

Utjecaj membranskih gangliozida na leptinski receptor i Na⁺,K⁺-ATPazu u talamusu miša

Potočki, Vinka

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:326334>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Vinka Potočki

**Utjecaj membranskih gangliozida na leptinski
receptor i Na^+ , K^+ -ATPazu u talamusu miša**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu neurobiologiju i neurokemiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Kristine Mlinac Jerković i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2023./2024.

Zahvale

Od srca zahvaljujem...

... svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Kristini Mlinac Jerković te prof. dr. sc. Svjetlani Kalanj Bognar i dr. sc. Borni Puljku koji su mi pružili neprocjenjiv prostor za znanstveno stvaralaštvo i otvorili vrata u svijet znanosti. Hvala Vam na svim lijepim trenucima unutar i izvan laboratorija.

... svim mojim prijateljima, koje sam stekla na fakultetu i kroz život, hvala na druženju, smijehu i nezaboravnim trenucima. Hvala što ste bili uz mene na ovom putovanju!

... konačno, i najvažnije, svojoj obitelji: mami, tati, bratu i baki. Hvala vam na bezuvjetnoj ljubavi, strpljenju i požrtvornosti. Zahvalna sam što sam odrasla u obitelji punoj ljubavi i podrške jer bez vas ne bih postigla ono što jesam.

KRATICE

AD	Alzheimerova bolest (engl., <i>Alzheimer's disease</i>)
AHC	naizmjenična hemiplegija djetinjstva (engl., <i>Alternating hemiplegia of childhood</i>)
AgRP	protein povezan s agutijem (engl., <i>Agouti-related protein</i>)
ARC	arkuatna jezgra (engl., <i>Arcuate nucleus</i>)
ATP	adenozin-trifosfat
Atp1a1-4	geni koji kodiraju alfa podjedinice Na ⁺ , K ⁺ -ATPaze
Atp1b1-3	geni koji kodiraju beta podjedinice Na ⁺ , K ⁺ -ATPaze
Atp2b1-4	geni koji kodiraju četiri izoforme Ca ²⁺ -ATPaze stanične membrane
BSA	goveđi serumski albumin (engl., <i>Bovine serum albumin</i>)
CAPOS sindrom	cerebelarna ataksija, arefleksija, pes cavus, optička atrofija, sensorineuralno oštećenje sluha (engl., <i>Cerebellar ataxia, areflexia, pes cavus, optic atrophy, and sensorineural hearing loss</i>)
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta (engl., <i>Epidermal growth factor receptor</i>)
ERK	kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (engl., <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>)
FHM	obiteljska hemiplegična migrena (engl., <i>Familial hemiplegic migraine</i>)
GABA	gama-aminomaslačna kiselina (engl., <i>Gamma-aminobutyric acid</i>)
GM3S	GM3-sintaza
GPI-sidro	glikozilfosfatidilinozitolno sidro
HD	Huntingtonova bolest (engl., <i>Huntington's disease</i>)
HRP	peroksidaza iz hrena (engl., <i>Horseradish peroxidase</i>)
IUPAC	Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl., <i>International Union for Pure and Applied Chemistry</i>)
InsR	inzulinski receptor (engl., <i>Insulin receptor</i>)
JAK-STAT put	Janus kinaze (JAK; engl., <i>Signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway</i>)

KO	životinje s isključenim genom (engl., <i>Knock-out</i>)
LepR	leptinski receptor
LR	lipidne splavi (engl., <i>Lipid rafts</i>)
MAG	glikoprotein pridružen mijelinu (engl., <i>Myelin-associated glycoprotein</i>)
MC4R	receptor melanokortina 4 (engl., <i>Melanocortin 4 receptor</i>)
NKA	Na ⁺ , K ⁺ -ATPaza
NPY	neuropeptid Y
PD	Parkinsonova bolest (engl., <i>Parkinson's disease</i>)
PMCA	Ca ²⁺ -ATPaza stanične membrane (engl. <i>Plasma membrane Ca²⁺-ATPase</i>)
POMC	proopiomelanokortin (engl., <i>Proopiomelanocortin</i>)
PVDF	poliviniliden-difluorid (engl., <i>Polyvinylidene difluoride</i>)
RDP	distonični parkinsonizam (engl., <i>Rapid-onset dystonia-parkinsonism</i>)
SDS-PAGE	gel-elektroforeza uz dodatak natrijeva dodecil-sulfata (engl., <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SOCS	supresor signalizacije citokina (engl. <i>Suppressor of cytokine signaling</i>)
SŽS	središnji živčani sustav
WT	divlji tip (engl., <i>Wild type</i>)
α-MSH	hormon koji stimulira melanocyte (engl., <i>Alpha-melanocyte stimulating hormone</i>)

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	Gangliozidi.....	1
1.1.1.	Gangliozidi u staničnoj membrani.....	3
1.1.2.	Distribucija gangliozida u mozgu	4
1.1.3.	Gangliozidi i bolesti središnjeg živčanog sustava	5
1.2.	Leptin i leptinski receptor	5
1.2.1.	Leptinski receptor i bolesti središnjeg živčanog sustava	7
1.2.2.	Međuodnos leptina, leptinskog receptora i gangliozida	8
1.2.3.	Međuodnos leptina, leptinskog receptora i Na ⁺ ,K ⁺ -ATPaze.....	9
1.3.	Na ⁺ ,K ⁺ -ATPaza	9
1.3.1.	Međuodnos Na ⁺ ,K ⁺ -ATPaze i gangliozida.....	10
1.3.2.	Na ⁺ ,K ⁺ -ATPaza i bolesti središnjeg živčanog sustava	11
2.	Hipoteza	13
3.	Ciljevi rada.....	14
3.1.	Opći cilj.....	14
3.2.	Specifični ciljevi rada	14
4.	Materijali i metode	15
4.1.	Pokusne životinje	15
4.2.	Uzorkovanje	15
4.3.	Kemikalije, predgotovljeni komplementi i protutijela	15
4.4.	Određivanje koncentracije proteina.....	17
4.5.	Optimizacija razrjeđenja protutijela za leptinski receptor	19
4.6.	Analiza proteinske ekspresije metodom <i>Western blot</i>	20
4.7.	Određivanje enzimске aktivnosti.....	23
4.8.	Određivanje koncentracije kolesterola	25
4.9.	Statistička analiza	25

5.	Rezultati	26
5.1.	Rezultati analize proteinske ekspresije metodom <i>Western blot</i>	26
5.2.	Određivanje enzimске aktivnosti Na ⁺ ,K ⁺ -ATPaze	31
5.3.	Određivanje koncentracije kolesterola	32
6.	Rasprava	33
7.	Sažetak	36
8.	Abstract	37
9.	Literatura	38
10.	Životopis	45

1. Uvod

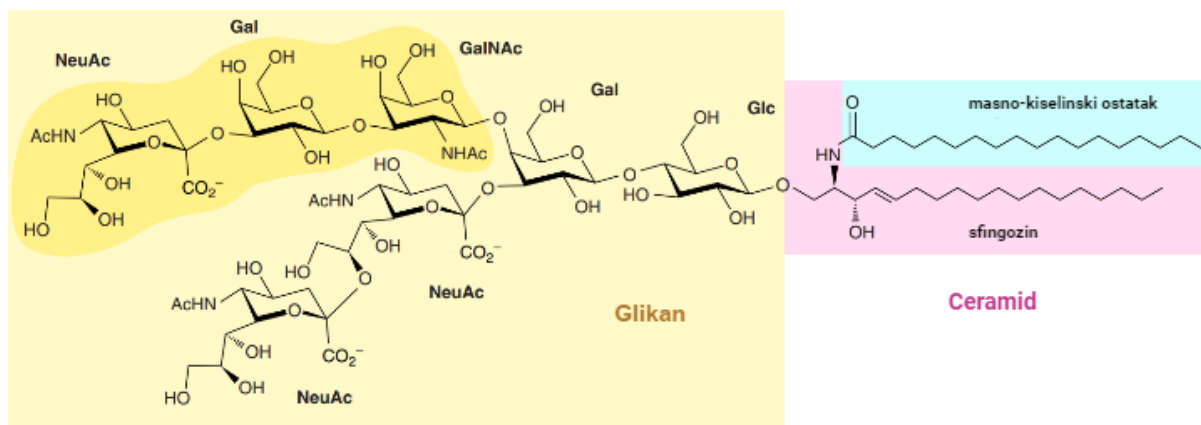
1.1. Gangliozidi

Glikolipidi su heterogena skupina biomolekula koje sadrže jedan ili više ugljikohidratnih lanaca vezanih na hidrofobni lipidni ostatak. Glikolipidi kojima je hidrofobni lipidni ostatak ceramid, nazivaju se glikosfingolipidi. Na temelju njihovih ugljikohidratnih struktura, glikosfingolipidi se klasificiraju u različite serije, od kojih su za kralježnjake najznačajnije ganglio-, lakto-, neolakto-, globo- i muko-serije. Konačno, kiseli glikosfingolipidi koji sadrže jedan ili više ostataka sijalinskih kiselina (*N*-acetilneuraminska kiselina ili *N*-glikolil-neuraminska kiselina) u svom ugljikohidratnom ostatku nazivaju se gangliozidi (1).

Naziv gangliozidi skovao je njemački biokemičar Klenk, koji ih je izolirao iz ganglijskih stanica pacijenata s amaurotskim idiotizmom i Niemann-Pickovom bolesti (2). Sijalinska se kiselina po prvi put izolirala iz mucina submaksilarne žljezde 1936. godine te je njenu strukturu pedesetih godina 19. stoljeća više skupina znanstvenika poistovjetilo s *N*-acetilneuraminskom kiselinom koju su izolirali Klenk i Faillard. Biokemijske podloge amaurotičnog idiotizama, GM1-gangliozidoze, Tay-Sachs- i Sandhoffove bolesti identificirali su Sandhoff i drugi 1960-ih (3).

Švedski neurokemičar Lars Svennerholm je 1962. godine predložio nomenklaturu gangliozida, koje je klasificirao s obzirom na broj ostataka sijalinske kiseline vezanih za ceramidnu osnovicu te s obzirom na kromatografsku pokretljivost koja ovisi o strukturi osnovnog ugljikohidratnog lanca na koji su vezane sijalinske kiseline (4). Početno slovo je uvijek isto (G) te označava skupinu gangliozida, nakon čega slijedi slovo koje označava broj molekula sijalinskih kiselina. Ukoliko je vezana samo jedna, slijedit će slovo „M“ (mono). Slovo „D“ (di) označava dvije, „T“ (tri) tri, „Q“ (quattro) četiri ili „P“ (penta) pet vezanih molekula sijalinske kiseline. Broj koji slijedi označava slijed i duljinu oligosaharidnog lanca koji je vezan za ceramid odnosno njihovu kromatografsku pokretljivost. Na primjer, brojka „1“ označava slijed Gal-GalNAc-Gal-Glc-ceramid, brojka „2“ označava slijed GalNAc-Gal-Glc-ceramid, dok brojka „3“ označava slijed Gal-Glc-ceramid (Gal = galaktoza, Glc = glukoza, GalNAc = *N*-acetilgalaktozamin). Naziv gangliozida može završiti malim tiskanim slovom koje označava broj sijalinskih kiselina vezanih za unutarnju molekulu galaktoze, stoga „a“

označava jednu, „b“ dvije, te „c“ tri molekule sijalinske kiseline. Gangliozid može biti i iz asijalo serije, „0“. Danas se gotovo isključivo koristi nomenklatura po Svennerholmu, a IUPAC-ova službena nomenklatura, je danas rijetko u upotrebi zbog složenosti strukture gangliozida (5),(6).

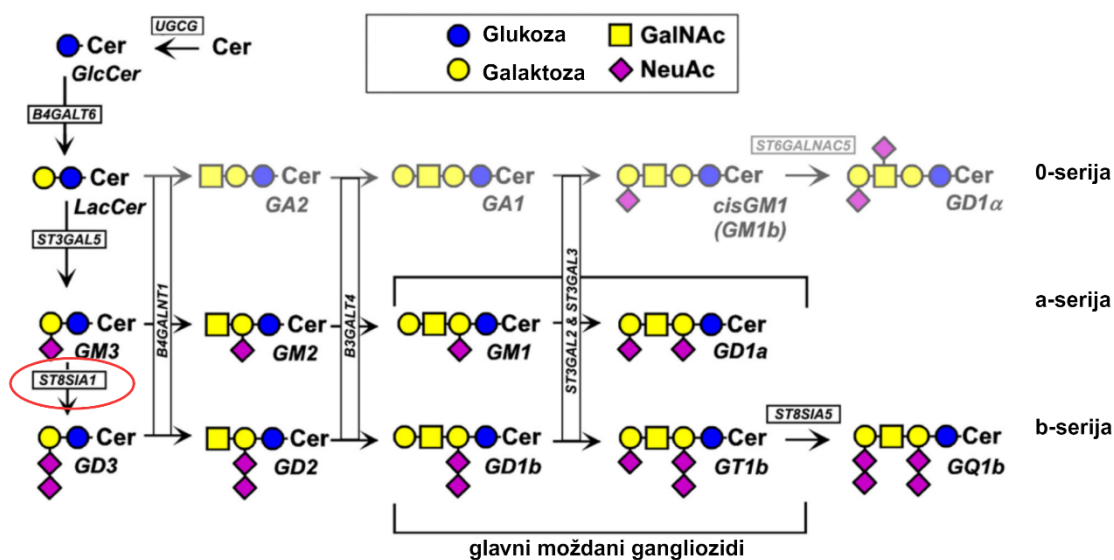


Slika 1. Prikaz strukture gangliozida GT1b. Gal – galaktoza, Glc – glukoza, GalNAc – N-acetilgalaktozamin, NeuAc – N-acetilneuraminska kiselina (sijalinska kiselina). Preuzeto i prilagođeno uz dopuštenje (7).

Razvojem mozga, ekspresija se gangliozida dramatično mijenja. U embrionalnom mozgu ljudi i glodavaca dominantni su jednostavniji gangliozidi GM3 i GD3. Sazrijevanjem su u mozgu izraženiji složeni gangliozidi poput GM1, GD1a, GD1b i GT1b, dok se koncentracija jednostavnih gangliozida smanjuje. Ove promjene su povezane s regulacijom glikoziltransferaza, koje se prostorno-vremenski reguliraju na transkripcijskoj i posttranslacijskoj razini, djelovanjem transkripcijskih faktora i epigenetskih modifikacija (5).

Biosinteza gangliozida započinje biosintezom ceramida, lipidne okosnice koja služi kao prekursor za složene glikosfingolipide. Kroz niz koraka djelovanjem specifičnih glikoziltransferaza potom nastaju galaktozilceramid, zatim glukozilceramid te laktozilceramid (engl., *lactosylceramide*, LacCer). LacCer služi kao okosnica za dodavanje molekula sijalinske kiseline u procesu koji se naziva sijalilacija.

Dodavanjem prve molekule sijalinske kiseline nastaje gangliozid GM3, zatim GD3 te GT3, kojima započinju sinteze a-, b- i c-serija gangliozida (5),(6).



Slika 2.1. Shematski prikaz biosinteze gangliozida. Crveno je zaokružen enzim koji nedostaje u mišjem modelu *St8sia1 null* zbog nefunkcionalnog gena za GD3-sintazu i blokira biosintetski put gangliozida b- i c-serije. Cer = ceramid, GlcCer = glukoza-ceramid, Lac-Cer = laktosilceramid, GalNAc = N-acetilgalaktozamin, NeuAc = N-acetilneuraminska kiselina. Preuzeto i prilagođeno uz dopuštenje (7).

1.1.1. Gangliozidi stanične membrane

Unutar stanične membrane gangliozidi se nakupljaju u lipidnim splavima (engl., *lipid rafts*, LR) koje imaju ključnu ulogu u nizu staničnih procesa, poput transmembranskog prijenosa molekula (8),(9) regulacije signalnih puteva i staničnog prepoznavanja. LR su visokoorganizirane domene bogate glikosfingolipidima i kolesterolom (8), netopljive u ionskim detergentima (engl., *detergent resistant membrane (DRM) fractions*) (10). Gangliozidi i LR utječu na koncentraciju kolesterola stanične membrane te je dokazana povezanost poremećenog metabolizma kolesterola u odnosu na promijenjen sastav gangliozida (11). Unutar LR se nalaze veće koncentracije različitih membranskih proteina poput receptorskih tirozin-kinaza iz obitelji kinaza Src, proteina s GPI-sidrom (glikozilfosfatidilinozitolnim sidrom) (12), receptora za faktore rasta (8), palmitoiliranih i miristoiliranih proteina poput flotilina (13) i proteina koji vežu kolesterol poput kaveolina (14). Istraživanja (15) pokazuju da GM1 lokalizira na uropodima (uropod – izbočina na stražnjoj strani ameboidnih pokretnih

stanica kao što su leukociti (16)), dok se GM3 odvaja do prednjeg ruba. Stoga, dvije različite skupine splavi, GM1-splavi i GM3-splavi, koje sadrže različite podskupine proteina povezanih s lipidnim splavima postaju dinamički odvojene tijekom polarizacije stanice. Ove značajke lipidnih splavi omogućuju stanici koordiniranu indukciju signalnih puteva te su mjesto za interakciju signalnih molekula i drugih glikolipida.

1.1.2. Raspodjela gangliozida u mozgu

Gangliozidi nisu jednako zastupljeni u različitim moždanim regijama, odnosno pojedine moždane regije, kao i drugi organi, uvelike se razlikuju po koncentraciji i sastavu gangliozida. Tako primjerice, gangliozidi GM1, GD1a, GD1b i GT1b čine 97% svih gangliozida u ljudskom mozgu te mozgovima sisavaca i ptica (17) (u daljnjem tekstu: glavni gangliozidi).

Imunohistokemijom je utvrđeno da je GD1b izrazito izražen u sivoj i bijeloj tvari u cijelom mozgu. Nasuprot tome, ostala tri glavna gangliozida imaju specifičnije obrasce distribucije u određenim regijama mozga. GM1 se nalazi u bijeloj tvari, blisko usklađen s uzorkom ekspresije glikoproteina pridruženog mijelinu (engl., *myelin-associated glycoprotein*, MAG), a također je prisutan u nekim moždanim jezgrama. GD1a i GT1b uglavnom su smješteni u sivoj tvari, uz nešto prisutnosti u traktovima bijele tvari. Distribucija GD1a i GT1b slična je u rostralnim dijelovima telencefalona, ali je ekspresija GD1a ograničena na nekoliko struktura u moždanom deblu od razine prednjeg pretektalnog nukleusa i gornjeg kolikulusa nadalje (17).

U malom mozgu miša, GM1 je prisutan samo u bijeloj tvari, dok se gangliozidi GD1a, GD1b i GT1b nalaze u sva tri sloja kore malog mozga (molekularni sloj, sloj Purkinjeovih stanica i granularni sloj) (18).

U jezgrama talamusa nalazimo poglavito „glavne“ gangliozide, a GD1a slabo je izražen samo u retikularnoj jezgri talamusa. U epitalamičkim medijalnim i lateralnim habenularnim jezgrama jako se ekspimiraju GD1b i GT1b, dok je GM1 slabo ekspimiran, a GD1a je potpuno odsutan. Sve jezgre hipotalamusa, uključujući paraventrikularne i medijalne preoptičke jezgre i područje prednjeg hipotalamusa, obilno izražavaju gangliozide GM1, GD1a, GD1b i GT1b. U subtalamičkoj jezgri i zoni incerti GT1b je izražen, a GD1a je potpuno odsutan (17).

1.1.3. Gangliozidi i bolesti središnjeg živčanog sustava

Kao što je ranije spomenuto, gangliozidi su ključni za održavanje homeostaze središnjeg živčanog sustava (SŽS), pri čemu svaka promjena koncentracije i sastava gangliozida može doprinijeti razvoju teških neurodegenerativnih stanja. Mutacije koje utječu na lizosomske enzime za razgradnju gangliozida mogu dovesti do nakupljanja gangliozida, što rezultira smrtonosnim lizosomskim bolestima nakupljanja poput GM1-gangliozidoze, Tay-Sachsove i Sandhoffove bolesti. Ove bolesti karakterizira mnogo različitih kliničkih simptoma, razvojno zaostajanje i rani početak neurodegeneracije. Osim toga, mutacije u genima koji kodiraju enzime biosinteze gangliozida mogu dovesti do teških sindroma poput nasljednog oblika epilepsije s početkom u dječjoj dobi (19).

Promijenjene razine pojedinih gangliozida uočene su i zabilježene kod Parkinsonove bolesti (PD), Huntingtonove bolesti (HD), Alzheimerove bolesti (AD), amiotrofične lateralne skleroze (ALS) i multiple skleroze (MS) (20).

Istraživanja pokazuju da gangliozidi utječu na ekspresiju i pozicioniranje neuroplastina koji je impliciran kao sudionik neuropatološke kaskade kod Alzheimerove bolesti (21).

1.2. Leptin i leptinski receptor

Leptin je peptidni hormon, veličine 16 kDa, kojega kodira gen *ob* (engl., *ob* – *obesity*) u masnom tkivu, a održava homeostazu energijskog metabolizma i tjelesnu masu (22). Pojam koji često povezujemo s leptinom je adipoznost, jer leptin u tijelu dovodi do mobilizacije lipida što određuje količinu masnih rezervi. Osim toga, sudjeluje i u procesima povezanim s potrošnjom energije, poput termogeneze u smeđem masnom tkivu i posmeđivanja bijelih adipocita. Leptin prenosi informacije o metabolizmu u hipotalamus, koji djeluje kao centar za regulaciju prehrane, tjelesne mase i potrošnje energije (23).

Leptinski receptor (LepR) je transmembranski protein koji veže leptin, a pripada obitelji citokinskih receptora klase I (23). LepR je proizvod alternativnog RNA izrezivanja gena *db* (gen dijabetes) (28), a izražava se u šest izoformi. Strukturne razlike LepR-a dijele ih u tri klase: duge, kratke i sekretorne izoforme. Duga, potpuno aktivna izoforma Lep-Rb uglavnom se eksprimira u hipotalamusu gdje sudjeluje u

energetskoj homeostazi te na imunološkim stanicama uključenim u urođenu i stečenu imunost. Duge i kratke izoforme LepR-a (LepRa, LepRc, LepRd i LepRe), osim jednakih izvanstaničnih i transmembranskih aminokiselina, imaju isti slijed prvih 29 unutarstaničnih aminokiselina, što sadržava konstantni box 1 motiv i JAK tirozin-kinazu (29). Duljina daljnje unutarstanične sekvence aminokiselina ovise o alternativnom mRNA izrezivanju; duga izoforma sadrži dodatne motive i supresore signalizacije citokina (engl., *suppressor of cytokine signaling*, SOCS) koja je inducirana citokinima (30). Sekretorna izoforma (LepRe) ne posjeduje unutarstaničnu domenu, već se secernira izravno u krvotok gdje djeluje kao otopljeni receptor (24),(25).

Arkuatna jezgra hipotalamusa sadrži dvije međusobno povezane skupine neurona koji izražavaju dulju izoformu leptinskog receptora (LepRb) i glavno je mjesto aktivnosti leptina (24). Proopiomelanokortinski neuroni (engl., *proopiomelanocortin*, POMC) potiču osjećaj sitosti i tonički otpuštaju hormon koji stimulira α -melanocyte (engl., *alpha-melanocyte stimulating hormone*, α -MSH), koji se veže na receptor melanokortina 4 (engl., *melanocortin 4 receptor*, MC4R) u paraventrikularnu jezgru hipotalamusa i na taj način potiče anorektički učinak, tj. potrošnju energije. Neuroni koji proizvode protein povezan s agutijem (engl., *Agouti-related protein*, AgRP) potiču glad i otpuštaju 1) AgRP, koji se natječe s α -MSH za vezno mjesto MC4R za regulaciju prehrane i energetske ravnoteže, te 2) neuropeptid Y (engl., *neuropeptide Y*, NPY) i γ -aminomaslačnu kiselinu (engl., *gamma-aminobutyric acid*, GABA) za regulaciju energetske ravnoteže. LepRb se eksprimira i u POMC neuronima, i u AgRP neuronima. Međutim, postprandijalno povećana razina cirkulirajućeg leptina stimulira POMC neurone (s posljedičnim otpuštanjem α -MSH i inhibicijom hranjenja), a inhibira AgRP neurone (26). Konačno, povišena razina leptina tipično stvara jak signal koji sprječava pretilost. Međutim, taj učinak je slab ili poremećen kod pretilih osoba, koji pokazuju stalnu hiperleptinemiju i ne reagiraju na egzogenu primjenu leptina (27).

JAK-STAT put je primarni i najistraživaniji put prijenosa signala koji je aktiviran leptinom. p-Tyr1138 je vezno mjesto za STAT3, kojeg fosforilira JAK2 i translocira u jezgru kao dimer za pokretanje ekspresije gena kao što je SOCS, regulator negativne povratne sprege puta JAK-STAT. SOCS3 se veže na p-Tyr985 LepRb, inhibirajući aktivaciju JAK2, a time i LepRb signalizaciju (28). Leptin također aktivira STAT5 putem fosforilacije Tyr1077, ali mutacije na ovom mjestu ili neuronska delecija STAT5

rezultiraju manjim ili nikakvim značajnim učincima na regulaciju tjelesne mase. Ovo sugerira da put LepR-STAT5 ima manju ulogu u energetske ravnoteži i može posredovati u drugim signalima citokina (29).

Miševi koji nemaju funkcionalni leptin ili LepR pretili su, hiperfagični, imaju hiperglikemiju i inzulinsku rezistenciju (30). Kratke izoforme LepR-a sposobne su vezati JAK kinaze i aktivirati kaskade prijenosa signala, međutim učinak kratke izoforme razlikuje se od učinka duge izoforme. Njegova je glavna funkcija vjerojatno povezana s internalizacijom i degradacijom leptina. Kratka se izoforma može naći u raznim tkivima, poput bubrega, pluća, jetre, slezene i u makrofagima (24).

1.2.1. Leptinski receptor i bolesti središnjeg živčanog sustava

Postoje brojna istraživanja o ključnoj ulozi leptina i leptinskog receptora u regulaciji neuroendokrinog sustava i korelaciji s neurodegenerativnim bolestima. Novija istraživanja pokazuju da leptin i njegov receptor igraju značajnu regulatornu ulogu u SŽS-u te da su povezani s patološkim i fiziološkim mehanizmima neuroloških bolesti, uključujući neurodegenerativne bolesti i poremećaje raspoloženja (25). Utvrđeno je da se neke neurološke bolesti pojavljuju uz promjene razine leptina, što ukazuje da bi leptin mogao biti pokazatelj razvitka bolesti, što istraživanjima o leptinu i njegovom receptoru daje još veći značaj.

Kliničke studije koje su istraživale odnos između depresije i razine leptina dale su nepouzdan rezultate. Niže razine leptina prijavljene su kod pacijenata s depresijom u usporedbi s kontrolnom skupinom u ranijim studijama. No, postoje i istraživanja koja pokazuju da pacijenti s velikim depresivnim poremećajem imaju više razine leptina (31). Nekoliko studija na štakorima pokazalo je da kronični nepredvidivi stres uzrokuje niže razine leptina (32).

Neka istraživanja (33) sugeriraju da adipokini, a posebice leptin, ima ulogu u patogenezi AD. Studija na 785 sudionika pokazala je da su više razine cirkulirajućeg leptina povezane sa smanjenom incidencije nastanka AD, što bi upućivalo na neuroprotektivni učinak leptina (34). Više razine leptina se također povezuju s većim ukupnim volumenom mozga u istoj studiji.

1.2.2. Međudnos leptina, leptinskog receptora i gangliozida

Gangliozidi GM1 i GD1a stupaju u interakciju s leptinskim receptorom (LepR) i pojačavaju LepR signalizaciju putem aktivacije JAK2/STAT3 puta. Istraživanja stanica koje imaju nefunkcionalnu GM3-sintazu (GM3S KO) pokazuju da gangliozidi također utječu na put kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (ERK), koji je nizvodno od LepR signalnog puta. Štoviše, novija otkrića upućuju na interakciju između LepR puta i drugih receptorskih putova poput putova receptora za inzulin (InsR) i receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR). Gangliozidi mogu modulirati učinke leptina reguliranjem funkcije ovih receptora i izravnom interakcijom s LepR za kontrolu signalizacije (26).

Studija Furukawine grupe iz 2016. godine ispitala je promijenjenu signalizaciju leptina u hipotalamusu miševa kojima nedostaje GD3-sintaza (GD3S KO miševi). Ovi miševi nisu razvili pretilost unatoč niskim razinama leptina u cirkulaciji. Miševi GD3S KO imaju više razine gangliozida GM1 i GD1a u hipotalamusu u usporedbi s miševima divljeg tipa (engl., *wild type*, WT), dok glavni gangliozidi b-serije, GD1b i GT1b, nisu prisutni. Studija je pokazala da GD3S KO miševi imaju više razine hipotalamičke LepRb mRNA i proteina, što dovodi do povišenih bazalnih razina hipotalamičkog fosfo-STAT3. Ovo povećanje dodatno je pojačano davanjem leptina, što je rezultiralo jačom aktivacijom STAT3 u GD3S KO miševa nego u WT miševa.

Prekomjerna ekspresija GD3S u stanicama N-41 (koje poglavito eksprimiraju a-seriju gangliozida) uzrokuje smanjenu fosforilaciju STAT3 izazvanu leptinom, povećanu ekspresiju gangliozida b-serije i smanjenu količinu gangliozida a-serije. Uz to, koimunoprecipitacija je pokazala da stimulacija leptinom povećava interakciju LepR s GM1 ili GD1a. Ove činjenice ukazuju na to da više razine GM1 i GD1a u hipotalamusu GD3S KO miševa pojačavaju signaliziranje leptina, kompenzirajući smanjeno lučenje leptina (26).

Ukratko, gangliozidi su važni za regulaciju LepR i potencijalno drugih receptora uključenih u održavanje energetske ravnoteže, ukazujući na specifičnost za različite vrste gangliozida. Iako točni molekularni procesi nisu u potpunosti razjašnjeni, moguća su objašnjenja ili izravno vezanje između LepR i specifičnih gangliozida, ili interakcija između LepR i drugih receptora unutar neurona hipotalamusa. Potrebna su daljnja

istraživanja da se identificiraju mehanizmi regulacije energetske ravnoteže pod utjecajem gangliozida (26).

1.2.3. Međudnos leptina, leptinskog receptora i Na^+, K^+ -ATPaze

Pokazalo se da Na^+, K^+ -ATPaza (NKA) u arkuatnoj jezgri (engl., *arcuate nucleus*, ARC) u hipotalamusu regulira energetska stanja kako bi se kontroliralo hranjenje (35). Supresija NKA potiče hranjenje primarno putem aktivacije AgRP/NPY neurona u ARC-u, a smanjena ekspresija POMC mRNA dodatni je regulatorni faktor. Stoga se može zaključiti da AgRP/NPY neuroni ovise o supresiji NKA što ilustrira važnost regulacije hranjenja kroz NKA (35),(36). Signalni putevi uključeni u ekscitaciju AgRP/NPY neurona u ARC-u izazvani su gladovanjem i inhibirani su leptinom (37). Stoga, postoje važni mehanizmi posredovani NKA u uvjetima gladovanja koji se isprepliću s drugim staničnim mehanizmima kako bi se učinkovito aktiviralo AgRP/NPY neurone da izazovu ponašanje pri hranjenju, koji su direktno povezani s leptinskim signalnim putevima.

1.3. Na^+, K^+ -ATPaza

Na^+, K^+ -ATPaza (NKA) je enzim koji se sastoji od dvije polipeptidne podjedinice, alfa (α) i beta (β), te nekoliko molekula lipida integriranih u lipidni dvosloj stanične membrane. Ovaj kompleks enzima igra ključnu ulogu u održavanju ionskih gradijenata natrijevih i kalijevih iona preko stanične membrane. NKA spada u porodicu ATPaza tipa P topološkog tipa II, koja uz utrošak adenozin-trifosfata (ATP) aktivno transportira tri natrijeva iona iz stanice te dva kalijeva iona u stanicu, nasuprot njihovu koncentracijskom gradijentu. Na taj se način stvara elektrokemijski gradijent neophodan za razne stanične funkcije, uključujući prijenos živčanih impulsa, mišićne kontrakcije i transport hranjivih tvari. Lipidi u mikrookolini enzima također imaju važnu ulogu u njegovoj stabilnosti i funkciji (38). α -podjedinica sadrži oko 1000 aminokiselina, a različite vrste i tkiva posjeduju gotovo identične sekvence. Tri izoforme α -podjedinice identificirane su u kralježnjacima: $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$. Prisutne su u različitim omjerima u stanicama različitih tkiva. Izoforma $\alpha 1$ nalazi se u gotovo svim stanicama, $\alpha 2$ dominira u poprečno-prugastim mišićima, a $\alpha 3$ se nalazi prvenstveno u živčanom tkivu gdje su također prisutne $\alpha 1$ i $\alpha 2$ podjedinice. Sve tri izoforme imaju istu

molekularnu masu, ali se razlikuju u sastavu i slijedu aminokiselina, sekvencne identičnosti od otprilike 82%. Najveće razlike pojavljuju se u *N*-terminalnom dijelu, što utječe na njihovu osjetljivost prema srčanim glikozidima. U moždanom tkivu štakora, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ izoforme su osjetljivije na srčane glikozide od $\alpha 1$. Homologija između tri izoforme u mozgu je oko 90%. Izoforme β -podjedinica kod sisavaca su identične više od 98% (39).

β -podjedinica sadrži oko 300 aminokiselina. Sekvence β -podjedinica iz različitih vrsta i tkiva pokazuju nisku homologiju između izoforma, otprilike 40% između $\beta 1$, koji je prevladavajući oblik u bubregu sisavaca, i $\beta 2$, koji je izoliran iz mozga. Izoforma $\beta 2$ ima ulogu u međustaničnoj interakciji (38). Treća izoforma, $\beta 3$, izolirana je iz vrste žabe *Xenopus*, a H^+,K^+ -ATPaza $\beta 4$ -podjedinica je izolirana iz kunića i štakora. Različite β -izoforme i njihove posttranslacijske modifikacije omogućuju regulaciju Na^+,K^+ -ATPaze u različitim tkivima i odgovaraju na promjene u okolišu. Inaktivacija $\beta 1$ u srcu miševa pokazuje minimalne učinke do starosti od 10 mjeseci, dok inaktivacija $\beta 2$ rezultira smrću u roku od 17-18 dana nakon rođenja, zbog moždanih disfunkcija.

1.3.1. Međudnos Na^+,K^+ -ATPaze i gangliozida

NKA i gangliozidi imaju kompleksan međudnos koji utječe na funkcionalnost neuronalnih membrana. NKA, s obzirom da je transmembranski protein, zahtijeva određen lipidni sastav stanične membrane, što direktno korelira s gangliozidnim sastavom membrane. Utvrđeno je da se aktivnost NKA mijenja tijekom višestrukih ciklusa smrzavanja i odmrzavanja zbog preslagivanja između lipidnih splavi i gangliozida GM1, GD1a, GD1b i GT1b, stoga njihova distribucija unutar membrane odražava promjene NKA aktivnosti (40). Ti nam rezultati ukazuju na to da je uređenje gangliozida unutar stanične membrane ključno za pravilno funkcioniranje NKA. Poznato je da se različiti gangliozidi nalaze u različitim vrstama stanica (41), pa bi ovaj podatak mogao upućivati na to da direktno utječu na finu regulaciju aktivnosti NKA (42). Istražuje se i odnos gangliozida i NKA u okviru epileptičnih napadaja ako su njihove funkcije narušene. Istraživanja daju različite rezultate. Egzogeno dodani gangliozidi, uključujući GM1, GD1a, GD1b i GT1b, mogu imati mjerljive učinke na aktivnost NKA. Ovisno o koncentraciji i vrsti gangliozida, njihovo dodavanje može izazvati povećanje ili smanjenje aktivnosti NKA (42). Strukturne promjene neuronske

membrane uzrokovane promijenjenim sastavom gangliozida najvjerojatnije pridonose abnormalnoj aktivnosti NKA, no točnu korelaciju još je potrebno utvrditi (42), (43).

1.3.2. Na^+, K^+ -ATPaza i bolesti središnjeg živčanog sustava

Delecija gena *ATP1A1* koji kodira $\alpha 1$ -podjedinicu NKA nije spojiva sa životom. No, mutacije u ovom genu mogu biti povezane s bolestima poput tumora u nadbubrežnim žlijezdama koje uzrokuju hormonski disbalans i prekomjernu proizvodnju aldosterona, što uzrokuje hipertenziju kod 10% pacijenata s povišenim krvnim tlakom (44). Fiziološki će adrenalne stanice reagirati na peptidni hormon angiotenzin II i izvanstanične kalijeve ione putem depolarizacije i otvaranja kalcijevih kanala ovisnih o naponu. Povećana razina unutarstaničnih kalcijevih iona potiče ekspresiju enzima aldosteron-sintaze. Mutacije u genu *ATP1A1*, kao i u kalijevim i kalcijevim kanalima, mogu poremetiti ovaj signalni put, izravno utječući na membranski potencijal i razinu kalcijevih iona (45). Mutacije u genu *ATP1A1* mogu pumpu pretvoriti u ionski kanal, koji omogućava nesmetani ulazak natrijevih iona i protona u stranicu, umjesto pumpanja iona van stanice. Ovakva mutacija uzrokuje depolarizaciju i može imati ozbiljne posljedice, jer se narušava fiziološka funkcija NKA. Farmakološki gledano, mutacije koje preoblikuju pumpu u kanal su izrazito opasne. Dok su inhibitori pumpe poput srčanih glikozida toksični, nisu toliko opasni kao molekula palitoksin, koja pretvara pumpu u kanal. Palitoksin kojeg proizvode koralji vrste *Palythoa*, drugi je najsmrtonosniji nepeptidni spoj za kojeg znamo, jer samo jedna molekula na površini stanice može uzrokovati ozbiljne poremećaje u ionskoj ravnoteži stanice (46).

Obiteljska hemiplegična migrena (FHM) je autosomni nasljedni oblik migrene s austom i slabošću na jednoj strani tijela tijekom napada. Mutacije u tri gena povezane su s FHM-om: FHM1, FHM3 i FHM2. Opisano je minimalno 80 mutacija gena *ATP1A2*, koji kodira $\alpha 2$ -podjedinicu NKA, koje uzrokuju bolest FHM2. Te mutacije smanjuju funkciju pumpe, smanjujući njezinu sposobnost izbacivanja kalijevih iona i glutamata iz astroca (47), (48).

Mutacije u genu *ATP1A3* za posljedicu imaju tri neurološka sindroma: distonični parkinsonizam (engl., *rapid-onset dystonia parkinsonism*, RDP), naizmjenična hemiplegija djetinjstva (engl., *Alternating Hemiplegia of Childhood*, AHC) i CAPOS sindrom (cerebelarna ataksija, arefleksija, pes cavus, optička atrofija, sensorineuralno oštećenje sluha). RDP karakterizira nagli nastanak distonije i parkinsonizma, često

uzrokovan stresom u ranoj odrasloj dobi. Za sada ne postoji poznato liječenje, a ne reagira na levodopu (49). AHC se dijagnosticira prije 18. mjeseca života, a karakteriziraju ga periodi slabosti ili jednostrane paralize tijela, često udruženi s distonijom, korejom i nistagmusom. Opcije liječenja su ograničene na benzodijazepine i blokatore kalcijских kanala (50). CAPOS sindrom počinje u djetinjstvu, a izaziva ga vrućica. Klinički se ispoljava kao cerebralna ataksija, arefleksija te gubitak sluha i vida (51).

2. Hipoteza

Povećana količina gangliozida a-serije te nedostatak gangliozida b- i c-serije u talamusu miševa *St8sia1 null* uzrokuje smanjenje proteinske ekspresije membranskih proteina LepR i NKA, smanjenje enzimske aktivnosti NKA, te povećanje koncentracije kolesterola.

3. Ciljevi rada

3.1. Opći cilj

Utvrđiti utjecaj promijenjenog sastava gangliozida membrane stanica talamusa mišjeg modela *St8sia1 null*, koji ima poremećenu sintezu gangliozida, na proteinsku ekspresiju LepR i NKA, enzimsku aktivnost NKA i koncentraciju kolesterola.

3.2. Specifični ciljevi rada

1. Odrediti proteinsku ekspresiju LepR i NKA u talamusu mozga mišjeg modela *St8sia1 null* u usporedbi s kontrolnim uzorcima.
2. Odrediti enzimsku aktivnost NKA u talamusu mozga mišjeg modela *St8sia1 null* u usporedbi s kontrolnim uzorcima.
3. Odrediti koncentraciju kolesterola u uzorcima talamusa mozga mišjeg modela *St8sia1 null* u usporedbi s kontrolnim uzorcima.

4. Materijali i metode

4.1. Pokusne životinje

U svrhu izrade ovog diplomskog rada, korišteno je ukupno 12 uzoraka mišjeg talamusa, od čega je 6 poteklo od miševa soja *St8sia1 null* koji imaju poremećenu sintezu ganglizoida i 6 WT kontrolnih miševa. Sve životinje korištene u ovom istraživanju muškog su spola i žrtvovane u dobi od 6 mjeseci, a ustupljene su ljubaznošću prof. dr. sc. Marije Heffer s Katedre za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku. Rad s mišjim modelom odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu HRZZ projekta „Molekularni biljezi vulnerabilnosti, adaptacije i plastičnosti neurona u akutnoj i kroničnoj ozljedi mozga“ (IP-2016-06-8636) te Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske u sklopu HRZZ projekta „Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi“ (IP-2014-09-2324).

4.2. Uzorkovanje

Životinje su žrtvovane isključivo u svrhu istraživanja, a nakon neuroanatomske disekcije (52), uzorci moždanog tkiva zamrznuti su u tekućem dušiku i spremljeni na -80 °C do početka istraživanja. Moždano tkivo koje je izdvojeno za ovo istraživanje sastoji se većinski od talamusa, te epitalamusa i hipotalamusa. Lijeve i desne regije polutka mozga pojedinih životinja bile su zasebno izolirane i pohranjene, no kako bi se dobila veća masa uzoraka, udružili smo lijevu i desnu polovicu u jedan uzorak. Udruživanje uzoraka obično se koristi u raznim područjima istraživanja, uključujući neuroznanost, genetiku i epidemiologiju, kako bi se postigla veća i reprezentativnija veličina uzorka za analizu (58).

4.3. Kemikalije, predgotovljeni kompleti i protutijela

U Tablici 4.1 popisane su kemikalije korištene u svrhu istraživanja s odgovarajućim proizvođačem i kataloškim brojem. Predgotovljeni kompleti i protutijela prikazani su u tablicama 4.2 i 4.3.

Tablica 4.1. Kemikalije korištene u svrhu istraživanja

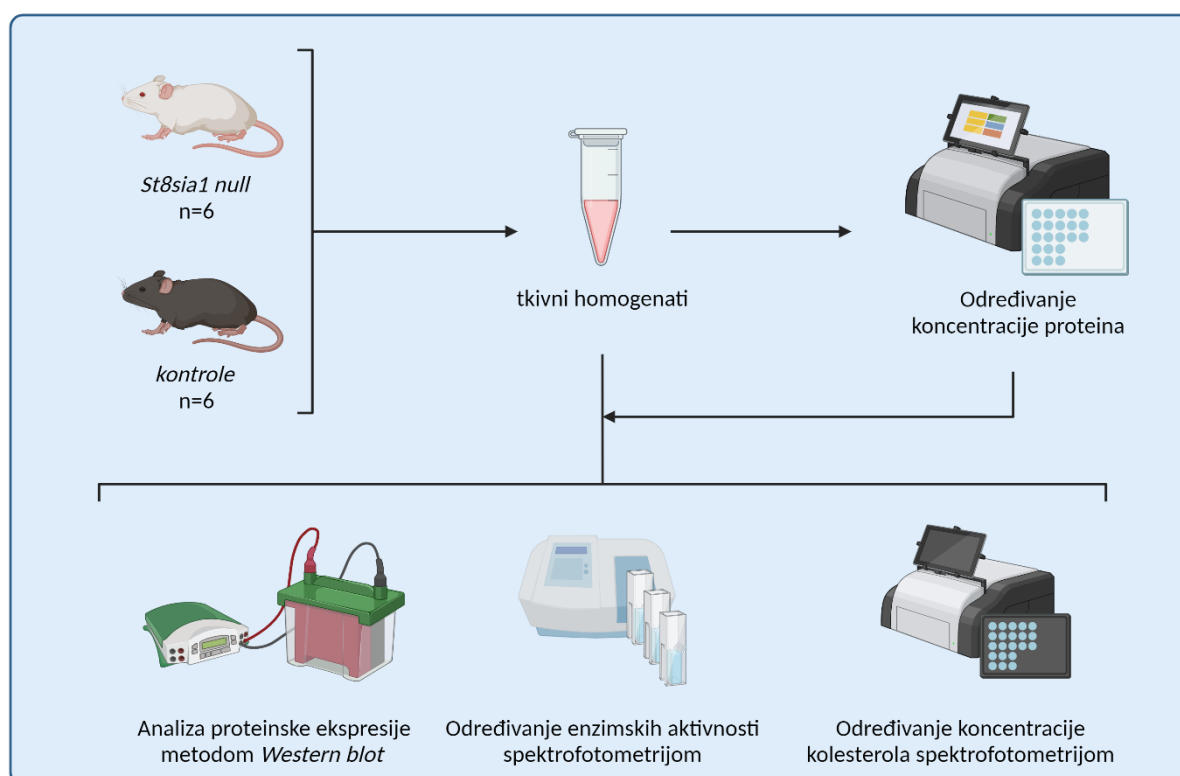
Kemikalija	Proizvođač	Kataloški broj
Adenozin-trifosfat, ATP	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	A9062-1G
Kalijev klorid	Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska	11209 07
Magnezijev klorid	Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska	13017 07
Metanol	Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska	13089 01
Natrijev dodecilsulfat, SDS	GE Healthcare Life Sciences	17-1313-01
Natrijev klorid	T. T. T. Ltd., Novaki, Hrvatska	-
Ouabain oktahidrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	O3125-250MG
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	26617
Trikloroctena kiselina	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Njemačka	8789
Tris(hidroksimetil)aminometan	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	252859-500G
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	P1379-100ML

Tablica 4.2. Predgotovljeni kompleti korišteni u svrhu istraživanja

Komplet	Naziv	Proizvođač	Kataloški broj
Komplet za određivanje koncentracije proteina	Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD	23225
Komplet za određivanje koncentracije kolesterola	Amplex™ Red Cholesterol Assay Kit, Invitrogen™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	A12216
Reducirajuća otopina	NuPage™ Sample Reducing Agent (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	NP0009
Pufer za denaturaciju uzoraka	NuPage™ LDS Sample Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	NP0007
Komplet za vizualizaciju kemiluminiscencije	SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	34095

Tablica 4.3. Protutijela korištena u svrhu istraživanja

Protutijelo	Klasa	Organizam podrijetla	Proizvođač	Kataloški broj	Razrjeđenje
Primarna protutijela					
Anti-Na⁺,K⁺-ATPaza (panNKA)	Monoklonalno, IgG	Kunić	Abcam, Cambridge, UK	ab76020	1: 1 000
Anti-Leptin receptor (Lep-R)	Monoklonalno, IgG	Kunić	Abcam, Cambridge, UK	ab5593	1: 2 000
Sekundarna protutijela					
Anti-kunić protutijelo HRP-konjugirano	Poliklonalno, IgG	Magarac	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, SAD	711-035-152	1: 50 000



Slika 4.1. Shematski prikaz istraživanja. Shema je kreirana na platformi BioRender.com.

4.4. Određivanje koncentracije proteina

U svrhu određivanja koncentracije proteina u uzorcima i analize proteinske ekspresije metodom *Western blot* korišteno je ukupno 12 životinja, od čega je 6 bilo *St8sia1 null* i 6 kontrola. Mase pojedinih uzoraka prikazane su u Tablici 4.4.

Tablica 4.4. Prikaz masa pojedinih uzoraka korištenih u istraživanju

Redni broj uzorka	Masa uzorka (mg)	
	<i>St8sia1 null</i>	Kontrole
1.	17,5	12,9
2.	21,3	16,3
3.	22,8	15,5
4.	18,8	22,4
5.	27,6	26,3
6.	13,3	9,0

Uzorci su nakon vaganja homogenizirani u hladnom Potter-Elvehjem homogenizatoru s teflonskim tučkom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) s vodom (Aqua pro injectione) u omjeru 1:10, na način da je tučak potisnut prema dnu homogenizatora ukupno 15 puta za svaki uzorak.

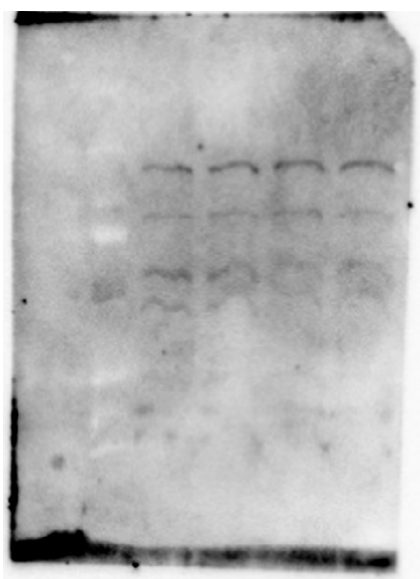
Nastavno na vaganje i homogeniziranje odredili smo ukupnu koncentraciju proteina u pojedinom uzorku koristeći predgotovljeni komplet za određivanje koncentracije proteina Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD) slijedeći upute proizvođača. Izrađena je radna otopina A i B iz kompleta u omjeru 50:1. Potom se u jažicama mikrotitarske pločice pomiješa 25 µL homogenata s 200 µL radne otopine, kao i slijepa proba. Svi uzorci, uz slijepu probu, izrađeni su u duplikatima. Pločica se laganim pokretom po ravnoj površini protrese, kako bi se uzorci i otopine pomiješale, te se inkubira 30 min na 37°C, tijekom čega se razvije ljubičasto obojenje. U uređaju Glomax® Discoverer (Promega, Madison, WI, SAD) očita se apsorbancija pri 560 nm. Iz očitanih vrijednosti, korištenjem Lambert-Beerovog zakona dobili smo konačne vrijednosti koncentracija proteina. Apsorbancije su korištene kao y varijabla, a vrijednosti koncentracije proteina očitane su na osi x. Baždarni pravac izrađen je prethodno korištenjem serijskih razrjeđenja 2 mg/ml goveđeg serumskog albumina (engl., *bovine serum albumin*, BSA) u rasponu od 25 µg/mL do 1 mg/mL. Vrijednosti koncentracija proteina u uzorcima prikazane su u Tablici 4.5.

Tablica 4.5. Prikaz koncentracija proteina odgovarajućih uzoraka dobivenih korištenjem predgotovljenog kompleta Pierce™ BCA Protein Assay Kit

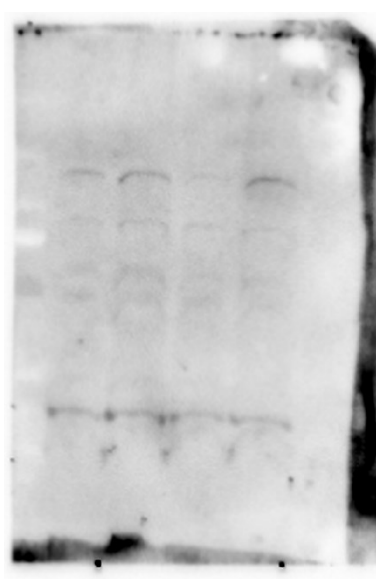
Redni broj uzorka	Koncentracija proteina (mg/ml)	
	<i>St8sia1 null</i>	Kontrole
1.	7,37	6,39
2.	7,90	7,18
3.	8,82	8,17
4.	7,27	7,71
5.	8,06	7,02
6.	10,06	9,46

4.5. Optimizacija razrjeđenja protutijela za leptinski receptor

Prije podvrgavanja uzoraka *Western blot* metodi, bilo je potrebno optimizirati razrjeđenje primarnog protutijela za LepR. U tu svrhu korišteni su uzorci malog mozga miša u razrjeđenjima primarnog protutijela LepR od 1:1000, 1:1500, 1:2000 i 1:2500. Na slikama 4.2 do 4.5 možemo vidjeti da najveće razrjeđenje od 1:2500 ne daje dovoljno signala za proteine od interesa, dok razrjeđenje od 1:1000 uzrokuje prevelik pozadinski šum zbog kojeg je teže razaznati proteine od interesa.



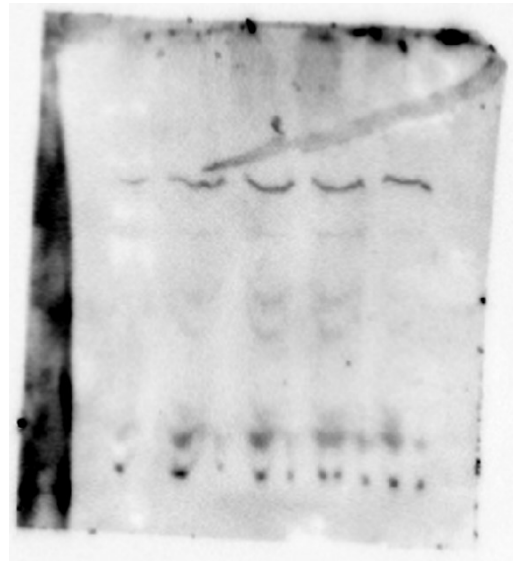
Slika 4.2. Razrjeđenje 1:1000.



Slika 4.3. Razrjeđenje 1:1500.



Slika 4.4. Razrjeđenje 1:2000.



Slika 4.5. Razrjeđenje 1:2500.

S druge strane, promatrajući membranu razrjeđenja od 1:1000 postavlja se pitanje jesu li dodatni bandovi nespecifično vezanje protutijela za različite proteine, ili je pak u pitanju vezanje protutijela za izoforme leptinskog receptora koje nisu toliko zastupljene u uzorku da bi pokazivale konkretan kemiluminiscentni signal, već pokazuju slabe signale zbog svoje niske koncentracije. U uvodu je raspravljeno kako leptinski receptor ima čak 6 izoformi, od kojih su 125 kDa i 100 kDa najzastupljenije i uredno se prikazuju na probnim elektroforezama. Otvorenim se ostavlja pitanje o količini vezanja protutijela na pojedine izoforme i njihovu količinu u određenim regijama mozga, što bi daljnja istraživanja o ovom recepturu učinila mnogo jasnijim.

4.6. Analiza proteinske ekspresije metodom *Western blot*

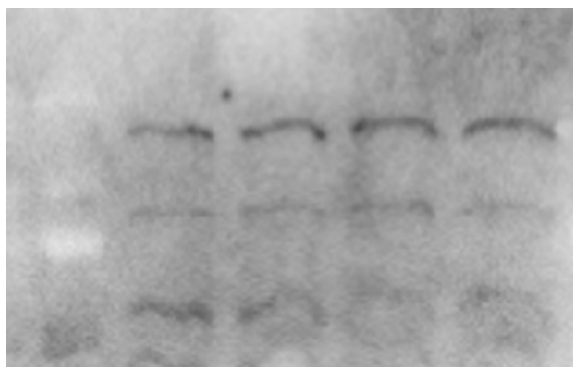
Western blot se provodi kroz sljedeće korake: pripremu uzoraka, gel-elektroforezu, prijenos proteina na membranu (transfer), blokiranje nespecifičnih interakcija, inkubacija s primarnim i sekundarnim protutijelom te detekcija i kvantifikacija signala na konačnoj membrani.

Homogenizirani uzorci pomiješani su s 7,5 μ L otopine predgotovljenog pufera za denaturaciju NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4x) i reducirajuće otopine NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10x) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) koji su pomiješani u omjeru 2:1. Uzorci su pipetirani tako da u svakome bude 15 mg/mL proteina, a nakon miješanja s otopinom pufera inkubiraju se 5 minuta na 95°C. Takvi

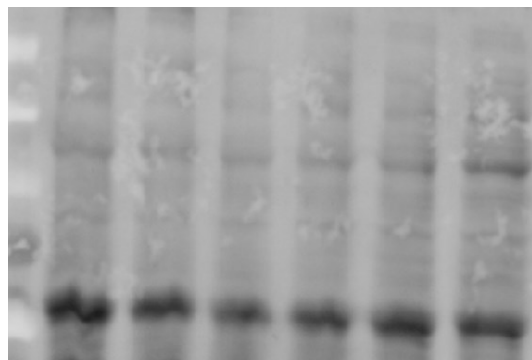
pripremljeni uzorci mogu se odmah koristiti za gel-elektroforezu ili pohraniti na +4°C do sljedećeg dana.

Za razdvajanje proteina koristimo se gel-elektroforezom uz dodatak natrijeva dodecil-sulfata (engl., *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) u kojemu denaturirani proteini postaju negativno nabijeni, čime je moguće odjeljivanje proteina na temelju molekulske mase. Gel-elektroforeza se provodi u kadici Mini Gel Tank, Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) na 80V dok uzorci ne dođu do prve gornje linije na kazeti gela te se nastavlja izvoditi na 120V sve dok uzorci ne dođu do kraja kazete (otprilike 90 minuta). Pufer za gel-elektroforezu sastoji se od 25 mM Trisa, 192 mM glicina i 1% SDS u H₂O. Na predgotovljene gelove od 12 jažica prenosi se 4 µL smjese proteina poznatih veličina PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i 25 µL uzorka. Gel se ispere i fotoaktivira UV svjetlom u uređaju ChemiDoc MP Imaging System (BioRad, Hercules, CA, SAD). Zatim slijedi prijenos proteina na membranu, za koji koristimo membranu načinjenu od poliviniliden-difluorida (engl., *Polyvinylidene difluoride*, PVDF) u sistemu Mini Blot Module, Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Transfer traje 60 minuta pri 30V u puferu sastava 5 mM Trisa, 192 mM glicina i 20% metanola. Membrane se potom izvade i fotografiraju u ChemiDoc uređaju. Slijedi blokiranje u 5% otopini mlijeka u prahu u fosfatnom puferu s dodatkom 0,1% detergenta (PBST) u trajanju od 60 minuta na sobnoj temperaturi. PBST se sastoji od 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0,1% Tween-20. Nakon toga, membrana se inkubira s primarnim protutijelom u odgovarajućem razrjeđenju u otopini za blokiranje na 4°C preko noći. Drugi se dan membrane ispiru 3 puta u PBST-u, dodaje se sekundarno protutijelo koje se inkubira 60 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ponovnog trostrukog ispiranja PBST-om možemo vizualizirati kemiluminiscentni signal u ChemiDoc uređaju pomoću otopine SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD).

Tijekom provođenja metode *Western blot* nije neuobičajeno susresti se s određenim tehničkim poteškoćama. U nastavku su navedeni neki od problema s kojima smo se susreli tijekom ovog istraživanja s odgovarajućim slikama.

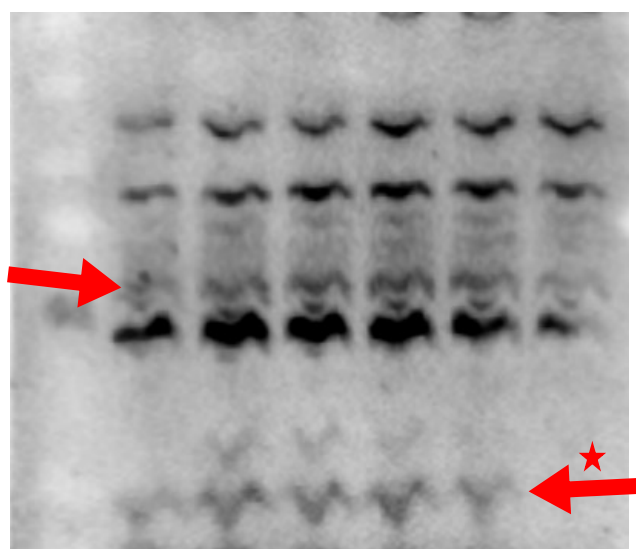


Slika 4.6. Pozadinski šum.



Slika 4.7. Mjehurići.

1. Jak pozadinski šum – često je uzrokovan neprimjerenom koncentracijom protutijela koje se nespecifično veže na proteine ili samu membranu. Ispravlja se povećanjem razrjeđenja, češćim ispiranjem ili kraćim vremenom ekspozicije.
2. Mjehurići – karakteristična greška koja nastaje zarobljivanjem zraka u mjehurićima tijekom transfera. Najveći problem je prilikom kvantifikacije proteina iz pojedinih vrpce jer mjehurići interferiraju s rezultatom tako da kompjuterski program za kvantifikaciju očita nižu vrijednost nego što zaista jest. Mjehuriće se izbjegne pažljivim slaganjem svih komponenti transfera.



Slika 4.8. Strelica prikazuje neočekivane vrpce, strelica sa zvjezdicom prikazuje vijugave vrpce.

3. Neočekivane ili neobične vrpce – opet mogu biti posljedicom neprimjerenog razrjeđenja ili posljedicom proteazne razgradnje. Kako bi se tom problemu

doskočilo, preporuča se pripremanje uzoraka neposredno prije same gel-elektroforeze ili čuvanje uzoraka na ledu. Vrpce koje se nalaze previsoko ili prenisko od očekivanog vjerojatno su se razdvojile tijekom elektroforeze pod previsokim ili preniskim naponom.

4. Neravne ili vijugave vrpce – vijugave vrpce nalazimo često kod kiselih proteina. Općenito neravne vrpce mogu se pojaviti kod previsokog napona, nepravilno pomiješanog pufera ili u pretoplom okolišu u kojem se elektroforeza odvija. Ispraviti se može podešavanjem sastava pufera, snižavanjem napona ili elektroforezom na ledu.

Podaci dobiveni iz ChemiDoc uređaja kvantificiraju se u programu ImageLab 6.0.1. (BioRad, Hercules, CA, SAD) tako da se prenesu fotografije ukupnih proteina na membrani i fotografije kemiluminiscentnog signala proteina od interesa. U padajućem izborniku pod *File* odabere se *Multi Channel Image* u kojemu se stupci i vrpce označe alatima s lijeve strane prozora. U Excel tablicu se izvezu podaci iz *Analysis Table*, iz koje potom možemo odrediti intenzitet kemiluminiscentnog signala proteina od interesa u odnosu na ukupne proteine.

4.7. Određivanje enzimске aktivnosti

Postupak određivanja enzimске aktivnosti provodi se na spektrofotometru Varian Cary 100 bio 8 (SpectraLab Scientific Inc., Markham, ON, Kanada) u programu Simple Reads prema protokolu naše istraživačke skupine (40). Spektrofotometar mjeri aktivnost enzima praćenjem promjena u apsorbanciji reakcijske smjese tijekom vremena, odnosno mjeri količinu anorganskog fosfata (P_i) koji nastaje hidrolitičkim djelovanjem NKA na ATP. U ovom istraživanju određivana je enzimska aktivnost NKA u prethodno izrađenim 10%-tnim vodenim homogenatima uzoraka talamusa 6 miševa *St8sia1 null* i 5 kontrolnih uzoraka.

Za ovu se metodu u 4 epruvete od 50 mL pripreme otopine koje mjere A) bazalnu količinu fosfata, B) ukupnu količinu fosfata i C) količinu fosfata oslobođenu katalitičkim djelovanjem svih ATPaza osim NKA jer je NKA inhibirana ouabainom. U Tablici 4.6. prikazani su volumeni pojedinih kemikalija u otopinama A, B i C.

Tablica 4.6. Sastav otopina za određivanje koncentracija fosfata u uzorcima

	A	B	C
75 mM Tris	8 mL	8 mL	8 mL
30 mM MgCl₂	2 mL	2 mL	2 mL
1000 mM NaCl	2 mL	2 mL	/
200 mM KCl	2 mL	2 mL	/
H₂O	4 mL	2 mL	4 mL
10 mM Ouabain	/	/	2 mL

Otopine se pomiješaju s homogenatima uzoraka u tubicama te se inkubiraju u njihajućoj kupelji od 37°C 10 minuta. Nakon toga se u B i C tubice dodaje otopina 50 µL 30 mM ATP-a kako bi se pokrenula reakcija i ponovno se inkubira u kupelji na 37°C 15 minuta. Nakon toga se tubice vade i reakcija se prekida dodavanjem 500 µL hladne trikloroctene kiseline. Tubice se potom centrifugiraju 10 min, 21290 rpm pri 4°C u centrifugi Hettich Universal 32 R (Andreas Hettich GmbH & Co., Tuttilingen, Njemačka). Iz centrifugiranog sadržaja tubica izdvaja se 500 µL supernatanta koji se pomiješa s kolor reagensom. Tubice pomiješane s reagensom inkubiraju se 45 minuta na sobnoj temperaturi. Konačno, sadržaji tubica ulijevaju se u kivete za spektrofotometar te slijedi očitavanje vrijednosti apsorbancija, na način da se spektrofotometar najprije baždari sa slijepom probom (H₂O + kolor reagens).

Svi su uzorci i slijepe probe izrađivane u duplikatima, s napomenom da se izvodilo maksimalno četiri duplikata istovremeno zbog vremenske osjetljivosti dodavanja otopine ATP-a i hladne trikloroctene kiseline.

Za izračun aktivnosti NKA koristi se baždarni pravac s poznatim koncentracijama fosfata (50-500 µg). Najprije se od vrijednosti reakcija B i C oduzima bazalna količina oslobođenog fosfata (A). Razlika B - C daje aktivnost NKA inhibiranu ouabainom. Dobivene vrijednosti se potom uvrštavaju u jednadžbu pravca kako bi se izračunala količina oslobođenog Pi, a aktivnosti se izražavaju kao µmol oslobođenog Pi po mg proteina po satu (µmol Pi/(mg proteina*h)).

4.8. Određivanje koncentracije kolesterola

Koncentracija kolesterola u staničnim membranama mijenja se s obzirom na njihov sastav. Za određivanje koncentracije kolesterola korišteno je 5 homogeniziranih uzoraka talamusa miša *St8sia1 null* i 4 kontrolnih. Metoda je provedena koristeći predgotovljeni komplet Amplex™ Red Cholesterol Assay Kit, Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Radi se o metodi koja koristi fluorescenciju za osjetljivo određivanje koncentracije kolesterola i čitač mikropločica za fluorescenciju Glomax® Discoverer (Promega, Madison, WI, SAD). Test se temelji na reakciji koja detektira i slobodni kolesterol i estere kolesterola. Kolesterol-estri se hidroliziraju kolesterol-esterazom u kolesterol, koji se zatim oksidira kolesterol-oksidadom dajući H_2O_2 i odgovarajući ketonski proizvod. H_2O_2 se zatim detektira pomoću 10-acetil-3,7-dihidroksifenoksazina (Amplex® Red reagent), visoko osjetljive i stabilne sonde za H_2O_2 . U prisutnosti peroksidaze iz hrena (HRP), Amplex® Red reagent reagira s H_2O_2 u omjeru 1:1 proizvodeći visoko fluorescentni resorufin. Prema uputama proizvođača, najprije se izrade smjesa enzima i reakcijski pufer. Na mikrotitarskim pločicama nanese se 5 μ L slijepe probe i 5 μ L homogenata uzoraka u duplikatima. Zatim slijedi dodavanje 50 μ L smjese enzima i 45 μ L reakcijskog pufera. Pločica se inkubira 30 minuta na 37°C. Konačno, vrijednosti koncentracija kolesterola očitaju se pomoću uređaja Glomax®.

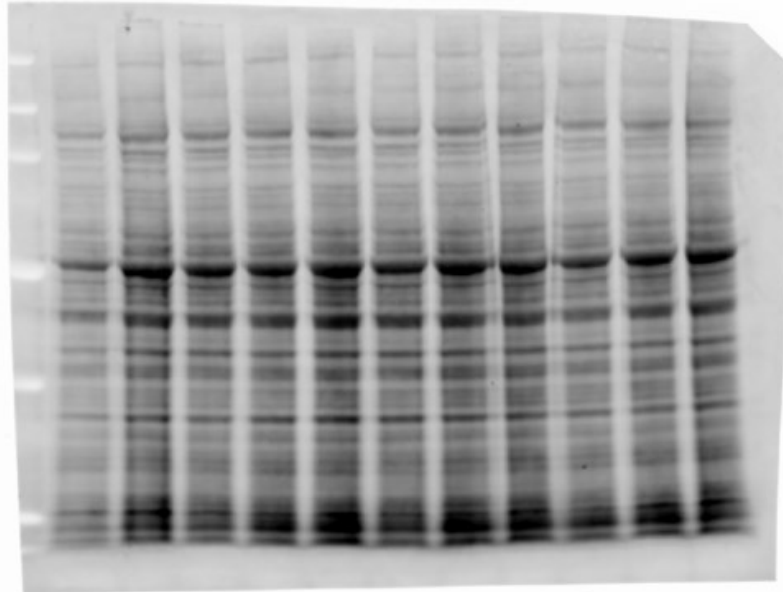
4.9. Statistička analiza

Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilk testom. Podaci su normalno distribuirani te je stoga korišten Studentov t-test. Statistički značajnim smatra se vrijednost $p < 0,05$. Podaci su grafički prikazani uz pomoć programa GraphPad Prism version 10.1.1.

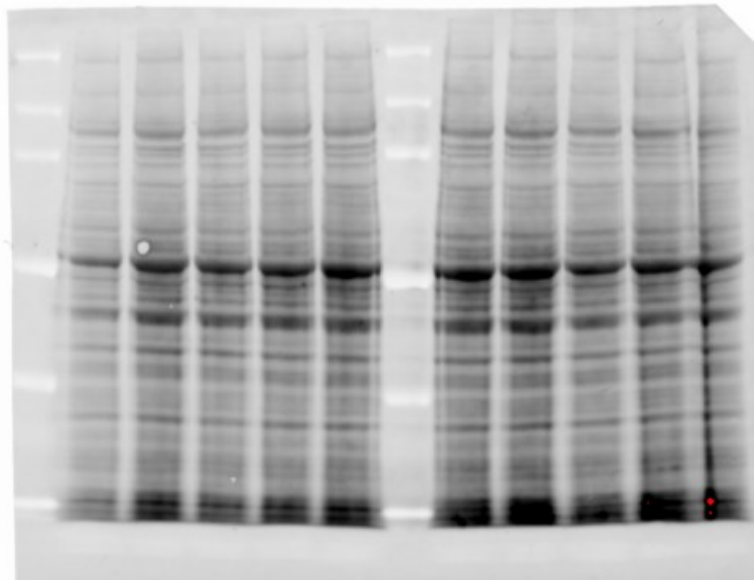
5. Rezultati

5.1. Rezultati analize proteinske ekspresije metodom *Western blot*

Slike 5.1, 5.2 i 5.3 prikazuju membrane PVDF nakon transfera proteina (prijenosa proteina s gela na membranu).

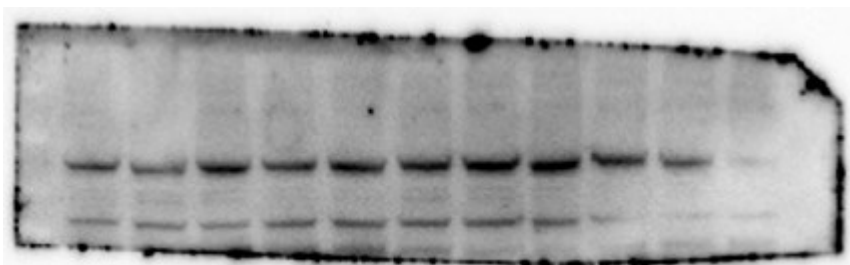


Slika 5.1. Membrana PVDF koja je u sljedećem koraku metode inkubirana s protutijelom za LepR, vizualizirana u BioRad ChemiDoc sustavu.

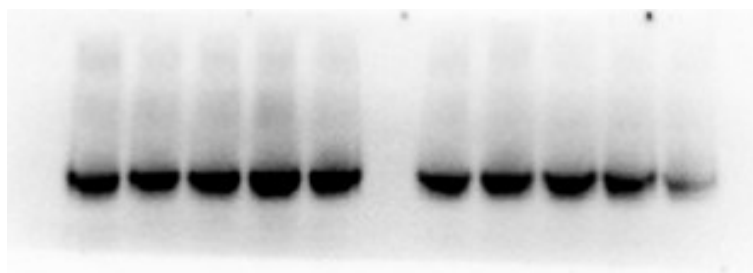


Slika 5.2. Membrana PVDF koja je u sljedećem koraku metode inkubirana s protutijelom za panNKA, vizualizirana u BioRad ChemiDoc sustavu.

BioRad ChemiDoc sustav kompatibilan je ImageLab programu za vizualizaciju i kvantifikaciju signala proteina od interesa. Na slikama 5.4, 5.5 i 5.6. prikazane su membrane nakon inkubacije s odgovarajućim protutijelima (Tablica 4.3). Membrane za LepR inkubirane su s predgotovljenim kompletom za vizualizaciju kemiluminiscencije, SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), dok je membrana za panNKA inkubirana reagensom za detekciju kemiluminiscentnog signala.



Slika 5.3. Membrana s kemiluminiscentnim signalom nakon inkubacije s protutijelom za LepR.

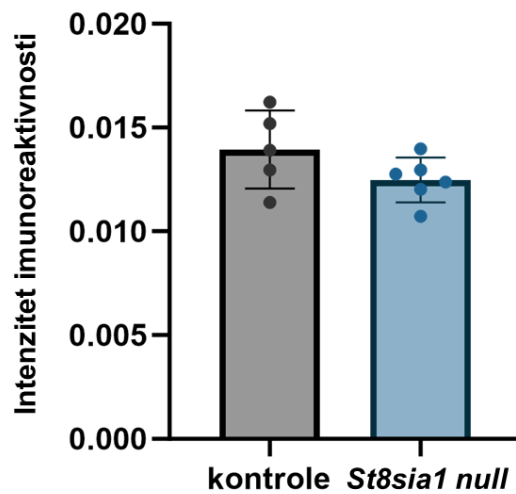


Slika 5.4. Membrana s kemiluminiscentnim signalom nakon inkubacije s protutijelom za panNKA.

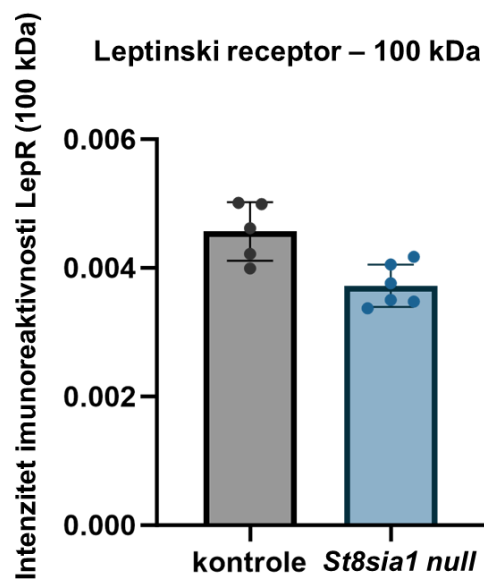
Rezultati analize proteinske ekspresije LepR i NKA metodom *Western blot* prikazani su grafički.

Analizom proteinske ekspresije metodom *Western blot* u tkivima talamusa *St8sia1 null* i kontrolnih miševa utvrđen je intenzitet imunoreaktivnosti ukupnog LepR te pojedinačnih izoforma LepR-a od 100 kDa i 125 kDa. Ukupan sadržaj LepR-a manji je u tkivu talamusa miševa *St8sia1 null* naspram kontrolnih miševa. Također su smanjeni i ukupni sadržaji pojedinih izoformi (100 i 125 kDa) u tkivu talamusa miševa *St8sia1 null* naspram kontrolnih miševa.

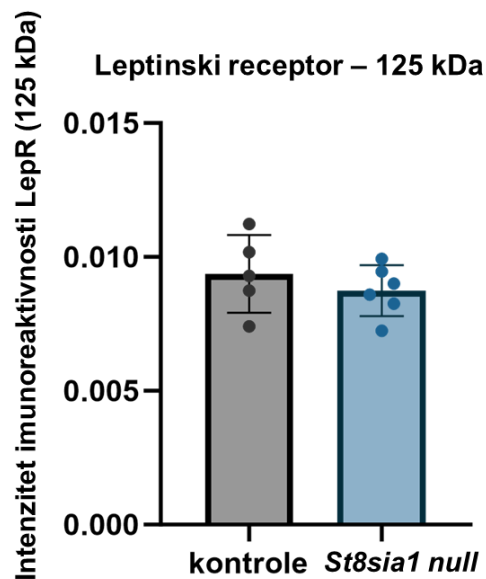
Leptinski receptor – 100 kDa + 125 kDa



Slika 5.5. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti ukupnog LepR u tkivu talamusa kontrolnih i *St8sia1 null* miševa. Traka pogreške prikazuje standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Talamus, Studentov t-test. n=11.

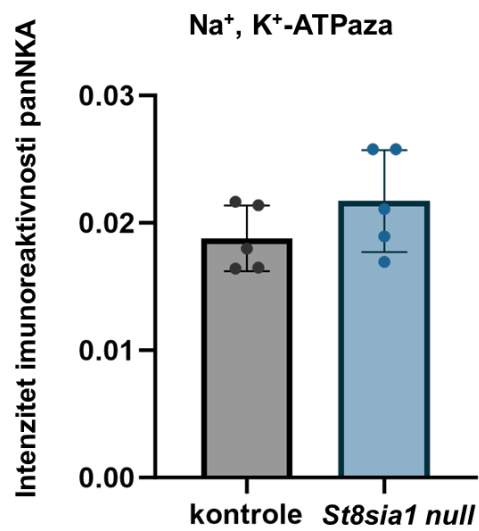


Slika 5.6. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti izoforme 100 kDa LepR-a u tkivu talamusa kontrolnih i *St8sia1 null* miševa. Traka pogreške prikazuje standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Talamus, Studentov t-test. n=11.



Slika 5.7. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti izoforme 125 kDa LepR-a u tkivu talamusa kontrolnih i *St8sia1 null* miševa. Traka pogreške prikazuje standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Talamus, Studentov t-test. n=11.

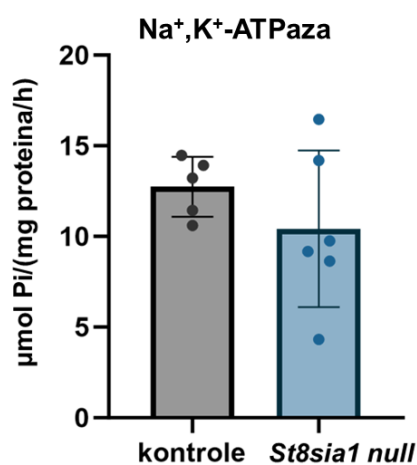
Analizom proteinske ekspresije metodom *Western blota* u tkivima talamusa *St8sia1 null* i kontrolnih miševa utvrđen je intenzitet imunoreaktivnosti svih podjedinica NKA. U tu svrhu koristili smo protutijelo panNKA, koje prepoznaje $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ podjedinice NKA. Intenzitet imunoreaktivnosti veći je u talamusima *St8sia1 null* miševa naspram kontrola (Slika 5.9). Ukupni sadržaj NKA veći je u tkivu talamusa miševa *St8sia1 null* naspram kontrolnih miševa.



Slika 5.8. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti NKA u tkivu talamusa kontrolnih i *St8sia1 null* miševa. Traka pogreške prikazuje standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Talamus, Studentov t-test. n=10.

5.2. Određivanje enzimске aktivnosti Na⁺,K⁺-ATPaze

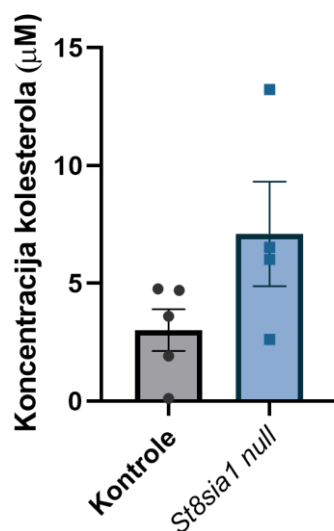
Po prvi puta smo istraživali enzimsku aktivnost NKA u talamusima miševa promijenjenog sastava gangliozida u usporedbi s kontrolnim miševima. Za određivanje enzimске aktivnosti koristili smo se spektrofotometrijskom metodom te je u homogenatima talamusa mišev *St8sia1 null* ustanovljena niža aktivnost NKA u usporedbi s kontrolnim miševima.



Slika 5.9. Grafički prikaz enzimске aktivnosti NKA u tkivu talamusa kontrolnih i *St8sia1 null* miševa. Traka pogreške prikazuje standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Talamus, Studentov t-test. n=11.

5.3. Određivanje koncentracije kolesterola

Na slici 5.12 grafički je prikazana razlika u koncentracijama kolesterola između *St8sia1 null* i kontrolnih miševa. Ustanovljeno je da je koncentracija kolesterola u uzorcima homogenata talamusa miševa s poremećenom sintezom gangliozidom značajno veća od kontrola.



Slika 5.12. Grafički prikaz koncentracije kolesterola u tkivu talamusa kontrolnih i *St8sia1 null* miševa. Traka pogreške prikazuje standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Talamus, Studentov t-test. n=8.

6. Rasprava

Cilj ovog istraživanja bio je rasvijetliti utjecaj promijenjenog sastava gangliozida na druge sastojke stanične membrane neurona u talamusu: membranski prijenosnik iona NKA te leptinski receptor LepR. To smo učinili koristeći se metodom *Western blot* za analizu proteinske ekspresije te spektrofotometrijskom metodom za određivanje enzimske aktivnosti NKA i koncentracije kolesterola u homogenatima mišjeg talamusa.

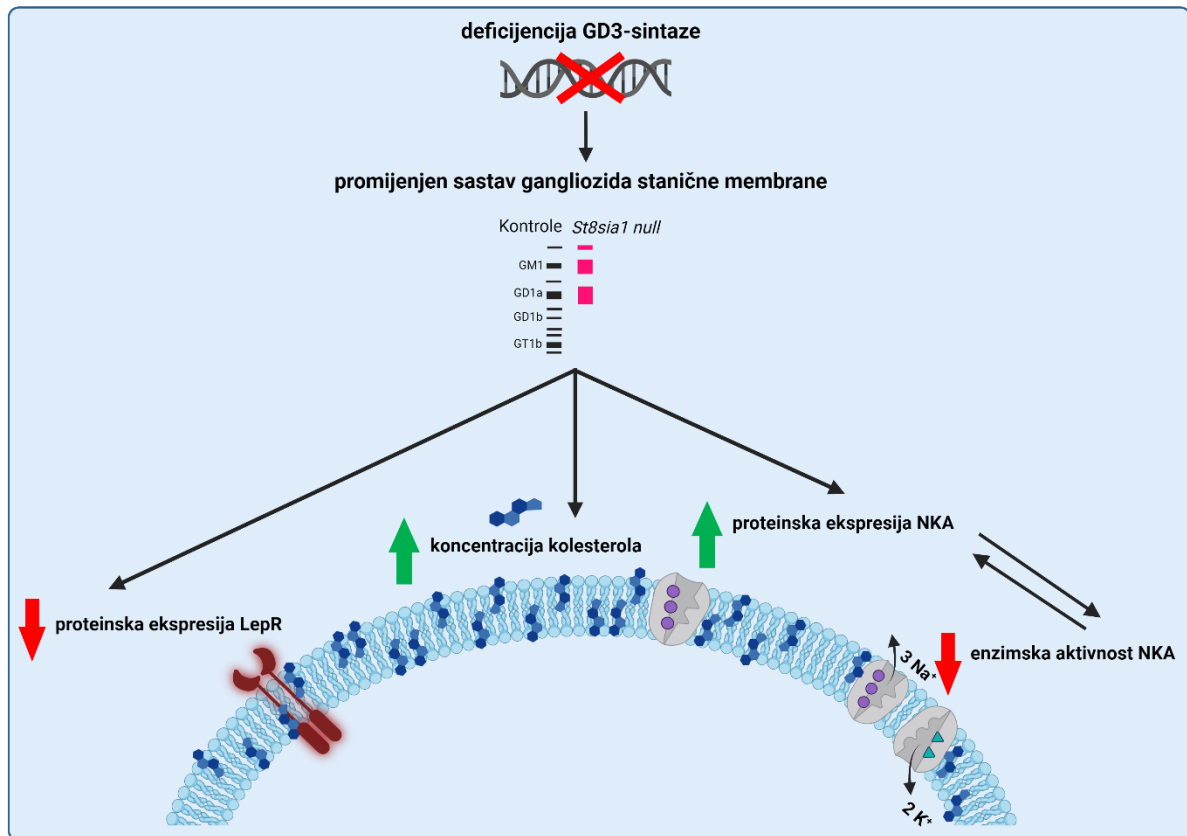
Po prvi smo puta u kontekstu promijenjenog sastava gangliozida združeno istražili NKA te LepR u talamusu mišjeg mozga. Koristeći se mišjim modelom *St8sia1 null*, kojemu nedostaje enzim GD3-sintaza, ustanovili smo kako se prekomjerno stvaranje a-serije i nedostatak b- i c-serije gangliozida odražava na proteinsku ekspresiju NKA i LepR te enzimsku aktivnost NKA. Naša je istraživačka grupa istražila proteinsku ekspresiju i enzimsku aktivnost NKA i u drugim regijama mozga: moždanoj kori, malome mozgu i hipokampusu (52). Ustanovljeno je da dolazi do pada enzimske aktivnosti NKA u moždanoj kori i malome mozgu miševa *St8sia1 null* uslijed ukupnih biokemijskih promjena uzrokovanim promijenjenim gangliozidnim sastavom membrane.

U ovom istraživanju po prvi je puta učinjena zbirna analiza proteinskog sadržaja NKA i LepR u tkivu talamusa miševa s poremećenom sintezom gangliozida. Hipoteza istraživanja glasila je da povećana količina gangliozida a-serije i nedostatak gangliozida b- i c-serije u talamusu miševa *St8sia1 null* uzrokuje smanjenje proteinske ekspresije NKA i LepR. Hipoteza je potvrđena u slučaju LepR jer je pomoću protutijela specifičnog za njegove dvije izoforme (100 i 125 kDa) dokazano da je u talamusu miša promijenjenog sastava gangliozida njihova koncentracija snižena, iako nije statistički značajna. Druga istraživanja (26) upućuju na to da je ovakav rezultat posljedica promijenjenog metabolizma gangliozida i njihove uloge u specifičnim signalnim putevima. Gangliozidi imaju ključnu ulogu u modulaciji signalnih putova ERK i STAT3 koji aktiviraju LepR te je moguće da će poremećen gangliozidni sastav stanične membrane na taj način imati utjecaj na ekspresiju i regulaciju LepR-a. Od velike je važnosti i napomenuti način uzorkovanja tkiva za ovo istraživanje. Zbog male mase mišjeg mozga može biti izazovno odvojiti talamus od priležećih struktura, ponajprije misleći na hipotalamus. Hipotalamus je svojom funkcijom, pa tako i strukturom

značajno različiti od talamusa, te se stoga dovodi u pitanje treba li prilikom interpretacije rezultata uzeti u obzir sastav gangliozida u drugim regijama diencefalona. Unatoč tome, dosadašnja istraživanja (53) tvrde da je aktivacija LepR-a povećana u hipotalamusu *St8sia1 null* miševa u usporedbi s kontrolama, odražavajući povećanu leptinsku signalizaciju zbog većeg sadržaja gangliozida a-serije. U slučaju NKA, hipoteza je opovrgnuta, jer je analizom proteinske ekspresije metodom *Western blot* utvrđena veća koncentracija transmembranskog ionskog prijenosnika NKA u stanicama miševa s poremećenom sintezom gangliozida. Poznato je da se mikrolokalizacija NKA mijenja unutar membrane ovisno o njenom gangliozidnom profilu (40). Posljedično se mijenja i njena aktivnost što je slučaj i u našem istraživanju gdje je utvrđena smanjena enzimska aktivnost NKA u *St8sia1 null* miševa naspram njihovih kontrola. Dakle, utvrdili smo povećanu proteinsku ekspresiju, ali smanjenu enzimsku aktivnost NKA. Povećana proteinska ekspresija NKA može se objasniti i kompenzatornim mehanizmom kako bi se ponovno uspostavila homeostaza iona u stanici, koja je poremećena zbog smanjene aktivnosti NKA.

Po prvi smo puta u kontekstu promijenjenog sastava gangliozida istražili koncentraciju kolesterola u talamusima *St8sia1 null* i kontrolnih miševa. Ustanovili smo da je u miševa s promijenjenim sastavom gangliozida veća koncentracija kolesterola naspram kontrolnih miševa, čime smo potvrdili našu hipotezu. Poznato je da se kolesterol u LR ponaša kao svojevrsno ljepilo koje drži komponente LR zajedno, tako da se interkalira između pojedinih sfingolipida (12). Poremećena koncentracija kolesterola u *St8sia1 null* miševa svakako je zanimljiv rezultat i postavlja se pitanje utječe li promijenjena koncentracija kolesterola u ovom mišjem modelu na istražene membranske proteine, ili poremećaji u ekspresiji i lokalizaciji specifičnih membranskih proteina na neki način utječu na metabolizam kolesterola. Nadalje, istraživanja pokazuju da kolesterol može imati direktan utjecaj ne samo na enzimsku aktivnost već i na ekspresiju NKA (54),(55). Specifično, smanjena koncentracija kolesterola u membrani dovodi i do smanjene ekspresije podjedinice $\alpha 1$ NKA (54) te do smanjene aktivnosti NKA (55). Ovo istraživanje pokazalo je da naš mišji model ima povećanu koncentraciju kolesterola i povećanu ekspresiju NKA (u skladu sa spomenutim istraživanjima), međutim enzimska aktivnost je smanjena, što ukazuje na moguće dodatne mehanizme fine regulacije aktivnosti NKA unutar membrane, te govori u prilog tome da promijenjen sastav gangliozida membrane potencijalno ima veći utjecaj na

aktivnost NKA nego promijenjen sadržaj kolesterola. Shematski prikaz rezultata ovog istraživanja u skladu s komentiranim sažeto je prikazan na Slici 6.1.



Slika 6.1. Shematski prikaz posljedica nedostatka GD3-sintaze na koncentraciju kolesterola, proteinsku ekspresiju leptinskog receptora (LepR) te proteinsku ekspresiju i enzimsku aktivnost Na^+, K^+ -ATPaze (NKA) u talamusu miša. Promjene (i njihov smjer) utvrđene ovim istraživanjem prikazane su blok-strelicama u crvenoj (smanjenje) odnosno zelenoj boji (povećanje). LepR = leptinski receptor; NKA = Na^+, K^+ -ATPaza. Shema je kreirana na platformi BioRender.com.

Ovo istraživanje ističe važnost gangliozidnog profila stanične membrane u regulaciji ključnog membranskog prijenosnika iona, NKA, te leptinskog receptora u mozgu, ukazujući na potrebu daljnjeg istraživanja kako bi se potpuno razumjeli mehanizmi interakcije između gangliozida i ovih proteina. Naši rezultati imaju potencijalne implikacije za razvoj terapijskih strategija koje ciljaju na modifikaciju gangliozidskog sastava stanične membrane talamusa u liječenju neurodegenerativnih i neuroloških bolesti.

7. Sažetak

Utjecaj membranskih gangliozida na leptinski receptor i Na⁺,K⁺-ATPazu u talamusu miša

Vinka Potočki

Gangliozidi, složeni membranski glikosfingolipidi, sudjeluju u međustaničnim i unutarstaničnim interakcijama te imaju ključnu ulogu u patogenezi raznih neuroloških i neurodegenerativnih bolesti. Membranski protein, leptinski receptor (LepR), modulira ponašanje u hranjenju tako da utječe na signalizaciju i integraciju u mnogim područjima središnjeg živčanog sustava. Studije pokazuju da gangliozidi a-serije mijenjaju aktivnost leptina interakcijom s LepR-om. Promjena sadržaja gangliozida također može utjecati na regulaciju funkcije Na⁺,K⁺-ATPaze (NKA), dok leptinski putevi mogu inhibirati NKA. Naš je cilj bio rasvijetliti kako izmijenjeni sastav gangliozida u staničnoj membrani utječe na ekspresiju LepR-a, ekspresiju i aktivnost NKA te koncentraciju kolesterola u mišjem talamusu. Koristili smo *St8sia1 null* model miša, kojemu nedostaje GD3-sintaza i stoga ne sintetizira b- i c-seriju gangliozida, već umjesto toga sintetizira više a-serije gangliozida u usporedbi s divljim tipom (WT) miševa. Ispitane su obje izoforme, 125 kDa i 100 kDa LepR-a. Analizirali smo proteinsku ekspresiju metodom *Western blot* za LepR i NKA u uzorcima talamusa. Osim toga, mjerili smo enzimsku aktivnost NKA kod *St8sia1 null* u usporedbi s WT miševima te izmjerili koncentraciju kolesterola u talamusu istih životinja s obzirom da je poznato da gangliozidni sastav utječe na metabolizam kolesterola, a kolesterol utječe na enzimsku aktivnost NKA. Rezultati su pokazali veće količine NKA i manje količine obje izoforme LepR-a u uzorcima talamusa kod *St8sia1 null* miševa u usporedbi s WT miševima. Enzimska aktivnost NKA bila je manja u uzorcima talamusa *St8sia1 null* miševa u usporedbi s WT miševima, dok je koncentracija kolesterola bila veća. Stoga zaključujemo da izmijenjen sastav gangliozida utječe na obilježja NKA i LepR-a, praćeno manjom enzimskom aktivnošću NKA u mišjem talamusu, sugerirajući značajnu povezanost između leptinskog receptora i NKA u raznolikom glikolipidnom okruženju.

Ključne riječi: gangliozidi, GD3-sintaza, leptinski receptor, Na⁺,K⁺-ATPaza

8. Abstract

The effect of membrane gangliosides on leptin receptor and Na⁺,K⁺-ATPase in mouse thalamus

Vinka Potočki

Gangliosides, complex membrane glycosphingolipids, engage in a variety of inter- and intracellular interactions and play a crucial role in the pathogenesis of various neurological and neurodegenerative diseases. Another membrane constituent, leptin receptor (LepR), modulates feeding behavior by influencing signaling and integration in many regions of the central nervous system. Studies show that a-series gangliosides alter leptin activity by interacting with LepR. The redistribution of gangliosides can also influence the regulation of the Na⁺,K⁺-ATPase (NKA) function, whereas leptin pathways can inhibit NKA. Our aim was to deepen the understanding of how altered ganglioside profile impacts the expression of LepR, the expression and activity of NKA, as well as cholesterol concentration in mouse thalamus. We used the *St8sia1 null* mouse model, which lacks GD3 synthase and consequently does not synthesize b-series gangliosides, but instead synthesizes more a-series gangliosides compared to wild-type (WT) mice. Both isoforms, 125 kDa and 100 kDa of LepR, were explored. We used protein expression analysis by Western blotting for LepR and NKA in thalamus samples. In addition, the enzyme activity of NKA was measured in *null* compared to WT mice, as well as cholesterol concentration, since according to literature ganglioside composition affects cholesterol metabolism, and cholesterol affects NKA activity. Results revealed higher amounts of NKA and lower amounts of both LepR isoforms in thalamus samples of the *null* mice compared to their WT. Enzyme activity of NKA was lower in thalamus samples of *null* mice compared to their WT, however cholesterol concentration was higher. Therefore, altered ganglioside composition differentially affects NKA and LepR abundance, accompanied by lower NKA enzyme activity in the mouse thalamus, suggesting a noteworthy connection between leptin receptor and NKA ion transporter in a diverse glycolipid milieu.

Keywords: gangliosides, GD3 synthase, leptin receptor, Na⁺,K⁺-ATPase

9. Literatura

1. Yu RK, Tsai Y-T, Ariga T, Yanagisawa M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides-An overview.
2. Klenk E. Über die Ganglioside, eine neue Gruppe von zuckerhaltigen Gehirnlipoiden. Hoppe Seylers Z Physiol Chem [Internet]. 1942 Jan 1 [cited 2024 Apr 23];273(1–2):76–86. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/bchm2.1942.273.1-2.76/html>
3. Sandhoff K, Andreae U, Jatzkewitz H. Deficient hexosaminidase activity in an exceptional case of Tay-Sachs disease with additional storage of kidney globoside in visceral organs. Life Sci. 1968 Mar 15;7(6):283–8.
4. Svennerholm L. CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF HUMAN BRAIN GANGLIOSIDES*. J Neurochem [Internet]. 1963 Sep 1 [cited 2024 Apr 23];10(9):613–23. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1471-4159.1963.tb08933.x>
5. Yu RK, Nakatani Y, Yanagisawa M. The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain. J Lipid Res [Internet]. 2009 Apr [cited 2024 Apr 23];50(Suppl):S440. Available from: [/pmc/articles/PMC2674698/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19111111/)
6. Yamaji T, Hanada K. Sphingolipid Metabolism and Interorganellar Transport: Localization of Sphingolipid Enzymes and Lipid Transfer Proteins. Traffic. 2015 Feb 1;16(2):101–22.
7. Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Sialic acids in the brain: Gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. Physiol Rev. 2014;94(2):461–518.
8. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. Nature [Internet]. 1997 Jun 5 [cited 2024 Apr 28];387(6633):569–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9177342/>
9. Levental I, Levental KR, Heberle FA. Lipid Rafts: Controversies Resolved, Mysteries Remain. Trends Cell Biol [Internet]. 2020;30(5):341–53. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.01.009>

10. Rajendran L, Simons K. Lipid rafts and membrane dynamics. Rajendran, L; Simons, K (2005) Lipid rafts Membr Dyn J Cell Sci 118(Pt 6)1099-1102 [Internet]. 2005 Mar 15 [cited 2024 Apr 28];118(Pt 6):1099–102. Available from: <https://www.zora.uzh.ch/id/eprint/49541/>
11. Mlinac K, Fon Tacer K, Heffer M, Rozman D, Kalanj Bogнар S. Cholesterogenic genes expression in brain and liver of ganglioside- deficient mice. Mol Cell Biochem. 2012 Oct;369(1–2):127–33.
12. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2000 [cited 2024 Apr 28];1(1):31–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11413487/>
13. Rajendran L, Masilamani M, Solomon S, Tikkanen R, Stuermer CAO, Plattner H, et al. Asymmetric localization of flotillins/reggies in preassembled platformsconfers inherent polarity to hematopoietic cells. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2003 Jul 7 [cited 2024 Apr 28];100(14):8241. Available from: </pmc/articles/PMC166213/>
14. Kurzchalia T V., Parton RG. Membrane microdomains and caveolae. Curr Opin Cell Biol [Internet]. 1999 [cited 2024 Apr 28];11(4):424–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10449327/>
15. Gómez-Moutón C, Lacalle RA, Mira E, Jiménez-Baranda S, Barber DF, Carrera AC, et al. Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. J Cell Biol [Internet]. 2004 Mar 3 [cited 2024 Apr 28];164(5):759. Available from: </pmc/articles/PMC2172162/>
16. Sánchez-Madrid F, Serrador JM. Bringing up the rear: defining the roles of the uropod. Nat Rev Mol Cell Biol 2009 105 [Internet]. 2009 Apr 17 [cited 2024 Apr 28];10(5):353–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm2680>
17. Vajn K, Viljetić B, Degmečić IV, Schnaar RL, Heffer M. Differential Distribution of Major Brain Gangliosides in the Adult Mouse Central Nervous System. PLoS One. 2013 Sep 30;8(9).
18. Kračun I, Rösner H, Čosović C, Stavljenić A. Topographical atlas of the gangliosides of the adult human brain. J Neurochem [Internet]. 1984 [cited

- 2024 Jun 16];43(4):979–89. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6470716/>
19. Sipione S, Monyror J, Galleguillos D, Steinberg N, Kadam V. Gangliosides in the Brain: Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Applications. Vol. 14, *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2020.
 20. Trinchera M, Parini R, Indellicato R, Domenighini R, dall'Olio F. Diseases of ganglioside biosynthesis: An expanding group of congenital disorders of glycosylation. *Mol Genet Metab*. 2018 Aug 1;124(4):230–7.
 21. Ilić K. Povezanost sastava gangliozida i izražaja neuroplastina s neurodegenerativnim promjenama [disertacija]. Zagreb Sveučilište u Zagreb Med Fak. 2018;
 22. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* [Internet]. 1994 Dec 1 [cited 2024 Apr 28];372(6505):425–32. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7984236/>
 23. Picó C, Palou M, Pomar CA, Rodríguez AM, Palou A. Leptin as a key regulator of the adipose organ. *Rev Endocr Metab Disord* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2024 Apr 29];23(1):13. Available from: [/pmc/articles/PMC8873071/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38873071/)
 24. Tartaglia, LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor, OB-R. *Cell*. 1995;83:1263–71.
 25. McGregor G, Harvey J. Regulation of hippocampal synaptic function by the metabolic hormone, Leptin: Implications for health and neurodegenerative disease. *Front Cell Neurosci*. 2018 Oct 16;12:413613.
 26. Inamori KI, Inokuchi JI. Roles of gangliosides in hypothalamic control of energy balance: New insights. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–17.
 27. Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, Dixon RM, Kushner R, Hunt T, et al. Recombinant Leptin for Weight Loss in Obese and Lean Adults: A Randomized, Controlled, Dose-Escalation Trial. *JAMA* [Internet]. 1999 Oct 27

- [cited 2024 Apr 29];282(16):1568–75. Available from:
<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/192037>
28. Bjørnbæk C, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Oct 15 [cited 2024 May 4];274(42):30059–65. Available from:
<http://www.jbc.org/article/S0021925819518658/fulltext>
 29. Patterson CM, Villanueva EC, Greenwald-Yarnell M, Rajala M, Gonzalez IE, Saini N, et al. Leptin action via LepR-b Tyr1077 contributes to the control of energy balance and female reproduction. *Mol Metab* [Internet]. 2012 Dec [cited 2024 May 4];1(1–2):61–9. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24024119/>
 30. Friedman J. The long road to leptin. *J Clin Invest*. 2016 Dec 1;126(12):4727–34.
 31. Milaneschi Y, Lamers F, Bot M, Drent ML, Penninx BWJH. Leptin Dysregulation Is Specifically Associated With Major Depression With Atypical Features: Evidence for a Mechanism Connecting Obesity and Depression. *Biol Psychiatry*. 2017 May 1;81(9):807–14.
 32. Ozsoy S, Besirli A, Unal D, Abdulrezzak U, Orhan O. The association between depression, weight loss and leptin/ghrelin levels in male patients with head and neck cancer undergoing radiotherapy. *Gen Hosp Psychiatry*. 2015 Jan 1;37(1):31–5.
 33. Lieb W, Beiser AS, Vasan RS, Tan ZS, Au R, Harris TB, et al. Association of plasma leptin levels with incident Alzheimer disease and MRI measures of brain aging. *JAMA* [Internet]. 2009 Dec 16 [cited 2024 May 4];302(23):2565–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20009056/>
 34. Davis C, Mudd J, Hawkins M. Neuroprotective effects of leptin in the context of obesity and metabolic disorders. *Neurobiol Dis*. 2014 Dec 1;72(Part A):61–71.
 35. Kurita H, Xu KY, Maejima Y, Nakata M, Dezaki K, Santoso P, et al. Arcuate Na⁺,K⁺-ATPase senses systemic energy states and regulates feeding behavior through glucose-inhibited neurons. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*

- [Internet]. 2015 Aug 18 [cited 2024 Jun 26];309(4):E320–33. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.00446.2014>
36. Hodeify R, Kreydiyyeh S, Leen ·, Zaid MJ, Khaimah A. Identified and potential internalization signals involved in trafficking and regulation of Na⁺ /K⁺ ATPase activity. [cited 2024 Jun 26];1:3. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11010-023-04831-y>
 37. Baver SB, Hope K, Guyot S, Bjørbaek C, Kaczorowski C, O’Connell KMS. Leptin modulates the intrinsic excitability of AgRP/NPY neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jun 26];34(16):5486–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24741039/>
 38. Skou JC, Esmann M. The Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr*. 1992;24(3):249–61.
 39. Diaz M, Martín-Vasallo P, Obsil T, Catherine Liu L, Poulsen H, Clausen M V, et al. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Front Physiol* [Internet]. 2017 [cited 2024 May 4];8:371. Available from: www.frontiersin.org
 40. Puljko B, Stojanović M, Ilic K, Maček Hrvat N, Zovko A, Damjanović V, et al. Redistribution of gangliosides accompanies thermally induced Na⁺, K⁺-ATPase activity alternation and submembrane localisation in mouse brain. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2021 Jan 1;1863(1):183475.
 41. Vyas KA, Patel H V., Vyas AA, Schnaar RL. Segregation of gangliosides GM1 and GD3 on cell membranes, isolated membrane rafts, and defined supported lipid monolayers. *Biol Chem* [Internet]. 2001 [cited 2024 May 5];382(2):241–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11308022/>
 42. Puljko B, Stojanovi M, Ilic K, Kalanj-Bognar S, Mlinac-Jerkovic K. Start Me Up: How Can Surrounding Gangliosides Affect Sodium-Potassium ATPase Activity and Steer towards Pathological Ion Imbalance in Neurons? 2022 [cited 2024 May 5]; Available from: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
 43. Nagata Y, Ando M, Iwata M, Hara A, Taketomi T. Effect of Exogenous

- Gangliosides on Amino Acid Uptake and Na⁺,K⁺-ATPase Activity in Superior Cervical and Nodose Ganglia of Rats. *J Neurochem* [Internet]. 1987 Jul 1 [cited 2024 May 5];49(1):201–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1471-4159.1987.tb03415.x>
44. Azizan EAB, Poulsen H, Tuluc P, Zhou J, Clausen M V., Lieb A, et al. Somatic mutations in ATP1A1 and CACNA1D underlie a common subtype of adrenal hypertension. *Nat Genet* [Internet]. 2013 Sep [cited 2024 May 5];45(9):1055–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23913004/>
 45. Choi M, Scholl UI, Yue P, Björklund P, Zhao B, Nelson-Williams C, et al. K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* [Internet]. 2011 Feb 11 [cited 2024 May 5];331(6018):768–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21311022/>
 46. Rossini GP, Bigiani A. Palytoxin action on the Na(+),K(+)-ATPase and the disruption of ion equilibria in biological systems. *Toxicon* [Internet]. 2011 Mar 1 [cited 2024 May 5];57(3):429–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20932855/>
 47. De Fusco M, Marconi R, Silvestri L, Atorino L, Rampoldi L, Morgante L, et al. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na⁺/K⁺ pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat Genet* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2024 May 5];33(2):192–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12539047/>
 48. Pelzer N, Blom DE, Stam AH, Vijfhuizen LS, Hageman ATM, Van Vliet JA, et al. Recurrent coma and fever in familial hemiplegic migraine type 2. A prospective 15-year follow-up of a large family with a novel ATP1A2 mutation. *Cephalalgia* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2024 May 5];37(8):737–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27226003/>
 49. Wang Y, Zhao Y, Pan H, Zeng Q, Zhou X, Xiang Y, et al. Genetic analysis of dystonia-related genes in Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2023 [cited 2024 May 5];15. Available from: [/pmc/articles/PMC10250656/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4010250656/)
 50. Heinzen EL, Arzimanoglou A, Brashear A, Clapcote SJ, Gurrieri F, Goldstein

- DB, et al. Distinct neurological disorders with ATP1A3 mutations. *Lancet Neurol* [Internet]. 2014 [cited 2024 May 5];13(5):503–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24739246/>
51. Demos MK, Van Karnebeek CDM, Ross CJD, Adam S, Shen Y, Zhan SH, et al. A novel recurrent mutation in ATP1A3 causes CAPOS syndrome. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2014 Jan 28 [cited 2024 May 5];9(1):1–9. Available from: <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1172-9-15>
52. Puljko B. Utjecaj sastava gangliozida na ekspresiju, submembransku lokalizaciju i aktivnost Na⁺, K⁺-ATPaze i Ca²⁺-ATPaze stanične membrane u mozgu miša [disertacija]. Zagreb Sveučilište u Zagreb Med Fak. 2023;
53. Ji S, Tokizane K, Ohkawa Y, Ohmi Y, Banno R, Okajima T, et al. Increased a-series gangliosides positively regulate leptin/Ob receptor-mediated signals in hypothalamus of GD3 synthase-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2016 Oct 21 [cited 2024 Jun 16];479(3):453–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27644882/>
54. Zhang J, Li X, Yu H, Larre I, Dube PR, Kennedy DJ, et al. Regulation of Na/K-ATPase expression by cholesterol: isoform specificity and the molecular mechanism. *Am J Physiol - Cell Physiol* [Internet]. 2020 Dec 12 [cited 2024 Jun 25];319(6):C1107. Available from: </pmc/articles/PMC7792677/>
55. Garcia A, Lev B, Hossain KR, Gorman A, Diaz D, Pham THN, et al. Cholesterol depletion inhibits Na⁺,K⁺-ATPase activity in a near-native membrane environment. *J Biol Chem*. 2019 Apr 12;294(15):5956–69.

10. Životopis

Vinka Potočki rođena je 29. kolovoza 1996. u Zagrebu. Pohađala je Osnovnu školu Oroslavje i Srednju školu Oroslavje, opći smjer gdje je i maturirala. Nakon tri godine studija na Veterinarskom fakultetu, upisuje Medicinski fakultet u Zagrebu 2018. godine. Tijekom studija sudjeluje u brojnim aktivnostima, a koje započinju kandidaturom za Studentski zbor Medicinskog fakulteta na drugoj godini studija. Od tada se uključuje u brojne funkcije, od čega su za izdvojiti studentsko pravobraniteljstvo na sastavnici u ak. god. 2020./21.; predstavništvo u Studentskom zboru Sveučilišta u Zagrebu, predsjedništvo Studentskog zbora Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i članstvo u Dekanskom kolegiju u ak. god. 2021./22. Bila je članica Fakultetskog vijeća, Povjerenstva za nastavu, Povjerenstva za rodnu ravnopravnost i Povjerenstva za žalbe. Sudjelovala je u brojnim organizacijskim aktivnostima od kojih su najvažniji Croatian Student Summit (CROSS), Hrvatski studentski simpozij o bioetici (HSSB), Simpozij Prehrana i Zdravlje, Simpozij o sindromu policističnih jajnika i endometriozi, Smotra Sveučilišta, Studentski zdravi dani i Tjedan mozga. Dobitnica je Rektorove nagrade za Simpozij „Prehrana i zdravlje u ak. god. 2020./21. i Dekanove nagrade za izniman doprinos ugledu Medicinskog fakulteta. Aktivno je sudjelovala na studentskim kongresima, a sažetak istraživanja iz diplomskog rada predstavila je na FENS Forumu u Beču u lipnju 2024. godine. Tijekom studija sudjelovala je u dvomjesečnoj Erasmus+ stručnoj praksi na Klinici za psihijatriju na Sveučilišnoj bolnici u Münsteru i praksi od mjesec dana na Klinici za oftalmologiju na Sveučilišnoj bolnici u Tübingenu. Govori tečno engleski i njemački jezik i završila je B2 tečaj švedskog jezika. Laboratoriju za molekularnu neurobiologiju i neurokemiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga pridružila se početkom ak. god. 2022./23., gdje je pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Kristine Mlinac Jerković izradila ovaj diplomski rad.