promjena u ekspresiji interneurona povezanih s kalbindinom-D28k u arkuatnoj jezgri hipotalamusa potvrđuje postavljenu hipotezu rada. Prema očekivanome, uočene su velike razlike u intenzitetu obojenja izmedu WT skupine i promatranih genetski preinačenih skupina. Skupina WT imala je najveću ekspresiju kalbindinskih interneurona, dok su skupine *St3Gal2* i *St3Gal3,* skupine sa isključenim pojedinačnim genom imale najmanju ekspresiju. Prema tome možemo zaključiti da smanjena ekspresija kalbindinskih interneurona u arkuatnoj jezgri hipotalamusa ima ulogu u promjeni ishrane i pojavi negativnih fizioloških posljedica kod genetski preinačenih mišjih modela. Uzevši u obzir da protutijela na kalbindin generalno označavaju stanice s tankim, nemijeliniziranim aksonima koje imaju difuznu projekciju (Celio 1990) moguće je pretpostaviti da kod genetski preinačenih mišjih modela dolazi do pojave promjena u signalizaciji na lokalnoj razini između neurona unutar hipotalamusa. Ukoliko se razmatraju dodatne promjene u signalizaciji mozga koje bi mogle imati poveznice s promjenama u načinu ishrane također treba uzeti u obzir i potencijalni utjecaj promjena uzrokovanih nedostatkom sintetiziranih gangliozida na regulaciju razina aguoti-vezanog proteina (AGRP) kao jedan od mogućih mehanizama. Povezanost aguoti-vezanog proteina s pretilošću i povećanjem poriva za hranjenjem kod transgenskih mišjih modela otprije je poznata (Graham i sur. 1997). Zanimljivo je napomenuti da smo najnižu razinu statistički značajne razlike primjetili između WT i *St3Gal2/3* skupine, usprkos tome što *St3Gal2/3* skupina ima modificirana (utišana) oba gena i ima najveći nedostatak gangliozida od svih ostalih promatranih skupina, te visoki stupanj demijelinizacije. Međutim, moguće je da kod

ove grupe u dolazi do pojave kompenzacije nedostatka GD1a gangliozida usljed povećanja GM1 i GD1b (Yoo i sur. 2015).

Između *St3Gal2* i *St3Gal3* skupina nije primjećena statistički značajna razlika u ekspresiji kalbindinskih interneurona u arkuatnoj jezgri hipotalamusa što dovodi do zaključka da promjene u ishrani i tjelesnoj građi vrlo vjerojatno nisu direktno povezane s uočenim promjenama.

Rezultati dobiveni analizom ekspresije kalbindinskih interneurona u području lateralnog hipotalamusa pokazuju značajnu razliku u usporedbi WT i *St3Gal2/3* skupina miševa sa *St3Gal2* skupinom. Jedan od mogućih uzroka pretilosti *St3Gal2* skupine može biti promjena uzrokovana nepravilnom modulacijom signala koji se naknadno projiciraju s područja lateralnog hipotalamusa prema ventralnom tegmentalnom području koje sadrži centre za nagrade stečene podražajima (Okumura i sur. 2015).

Dobiveni rezultati pokazuju statistički značajnu razliku u ekspresiji kalretininskih interneurona u arkuatnoj jezgri hipotalamusa pri usporedbi WT skupine sa *St3Gal2* i *St3Gal2/3* skupinama. Razlike u rastu i fenotipu *St3Gal2* i *St3Gal2/3* skupina mogle bi biti povezane s narušenom modulacijom centralnih projekcija neurosekretornih neurona koji luče somatostatin, inhibitor hormona rasta u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa. (Lanneau i sur. 2000). Još jedna zanimljiva poveznica koja bi mogla biti povezana sa slabijim roditeljskim ponašanjem izraženim kod *St3Gal3* i *St3Gal2/3* skupina (Sturgill 2012) je moguća narušena sinteza oksitocina koja bi osim navedene promjene u ponašanju mogla utjecati na smanjenje ishrane kao posljedicu regulacije neuronima koji sadrže oksitocin u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa (Dudás 2013). Kod istraživanih *St3Gal2, St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa su otprije dokazane promjene u udjelu GABA–ergičnih neurona u različitim regijama mozga (Blažetić 2015). Narušena regulacija GABA-e i sukladno tome narušena regulacija oksitocina tijekom porođaja rezultira dokazanim deficitima u roditeljskom ponašanju (Lonstein i sur. 2014). Međutim, slabije roditeljsko ponašanje također može biti i posljedica otprije poznatih neuroloških deficita (Yoo i sur. 2015; Edvardson 2013).

Rezultati dobiveni analizom ekspresije kalretininskih interneurona u području lateralnog hipotalamusa ponovno izdvajaju WT i *St3Gal2/3* skupine. Budući da se nedostatak kalretinina često povezuje s povećanom ekscitacijom (Gall i sur. 2003) moguće je da su promjene uočene kod *St3Gal2* i *St3Gal3* skupina uzrokovane nedovoljnom inhibicijom

putem GABA-e. Međutim, zanimljivo je napomenuti da između WT i *St3Gal2/3* skupina još jednom nije pronađena statistički značajna razlika usprkos brojnim deficitima genetski preinačene skupine, što bi mogao biti dodatni primjer kompenzacije nedostatka gangliozida kod *St3Gal2/3* skupine (Yoo i sur. 2015).

5. ZAKLJUČAK

1. Na temelju dobivenih podataka vidljiva je povezanost nedostatka glavnih glikozida mozga s promjenama u ekspresiji kalbindinskih i kalretininskih interneurona u području hipotalamusa pri usporedbi divljeg tipa miša (WT) s genetski preinačenim mišjim modelima (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*).
2. Dvostruko preinačeni mišji model *St3Gal2/3* usprkos većem deficitu sintetiziranih gangliozida pokazuje veću sličnost s WT skupinom nego *St3Gal2* i *St3Gal3* skupine.
3. Uzimajući u obzir fiziološku funkciju arkuatnih jezgara (ARC) i područja lateralnog hipotalamusa (LH), lokalizirane promjene u ekpresiji interneurona promatranih skupina potencijalno imaju važan utjecaj na razvoj pretilosti i promjena u ishrani.

6. LITERATURA

Airaksinen, M. S., Eilers, J., Garaschuk, O., Thoenen, H., Konnerth, A., & Meyer, M. (1997) Ataxia and altered dendritic calcium signaling in mice carrying a targeted null mutation of the calbindin D28k gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:1488–1493.

Amenta, F., Cavalotta, D., Del Valle, M. E., Mancini, M., Sabbatini, M., Torres, J. M., Vega, J. A. (1994) Calbindin-D28k immunoreactivity in the rat cerebellar cortex: Age-related changes. *Neuroscience Letters* 178:131–134.

Andressen, C., Blümcke, I., Celio, M.R. (1993) Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell and Tissue Research* 271:181–208.

Arora, S., Anubhuti. (2006) Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity - a review. *Neuropeptides* 40:375-401.

Baimbridge, K.G., Celio, M.R., Rogers, J.H. (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends in Neurosciences* 15:303–308.

Barski, J. J., Hartmann, J., Rose, C. R., Hoebeek, F., Mörl, K., Noll-Hussong, M., i sur. (2003) Calbindin in cerebellar Purkinje cells is a critical determinant of the precision of motor coordination. *Journal of Neuroscience* 23:3469–3477.

Berggård, T., Miron, S., Önnerfjord, P., Thulin, E., Akerfeldt, K. S., Enghild, J. J., Akke, M., & Linse, S. (2002). Calbindin D28k exhibits properties characteristic of a Ca2+ sensor. *Journal of Biological Chemistry* 277:16662–16672

Billing-Marczak, K., Zieminska, E., Lesniak, W., Lazarewicz, J.W., Kuznicki, J. (2004) Calretinin gene promoter activity is differently regulated in neurons and cancer cells. Role of AP2-like cis element and zinc ions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1678:14–21.

Blažetić, S. (2015) Distribution of basic chemical phenotypes of interneurons in the brain of sialyltransferase knockout mice (St3Gal2, St3Gal3 and St3Gal2/St3Gal3). PhD thesis. Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. Osijek.

Booth, A.D. (1968) Mechanism Of Action of Norepinephrine in eliciting an Eating Response on Injection into the Rat Hypothalamus. *Journal of Pharmacology and Experimental* Therapeutics 160:336-348.

Bouret, S.G., Draper, S.J., Simerly, R.B. (2004) Formation of Projection Pathways from the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus to Hypothalamic Regions Implicated in the Neural Control of Feeding Behavior in Mice. *The Journal of Neuroscience.* 24:2797–2805.

Celio, M. R. (1990) Calbindin-D28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35:375–475.

Choi, YH., Fujikawa, T., Lee, J., Reuter, A., Kim K.W. (2013) Revisiting the ventral medial nucleus of the hypothalamus: the roles of SF-1 neurons in energy homeostasis. *Frontiers in Neuroscience* 7:1-9.

Christakos, S., Gabrielides, C., & Rhoten, W. B. (1989) Vitamin D-dependent calcium binding proteins: chemistry, distribution, functional considerations, and molecular biology. *Endocrine Reviews* 10:3–26.

DeFelipe, J., López-Cruz, P.L., Benavides-Piccione, R., Bielza, C., Larrañaga, P., Anderson, S., Burkhalter, A., Cauli, B., Fairén, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fitzpatrick, D., Freund, T.F., González-Burgos, G., Hestrin, S., Hill, S., Hof, P.R., Huang, J., Jones, E.G., Kawaguchi, Y., Kisvárday, Z., Kubota, Y., Lewis, D.A., Marín, O., Markram, H., McBain, C.J., Meyer, H.S., Monyer, H., Nelson, S.B., Rockland, K., Rossier, J., Rubenstein, J.L., Rudy, B., Scanziani, M., Shepherd, G.M., Sherwood, C.C., Staiger, J.F., Tamás, G., Thomson, A., Wang, Y., Yuste, R., Ascoli, G.A. (2013) New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nature Reviews Neuroscience* 14:202–216.

Dudás (ur.) (2013). The Human Hypothalamus: Anatomy, Functions and Disorders. New York: Nova Science Publishers.

Edvardson, S., Baumann, AM., Mühlenhoff, M., Stephan, O., Kuss, A.W., Shaag, A., He, L., Zenvirt, S., Tanzi, R., Gerardy- Schahn, R., Elpeleg, O. (2013) West syndrome caused by ST3Gal-III deficiency. *Epilepsia* 54:24–27

Elias, C.F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R.S., Bjorbaek,C., Flier, J.S., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (1999) Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23:775–786.

Ellies, L. G., Ditto, D., Levy, G.G., Wahrenbrock, M., Ginsburg, D., Varki, A., Le, D.T., Marth, J.D. (2002a) Sialyltransferase ST3Gal-IV operates as a dominant modifier of hemostasis by concealing asialoglycoprotein receptor ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:10042–10047.

Ellies, L. G., Sperandio, M., Underhill, G.H., Yousif, J., Smith, M., Priatel, J.J., Kansas, G.S., Ley, K., Marth J.D. (2002b) Sialyltransferase specificity in selectin ligand formation. *Blood* 100:3618–3625.

Fierro, L., Llano, I. (1996) High endogenous calcium buffering in purkinje cells from rat cerebellar slices. *The Journal of Physiology* 496:617–625.

Gall, D., Roussel, C., Susa, I., D'Angelo, E, Rossi, P., Bearzatto, B., Galas, M.C., Blum, D.,Schurmans, S., Schiffmann, S.N. (2003) Altered Neuronal Excitability in Cerebellar Granule Cells of Mice Lacking Calretinin. *Journal of Neuroscience* 23:9320–9327.

Graham, M., Shutter, J.R., Sarmiento, U., Sarosi, I., Stark, K.L. (1997) Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice. *Nature Genetics.* 17:273–4.

Hack, N.J., Wride, M.C., Charters, K.M., Kater, S.B., Parks, T.N. (2000) Developmental changes in the subcellular localization of calretinin. *Journal of Neuroscience* 20:RC67

Heffer-Lauc, M., Viljetić, B., Vajn, K., Schnaar, R.L., Lauc, G. (2007) Effects of Detergents on the Redistribution of Gangliosides and GPI-anchored Proteins in Brain Tissue Sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 55:805–812.

Heizmann, C.W. (1992) Calcium-binding proteins: basic concepts and clinical implications. *General Physiology and Biophysics* 11:411–425.

Heizmann, C.W, Hunziker, W. (1991) Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. *Trends in Neurosciences* 16:98–103.

Iacopino, A.M., Rhoten, W.B., Christakos, S. (1990) Calcium binding protein (calbindin-D28k) gene expression in the developing and aging mouse cerebellum. *Molecular Brain Research* 8:283–290.

Iritani, S., Niizato, K., & Emson, P. C. (2001) Relationship of calbindin D28K-immunoreactive cells and neuropathological changes in the hippocampal formation of Alzheimer's disease. *Neuropathology: official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 21:162–167.

Jacobowitz, D.M., Winsky, L.(1991) Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 304:198–218.

Kawaguchi, Y., Katsumaru, H., Kosaka, T., Heizmann, C.W., Hama, K. (1987) Fast spiking cells in rat hippocampus (CA1 region) contain the calcium-binding protein parvalbumin. *Brain Research* 416:369–374.

Kishimoto, J., Tsuchiya, T., Cox, H., Emson, C., Nakayama Y. (1997) Age-related Changes of Calbindin-D28k, Calretinin, and Parvalbumin mRNAs in the Hamster Brain. *Neurobiology of Aging* 19:77– 82.

Kojetin, D. J., Venters, R. A., Kordys, D. R., Thompson, R. J., Kumar, R., & Cavanagh, J. (2006) Structure, binding interface and hydrophobic transitions of Ca2+-loaded calbindin-D28K. *Nature Structural and Molecular Biology* 13:641–647.

Kolter, T. (2012) Ganglioside Biochemistry. *International Scholarly Research Network* 2012, e506160.

Kono, M., Yoshida, Y., Kojima, N., Tsuji, S. (1996) Molecular Cloning and Expression of a Fifth Type of α2,8-Sialyltransferase (ST8Sia V). *The Journal of Biological Chemistry* 271:29366–29371.

Korotkov, S.M., Sokolova, T.V., Avrova, N.F. (2015) Gangliosides GM1 and GD1a Normalize Respiratory Rates of Rat Brain Mitochondria Reduced by tert-Butyl Hydroperoxide. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 53:200–207.

Lanneau, C., & Peineau, S., Petit, F., Epelbaum, J., Gardette, R. (2000) Somatostatin Modulation of Excitatory Synaptic Transmission Between Periventricular and Arcuate Hypothalamic Nuclei In Vitro. *Journal of neurophysiology* 84:1464-74.

Ledeen, R.W., Yu, R.K. (1982) Gangliosides: structure, isolation and analysis. *Methods in Enzymology* 83: 139–191.

Li, J., Hu, Z., De Lecea, L. (2014a) The hypocretins/orexins: integrators of multiple physiological functions. *British Journal of Pharmacology* 171:332–50.

Li, A., Nattie, E. (2014b) Orexin, cardio-respiratory function, and hypertension. *Frontiers in Neuroscience* 8:22.

Lingwood, C.A. (2011) Glycosphingolipid Functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(7):a004788.

Lonstein, J.S., Maguire, J., Meinlschmidt, G., Neumann, I.D. (2014) Emotion and Mood Adaptations in the Peripartum Female: Complementary Contributions of GABA and Oxytocin. *Journal of Neuroendocrinology* 26:649–664.

Lopez, P.H.H., Aja, S., Aoki, K., Seldin, M.M., Lei, X., Ronnett, G.V., Wong, G.W., Schnaar, R.L. (2016) Mice lacking sialyltransferase ST3Gal-II develop late-onset obesity and insulin resistance. *Glycobiology* 27:129–139.

Malenka, R.C., Nestler, E.J., Hyman, S.E. (2009). Chapter 12: Sleep and Arousal. U: Sydor, A., Brown, R.Y. (ur.) Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience (2nd ed.). New York: McGraw-Hill Medical. pp. 294–296, 303.

McMahon, A., Wong, B.S., Iacopino, A.M., Ng, M.C., Chi, S., German, D.C. (1998) Calbindin-D28k buffers intracellular calcium and promotes resistance to degeneration in PC12 cells. *Molecular Brain Research* 54:56–63.

Messina, G., Dalia, C., Tafuri, D., Monda, V., Palmieri, F., Dato, A., Russo, A., De Blasio, S., Messina, A., De Luca, V., Chieffi, S., Monda, M. (2014) Orexin-A controls sympathetic activity and eating behavior. *Frontiers in Psychology* 5: 997.

Mlinac-Jerković, K., Kalanj-Bognar, S. (2010) Role of gangliosides in brain aging and neurodegeneration. *Translational Neuroscience* 1:300-307.

Mocchetti, I. (2005) Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62:2283–2294.

Molinari, S., Battini, R., Ferrari, S., Pozzi, L., Killcross, A. S., Robbins, T. W., et al. (1996) Deficits in memory and hippocampal long-term potentiation in mice with reduced calbindin D28K expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:8028–8033.

Münkle, M.C., Waldvogel, H.J., Faull, R.L.M. (2000) The distribution of calbindin, calretinin and parvalbumin immunoreactivity in the human thalamus. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 19:155–173.

Okumura, T., Nozu, T., Kumei, S., Takakusaki, K., Miyagishi, S., Ohhira, M. (2015) Antinociceptive action against colonic distension by brain orexin in conscious rats. *Brain Research* 1598:12–17.

O'Rahilly, S., Farooqi, I.S., Yeo, G.S.H., and Challis, B.G. (2003) Minireview: human obesity-lessons from monogenic disorders. *Endocrinology* 144:3757–3764.

Persechini, A., Moncrief, N.D., Kretsinger, R.H. (1989) The EF-hand family of calcium-modulated proteins. *Trends in Neurosciences* 12:462–467.

Priatel, J.J., Chui, D., Hiraoka N, Simmons, C.J., Richardson, K.B., Page, D.M., Fukuda, M., Varki, N.M., Marth, J.D. (2000) The ST3Gal-I Sialyltransferase Controls CD8+ T Lymphocyte Homeostasis by Modulating O-Glycan Biosynthesis. *Immunity* 12:273–283.

Rao, F.V., Rich, J.R., Rakić, B., Buddai, S., Schwartz, M.F., Johnson, S., Bowe, C., Wakarchuk, W.W., DeFrees, S., Withers, S.G., Strynadka, N.C.J. (2009) Structural insight into mammalian sialyltransferases. *Nature Structural & Molecular Biology* 16:1186-1188.

Rogers, J. H. (1987) Calretinin. A gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *The Journal of Cell Biology* 105:1343–1353.

Sandhoff, K., Harzer, K. (2013) Gangliosides and Gangliosidoses: Principles of Molecular and Metabolic Pathogenesis. *Journal of Neuroscience* 33:10195–10208.

Schnaar, R.L., Fromholt, S.E., Yanping, G., Vyas, A.A., Wouter, L., Wayman, D.M., Heffer-Lauc, M., Hiromi, I., Ishida, Hideharu, Kiso, Makoto, Griffin, John, W., Shiekh, Kazim, A. (2002) Immunoglobulin G-class mouse monoclonal antibodies to major brain gangliosides. *Analytical Biochemistry* 302, 276–284.

Schnaar, R.L., Gerardy-Schahn, R., Hildebrandt, H. (2014) Sialic Acids in the Brain: Gangliosides and Polysialic Acid in Nervous System Development, Stability, Disease, and Regeneration. *Physiological Reviews* 94: 461–518.

Schurmans, S., Schiffmann, S.N., Gurden, H., Lemaire, M., Lipp, H.P., Schwam, V., Pochet, R., Imperato, A., Böhme, G.A., Parmentier, M. (1997) Impaired long-term potentiation induction in dentate gyrus of calretinin- deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:10415–20.

Schwaller, B. (2009) The continuing disappearance of "pure" Ca^{2+} buffers. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66:275–300.

Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J., and Baskin, D.G. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661–671.

Stevens, J., Rogers, J. H. (1997) Chick Calretinin: Purification, Composition, and Metal Binding Activity of Native and Recombinant Forms. *Protein Expression and Purification* 9, 171–181.

Sturgill, E.R., Aoki, K., Lopez, P.H.H., Colacurcio, D., Vajn, K., Lorenzini, I., Majić, S., Yang, W.H., Heffer, M., Tiemeyer, M., Marth, J.D., Schnaar, R.L. (2012) Biosynthesis of the major brain gangliosides GD1a and GT1b. Glycobiology 22, 1289–1301.

Svennerholm, L. (1994) Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids. *Progress in Brain Research* 101:11–14

Takashima, S. (2008) Characterization of Mouse Sialyltransferase Genes: Their Evolution and Diversity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72:1155-1167.

Takashima, S., Tsuji, S., Tsujimoto, M. (2008) Comparison of the Enzymatic Properties of Mouse β-Galactoside α2,6-Sialyltransferases, ST6Gal I and II. *The Journal of Biological Chemistry* 134:287-296.

Tettamanti, G., Bonali, F., Marchesini, S., Zambotti, V. (1973) A new procedure for the extraction, purification and fractionation of brain gangliosides. *Biochimica et Biophysica Acta* 296:160–170.

Tettamanti, G., Riboni, L. (1994) Ganglioside turnover and neural cell function: a new perspective. *Progress in Brain Research* 101:77–100.

Vajn, K., Viljetić, B., Degmečić, I. V., Schnaar, R. L., Heffer, M. (2013) Differential Distribution of Major Brain Gangliosides in the Adult Mouse Central Nervous System. *PLOS One* 8, e75720.

Van der Pol, A.N. (2003) Weighing the Role of Hypothalamic Feeding Neurotransmitters. *Neuron* 40:1059–1061

Zeller, C.B., Marchase, R.B. (1992) Gangliosides as modulators of cell function. American Journal of Physiology 262:1341–1355.

Yoo, S-W., Motari, M.G., Keiichiro Susuki, K., Prendergast, J., Mountney, A., Hurtado, A., Schnaar, R.L. (2015) Sialylation regulates brain structure and function. *The FASEB Journal 29*:3040-3053.

Web izvori:

Web 1. Cloud-Clone Corp.: Calretinin (CR)
http://www.cloud-clone.com/items/A687.html (3.10.2018.)

7. POPIS KRATICA

AGRP – aguoti-vezani protein (engl. *aguoti-related protein*)
ARC – arkuatna jezgra
BSA – goveđi serum albumina (engl. *albumin bovine serum*)
CART – kokainom i amfetaminom regulirani transkript (engl. *cocaine and amphetamine regulated transcript*)
CAZy – (eng. *carbohydrate active enzyme*)
CB – kalbindin (engl. *calbindin*)
CBD24K – kalbindin-D28k
Cer – ceramid
CMP – citidin monofosfat (engl. *cytidine monophosphate*)
CR – kalretinin (engl. *calretinin*)
DMH – dorzomedijalna jezgra hipotalamusa
GABA – gama-aminomaslačna kiselina (engl. *gamma-aminobutyric acid*)
Gal – galaktoza
GalNAC – N-acetilgalaktozamin
Glc – glukoza
IgG – imunoglobulin G
LH – lateralni hipotalamus
LHA – područje lateralnog hipotalamusa (engl. *lateral hypothalamic area*)
LTP – dugoročna potencijacija (engl. *long-term potentiation*)
NeuAC – N-acetilmuraminska kiselina
NPY – neuropeptid Y
POMC – propiomelanokortin
PVH – paraventrikularna jezgra hipotalamusa
SA – sijalinska kiselina (engl. *sialic acid*)
***St3Gal2* –** genetički modificiran miš sa isključenim genom za sintezu ST β-galaktozid α2,3-sijalotransferaze 2
***St3Gal3* –** genetički modificiran miš sa isključenim genom za sintezu ST β-galaktozid α2,3-sijalotransferaze 3
***St3Gal2/3* –** genetički modificiran miš sa isključenim genom za sintezu ST β-galaktozid α2,3-sijalotransferaze 2 i 3
VMH – ventromedialni hipotalamus
WT – divlji tip (engl. *wild type*)