Ekspresija interneurona u striatumu genetički izmijenjenog miša B4Galnt1

Ilijašević, Mihaela

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:643120

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

Mihaela Ilijašević

EKSPRESIJA INTERNEURONA U STRIATUMU GENETIČKI IZMIJENJENOG MIŠA *B4Galnt1*

ZAVRŠNI RAD

OSIJEK, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

Mihaela Ilijašević

EKSPRESIJA INTERNEURONA U STRIATUMU GENETIČKI IZMIJENJENOG MIŠA *B4Galnt1*

ZAVRŠNI RAD

OSIJEK, 2017.

- Ovaj rad ostvaren je u Neurobiološkom laboratoriju Medicinskog fakulteta Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.
- Mentor rada: doc. dr. sc. Barbara Viljetić
- Rad ima 27 listova, 1 tablicu i 12 slika.

Veliko hvala upućujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Barbari Viljetić, na velikoj pomoći, strpljenju i prenesenome znanju prilikom izrade ovoga rada.

Zahvalu upućujem mojoj obitelji i Marku za podršku i pomoć.

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. INTERNEURONI 1
1.1.1. PARVALBUMIN 1
1.1.2. KALBINDIN 2
1.1.3. KALRETININ 3
1.2. GANGLIOZIDI 4
1.2.1. BIOSINTEZA GANGLIOZIDA 4
1.2.2. RAZGRADNJA GANGLIOZIDA 5
1.3. GENETIČKI IZMIJENJENI MIŠJI MODELI 6
1.4. STRIATUM 6
2. HIPOTEZA 8
3. CILJEVI 9
4. MATERIJAL I METODE 10
4.1. MATERIJAL 10
4.2. KEMIKALIJE 10
4.3. METODE 11
4.3.1. GENOTIPIZACIJA MIŠEVA 11
4.3.2. PERFUZIJA I ŽRTVOVANJE ŽIVOTINJA 12
4.3.3. REZANJE MOŽDANOGA TKIVA NA KRIOSTATU 12
4.3.4. IMUNOHISTOKEMIJA 12
4.3.5. ANALIZA EKSPRESIJE PARVALBUMINSKIH, KALBINDINSKIH, KALRETININSKIH PROTUTIJELA 13
5. REZULTATI 14
6. RASPRAVA 19
7. ZAKLJUČCI 21
8. SAŽETAK 22
9. SUMMARY 23
10. LITERATURA 23
11. ŽIVOTOPIS 27

POPIS KRATICA

ACh – acetilkolin

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

CB – kalbindin (engl. *calbindin*)

Chl – kolinergički interneuron

CR – kalretinin (engl. *calretinin*)

DAB – diaminobenzidin

GABA – gama aminomaslačna kiselina (engl. *gamma – aminobutyric acid*)

GPI – glikozilfosfatidilinozitol (engl. *glycosylphoshatidylinositol*)

HRP – peroksidaza iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*)

KO – miševi s isključenim genom (engl. *knock – out*)

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

PFA – paraformaldehid

PV – parvalbumin

SŽS – središnji živčani sustav

WT – divlji tip (engl. *wild type*)

1. UVOD

1.1. INTERNEURONI

Živčani sustav ljudi građen je od velikoga broja neurona koji su organizirani u neuronske krugove. Takvi neuronski krugovi sastoje se od tri vrste neurona: eferentnih, aferentnih te interneurona. Interneuroni omogućuju komunikaciju između osjetilnih ili motoričkih neurona i središnjega živčanog sustava (SŽS). Nazivaju se i inhibicijskim neuronima lokalnih krugova, a glavni neurotransmiter preko kojega djeluju je gama aminomaslačna kiselina (engl. *gamma – aminobutyric acid,* GABA) (1).

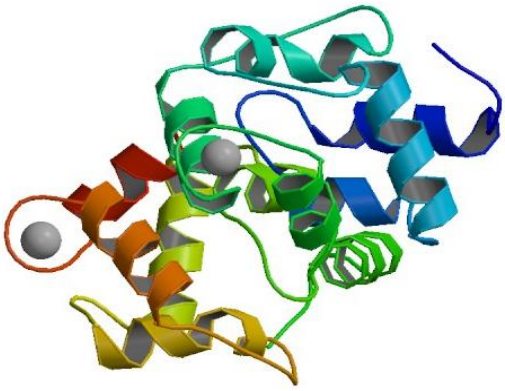
GABA se osim u interneuronima može naći i u Purkinjeovim stanicama maloga mozga. Sintetizira se iz glutamata pomoću enzima dekarboksilaze glutaminske kiseline, čija aktivnost limitira brzinu njezine sinteze, a razgrađuje se u semialdehid jantarne kiseline. Sama razgradnja odvija se u živcima i u stanicama glije. Huntingtova koreja i konvulzije nastaju kao posljedica poremećene sinteze GABA-e (2).

U mozgu odraslih sisavaca interneuroni sudjeluju u stvaranju refleksa, neuronskim oscilacijama i neurogenezi. Međusobno se razlikuju prema funkciji i anatomskim obilježjima, a jednu skupinu čine interneuroni koji eksprimiraju proteine koji vežu kalcij, kao što su parvalbumin, kalbindin i kalretinin (3).

Navedeni proteini imaju pufersku i modulatornu funkciju te služe kao markeri različitih potporodica interneurona (4).

1.1.1. PARVALBUMIN

Parvalbumin ima ulogu vezanja magnezija i cinka. Grade ga tri domene: AB, CD, EF. Svaka domena se sastoji od dvije alfa uzvojnice, a jedino EF domena ima sposobnost vezanja (5). Mala je i stabilna molekula. Nalazi se u različitim tkivima i organima kao što su mozak, masno tkivo, bubrezi i testisi. Javlja se u stanicama s debelim, mijeliniziranim aksonima.



Slika 1. *Struktura parvalbumina (Slika preuzeta iz rada autora Cates MS, i sur. (6) i prilagođena).*

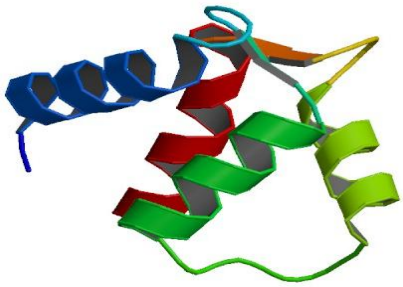
Osnovna uloga parvalbumina je zaštita stanice od prevelikog nakupljanja kalcija što za posljedicu ima oštećenje stanica u živčanome tkivu. Također, sudjeluje u određivanju brzine i dužine nastajanja signala te ima bitnu ulogu u staničnome ciklusu i rastu stanica. Parvalbuminski interneurnon prožet je kranijalnim živčanim jezgrama koje su zaslužne za pomicanje očne jabučice (6, 7).

Kod osoba koje boluju od Tourettova sindroma primijećene su snižene vrijednosti parvalbumina i kolinergičkih interneurona u striatumu. Vrijednosti su snižene čak od 50% do 60% (8). Provedena su još neka istraživanja na temu patofiziologije Huntingtonove bolesti te su utvrđene snižene vrijednosti parvalbuminskih interneurona u striatumu. Istraživanje je dovelo do spoznaje kako je vrijednost parvalbumina snižena do 26% u odnosu na normalne referentne vrijednosti te takve vrijednosti dovode do distonije koja je glavni krivac motorne invalidnosti u Huntingtonovoj bolesti (9). Smanjena ekspresija parvalbumina zabilježena je kod osoba koje boluju od shizofrenije (10).

1.1.2. KALBINDIN

Sljedeći važan interneuron je kalbindin. Građen je od šest EF- hand domena od kojih samo četiri imaju sposobnost vezanja kalcija. Nalazimo ga u većini tkiva, posebice u leđnoj moždini i mozgu.

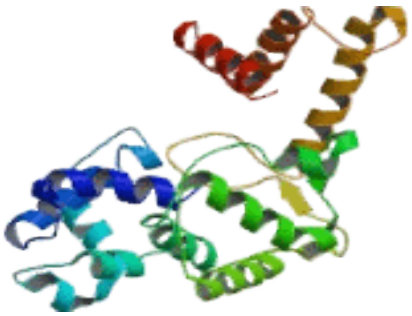
Kalbindin ima tri uloge: predstavlja imobilizirani kalcij pufer s aktivnom aktivnošću, puferira transport kalcija i ostvaruje interakciju s ciljnim proteinima (11). Stanice koje sadrže kalbindinski interneuron osjetljive su na neurodegenerativne promjene (7).



Slika 2. *Struktura kalbindina (Slika preuzeta iz rada autora Kordel J, i sur. (12) i prilagođena).*

1.1.3. KALRETININ

Kalretininski protein je kod ljudi kodiran pomoću CALB2 gena. Taj gen kodira unutarstanični protein koji pripada superobitelji troponina C (13). Kalretinin je građen od šest EF - hand domena: pet kalcij vezujućih domena i jedne koja ne veže kalcij. Također ima sposobnost vezanja bakra i cinka. Nalazimo ga u različitim regijama mozga. Najviše ga ima u retini i malome mozgu pa nedostatak kalretinina dovodi do poremećaja u motoričkoj koordinaciji (14).



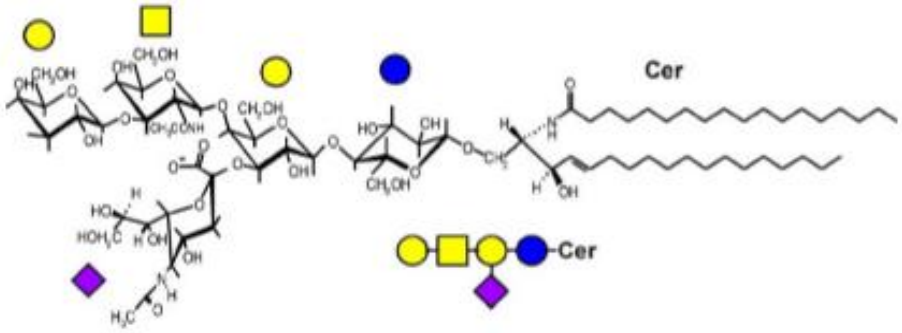
Slika 3. *Struktura kalretinina (Slika preuzeta iz rada autora Strauss KI, i sur. (14) i prilagođena).*

Jedan od takvih poremećaja je Parkinsonova bolest. Primijećena je veza između dopamina i kalretinina koja utječe na fenotipsku ekspresiju. Naime, neuroni se postepeno razgrađuju i umiru u mozgu, a ukoliko nastane veliko smanjenje neurotransmitora dopamina, doći će do abnormalnosti mozga i prvih znakova Parkinsonove bolesti. Ova činjenica ključna je za razumijevanje patofiziologije navedene bolesti (15).

1.2. GANGLIOZIDI

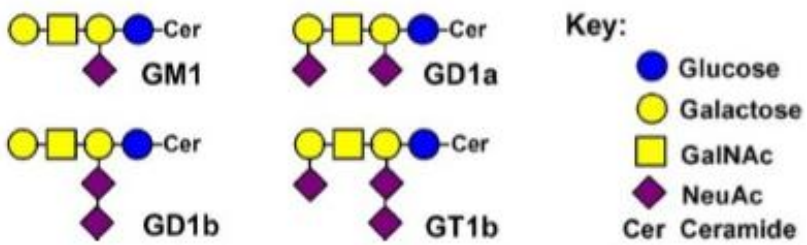
1.2.1. BIOSINTEZA GANGLIOZIDA

Gangliozidi i glikozilfosfatidilinozitol (GPI) proteini imaju različito biosintetsko podrijetlo, ali imaju jednu poveznicu: obojica su građeni od velikog hidrofilnog ostatka koji se veže na membranu s malenim lipidnim repom. Takvi proteini aktivno se prelijevaju iz jedne u drugu membranu i pri tome preuzimaju druge stanice umećući njihova lipidna sidra u staničnu membranu (16). Gangliozidi su glikosfingolipidi koji su građeni od glikana i ceramida (Slika 4).



Slika 4. *Struktura gangliozida (Slika preuzeta iz rada autora Lauc G, Heffer-Lauc M (16) i prilagođena).*

Njihova sinteza odvija se pomoću enzima koji su smješteni u Golgijevom aparatu. Nalaze se usidreni u vanjskome sloju stanične membrane preko ceramidne lipidne jedinice. Pronađeni su u svim tkivima, ali ih najviše ima u mozgu gdje služe kao biljezi razvojnih faza. Najzastupljenija su: GM1, GD1a, GD1b, GT1b. GM1 pojavljuje se tijekom mijelinizacije, GT1b tipičan je za zrele neurone, dok GD1a služi kao marker sinaptogeneze (17).



Slika 5. *Shematski prikaz kompleksnih gangliozida (Slika preuzeta iz rada autora Lauc G, Heffer-Lauc M (16) i prilagođena).*

Zajedno čine 97% gangliozida mozga. Ovi gangliozidi dijele isti glikanski neutralni dio i međusobno se razlikuju po broju molekula i mjestu njihova vezanja. Njihova rasprostranjenost u mozgu ovisi o dobi i regiji mozga pa tako na primjer, u embrionalnom ljudskom mozgu, dominiraju GM3 i GD3 gangliozidi (18). Razvojem mozga, ekspresija navedenih jednostavnih gangliozida prelazi u kompleksne gangliozide kao što su: GM1, GD1a, GD1b i GT1b (19). Gangliozidi su evolucijski dobro očuvani, ali kao posljedicu imaju siromašnu proizvodnju antitijela. Uloga gangliozida je slijedeća: stupaju u interakcije s receptorima koji su bitni za staničnu signalizaciju i adheziju s ciljem reguliranja diferencijacije, proliferacije, staničnog rasta te apoptoze, bitni su za međusobne interakcije kao i za interakcije između molekula i stanica. U staničnoj jezgri sudjeluju u regulaciji ravnoteže iona kalcija (20).

Gangliozidi sudjeluju u popravku i održavanju živčanih tkiva (18). Glikanski lanci navedenih gangliozida sudjeluju u međustaničnim interakcijama. Vežu se za glikan-vezujuće proteine na suprotnoj stanici, a takva interakcija naziva se *trans* interakcija. Također sudjeluju i u lateralnim *(cis)* interakcijama unutar samih membrana (17).

Ovim načinima, gangliozidi služe kao regulatori elemenata u živčanom i imunološkom sustavu. Vežu se na različite receptore u Golgijevom aparatu i kao posljedica toga postaju povlašteni pratioci kolesterola u lipidnim splavima (17).

Deficit gangliozida i interneurona dovodi do neuroloških poremećaja. Smanjena sinteza gangliozida povezuje se s Alzheimerovom bolešću, epilepsijom te Parkinsonovom bolešću, dok poremećaje u funkciji interneurona povezujemo s autizmom, epilepsijom i shizofrenijom (21). Također može doći do upale i aktivacije sustava komplementa (22).

1.2.2. RAZGRADNJA GANGLIOZIDA

Razgradnja gangliozida započinje u lizosomima i endosomima stanice. Da bi došlo do razgradnje, potrebna je reakcija vezanja proteina i hidrolaza (18). Na učinkovitu razgradnju gangliozida djeluje sastav lipida i tlak membrane (23). Ukoliko dođe do poremećaja razgradnje gangliozida pojavit će se Tay-Sachs bolest. Osobe s tom bolešću imaju deficitaran enzim acetilheksozaminidazu te u njihovim stanicama dolazi do nakupljanja lipida. Bolest uzrokuje teške neurološke smetnje jer se nakupljanje lipida odvija u moždanome tkivu (24).

1.3. GENETIČKI IZMIJENJENI MIŠJI MODELI

Miševima *B4Galnt1* nedostaje aktivnost enzima GM2/GD2 sintaze te oni ne izražavaju niti jedan od četiri kompleksna gangliozida (18). Kod *B4Galnt1* miševa uočavaju se neurodegenerativne promjene, intenzivnija vakuolizacija bijele tvari i smanjenje mozga zbog poremećene sinteze gangliozida. Također, uočena je smanjena prisutnost mijeliniziranih aksona, mijelinskih proteina te je prisutan poremećaj oko Ranvierova čvora. Miševi se kreću malim i otežanim pokretima. Stariji miševi pokazuju pojavu tremora i katalepsije. Ovako genetički promjenjeni miševi daju uvid u funkciju gangliozida u skladu s ljudskim kongenitalnim poremećajima (25).

1.4. STRIATUM

Striatum je glavni dio bazalnog ganglija. Povezujemo ga s kongnitivnim i motoričkim funkcijama. Sastoji se od striatalnih projekcijskih neurona, kolinergičkih interneurona te GABA-ergičnih interneurona. Interneuroni, koji se nalaze u striatumu, većinom su aspinozni. Striatum je glavno mjesto neurona talamusa i kore velikoga mozga (26).

Mnogi neurotransmitori sudjeluju u strujnim krugovima, a najvažniji među njima je acetilkolin (ACh). Striatum u usporedbi s ostalim dijelovima mozga sadrži najveće količine acetilkolina. Kolinergički interneuron (Chl), koji sadrži 1-2% svih stanica striatuma, glavni je izvor navedenog neurotransmitora. Ovakve činjenice dovode do napretka u razumijevanju čimbenika koji utječu na pobudnost tih neurona (27).

Striatum, osim što je bogat neurotransmitorima, obiluje i stanicama astrocitima. Glavna funkcija astrocita je održavanje homeostaze glutamata. Glutamat je važan neurotransmiter. Aktivira vlakna neurona. Astrociti izazivaju promjene u sinaptičkome oslobađanju glutamata kada dođe do oštećenja mozga. Takva promjena uočena je kod ljudi oboljelih od Parkinsonove i Huntingtonove bolesti (28).

Striatum povezujemo s društvenim ponašanjem pa tako socijalna izolacija ugrožava normalnu funkciju striatuma. Istraživanje u kojem su glodavci bili izolirani pokazalo je kako izolacija dovodi do agresivnoga ponašanja. Mozak takvih životinja imao je promjene u kortikalnom i subkortikalnom području. Osim na ponašanje, izolacija djeluje i na anatomske i

neurokemijske čimbenike (29). Prema tome, smatra se da su bazalni gangliji u striatumu odgovorni za normalno ponašanje i donošenje odluka (30).

2. HIPOTEZA

Ekspresija interneurona koji vežu kalcij u striatumu genetički izmijenjenih miševa *B4Galnt1* s nedostatkom u sintezi kompleksnih gangliozida, bit će promijenjena.

3. CILJEVI

- Cilj ovoga istraživanja je odrediti ekspresiju interneurona u striatumu genetički izmijenjenoga miša *B4Galnt1* i divljega tipa (engl. *wild* type, WT) koristeći protutijela za parvalbuminske, kalbindinske i kalretininske interneurone.
- Odrediti postoji li razlika u ekspresiji interneurona kod divljega tipa i genetički izmijenjenoga tipa miša.

4. MATERIJAL I METODE

Rad je napravljen u sklopu 2 projekta: *"Distribucija pojedinih tipova interneurona u genetički izmijenjenom mišu B4Galnt1 s nedostatkom u sintezi kompleksnih gangliozida"* (VIF2015-MEFOS-16), te *"Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi"* (IP-09-2014-2324). Za rad s navedenim životinjama dobiveno je dopuštenje etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek u sklopu projekta *"Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi"* (IP-09-2014-2324).

4.1. MATERIJAL

U istraživanje su uključena dva tipa miševa. Jedna vrsta je genetički izmijenjena s nedostatkom u sintezi kompleksnih gangliozida *B4Galnt1*, dok drugu vrstu čini divlji tip miševa (engl. *wild type*, WT) starosti tri mjeseca. Ta druga skupina ujedno je i kontrolna skupina. Po tri miša, odnosno njihova moždanoga tkiva, korištena su u istraživanju.

4.2. KEMIKALIJE

- NaOH (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- SYBR Safe (Invitrogen, , Carlsbad CA, USA)
- AE pufer (Qiagen, Hilden, Germany)
- agaroza (Lonza, Rockland, ME, USA)
- TBE pufer (Gibco, Life Technologies, Paihley, Scotland)
- izofluran (Forane, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, SAD)
- PBS:
    - NaCl (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA),
    - KCl (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA),
    - $Na_2HPO_4x7H_2O$ (Sigma−Aldrich,St.Louis,MO,USA),

- KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)

- paraformaldehid (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- saharoza (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- 2-metilbutan (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- medij za kriostatsko rezanje (Tissue Freezing Medium; Leica, Nussloch, Germany)
- 30% vodikov peroksid (H_2O_2) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- goveđi serum (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- kozji serum (Gibco, Invitrogen Auckland, NZ)
- primarna protutijela:
  - mišji anti-parvalbumin (Milipore, Temecula, CA, USA),
  - zečji anti-kalbindin (Milipore, Temecula, CA, USA),
  - zečji anti-kalretinin (Milipore, Temecula, CA, USA)
- sekundarna protutijela: mišje i zečje IgG protutijelo konjugirano s biotinom (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD)
- tercijarni kompleks "*Vectastain ABC Kit Elite*" koji sadrži kompleks avidina i biotiniliranog HRP-a (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- diaminobenzidin (DAB) (Peroxidase Substrate System, Vector Lab, Burlingame, CA, USA)
- Vectamount pokrivalo (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)

4.3. METODE

4.3.1. GENOTIPIZACIJA MIŠEVA

DNA je izolirana korištenjem visokih koncentracija natrijevog hidroksida (NaOH) (50mM). NaOH se dodaje na uzorke te se inkubiraju 30 minuta na 95°C. Nakon toga se odpipetira i dodaje AE pufer. Za razlikovanje divljega tipa miševa od genetički izmijenjenih tipova, korištena je metoda lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*,

PCR). Odsječci DNA umnoženi su korištenjem specifičnih početnica. Korištene početnice su 3′ Neo (null AGG TGA GAT GACAGG AGA TC), 5′ Neo (null CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC), WT sense (TGC CTC AGC CAA CAG CTT CC) te WT antisense (CGC CCT ATC GAA ACA CAC AGG). Segmenti DNA razdvojeni su elektroforezom u agaroznom gelu u koju je dodana boja *Syber Safe*, te su vizualizirani pod UV svjetlom.

4.3.2. PERFUZIJA I ŽRTVOVANJE ŽIVOTINJA

Životinje su anestezirane izofluranom. Nakon toga uslijedila je transkardijalna perfuzija.

Postupak perfuzije:

- kada je životinja bila duboko anestezirana, uvela joj se igla za perfuziju u lijevu klijetku srca,
- iglom se polagano ubrizgao 1xPBS (postupak se radi sve dok 1xPBS ne zamijeni krv),
- potom se ubrizgao 4%-tni paraformaldehid (PFA),
- ukoliko je miš u potpunosti ukočen, tada je provedena perfuzija uspješna.

Nakon provedene perfuzije učinjena je disekcija cijeloga mozga. Mozak je pohranjen u 4%-tni PFA na 24 sata. Potom je premješten u 10, a zatim u 20%-tnu otopinu saharoze na 24 sata. Mozak je smrznut u izopentanu i pohranjen na -80°C.

4.3.3. REZANJE MOŽDANOGA TKIVA NA KRIOSTATU

Rezanje mozgova provelo se na kriostatu (Cryostat CM3050S, Leica, Nussloch, Germany). Rezovi su bili veličine $35\mu m$, a temperatura kriostata je bila CT -18°C i OT -16°C. Mozgovi su se rezali u koronarnom smjeru, a rezovi su se stavljali u jažice sa 1xPBS.

4.3.4. IMUNOHISTOKEMIJA

Postupak:

- rezovi su najprije inkubirani u 0.2% otopini H_2O_2 u 1xPBS 30 minuta da bi se blokirala aktivnost endogenih peroksidaza;
- nakon toga su inkubirani u otopini za blokiranje koja se sastoji od 1% BSA, 5% kozjeg seruma u 1xPBS 45 minuta na sobnoj temperaturi uz neprekidno miješanje;
- zatim je slijedila inkubacija u primarnim monoklonskim protutijelima IgG klase preko noći na +4°C. Protutijela su pripremljena u različitim razrijeđenjima: anti-PV (1:500), anti-CB (1:200), anti-CR (1:50);
- slijedi ispiranje rezova tri puta po deset minuta u 1xPBS-u;
- nakon toga inkubacija rezova u sekundarnim protutijelima (2 sata na sobnoj temperaturi uz miješanje);
- slijedi ispiranje rezova tri puta po deset minuta u 1xPBS-u;
- te inkubacija rezova 1 sat na sobnoj temperaturi u „ABC“ reagensu („Vectastain ABC Kit Elite“);
- na kraju postupka slijedi vizualizacija protutijela pomoću diaminobenzidina (DAB) te vraćanje rezova nazad u 1xPBS.

4.3.5. ANALIZA EKSPRESIJE PARVALBUMINSKIH, KALBINDINSKIH, KALRETININSKIH PROTUTIJELA

Preparati rezova analizirani su pod svjetlosnim mikroskopom (Axioskop 2, Carl Zeiss, MOT, Jena, Germany) te uslikani kamerom *Olympus DP70* (Olympus DP70, Optical Olympus, Japan). Slikani su pod povećanjem 50x i 200x na slikovnom području veličine 200x200 μm. Slikane su obje hemisfere mozga. Slike su analizirane pomoću računalnoga programa *ImageJ 1.48v*. Statistika je napravljena u programu *Statistica 12* (Quest Software Inc., Aliso Viejo, CA, SAD). Razlike u ekspresiji potvrđene su Mann-Whitney-U testom. Razina značajnosti je 0,05.

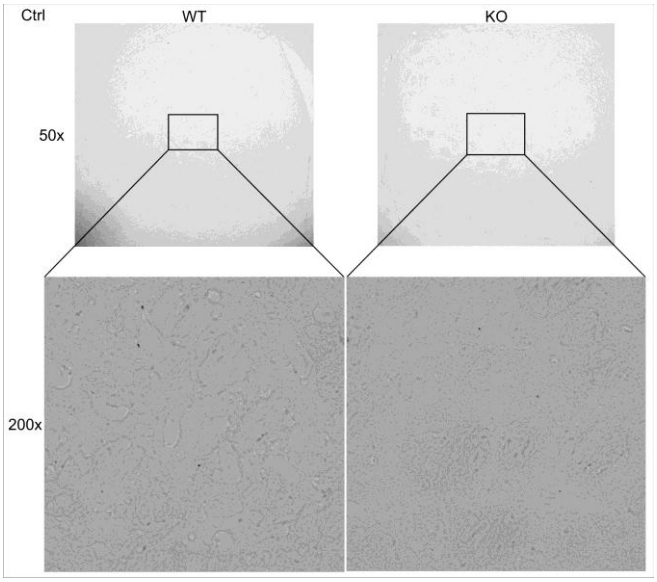
5. REZULTATI

U ovom je radu određivana ekspresija parvalbuminskih, kalbindinskih i kalretininskih interneurona u striatumu koji je zadužen za ponašanje. U računalnome programu *ImageJ* analizirane su slike obje hemisfere mozga te je kvantificirana prisutnost navedenih proteina koji vežu kalcij. Rezultati pozitivno obojenih stanica i standardnih devijacija prikazani su u Tablici 1. Statistički rezultati obrađeni su u računalnome programu *Statistica 12*.

Tablica 1. *Srednje vrijednosti i standardna devijacija broja stanica koje eksprimiraju parvalbuminske, kalbindinske i kalretininske interneurone miša divljeg tipa (WT) i genetički izmijenjenog miša B4Galnt1 (KO) u striatumu.*

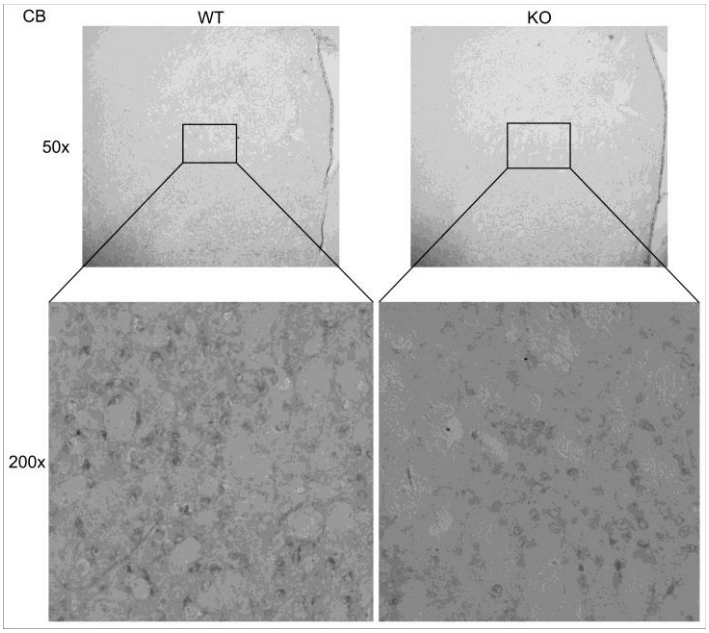
INTERNEURONI	MIŠ	SREDNJA VRIJEDNOST
PARVALBUMIN	KO	7 (±4,358898944)
	WT	5,33 (±2,516611478)
KALBINDIN	KO	0,333 (±0,57735027)
	WT	3,333 (±0,57735027)
KALRETININ	KO	124 (±23,3023604)
	WT	122 (±27,9702223)

Na Slici 6 prikazani su kontrolni rezovi koji pokazuju kako nespecifičnog vezanja protutijela nije bilo. Na Slikama 7, 9 i 11 prikazana su pozitivna bojanja sa protutijelima na parvalbuminske, kalretininske i kalbindinske interneurone. Na Slikama 8, 10 i 12 rezultati su i grafički prikazani.

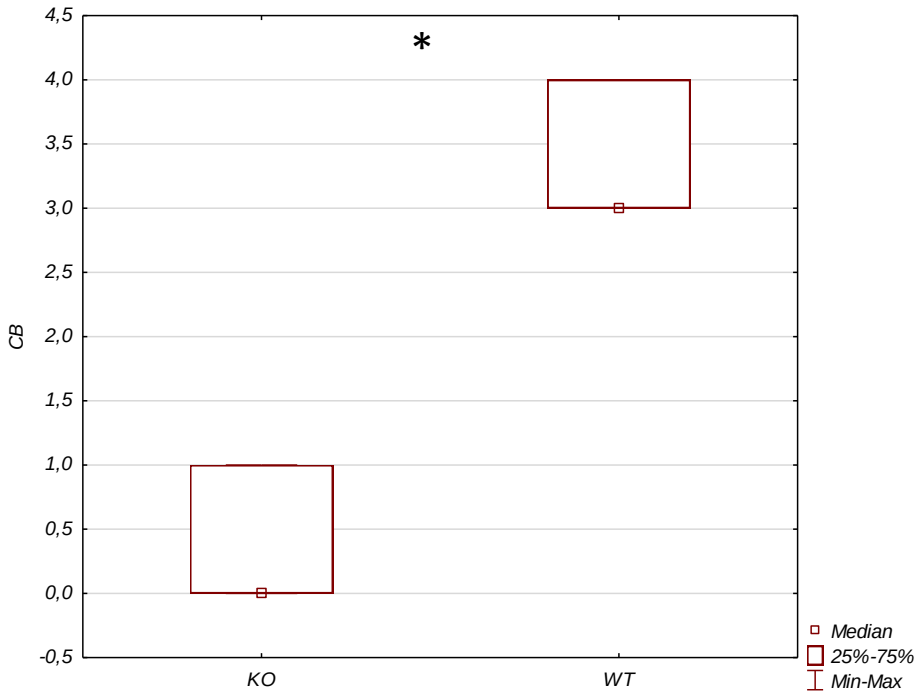


Slika 6. *Imunohistokemijski prikaz negativne kontrole. Lijevo je prikaz striatuma miša divljeg tipa (WT), a desno genetički izmijenjenog (KO) miša. Povećanje je 50x i 200x.*

Provedenom analizom određena je ekspresija interneurona u striatumu. Ekspresija je različita za svaki pojedini interneuron. Statistički značajna razlika utvrđena je u ekspresiji kalbindina gdje je određena p vrijednost 0,003538 (med=2,0000, min=0,00000, max=4,0000).

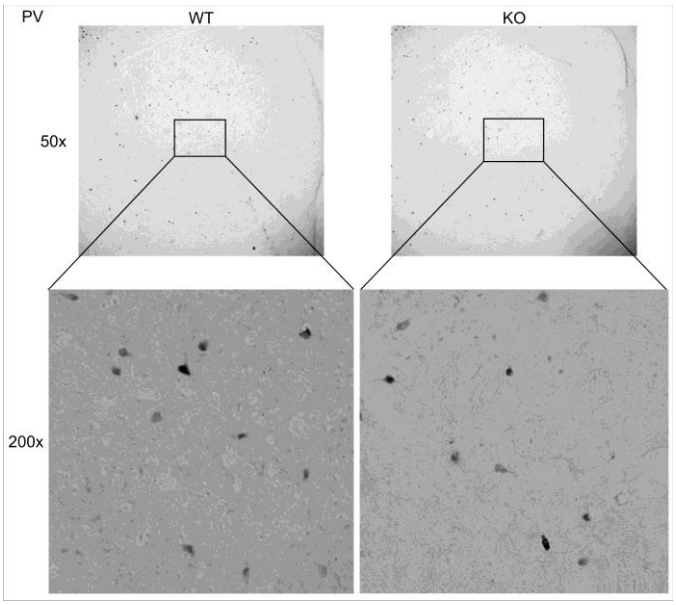


Slika 7. *Imunohistokemijsko obojenje kalbindinskih interneurona u striatumu miša divljeg tipa (WT) i genetički izmijenjenog miša B4Galnt1 (KO). Povećanje je 50x i 200x.*

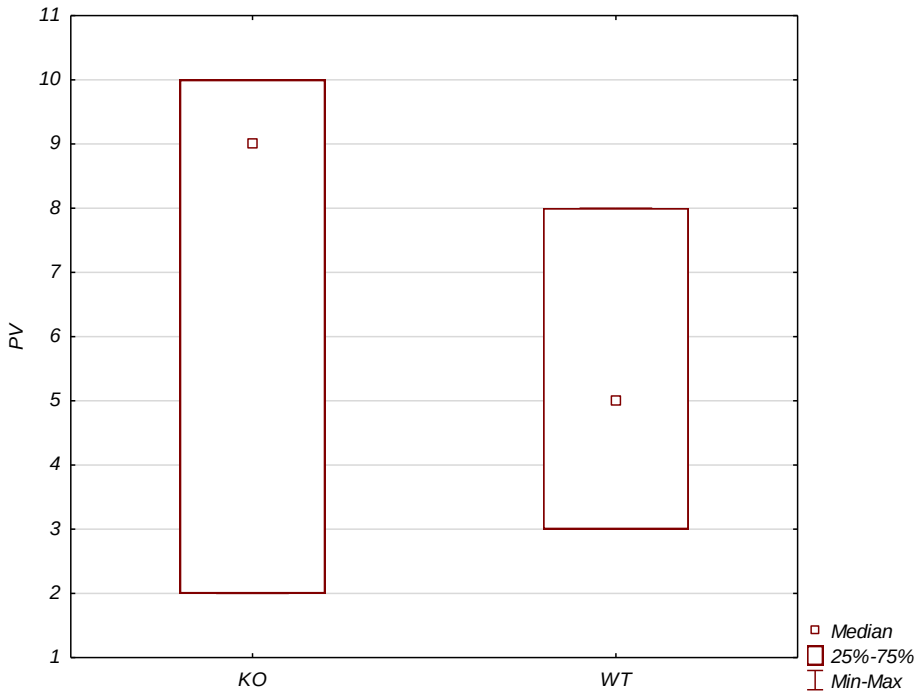


Slika 8. *Usporedba ekspresije kalbindinskih interneurona u striatumu genetički izmijenjenih miševa B4Galnt1(KO) i divljeg tipa miša (WT). * označava značajnu razliku, p=0,003538.*

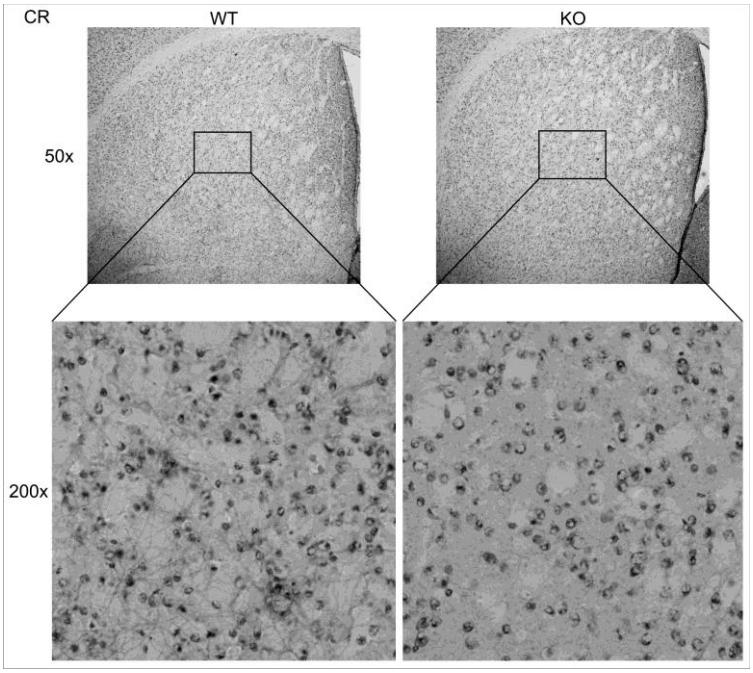
Kod parvalbumina određena p vrijednost je 0,373418 (med=6,5000, min=2,00000, max=10,0000), a kod kalretinina p je 0,808198 (med=128,0000, min=98,00000, max=167,0000).



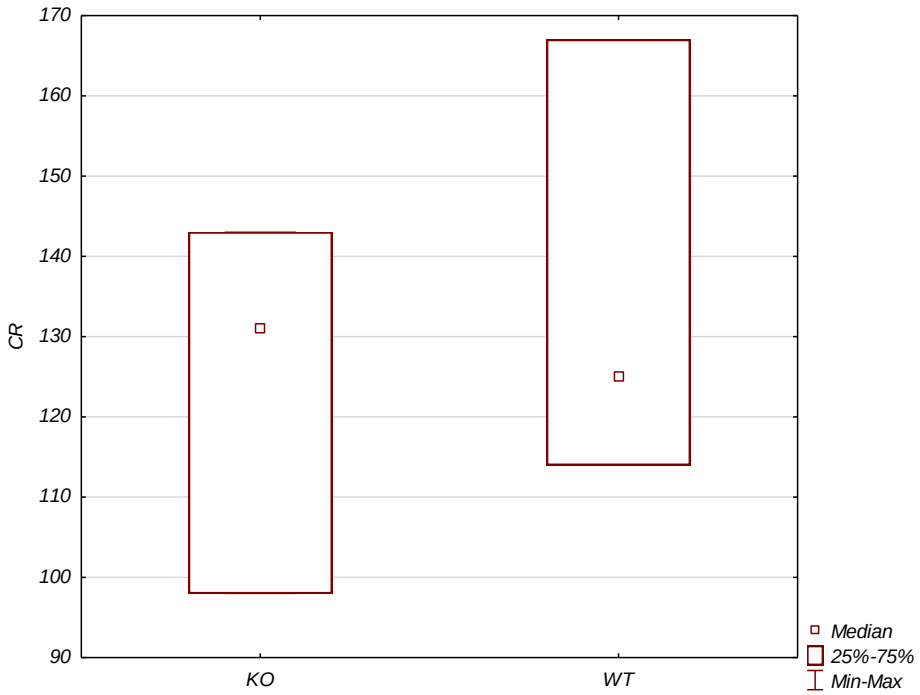
Slika 9. *Imunohistokemijsko obojenje parvalbuminskih interneurona u striatumu miša divljeg tipa (WT) i genetički izmijenjenog miša B4Galnt1 (KO). Povećanje je 50x i 200x.*



Slika 10. *Usporedba ekspresije parvalbuminskih interneurona u striatumu genetički izmijenjenog miša B4Galnt1(KO) i divljeg tipa miša (WT).*



Slika 11. *Imunohistokemijsko obojenje kalretininskih interneurona u striatumu miša divljeg tipa (WT) i genetički izmijenjenog miša B4Galnt1 (KO). Povećanje je 50x i 200x.*



Slika 12. *Usporedba ekspresije kalretininskih interneurona u striatumu genetički izmijenjenog miša B4Galnt1 (KO) i divljeg tipa miša (WT).*

6. RASPRAVA

Shizofrenija, epilepsija i autizam javljaju se kao posljedica poremećene funkcije interneurona koji se nalaze u striatumu. Njihova smanjena ekspresija povezana je s poremećajima u sintezi gangliozida što je pokazano u istraživanju na miševima (21). Gangliozide nalazimo u svim tkivima, a ponajviše ih ima u mozgu te su prisutni u različitim tipovima neurona. Služe kao biljezi razvojnih faza (17). Stupaju u interakcije sa receptorima koji su bitni za adheziju i staničnu signalizaciju sa ciljem reguliranja proliferacije, apoptoze, diferencijacije, staničnog rasta (20). Sudjeluju u međusobnim interakcijama te u interakcijama između stanica i molekula. U staničnoj jezgri reguliraju ravnotežu iona kalcija te služe kao modulatori proteina koji utječu na vezanje liganda (17, 20).

Ovo istraživanje provedeno je na dvije skupine miševa. Jedna skupina su genetički izmijenjeni miševi sa utišanim genom za sintezu kompleksnih gangliozida dok su druga skupina miševa divljeg tipa koji eksprimiraju sva četiri kompleksna gangliozida. Na spomenutim je miševima proučavana ekspresija parvalbuminskih, kalbindinskih i kalretininskih interneurona u striatumu. Striatum je glavni dio bazalnog ganglija te zadužen za sintezu navedenih proteina koji vežu kalcij. Zajedno sa bazalnim ganglijima djeluje na modulaciju procesa u motoričkom sustavu i tako čine bitan dio neuronskih krugova (26). Obiluje stanicama astrocitima čija je uloga održavanje homeostaze glutamata. Ukoliko dođe do oštećenja mozga i poremećenog oslobađanja glutamata kao posljedica može doći do razvoja npr. Parkinsonove ili Huntingtonove bolesti (28). Striatum povezujemo sa društvenim ponašanjem pa tako socijalna izolacija ugrožava normalnu funkciju striatuma. To se najbolje primijetilo na provedenome istraživanju u kojemu su glodavci bili izolirani te se pokazalo da izolacija dovodi do agresivnog ponašanja u životinja (29).

Istraživanjem je utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji kalbindina, ali ne i za parvalbumin i kalretinin. Dobiveni rezultati u skladu su sa istraživanjem provedenom na miševima sa isključenim genima *St3Gal2* i *St3Gal3*. U navedenome radu najznačajnija razlika javila se kod *St3Gal2* miša gdje CB pozitivni interneuroni dominiraju u striatumu, dok se PV i CR pojavljuju u manjem broju (31).

Promjene u ekspresiji interneurona dovode do neurodegenerativnih poremećaja. Nedavnim istraživanjem primijećena je veza između dopamina i kalretinina koja utječe na fenotipsku ekspresiju. To znači da ubrzanim odumiranjem neurona dolazi do abnormalnosti

koje kasnije vode do Parkinsonove bolesti. Takva spoznaja ključna je za razumijevanje patofiziologije navedene bolesti (15).

Ovim radom je po prvi puta prikazana ekspresija interneurona koji eksprimiraju proteine koji vežu kalcij u striatumu miševa sa utišanim genom za sintezu kompleksnih gangliozida. Nedostatak ove studije je što se navedeni interneuroni nisu analizirali u ranijim fazama života te se ne može utvrditi kada dolazi do smanjene sinteze pojedinih interneurona.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako isključenje gena za sintezu kompleksnih gangliozida utječe na ekspresiju interneurona koji vežu kalcij smanjujući im diferencijaciju.

7. ZAKLJUČCI

- Poremećaji u sintezi kompleksnih gangliozida kao posljedica isključenja gena *B4Galnt1* dovode do smanjene ekspresije interneurona koji vežu kalcij u striatumu.
- Značajna razlika, odnosno smanjenje, uočeno je u ekspresiji kalbindina u striatumu genetički izmijenjenoga miša *B4Galnt1* u odnosu na miša divljega tipa.

8. SAŽETAK

Uvod: Živčani sustav ljudi građen je od neurona koji tvore neuronske krugove u kojima sudjeluju i interneuroni. Oni omogućuju komunikaciju između središnjega živčanog sustava (SŽS) i motoričkih ili osjetilnih neurona te eksprimiraju proteine koji vežu kalcij kao što su parvalbumin, kalbindin te kalretinin. Gangliozidi su glikosfingolipidi koji se nalaze u svim tkivima, ali ih ponajviše ima u mozgu. Stupaju u interakcije sa receptorima s ciljem reguliranja proliferacije, apoptoze te diferencijacije. U staničnoj jezgri sudjeluju u ravnoteži iona kalcija. Nedostatak u sintezi gangliozida i interneurona dovodi do neuroloških poremećaja.

Ciljevi: Odrediti ekspresiju interneurona u striatumu genetički izmjenjenoga miša *B4Galnt1* (KO) i miša divljeg tipa (WT) koristeći protutijela za parvalbuminske, kalbindinske i kalretininske interneurone te odrediti postoji li razlika u ekspresiji interneurona u navedenih miševa.

Materijali i metode: U istraživanju su korišteni uzorci moždanoga tkiva genetički izmijenjenoga miša i divljega tipa miša. Nakon utvrđivanja genotipa, životinje su žrtvovane, a mozgovi su rezani na kriostatu. Imunohistokemijska analiza provedena je koristeći protutijela za parvalbuminske, kalbindinske i kalretininske interneurone, a dobiveni rezultati analizirani su u računalnim programima *ImageJ* i *Statistica 12.*

Rezultati: Ekspresija interneurona u striatumu KO miša smanjena je u odnosu na ekspresiju interneurona WT. Istraživanjem je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji kalbindina, ali ne i za parvalbumin i kalretinin.

Zaključak: Takvi rezultati podupiru teoriju da gangliozidi služe kao modulatori proteina koji vežu kalcij te utječu na vezanje liganda. Poremećaji u sintezi gangliozida dovode do smanjene ekspresije interneurona u striatumu.

Ključne riječi: gangliozidi; interneuroni; kalbindin; kalretinin; parvalbumin

9. SUMMARY

Expression of interneurons in the striatum of genetically modified mouse B4Galnt1

Introduction: The human nervous system consists of neurons that build neuron circuits in which interneurons also take part. They enable the communication between the central nervous system and the motor or sensor neurons. Also, they express proteins that bind calcium such as parvalbumin, calretinin and calbindin. Gangliosides are glycosphingolipids that can be found in tissues, but the biggest number of them is in the brain. They interact with receptors with the aim of regulating proliferation, apoptosis and differentiation. In the cell nucleus, they take part in balancing calcium ions. Deficiency in the synthesis of gangliosides and interneurons leads to neurological disorders.

Goals: The aim of this study was to determine expression of interneurons in striatum of a genetically modified mouse *B4Galnt1* (KO) and a wild type (WT) by using antibodies for parvalbumin, calbindin and calretinin interneurons, and to determine if there is a difference in the expression of interneurons between a wild type mouse and a genetically modified mouse.

Materials and methods: In this research, brain tissue samples from a genetically modified mouse and a wild type of mouse were used. After determining the genotype, the animals were done away with, and the brains were cut on cryostat. An immunohistochemical analysis was carried out by using specific antibodies for parvalbumin, calbindin and calretinin interneuorns, and the results were analysed in two softwares: *ImageJ* and *Statistica 12.*

Results: The expression of interneurons in the striatum of the genetically modified mouse was reduced in comparison with the expression of interneurons in the wild type mouse. The research confirmed that there is a statistically significant difference in expression of calbindin, but not parvalbumin and calretinin.

Conclusion: These results confirm the theory that gangliosides serve as protein modulators that bind calcium and impact binding ligand properties. The disorders in the synthesis of gangliosides lead to a reduced expression of interneurons in the striatum.

Key words: calbindin; calretinin; gangliosides; interneurons; parvalbumin

10. LITERATURA

1. Kay JN, Voinescu PE, Chu MW, Sanes JR. Neuro expression defines new retinal amacrine cell subtypes and regulates their fate. Nat Neurosci. 2011; 14, 965-972

2. Barac B. i sur. Neurologija; Medicinska biblioteka; Zagreb,1992.

3. Beglopoulos V. i sur. Neurexophilin 3 is highly localized in cortical and cerebellar regions and is functionally important for sensorimotor gating and motor coordination. Mol. Cell. Biol. 2005; 25,7278-7288

4. De Felipe J. i sur. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. Nat. Rev. Neurosci. 2013; 14, 202-216

5. Cates MS, Teodoro ML, Philips GN. Molecular mehanisms of calcium and magnesium binding to parvalbumin. Biophys. J. 2002; 82, 1133-1146

6. Cates MS, Berry MB, Ho EL, Li Q, Potter JD, Phillips Jr. GN. Metal-ion affinity and specificity in EF-hand proteins: coordination geometry and domain plasticity in parvalbumin. NCBI. 1990; 7 (10): 1269-78

7. Celio MR. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervus system. Neuroscience. 1990; 375-475

8. Kataoka Y, Grantz H, Saper C, i sur. Decreased number of parvalbumin and colinergic interneurons in the striatum of individuals with Tourette syndrome. NIH Public Access. 2010; 518 (3): 277-291

9. Reiner A, Shelby E, Wang H, i sur. Striatal parvalbuminergic neurons are lost in Huntington′s disease: implications for dystonia. ResearchGate. NCBI. 2013; 28 (12): 1691-1699

10. Murray JA, Ansel-Bollepalli L, i sur. Parvalbumin – positive interneurons of the prefrontal cortex support working memory and cognitive flexibility. Scientific reports. 2015; 5: 16778

11. Groves P, Palczevuska M, Kuanicki J. Calretinin, and EF – hand calcium – binding protein, binds zinc and copper. Calcium Bind. Proteins. 2006; 1, 156-159

12. Kordel J, Skelton NJ, Akke M, Chazin WJ. High-resolution structure of calcium-loaded calbindin D9k. NCBI. 1993; 231 (3): 711-34

13. Schwaller B. The continuing disappearance of „pure“ Ca^{2+} buffers. Cell. Mol. Life Sci. 2009; 66, 275-300

14. Strauss KI, Kuznicki J, Winsky L, Kawagoe JI, Hammer M, Jacobowitz DM. The mouse calretinin gene promoter region: structural and functional components. 1997; 49: 175-187

15. Petryszyn S, Di Paolo T, Parent A, Parent M, The number of striatal cholinergic interneurons expressing calretinin is increased in Parkinsonian monkeys. NCBI. 2016; 95: 46-53

16. Lauc G, Heffer-Lauc M. Shedding and uptake of gangliosides and glycosylpho-sphatidylinositol-anchored proteins. Biochimica et Biophysica Acta. 2006; 584-602

17. Lopez PH, Schnaar RL. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. NCBI. 2009; 19 (5): 549-57

18. Kolter T. Ganglioside biochemistry.NCBI. 2012; 2012: 506-160

19. Heffer-Lauc M, Viljetić B, Vajn K, Schnaar R, Lauc G. Effects of detergents on the redistribution of gangliosides and GPI-anchored proteins in brain tissue sections. SAGE. : 2007; 55(8): 805-812

20. Zhang X, Kiechle FL. Review: Glycosphingolipids in health and disease. Ann. Clin. Lab. Sci. 2004; 34, 3-13

21. Chu J, Anderson SA. Development of cortical interneurons. Neuropsychopharmacology. 2015; 40 (1): 16-23

22. Ohmi Y, i sur. Gangliosides play pivotal roles in the regulation of complement systems and in the maintenance of integrity in nerve tissue. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2009; 106, 22405-22410

23. Werth N, i sur. Degradation of membrane – bound ganglioside GM2 by beta – hexosaminidase A. Stimulation by GM2 activator protein and lysosomal lipids. J Biol Chem. 2001; 276: 12685-12690

24. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biokemija. 1. izdanje. Zagreb: Školska knjiga; 2013

25. Schnaar R L, Gerardy – Schahn R, Hildebrandt H. Sialic acid in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease and regeneration. Physiol. Rev. 2014; 94, 461-518

26. Tepper JM, Tecuapetla F, Koos T, Ibanez – Sadoval O. Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. Front. Neuroanat. 2010; 4: 150

27. Sean Austin Lim, Un Jung Kang, Daniel S McGehee. Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects. NCBI. 2014; 6-22

28. Dvorzhak A, Melnick I, Grantyn R. Astrocytes and presynaptic plasticity in the striatum: Evidence and unanswered questions. NCBI. 2017; S0361-9230 (17) 30003-5

29. Baez-Mendoza R, Schultz W. The role of the striatum in social behavior. NCBI. 2013; 7-233

30. Da Cunha C, Gomez-A A, D Blaha C. The role of the basal ganglia in motivated behavior. Rev. Neurosci. 2012; 23 (5-6): 747-767

31. Blažetić S. Distribucija osnovnih kemijskih fenotipova interneurona u mozgu 3 genetski preinačena mišja modela s isključenim genima *St3Gal2, St3Gal3 i St3Gal2/St3Gal3*. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku. 2015.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Mihaela Ilijašević

Datum i mjesto rođenja: 15.08.1995., Virovitica

Obrazovanje:

- 2014. – 2017. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku
- 2010. – 2014. Medicinska škola Bjelovar – zdravstveno-laboratorijski tehničar