

Utjecaj sastava gangliozida na ekspresiju, submembransku lokalizaciju i aktivnost Na⁺, K⁺-ATPaze i Ca²⁺-ATPaze stanične membrane u mozgu miša

Puljko, Borna

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:903757>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Borna Puljko

**Utjecaj sastava gangliozida na ekspresiju,
submembransku lokalizaciju i aktivnost
Na⁺, K⁺-ATPaze i Ca²⁺-ATPaze stanične
membrane u mozgu miša**

DISERTACIJA



Zagreb, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Borna Puljko

**Utjecaj sastava gangliozida na ekspresiju,
submembransku lokalizaciju i aktivnost
Na⁺, K⁺-ATPaze i Ca²⁺-ATPaze stanične
membrane u mozgu miša**

DISERTACIJA

Zagreb, 2023.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za molekularnu neurobiologiju i neurokemiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, te na Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu projekta „Projekt razvoja karijera mladih istraživača - izobrazba novih doktora znanosti“ (DOK-09-2018, voditeljice doc. dr. sc. Kristine Mlinac Jerković), te znanstvenoistraživačkog projekta „Molekularni biljezi vulnerabilnosti, adaptacije i plastičnosti neurona u akutnoj i kroničnoj ozljedi mozga“ (IP-2016-06-8636, voditeljice prof. dr. sc. Svjetlane Kalanj Bognar) Hrvatske zaklade za znanost. Dodatnu potporu za izradu disertacije osigurao je Znanstveni centar izvrsnosti za temeljnu, kliničku i translacijsku neuroznanost, projekt: „Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi“ (KK.01.1.1.01.0007, voditelja prof. dr. sc. Miloša Judaša).

Voditeljica rada: doc. dr. sc. Kristina Mlinac Jerković

Zahvale

Najveću zahvalu upućujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Kristini Mlinac Jerković, izuzetnoj osobi i odličnoj znanstvenici koja me obilježila kao mladog znanstvenika i osobu. Draga Kristina, hvala ti na svom prenesenom znanju, savjetima i vjeri u mene!

Veliko hvala na svemu voditeljici projekta prof. dr. sc. Svjetlani Kalanj Bognar čija je vjera u rad i sposobnost mladih ljudi inspirirajuća!

Zahvaljujem se svojim neurokemičarima, dr. sc. Katarini Ilić i dr. sc. Mariju Stojanoviću na svom prenesenom znanju, savjetima, kao i na svim „kavama u transferu“.

Posebnu zahvalu upućujem dr. sc. Nikolini Maček Hrvat, čiji su savjeti uvelike pomogli u brušenju mog laboratorijskog zanata.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Mariji Heffer i njezinom timu na ustupanju životinja za istraživanje.

Zahvaljujem se i svim djelatnicima Hrvatskog instituta za istraživanje mozga čiji su mi savjeti uz održavanje dobre poslovne atmosfere posebice pomogli. Posebno hvala ekipi iz Ketitransa s kojom je svaki dolazak na posao bio ispunjen zabavom i smijehom.

Naposlijetku, ali nimalo manje značajno, hvala mojim divnim roditeljima i mojim dragim prijateljima na svojoj ljubavi, podršci i razumijevanju bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć.

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1. GANGLIOZIDI	1
1.1.1. <i>Međudnos gangliozida i proteina stanične membrane.....</i>	6
1.1.2. <i>Gangliozidi u bolestima središnjeg živčanog sustava</i>	7
1.1.3. <i>Mišji modeli s poremećenom sintezom gangliozida.....</i>	9
1.1.4. <i>Mišji model St8sia1 null</i>	9
1.2. Na⁺, K⁺-ATPaza	11
1.2.1. <i>Na⁺, K⁺-ATPaza u bolestima središnjeg živčanog sustava</i>	15
1.3. Ca²⁺-ATPaza STANIČNE MEMBRANE	16
1.3.1. <i>Ca²⁺-ATPaza stanične membrane u bolestima središnjeg živčanog sustava</i>	19
1.3.2. <i>Glikoprotein neuroplastin kao funkcionalna podjedinica Ca²⁺-ATPaze stanične membrane</i>	20
2. HIPOTEZA.....	23
3. CILJEVI RADA.....	24
3.1. OPĆI CILJ	24
3.2. SPECIFIČNI CILJEVI	24
4. MATERIJALI I METODE.....	25
4.1. MATERIJAL	25
4.1.1. <i>Pokusne životinje.....</i>	25
4.1.2. <i>Kemikalije, predgotovljeni kompleti, protutijela i početnice.....</i>	26
4.2. METODE.....	28
4.2.1. <i>Analiza genske ekspresije metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu</i>	29
4.2.2. <i>Analiza proteinske ekspresije westernskom metodom otiska</i>	33
4.2.3. <i>Izolacija lipidnih splavi.....</i>	36
4.2.4. <i>Određivanje koncentracije kolesterola.....</i>	38
4.2.5. <i>Određivanje enzimskih aktivnosti ATPaze.....</i>	39
4.2.6. <i>Statistička analiza</i>	42
5. REZULTATI.....	43
5.1. GENSKA EKSPRESIJA.....	43
5.1.1. <i>Ekspresija gena za katalitičke podjedinice Na⁺,K⁺-ATPaze</i>	43
5.1.2. <i>Ekspresija gena za β podjedinice Na⁺,K⁺-ATPaze</i>	43
5.1.3. <i>Ekspresija gena za izoforme Ca²⁺-ATPaze stanične membrane</i>	45
5.1.4. <i>Ekspresija gena Nptn</i>	47
5.2. PROTEINSKA EKSPRESIJA	48
5.2.1. <i>Proteinska ekspresija Na⁺, K⁺-ATPaze</i>	48
5.2.2. <i>Proteinska ekspresija Ca²⁺-ATPaze stanične membrane</i>	51
5.2.3. <i>Proteinska ekspresija neuroplastina</i>	57
5.3. ANALIZA SUBMEMBRANSKE LOKALIZACIJE PROTEINA.....	59
5.3.1. <i>Submembranska lokalizacija Na⁺, K⁺-ATPaze.....</i>	59
5.3.2. <i>Submembranska lokalizacija Ca²⁺-ATPaze stanične membrane</i>	61
5.3.3. <i>Submembranska lokalizacija neuroplastina.....</i>	69
5.4. ANALIZA SADRŽAJA KOLESTEROLA.....	74

5.5.	ANALIZA ENZIMSKIH AKTIVNOSTI ATPaza	76
5.5.1.	Aktivnost Na^+ , K^+ -ATPaze	76
5.5.2.	Aktivnost Ca^{2+} -ATPaze stanične membrane	77
5.5.3.	Aktivnost Na^+ , K^+ -ATPaze uz dodatak egzogenih gangliozida b-serije	77
5.5.4.	Aktivnost Ca^{2+} -ATPaze stanične membrane uz dodatak egzogenih gangliozida b-serije ...	78
6.	RASPRAVA	80
6.1.	UTJECAJ GANGLIOZIDA NA GENSKU EKSPRESIJU Na^+, K^+-ATPaze, Ca^{2+}-ATPaze STANIČNE MEMBRANE I NEUROPLASTINA	82
6.2.	UTJECAJ GANGLIOZIDA NA PROTEINSKU EKSPRESIJU Na^+, K^+-ATPaze, Ca^{2+}-ATPaze STANIČNE MEMBRANE I NEUROPLASTINA	84
6.3.	UTJECAJ GANGLIOZIDA NA PROMJENE U SUBMEMBRANSKOJ LOKALIZACIJI ISTRAŽIVANIH PROTEINA	86
6.4.	UTJECAJ GANGLIOZIDA NA ENZIMSKU AKTIVNOST ATPaza TIPA P	88
6.5.	UKUPNE BIOKEMIJSKE PROMJENE	90
6.6.	TRANSLACIJSKI POTENCIJAL REZULTATA ISTRAŽIVANJA	93
7.	ZAKLJUČCI	96
8.	SAŽETAK	97
9.	ABSTRACT	98
10.	POPIS LITERATURE	99
11.	ŽIVOTOPIS	126
	DODACI	

POPIS OZNAKA I KRATICA

AD	Alzheimerova bolest, prema engl. <i>Alzheimers disease</i>
AMPAR	GluR2-AMPA receptor
ATC	kompleks koji usmjerava AMPAR u membranu, prema engl. <i>AMPAR-trafficking complex</i>
ATP	adenozin-trifosfat, prema engl. <i>adenosine triphosphate</i>
<i>Atp1a1-4</i>	geni za katalitičke podjedinice Na ⁺ , K ⁺ -ATPaze
<i>Atp1b1-3</i>	geni za β podjedinice Na ⁺ , K ⁺ -ATPaze
<i>Atp2b1-4</i>	geni za četiri izoforme Ca ²⁺ -ATPaze stanične membrane
BSA	serumski albumin goveda, prema engl. <i>bovine serum albuminum</i>
CaM	kalmodulin, prema engl. <i>calmodulin</i>
CASK	serinske protein-kinaze ovisne o kalciju i kalmodulinu, prema engl. <i>calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase</i>
CDGg	urođeni poremećaji glikozilacije gangliozida, prema engl. <i>congenital disorders of glycosylation of gangliosides</i>
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina, prema engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta prema engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>
FGF2	faktor rasta fibroblasta 2, prema engl. <i>fibroblast growth factor 2</i>
FXVD	obitelj transmembranskih proteina s FXVD aminokiselinskim slijedom na N-kraju
GABA	gama-aminomaslačna kiselina, prema engl. <i>gamma-aminobutyric acid</i>
Gal	galaktoza
GalNAc	N-acetilgalaktozamin
GBD	vezna domena za gangliozide, prema engl. <i>ganglioside-binding domain</i>
Glc	glukoza
GPI-sidro	prema engl. <i>glycosyl phosphatidylinositol anchor</i>
Ig	imunoglobulini
IR	inzulinski receptor
KO	<i>knock-out</i> životinje

LacCer	laktozilceramid, prema engl. <i>lactosylceramide</i>
LR	lipidne splavi, prema engl. <i>lipid rafts</i>
MAG	glikoprotein pridružen mijelinu, prema engl. <i>myelin-associated glycoprotein</i>
MAGUK	gvanilat-ciklaze vezane uz membranu, prema engl. <i>membrane-associated guanylate kinase</i>
MAPK	protein-kinaze aktivirane mitogenom prema, engl. <i>mitogen-activated protein kinases</i>
mTOR	signalni put mTOR
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ prijenosnik, prema engl. <i>Na⁺/Ca²⁺ exchanger</i>
NeuAc	N-acetilneuraminska kiselina, prema engl. <i>N-acetyl-neuraminic acid</i>
NHERF2	regulatorni faktor 2 Na ⁺ /H ⁺ izmjenjivača, prema engl. <i>Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2</i>
NKA	Na ⁺ , K ⁺ -ATPaza
nLR	ne-splavi, prema engl. <i>non-lipid rafts</i>
nNOS	neuronalna sintaza dušikovog oksida, prema engl. <i>neuronal nitric oxide synthase</i>
Np	neuroplastin
Nptn	gen koji kodira neuroplastin
Nurr 1	protein 1 povezan s jezgrenom receptorom, prema engl. <i>nuclear receptor related 1</i>
PD	Parkinsonova bolest, prema engl. <i>Parkinsons disease</i>
PMCA	Ca ²⁺ -ATPaze stanične membrane, prema engl. <i>plasma membrane Ca²⁺-ATPase</i>
qRT-PCR	lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu, prema engl. <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RB	pufer za izolaciju lipidnih splavi, prema engl. <i>raft buffer</i>
RNA	ribonukleinska kiselina, prema engl. <i>ribonucleic acid</i>
ROS	reaktivne kisikove vrste, prema engl. <i>reactive oxygen species</i>
SDS PAGE	elektroforeza u denaturirajućim uvjetima, prema engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>

SŽS	središnji živčani sustav
TRAF6	faktor 6 povezan s receptorom faktora tumorske nekroze, prema engl. <i>tumor necrosis factor receptor-associated factor 6</i>
TrkA	tropomiozin receptor-kinaza A

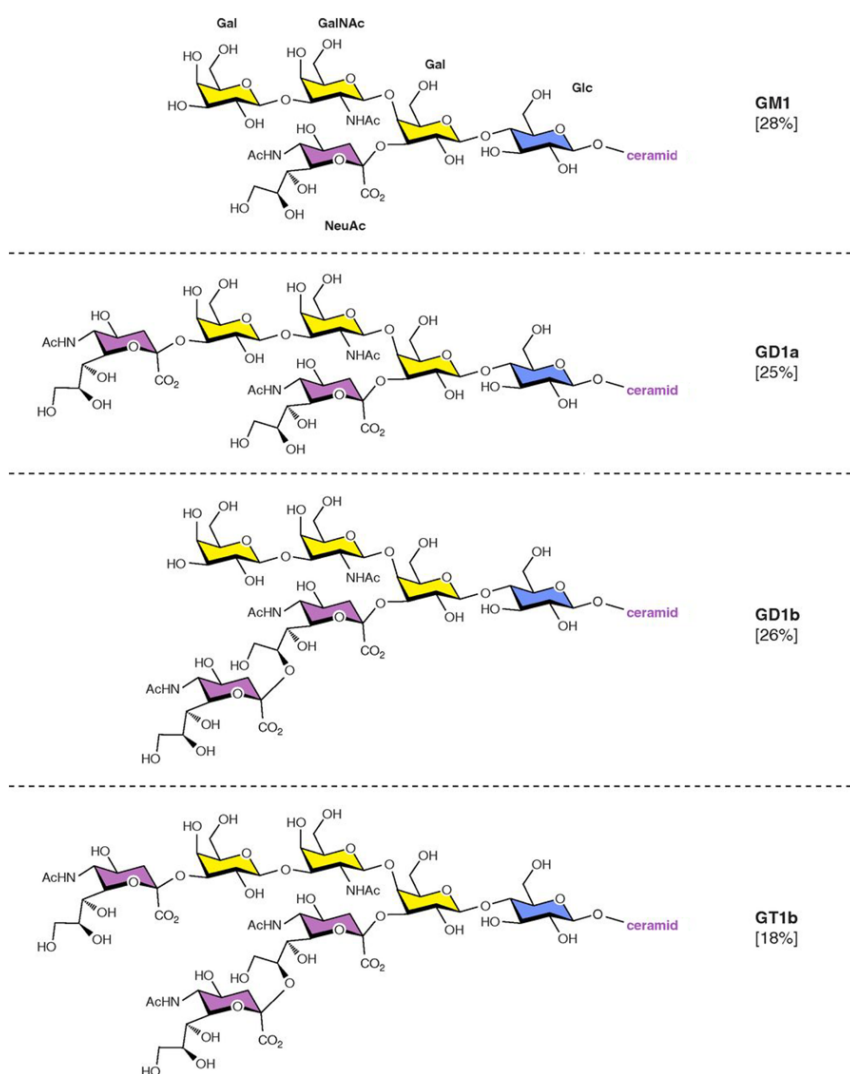
1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. GANGLIOZIDI

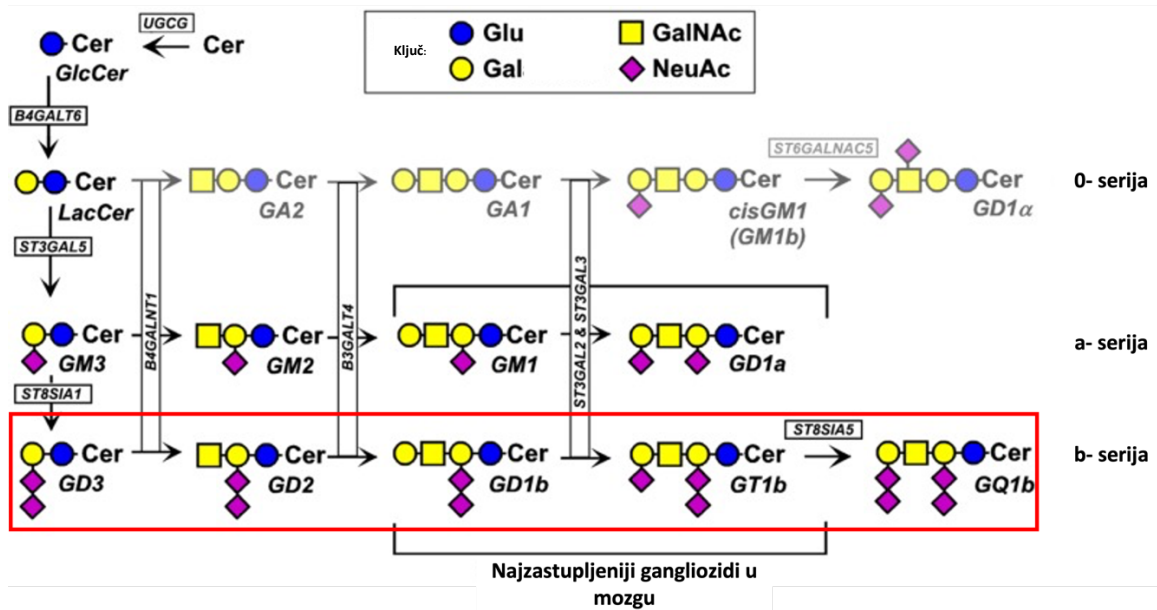
Glikolipidi su velika i heterogena skupina bioloških makromolekula u kojima je jedna ili više šećernih jedinica glikozidnom vezom vezana na hidrofobnu lipidnu osnovicu ceramid (Cer). Gangliozidi, kiseli membranski glikosfingolipidi koji sadrže sijalinsku kiselinu, skupina su struktura različite složenosti zastupljena u svim tjelesnim tkivima i tekućinama, a njihovu najveću raznolikost bilježimo u središnjem živčanom sustavu (SŽS) sisavaca (1). Prije više od 80 godina, njemački znanstvenik Ernst Klenk prvi je put izolirao do tada nepoznatu vrstu kiselih lipida iz stanica moždanih ganglija pacijenta oboljelog od Niemann-Pickove bolesti, te ih nazvao gangliozidima (2). Strukturno su građeni od hidrofilnog oligosaharidnog dijela različitog stupnja složenosti usmjerenog u izvanstanični okoliš, te vezanog na hidrofobnu Cer okosnicu kojom su usidreni u vanjski sloj stanične membrane. Ono što razlikuje gangliozide od ostalih glikosfingolipida je prisutnost jednog ili više ostataka sijalinske kiseline, *N*-acetilneuraminske (engl. *N-acetyl-neuraminic acid*, NeuAc) ili *N*-glikolilneuraminske kiseline, vezanih na lipooligosaharidnu okosnicu (3). Ovo čini gangliozide odrednicama kako lipidoma, tako i glikoma i sijaloma SŽS (4). Do danas je opisano dvjestotinjak različitih struktura gangliozida, od kojih su četiri, GM1, GD1a, GD1b i GT1b (Slika 1.1.) najzastupljeniji u odraslom mozgu sisavaca (1). U tradicionalnoj nomenklaturi prema Svennerholmu (5), gangliozidi su imenovani i podijeljeni u skupine prema broju ostataka sijalinske kiseline vezanih na lipooligosaharidnu jedinicu, te prema svojoj kromatografskoj pokretljivosti. Nakon početnog slova „G“ koje označava gangliozid slijedi slovo koje označava broj vezanih molekula sijalinske kiseline. Tako „M“ (mono) označuje jednu, „D“ (di) dvije, „T“ (tri) tri, „Q“ (quatra) četiri, ili „P“ (penta) pet vezanih molekula sijalinske kiseline. Nakon toga slijedi broj koji označava slijed i duljinu oligosaharidnog lanca što je uzrok različite kromatografske pokretljivosti gangliozida. Primjerice, GM1 ima ukupno 4 šećerne jedinice u svom oligosaharidnom lancu, odnosno slijed Gal-GalNAc-Gal-Glc vezan na Cer osnovicu (Gal=galaktoza, GalNAc=*N*-acetilgalaktozamin, Glc=glukoza). Naziv gangliozida može sadržavati i slovo koje označava broj sijalinskih kiselina vezanih na unutarnju molekulu Gal, pa tako „a“ označava jednu, „b“ dvije, a „c“ tri. Temeljem toga gangliozide

i dijelimo u a-, b-, c- ili 0, odnosno asijalo, serije. Nomenklatura gangliozida prema Svennerholmu i danas je uvrjevena u istraživanju gangliozida, dok je službena IUPAC nomenklatura rijetko u upotrebi.

Biosinteza gangliozida složen je proces koji započinje sintezom Cer u endoplazmatskoj mrežici, koji se potom prenosi u Golgijev aparat gdje nastaje laktozilceramid (LacCer) (3),(6). Specifične glikoziltransferaze tada kataliziraju stupnjevitu sintezu oligosaharidnog lanca na LacCer okosnici, te dodavanjem prve molekule sijalinske kiseline nastaje gangliozid GM3, te potom GD3 i GT3, koji predstavljaju osnovu za sintezu složenih gangliozida a-, b- i c-serije (Slika 1.2.) (1),(3),(7). Nastali gangliozidi transportnim vezikulama prenose se do stanične membrane, a razgradnja im se odvija primarno u endosomima i lizosomima (7).



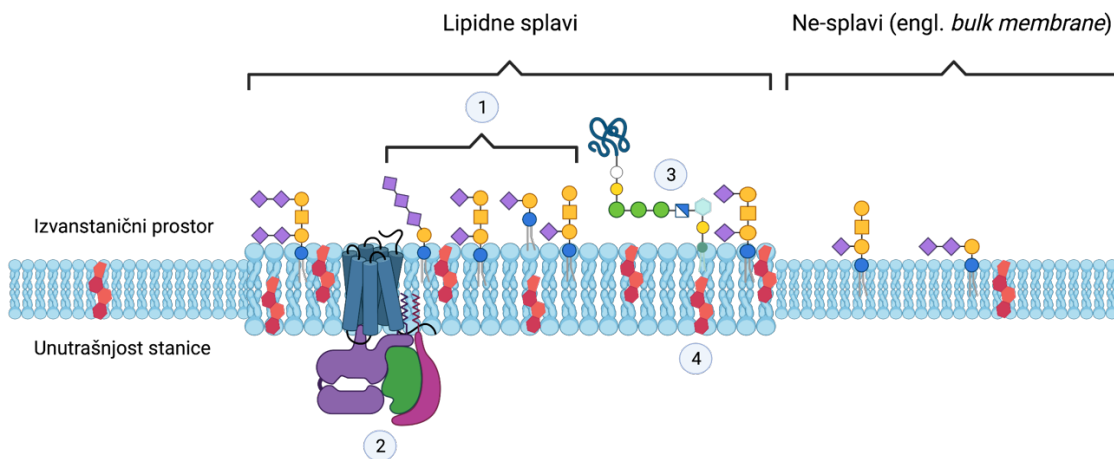
Slika 1.1. Strukture četiri najzastupljenija gangliozida u mozgu sisavaca, GM1, GD1a, GD1b, te GT1b s naznačenim postotnim udjelima u mozgu čovjeka. Oznake bojom: žuta, Gal/GalNAc; plava, Glc; ljubičasta, NeuAc. Preuzeto i prilagođeno uz dopuštenje iz (8).



Slika 1.2. Biosintetski put gangliozida u sisavaca. Glu – glukoza, Gal – galaktoza, GalNAc – N-acetilgalaktozamin, NeuAc – N-acetilneuraminska kiselina. Crnim pravokutnicima označena su imena enzima koji sudjeluju u pojedinom biosintetskom koraku. Crvenim pravokutnikom označena je blokada u biosintetskom putu gangliozida u mišjem modelu *St8sia1 null*, uslijed čega ovim životinjama nedostaju gangliozidi b- i c-serije. Preuzeto i prilagođeno uz dopuštenje iz (8).

Distribucija gangliozida unutar stanične membrane nije ravnomjerna, već ih nalazimo koncentriranim u lipidnim splavima (engl. *lipid rafts*, LR), visokoorganiziranim domenama bogatim složenim sfingolipidima i kolesterolom (9), što ih čini manje fluidnima i uređenijima u odnosu na ostatak membrane, te netopljivima u ionskim deterdžentima (10). Ove 10-200 nm velike domene su vremenski i prostorno vrlo dinamične, te omogućuju koncentriranje i segregaciju pojedinačnih staničnih komponenata dovodeći do regulacije njihovih interakcija (11). Kolesterol je od velike važnosti za ustroj LR budući da se interkalira između jedinica sfingolipida, te služi kao svojevrsno „ljepilo“ koje drži komponente LR na okupu (12). Izlazak kolesterola iz LR praćeno je izlaskom većine proteina sadržanih u ovim domenama onemogućujući njihovo pravilno funkcioniranje (13). Citoplazmatski proteini koji su kovalentno modificirani zasićenim masnim kiselinama, te proteini stanične membrane koji su u nju usidreni glikozil-fosfatidilinozitolnim sidrom (engl. *glycosyl phosphatidylinositol anchor*, GPI-sidro) visoko su zastupljeni u LR (10), a transmembranski proteini usmjeravaju se u LR aminokiselinskim slijedom u svojim izvanstaničnim, transmembranskim ili

unutarstaničnim domenama (14). U domenama LR koncentriraju se i proteini uključeni u puteve prijenosa signala, poput Src kinaza, proteina G, receptora faktora rasta, proteinskih kinaza aktiviranih mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinases*, MAPK), te protein-kinaza C (15)–(18), što čini LR svojevrsnim signalnim platformama s važnom ulogom u funkcioniranju stanice. Shematski prikaz ustroja LR dan je na Slici 1.3.



Slika 1.3. Ustroj lipidnih splavi. 1 – gangliozidi; 2 – transmembranski protein; 3 – protein usidren GPI sidrom; 4 – kolesterol. Shema kreirana na [Biorender.com](https://www.biorender.com).

Količina gangliozida u mozgu značajno se mijenja tijekom razvoja i rasta, te im je primjerice količina u mozgu odrasloga miša do 8 puta veća u odnosu na embrionalnu fazu (19). Tijekom ranijih faza rasta najzastupljeniji su jednostavniji gangliozidi GM3 i GD3 koji se postepeno zamjenjuju složenijim GM1, GD1a, GD1b i GT1b. Prilikom starenja dolazi do smanjenja ukupne koncentracije gangliozida u mozgu, ali i do promjena u njihovom sastavu (20),(21), primjerice porasta ekspresije GQ1b, GT1b i GD1b, a pada ekspresije GM1 i GD1a (22).

Gangliozidi pokazuju regionalno specifične ekspresijske profile ovisne o tipu stanica u SŽS (1). Ukupna im količina u pojedinoj regiji ovisi o omjeru količine bijele i sive tvari. Tako primjerice frontalni, parijetalni i temporalni režanj moždane kore sadrže najviše GM1 i GD1a, a mali mozak i strukture povezane s osjetom vida najviše b-serije gangliozida (23). Najviše gangliozida eksprimirano je u mijelinu i membranama neurona, gdje su u najvećim udjelima zastupljeni GM1 i GM4 (24). Oligodendrociti i astrociti

ekspimiraju jednostavne gangliozide (25),(26), a njihov sastav u membranama stanica mikroglije slabo je poznat (27).

Uloge pojedinih gangliozida su višestruke u ustrojstvu i održavanju funkcije SŽS. Primjerice, gangliozid GD3 je prepoznat kao ključan faktor u neurogenezi. Preko interakcije s receptorom epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) utječe na njegovu autofosforilaciju i posljedično na signalnu kaskadu koja promovira staničnu proliferaciju (28). Nadalje, utvrđena je uključenost acetilirane inačice GD3 na neuronalnu migraciju tijekom razvoja mozga štakora (29). Za GM1 je ustanovljeno da kod ljudi sudjeluje u izrastanju neurita i nastanku aksona (30). Gangliozidi GT1b i GD1a vežu glikoprotein pridružen mijelinu (engl. *myelin-associated glycoprotein*, MAG), što je ključno za stabilnost mijeliniziranih aksona (31),(32). U membranama aksona utvrđena je interakcija GT1b sa signalnim kompleksom sačinjenim od Nogo-66 receptora, Lingoa-1 i receptora neurotrofina p75NTR, a ova interakcija važna je za popravak nakon ozljeda SŽS (31). Potom, gangliozidi imaju ključnu ulogu u organizaciji čvorova mijeliniziranih živčanih vlakana, gdje osiguravaju ispravnu kompartmentizaciju molekula stanične adhezije poput kontaktina/crispr1 i neurofascina-155 (33). Nadalje, promijenjen sastav gangliozida stanične membrane utječe na cjelokupnu homeostazu iona u stanici. Gangliozidi utječu na transport iona preko membrana na nekoliko različitih načina opisanih u literaturi. GM1 utječe na transport Ca^{2+} iona preko stanične membrane jer potiče unos iona aktivacijom specifičnih ionskih kanala (34)–(36), a istraživanja su i pokazala kako sadržaj GM1 u LR korelira s promjenama u specifičnoj aktivnosti Ca^{2+} -ATPaze stanične membrane (engl. *plasma membrane Ca^{2+} -ATPase*, PMCA) (37). Opisana je i izravna interakcija GM1 s $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ prijenosnikom (engl. *$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger*, NCX) u jezgrinoj membrani (38), u kojoj su detektirani gangliozidi GM1 i GD1a (39). Važno je za istaknuti kako se smatra da gangliozidi jezgrine membrane epigenetskom regulacijom utječu na ekspresiju gena ovisno o stadiju razvoja i tipu stanica (40). Naime, utvrđena je interakcija GM1 s kromatinom putem acetilacije histona u diferenciranim živčanim stanicama, a poznata je i interakcija GM3 s histonom H1 u jezgri (41).

1.1.1. Međudodnos gangliozida i proteina stanične membrane

Gangliozidi stupaju u interakcije s membranskim proteinima i lipidima unutar same membrane (*cis*-interakcije), kao i u interakcije s molekulama susjednih stanica i izvanstaničnog matriksa (*trans*-interakcije) (8). Važna strukturna odlika gangliozida koja omogućava ove interakcije je mogućnost uspostavljanja vodikovih veza s lipidima i proteinima putem svojih nabijenih hidrofilnih dijelova i amidnih skupina Cer okosnice (42). *Cis*-interakcije utječu na submembransku lokalizaciju proteina, te mogu dovesti do dimerizacije receptora i ostvarivanja interakcija receptora s njihovim signalnim partnerima i regulatorima (43),(44), čime gangliozidi doprinose formiranju supramolekularnih kompleksa potrebnih za integraciju više puteva prijenosa signala u stanici (45). Primjerice, GM1 veže tropomiozinsku receptor-kinazu A (TrkA) i laminin-1, dovodeći do stvaranja kompleksa koji promoviraju rast aksona (46). GM1 se udružuje i s GluR2-AMPA receptorom (AMPAR), a GT1b s kompleksom koji usmjerava AMPAR u membranu (engl. *AMPAR-trafficking complex*, ATC), što omogućuje pozicioniranje AMPAR u sinaptičkoj membrani (47). GT1b također stupa u interakcije sa sinaptotagminom $\frac{1}{2}$ čime se stvara kompleks receptora za botulinum toksin tipa B u živčanim završetcima (48). Gangliozid GD3 stupa u interakciju s EGFR dovodeći do inhibicije dimerizacije i aktivacije receptora (49), a GM3 stupa u interakciju s inzulinskim receptorom (IR) dovodeći do prekida interakcije IR i kaveolina što rezultira prekidom u inzulinskoj signalizaciji (43). O samoj prirodi *cis*-interakcija gangliozida sa specifičnim membranskim proteinima postoje već spomenuti eksperimentalni dokazi, kao i podaci dobiveni računalnim (molekularnim) modeliranjem (50). Izrazita Coulombovska odbijanja negativno nabijenih karboksilnih skupina prisutnih sijalinskih kiselina rezultiraju stabilizacijskim ostvarivanjem vodikovih veza između karboksilne skupine sijalinske kiseline i amino-skupine *N*-acetilgalaktozamina, poznato kao „NH-trik“. Potonje dovodi do prividnog zasjenjenja negativnog naboja u oligosaharidnim lancima gangliozida te dovodi do specifične prostorne organizacije tih oligosaharidnih struktura o čemu će ovisiti i njihova topologija i interakcija sa specifičnim proteinima (50). Nadalje, specifični proteini sadrže i vezne domene za gangliozide, (engl. *ganglioside-binding domain*, GBD) (51). S tog aspekta možemo razlikovati četiri tipa veznih domena za

gangliozide (51), što ilustrira veliko bogatstvo potencijalnih točki kontakta između gangliozida i proteina.

Najvažniji primjer *trans*-interakcija gangliozida i proteina izvanstaničnog matriksa u SŽS je vezanje GT1b i GD1a i glikoproteina MAG. Nadalje, GM1 je identificiran kao koreceptor faktora rasta fibroblasta 2 (engl. *fibroblast growth factor 2*, FGF2) (52) i α -Klotho endokrinog faktora sa važnom neuroprotektivnom ulogom (53). Utvrđena je i mogućnost vezanja s neuroprijenosnicima, te se smatra kako ih gangliozidi kao koreceptori dohvaćaju prilikom otpuštanja u sinapsama, te ih usmjeravaju prema njihovim receptorima (54).

1.1.2. Gangliozidi u bolestima središnjeg živčanog sustava

Za normalnu funkciju SŽS potrebna je precizna regulacija optimalnog sadržaja (koncentracije i sastava) gangliozida. Poremećaje u katabolizmu gangliozida, koje zajednički nazivamo lizosomskim bolestima nakupljanja, karakteriziraju progresivna neurodegeneracija i teški neurološki deficiti (55),(56). Do nedavno, urođene greške biosinteze gangliozida u ljudi nisu bile poznate. Do danas, opisane su mutacije u samo tri gena biosintetskog puta gangliozida u ljudi: deficijencija GM3-sintaze (gen *ST3GAL5*), deficijencija GM2/GD2-sintaze (gen *B4GALNT1*) te deficijencija ST3 β -galaktozid α -2,3-sijaliltransferaze 3 (kodirane genom *ST3GAL3*) (45),(57),(58)(59). Prvi slučajevi deficijencije GM3-sintaze opisani su 2004. godine u izoliranoj zajednici Amiša te je utvrđeno da su uzrok autosomalnog recesivnog epileptičkog sindroma s početkom u dječjoj dobi (59). Za sindrom dosad poznat kao sindrom „soli i papra“ (eng. *salt and pepper syndrome*) kojeg karakterizira teško kognitivno zaostajanje, epilepsija, skolioza, koreoatetozna, dismorfične crte lica i promijenjena pigmentacija kože, također je utvrđeno da je uzrokovan mutacijom u genu *ST3GAL5* (60). Genska deficijencija GM2/GD2-sintaze utvrđena je kod pojedinaca s kompleksnim oblikom nasljedne spastične paraplegije (61)–(63). Karakteristična klinička obilježja oboljelih uključuju progresivnu mišićnu slabost i spasticitet, kao i ne-progresivno kognitivno oštećenje. Većina ovih pacijenata pokazuje blago do umjereno intelektualno zaostajanje koje ponekad prate i psihijatrijske bolesti (57). Mutacije u genu *ST3GAL3* koji kodira jednu od dvije sijaliltransferaze uključene u sintezu gangliozida GD1a i GT1b utvrđene su kao

uzrok sindroma West, odnosno epileptičke encefalopatije, poremećaja karakteriziranog epileptičkim napadajima, zastojem u razvoju, intelektualnim deficitima te kognitivnim zaostajanjem uz druge neurološke simptome (45),(59),(64). Sve to govori u prilog tome da upravo nedostatak specifičnih gangliozida povezan s razvojem epilepsije (45). Posve je jasno da se svakim danom povećava broj poremećaja dosad nepoznate etiologije, a za koje se sad ispostavlja da su povezani s deficijentnom biosintezom gangliozida. Ti se poremećaji danas klasificiraju kao urođeni poremećaji glikozilacije gangliozida (prema engl. *congenital disorders of glycosylation of gangliosides*, CDG) (57),(58).

Poremećaji u sastavu i koncentraciji gangliozida, kao i promjene u njihovom metabolizmu povezani su i s nekoliko neurodegenerativnih oboljenja, primjerice Parkinsonovom (engl. *Parkinsons disease*, PD), Alzheimerovom (engl. *Alzheimers disease*, AD) i Huntingtonovom bolešću (45),(65–72). Smanjenje ekspresije gangliozida GD1a i GT1b, a povećanje ekspresije GM1 i GD1b zabilježeno je u regiji *substantia nigra* u oboljelih od PD (66), te je pokazano kako administracija GM1 potiče ubrzano cijepanje α -sinukleina (65). U oboljelih od AD utvrđeno je kako tijekom razvoja bolesti dolazi do smanjenja ukupne količine gangliozida, ali do porasta u ekspresiji GM2, GM3 i GM4 u frontalnom režnju moždane kore (21). Dokazano je da GM1 veže A β -peptid, te se ova interakcija smatra važnom u formiranju A β fibrila (67),(68). Istraživanja na životinjskim modelima AD pokazala su protektivnu ulogu gangliozida a- i asijalo serije (45). Primjerice nakon administracije egzogenog GM1 zabilježeno je poboljšanje kognitivnih sposobnosti i smanjenje neurotoksičnosti uzrokovanih amiloidom u miševa i štakora (69),(70), a isti učinak zabilježen je i nakon jednogodišnje intramuskularne primjene GM1 u pacijenata (71). Istraživanja su pokazala i protektivnu ulogu u GM1 u modelima ishemijskog moždanog udara (73),(74). Poremećaji u metabolizmu gangliozida zabilježeni su i u pacijenata i u životinjskom modelu amiotrofične lateralne skleroze (75),(76). Budući da gangliozidi služe kao koreceptori neuroprijenosnika, smatra se kako imaju važnu ulogu i u patologiji poremećaja raspoloženja (45).

1.1.3. Mišji modeli s poremećenom sintezom gangliozida

U svrhu istraživanja funkcije gangliozida razvijeni su genetski preinačeni mišji modeli s poremećenom sintezom gangliozida (engl. *knock-out*, KO) koji imaju usporedivu ukupnu količinu gangliozida kao i kontrolni miševi, međutim sastav gangliozida se uvelike razlikuje, ovisno o tome koji gen je inaktiviran. Primjerice, miševi kojima nedostaje GM2/GD2-sintaza za koju kodira *B4galnt1* gen uopće ne eksprimiraju složene gangliozide, ali sintetiziraju usporedivu ukupnu količinu gangliozida koju najvećim dijelom čine jednostavni gangliozidi GM3 i GD3 (8),(77),(78). Fenotipske značajke svih ovih modela razlikuju se ovisno o sastavu gangliozida i uključuju: deficite u mijelinizaciji, progresivnu neuropatiju, motoričke deficite (79)–(81), gluhoću, poremećenu homeostazu glukoze (82)–(84), te nedostatnu regeneraciju hipoglosalnog živca nakon ozljede (85). Miševe kojima su inaktivirana po dva gena koji kodiraju enzime potrebne za biosintezu gangliozida (tzv. *double null* životinje), primjerice miševi kojima su inaktivirani geni *B4galnt1* i *St8sia1*, karakterizira degeneracija živaca, progresivni motorički, bihevioralni i senzorički deficiti te su također podložni indukciji letalnih audiogenih epileptičkih napadaja (86)–(88). Nedostatak svih kompleksnih gangliozida u mišjim modelima uzrokuje letalne epileptičke napadaje u gotovo 100% životinja, što ilustrira povezanost između složenih gangliozida i pojave epileptičkih napadaja. Međutim, mehanizam koji je u podlozi pojave epileptičkih napadaja u slučaju potpunog nedostatka kompleksnih gangliozida još nije razjašnjen (89).

1.1.4. Mišji model *St8sia1 null*

Miševi *St8sia1 null* imaju nefunkcionalan gen *St8sia1* koji kodira enzim GD3-sintazu (ST2; α -2,8-sijaliltransferaza; EC 2.4.99.8) što za posljedicu ima nemogućnost sinteze gangliozida b- i c-serije, no ukupna količina gangliozida je nepromijenjena zbog povećane sinteze gangliozida a-serije, ponajviše GM1 i GD1a (Slika 1.2.)(90). Morfološka analiza živčanog tkiva ovih miševa ne pokazuje značajne razlike u usporedbi s kontrolnim životinjama, ne pokazuju smetnje u ponašanju, normalnog su rasta i fertilni, ali imaju specifične neurološke poremećaje koji su posljedica starenja i pokazuju depresivno ponašanje (91), smanjenu mogućnost regeneracije živaca nakon ozljede (92),(93), poremećaje pamćenja (94), te auditorne poteškoće (95). Pokazuju i povećanu

osjetljivost na formalinskom testu i motoričku disfunkciju (96), te toplinsku hiperalgeziju i mehaničku alodiniju (97). Nadalje, miševi s nedostatkom GD3-sintaze imaju značajno smanjenu (za čak 30%) osjetljivost na svjetlosne podražaje te reduciranu vidnu oštrinu (98). Osim SŽS i oka, ekspresija GD3-sintaze je uobičajeno relativno visoka (u usporedbi s drugim organima) i u bubrezima te je pokazano da nedostatak GD3-sintaze ima određene posljedice i za taj organ, odnosno da je kod *St8sia1 null* miševa promijenjena renalna ekspresija koneksina i paneksina 1 (90).

Iako je očito da inaktivacija GD3-sintaze rezultira brojnim odstupanjima od optimalnog fiziološkog funkcioniranja organizma, nije razjašnjen molekularni put koji vodi od nedostatka ovog enzima do opisanog fenotipa. Svakako valja spomenuti i da je GD3-sintaza često u fokusu istraživanja mehanizama maligne transformacije kod različitih tipova tumora (99)–(102). Istraživanja već dugo pokazuju da je uz GD2 upravo gangliozid GD3 pojačano eksprimiran u mnogim tipovima tumora te je važan za proliferativna svojstva stanica. Ekspresija GD3-sintaze je visoka u prenatalnom razvoju i ranom djetinjstvu, ali opada sa starenjem. Međutim, kod tumora ekspresija opet značajno raste i u visoko proliferirajućim tumorskim stanicama možemo detektirati visoku koncentraciju GD3 gangliozida. Iz tog razloga GD3-sintaza se trenutno istražuje kao terapijski cilj u brojnim kliničkim istraživanjima i dokazano je da njena inaktivacija dovodi do smanjene proliferacije i metastatskog potencijala tumora (99)–(102). Međutim, upravo stoga što je nejasno koje sve posljedice za sobom nosi potpuna inaktivacija GD3-sintaze i kako do tih posljedica dolazi, iznimno je važno rasvijetliti fiziološke učinke inaktivacije *St8sia1* gena na stanice i tkiva. Iz tog razloga smatramo *St8sia1 null* mišji model idealnim ne samo za istraživanje uloga gangliozida i njihovih utjecaja na membranske proteine općenito, već i odličnim alatom za pomoć u razvoju optimalnih terapija kojima je cilj inaktivirati GD3-sintazu kako bi se izbjegle negativne posljedice takvog tretmana.

1.2. Na⁺, K⁺-ATPaza

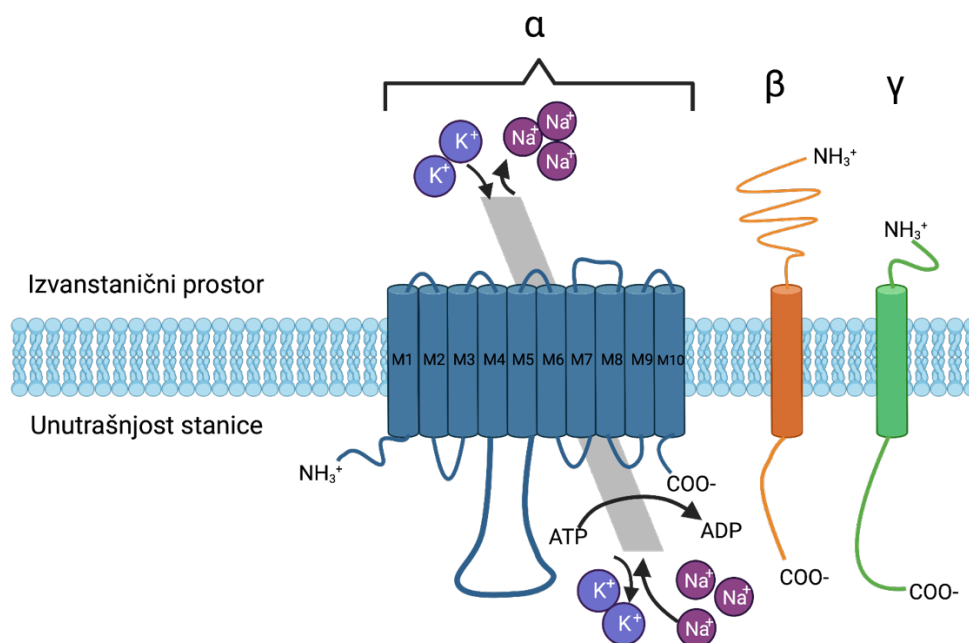
Na⁺, K⁺-ATPaza (Na⁺, K⁺-adenozin-trifosfataza; NKA; EC 7.2.2.13) elektrogena je transmembranska ATPaza iz porodice ATPaza tipa P topološkog tipa II, membranskih proteina koji koriste energiju dobivenu hidrolizom adenzin-trifosfata (ATP) za transport iona preko stanične membrane nasuprot njihovom koncentracijskom gradijentu. Karakteristika ovog tipa ATPaza je reakcijski ciklus u kojemu dolazi do izmjene dvaju konformacijskih stanja (E1 i E2) uslijed reverzibilne fosforilacije specifičnog aminokiselinskog ostatka (103),(104). NKA izbacuje 3 Na⁺ iona iz stanice uz istovremeni unos 2 K⁺ iona u stanicu po svakoj hidroliziranoj molekuli ATP-a, čime se osigurava veća izvanstanična koncentracija Na⁺ i veća unutarstanična koncentracija K⁺. Time stanica gubi neto negativan naboj što dovodi do hiperpolarizacije potencijala stanične membrane (105). Koncentracijski gradijenti monovalentnih kationa od velike su važnosti za brojne fiziološke procese uključujući stabilizaciju mirujućeg membranskog potencijala stanice, osmotsku regulaciju staničnog volumena, regulaciju staničnog ciklusa i metabolizma, prijenos signala i očuvanje ionske homeostaze stanice (106). NKA neovisno o svojoj ulozi membranskog prijenosnika iona ima i ulogu receptora i signalne molekule uključene u sinaptičku plastičnost (107),(108). Stvara komplekse s receptorima faktora rasta i veže se s receptorom inozitol-1,4,5-trifosfata čime se aktivira unutarstanična signalizacija posredovana Ca²⁺ ionima (108). Vežanje srčanog glikozida ouabaina mijenja način na koji NKA stupa u interakciju sa susjednim membranskim proteinima što dovodi do aktivacije Src tirozinskih kinaza, transaktivacije EGFR i povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsti (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (109),(110). Stupa i u interakciju s receptorom inozitol-trifosfata, NCX i kaveolinom-1, te nastaju signalni kompleksi koji koordiniraju transport preko stanične membrane (111), a važni su i za ustroj LR (112).

Aktivnost NKA od velike je važnosti u mozgu, gdje je u neuronima zadužena za preokret postsinaptičkog protoka Na⁺ te uspostavljanje gradijenata Na⁺ i K⁺ potrebnih za stvaranje akcijskog potencijala, dok u astrocitima gradijent Na⁺ osigurava ponovno preuzimanje neuroprijenosnika (113). Aktivnost NKA u mozgu koncentrirana je u membranama živčanih završetaka (114), gdje su visokozastupljeni i receptori

neuroprijenosnika i neuropeptida (111). Pokazano je i kako prijenos signala posredovan NKA sudjeluje u početnim fazama dendritičkog rasta (115). Zanimljivo je kako se procjenjuje da do 50% ukupne energije konzumirane u mozgu otpada na energiju potrebnu za rad NKA (116). Potrebna energija dobiva se u oksidativnom metabolizmu mitohondrija, a čak je dokazano da određeni transkripcijski faktori specifični za neurone reguliraju ekspresiju i enzima respiracijskog lanaca, i pojedinih podjedinica NKA (117).

Strukturno je NKA najveći pripadnik porodice ATPaza toploškog tipa II, a građena je kao heterodimer katalitičke α -podjedinice te regulacijske β -podjedinice odgovorne za pravilno pozicioniranje α -podjedinice i modulaciju njezine aktivnosti (113) (Slika 1.4.). α -podjedinica polipeptid je veličine je ~ 1020 aminokiselina, te se sastoji od 10 transmembranskih uzvojnica (M1-M10) koje sadrže vezna mjesta za katione (118), te velike unutarstanične i jednostavne izvanstanične domene (119). Vezno mjesto za ATP, domena aktuatora (A-domena), te fosforilacijska domena (P-domena) nalaze se unutar dviju citoplazmatskih petlji (104),(119). Izvanstanična domena mjesto je vezanja srčanih glikozida digoksina i ouabaina koji specifično inhibiraju aktivnost NKA (120),(121). U sisavaca postoje četiri izoforme α -podjedinice ($\alpha 1-4$) kodirane četirima različitim genima (*ATP1A1-4*, *Atp1a1-4*), pozicioniranim na različitim kromosomima (122), s različitim ekspresijskim profilima te kinetičkim svojstvima (123). Afinitet prema Na^+ razlikuje se među izoformama u smjeru $\alpha 1 > \alpha 2 > \alpha 3$, a naponska ovisnost $\alpha 2 > \alpha 1 > \alpha 3$ (124). $\alpha 1$ predominantna je i ubikvitarno eksprimirana izoforma, s najvećim afinitetom za K^+ (125), a u mozgu je eksprimirana u neuronima i glija stanicama (126). $\alpha 2$ ponajviše je eksprimirana u srčanom, koštanom i adipoznom tkivu, te potom tkivu pluća i mozgu, u astrocitima i oligodendrocitima(126),(127). Izoforma $\alpha 3$ pokazuje vrlo mali afinitet za Na^+ (125), te je primarno eksprimirana u neuronima (127),(128) i glijalnim stanicama (125), dok je $\alpha 4$ izoforma eksprimirana samo u testisima (129). β -podjedinica transmembranski je glikoprotein (130) i ključna je za pravilno smatanje, sazrijevanje, te usmjeravanje i pozicioniranje $\alpha\beta$ -heterodimera u staničnu membranu (131),(132). U sisavaca postoje tri izoforme ($\beta 1-3$), kodirane različitim genima (*ATP1B1-3*, *Atp1b1-3*), s različitim ekspresijskim profilima ovisno o vrsti tkiva i tipu stanica (113),(128). $\beta 1$ ubikvitarno je eksprimirana izoforma (133), dok $\beta 2$ ima ulogu adhezijske molekule u

stanicama glijе, ostvarujući interakcije s neuronima (134) te je visokoekspimirana u malom mozgu miša (135). β 3 izoforma ekspimirana je u tkivima pluća, bubrega, slezene, crijeva te mozga, u oligodendrocitima (126),(136). β -podjedinica se sastoji od 30 aminokiselina velikog *N*-kraja, unutarstanične domene, transmembranske uzvojnice, te 240 aminokiselina C-kraja koji čini izvanstaničnu domenu (113). Transmembranska uzvojnica sadrži konzerviranu aminokiselinsku sekvencu Y(XX)YF (gdje je X bilo koja hidrofobna aminokiselina) koja je ključna za ostvarenje interakcije između α - i β -podjedinice (137). Osim uloge svojevrsnog pratitelja (engl. *chaperone*), istraživanja su pokazala i kako β -podjedinica ima utjecaj na samu enzimsku aktivnost NKA, s utjecajem na afinitet za K^+ uslijed stabilizacije E2P intermedijera (104), s različitim afinitetima tkivno ekspimiranih izoformi (124),(138). Uz pomoć proteolitičke digestije (139), te fluorimetrije naponskom stezaljkom (130) konformacijske promjene unutar β -podjedinice tijekom reakcijskog ciklusa NKA. β 2 uključena je i u ostvarivanje međustaničnih interakcija (140). Treća, γ -podjedinica NKA proteini su iz FXYD obitelji transmembranskih proteina sa FXYD aminokiselinskim slijedom na *N*-kraju (141). Sedam različitih FXYD proteina tkivno specifično se vežu za α -podjedinicu i reguliraju njezinu aktivnost (142).



Slika 1.4. Shematski prikaz strukture NKA unutar stanične membrane. NKA je heterodimer α - i β -podjedinice, te pridružene γ -podjedinice (FXYD). α -podjedinica sadrži 10 transmembranskih domena (M1-10), dok β - i γ -podjedinice sadrže jednu transmembransku regiju. Shema kreirana na [Biorender.com](https://www.biorender.com).

Za aktivnost NKA od iznimne je važnosti njezin lipidni mikrookoliš uslijed fizikalnih i kemijskih interakcija s lipidima koji je okružuju (143). Istraživanja su pokazala postojanje dviju populacija NKA unutar membrane: aktivna populacija smještena u najvećem dijelu stanične membrane te neaktivna unutar lipidnih splavi, i u kaveolama (144). Specifično vezani lipidi imaju vezna mjesta unutar α uzvojnica u transmembranskim regijama proteina ili unutar šupljina na njihovoj površini, te su za NKA kristalografskim metodama definirana vezna mjesta za fosfolipide i kolesterol (143). Osim lipida s određenim veznim mjestima unutar enzima, poznati su i tzv. prstenasti lipidi (engl. *annular lipids*) koji okružuju transmembranske regije proteina (143), od kojih je otprilike 30 definirano u interakciji s NKA, najvećim udjelima fosfatidilkolin, fosfatidilserin i kolesterol (145). NKA pokazuje veću sklonost interakcijama s negativno nabijenim fosfolipidima, poglavito fosfatidilserinom, nego s neutralnim lipidnim strukturama (145). Dokazano je i kako navedeni lipidi imaju funkcionalni utjecaj na aktivnost same NKA na način da ju fosfatidilserin i kolesterol stabiliziraju, polinezasićeni fosfatidiletanolamini stimuliraju, a sfingomijelin i kolesterol mogu i inhibirati (143). Kolesterol se može vezati na dva mjesta u strukturi NKA, između α - i FXYD podjedinica što stabilizira NKA, ili između α - i β -podjedinice što onemogućuje aktivnost enzima (146).

Utjecaj gangliozida na aktivnost NKA zabilježen je u studijama u kojima je njezina aktivnost mjerena uz egzogeni dodatak gangliozida u homogenatima različitog podrijetla, često kontradiktornih rezultata (147). Primjerice, pokazano je kako nanomolarne koncentracije gangliozida GM1, GD1a, GD1b, GT1b aktiviraju NKA (148), međutim još nije razjašnjeno na koji način (147). Spektroskopskom analizom upregnutom elektronskom spinskom rezonancijom i spinski obilježenim gangliozidima GM1, GM2, GM3, GD1b utvrđen je nedostatak selektivnosti GM1, GM2 i GM3 prema NKA u odnosu na fosfatidilkolin, dok je GD1b pokazao selektivnost manju u odnosu na fosfolipide (149). Dosadašnja istraživanja naše skupine pokazala su kako dolazi do promjene u aktivnosti NKA zbog redistribucije gangliozida i potencijalno ostalih membranskih komponenti uslijed brojnih ciklusa smrzavanja i odmrzavanja. Preraspodjelu NKA između lipidnih splavi i ostatka membrane odnosno intenzitet imunoreaktivnosti prati i preraspodjela GM1, dok preraspodjela GD1a, GD1b, i GT1b

prati promjene u aktivnosti NKA (150). Pokazali smo i kako na razini genske ekspresije postoje suptilne razlike u ekspresiji specifičnih podjedinica NKA u mišjim modelima s poremećenom sintezom gangliozida što upućuje na mnogo dublji i složeniji utjecaj gangliozida na NKA (151). Nadalje, submembranska lokalizacija NKA se mijenja između LR i ostatka membrane ukoliko je gangliozidni sastav stanične membrane promijenjen. Smatramo da su ova vrijedna opažanja kao i nepodudarnost među rezultatima istraživanja utjecaja gangliozida na NKA različitim pristupima odlična polazišna točka koju treba popratiti s detaljnim razumijevanjem temeljnih procesa koji dovode do ovih promjena.

1.2.1. Na^+ , K^+ -ATPaza u bolestima središnjeg živčanog sustava

S obzirom na velik broj procesa u koje je ovaj enzim uključen, nije iznenađujuće kako se disfunkcije NKA povezuju s brojnim patofiziološkim promjenama u SŽS, poput glioma, multiple skleroze, subakutnog skleroznog panencefalitisa, PD, AD, sistemskog eritemskog lupusa, Downovog sindroma, te epilepsije (152)–(154). Različiti fenotipovi u epilepsiji povezani su s mutacijama gena koji kodiraju za izoforme α -podjedinice (126). Mutacije u genu koji kodira za $\alpha 1$ -podjedinicu povezane su s hipomagnezinemijom i epilepsijom u djece (155), a mutacije u genu za $\alpha 2$ -podjedinicu u obiteljskoj hemiplegijskoj migreni s pojavom epileptičkih napadaja u adolescentskoj dobi (156), te u oboljelih od polimikrogirije (157). Nekoliko različitih mutacija u genu za $\alpha 3$ -podjedinicu zabilježene su u naizmjeničnoj dječjoj hemiplegiji (158). Tijekom epileptičnih napadaja smanjena aktivnost NKA zabilježena je i kod ljudi kao i u mnogim istraživanjima na animalnim modelima epilepsije (159)–(162). Potencijalan mehanizam uključenosti NKA u patogenezu epileptičnih napadaja je da uslijed disfunkcije NKA dolazi do porasta unutarstanične koncentracije Na^+ što uzrokuje inhibiciju prijenosa gama-aminomaslačne kiseline (engl. *gamma*-aminobutyric acid, GABA), povećanja ekscitacije posredovane NMDA receptorom, te porast unutarstanične koncentracije Ca^{2+} uslijed interakcije s NCX (126). Snižena aktivnost i ekspresija NKA zabilježene su kod pacijenata oboljelih od AD i u animalnim modelima i kulturama stanica (163)–(167), a mutacije u genima za α -podjedinicu smatraju se važnim faktorom u razvoju patogeneze AD (154),(168).

Smanjenje aktivnosti NKA može biti izazvano lipidnom peroksidacijom, budući da amiloid dovodi do lipidne peroksidacije u kortikalnim i hipokampalnim neuronima (166). Utvrđeno je i stvaranje kompleksa između A β (1-42) peptida i NKA, u kojemu se amiloid veže u prazninu između α - i β -podjedinice te dovodi do gubitka aktivnosti enzima (169). Nedavno objavljeno istraživanje identificiralo je α 2-podjedinicu NKA kao pozitivni regulator neuroinflamacije ovisne o astrocitima budući da je njezina ekspresija zabilježena i u ljudi i na mišjem modelu tauopatija (170). Mutacije gena za α 3-podjedinicu povezane su i s manijom (171), a agrin, antagonist NKA, potencijalni je kandidat za njezino liječenje, kao i za liječenje drugih poremećaja s uočenim smanjenjem aktivnosti NKA (172). Brojni dokazi upućuju i na uključenost NKA u razvoju bipolarnog poremećaja (173), a smanjena aktivnost zabilježena je i u depresivnim poremećajima (174),(175). Smatra se kako inhibicijom kalcineurina dolazi do smanjenja aktivnosti NKA, što uzrokuje pojavu simptoma depresije djelovanjem signalnog puta mTOR (176). Smanjenje aktivnosti NKA uočeno je i u eksperimentalnom modelu ozljede mozga (177), kao i u životinjskom modelu akutne ishemije (178).

S obzirom na veliki broj dokaza o uključenosti NKA u patofiziološke promjene u SŽS, kao i u njegovom normalnom funkcioniranju i modulaciju različitih puteva prijenosa signala, ovaj enzim predstavlja zanimljivog kandidata za razvoj budućih terapija.

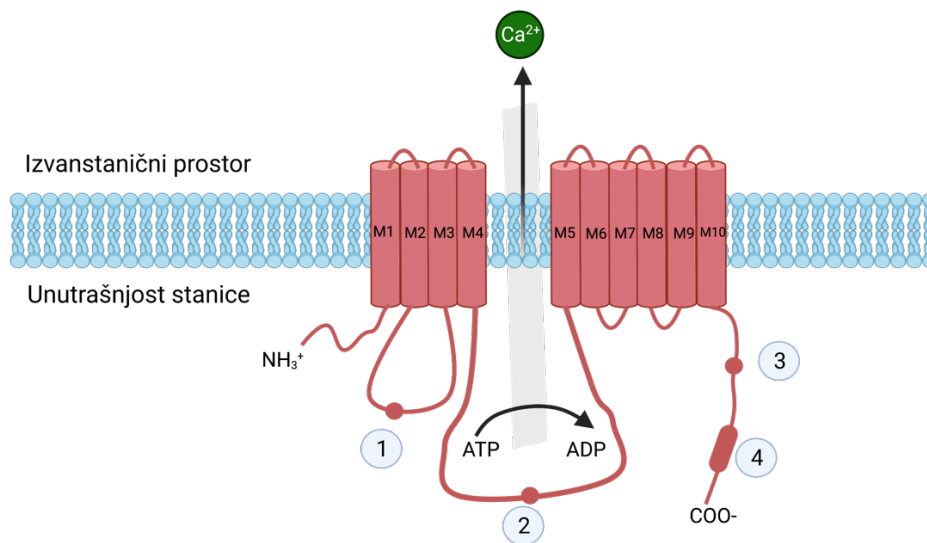
1.3. Ca²⁺-ATPaza STANIČNE MEMBRANE

PMCA (EC 3.6.3.8) je pripadnik porodice ATPaza topološkog tipa II i jedan je od ključnih enzima u održavanju stanične homeostaze Ca²⁺ (179). Samim time, PMCA je od velike važnosti zbog uloge Ca²⁺ kao drugog glasnika u putevima prijenosa signala uključenih u brojne stanične procese, poput fosforilacije i defosforilacije proteina, genske ekspresije, diobe stanice i stanične proliferacije (180). PMCA posjeduje veliki afinitet za prijenos unutarstaničnih Ca²⁺ iona u izvanstanični prostor, prenoseći jedan Ca²⁺ ion po hidroliziranoj molekuli ATPa, međutim pokazuje mali kapacitet za prijenos u usporedbi s drugim prijenosnicima Ca²⁺, poput NCX (181). U SŽS je koncentracija unutarstaničnog Ca²⁺ ključan regulatorni mehanizam uključen u procese otpuštanja neuroprijenosnika, prijenos signala, induciranje genske ekspresije, sinaptičku plastičnost, te procese učenja i pamćenja (182). Uslijed signalizacije posredovane Ca²⁺,

neuroni ponovno uspostavljaju osnovnu koncentraciju Ca^{2+} kako bi omogućili novu stimulaciju, te kako bi se spriječila citotoksičnost zbog povećane unutarstanične koncentracije Ca^{2+} (183). Upravo djelovanje PMCA jedan je od ključnih načina za održavanje unutarstanične koncentracije Ca^{2+} (181).

Strukturno se PMCA sastoji od 10 transmembranskih regija, dok su joj N- i C-krajevi s citosolne strane stanične membrane (180) (Slika 1.5.). U strukturi su od velike važnosti dvije unutarstanične petlje važne za ostvarivanje konformacijskih promjena u reakcijskom ciklusu enzima (184). Citosolna regija sadrži katalitičku domenu s veznim mjestom za ATP, te aspartatni ostatak podložan fosforilaciji (P-mjesto), karakterističan za ATPaze tipa P (184). Od velike važnosti su i tri mjesta alternativnog prekrajanja (A-, B- i C-mjesto), uslijed kojeg proizlazi velik broj proteina u rasponu masa 120-140 kDa (184). Četiri glavne izoforme PMCA u sisavaca, PMCA1-4, kodirane su četirima različitim genima (*ATP2B1-4*, *Atp2b1-4*), koji su kod ljudi i miševa izmješteni na različitim kromosomima (180),(184),(185). PMCA1 i 4 ubikvitarno su eksprimirane izoforme (180), a PMCA1 smatra se održavateljskom izoformom (engl. *House-keeping*) za čiji je nedostatak pokazano da u miševa uzrokuje smrt već u embrionalnom stadiju razvoja (186). PMCA2 i 3 predominantno su eksprimirane u SŽS i ekscitabilnim tkivima (180),(184),(187). PMCA2 posebno je zastupljena u Purkinjeovim i granularnim stanicama malog mozga, a PMCA3 u dendritičkim završetcima maloga mozga i koroidnog spleta (188). Funkcionalna značajnost i lokalizacija ostalih izoformi PMCA u SŽS još je uvijek nedovoljno istražena (189), no poznato je kako im se ekspresija mijenja tijekom različitih stadija razvoja mozga (190), te prilikom starenja (37). Osim njihove tkivno-specifične ekspresije, izoforme PMCA razlikuju se i po svojim kinetičkim svojstvima. PMCA1 i 4 smatraju se „sporim“, a PMCA2 i 3 „brzim“ izoformama zbog visoke bazalne aktivnosti (191). Osim uloge membranskog prijenosnika iona, PMCA je putem interakcija s drugim membranskim proteinima također uključena u puteve prijenosa signala u stanici (179). Zabilježeno je ostvarivanje interakcija s proteinima iz porodice membranski vezanih gvanilat-kinaza (engl. *membrane-associated guanylate kinase*, MAGUK)(192), regulatornim faktorom $2 \text{Na}^+/\text{H}^+$ izmjenjivača (engl. *Na^+/H^+ exchanger regulatory factor 2*, NHERF2) (193), Ania-3 Homer proteinom (194), neuronalnom sintazom dušikovog oksida (engl. *neuronal nitric oxide synthase*, nNOS) (195), te serinskom protein-kinazom

ovisnom o kalciju i kalmodulinu (engl. *calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase*, CASK) (196). PMCA je uključena i u regulaciju signalnog puta Ras/Erk putem interakcija s njegovim nizvodnim efektorom Rassf1A (197).



Slika 1.5. Shema strukture PMCA unutar stanične membrane. 1 – mjesto alternativnog prekrajavanja A; 2 – P-mjesto; 3 – mjesto alternativnog prekrajavanja C; 4 – vezno mjesto za kalmodulin. Shema kreirana na [Biorender.com](https://www.biorender.com).

Zanimljivo je za istaknuti kako je istraživanjem u staničnim kulturama utvrđena inhibicija aktivnosti PMCA u ovisnosti o NKA zbog termodinamičkog pomaka količine slobodne energije u korist NKA uslijed dostizanja kritične koncentracije ATP-a. Drugim riječima, NKA „krade“ ATP od PMCA odnosno dostupni ATP će iskoristiti NKA prije PMCA te dolazi do inhibicije aktivnosti PMCA (198). Aktivnost PMCA najvećim dijelom regulirana je vezanjem kalmodulina (engl. *calmodulin*, CaM) za regulatornu domenu čime se onemogućuje autoinhibicija enzima uslijed niskih koncentracija Ca^{2+} (199). Aktivnost joj regulira i citoplazmatska endopeptidaza kalpain aktivirana kalcijevim ionima (200), te proteinske kinaze A i C fosforilacijom serinskih i treoninskih ostataka na C-kraju proteina (201),(202). Promjene u lipidnom sadržaju membrana kao posljedica starenja također utječu na aktivnost PMCA (37)(203). U neuronalnim membranama najveća količina PMCA zastupljena je višesinaptičkim završecima u blizini mjesta otpuštanja neurotransmitera (191). Negativno nabijeni fosfolipidi, poput fosfatidilserina, kardiolipina, fosfatidilinozitola stimuliraju (204),(205), dok neutralni lipidi nemaju učinka na aktivnost PMCA (204). Fosfatidilinozitol-4,5- bisfosfat smanjuje

aktivnost PMCA u mozgu (204). Utvrđeno je kako je najveća aktivnost PMCA unutar mikrodomena LR bogatih gangliozidima i kolesterolom (37),(206).

Za gangliozide postoje saznanja da utječu na homeostazu Ca^{2+} u mozgu, te je pokazano kako promjena u količini pojedinih gangliozida kao posljedica starenja utječe na aktivnost PMCA. Gangliozid GD1b stimulira PMCA, GM1 smanjuje, a asialo-GM1 u potpunosti inhibira u mozgu štakora (181). Ista zapažanja zabilježena su prilikom dodavanjem egzogenih gangliozida u sinaptosome svinječeg mozga, ukazujući na važnost prisutnosti ostataka sijalinske kiseline u regulaciji aktivnosti PMCA (207). Gangliozidi GM1, GM2 i GM3 također su smanjivali aktivnost PMCA, a u istom istraživanju pokazano je i kako gangliozidi utječu na afinitet PMCA prema Ca^{2+} i kinetičke parametre enzima, na način da GD1b i GM2 povećavaju afinitet, dok GDb1 snižava, a GM2 povećava V_{\max} (207). Naša istraživačka skupina pokazala je da su kompleksi PMCA s neuroplastinom (engl. *neuroplastin*, Np) selektivno stabilizirani u lipidnim splavima koje sadrže GM1, te da promijenjen sastav ili poremećena organizacija lipidnih splavi rezultira promijenjenom regulacijom prometa Ca^{2+} iona u neuronima (208). Nadalje, pokazali smo da blokiranje GM1 specifičnim protutijelom u primarnim hipokampalnim kulturama rezultira odgođenim obnavljanjem razine Ca^{2+} iona nakon otpuštanja potaknutog električnim podražajem u somi hipokampalnih neurona (208). Naši preliminarni rezultati također ukazuju na preraspodjelu PMCA između organiziranih domena LR i ostatka membrane ukoliko je gangliozidni sastav stanične membrane promijenjen. Međutim, iako su neki učinci gangliozida na PMCA dokumentirani, točan mehanizam i prirodu interakcija između njih tek treba razjasniti.

1.3.1. Ca^{2+} -ATPaza stanične membrane u bolestima središnjeg živčanog sustava

Budući da je SŽS jedino mjesto u tijelu u kojemu su eksprimirane sve četiri izoforme PMCA, napravljen je velik broj istraživanja o mogućoj uključenosti ovog enzima u razvoj neuropatoloških promjena. Polimorfizmi gena *ATP2B2* koji kodira za PMCA2 zabilježeni su u ljudi s poremećajima iz spektra autizma (209),(210), a mutacije unutar ovog gena zabilježene su i u oboljelih i u mišjem modelu Huntingtonove bolesti (211). PMCA2 KO

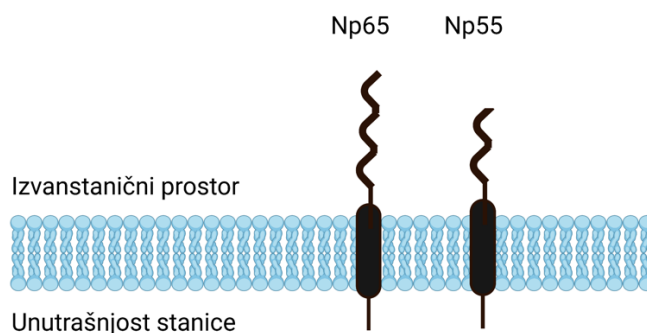
miševi razvijaju gluhoću i probleme s održavanjem ravnoteže i hodanjem, vjerojatno zbog visoke ekspresije ove izoforme u malome mozgu (212). Smanjena ekspresija PMCA2 zabilježena je i u štakorskom modelu autoimunog encefalomijelitisa (213). Mutacije unutar gena koji kodira za PMCA3 zabilježene su u oboljelih od cerebelarne ataksije (214),(215). Budući da je ekspresija PMCA2 i 3 ograničena na SŽS i ekscitabilna tkiva, nije neobično da se promjene u njihovim genima odražavaju u vidu različitih neuropatoloških fenotipova. Smanjenje ekspresije PMCA2 zabilježeno je i nakon inducirane ozljede kralježnične moždine u štakora (216). Medijatori lokalne upale u ozljedi SŽS, bradikinin i ATP aktiviraju PMCA4 u neuronima dentatnog girusa (217), što ukazuje da povećanje aktivnosti PMCA dovodi do povećane ekscitabilnosti senzornih neurona u odgovoru na ozljedu (218). Mutacije unutar gena *ATP2B4* utvrđene su u oboljelih od hereditarne spastične parapareze sa simptomima mentalne retardacije i konvulzijama (219). PMCA je i jedan od proteina čija se količina pokazala nižom u mozgu oboljelih od shizofrenije (220). Gubitak aktivnosti PMCA zabilježen je i u oboljelih od AD i PD, te u životinjskim modelima ovih neurodegenerativnih bolesti (221). Nemogućnost održavanja homeostaze Ca^{2+} u mozgu jedna je od značajki AD (218), te je dokazana inhibicija PMCA $A\beta$ -peptidom, s najvećim inhibitornim učinkom na PMCA4 (222). Pad aktivnosti PMCA uslijed akumulacije tau i $A\beta$ proteina, te posljedično povećanje unutarstanične koncentracije Ca^{2+} moguć je uzrok stanične smrti u AD (191). CaM kao aktivator PMCA predlaže se i kao ciljna molekula u razvoju terapija budući da je pokazano da kao antagonist $A\beta$ -peptida kompetitivno veže PMCA (223).

1.3.2. Glikoprotein neuroplastin kao funkcionalna podjedinica Ca^{2+} -ATPaze stanične membrane

Visokoglikozilirani protein Np pripadnik je porodice imunoglobulinskih proteina (engl. *immunoglobulins*, Ig) te je molekula stanične adhezije zadužena za *trans*-homofilno vezanje u sinapsama (224). Prepisivanjem jednog gena (*NPTN*, *Nptn*) nastaju dvije izoforme, ubikvitarno eksprimirana Np55 te Np65 eksprimirana u mozgu, s 2 odnosno 3 Ig domene (Slika 1.6.) (224),(225). Np65 predominantno je eksprimiran u neuronima moždane kore, hipokampusa i strijatuma, te u manjim količinama u talamusu

i hipotalamusu, dok je relativno slabo zastupljen u malome mozgu (225). Np55 je detektiran u svim regijama mozga, a u malome mozgu predstavlja 95% ukupnog Np (226). Np je uključen u regulaciju strukture i funkcije sinapsi i održavanje sinaptičke plastičnosti (227) te dugoročnu potencijaciju u CA1 hipokampalnim sinapsama (228), izrastanje neurita (229), procese učenja i formiranja asocijativnog pamćenja (230), a uključen je i u puteve prijenosa signala u stanici interakcijom sa signalnim putem MAPK kinaza (231). Identificiran je i kao vezni partner receptora GABA-e (232) i faktora 6 povezanim s receptorom faktora tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*, TRAF6) (233). Promjena u ekspresiji Np povezana je s brojnim poremećajima SŽS i njihovim životinjskim modelima, uključujući shizofreniju (234), poremećaje iz spektra autizma (235), razvoj simptoma anksioznosti i depresije (236) i AD (237).

Np je identificiran kao vezni partner i funkcionalna podjedinica PMCA ključna za njezinu ekspresiju i aktivnost, te shodno tome i za homeostazu Ca^{2+} (225),(238). Kompleks ljudske PMCA1 i Np strukturno je opisan krioelektronskom mikroskopijom u istraživanju koje je pokazalo kako PMCA1 bez Np gubi svoju katalitičku aktivnost, te je definirano i vezno mjesto unutar transmembranske uzvojnice Np i transmembranske regije PMCA1 (239).



Slika 1.5. Shema strukture Np65 i Np55. Uz transmembransku domenu, izoforma Np65 posjeduje tri, a Np55 dvije imunoglobulinske domene usmjerene u izvanstanični prostor. Shema kreirana na [Biorender.com](https://www.biorender.com).

Nadalje, poznato je da dolazi do preraspodjele Np između različitih membranskih domena, te je većina Np preferentno zastupljena u domenama LR, ukazujući na važnost lipidnog mikrookoliša za njegovo funkcioniranje i ostvarivanje interakcija s proteinima poput glutamatnih receptora, receptora GABA-e i PMCA (240). Naša istraživačka skupina utvrdila je da uslijed promijenjenog sastava gangliozida membrane dolazi do promjene u ekspresiji i imunolokalizaciji Np u mišjem hipokampusu (241). Ova vrijedna opažanja polazišna su točka za rasvjetljavanje načina na koji lipidni okoliš modulira funkciju Np i posljedično stanične procese i razvoj neuropatofizioloških promjena u koje je ovaj protein uključen.

Svrha ovog doktorskog rada je primjenom metoda analize genske i proteinske ekspresije, submembranske lokalizacije i enzimске aktivnosti NKA i PMCA doprinijeti razumijevanju funkcionalnosti ovih enzima. Pri tome ćemo uzeti u obzir kompleksnu mrežu interakcija između NKA i PMCA unutar membrane i unutar stanice, te imati na umu važnost lipidnog mikrookoliša na njihovo funkcioniranje uslijed promijenjenog sastava gangliozida. Rezultati ovog istraživanja će doprinijeti rasvjetljavanju utjecaja gangliozida na aktivnost membranskih prijenosnika iona zaduženih za stvaranje akcijskog potencijala neurona i unutarstaničnu signalizaciju, kao i razumijevanju patologije poremećaja u ljudi uzrokovanih mutacijama u genima koji kodiraju za enzime biosintetskog puta gangliozida (urođenih poremećaja glikozilacije gangliozida).

2. HIPOTEZA

Povećana količina gangliozida a-serije i nedostatak gangliozida b- i c-serije u moždanom tkivu miševa *St8sia1 null* uzrokuje smanjenje genske i proteinske ekspresije membranskih prijenosnika iona NKA i PMCA, manju enzimsku aktivnost NKA i PMCA, te intramembransku redistribuciju NKA, PMCA i neuroplastina, funkcionalne podjedinice PMCA.

3. CILJEVI RADA

3.1. OPĆI CILJ

Sustavno utvrditi utjecaj promijenjenog sastava gangliozida membrane na gensku i proteinsku ekspresiju, te submembransku lokalizaciju NKA, PMCA i Np, kao i na enzimsku aktivnost NKA i PMCA u različitim regijama mozga koristeći se mišjim modelom *St8sia1 null* s poremećenom sintezom gangliozida.

3.2. SPECIFIČNI CILJEVI

- I) Odrediti proteinsku i gensku ekspresiju NKA, PMCA i Np u regijama mozga mišjeg modela *St8Sia1 null* u usporedbi s odgovarajućim kontrolama.
- II) Odrediti enzimsku aktivnost NKA i PMCA u regijama mozga miševa *St8Sia1 null* u usporedbi s odgovarajućim kontrolama.
- III) Odrediti utjecaj promjene sastava gangliozida membrane na submembransku lokalizaciju PMCA, NKA i Np u regijama mozga miševa *St8Sia1 null* u odnosu na odgovarajuće kontrole.
- IV) Odrediti koncentraciju kolesterola u homogenatima i frakcijama lipidnih splavi i ne-splavi u regijama mozga miševa *St8Sia1 null* u usporedbi s odgovarajućim kontrolama.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. MATERIJAL

4.1.1. Pokusne životinje

U svrhu ovog istraživanja korišteno je ukupno 25 miševa dvaju sojeva: 12 miševa soja *St8sia1 null* s poremećenom sintezom gangliozida i 13 kontrolnih miševa soja B6;129S. Sve korištene životinje muškog su spola i starosti 6 mjeseci. Životinje su ustupljene ljubaznošću prof. dr. sc. Marije Heffer s Katedre za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku. Miševi su uzgajani u Vivariju i prostoru za kirurške zahvate na glodavcima Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku, u nastambi broja odobrenja HR-POK-005. Životni uvjeti uzgoja definirani su ciklusima dan/noć u intervalima od 12 sati (12/12) uz stalno održavanje temperature i vlažnosti zraka. Hrana i voda bile su dostupne životinjama *ad libitum*, u okolišu obogaćenom predmetima za igru. Rad s mišjim modelima odobren je od strane Etičkog povjerenstva 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). Životinje su uzgajane i korištene u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/2017), Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/2013) te Direktivom 2010/63/EU Parlamenta Europske unije. Rad sa životinjama odvijao se prema smjernicama ARRIVE 2.0 za rad sa laboratorijskim životinjama uz poštovanje načela 3R (242).

4.1.1.1. Uzorkovanje

Životinje su korištene isključivo u svrhu uzorkovanja tkiva te nisu podvrgnute eksperimentalnim postupcima. Usmrćene su u komori s CO₂ bez anestetika za eutanaziju, nakon čega je izdvojen mozak. Mozgovi su potom neuroanatomski disecirani izdvajajući tri moždane regije za analizu; moždanu koru, hipokampus i mali mozak.

Pojedinačne regije su potom smrznute u tekućem dušiku te pohranjene na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do korištenja.

4.1.2. Kemikalije, predgotovljeni kompleti, protutijela i početnice

U svrhu istraživanja korištene su kemikalije navedene u Tablici 4.1, te predgotovljeni kompleti navedeni u Tablici 4.2. U Tablici 4.3. navedena su protutijela s pripadajućim razrjeđenjima korištena za westernsku metodu otiska, a u Tablici 4.4. sekvencije početnica korištenih za izvedbu lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR).

Tablica 4.1. Popis kemikalija korištenih u istraživanju

Kemikalija	Proizvođač	Kataloški broj
Adenozin-trifosfat, ATP	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	A9062-1G
Amonijev molibdat heksahidrat, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	09878-25G
Brij® O20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	436240-100G
Ditiotreitol	Fluka BioChemica, Buchs, Švicarska	43819
Fenilmetansulfonil-fluorid	Acros Organics B.V.B.A., Geel, Belgija	215740050
Gangliozid GD1b	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	G0146-1MG
Gangliozid GT1b	Ustupljeno ljubaznošću prof. Schnaara	
Glicin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	G7126-1KG
Inhibitor proteaza cComplete Mini, EDTA free	Roche Holding AG, Basel, Švicarska	11836170001
Kalcijev klorid, CaCl_2	Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska	11072 06
Kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4	Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska	11124 08
Kalijev klorid, KCl	Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska	11209 07
Karboksieozin	Marker Gene Technologies, Inc., Eugene, OR, SAD	111900
Magnezijev klorid, MgCl_2	Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska	13017 07
Metanol, CH_3OH	Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska	13089 01
Natrijev dodecilsulfat, SDS	GE Healthcare Life Sciences	17-1313-01
Natrijev fluorid, NaF	Alkaloid, Skopje, Sjeverna Makedonija	-
Natrijev hidrogenfosfat, Na_2HPO_4	Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska	14098 06
Natrijev klorid, NaCl	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
Saharozna	Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska	18004 08
Sumporna kiselina, H_2SO_4	Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska	18165 01
Trikloroctena kiselina, CCl_3COOH	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Njemačka	8789
Tris(hidroksimetil)aminometan, Tris	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	252859-500G
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	P1379-100ML
Željezo (II) sulfat heptahidrat, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	215422-250G

Tablica 4.2. Popis predgotovljenih kompleta korištenih u istraživanju

Svrha	Naziv	Proizvođač	Kat. broj
Komplet za izolaciju ribonukleinske kiseline	GeneJET RNA Purification kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	K0702
Komplet za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu	qRT-PCR SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA	4309155
Komplet za provjeru kakvoće ribonukleinske kiseline na mikročipovima	Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD	5067-1511
Komplet za određivanje koncentracije kolesterola	Aplex™ Red Cholesterol Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	A12216
Komplet za određivanje koncentracije proteina	Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD	23225
Komplet za reverznu transkripciju	High-Capacity RNA-to-cDNA™ KIT with RNase Inhibitor	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA	4388950
Komplet za tretman Dnazom I	DNase I Amplification grade	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD	EN0521
Komplet za vizualizaciju kemiluminiscencije	SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	34095
Pufer za denaturaciju uzoraka	NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	NP0007
Reducirajuća otopina	NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD	NP0009

Tablica 4.3. Popis protutijela korištenih u westernskoj metodi otiska s pripadajućim razrjeđenjima

Primarna protutijela				
Naziv	Klasa protutijela	Organizam porijekla	Proizvođač i kataloški broj	Razrjeđenje
Anti-Neuroplastin (Np)	Poliklonalno, IgG	Ovca	R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD, AF5360	1:1000
Anti-Na ⁺ /K ⁺ ATPaza (panNKA)	Monoklonalno, IgG	Kunić	Abcam, Cambridge, UK, ab300507	1:2500
Anti-Na ⁺ /K ⁺ ATPaza izoforma α 1	Monoklonalno, IgG	Kunić	Abcam, Cambridge, UK, AEP1845Y	1: 100 000
Anti-Plazma membranska Ca ²⁺ ATPaza (panPMCA)	Molonklonalno, IgG	Miš	Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka, #MABN1802	1:2000
Anti-Plazma membranska Ca ²⁺ ATPaza izoforma 1 (PMCA1)	Monoklonalno, IgG	Kunić	Abcam, Cambridge, UK, ab190355	1:1000
Anti-Plazma membranska Ca ²⁺ ATPaza izoforma 2 (PMCA2)	Poliklonalno, IgG	Kunić	Abcam, Cambridge, UK, ab3529	1:1000
Anti-Plazma membranska Ca ²⁺ ATPaza izoforma 3 (PMCA3)	Poliklonalno, IgG	Kunić	Novus Biologicals, Bio-Techne Ltd., Abingdon, UK, NBP1-59465	1:1000
Anti-Plazma membranska Ca ²⁺ ATPaza izoforma 4 (PMCA4)	Monoklonalno, IgG	Miš	Abcam, Cambridge, UK, ab2783	1:1000
Anti-Transferinski receptor (TfR)	Monoklonalno, IgG	Miš	Thermo Fisher, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA, 136800	1:1000
Anti-Flotilin (Flot)	Monoklonalno, IgG	Miš	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA, 610821	1:1000
Podjedinica beta Kolera toksina (CTB) konjugirana HRP-om	Rekombinantno	/	Thermo Fisher, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA, C34780	1: 50 000
Sekundarna protutijela				
Anti-mišje protutijelo HRP-konjugirano	Poliklonalno, IgG	Magarac	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, SAD, 715-035-150	1: 50 000
Anti-kunić protutijelo HRP-konjugirano	Poliklonalno, IgG	Magarac	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, SAD, 711-035-152	1: 50 000
Anti-ovčje protutijelo HRP-konjugirano	Poliklonalno, IgG	Magarac	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, SAD, 713-035-147	1: 50 000
Anti-kozje protutijelo HRP-konjugirano	Poliklonalno, IgG	Magarac	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, SAD, 705-035-003	1: 50 000

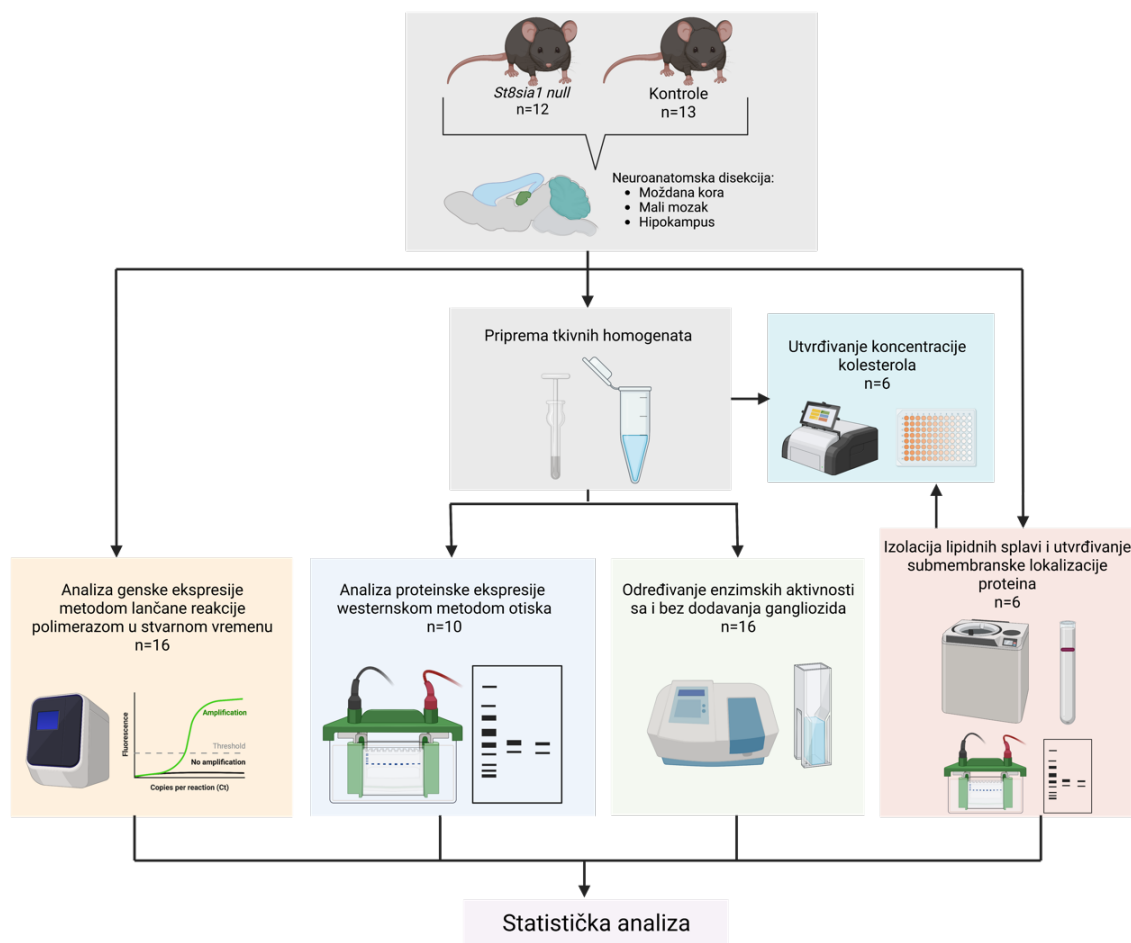
Tablica 4.4. Sekvencije početnica korištenih za metodu qRT-PCR. Sekvencije su navedene u 5' → 3' smjeru *

Gen	Uzvodna početnica	Nizvodna početnica	Veličina produkta (pb)
<i>Actb</i>	CATTGCTGACAGGATGCAGAA	GCTGATCCACATCTG CTGGA	55
<i>Atp1a1</i>	TTGAAGAGACAGCCCTTGCT	GAGGGGATACATCCTAAGGGC	74
<i>Atp1a2</i>	AGTCCATCGCATAACCCCTG	GGAAGGGGATGTTGGCAAT	82
<i>Atp1a3</i>	TCGGCTTGTTGAGGAGACG	GAGAGGGTACATGCGAAGGG	83
<i>Atp1b1</i>	TTAAGAGCTGATCACAAGCACA	ACTTATTAATGGCTAGTGGGAAAG	50
<i>Atp1b2</i>	TCAGCCTTGGTGGCTGTAA	TGCGGCATTCAACATTCACC	68
<i>Atp1b3</i>	CATTCAATGTGGGCCATGC	TCTGGTCTCGATATTCGGAACCT	63
<i>Atp2b1</i>	TGGCAAACAACACTAGTTGCATATAGTGG	TCCTGTTCAATTCGACTCTGCAAGCCTCG	57
<i>Atp2b2</i>	GCTGAACTTGGTCACACAGTC	AGTGGAGCCCATGTCTTGC	50
<i>Atp2b3</i>	TCCTGTTCAATTCGACTCTGCAAGCCTCG	TCTGCTCTGCTCAATTCGG	68
<i>Atp2b4</i>	CAAGCTTCGGGTACTGGCAC	TTTCACCAATGTGTGCTTGTCTG	55
<i>Nptn</i>	TCTCGCTCTTGTGGTCTCT	TGGTGACAATTCTTGGTTCCG	113

* pb – broj parova baza

4.2. METODE

Na Slici 4.1. dan je shematski prikaz istraživanja s brojem životinja čije je tkivo korišteno za pojedinu metodu.



Slika 4.1. Shematski prikaz istraživanja. Shema kreirana na [Biorender.com](https://www.biorender.com).

4.2.1. Analiza genske ekspresije metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

U svrhu utvrđivanja utjecaja promijenjenog gangliozidnog sastava na gensku ekspresiju NKA, PMCA i Np, te njihovih pojedinačnih izoformi korištena je metoda qRT-PCR. U svrhu analize korišteno je tkivo regija mozga iz 16 životinja, 8 *St8sia1 null* i 8 kontrolnih.

4.2.1.1. Izolacija ribonukleinske kiseline

Ukupna ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*, RNA) izolirana je pomoću predgotovljenog kompleta GeneJET RNA Purification kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), prema uputama proizvođača u sljedećim koracima:

1. Izvagano tkivo mase ≥ 10 mg homogenizirano je u ohlađenom Potter-Elvehjem staklenom homogenizatoru s teflonskim tučkom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), u 300 μ L pufera za lizu s dodatkom 2 M ditionitola.
2. Na homogenat je dodano 200 μ L otopine proteinaze K, te je smjesa promiješana i inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi (ST).
3. Otopina je centrifugirana 10 min, na 12 000 g, pri ST, pomoću centrifuge Microspin 12 High-speed Mini-centrifuge (Biosan Sia, Riga, Latvija).
4. Izdvojen je supernatant na koji je dodano 450 μ L 96% etanola (v/v).
5. 700 μ L smjese prenešeno je na kolonice za izolaciju RNA. Kolonice su potom centrifugirane do protjecanja ukupnog volumena kroz kolonicu.
6. Na kolonice je dodano 500 μ L pufera za ispiranje 1. Kolonice su centrifugirane do protjecanja ukupnog volumena.
7. Na kolonice su dodana dva alikvota od 500 μ L pufera za ispiranje 2. Kolonice su centrifugirane do protjecanja ukupnog volumena.
8. Pročišćena RNA isprana je s kolonica u 10 μ L vode bez nukleaza.
9. Čistoća i koncentracija RNA provjerene su pomoću spektrofotometra NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, SAD).

Provjera kvalitete izolirane RNA dijela uzoraka provjerena je na mikročipovima pomoću predgotovljenog kompleta Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) na bioanalizatoru Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) prema uputama proizvođača:

1. Boja RNA 6000 Nano promiješana je tijekom 10 s.
2. Dodano je 1 μL boje RNA 6000 Nano u 65 μL filtriranog gela RNA 6000.
3. Mješavina je centrifugirana brzinom od 10864 g tijekom 10 min pomoću centrifuge Hettich Universal 32 R (Andreas Hettich GmbH & Co., Tuttlingen, Njemačka).
4. 9 μL mješavine gela i boje naneseo je u za to predviđenu jažicu na čipu.
5. Mješavina gela i boje raspodjeljena je u preostale jažice na čipu na za to predviđenom nosaču tijekom 30 s.
6. Naneseno je 9 μL mješavine gela i u ostale predviđene jažice na čipu.
7. Naneseno je 5 μL RNA 6000 Nano markera u za to predviđene jažice na čipu.
8. Naneseno je 1 μL RNA 6000 Nano standarda u za to predviđene jažice na čipu.
9. Naneseno je 1 μL pojedinog uzoraka u za to predviđene jažice na čipu.
10. Sadržaj jažica na čipu promiješan je pomoću uređaja IKA vortexer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) tijekom 1 min.
11. Rezultati su očitani na bioanalizatoru.

Nakon očitavanja na instrumentu dobiveni su podaci o kvaliteti izolirane RNA – omjer 28S i 18S rRNA, RIN vrijednost te prikaz virtualne elektroforeze (primjer je dan u Dodatku 2.). Za analizu genskog izražaja na mikromrežama izabrani su uzorci čije su RIN vrijednosti iznosile minimalno 7.

4.2.1.2. Priprema komplementarne deoksiribonukleinske kiseline

Pročišćena RNA podvrgnuta je tretmanu DNazom I (DNase I Amplification grade, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i prepisivanju u komplementarnu deoksiribonukleinsku kiselinu reverznom transkripcijom (engl. *complementary deoxyribonucleic acid*, cDNA) pomoću predgovotljenog kompleta High-Capacity RNA-to-cDNA™ KIT with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) prema uputama proizvođača:

1. Priređena je reakcijska smjesa sastava 1 ng RNA, 1 μ L 10 X puferske smjese, te 1 μ L DNaze I.
2. Reakcijske smjese su inkubirane 15 min pri ST.
3. U reakcijske smjese je dodan 1 μ L Stop otopine.
4. DNaza I inaktivirana je zagrijavanjem smjese na 70 °C tijekom 10 min pomoću termokružnika 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).
5. Nakon hlađenja, na priređenu smjesu dodana je matična otopina za reverznu transkripciju priređena prema uputama proizvođača.
6. Reakcije su podvrgnute sljedećem ciklusu pomoću termokružnika 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA):
25°C 10 min
37°C 120 min
85°C 5 min
4°C ∞
7. Čistoća i koncentracija cDNA provjerene su pomoću spektrofotometra NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, SAD). Za daljne eksperimente korištena je cDNA razrijeđena 10X u vodi bez nukleaza.

4.2.1.3. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

cDNA odabranih gena koji kodiraju za NKA, PMCA i Np te njihove specifične izoforme umnožena je pomoću predgotovljenog kompleta qRT-PCR SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) koristeći specifične početnice dizajnirane u našem laboratoriju (Tablica 4.4). Za dizajn početnica korištene su sekvencije preuzete iz javno dostupne baze www.ensembl.org, a početnice su dizajnirane pomoću mrežnog alata *NCBI Primer Blast* (NCBI, Bethesda, MD, SAD), te su naručene od dobavljača (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD). Početnice za umnažanje gena *Atp2b1* i *Atp2b3* preuzete su iz literature (243),(244). Specifičnost početnica povjerena je klasičnom PCR metodom provjerom veličine dobivenih DNA fragmenata na agaroznom gelu. Primjer utvrđivanja specifičnosti početnica na gelu dan je u Dodatku 2. Reakcijske smjese priređene su u tehničkim duplikatima na pločicama s 96 jažica do konačnog volumena 25 μL dodavanjem sljedećih otopina:

1. 12,5 μL SYBER Mix
2. 0,5 μL 5 μmolL^{-1} odgovarajućih početnica
3. 1 μL cDNA
4. 10,5 μL vode bez nukleaza.

Reakcije su podvrgnute ciklusu:

95°C 10 min	} 45x
95°C 15s	
60°C 60 s	

pomoću uređaja 7900 HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) nakon čega je slijedio ciklus u kojemu je linearnim porastom temperature od 60 °C do 95 °C određena temperatura mekšanja cDNA.

4.2.1.4. Obrada podataka

Očitane vrijednosti fluorescencije za pojedine gene korištene su za određivanje relativne količine mRNA u uzorku metodom $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Kritični broj ciklusa, vrijednost Ct , određen je kao arbitrarni prag na sredini linearnog dijela krivulje umnažanja. Vrijednost

ΔCt je određena kao razlika srednje vrijednosti tehničkih replika Ct gena od interesa i Ct unutarnje kontrole, aktina (*Actb*). Vrijednost $\Delta\Delta Ct$ je određena kao razlika ΔCt vrijednosti gena od interesa i unutarnje kontrole. Uvrštavanjem u izraz $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dobivene su vrijednosti relativne količine mRNA za pojedini gen u odnosu na mRNA unutarnje kontrole.

4.2.2. Analiza proteinske ekspresije westernskom metodom otiska

U homogenatima tkiva regija mozga westernskom metodom otiska analizirana je proteinska ekspresija odabranih izoformi NKA, PMCA i Np u svrhu utvrđivanja utjecaja promjenjenog gangliozidnog sastava na ekspresiju navedenih proteina. U svrhu analize korišteno je tkivo regija mozga iz 10 životinja, 5 *St8sia1 null* i 5 kontrolnih.

4.2.2.1. Priprema homogenata i određivanje koncentracije proteina

10%-tni vodeni homogenati odleđenog tkiva regija mozga priređeni su u prethodno ohlađenom Potter-Elvehjem staklenom homogenizatoru s teflonskim tučkom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), uz 15 potisaka. Koncentracija ukupnih proteina u homogenatima određena je na mikrotitarskim pločicama pomoću predgotovljenog kompleta za kvantitativno određivanje koncentracije proteina Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD), prema uputama proizvođača:

1. Priređena su serijska razrjeđenja 2 mg/ml serumskog albumina goveda (engl. *bovine serum albuminum*, BSA) u rasponu od 25 µg/mL do 1 mg/mL u svrhu izrade baždarnog pravca.
2. Svježe je pripremljena radna otopina miješanjem otopina A i B iz kompleta u omjeru 50:1.
3. U jažicama mikrotitarske pločice pomiješano je 25 µL homogenata s 200 µL radne otopine za uzorke, a 25 µL i 200 µL radne probe za slijepu probu. Reakcije su priređene u tehničkim triplikatima.

4. Pločice su inkubirane 30 min na 37 °C do razvitka ljubičastog obojenja.
5. Apsorbancija je očitana pri 560 nm na uređaju GloMax® Discoverer (Promega, Madison, WI, SAD).
6. Izmjerene apsorbancije i vrijednosti korištene su kao y varijabla za izračunavanje koncentracije proteina, x varijable, u jednadžbi Lambert-Beerovog zakona uz vrijednosti koeficijenta smjera pravca i odsječka na y-osi iz priređenog baždarnog pravca. Za daljnje postupke korišteno je 15 mg/mL proteina.

4.2.2.2. Westernska metoda otiska

Za razdvajanje proteina elektroforezom u denaturirajućim uvjetima (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS PAGE) korišteni su gelovi umreženosti 12% iz predgotovljenog kompleta TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Solutions (BioRad, Hercules, CA, SAD) priređeni prema uputama proizvođača. *Stain-free* tehnologija koristi poliakrilamidne gelove s inkorporiranom bojom koja veže triptofanske ostatke proteina, uslijed čega se nakon fotoaktivacije UV svjetlom mogu vizualizirati svi proteini na gelu, što omogućuje kvantifikaciju proteina od interesa normalizacijom prema ukupnim proteinima na membrani, te nije potrebna detekcija održavateljskih proteina (engl. *Housekeeping proteins*).

Postupak:

1. Uzorci tkiva regija mozga priređeni kako je navedeno u koraku 4.2.2.1. denaturirani su za elektroforezu u 7,5 µL matične otopine priređene miješanjem predgotovljenog pufera za denaturaciju NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4x) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i reducirajuće otopine NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u omjeru 2:1, nakon čega su uzorci inkubirani 5 min na 95 °C. Za analizu je korišteno 15 mg/mL proteina.
2. 25 µL uzoraka nanešeno je na priređene gelove uz nanošenje 4 µL smjese proteina poznate molekulske mase PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD).

3. Elektroforeza je izvođena u kadici Mini Gel Tank, Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), 15 min pri 80 V, te potom 90 min pri 120 V, u puferu za razdvajanje sastava 25 mM Tris, 192 mM glicin, 1% SDS u H₂O.
4. Gelovi su isprani i fotoaktivirani UV svjetlom pomoću uređaja ChemiDoc MP Imaging System (BioRad, Hercules, CA, SAD).
5. Proteini su preneseni na polivinil-difluoridnu (PVDF) membranu (PVDF Transfer Membrane, 0.45 μm, 26.5 cm x 3.75 m; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u modulima za prijenos proteina na membranu Mini Blot Module Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) pri 30 V u trajanju od 1 h, u puferu za prijenos proteina na membranu sastava 5 mM Tris, 192 mM glicin, 20% (v/v) metanol.
6. Membrane su fotografirane pomoću uređaja ChemiDoc MP Imaging System (BioRad, Hercules, CA, SAD).
7. Membrane su blokirane u 5% otopini mlijeka u prahu u 1X fosfatnom puferu s dodatkom detergenta (PBST) sastava 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0,1% Tween-20, pri ST u trajanju 1 h.
8. Membrane su inkubirane u otopinama odgovarajućih primarnih protutijela (Tablica 4.3.), u otopini za blokiranje na 4 °C preko noći.
9. Membrane su isprane 3 puta u 1X PBST puferu u trajanjima od 10 min.
10. Membrane su inkubirane u otopinama odgovarajućih sekundarnih protutijela (Tablica 4.3.), 1h pri ST.
11. Membrane su isprane 3 puta u 1X PBST puferu u trajanjima od 10 min.
12. Proteini od interesa vizualizirani su na membrani pomoću predgotovljene reagensije za kemiluminiscentnu vizualizaciju SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), te fotografirane pomoću uređaja ChemiDoc MP Imaging System (BioRad, Hercules, CA, SAD).

4.2.3.1. Obrada podataka

U svrhu kvantifikacije dobivenih rezultata korišteno je javno dostupno sučelje *ImageLab 6.1.* (BioRad, Hercules, CA, SAD) kompatibilno s uređajem ChemiDoc MP Imaging System. Fotografije ukupnih proteina na membrani nakon prijenosa, te fotografije kemiluminiscentnog signala proteina od interesa korišteni su za kvantitativnu analizu na sljedeći način:

1. Fotografije ukupnih proteina na membrani nakon prijenosa, te fotografije kemiluminiscentnog signala proteina od interesa unesene su u sučelje *ImageLab 6.1.*
2. Fotografije su objedinjene pomoću funkcije *File > Create Multi Channel Image.*
3. Pomoću funkcije *Lane and Bands* označene su pojedine jažice s ukupnim proteinima i kemiluminiscentnim signalom.
4. Pomoću funkcije *Detect Bands* detektiraju se proteinske vrpce na membranama.
5. Funkcijom *Analysis Table* dobiju se vrijednosti volumena intenziteta signala u pojedinim proteinskim vrpcama koje se koriste za određivanje omjera intenziteta kemiluminiscentnog signala u odnosu na signale ukupnih proteina na membrani.

4.2.3. Izolacija lipidnih splavi

Membranske frakcije LR i ostatka membrane, ne-splavi (engl. *Non-lipid rafts*, nLR) izolirane su u svrhu utvrđivanja utjecaja promijenjenog gangliozidnog sastava na submembransku lokalizaciju proteina od interesa u membranskim domenama LR i nLR. Korišten je protokol koji je optimizirala naša istraživačka skupina (150),(208),(240), a metoda se zasniva na netopljivosti LR u neionskom detergentu BrijO20 uslijed čega dolazi do odvajanja frakcija LR ultracentrifugiranjem u diskontinuiranom gradijentu saharoze. Za analizu je korišteno tkivo regija mozga iz 10 životinja, 5 *St8sia1 null* i 5 kontrolnih.

Priređene su otopine sljedećih sastava: pufer za izolaciju lipidnih splavi (engl. *Raft buffer*, RB) sastava 50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ i CaCl₂, 0,32M otopina saharoze u RB-u, 1% otopina BrijO20 u RB-u. Za diskontinuirani gradijent pripremljene su 3%, 35% i 80% otopine saharoze u 1% otopini BrijO20 u RB-u. Otopine pufera pripremljene su uz dodatak inhibitora proteaza; 1mM fenilmetilsulfonil fluorida, 5mM natrijevog fluorida te koktela inhibitora proteaza Complete™ (Roche, Basel, Švicarska). Slijedio je postupak:

1. Odmrznuto je i izvagano tkivo regija mozga. Za postupak je korišteno ≥ 70 mg tkiva.
2. U prethodno ohlađenom Potter-Elvehjem staklenom homogenizatoru s teflonskim tučkom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) tkivo je homogenizirano u 3 mL 0,32M otopine saharoze u RB-u, uz 30 potisaka.
3. Smjese su centrifugirane na 1000 g, 20 minuta pri 4 °C pomoću centrifuge Hettich Universal 32 R (Andreas Hettich GmbH & Co., Tuttlingen, Njemačka).
4. Odvojen je postnuklearni supernatant koji je prebačen u tubice 50.4 Ti (Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD).
5. Tubice su ultracentrifugirane na 100 000 g, 45 minuta pri 4 °C pomoću ultracentrifuge Beckman Optima XL-80K (Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD) u rotoru 50.4 Ti (Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD). U ovom koraku izdvojene su membrane u obliku taloga.
6. Talog je otopljen u 1 mL 1% otopini BrijO20 u RB-u, te je homogeniziran u Potter-Elvehjem staklenom homogenizatoru s teflonskim tučkom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), uz 15 potisaka.
7. 600 μ L membranskog homogenata pomiješano je sa 600 μ L 80% otopine saharoze u 1% otopini BrijO20 u RB-u na dnu pothlađene SW 28.1 Ti epruvete (Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD).
8. Na zamiješani uzorak, pažljivo je nadliveno 10 mL 35% otopine saharoze što je potom nadliveno s 4 mL 3% otopine saharoze u 1% otopini BrijO20 u RB-u.
9. Priređeni diskontinuirani gradijent saharoze se pažljivo premjesti u rotor SW 28.1 Ti (Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD) i centrifugira na 141 000 g, 18

sati pri 4 °C pomoću ultracentrifuge (Beckman Optima XL-80K (Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD).

10. Skupljene su frakcije od 1,5 mL (1-10), od gore prema dolje. Frakcije rednog broja 3 i 4 sadrže LR, dok su frakcije nLR u frakcijama 9 i 10. Prikaz frakcija nakon izolacije dan je u Dodatku 3.

Uspješnost izolacije membranskih frakcija potvrđena je westernskom metodom otiska. Pojedine frakcije priređene su za elektroforezu miješanjem 15 µL pojedine frakcije s predgotovljenim puferom za denaturaciju NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4x) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i reducirajućom otopinom (NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u omjeru 2:1, te su dalje praćeni koraci opisani u odjeljku 4.2.3. Membrane se inkubiraju u otopinama protutijela za biljege LR, GM1 i Flotilina-1, te nLR, transferinskog receptora (Tablica 4.3.). Izolacija je smatrana uspješnom ukoliko su markeri LR i nLR prisutni u odgovarajućim frakcijama.

4.2.4. Određivanje koncentracije kolesterola

U svrhu utvrđivanja utjecaja promijenjenog gangliozidnog sastava na koncentraciju i submembransku lokalizaciju kolesterola mjerena je njegova koncentracija u homogenatima tkiva regija mozga i frakcijama LR i nLR pomoću predgotovljenog kompleta Amplex™ Red Cholesterol Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Za analizu je korišteno tkivo regija mozga iz 6 životinja, 3 *St8sia1 null* i 3 kontrolne.

1. Reakcijski pufer i enzimski smjesa priređeni su prema uputama proizvođača.
2. U svrhu izrade baždarnog pravca priređena su serijska razrjeđenja standarda na mikrotitarskim pločicama prema uputama proizvođača.
3. Na mikrotitarskim pločicama priređene su reakcije u duplikatima miješanjem 5 µL uzorka s 45 µL reakcijskog pufera i 50 µL enzimski smjese.
4. Reakcije su inkubirane 30 min pri 37 °C, u mraku.

5. Očitane su vrijednosti fluorescencije pri ekscitaciji na 520 nm i emisiji na 590 nm pomoću uređaja GloMax® Discoverer (Promega, Madison, WI, SAD).
6. Uvrštavanjem očitanih vrijednosti fluorescencije vrijednosti u jednadžbu pravca izračunata je koncentracija kolesterola u uzorcima.

4.2.5. Određivanje enzimskih aktivnosti ATPaza

Enzimska aktivnost NKA i PMCA određivana je u svrhu utvrđivanja utjecaja promijenjenog sastava gangliozida na prijenos Na^+ , K^+ i Ca^{2+} preko stanične membrane. Aktivnost je određivana spektrofotometrijski prema optimiziranom protokolu naše istraživačke skupine (150),(208),(240), a metoda je zasnovana na mjerenju količine oslobođenog anorganskog fosfata (P_i) nastalog hidrolitičkim cijepanjem ATP-a tijekom mehanizma djelovanja navedenih enzima. Nakon dodavanja reagensa koji stvara obojene komplekse s oslobođenim P_i , mjeri se apsorbancija koja se koristi za izračunavanje aktivnosti enzima.

Provedena su dva tipa eksperimenata:

- I) Određivanje enzimskih aktivnosti u tkivima regija mozga životinja *St8sia1 null* i kontrolnih životinja. Za potrebe ove metode korišteni su 10%-tni vodeni homogenati regija mozga iz 10 životinja, 5 *St8sia1 null* i 5 kontrolnih, priređeni u koraku 4.2.2.1.
- II) Određivanje enzimskih aktivnosti u tkivima regija mozga životinja *St8sia1 null* i kontrolnih životinja uz predinkubaciju s egzogenim gangliozidima b- serije, GD1b i GT1b. Za potrebe ove metode korišteni su 10%-tni vodeni homogenati regija mozga iz 6 životinja; 3 kontrolne i 3 *St8sia1 null*.

4.2.5.1. Određivanje enzimskih aktivnosti u tkivima *St8sia1* null i kontrolnih životinja

Za set eksperimenata I) za pojedini uzorak priređene su 4 zasebne matične otopine (A-D) za mjerenje:

- A. Bazalne količine oslobođenog fosfata.
- B. Ukupne količine oslobođenog fosfata.
- C. Količine oslobođenog fosfata uz ouabainom inhibiranom aktivnosti NKA.
- D. Količine oslobođenog fosfata uz karboksieozinom inhibiranom aktivnosti PMCA.

Sastav pojedinih matičnih otopina dan je u Tablici 4.5.

Tablica 4.5. Sastav otopina za određivanje aktivnosti ATPaza

	A / μL	B / μL	C / μL	D / μL
1 μM Karboksieozin	/	/	/	50
10 mM Ouabain	/	/	50	/
75 mM Tris-HCl	200	200	200	200
30 mM MgCl_2	50	50	50	50
1 M NaCl	50	50	/	50
20 mM KCl	50	50	/	50
Uzorak	50	50	50	50
H_2O	100	50	100	/

Slijedio je postupak:

1. Sadržaj tubica je promiješan i inkubiran na 37°C, 10 min uz njihanje.
2. U otopinama B, C i D reakcija je pokrenuta dodavanjem 50 μL 30 mM ATP-a.
3. Sadržaj tubica je promiješan i inkubiran 15 min na 37°C, uz njihanje.
4. Reakcije su zaustavljene dodavanjem 500 μL ledene trikloroctene kiseline.
5. Tubice su centrifugirane 10 min, na 21290 rpm, pri 4 °C pomoću centrifuge Hettich Universal 32 R (Andreas Hettich GmbH & Co., Tuttlingen, Njemačka).
6. Iz reakcija je izdvojeno 500 μL supernatanta koji je pomiješan s 500 μL reagensa sastava 1% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$, 4% FeSO_4 u 0,6 M H_2SO_4 .
7. Tubice su inkubirane 45 min na ST do pojave plavičastog obojenja.
8. Apsorbancija je mjerena na 700 nm pomoću spektrofotometra Varian Cary 100 bio 8 (SpectraLab Scientific Inc., Markham, ON, Kanada).

4.2.5.1. Određivanje enzimskih aktivnosti u moždanoj kori životinja uz predinkubaciju s egzogenim gangliozidima

Za set eksperimenata II) za pojedini uzorak priređene su 4 zasebne matične otopine u kojima su u volumenu vode navedenom u Tablici 4.1. otopljeni gangliozidi GD1b i GT1b u koncentracijama 10^{-6} mM. Slijedila je predinkubacija pojedinih reakcija od 120 min pri 37°C , nakon čega su slijedio postupak naveden u odjeljku 4.2.5.1. Eksperiment je ustrojen na temelju preliminarnih eksperimenata u kojima su homogenati moždane kore kontrolnih životinja predinkubirani s gangliozidima GD1b i GT1b u koncentracijama 10^{-3} mM, 10^{-4} mM, 10^{-5} mM i 10^{-6} mM u vremenskim intervalima od 15, 30, 60 i 120 min pri 37°C , nakon čega je slijedio postupak naveden u odjeljku 4.2.5.1., te je uočena najveća razlika u aktivnosti NKA i PMCA u slučaju predinkubacije homogenata s gangliozidima u koncentracijama 10^{-6} mM u trajanju od 120 min.

4.2.5.3. Obrada podataka

Kako bi se dobivene vrijednosti mogle koristiti za izračun aktivnosti NKA i PMCA načinjen je baždarni pravac pomoću poznatih koncentracija otopine fosfata u rasponu od 50 μg do 500 μg . U jednadžbu pravca uvrste se vrijednosti dobivene sljedećim načinom:

1. Vrijednostima reakcija B, C i D oduzme se vrijednost bazalne količine oslobođenog fosfata A.
2. Vrijednost B - C daje vrijednost ouabainom inhibirane aktivnosti NKA.
3. Vrijednost B - D daje vrijednost karboksieozinom inhibirane aktivnosti PMCA.
4. Uvrštavanjem dobivenih vrijednosti u jednadžbu pravca izračuna se količina oslobođenog Pi.
5. Vrijednosti aktivnosti su izražene kao μmol oslobođenog Pi po mg proteina po satu ($\mu\text{mol Pi} / (\text{mg}_{\text{proteina h}})$).

4.2.6. Statistička analiza

Hipoteza istraživanja obuhvaća sljedeće parametre: I) proteinsku ekspresiju, II) gensku ekspresiju, III) enzimsku aktivnost i IV) submembransku lokalizaciju proteina od interesa. Za svaki parametar zasebno je izračunata potrebna veličina uzorka. Za izračun veličine uzoraka korišteni su preliminarni rezultati i javno dostupan statistički alat *G*Power v.3.1.* (245), te je izračunata veličina uzorka iznosila 5+5 životinja za parametre I), II) i III). Broj životinja korišten za utvrđivanje submembranske lokalizacije proteina određen je prema preporukama struke te publikacijama (150),(208),(240),(246). Distribucija podataka utvrđena je Shapiro-Wilk testom. Obzirom na distribuciju podataka korišten je parametrijski Student *t*-test za normalno distribuirane podatke, odnosno Mann-Whitney test za podatke koji ne prate normalnu distribuciju. Svi podaci obrađeni su te prikazani grafički i tablično kao srednja vrijednost +/- standardna pogreška (SEM) uz pomoć programa *GraphPad Prism version 9 for macOS* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Statistička značajnost definirana je na razini $p < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. GENSKA EKSPRESIJA

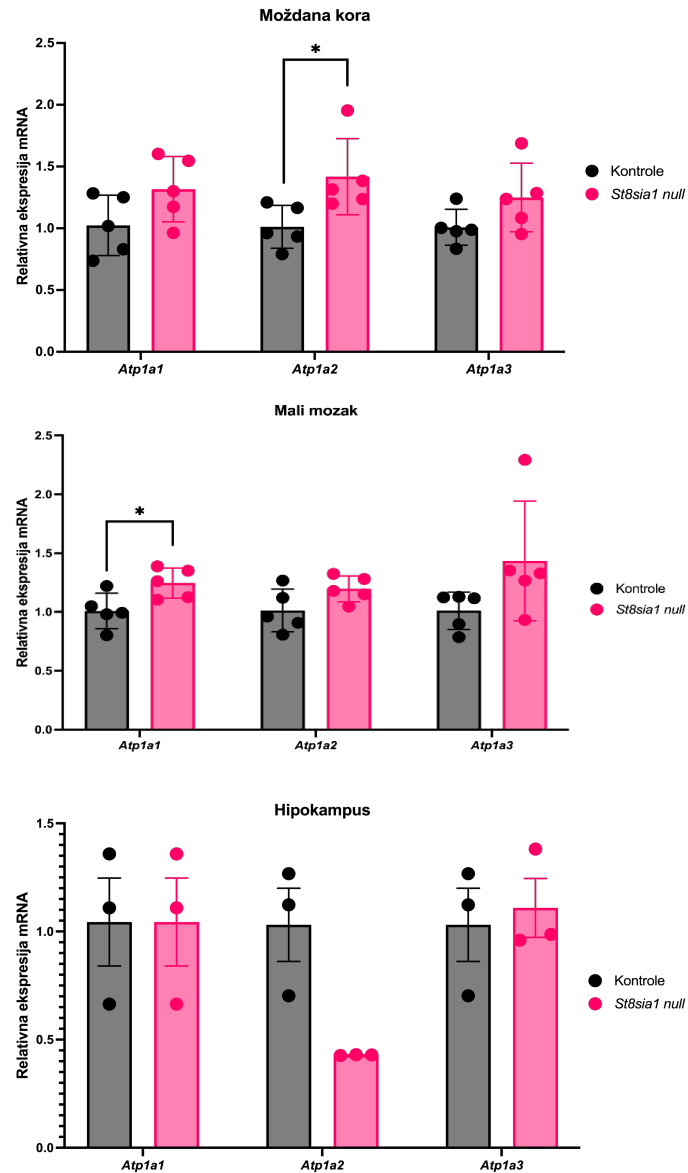
U svrhu utvrđivanja mogućeg utjecaja promijenjenog sastava gangliozida na gensku ekspresiju odabranih proteina u tkivu regija mozga miševa *St8sia1null* u odnosu na kontrolne miševe, metodom qRT-PCR utvrđena je relativna ekspresija mRNA koje kodiraju za pojedinačne izoforme NKA i PMCA, te gena za Np. Analizirano je tkivo moždane kore, maloga mozga i hipokampusa, a navedene regije izabrane su za analizu zbog poznatih razlika u sadržaju pojedinih gangliozida.

5.1.1. Ekspresija gena za katalitičke podjedinice Na⁺,K⁺-ATPaze

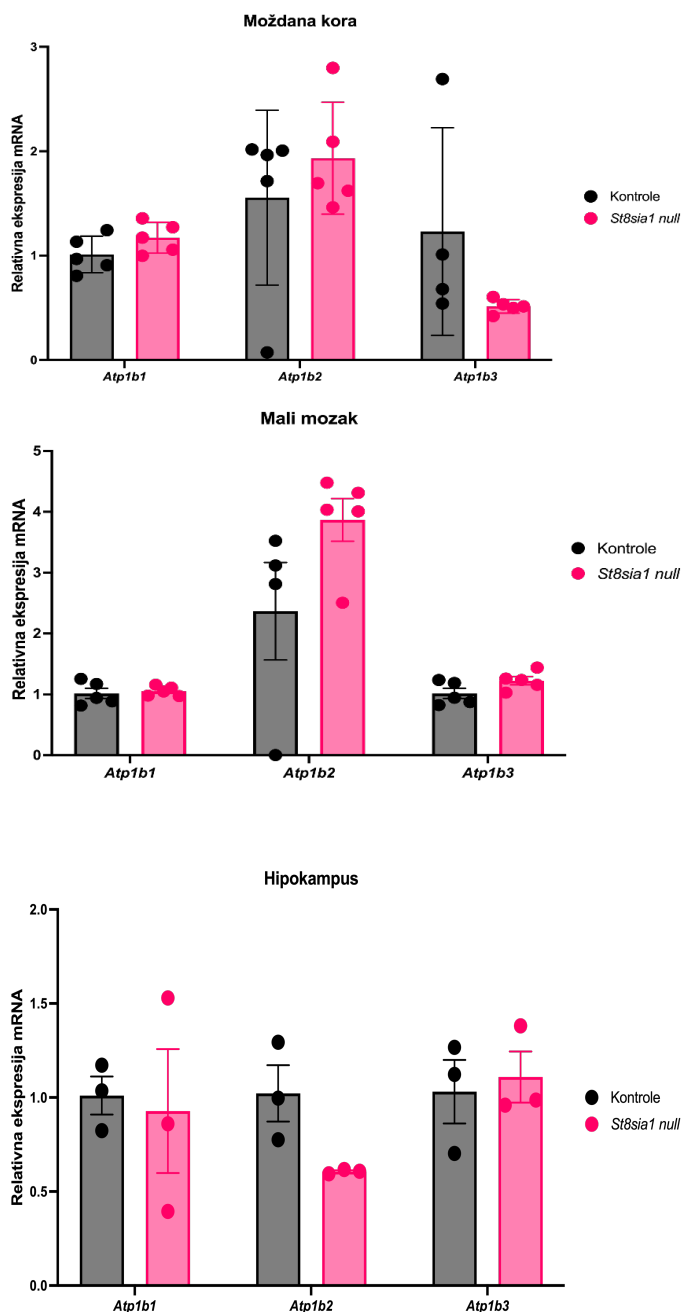
Metodom RT-qPCR u tkivima moždane kore, maloga mozga i hipokampusa utvrđena je relativna ekspresija mRNA gena *Atp1a1*, *Atp1a2* i *Atp1a3* koji redom kodiraju za katalitičke, $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ podjedinice NKA odgovorne za prijenos Na⁺ i K⁺ preko stanične membrane. Obrazac porasta ekspresije sva tri gena utvrđen je u tkivu moždane kore i maloga mozga miševa *St8sia1 null* u odnosu na kontrolne. Statistički značajno je povećanje u ekspresiji gena *Atp1a1* u malome mozgu životinja *St8sia1null* u odnosu na kontrolne životinje ($p < 0,05$, Studentov *t*-test), te gena *Atp1a2* u moždanoj kori životinja *St8sia1null* u odnosu na kontrolne životinje ($p < 0,05$, Studentov *t*-test) (Slika 5.1.1). Uočeno je smanjenje ekspresije gena *Atp1a2* i porast ekspresije gena *Atp1a3* u hipokampusu životinja *St8sia1null* u odnosu na kontrolne životinje (Slika 5.1.1.).

5.1.2. Ekspresija gena za β podjedinice Na⁺,K⁺-ATPaze

U tkivu moždane kore, maloga mozga i hipokampusa utvrđena je i relativna ekspresija gena *Atp1b1*, *Atp1b2* i *Atp1b3* koji redom kodiraju za regulatorne $\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 3$ podjedinice NKA odgovorne za transport i pozicioniranje katalitičkih podjedinica NKA u staničnoj membrani. Studentovim *t*-testom nije utvrđena statistički značajna razlika u relativnoj ekspresiji mRNA ovih gena niti u jednoj od tri analizirane regije moga, no uočen je obrazac porasta ekspresije gena *Atp1b2* u moždanoj kori i malome mozgu, a smanjenja u hipokampusu životinja *St8sia1 null* (Slika 5.1.2.).



Slika 5.1.1. Ekspresija gena koji kodiraju za katalitičke podjedinice NKA u tkivu moždane kore, maloga mozga i hipokampusa kontrolnih i *St8sia1 null* životinja. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Zvezdica (*) predstavlja statistički značajnu razliku u usporedbi s miševima divljeg tipa, $p < 0,05$ (Studentov *t*-test). $n = 10$ (moždana kora i mali mozak); $n = 6$ (hipokampus).

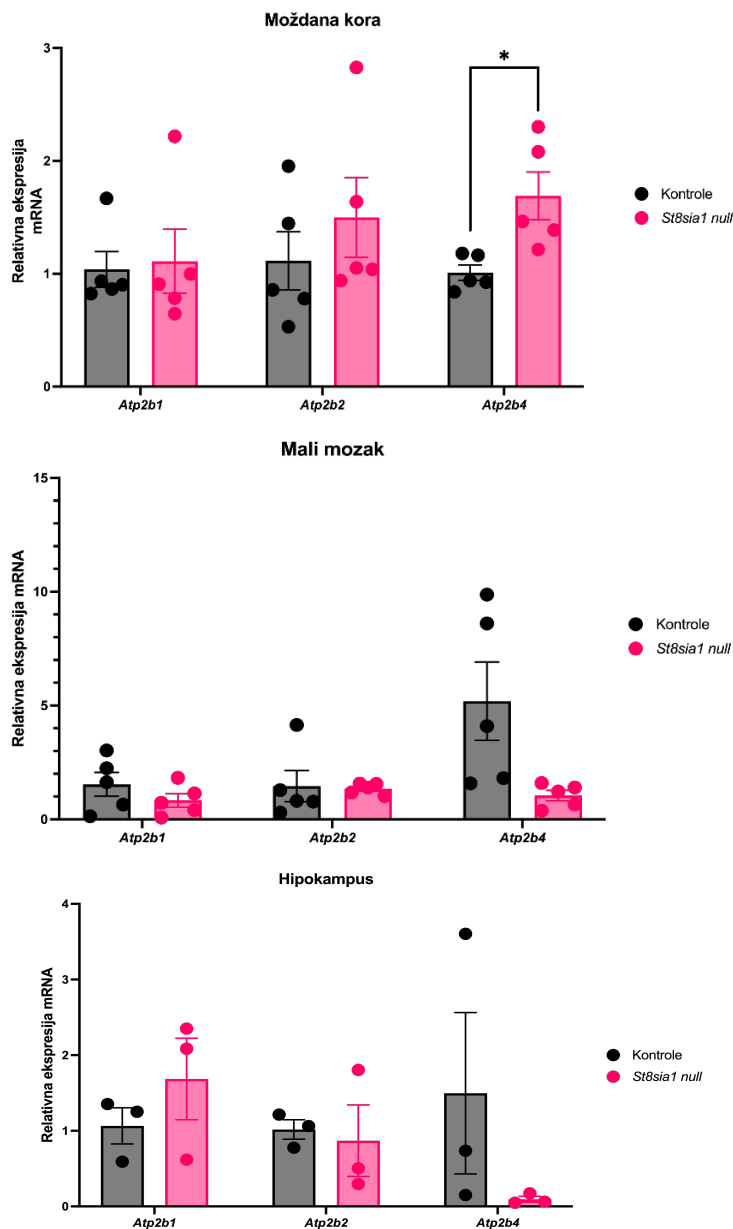


Slika 5.1.2. Ekspresija gena koji kodiraju za regulatorne podjedinice NKA u tkivu moždane kore, maloga mozga i hipokampusu kontrolnih i *St8sia1 null* životinja. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Zvezdica (*) predstavlja statistički značajnu razliku u usporedbi s miševima divljeg tipa, $p < 0,05$ (Studentov *t*-test). $n = 10$ (moždana kora i mali mozak); $n = 6$ (hipokampus).

5.1.3. Ekspresija gena za izoforme Ca^{2+} -ATPaze stanične membrane

Metodom RT-qPCR analizirana je ekspresija gena *Atp2b1*, *Atp2b2*, *Atp2b3* i *Atp2b4* koji kodiraju za izoforme PMCA 1-4. Rezultati analize ekspresije kodirajuće mRNA za gen

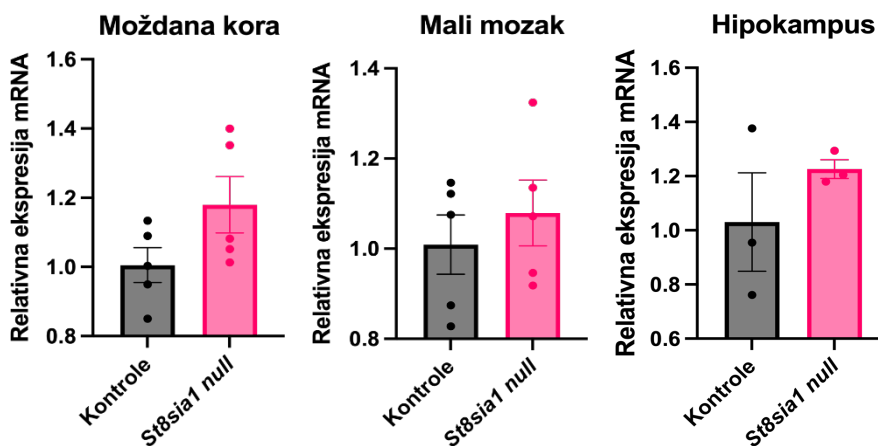
Atp2b3 izostavljeni su iz analize prema pravilima struke zbog prevelikog kritičnog broja ciklusa potrebnih da bi se umnožila određena količina mRNA (više od 45 ciklusa) zbog čega gensku ekspresiju PMCA3 izoforme možemo smatrati zanemarivom. Utvrđen je obrazac porasta ekspresije gena *Atp2b2* u moždanoj kori i *Atp2b1* u hipokampusu miševa *St8sia1null*, a statistički je značajno povećanje relativne ekspresije mRNA gena *Atp2b4* koji kodira za izoformu PMCA4 u tkivu moždane kore životinja *St8sia1null* u odnosu na kontrolne životinje ($p < 0,05$, Studentov *t*-test) (Slika 5.1.3.).



Slika 5.1.3. Ekspresija gena koji kodiraju za izoforme PMCA u tkivu moždane kore, maloga mozga i hipokampusu kontrolnih i *St8sia1 null* životinja. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Zvezdica (*) predstavlja statistički značajnu razliku u usporedbi s miševima divljeg tipa, $p < 0,05$ (Studentov *t*-test). $n=10$ (moždana kora i mali mozak); $n=6$ (hipokampus).

5.1.4. Ekspresija gena *Nptn*

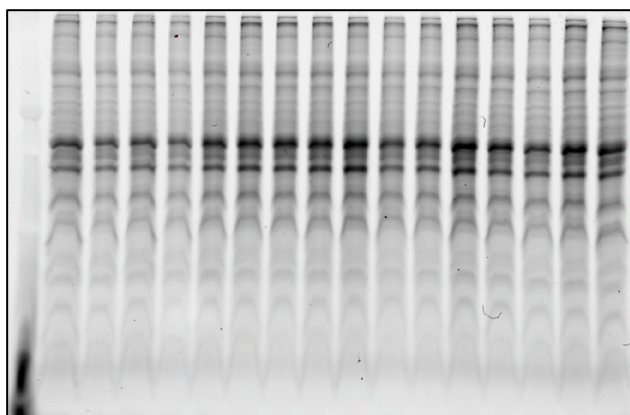
Metodom qRT-PCR utvrđena je ekspresija gena za neuroplastin, *Nptn*. Prepisivanjem istog gena nastaje proteinski produkt koji se naknadno postranskripcijskom modifikacijama prekraja u dvije izoforme, Np55 i Np65. Studentovim *t*-testom nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji gena *Nptn* između *St8sia1 null* i kontrolnih životinja u istraživanim moždanim regijama, no prisutan je obrazac porasta ekspresije u sve tri regije mozga miševa *St8sia1 null* (Slika 5.1.4.).



Slika 5.1.4. Ekspresija gena *Nptn* koji kodira za Np u tkivu moždane kore i maloga mozga kontrolnih i *ST8sia1 null* životinja. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. $n=10$ (moždana kora i mali mozak); $n=6$ (hipokampus).

5.2. PROTEINSKA EKSPRESIJA

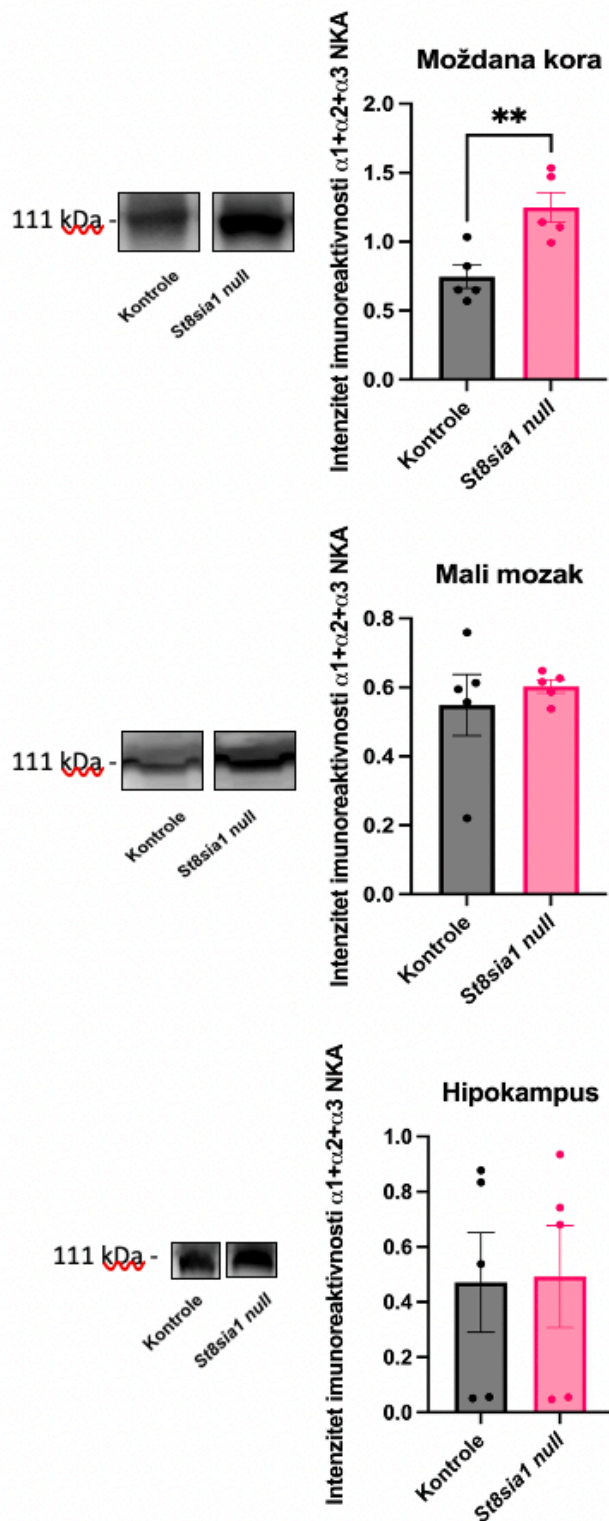
Kao sljedeći korak u sveobuhvatnoj analizi utjecaja promjene gangliozidnog sastava na ekspresiju NKA, PMCA i Np, westernskom metodom otiska analizirana je njihova proteinska ekspresija u tkivu moždane kore, maloga mozga, te hipokampusa miševa *St8sia1null* u odnosu na kontrolne miševe. Za kvantifikaciju je korištena *Stain-free* metoda u kojoj se ukupna količina proteina nanešenih u pojedinu jažicu koristi kao standard prema kojemu se normalizira intenzitet imunoreaktivnosti signala za pojedino protutijelo (Slika 5.2.). Fotografije membrana za pojedine proteine dane su u Dodatku 3.



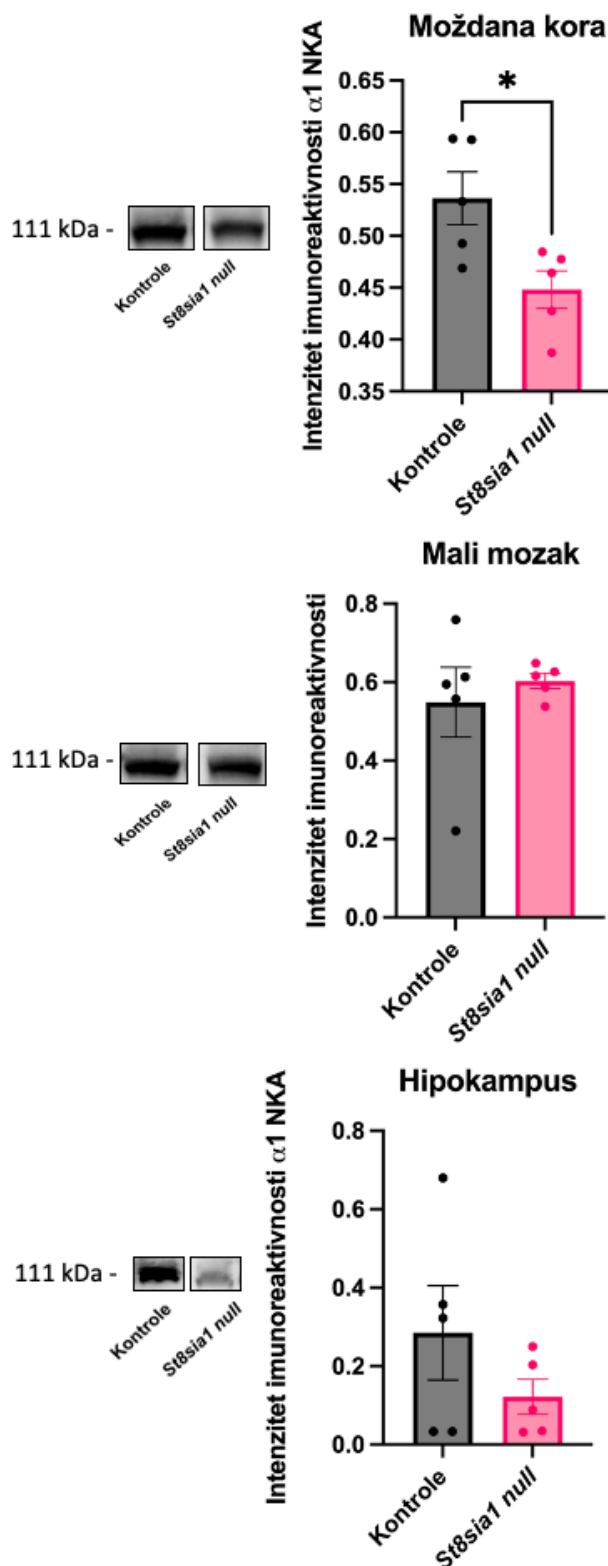
Slika 5.2. Reprezentativni prikaz *stain-free* gela nakon fotoreaktivacije UV svjetlom. Na gel su naneseni uzorci jednake koncentracije proteina, što osigurava kvalitetu kvantifikacije imunoreaktivnosti.

5.2.1. Proteinska ekspresija Na^+ , K^+ -ATPaze

Westernskom metodom otiska u tkivima moždane kore, maloga mozga i hipokampusa *St8sia1 null* i kontrolnih miševa utvrđen je intenzitet imunoreaktivnosti ukupnih katalitičkih podjedinica NKA koristeći se panNKA protutijelom koje prepoznaje i veže $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ podjedinice. Ukupan sadržaj $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ podjedinice NKA statistički je značajno veći u tkivu moždane kore miševa *St8sia1 null* u odnosu na kontrolne miševe ($p < 0,001$, Studentov *t*-test) (Slika 5.2.1.). Nadalje, u istim regijama analiziran je i sadržaj ubikvitarno eksprimirane $\alpha 1$ podjedinice NKA koristeći se protutijelom specifičnim za tu podjedinicu. Uočen je obrazac smanjenja sadržaja $\alpha 1$ podjedinice NKA u moždanoj kori i hipokampusu miševa *St8sia1 null* u odnosu na kontrolne miševe, ali statistički značajno smanjenje utvrđeno je jedino u tkivu moždane kore ($p < 0,05$, Studentov *t*-test) (Slika 5.2.2.), dok je u tkivu maloga mozga zabilježen obrazac porasta.



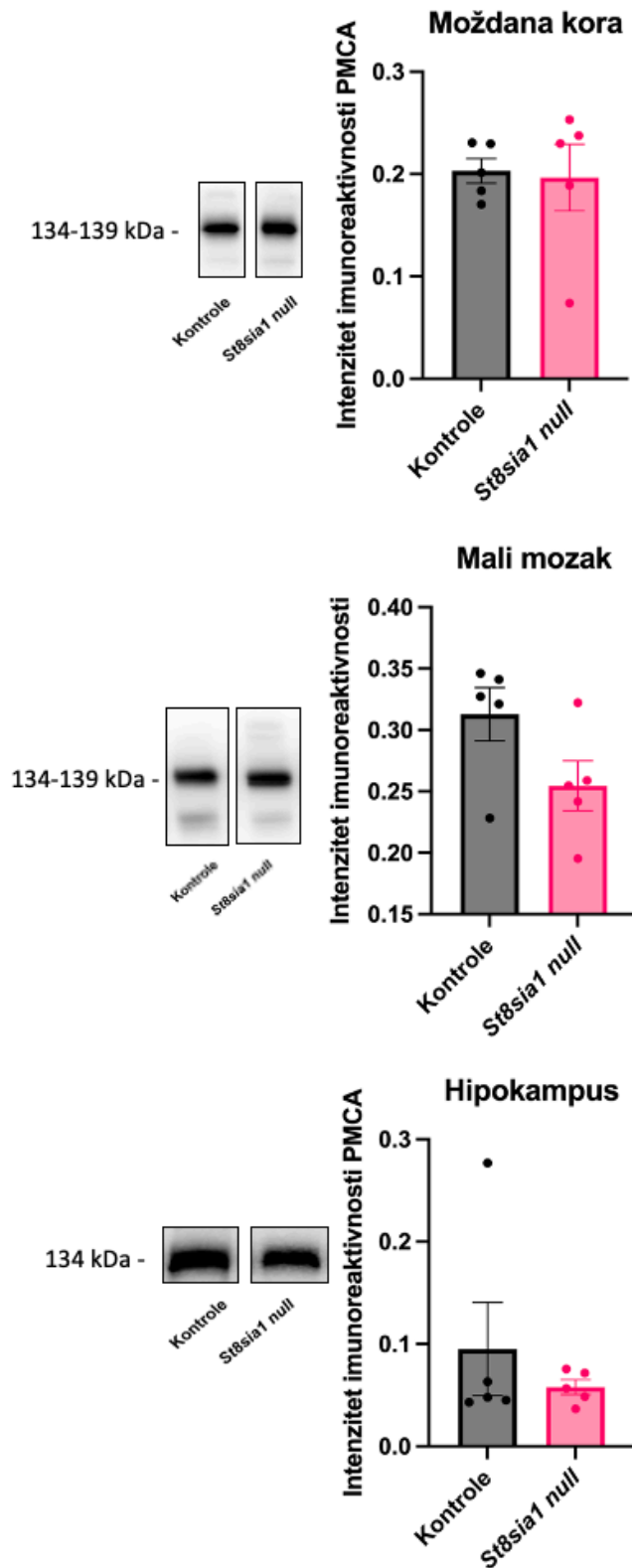
Slika 5.2.1. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti ukupnih katalitičkih podjedinica NKA u tkivu moždane kore, maloga mozga i hipokampusa kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Zvezdice (**) predstavljaju statistički značajnu razliku u usporedbi s miševima divljeg tipa, $p < 0,001$ (Studentov *t*-test). $n = 10$.



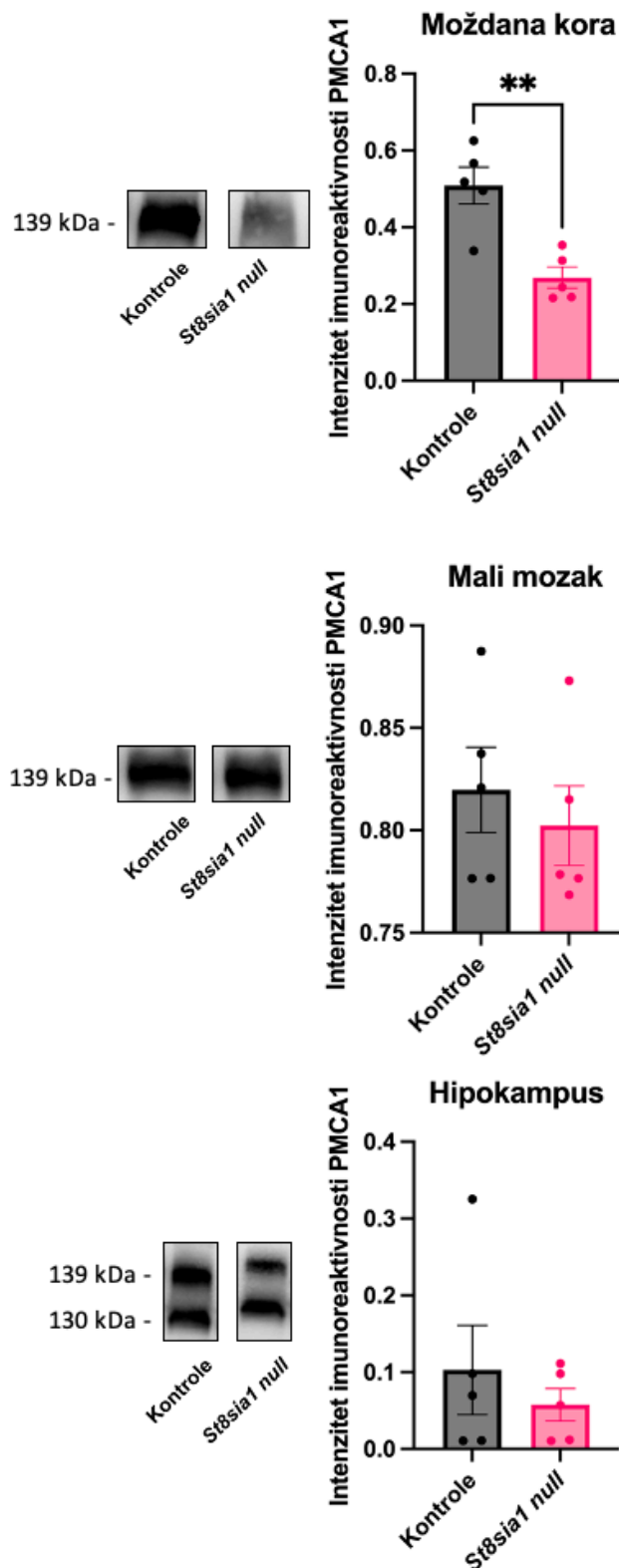
Slika 5.2.2. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti $\alpha 1$ podjedinice NKA u tkivu moždane kore, maloga mozga i hipokampusa kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Zvezdica (*) predstavlja statistički značajnu razliku u usporedbi s miševima divljeg tipa, $p < 0,05$ (Studentov *t*-test). $n=10$.

5.2.2. Proteinska ekspresija Ca^{2+} -ATPaze stanične membrane

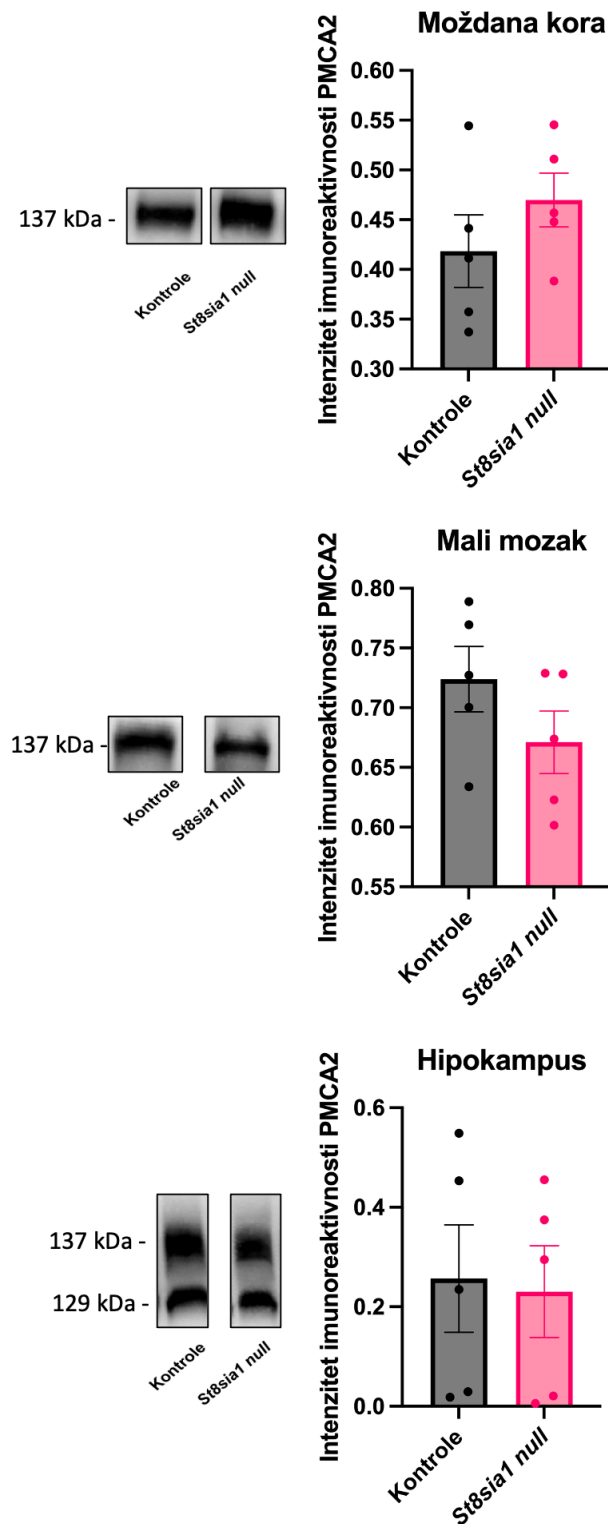
Westernskom metodom otiska u homogenatima tkiva moždane kore, maloga mozga i hipokampusa *St8sia1 null* i kontrolnih miševa analizirana je ekspresije ukupne PMCA, te izoformi PMCA 1-4 koristeći se protutijelima specifičnim za ukupnu PMCA (panPMCA) i svaku izoformu pojedinačno. Na Slici 5.2.3. prikazani su rezultati analize imunoreaktivnosti ukupne PMCA u navedenim regijama mozga. Budući da u niti jednoj od regija nije uočena statistički značajna razina u ekspresiji, pristupljeno je analizi svake izoforme pojedinačno. Analizom sadržaja ubikvitarno eksprimirane PMCA1 pomoću specifičnog protutijela utvrđen je trend smanjenja količine ove izoforme u sve tri analizirane regije miševa *St8sia1 null* u odnosu na kontrolne miševe, dok je smanjenje statistički značajno u tkivu moždane kore ($p < 0,001$, Studentov *t*-test) (Slika 5.2.4.). Također je ustanovljeno i postojanje dvije varijante ove izoforme, PMCA1a i PMCA1b u tkivu hipokampusa. Slika 5.2.5. prikazuje analizu intenziteta imunoreaktivnosti PMCA2 u istim tkivnim homogenatima, te je utvrđeno smanjenje ekspresije ove inačice PMCA specifične za neurone u regijama mozga *null* miševa (Slika 5.2.5.). Analiza intenziteta imunoreaktivnosti izoforme PMCA3, također specifične za neurone, pokazala je statistički značajno smanjenje u ekspresiji ove izoforme u malome mozgu miševa *St8sia1 null* u odnosu na kontrolne miševe ($p < 0,001$, Studentov *t*-test), te porast u hipokampusu (Slika 5.2.6.). Na Slici 5.2.7. prikazana je analiza ekspresije ubikvitarno eksprimirane izoforme PMCA4 za koju je ustanovljeno statistički značajno smanjenje sadržaja u tkivu moždane kore miševa *St8sia1 null* u odnosu na kontrolne miševe, te povećanje ekspresije ove izoforme u malome mozgu i hipokampusu *null* miševa ($p < 0,001$, Studentov *t*-test).



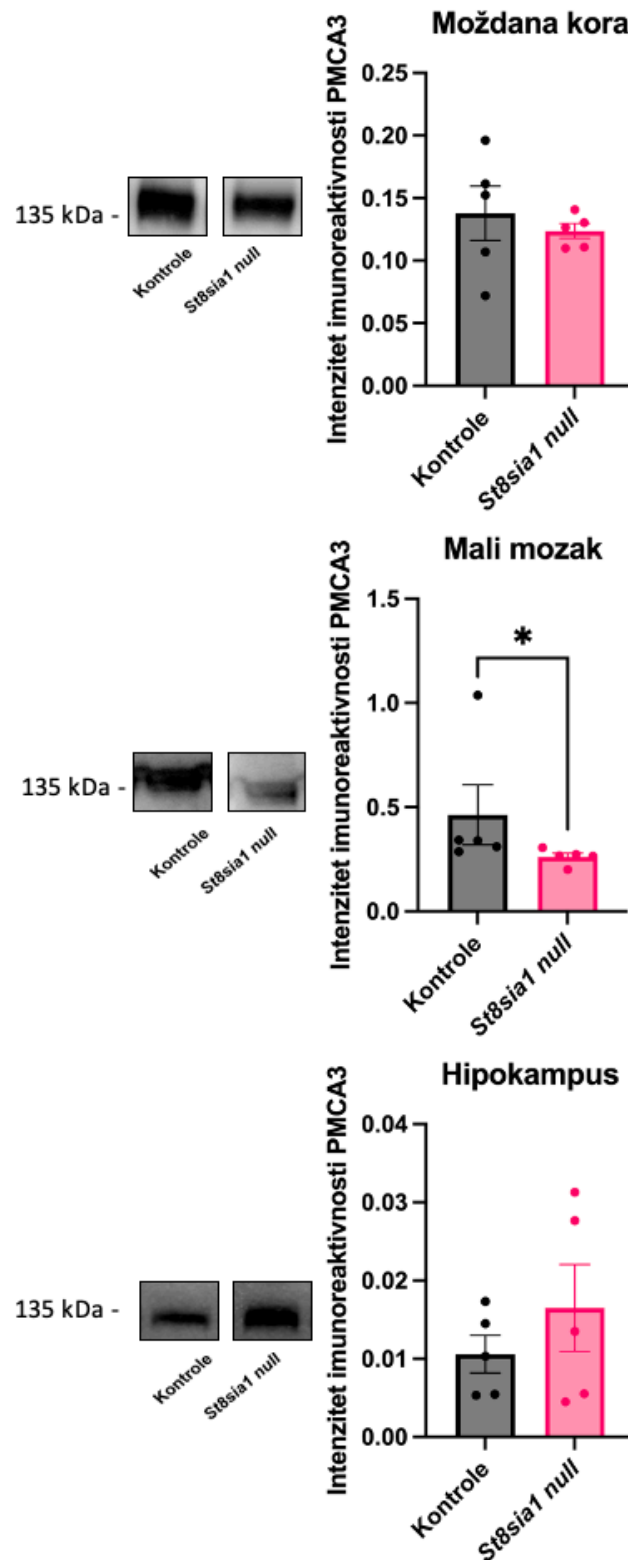
Slika 5.2.3. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti ukupne PMCA u tkivu moždane kore, maloga mozga i hipokampusa kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Moždana kora i mali mozak: Studentov *t*-test; hipokampus: Mann-Whitney test. $n=10$.



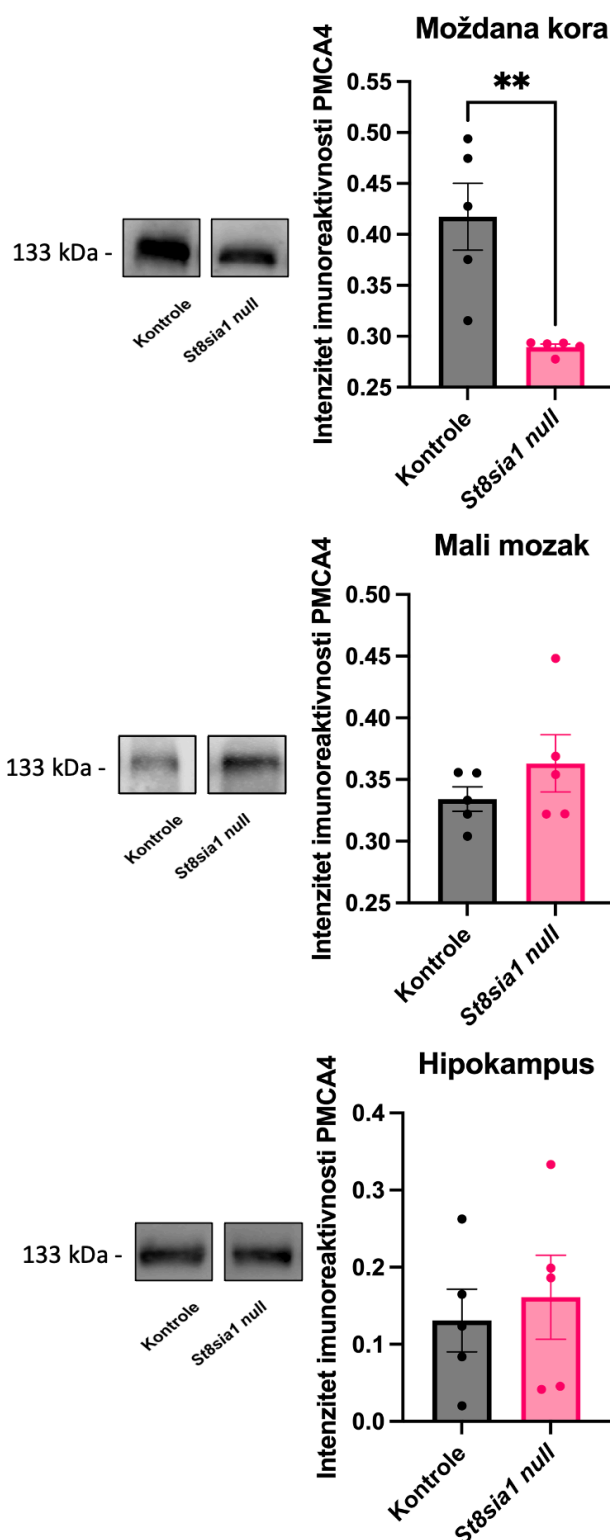
Slika 5.2.4. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti PMCA1 u tkivu moždane kore, maloga mozga i hipokampusa kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Zvezdice (**) predstavljaju statistički značajnu razliku u usporedbi s miševima divljeg tipa, $p < 0,001$ (Studentov *t*-test). $n=10$.



Slika 5.2.5. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti PMCA2 u tkivu moždane kore, maloga mozga i hipokampusa kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. $n=10$.



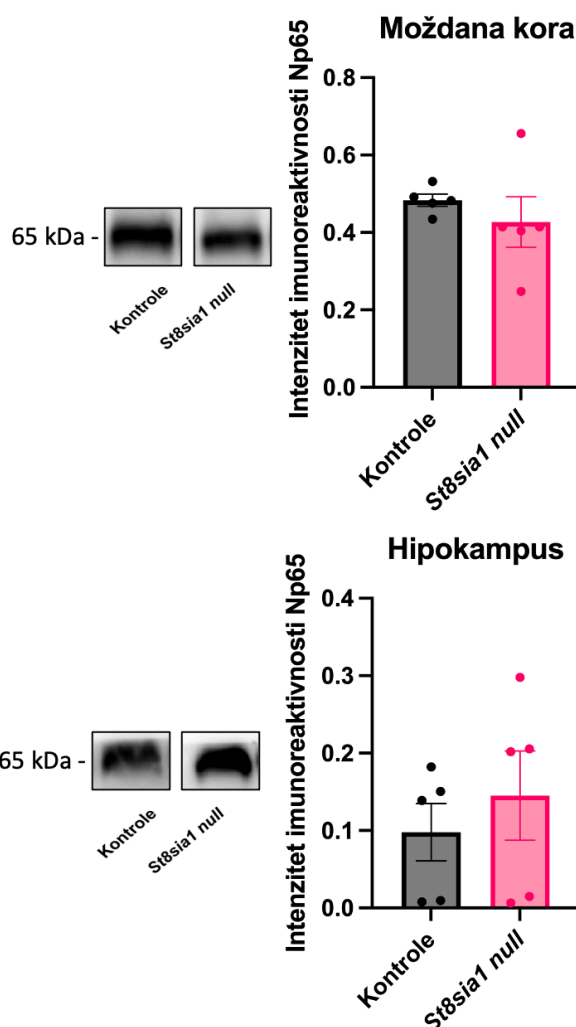
Slika 5.2.6. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti PMCA3 u tkivu moždane kore, maloga mozga i hipokampusa kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Moždana kora i hipokampus: Studentov *t*-test; mali mozak: Mann-Whitney test. Zvezdica (*) predstavlja statistički značajnu razliku u usporedbi s miševima divljeg tipa, $p < 0,05$ (Mann-Whitney test). $n=10$.



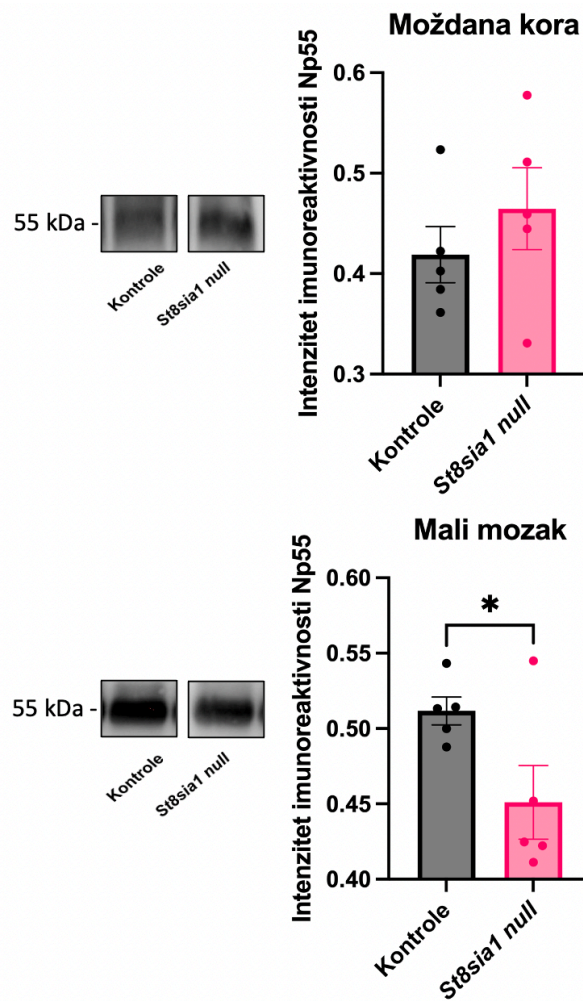
Slika 5.2.7. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti PMCA4 u tkivu moždane kore, maloga mozga i hipokampusu kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Zvezdice (**) predstavljaju statistički značajnu razliku u usporedbi s miševima divljeg tipa, $p < 0,001$ (Studentov *t*-test). $n=10$.

5.2.3. Proteinska ekspresija neuroplastina

Za izvedbu westernske metode otiska tkiva moždane kore, maloga mozga i hipokampusa *St8sia1 null* i kontrolnih miševa za glikoprotein neuroplastin za koji je utvrđeno da je funkcionalna podjedinica PMCA, korišteno je protutijelo mNp koje prepoznaje obje izoforme, Np55 i Np65. Analiza izoforme Np65 pokazala je manju količinu ove izoforme u moždanoj kori, te porast u hipokampusu *St8sia1 null* miševa, dok je u malome mozgu analiza izostavljena jer je u ovoj regiji mozga ekspresija Np65 izuzetno slaba (Slika 5.2.8.). Međutim, u malome mozgu životinja *St8sia1 null* intenzitet imunoreaktivnosti izoforme Np55 statistički je značajno smanjen ($p < 0,05$, Studentov *t*-test), a u tkivu moždane kore veći u odnosu na kontrolne životinje (Slika 5.2.9).



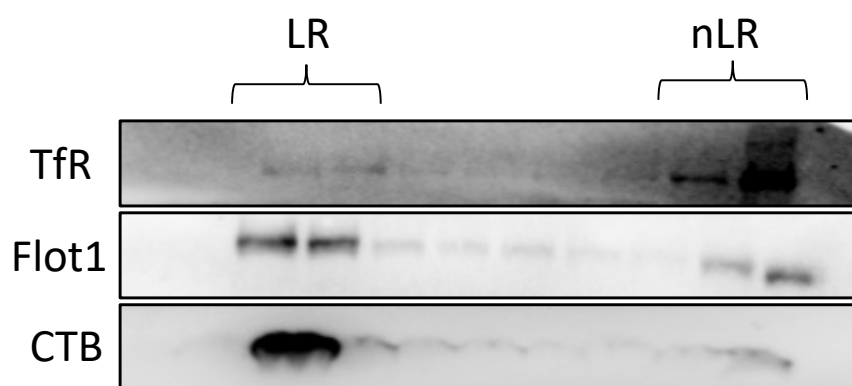
Slika 5.2.8. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti Np65 u tkivu moždane kore i hipokampusa kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. $n=10$.



Slika 5.2.9. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti Np55 u tkivu moždane kore i maloga mozga kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Zvezdica (*) predstavlja statistički značajnu razliku u usporedbi s miševima divljeg tipa, $p < 0,05$ (Studentov *t*-test). $n=10$.

5.3. ANALIZA SUBMEMBRANSKE LOKALIZACIJE PROTEINA

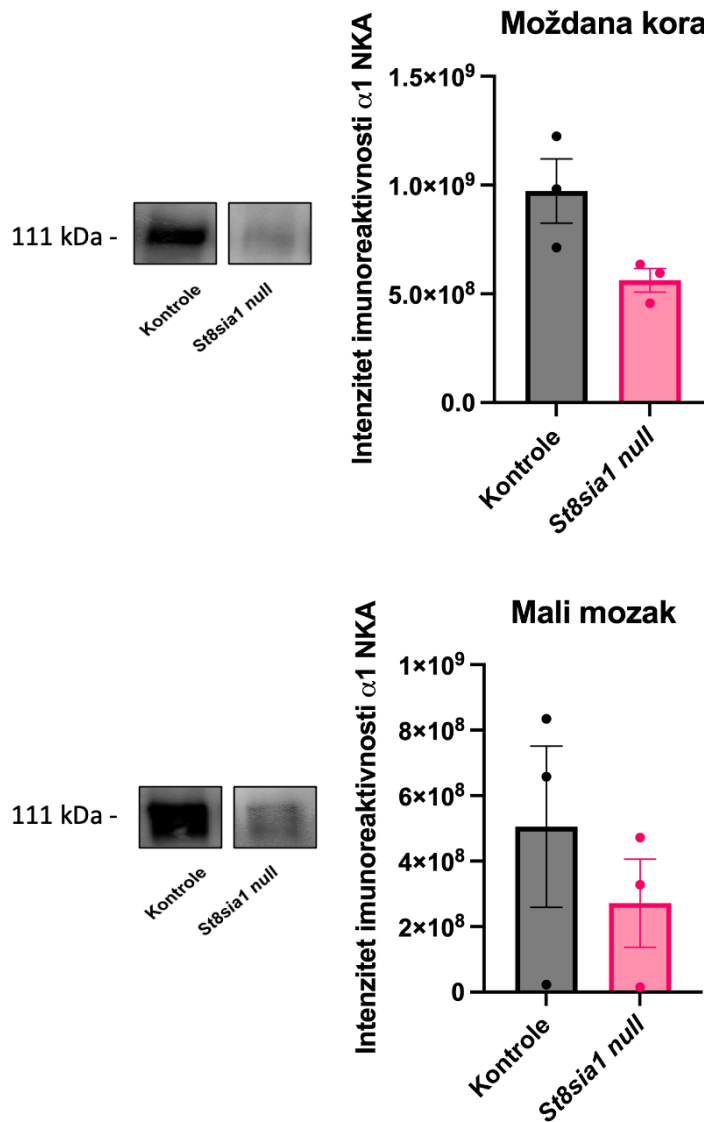
Nakon analize proteinske ekspresije NKA, PMCA i Np analizirana je njihova submembranska lokalizacija. Izolirane su frakcije LR i nLR iz regija moždane kore i malog mozga miševa *St8sia1 null* i kontrolnih miševa. LR i nLR frakcije iz hipokampusa nisu izolirane zbog ograničenja metode izolacije za čiju je izvedbu potrebno minimalno 70 mg tkiva. Uspješnost izolacije membranskih frakcija potvrđena je westernskom metodom otiska pomoću protutijela specifičnih za markere LR (Flot1 i CTB), te nLR (Tfr) (Slika 5.3.), nakon čega je utvrđen sadržaj pojedinih izoformi NKA, PMCA i Np u domenama LR i nLR. Fotografije cjelovitih membrana prikazane su u Dodatku 5.



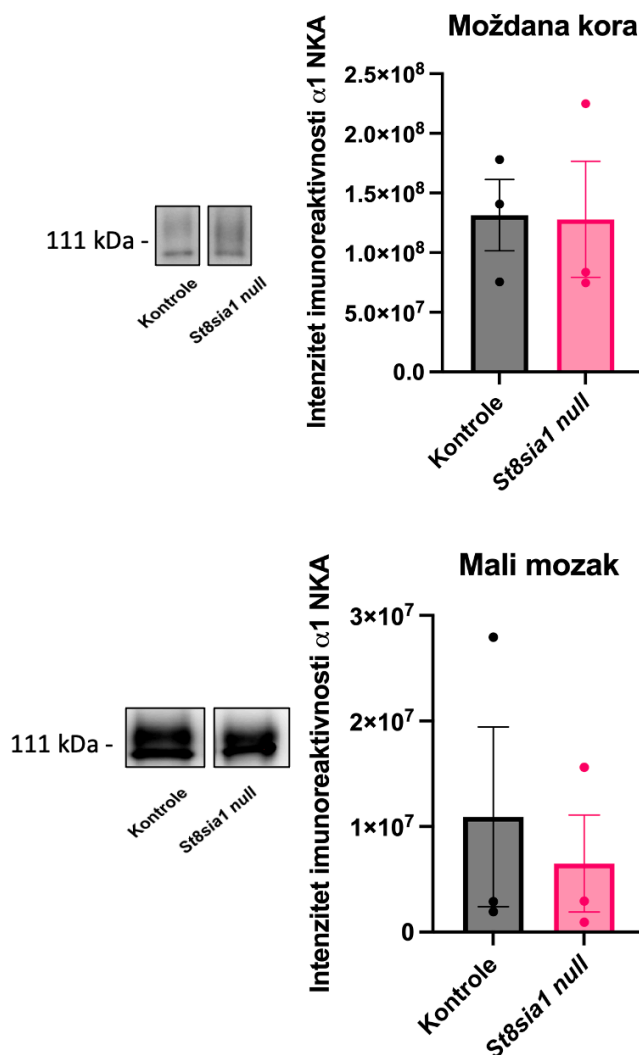
Slika 5.3. Fotografija membrane s kemiluminiscentnim signalima proteina markera LR i nLR frakcija.

5.3.1. Submembranska lokalizacija Na^+ , K^+ -ATPaze

Analizom submembranske lokalizacije NKA ustanovljeno je kako ona drastično mijenja svoj položaj unutar same membrane. Uočen je obrazac smanjenja njezinog sadržaja unutar LR frakcija izoliranih iz moždane kore i maloga mozga miševa *St8sia1 null* u odnosu na one kontrolnih miševa (Slika 5.3.1.). Na slici 5.3.2. prikazan je sadržaj NKA u frakcijama nLR, koji je manji u nLR frakcijama iz maloga mozga miševa *St8sia1 null* u odnosu na one kontrolne miševe.



Slika 5.3.1. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti $\alpha 1$ podjedinice NKA u frakcijama LR izoliranim iz moždane kore i maloga mozga kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. $n=6$.

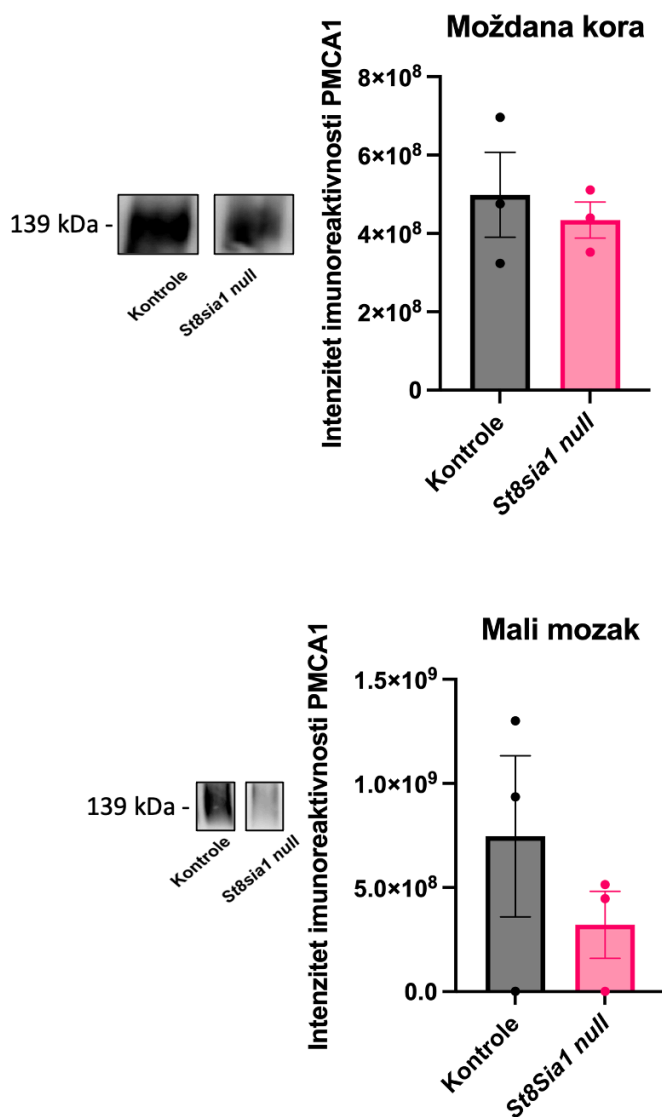


Slika 5.3.2. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti $\alpha 1$ podjedinice NKA u frakcijama nLR izoliranim iz moždane kore i maloga mozga kontrolnih i *St8sia1 null* životinja sa pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. $n=6$.

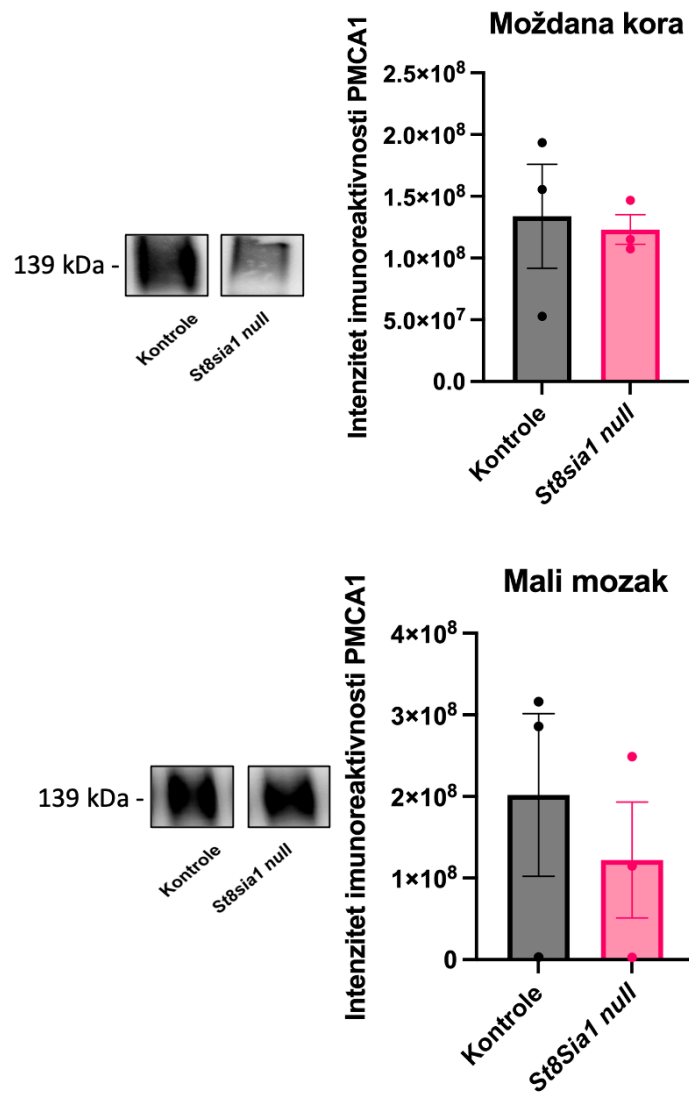
5.3.2. Submembranska lokalizacija Ca^{2+} -ATPaze stanične membrane

Analizom submembranske lokalizacije izoformi PMCA ustanovljena je razlika u distribuciji pojedinih izoformi između LR i nLR domena. Za PMCA1 pokazano je kako je njezin sadržaj smanjen u frakcijama LR izoliranih iz regija moždane kore i maloga mozga *St8sia1 null* u odnosu na kontrolne (Slika 5.3.3.), te u nLR frakcijama iz maloga mozga *St8sia1 null* životinja (Slika 5.3.4.), no bez statističke značajnosti. Za izoformu PMCA2 pokazano je kako je njezin sadržaj veći u LR i nLR frakcijama moždane kore *St8sia1 null*

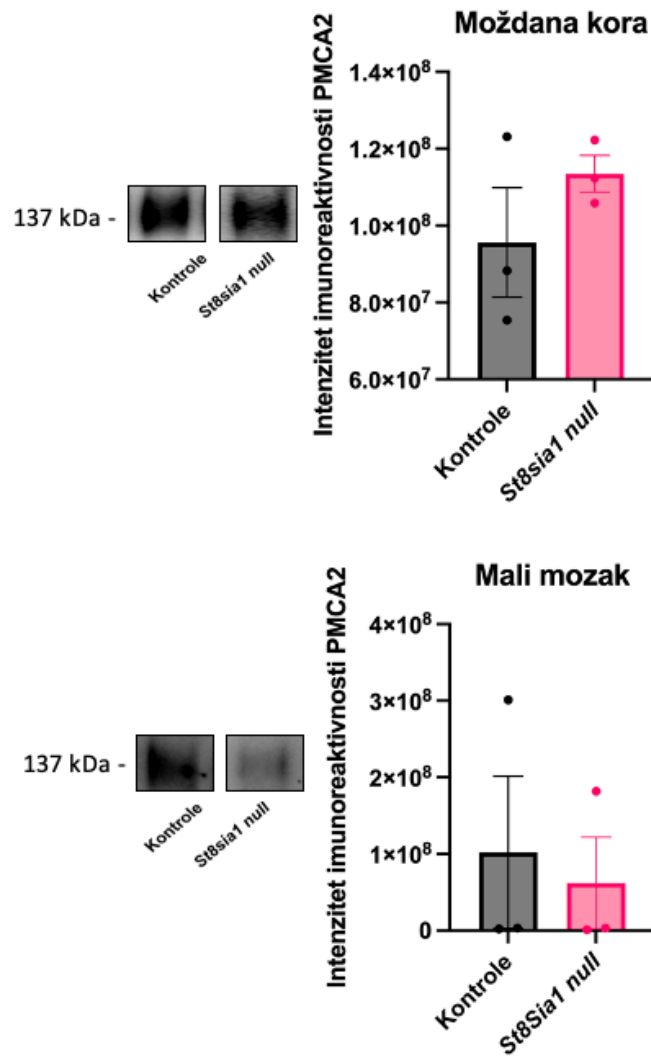
životinja u odnosu na kontrolne, a smanjen u istim frakcijama u malome mozgu (Slike 5.3.5. i 5.3.6.). Obrazac smanjenja količine u LR i nLR frakcijama u obje istraživane regije *St8sia1 null* životinja u odnosu na kontrolne zabilježen je za izoforme PMCA3 (Slike 5.3.7. i 5.3.8.) i PMCA4 (Slike 5.3.9. i 5.3.10.).



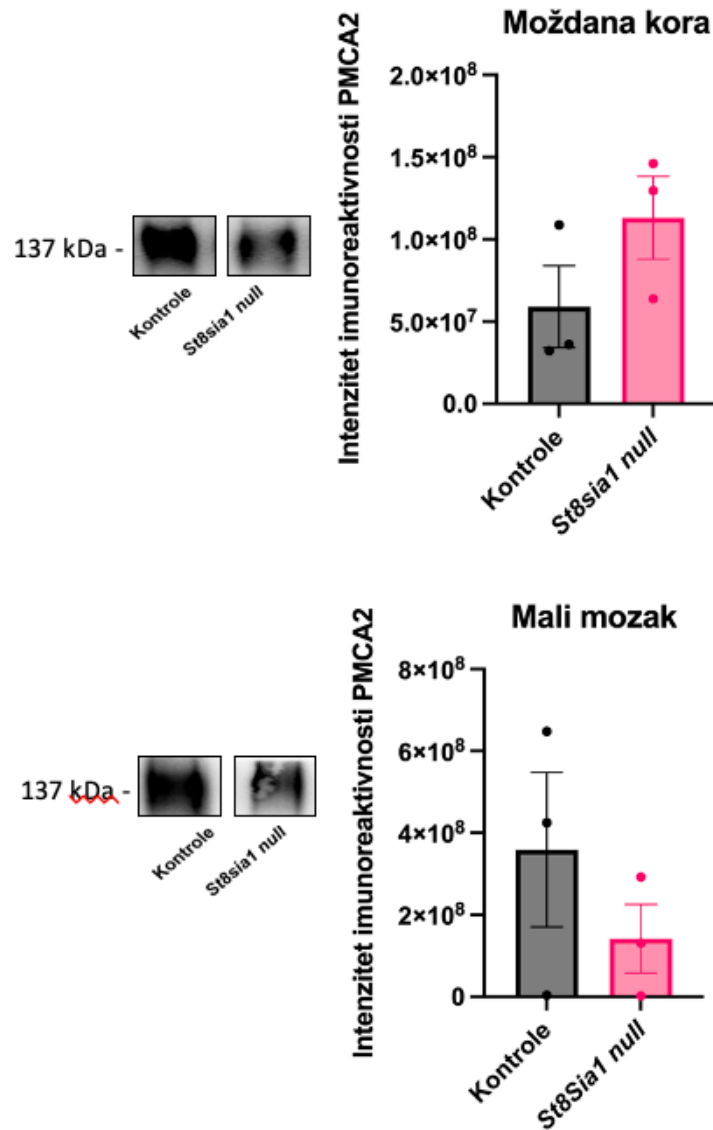
Slika 5.3.3. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti PMCA1 u frakcijama LR izoliranim iz moždane kore i maloga mozga kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. $n=6$.



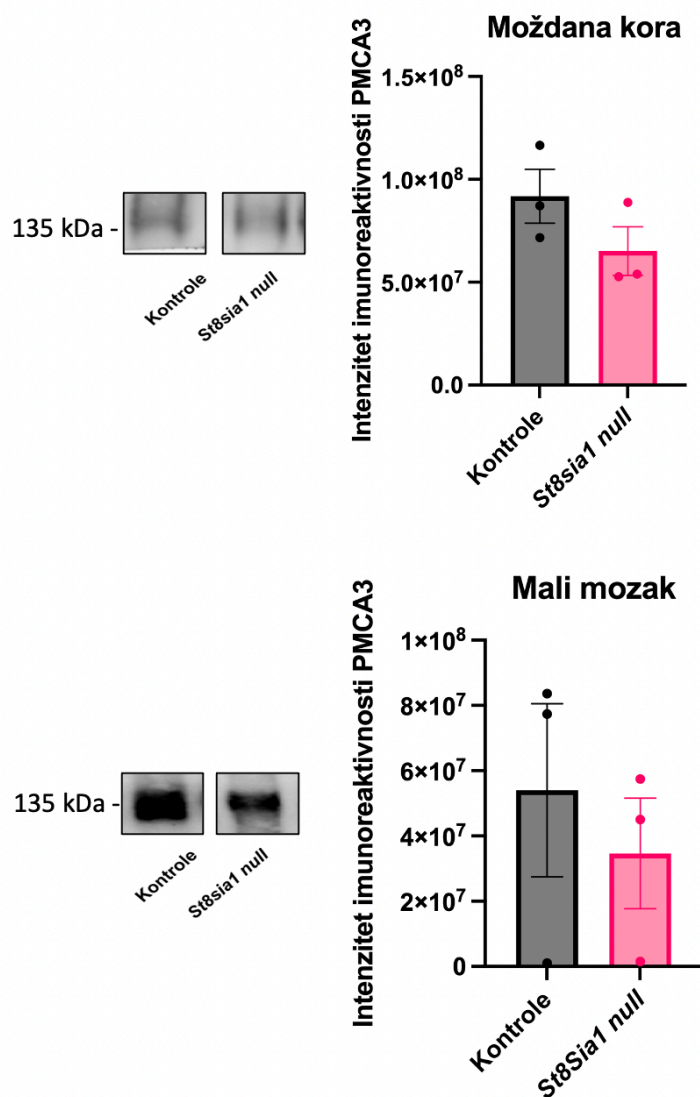
Slika 5.3.4. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti PMCA1 u frakcijama nLR izoliranim iz moždane kore i maloga mozga kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. $n=6$.



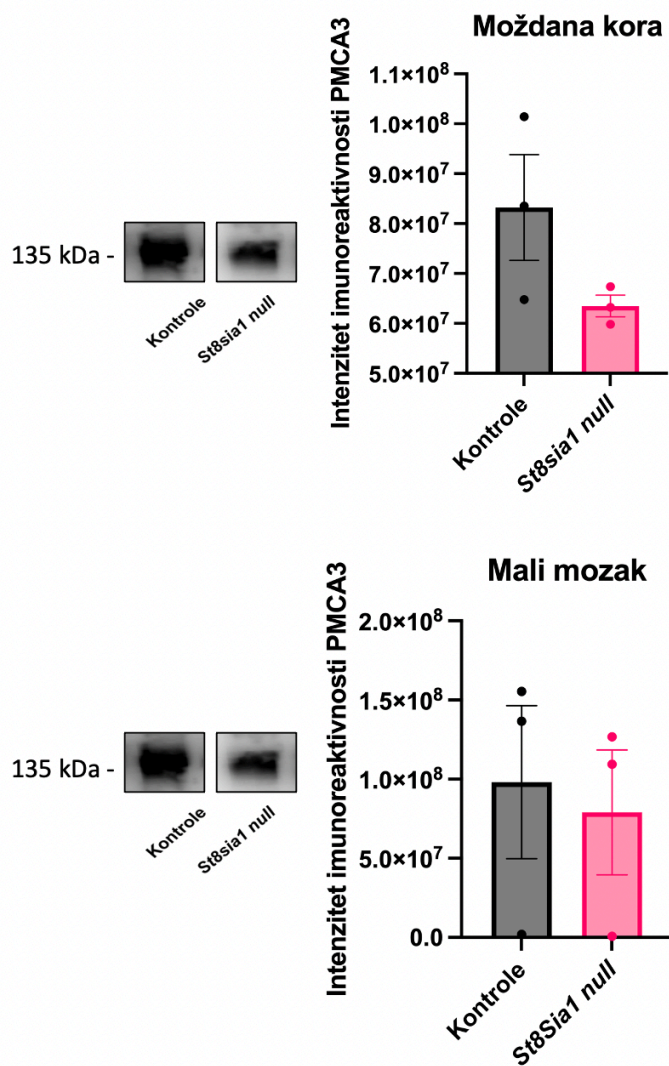
Slika 5.3.5. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti PMCA2 u frakcijama LR izoliranimi iz moždane kore i maloga mozga kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. $n=6$.



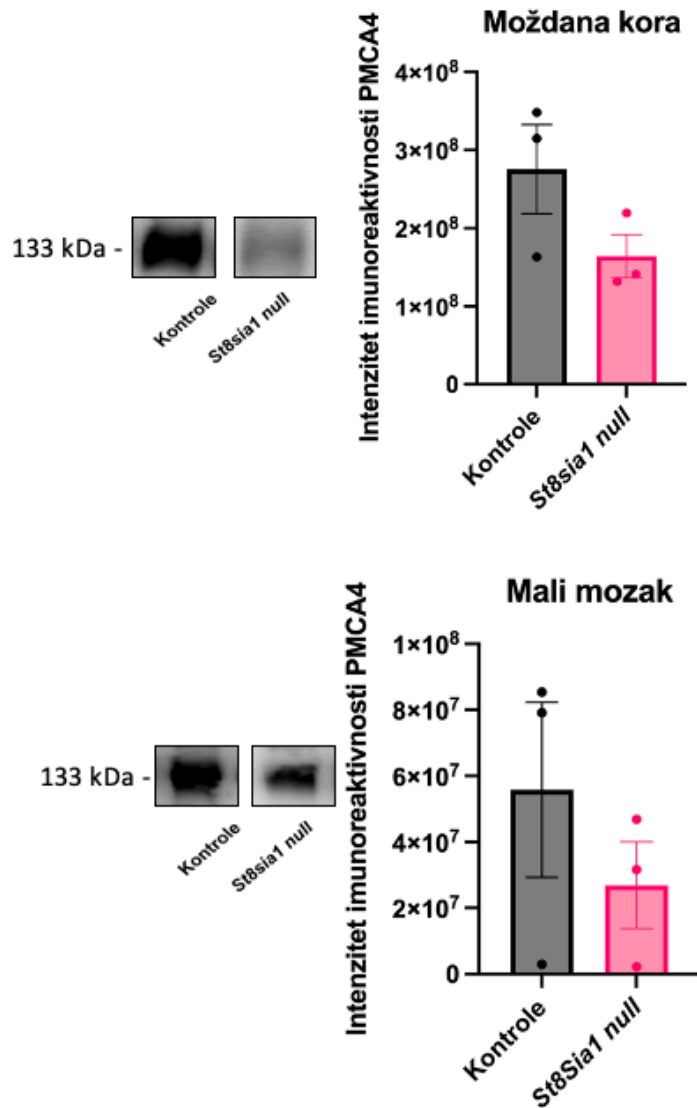
Slika 5.3.6. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti PMCA2 u frakcijama nLR izoliranim iz moždane kore i maloga mozga kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. $n=6$.



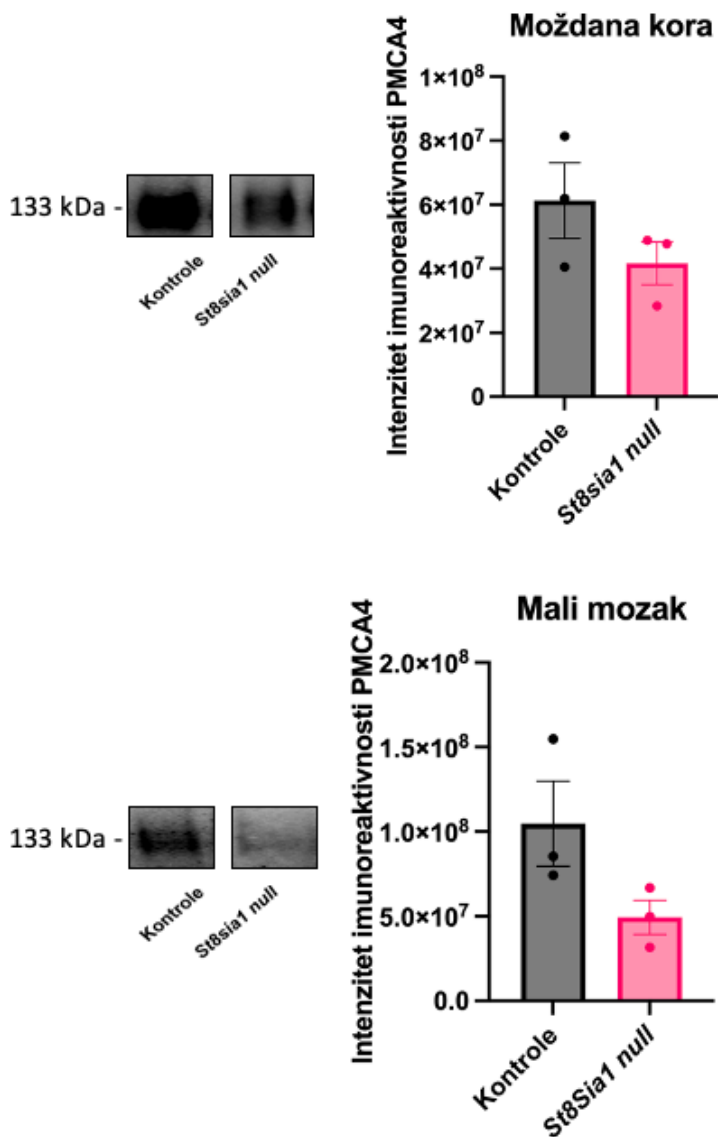
Slika 5.3.7. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti PMCA3 u frakcijama LR izoliranim iz moždane kore i maloga mozga kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. $n=6$.



Slika 5.3.8. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti PMCA3 u frakcijama nLR izoliranimi iz moždane kore i maloga mozga kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. $n=6$.



Slika 5.3.9. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti PMCA4 u frakcijama LR izoliranimi iz moždane kore i maloga mozga kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. $n=6$.

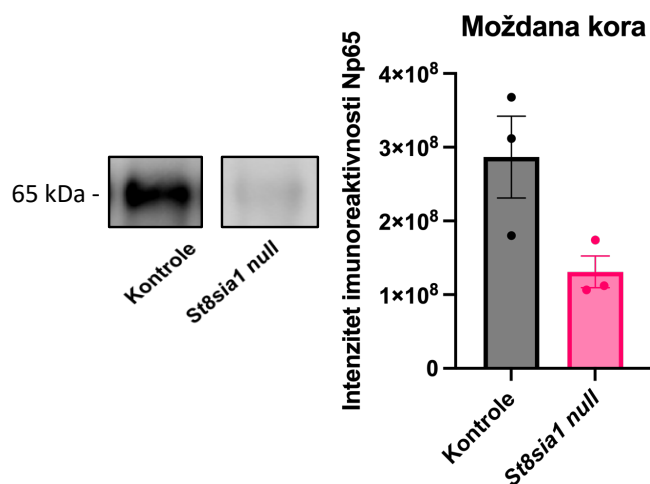


Slika 5.3.10. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti PMCA4 u frakcijama nLR izoliranim iz moždane kore i maloga mozga kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. $n=6$.

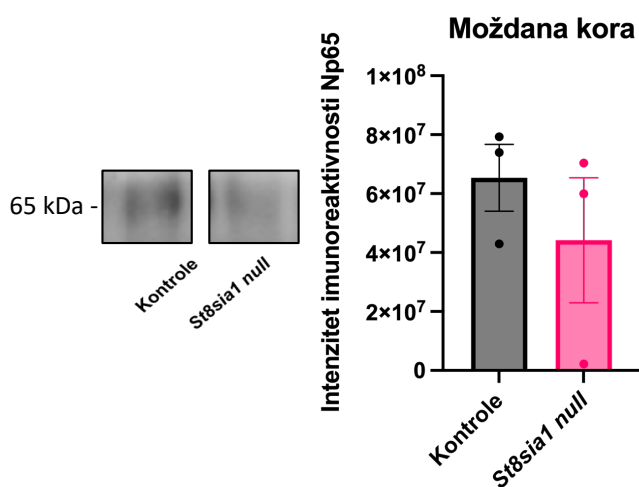
5.3.3. Submembranska lokalizacija neuroplastina

Analiza sadržaja Np65 izoforme glikoproteina neuroplastina pokazala je obrazac smanjenja količine proteina u domenama LR (Slika 5.3.11.) i nLR (Slika 5.3.12.) izoliranim iz tkiva moždane kore miševa *St8sia1 null* u odnosu na kontrolne. Za izoformu 55 pokazano je smanjenje u domenama LR iz obje analizirane regije mozga

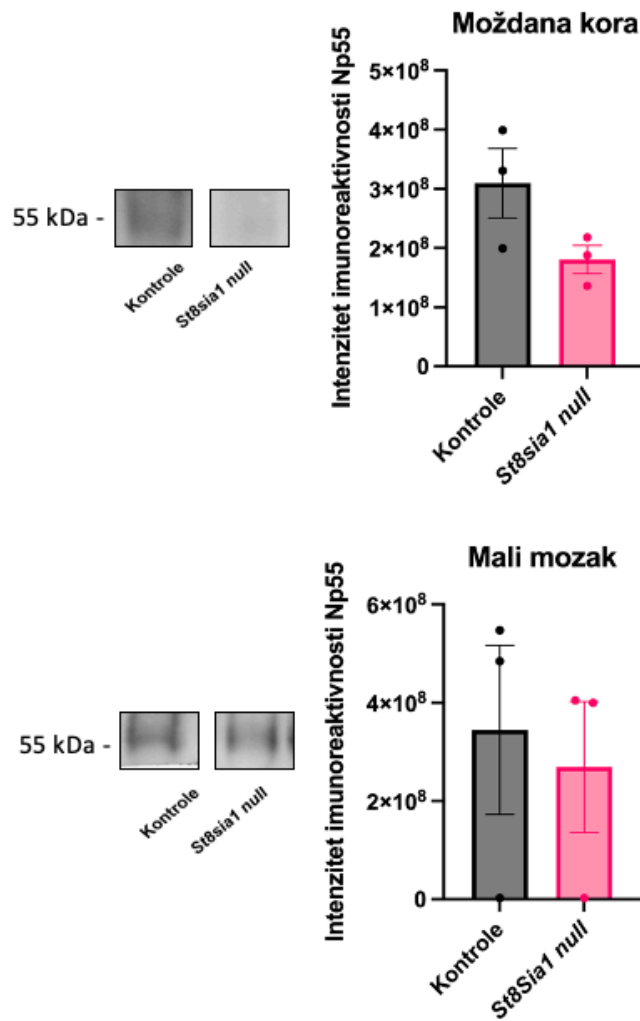
životinja *St8sia1 null* (Slika 5.3.13.), dok u sadržaju ove izoforme unutar nLR domena nema promjena (Slika 5.3.14.).



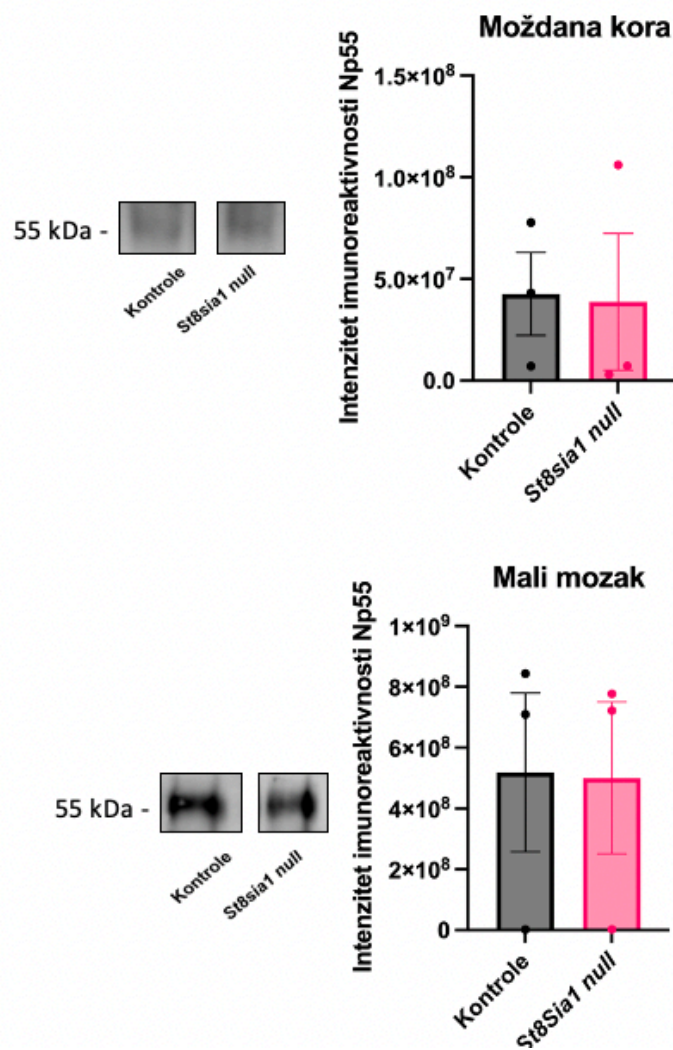
Slika 5.3.11. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti Np65 u frakcijama LR izoliranim iz moždane kore kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. $n=6$.



Slika 5.3.12. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti Np65 u frakcijama nLR izoliranim iz moždane kore kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. $n=6$.

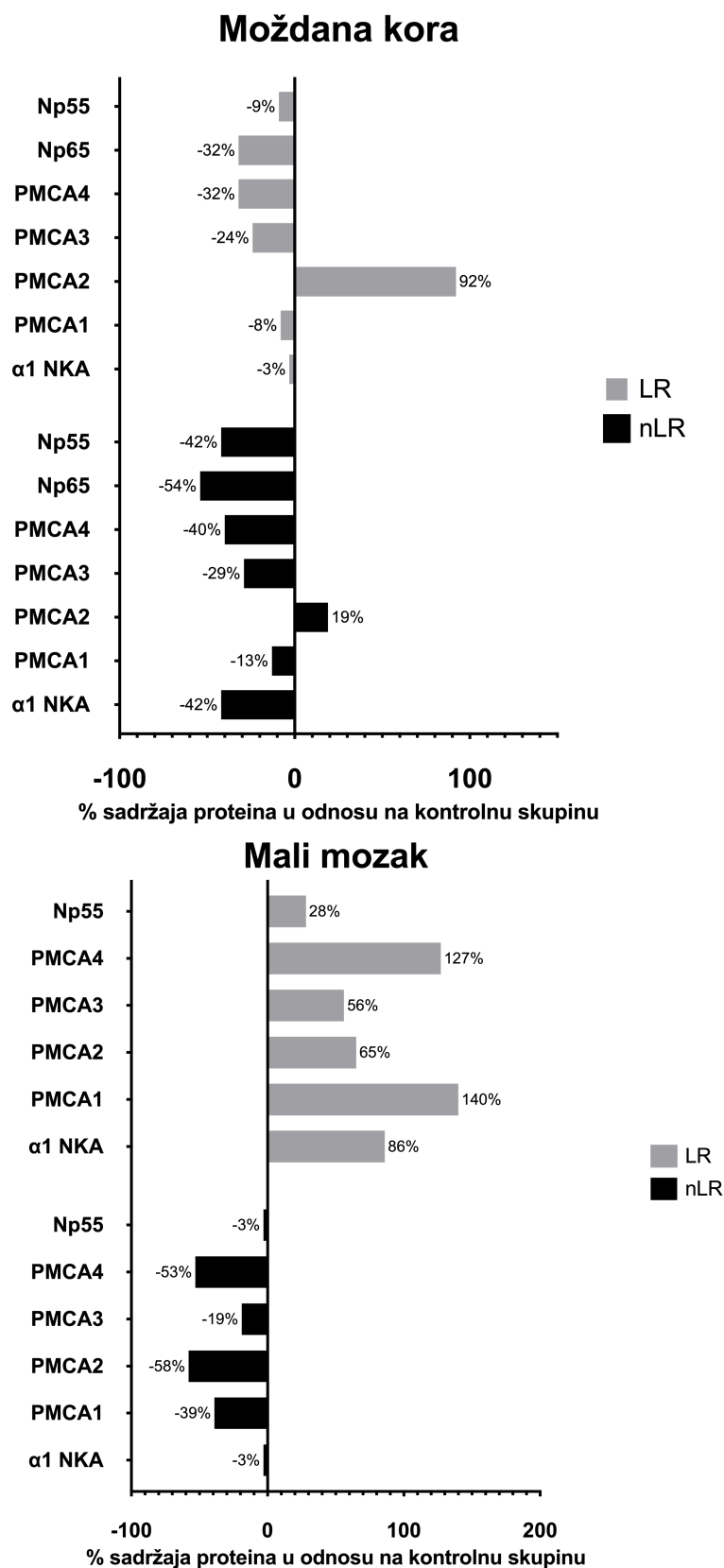


Slika 5.3.13. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti Np55 u frakcijama LR izoliranim iz moždane kore i maloga mozga kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. $n=6$.



Slika 5.3.14. Grafički prikaz intenziteta imunoreaktivnosti Np55 u frakcijama nLR izoliranim iz moždane kore i maloga mozga kontrolnih i *St8sia1 null* životinja s pripadajućim fotografijama kemiluminiscentnog signala. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. $n=6$.

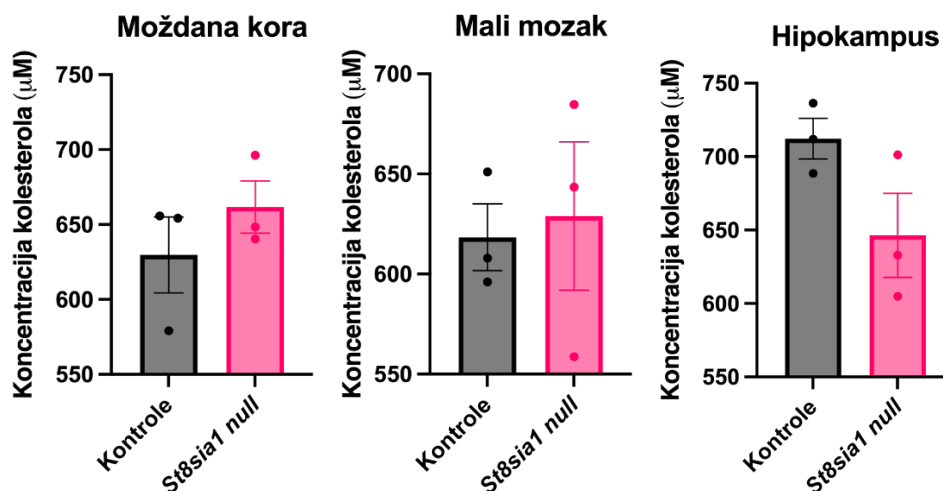
Na Slici 5.3.15. zbirno su prikazani rezultati analize submembranske lokalizacije proteina od interesa u LR i nLR frakcijama moždane kore i maloga mozga životinja *St8sia1 null* prikazani kao postotne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu. Iz ovog oblika prikaza rezultata jasno je vidljiv stupanj redistribucije između domena LR i nLR. Primjerice 92% više PMCA2 prisutno je u LR i 19% u nLR u moždanoj kori životinja *St8sia1 null*, dok je u malome mozgu zabilježeno povećanje sadržaja svih istraživanih proteina u frakcijama LR i smanjenje njihove količine u domenama nLR životinja *St8sia1 null*.



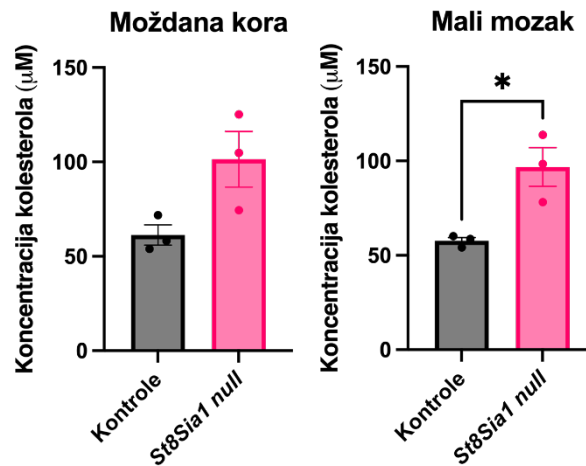
Slika 5.3.15. Postotni udjeli proteina od interesa u frakcijama LR i nLR izoliranih iz tkiva moždane kore i maloga mozga životinja *St8sia1 null* u odnosu na kontrolnu skupinu.

5.4. ANALIZA SADRŽAJA KOLESTEROLA

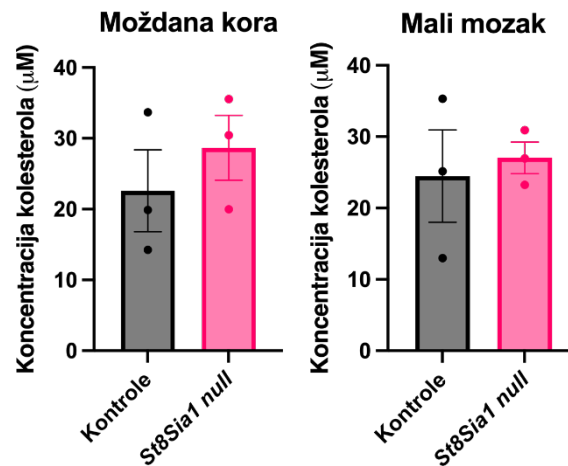
Zbog važnosti kolesterola u ustroju lipidnih splavi nakon utvrđenih promjena u submembranskoj lokalizaciji NKA, PMCA i Np uslijed promijenjenog gangliozidnog sastava membrane izmjerena je koncentracija kolesterola u homogenatima tkiva moždane kore, maloga mozga i hipokampusa, kao i u LR i nLR frakcijama moždane kore i maloga mozga kontrolnih i *St8sia1 null* životinja. Utvrđen je obrazac povećanja ukupne koncentracije kolesterola u homogenatima moždane kore i maloga mozga, te smanjenja u homogenatima hipokampusa *St8sia1 null* životinja u odnosu na kontrolne (Slika 5.4.1.). Utvrđena je i preraspodjela kolesterola između LR i nLR domena. Na Slici 5.4.2. prikazana je izmjerena koncentracija kolesterola u frakcijama LR iz moždane kore i maloga mozga, te je uočen obrazac porasta koncentracije kolesterola kod *St8sia1 null* životinja. Isti obrazac zabilježen je i u frakcijama nLR (Slika 5.4.3.).



Slika 5.4.1. Grafički prikaz koncentracije kolesterola u homogenatima moždane kore, maloga mozga i hipokampusa kontrolnih i *St8sia1 null* životinja. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. $n=6$.



Slika 5.4.2. Grafički prikaz koncentracije kolesterola u frakcijama LR izoliranih iz tkiva moždane kore i maloga mozga kontrolnih i *St8sia1 null* životinja. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. *n*=6.



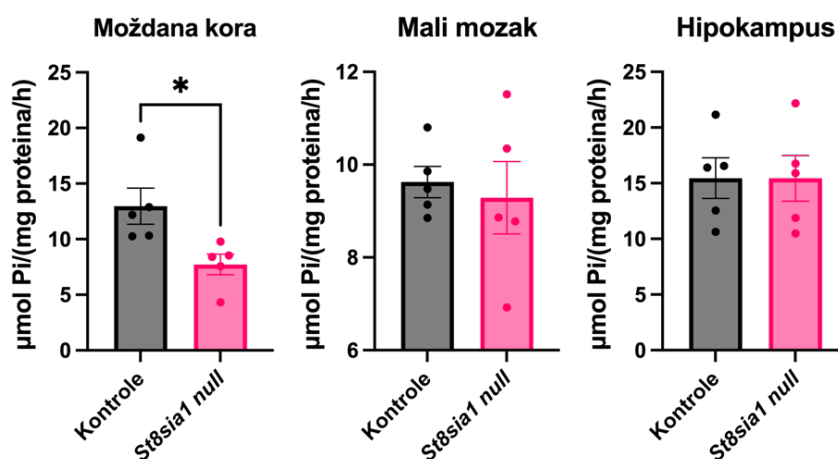
Slika 5.4.3. Grafički prikaz koncentracije kolesterola u frakcijama nLR izoliranih iz tkiva moždane kore i maloga mozga kontrolnih i *St8sia1 null* životinja. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Studentov *t*-test. *n*=6.

5.5. ANALIZA ENZIMSKIH AKTIVNOSTI ATPaza

U svrhu istraživanja utjecaja promijenjenog sastava gangliozida na enzimске aktivnosti NKA i PMCA korištena je spektrofotometrijska metoda utvrđivanja aktivnosti ovih enzima optimizirana u našem laboratoriju. Ispitivana je aktivnost enzima u homogenatima tkiva moždane kore, maloga mozga i hipokampusa *St8sia1 null* i kontrolnih miševa u kojima je westernskom metodom otiska utvrđena ekspresija proteina, a navedene tri regije izabrane su za analizu zbog utvrđenih razlika u sadržaju pojedinih gangliozida. Mjerena je i aktivnost enzima homogenata moždane kore *St8sia1 null* i kontrolnih miševa nakon predinkubacije s gangliozidima b-serije, GD1b i GT1b, koji nedostaju *null* miševima.

5.5.1. Aktivnost Na^+ , K^+ -ATPaze

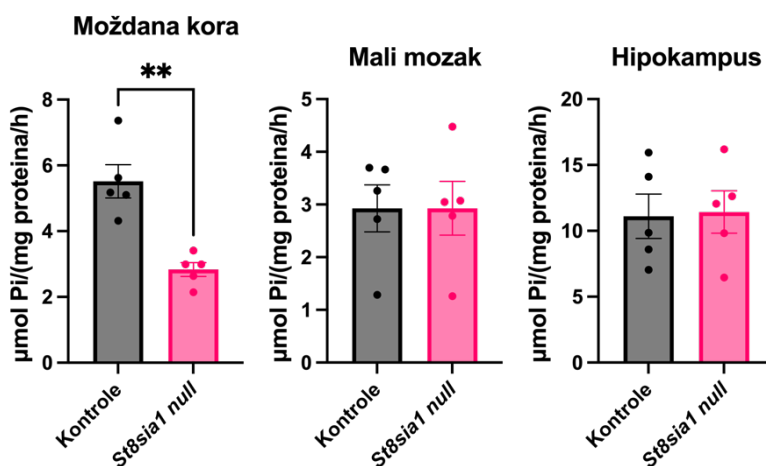
Mjerenjem aktivnosti NKA u homogenatima tkiva moždane kore, maloga mozga i hipokampusa ustanovljena je statistički značajno niža aktivnost enzima u moždanoj kori miševa *St8sia1 null* u odnosu na kontrolne životinje ($p < 0,05$, Studentov *t*-test), a pad aktivnosti iznosio je čak 60% (Slika 5.5.1.).



Slika 5.5.1. Grafički prikaz enzimске aktivnosti NKA u tkivu moždane kore, maloga mozga i hipokampusa kontrolnih i *St8sia1 null* životinja. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Zvezdica (*) predstavlja statistički značajnu razliku u usporedbi s miševima divljeg tipa, $p < 0,05$ (Studentov *t*-test). $n=10$.

5.5.2. Aktivnost Ca^{2+} -ATPaze stanične membrane

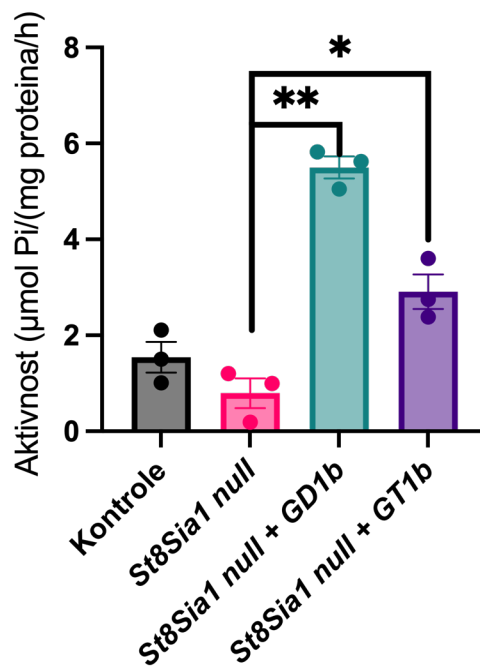
Na slici 5.5.2. prikazani su rezultati mjerenja aktivnosti PMCA u navedenim regijama mozga kontrolnih i *St8sia1 null* životinja. Utvrđeno je statistički značajno smanjenje aktivnosti PMCA u moždanoj kori miševa *St8sia1 null* u odnosu na kontrolne životinje ($p < 0,001$, Studentov *t*-test). Pad aktivnosti iznosio je 50%.



Slika 5.5.2. Grafički prikaz enzimske aktivnosti PMCA u tkivu moždane kore, maloga mozga i hipokampusu kontrolnih i *St8sia1 null* životinja. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Zvezdice (**) predstavljaju statistički značajnu razliku u usporedbi s miševima divljeg tipa, $p < 0,001$ (Studentov *t*-test). $n=10$.

5.5.3. Aktivnost Na^+ , K^+ -ATPaze uz dodatak egzogenih gangliozida b-serije

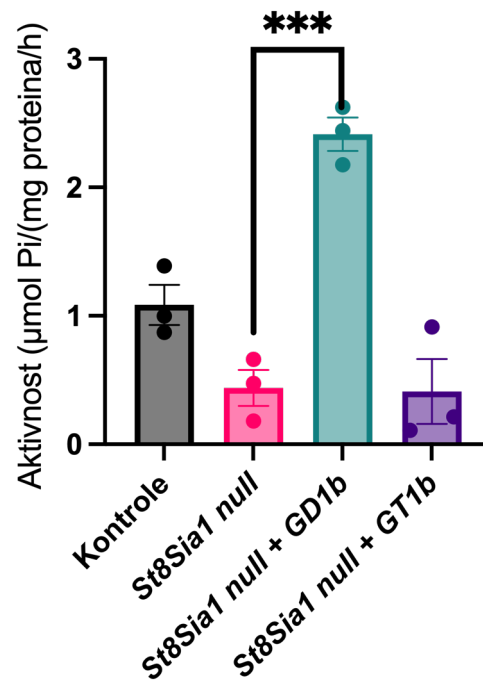
Budući da je utvrđena statistički značajno niža aktivnost NKA u moždanoj kori miševa *St8sia1 null* kojima nedostaju gangliozidi b-serije u odnosu na kontrolne životinje (Slika 5.5.1.), mjerena je i njezina aktivnost nakon egzogeno dodanih gangliozida GD1b i GT1b. Zabilježen je značajan porast aktivnosti nakon predinkubacije s gangliozidom GD1b u odnosu na netretirane homogenate ($p < 0,001$, Studentov *t*-test) (Slika 5.5.3.). Porast aktivnosti zabilježen je i u homogenatima moždane kore miševa *St8sia1 null* nakon predinkubacije s gangliozidom GT1b u odnosu na netretirane homogenate ($p < 0,05$, Studentov *t*-test) (Slika 5.5.3.).



Slika 5.5.3. Grafički prikaz enzimske aktivnosti NKA u tkivu moždane kore kontrolnih i *St8sia1 null* životinja sa i bez dodatka egzogenih gangliozida b-serije. Zvezdica (*) predstavlja statistički značajnu razliku u usporedbi s miševima divljeg tipa, $p < 0,05$ (Studentov *t*-test). Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Zvezdice (**) predstavljaju statistički značajnu razliku u usporedbi s miševima divljeg tipa, $p < 0,001$ (Studentov *t*-test). $n=6$.

5.5.4. Aktivnost Ca^{2+} -ATPaze stanične membrane uz dodatak egzogenih gangliozida b-serije

Nakon što je utvrđena statistički značajno niža aktivnost PMCA u moždanoj kori miševa *St8sia1 null* kojima nedostaju gangliozidi b-serije u odnosu na kontrolne životinje (Slika 5.5.2.), njezina je aktivnost također analizirana nakon egzogeno dodanih gangliozida GD1b i GT1b. Zabilježen je značajan porast aktivnosti nakon predinkubacije s gangliozidom GD1b u odnosu na netretirane homogenate ($p < 0,0005$, Studentov *t*-test), dok za gangliozid GT1b nije uočena promjena (Slika 5.5.3.).



Slika 5.5.4. Grafički prikaz enzimske aktivnosti PMCA u tkivu moždane kore kontrolnih i *St8sia1 null* životinja sa i bez dodatka egzogenih gangliozida b-serije. Traka pogreške označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine. Zvezdice (***) predstavljaju statistički značajnu razliku u usporedbi s miševima divljeg tipa, $p < 0,0005$ (Studentov *t*-test). $n=6$.

6. RASPRAVA

Gangliozidi kao važne odrednice lipidoma, glikoma i sijaloma SŽS-a se zbog svoje uključenosti u velik broj važnih staničnih i međustaničnih procesa već dugi niz godina istražuju kao modulatori funkcije membranskih proteina, no sama priroda njihovih interakcija i međuodnosa još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Cilj ovog istraživanja bio je višerazinskim metodološkim pristupom sustavno utvrditi utjecaj promijenjenog sastava gangliozida membrane na gensku i proteinsku ekspresiju, te submembransku lokalizaciju NKA, PMCA i Np, kao i na enzimsku aktivnost NKA i PMCA u različitim regijama mozga koristeći se mišjim modelom *St8sia1 null* s poremećenom sintezom gangliozida. Nedostatak enzima GD3-sintaze u ovom mišjem modelu za posljedicu ima nemogućnost sinteze gangliozida b- i c-serije, te prekomjernu ekspresiju gangliozida a-serije (90), što je omogućilo istraživanje utjecaja različitih gangliozidnih struktura na spomenute proteine s važnim ulogama u funkcioniranju SŽS-a i razvoju neuropatoloških i neurodegenerativnih promjena. Utjecaj gangliozida u navedenom mišjem modelu istražili smo na nekoliko bioloških razina, te su ustanovljene razlike u razini genske ekspresije pojedinih izoformi proteina od interesa metodom qRT-PCR, njihovog ukupnog sadržaja u membrani westernskom metodom otiska, kao i njihove lokalizacije u membranskim nanodomenama za čiji su ustroj gangliozidi i kolesterol od posebnog značaja. Ukupne promjene u fundamentalnim biološkim razinama u konačnici se odražavaju i na samu aktivnost enzima. Zbirni prikaz rezultata ovog istraživanja prikazan je u Tablici 6.

Tablica 6. Sažeti prikaz ukupnih rezultata *

Genska ekspresija					
	Moždana kora		Mali mozak		Hipokampus
<i>Atp1a1</i>	↑		↑*		∅
<i>Atp1a2</i>	↑*		↑		↓
<i>Atp1a3</i>	↑		↑		↑
<i>Atp1b1</i>	↑		∅		↓
<i>Atp1b2</i>	↑		↑		↓
<i>Atp1b3</i>	↓		∅		↑
<i>Atp2b1</i>	∅		↓		↑
<i>Atp2b2</i>	↑		∅		↓
<i>Atp2b4</i>	↑*		↓		↓
<i>Nptn</i>	↑		↑		↑
Proteinska ekspresija					
α1+α2+3α NKA	↑**		↑		∅
α1 NKA	↓*		↑		↓
panPMCA	∅		↓		↓
PMCA1	↓**		↓		↓
PMCA2	↑		↓		∅
PMCA3	∅		↓*		↑
PMCA4	↓**		↑		↑
Np65	↓				↑
Np55	↑		↓*		
Submembranska lokalizacija					
α1 NKA	↓ LR	∅ nLR	↓ LR	↓ nLR	
PMCA1	↓ LR	↓ nLR	↓ LR	↓ nLR	
PMCA2	↑ LR	↓ nLR	↓ LR	↓ nLR	
PMCA3	↓ LR	↓ nLR	↓ LR	↓ nLR	
PMCA4	↓ LR	↓ nLR	↓ LR	↓ nLR	
Np65	↓ LR	↓ nLR	∅ LR	∅ nLR	
Np55	↓ LR	↓ nLR			
Kolesterol	↑ LR	↑ nLR	↑* LR	↑ nLR	
Konzentracija kolesterola					
	↑		↑		↓
Aktivnost ATPaza					
NKA	↓*		↓		∅
PMCA	↓**		∅		∅

* Prikazane su promjene pojedinog analiziranog parametra u *St8sia1 null* životinjama u odnosu na kontrolnu skupinu. ↑ – porast u odnosu na kontrolnu skupinu; ↓ – sniženje u odnosu na kontrolnu skupinu; ∅ – bez promjene; * – p<0,05; ** – p<0,001.

6.1. UTJECAJ GANGLIOZIDA NA GENSKU EKSPRESIJU Na⁺, K⁺-ATPaze, Ca²⁺-ATPaze STANIČNE MEMBRANE I NEUROPLASTINA

Hipoteza istraživanja glasila je da povećana količina gangliozida a-serije i nedostatak gangliozida b- i c-serije u moždanom tkivu miševa *St8sia1 null* uzrokuje smanjenje genske ekspresije membranskih prijenosnika iona NKA i PMCA i glikoproteina Np. Ovim istraživanjem po prvi puta je načinjena analiza genske ekspresije svih podjedinica i izoformi NKA i PMCA u tri regije mozga miševa s poremećenom sintezom gangliozida. U slučaju NKA hipoteza je djelomično potvrđena budući da je ustanovljen obrazac snižene ekspresije gena *Atp1b3* za $\beta 3$ podjedinicu NKA u moždanoj kori, te ekspresije gena *Atp1a1*, *Atp1b1* i *Atp1b2* u hipokampusu miševa *St8sia1 null* u odnosu na kontrolnu skupinu. Svakako valja istaknuti da je već na ovoj razini uočen različit obrazac ekspresije u *St8sia1 null* životinja u usporedbi s kontrolama za pojedine podjedinice ovisno o regiji mozga, odnosno da je ovisno o regiji ekspresija negdje niža, a negdje viša u usporedbi s kontrolama (Tablica 6). Snižena ekspresija gena *Atp1b3* u hipokampusu miševa *St8sia1 null* je poznata u literaturi (151). Smanjenje ekspresije gena za katalitičke podjedinice enzima ukazuje na smanjenu potrebu stanice za sintezom ovih proteina jer je i sama aktivnost enzima u ovoj regiji mozga nepromijenjena. Zanimljivo je za istaknuti kako je u staničnim kulturama utvđen utjecaj kolesterola na smanjenje ekspresije *Atp1a2* i *Atp1a3* putem Src kinaza (247). Ovim istraživanjem je utvrđen obrazac porasta sadržaja kolesterola u moždanoj kori i malome mozgu, a smanjenja u hipokampusu miševa *St8sia1 null* u odnosu na kontrolne miševe, što svakako podupire istraživanja koja pokazuju da promijenjena koncentracija kolesterola ide ruku pod ruku s izmijenjenom ekspresijom ili aktivnošću NKA. Rezultati analize genske ekspresije NKA najvećim djelom pokazuju porast u obrascu ekspresije, ponajviše gena za katalitičke podjedinice *Atp1a1* u moždanoj kori i *Atp1a2* u malome mozgu miševa *St8sia1 null*, upućujući na zaključak o povećanoj staničnoj potrebi za sintezom katalitičkih podjedinica NKA u regijama mozga u kojima je enzimska aktivnost NKA snižena. Porast genske ekspresije rezultira i povećanom količinom ukupnih katalitičkih podjedinica NKA u navedenim regijama ustanovljenoj westernskom metodom otiska.

U slučaju PMCA hipoteza je također djelomično potvrđena budući da je utvrđen obrazac smanjenja genske ekspresije gena *Atp2b1* i *Atp2b4* u malome mozgu, te *Atp2b2* i *Atp2b4* u hipokampusu miševa *St8sia1 null* u odnosu na kontrolnu skupinu, uz porast ekspresije gena u moždanoj kori, dok je aktivnost PMCA u ovoj regiji statistički značajno smanjena. Smanjenje sadržaja PMCA4 u moždanoj kori miševa *St8sia1 null* utvrđeno westernskom metodom otiska i porast obrasca genske ekspresije gena *Atp2b4* upućuje na zaključak o mehanizmu povratne sprege. Različiti ekspresijski profili pojedinih gena u trima moždanim regijama upućuju na različitu potrebu za pojedinim izoformama PMCA koje se međusobno razlikuju po svojim kinetičkim svojstvima (191).

U slučaju neuroplastina u sve tri istraživane regije mozga miševa *St8sia1 null* utvrđen obrazac porasta gena *Nptn* u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 5.1.4.). Porast ekspresije gena *Nptn* u moždanoj kori korelira s ekspresijom gena *Atp2b2* u skladu je s ranije opisanom interakcijom Np i PMCA2 važnom za funkcioniranje osjeta sluha (248), što je vrlo zanimljivo budući da miševi *St8sia1 null* pokazuju auditorne poteškoće (95).

Promjene u ekspresiji gena u mišjem modelu s poremećenom sintezom gangliozida mogu se pripisati činjenici da je utvrđena prisutnost gangliozida GM1 i GD1a u unutrašnjoj i vanjskoj jezgrinoj ovojnici (39), u količinama koje odražavaju količine u staničnoj membrani (249), a upravo ova dva gangliozida pojačano su eksprimirana u mišjem modelu *St8sia1 null* uslijed nefunkcionalnosti gena koji kodira za enzim GD3-sintazu. Za GM1 je ustanovljeno da utječe na ekspresiju gena *GalNACT* i *NeuroD1* u diferenciranim neuronima na način da veže acetilirane histone H3 i H4 na njihovim promotorima (40), te je isti epigenetski mehanizam regulacije genske ekspresije moguć i za gene analizirane u ovome radu. Za GM1 također je pokazano da potiče ekspresiju tirozin-hidroksilaze u *substantii nigri pars compacta* vezanjem acetiliranih histona u promotorskoj regiji što omogućava vezanje proteina 1 povezanog s jezgrenim receptorom (engl. *Nuclear receptor related 1*, Nurr 1), važnog transkripcijskog faktora u procesima diferencijacije, sazrijevanja i održavanja dopaminergičkih neurona (250). Za gangliozid GD1a pokazano je da utječe na ekspresiju hepatičkog faktora rasta preko interakcije s kaveolinom-1 (251),(252), te da putem signalnog puta MAPK snižava ekspresiju gena za nNOS u kulturi osteosarkoma (253). Također, miševi *St8sia1 null* uslijed nedostatka GD3-sintaze ne mogu sintetizirati gangliozid GD3, za koji je pokazano

da stupa u interakciju s histonom H1 u jezgri (41), te su promjene u ekspresiji gena mogući rezultat kombinacije pojačane ekspresije a-serije i nedostatka b- i c-serije gangliozida. Prisutnost drugih gangliozida, poput GT3, koji također nije sintetiziran u mozgu miševa *St8sia1 null* zabilježena je u jezgri ovojnice, te bi valjalo istražiti i njegovu potencijalnu ulogu u regulaciji genske ekspresije (254). Važno je za napomenuti i da se koncentracija pojedinih gangliozidnih struktura u jezgri ovojnice povećava tijekom diferencijacije neurona iz matičnih stanica i prilikom izrastanja neurita, procesima s povećanom ukupnom transkripcijskom aktivnosti stanice (254),(255).

6.2. UTJECAJ GANGLIOZIDA NA PROTEINSKU EKSPRESIJU Na⁺,K⁺-ATPaze, Ca²⁺-ATPaze STANIČNE MEMBRANE I NEUROPLASTINA

U ovom istraživanju je po prvi puta je učinjena zbirna analiza proteinskog sadržaja NKA, PMCA i Np u tkivu moždane kore, maloga mozga i hipokampusu miševa s poremećenom sintezom gangliozida kako bi se dobio uvid u dugotrajnost promjena zabilježenih na razini genske ekspresije navedenih proteina. Hipoteza istraživanja glasila je da povećana količina gangliozida a-serije i nedostatak gangliozida b- i c-serije u moždanom tkivu miševa *St8sia1 null* uzrokuje smanjenje proteinske ekspresije membranskih prijenosnika iona NKA i PMCA. U slučaju NKA hipoteza je djelomično potvrđena jer je pomoću protutijela specifičnog za sve katalitičke podjedinice NKA utvrđen povećan sadržaj u moždanoj kori i malome mozgu miševa *St8sia1 null* u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je nepromijenjen u tkivu hipokampusu. Ova promjena prati obrazac aktivnosti NKA u navedenim regijama. Hipoteza je potvrđena u vidu zabilježenog sniženja sadržaja ubikvitarno eksprimirane katalitičke $\alpha 1$ podjedinice u moždanoj kori i hipokampusu. Snižen sadržaj $\alpha 1$ podjedinice, a povećan sadržaj ukupnih katalitičkih podjedinica upućuje na zaključak o povećanoj ekspresiji $\alpha 2$ i/ili $\alpha 3$ katalitičke podjedinice. podjedinica $\alpha 3$ striktno je eksprimirana u GABAergicim neuronima u strijatumu, *globus pallidus*, subtalamičkim jezgrama, *substantii nigri* i malome mozgu, moždanim strukturama potrebnim za preciznu regulaciju kretanja (256), što je vrlo zanimljivo u kontekstu mišjeg modela *St8sia1 null* čija je fenotipska karakteristika problem održavanja ravnoteže (95). U budućnosti bi valjalo utvrditi sadržaj $\alpha 2$ i $\alpha 3$

podjedinica u istraživanom mišjem modelu u kojemu smo utvrdili razlike u sadržaju kolesterola između triju istraživanih regija mozga, a upravo je za $\alpha 2$ i $\alpha 3$ podjedinice pokazano kako su regulirane sadržajem kolesterola u staničnim kulturama (247). Također bi valjalo analizirati i sadržaj β -podjedinica kako bi se dobio širi uvid u regulaciju aktivnosti NKA.

U slučaju PMCA hipoteza je potvrđena u slučaju smanjenog sadržaja ukupne PMCA u tkivu moždane kore i maloga mozga *St8sia1 null*, PMCA1 u tkivima moždane kore, maloga mozga i hipokampusu, te PMCA2 i PMCA3 u tkivu maloga mozga, kao i statistički značajno smanjene ekspresije PMCA4 u tkivu moždane kore miševa *St8sia1 null* u odnosu na kontrolnu skupinu. Različiti količinski sadržaj specifičnih izoformi PMCA između tri regije mozga upućuje na različite potrebe za pojedinim izoformama sa specifičnim kinetičkim parametrima. Rezultati ukazuju da ne dolazi do istovremenog smanjenja ekspresije svih izoformi PMCA koje su u mozgu eksprimirane ovisno o regiji, a rezultati također idu u prilog činjenici da izostanak funkcije neuronalno specifičnih PMCA2 i PMCA3 u mozgu ne može biti nadoknađen povećanjem sadržaja drugih izoformi (257). Iz rezultata je vidljivo kako je barem jedna od neuronalno specifičnih izoformi povećanog ili nepromijenjenog sadržaja u sve tri analizirane regije mozga. Značajno smanjen sadržaj ubikvitarno eksprimiranih izoformi PMCA1 i PMCA4 korelira sa značajnim sniženjem aktivnosti PMCA u tkivu moždane kore regija *St8sia1 null*, što upućuje na zaključak o važnosti ovih izoformi PMCA koje se smatraju „sporim“ izoformama u kontekstu svojih kinetičkih parametara uz istovremeno povećanje sadržaja izoforme PMCA2 koja je specifična za neurone i smatra se „brzom“ izoformom, što je i u skladu s povećanom ekspresijom gena *Atp2b2* koji za nju kodira u navedenoj regiji mozga. Možemo pretpostaviti da uslijed pada aktivnosti dolazi do smanjenja količine „sporih“ i povećanja količine „brzih“ izoformi kako bi se uspjela održavati homeostaza Ca^{2+} , no stvarnost je vjerojatno puno kompleksnija jer je ukupan broj različitih varijanti PMCA koje nastaju alternativnim prekrajanjem četiriju gena veći od 30 (184). Diskrepancija koju na prvi pogled vidimo u razlici sadržaja pojedinih izoformi u staničnoj membrani i same ekspresije gena koji za njih kodiraju može se pripisati činjenici da se PMCA smatra „dugoživućim“ proteinom s vremenom poluživota od 12 (+/-1) dana, no još uvijek nije poznato vrijeme poluživota pojedinačnih izoformi (257). Razlike između

genske ekspresije utvrđene metodom qRT-PCR i proteinske ekspresije utvrđene westernskom metodom otiska mogu biti posljedica različitog metodološkog pristupa. Naime, svaka od analiziranih izoformi proteina posjeduje i brojne transkripcijske varijante koje početnice korištene u ovom istraživanju ne obuhvaćaju, a također prethodno navedeni velik broj varijanti koje nastaju alternativnim prekranjem transkripcijskog produkta u konačnici nisu prepoznate korištenjem protutijela u westernskoj metodi otiska. Prednost ovog istraživanja svakako je višerazinski pristup u analizi proteina od interesa, na razini genske i proteinske ekspresije.

U slučaju neuroplastina hipoteza je potvrđena u vidu sniženja sadržaja izoforme Np65 u moždanoj kori i Np55 u malome mozgu miševa *St8sia1 null*, dok je ekspresija Np65 povećana u hipokampusu. Sniženje količine Np65 prati smanjenje količine PMCA1 u moždanoj kori ide u prilog činjenici da Np tvori funkcionalne komplekse s PMCA1, te je pokazano kako PMCA1 bez Np gubi svoju katalitičku aktivnost (238). Smanjena količina neuroplastina u pojedinim regijama moguće je i jedan od čimbenika razvoja depresivnog ponašanja u miševa *St8sia1 null*, budući da su poremećaji u ekspresiji neuroplastina su zabilježeni u razvoju depresivnih poremećaja u animalnim modelima (236).

6.3. UTJECAJ GANGLIOZIDA NA PROMJENE U SUBMEMBRANSKOJ LOKALIZACIJI ISTRAŽIVANIH PROTEINA

Ovim istraživanjem po prvi puta je zbirno analiziran utjecaj promijenjenog gangliozidnog sastava na submembransku lokalizaciju pojedinačnih izoformi NKA, PMCA i neuroplastina, membranskih proteina čije je funkcioniranje u velikoj mjeri pod utjecajem lipidnog mikrokoliša u kojem se nalaze. Gangliozidi su posebno koncentrirani u domenama LR gdje sudjeluju u modulaciji funkcija membranskih proteina i ionskih kanala, te u brojnim putevima prijenosa signala u stanici i međustaničnoj komunikaciji (45). Hipoteza istraživanja glasila je da povećana količina gangliozida a-serije i nedostatak gangliozida b- i c-serije u moždanom tkivu miševa *St8sia1 null* uzrokuje intramembransku redistribuciju NKA, PMCA i neuroplastina, funkcionalne podjedinice PMCA, te je hipoteza u potpunosti potvrđena. Za sve analizirane proteine pokazano je

kako mijenjaju svoj položaj među membranskim nanodomenama LR koje su osobito bogate gangliozidima i ostatka stanične membrane u dvije analizirane regije mozga. Za sve proteine osim PMCA2 pokazano je da im se smanjuje sadržaj u domenama LR i nLR, što ukazuje na sveobuhvatan proces redistribucije istraživanih proteina između specifičnih membranskih nanodomena uslijed povećanja količine gangliozida a-serije i nedostatka gangliozida b- i c-serije u moždanom tkivu miševa *St8sia1 null*. Za pravilno funkcioniranje NKA od iznimne je važnosti njezin lipidni mikrokoliš uslijed fizikalnih i kemijskih interakcija s lipidima koji je okružuju (143), te je utvrđeno postojanje dviju populacija NKA unutar membrane: aktivne i neaktivne populacije (144). Ovim istraživanjem utvrđen je obrazac smanjenja aktivnosti NKA u moždanoj kori i malome mozgu miševa *St8sia1 null*, što može biti posljedica redistribucije aktivne populacije enzima uslijed promijenjenog gangliozidnog sastava membrane čime NKA postaje okružena suboptimalnim okolišem po pitanju njezine kako enzimske aktivnosti tako i uloge u signalnim putevima. Naša istraživačka skupina ranije je pokazala da dolazi do preraspodjele NKA između domena LR i ostatka membrane nakon ciklusa smrzavanja i odmrzavanja uslijed reorganizacije membrane, a promjenu u preraspodjeli prati i GM1 (150) koji je u mišjem modelu *St8sia1 null* pojačano eksprimiran. Istraživanjem je analizirana i submembranska lokalizacija kolesterola u LR i nLR domenama zbog važne uloge kolesterola u ustroju LR. Utvrđen je porast sadržaja kolesterola u domenama LR, a pokazano je kako se kolesterol može vezati između α - i β -podjedinice NKA što onemogućuje aktivnost enzima (146).

Promjene u redistribuciji PMCA1, PMCA3 i PMCA4 idu u prilog statistički značajno smanjenoj aktivnosti PMCA u tkivu moždane kore miševa *St8sia1 null*, budući da je u literaturi poznato kako je najveća aktivnost PMCA unutar mikrodomena LR bogatih gangliozidima i kolesterolom (37),(206). Zanimljivo je kako unatoč povećanoj količini kolesterola u domenama LR u obje analizirane regije dolazi do izlaska PMCA izoformi iz njih, iako je u literaturi pokazano da do redistribucije PMCA između LR i nLR dolazi u slučaju smanjenja sadržaja kolesterola (206), što upućuje na izraženiji učinak promijenjenog sastava gangliozida u ustroju LR i pozicioniranju proteina unutar ovih nanodomena. Za izoformu PMCA4 poznato je kako je zajedno s kolesterolom i GM1 predominantno prisutna u domenama LR u malome mozgu (258), regiji posebno bogatoj

b-serijom gangliozida (23), koja uslijed nefunkcionalnosti GD3-sintaze nije sintetizirana u mozgu miševa *St8sia1 null*. To ukazuje na važnost b-serije gangliozida za pravilno pozicioniranje PMCA4 u membrani budući da rezultati pokazuju smanjenje sadržaja ove izoforme u domenama LR izoliranim iz malog mozga. Među rezultatima se ističe porast količine PMCA2 u domenama LR i nLR u tkivu moždane kore *null* miševa, praćen porastom ekspresije gena *Atp2b2* i samog sadržaja proteina utvrđenom westernskom metodom otiska, što ukazuje na važnost ove neuronalno specifične izoforme u kompenzaciji pada aktivnosti PMCA u tkivu moždane kore uslijed promijenjenog gangliozidnog sastava membrane.

Zanimljivo je za istaknuti kako promjene u redistribuciji Np65 ne prate promjene u redistribuciji PMCA2. Naša je istraživačka skupina pokazala kako je kompleks Np65/PMCA2 stabiliziran u lipidnim splavima obogaćenim gangliozidom GM1 (208), što upućuje na važnost optimalnog sadržaja GM1 u staničnoj membrani za stabilnost navedenog kompleksa, a upravo je ekspresija ovog gangliozida povećana u mišjem modelu *St8sia1 null*.

6.4. UTJECAJ GANGLIOZIDA NA ENZIMSKU AKTIVNOST ATPaza TIPA P

Nakon sustavnog utvrđivanja razlika u genskoj ekspresiji, proteinskom sadržaju i promjena u submembranskoj lokalizaciji NKA i PMCA, mjerenjem njihovih enzimskih aktivnosti ustanovljen je konačan biokemijski učinak navedenih promjena uslijed povećanja količine gangliozida a-serije i nedostatka gangliozida b- i c-serije u moždanom tkivu miševa *St8sia1 null* u odnosu na kontrolnu skupinu. Aktivnosti obaju spomenutih enzima u ovom istraživanju po prvi puta su određene u mišjem modelu s navedenom promjenom u gangliozidnom sastavu. Hipoteza koja glasi da zbog navedenog specifičnog gangliozidnog sastava dolazi do pada aktivnosti i NKA i PMCA potvrđena je u slučaju statistički značajnog smanjenja aktivnosti obaju enzima u tkivu moždane kore i smanjenja aktivnosti NKA u malome mozgu miševa *St8sia1 null*. Poznato je da smanjenje aktivnosti NKA dovodi do poremećaja u ionskoj homeostazi stanice, i opisani su učinci smanjenja njezine aktivnosti na razvoj patologije neuroloških i neurodegenerativnih oboljenja poput glioma, multiple skleroze, subakutnog skleroznog panencefalitisa, PD,

AD, sistemskog eritemskog lupusa, Downovog sindroma, te epilepsije (152)–(154). Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako se smanjenje aktivnosti NKA vjerojatno nastoji kompenzirati povećanom ekspresijom gena za katalitičke podjedinice NKA što je vidljivo iz rezultata analize njihove genske ekspresije, te posljedično i povećanja proteinskog sadržaja ukupnih katalitičkih podjedinica u tkivima moždane kore i maloga mozga miševa *St8sia1 null*. Uvidom u rezultate utvrđivanja submembranske lokalizacije može se zaključiti da unatoč porastu ukupnog sadržaja katalitičkih podjedinica NKA, kao i porasta ekspresije gena koji za njih kodiraju ipak dolazi do redistribucije enzima u staničnoj membrani između LR domena i ostatka membrane upućuje na izuzetnu važnost gangliozidnog sastava membrane za optimalno funkcioniranje enzima. Naše prethodno istraživanje pokazalo je kako uslijed reorganizacije membrane promjene u aktivnosti NKA prati preraspodjela GD1a, GD1b, i GT1b između domena LR i nLR (150). Sniženje aktivnosti NKA u moždanoj kori i malome mozgu prati i porast količine kolesterola u navedenim regijama miševa *St8sia1 null*, a pokazano je kako kolesterol veže i inhibira aktivnost NKA (146). Predlažemo kako strukturne promjene neuronalnih membrana koje su posljedica promijenjenog sastava gangliozida dovode do gubitka funkcije NKA i poremećene ionske homeostaze što rezultira promjenama u njihovom akcijskom potencijalu (147). Dodavanjem gangliozida b-serije gangliozida u homogenate miševa *St8sia1 null* u kojima je bez njihovog dodatka aktivnost manja u odnosu na kontrolnu skupinu, po prvi puta smo uspjeli „spasiti“ aktivnost enzima (engl. *Activity rescue*). U ovom istraživanju aktivnost (Slika 5.5.3 i 5.5.4.) je i premašila onu u kontrolnim životinjama, pa bi daljnja istraživanja trebala usmjeriti na optimizaciju koncentracije dodanih gangliozida i način njihova dodatka kako bi postignuta aktivnost u potpunosti odgovarala onoj kontrolnih životinja.

Gubitak aktivnosti PMCA uzrokuje poremećaj u homeostazi Ca^{2+} u tkivu mozga, a smanjenje aktivnosti zabilježeno je u oboljelih od AD i PD, te u životinjskim modelima ovih neurodegenerativnih bolesti (221). Nemogućnost održavanja homeostaze Ca^{2+} u mozgu jedna je od značajki AD (218), te je dokazana inhibicija PMCA $\text{A}\beta$ -peptidom, s najvećim inhibitornim učinkom na PMCA4 (222). Aktivnost PMCA utvrđena u ovom istraživanju statistički je značajno manja u moždanoj kori miševa *St8sia1 null*, praćena porastom ekspresije gena za izoforme PMCA2 i PMCA4, te povećanjem sadržaja „brze“

neuronalno specifične izoforme PMCA2 i njezine zastupljenosti u lipidnim splavima kao mehanizma kompenzacije za pad aktivnosti u ovoj regiji mozga. Smanjenje aktivnosti PMCA može se i pripisati činjenici da je istraživanjem u staničnim kulturama utvrđena inhibicija aktivnosti PMCA u ovisnosti o NKA zbog termodinamičkog pomaka količine slobodne energije u korist NKA uslijed dostizanja kritične koncentracije ATP-a (198). U kontekstu specifičnog sastava moždanih gangliozida u miševa *St8sia1 null* u prilog smanjenju aktivnosti PMCA idu spoznaje da gangliozid GD1b stimulira PMCA, GM1 smanjuje, a asialo-GM1 u potpunosti inhibira u mozgu štakora (181). Iste rezultate zabilježili smo i u ovom istraživanju, kada je aktivnost PMCA u homogenatima moždane kore miševa ponovno povećana dodavanjem gangliozida b-serije. Zbirno, navedeni rezultati upućuju na izrazit utjecaj sastava gangliozida i kolesterola na optimalno funkcioniranje PMCA, te posljedično na održavanje homeostaze Ca^{2+} u SŽS.

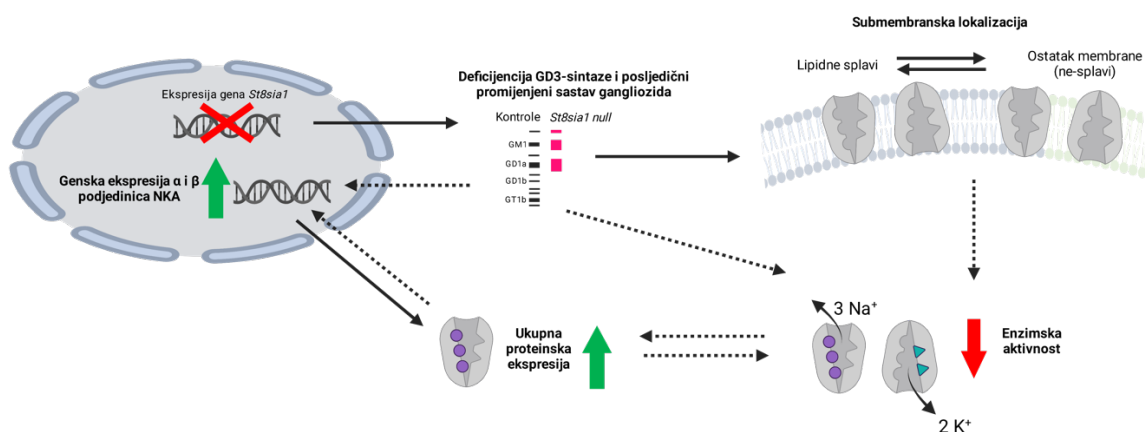
6.5. UKUPNE BIOKEMIJSKE PROMJENE

U ovom istraživanju analizirane su 3 regije mozga, moždana kora, mali mozak i hipokampus, koje su odabrane radi regionalno-specifičnog obrasca izražaja gangliozida. Primjerice, b-serija gangliozida koja nedostaje istraživanom mišjem modelu osobito je zastupljena u malom mozgu (259). U malom mozgu miševa detektirana je i jaka imunoreaktivnost gangliozida GD1a (259), čija je koncentracija u ovom mišjem modelu povećana u usporedbi s kontrolama (78). Moždana kora također je bogata gangliozidima GD1a, GD1b te GT1b (259), a upravo smo za moždanu koru u ovom istraživanju pokazali najveće sveobuhvatne razlike i na razini genske i proteinske ekspresije, kao i u samoj aktivnosti enzima NKA i PMCA te u koncentraciji kolesterola.

Prethodna istraživanja naše skupine pokazala su da je upravo u ovom mišjem modelu u svim istraživanim regijama mozga promijenjena ekspresija gena koji kodiraju enzime i proteine metabolizma kolesterola (260). Primjerice, pokazano je kako je genska ekspresija 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA-reduktaze, glavnog regulacijskog enzima u biosintetskom putu kolesterola, povećana u *St8sia1 null* životinja u usporedbi s kontrolama u moždanoj kori, malom mozgu i hipokampusu. Ovim istraživanjem detektirana je povećana koncentracija kolesterola i u ukupnim homogenatima, kao i u pojedinim submembranskim domenama tih regija mozga. Poznato je da kolesterol može

imati utjecaja na enzimsku aktivnost i NKA i PMCA (37),(143),(146) te je moguće da u ovom modelu na aktivnost istraživanih enzima ne utječe samo promijenjen gangliozidni okoliš, već i promijenjen sadržaj kolesterola. Nadalje, za oba istraživana enzima poznate su interakcije u koje preferencijalno stupaju s negativno nabijenim fosfolipidima membrane (149),(204),(205). S obzirom da i gangliozidi nose značajan negativni naboj, moguće je da i oni stupaju u direktne interakcije odnosno vežu NKA i/ili PMCA čime direktno utječu na njihovu enzimsku aktivnost, a ne samo preko promijenjene arhitekture stanične membrane i sadržaja kolesterola. U posljednje vrijeme u literaturi se sve više govori o proteinima koji posjeduju vezne domene za gangliozide (51), stoga je ovakva hipoteza vrlo intrigantna i predstavlja obećavajući smjer daljnjih istraživanja. Osobito je zanimljivo da su ovim istraživanjem detektirane promjene na svim biološkim razinama, od genske i proteinske ekspresije do enzimске aktivnosti. Razlike su specifične za pojedine enzimске podjedinice koje inače imaju drugačiju zastupljenost u različitim tkivima. Ono što se logično nameće kao pitanje kada sveobuhvatno sagledavamo dobivene rezultate, je što je primarna promjena koja potom za sobom povlači i ostale promjene. U tom kontekstu možemo razmotriti nekoliko mogućnosti: a) promijenjena arhitektonika stanične membrane zbog promijenjenog gangliozidnog sastava utječe na redistribuciju lipidnih splavi što se odražava na enzimsku aktivnost NKA i PMCA; potom promijenjena enzimska aktivnost mehanizmom povratne sprege utječe na samu gensku i proteinsku ekspresiju navedenih enzima; b) promijenjen gangliozidni sastav gdje pojedinih gangliozida imamo više nego u kontrolama (GM1 i GD1a), a nekih nemamo uopće (GD1b i GT1b), direktno utječu na gensku ekspresiju ciljnih gena koji uključuju gene za metabolizam kolesterola, neuroplastin, PMCA i NKA, što posljedično dovodi do različite koncentracije navedenih proteina i kolesterola, redistribucije komponenti lipidnih splavi te promijenjene enzimске aktivnosti. Naravno, ovdje treba uzeti u obzir i međuovisnost PMCA i NKA, za čiju je enzimsku aktivnost potreban ATP i u slučaju njegove niske koncentracije NKA „krade“ ATP od PMCA odnosno dostupni ATP će iskoristiti NKA prije PMCA te dolazi do inhibicije aktivnosti PMCA (198).

Predloženi mehanizmi su sažeto prikazani na primjeru moždane kore i NKA u Slici 6. Stvarna situacija se vjerojatno nalazi između ova dva objašnjenja te su potrebna daljnja ciljana istraživanja koja bi rasvijetlila na koji način su gangliozidi inicijalni okidač ovih promjena, bilo da utječu na gensku ekspresiju ili na samu aktivnost enzima direktnim vezanjem, ili gangliozidi pak pokreću svojevrsnu kaskadu promjena koja ultimativno rezultira smanjenom enzimskom aktivnošću.



Slika 6. Shematski prikaz posljedica nedostatka GD3-sintaze na primjeru ekspresije, submembranske lokalizacije i aktivnosti NKA u moždanoj kori. Crne pune strelice predstavljaju dokazani smjer promjene; primjerice, nedostatak ekspresije gena *St8sia1 null* uzrokuje nedostatak ekspresije GD3-sintaze i posljedično promijenjen sastav gangliozida. Također, logično je za pretpostaviti da povećana genska ekspresija pojedinih podjedinica NKA uzrokuje povećanu ukupnu proteinsku ekspresiju NKA. Crne isprekidane strelice prikazane su za slučajeve kad nije sigurno što je nastupilo prvo; primjerice utječe li promijenjeni sastav gangliozida direktno na gensku ekspresiju; utječe li promijenjeni sastav gangliozida direktno na enzimsku aktivnost ili redistribucija lipidnih splavi zbog promijenjenog gangliozidnog sastava utječe na enzimsku aktivnost NKA; potom promijenjena enzimska aktivnost mehanizmom povratne sprege utječe na samu gensku i proteinsku ekspresiju NKA. Promjene (i njihov smjer) utvrđene ovim istraživanjem prikazane su blok-strelicama u crvenoj odnosno zelenoj boji (u skladu s Tablicom 6.). Shema kreirana na [Biorender.com](https://www.biorender.com).

6.6. TRANSLACIJSKI POTENCIJAL REZULTATA ISTRAŽIVANJA

Nedostatak GD3-sintaze te posljedično povećana količina gangliozida a-serije i nedostatak gangliozida b- i c-serije u moždanom tkivu miševa *St8sia1 null* polazišna su točka ovog rada u kojemu je istražen utjecaj navedene promjene u gangliozidnom sastavu na gensku i proteinsku ekspresiju, te submembransku lokalizaciju NKA, PMCA i Np, kao i na enzimsku aktivnost NKA i PMCA u različitim regijama mozga. Međutim GD3-sintaza se dugi niz godina istražuje i kao ključan enzim u razvoju brojnih vrsta tumora, pogotovo u tumorima dermalnog porijekla, a sam gangliozid GD3 smatra se važnim faktorom u razvoju melanoma i neuroblastoma zbog učinka na staničnu proliferaciju (99). Nedostatak GD3-sintaze i posljedično gangliozida GD3 rezultira sporijim rastom tumora u staničnoj kulturi bez utjecaja na razvoj fenotipa melanoma (261). Mehanizmi uključenosti GD3-sintaze i GD3 razlikuju se među različitim vrstama tumora. Primjerice, inhibicija ekspresije GD3-sintaze u hibridnim stanicama neuroblastoma štakora povezan je sa sporijim rastom tumorskih stanica i smanjenim metastatskim potencijalom i usporenom angiogenezom (262). Porast ekspresije GD3-sintaze zabilježen je i u tumoru dojke s pozitivnim esktrogenskim receptroima (263), a pokazano je i kako uslijed ekspresije GD3-sintaze dolazi do porasta količine malignih promjena u stanicama tumora dojke putem aktivacije signalnih puteva Erk/MAPK i PI3K/Akt (264). Maligni glioblastomi ljudi karakterizirani su velikim udjelom GD3, čija je količina u tumorskom tkivu direktan odraz stupnja malignosti (265), te se GD3-sintaza i GD3 smatraju potencijalnim ciljnim molekulama za razvoj novih terapija (266). Uključenost GD3-sintaze i GD3 zabilježen je i smatra se potencijalnim kandidatima u razvoju terapija za liječenje tumora želuca (267) i prostate (268), kao i kronične mijeloidne leukemije (269). Zadnjih godina velika pozornost usmjerena je na razvoj inhibitora aktivnosti GD3-sintaze. Primjerice spoj triptolid izoliran iz biljke *Tripterygium wilfordii* utvrđen je kao inhibitor GD3-sintaze jer izaziva supresiju aktivacije signalnog puta NF- κ B što dovodi do inhibicije proliferacije stanica SK-MEL-2 melanoma čovjeka (270). Sintetska molekula BMS-345541 također uzrokuje inhibiciju ekspresije GD3-sintaze putem inhibicije puta NF- κ B rezultirajući smanjenjem veličine tumora i produljenjem životnog vijeka miševa s tumorom dojke (271). Međutim, rezultati ovog doktorskog rada upućuju da nedostatak GD3-sintaze i

posljedično promjena gangliozidnog mikrookoliša imaju negativan utjecaj na funkcioniranje NKA i PMCA, proteina od iznimne važnosti u održavanju ionske homeostaze. Doprinos ovog doktorskog rada također je i rezultat kojim je pokazan povrat odnosno „spašavanje“ aktivnosti NKA i PMCA dodavanjem gangliozida b-serije (Slike 5.5.3 i 5.5.4), čime se znatno smanjuje negativan utjecaj nedostatka GD3-sintaze na navedene proteine. Smanjenje uočenih negativnih promjena administracijom gangliozida GD1b i GT1b daje ovom doktorskom istraživanju potencijalnu translacijsku primjenu u budućim istraživanjima uključenosti GD3-sintaze u razvoju različitih tumora. Naime, primjena egzogenih gangliozida strategija je u razvoju terapija za različite patofiziološke promjene. U mišjim modelima pokazano je kako intranazalna administracija gangliozida GD3 i GM1 dovodi do obnove sposobnosti regeneracije neuronalnih matičnih stanica i promoviranja neurogeneze u mišjem modelu PD (272). Pokazano je i kako administracija GM1 pozitivno utječe i na oporavak od inducirane ozljede kralježnične moždine u mišjem modelu (273). Administracija gangliozida strategija je i u kliničkim istraživanjima na ljudima. Primjerice, u dva klinička istraživanja pacijenti oboljeli od PD intravenozno ili subkutano su primali 100 mg egzogenog gangliozida GM1 tijekom dvije godine, što je dovelo do poboljšanja motoričkih funkcija i sporije progresije bolesti (274). Klinička istraživanja administracije gangliozida GM1 pokazala su pozitivan učinak kod pacijenata oboljelih od AD (71). Prvi službeni gangliozidni lijek *Cronassial* na tržište je izišao još 1973. godine te je propisivan za liječenje perifernih neuropatija (275).

Naposljetku, uzimajući u obzir sve prikazane rezultate, jasno je da promijenjen sastav gangliozida ima dalekosežne posljedice po funkcioniranje ubikvitarnih staničnih membranskih prijenosnika iona. Iako za većinu podjedinica NKA odnosno izoformi PMCA ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji između *St8sia1 null* miševa i kontrola, postoje jasni trendovi promijenjenog obrasca ekspresije koji dovodi do snižene aktivnosti NKA i PMCA. Svakako valja imati na umu da i male, na prvi pogled „neznačajne“ promjene u primjerice proteinskoj ekspresiji mogu imati bitan utjecaj na stanične procese, osobito ako su kumulativne. Ovaj mišji model postaje sve zanimljiviji istraživačima zbog svog relativno blagog fenotipa, ali analogne smetnje u motorici, oporavku nakon ozljede, poteškoće sa sluhom i vidom kod ljudi mogu iznimno značajno

utjecati na kvalitetu života. Nadalje, GD3-sintaza kao terapijski cilj u brojnim istraživanjima tumora od osobitog je interesa i upravo zbog namjere da se inhibira kod liječenja različitih vrsta karcinoma izrazito je važno u potpunosti rasvijetliti posljedice inaktivacije ovog enzima. Stoga naše istraživanje kojim smo ne samo rasvijetlili posljedice inaktivacije GD3-sintaze, već i predložili potencijalnu terapiju odnosno način da maksimalno umanjimo negativne posljedice u vidu egzogenog dodatka gangliozida b-serije, predstavlja vrijedan doprinos temeljnim spoznajama u glikobiologiji kao i razvitku budućih terapija u poremećajima koji uključuju promijenjenu ekspresiju GD3-sintaze.

7. ZAKLJUČCI

- I. Promijenjen gangliozidni sastav membrane u različitim regijama mozga miševa *St8sia1 null* uzrokuje promjene ekspresije gena koji kodiraju za pojedine izoforme i podjedinice NKA, PMCA i Np.
- II. Promijenjen gangliozidni sastav membrane membrane u različitim regijama mozga miševa *St8sia1 null* uzrokuje selektivne promjene u proteinskoj količini pojedinih izoformi i podjedinica NKA, PMCA i Np.
- III. Promijenjen gangliozidni sastav membrane uzrokuje redistribuciju NKA, PMCA i Np između različitih membranskih domena u mozgu miševa *St8sia1 null*.
- IV. Promijenjen gangliozidni sastav membrane uzrokuje povećanje koncentracije kolesterola i njegove količine u membranskim domenama u miševa *St8sia1 null*.
- V. Promijenjen gangliozidni sastav membrane uzrokuje smanjenje aktivnosti NKA i PMCA u različitim regijama mozga miševa *St8sia1 null*.
- VI. Dodatak egzogenih gangliozida b-serije dovodi do povećanja početno snižene aktivnosti NKA i PMCA u moždanoj kori miševa *St8sia1 null*.

8. SAŽETAK

U mišjim modelima s poremećenom sintezom glikosfingolipida gangliozida dolazi do promjene u lipidnom okolišu membrane potrebnom za pravilno funkcioniranje membranskih proteina. Cilj ovog istraživanja bio je višerazinskim metodološkim pristupom sustavno utvrditi utjecaj promijenjenog sastava gangliozida u mišjem modelu *St8sia1 null* na gensku i proteinsku ekspresiju, te submembransku lokalizaciju pojedinih izoformi i podjedinica Na⁺, K⁺-ATPaze (NKA), Ca²⁺-ATPaze stanične membrane (PMCA) i neuroplastina (Np), kao i na enzimsku aktivnost NKA i PMCA u različitim regijama mozga. Analizom genske ekspresije metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu utvrđene su promjene u ekspresiji gena za katalitičke i β- podjedinice NKA, izoforme PMCA između moždane kore, maloga mozga i hipokampusu miševa *St8sia1 null* u odnosu na kontrolnu skupinu, ukazujući na različitu staničnu potrebu za pojedinim izoformama, dok je u sve tri regije mozga utvrđen porast ekspresije gena za neuroplastin. Westernskom metodom otiska pokazano je da dolazi do promjene u količinskom sadržaju istraživanih proteina u regijama mozga *St8sia1 null* u vidu porasta količine katalitičkih podjedinica NKA te izoforme PMCA2 u moždanoj kori, PMCA4 u malome mozgu, te PMCA3 i 4 u hipokampusu miševa *St8sia1 null* ukazujući na različitu staničnu potrebu za pojedinim izoformama različitih kinetičkih svojstava. Analizom submembranske lokalizacije navedenih proteina utvrđen je proces njihove redistribucije u analiziranim regijama mozga miševa *St8sia1 null*. Analizom enzimskih aktivnosti NKA i PMCA utvrđeno je kako dolazi do pada aktivnosti u moždanoj kori i malome mozgu miševa *St8sia1 null* uslijed ukupnih biokemijskih promjena uzrokovanim promijenjenim gangliozidnim sastavom membrane. Dodavanjem egzogenih gangliozida b- serije uspostavljen je porast enzimske aktivnosti NKA i PMCA, dajući ovom istraživanju translacijski potencijal. Rezultati istraživanja nedvojbeno pokazuju da promijenjen sastav gangliozida ima dalekosežne posljedice po funkcioniranje ubikvitarnih staničnih membranskih prijenosnika iona.

9. ABSTRACT

The effect of ganglioside composition on expression, submembrane localization and activity of Na⁺, K⁺-ATPase and plasma membrane Ca²⁺-ATPase in mouse brain

Borna Puljko, MS Mol. Bio., 2023.

Mice models with altered biosynthesis of glycosphingolipids gangliosides have altered membrane lipid environment necessary for the proper function of membrane proteins. The aim of this thesis was to systematically determine the effect of altered ganglioside composition on gene and protein expression, submembrane localization of specific isoforms and subunits of Na⁺, K⁺-ATPase (NKA), plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) and neuroplastin (Np), and enzyme activity of NKA and PMCA in different brain regions of *St8sia1 null* mice. Gene expression analysis revealed changes in expression profiles of different PMCA isoforms and NKA subunits in *null* mice compared to their controls, indicating the different cellular need for specific isoforms. Neuroplastin gene expression was higher in all analysed regions. Higher protein content of catalytic NKA subunits and PMCA2 isoforms in the cortex, PMCA4 in the cerebellum, and of PMCA3 and PMCA4 isoforms in the hippocampus was determined in *null* mice illustrating the cellular needs for specific subunits with differing kinetic parameters. Altered submembrane localization of investigated proteins shows their redistribution between different membrane subdomains. Described biochemical changes stemming from altered ganglioside composition, cause lower enzyme activities of NKA and PMCA determined in cortices and cerebella of *null* mice. We were able to rescue NKA and PMCA activity by administration of exogenous b- series gangliosides, giving this research translational potential. The results of this thesis unequivocally show that changes in ganglioside microenvironment have considerable consequences on the function of membrane ion transporters.

10. POPIS LITERATURE

1. Yu RK, Nakatani Y, Yanagisawa M. The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain. *J Lipid Res.* 2009;(50):S440–5.
2. Klenk E. Über die Ganglioside, eine neue Gruppe von zuckerhaltigen Gehirnlipoiden. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1942;(273):76–86.
3. Yu RK, Tsai YT, Ariga T, Yanagisawa M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides—An overview. *J Oleo Sci.* 2011;(60):537–44.
4. Cohen M, Varki A. The sialome—far more than the sum of its parts. *OMICS.* 2010;(14):455–64.
5. Svennerholm L. Ganglioside designation. *Adv Exp Med Biol.* 1980;(125):11.
6. Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M, et al. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature.* 2003;(426):803–9.
7. Yu RK, Bieberich E, Xia T, Zeng G. Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system. *J Lipid Res.* 2004;(45):783–93.
8. 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):461–518.
9. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997 387:6633. 1997;(387):569–72.
10. Calder PC, Yaqoob P. Lipid Rafts—Composition, Characterization, and Controversies. *J Nutr.* 2007;(137):545–7.
11. Ripa I, Andreu S, López-Guerrero JA, Bello-Morales R. Membrane Rafts: Portals for Viral Entry. *Front Microbiol.* 2021;(12):631274.
12. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;(1):31–9.
13. Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest.* 2002;(110):597–603.
14. Pike LJ. The challenge of lipid rafts. *J Lipid Res.* 2009;(50):S323–8.
15. Villar VAM, Cuevas S, Zheng X, Jose PA. Localization and signaling of GPCRs in lipid rafts. *Methods Cell Biol.* 2016;(132):3–23.

16. Wehmeyer L, Toit A du, Lang DM, Hapgood JP. Lipid raft- and protein kinase C-mediated synergism between glucocorticoid- and gonadotropin-releasing hormone signaling results in decreased cell proliferation. *J Biol Chem.* 2014;(289):10235–51.
17. Arcaro A, Aubert M, Espinosa del Hierro ME, Khanzada UK, Angelidou S, Tetley TD, i sur. Critical role for lipid raft-associated Src kinases in activation of PI3K-Akt signalling. *Cell Signal.* 2007;(19):1081–92.
18. Zuo W, Chen YG. Specific Activation of Mitogen-activated Protein Kinase by Transforming Growth Factor- β Receptors in Lipid Rafts Is Required for Epithelial Cell Plasticity. *Mol Biol Cell.* 2009;(20): 1020-9.
19. Ngamukote S, Yanagisawa M, Ariga T, Ando S, Yu RK. Developmental changes of glycosphingolipids and expression of glycoconjugates in mouse brains. *J Neurochem.* 2007;(103):2327–41.
20. Svennerholm L, Boström K, Jungbjer B, Olsson L. Membrane lipids of adult human brain: lipid composition of frontal and temporal lobe in subjects of age 20 to 100 years. *J Neurochem.* 1994;(63):1802–11.
21. Kracun I, Rosner H, Drnovsek V, Vukelic Z, Cosovic C, Trbojevic-Cepe M, i sur. Gangliosides in the human brain development and aging. *Neurochem Int.* 1992;(20):421–31.
22. Segler Stahl K, Webster JC, Brunngraber EG. Changes in the concentration and composition of human brain gangliosides with aging. *Gerontology.* 1983;(29):161–8.
23. Kračun I, Rösner H, Čosović C, Stavljenić A. Topographical atlas of the gangliosides of the adult human brain. *J Neurochem.* 1984;(43):979–89.
24. Yu RK, Iqbal K. Sialosylgalactosyl ceramide as a specific marker for human myelin and oligodendroglial perikarya: gangliosides of human myelin, oligodendroglia and neurons. *J Neurochem.* 1979;(32):293–300.
25. Kim SU. Neurobiology of human oligodendrocytes in culture. *J Neurosci Res.* 1990;(27):712–28.
26. Sbaschnig-Agler M, Dreyfus H, Norton WT, Sensenbrenner M, Farooq M, Byrne MC, i sur. Gangliosides of cultured astroglia. *Brain Res.* 1988;(461):98–106.

27. Simon BM, Malisan F, Testi R, Nicotera P, Leist M. Disialoganglioside GD3 is released by microglia and induces oligodendrocyte apoptosis. *Cell Death Differ.* 2002;(9):758–67.
28. Wang J, Yu RK. Interaction of ganglioside GD3 with an EGF receptor sustains the self-renewal ability of mouse neural stem cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;(110):19137–42.
29. Santiago MF, Berredo-Pinho M, Costa MR, Gandra M, Cavalcante LA, Mendez-Otero R. Expression and function of ganglioside 9-O-acetyl GD3 in postmitotic granule cell development. *Mol Cell Neurosci.* 2001;(17):488–99.
30. Igarashi M. Molecular basis of the functions of the mammalian neuronal growth cone revealed using new methods. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2019;(95):358–77.
31. Lopez PHH, Báez BB. Gangliosides in Axon Stability and Regeneration. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2018;(156):383–412.
32. Yang LJS, Zeller CB, Shaper NL, Kiso M, Hasegawa A, Shapiro RE, i sur. Gangliosides are neuronal ligands for myelin-associated glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;(93):814–8.
33. Susuki K, Baba H, Tohyama K, Kanai K, Kuwabara S, Hirata K, i sur. Gangliosides contribute to stability of paranodal junctions and ion channel clusters in myelinated nerve fibers. *Glia.* 2007;(55):746–57.
34. Ledeen R, Wu G. New findings on nuclear gangliosides: overview on metabolism and function. *J Neurochem.* 2011;(116):714–20.
35. Ledeen RW, Wu G. The multi-tasked life of GM1 ganglioside, a true factotum of nature. *Trends Biochem Sci.* 2015;(40):407–18.
36. Dyatlovitskaya E, Novikov AM, Gorkova NP, Bergelson LD. Gangliosides of hepatoma 27, normal and regenerating rat liver. *Eur J Biochem.* 1976;(63):357–64.
37. Jiang L, Bechtel MD, Galeva NA, Williams TD, Michaelis EK, Michaelis ML. Decreases in plasma membrane Ca²⁺-ATPase in brain synaptic membrane rafts from aged rats. *J Neurochem.* 2012;(123):689–99.

38. Wu G, Xie X, Lu ZH, Ledeen RW. Sodium-calcium exchanger complexed with GM1 ganglioside in nuclear membrane transfers calcium from nucleoplasm to endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;(106):10829–34.
39. Wang J, Wu G, Miyagi T, Lu ZH, Ledeen RW. Sialidase occurs in both membranes of the nuclear envelope and hydrolyzes endogenous GD1a. *J Neurochem*. 2009;(111):547–54.
40. Tsai YT, Itokazu Y, Yu RK. GM1 ganglioside is involved in epigenetic activation loci of neuronal cells. *Neurochem Res*. 2016;(41):107–15.
41. Tempera I, Buchetti B, Lococo E, Gradini R, Mastronardi A, Mascellino MT, i sur. GD3 nuclear localization after apoptosis induction in HUT-78 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;(368):495–500.
42. Gu RX, Ingólfsson HI, de Vries AH, Marrink SJ, Tieleman DP. Ganglioside-Lipid and Ganglioside-Protein Interactions Revealed by Coarse-Grained and Atomistic Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Physical Chemistry B*. 2017;(121):3262–75.
43. Kabayama K, Sato T, Saito K, Loberto N, Prinetti A, Sonnino S, i sur. Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;(104):13678–83.
44. Julien S, Bobowski M, Steenackers A, le Bourhis X, Delannoy P. How Do Gangliosides Regulate RTKs Signaling? *Cells*. 2013;(2):751–67.
45. Sipione S, Monyror J, Galleguillos D, Steinberg N, Kadam V. Gangliosides in the Brain: Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Applications. *Front Neurosci*. 2020;(14): 572965.
46. da Silva JS, Hasegawa T, Miyagi T, Dotti CG, Abad-Rodriguez J. Asymmetric membrane ganglioside sialidase activity specifies axonal fate. *Nat Neurosci*. 2005;(8):606–15.
47. Prendergast J, Umanah GKE, Yoo SW, Lagerlöf O, Motari MG, Cole RN, i sur. Ganglioside Regulation of AMPA Receptor Trafficking. *J Neurosci*. 2014;(34):13246–58.
48. Flores A, Ramirez-Franco J, Desplantes R, Debreux K, Ferracci G, Wernert F, i sur. Gangliosides interact with synaptotagmin to form the high-affinity receptor

- complex for botulinum neurotoxin B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;(116):18098–108.
49. Coskun Ü, Grzybek M, Drechsel D, Simons K. Regulation of human EGF receptor by lipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;(108):9044–8.
50. Azzaz F, Yahi N, Di Scala C, Chahinian H, Fantini J. Ganglioside binding domains in proteins: Physiological and pathological mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2022;(128):289–324.
51. Fantini J, Fantini CJ. Lipid rafts and human diseases: why we need to target gangliosides. *FEBS Open Bio.* 2023 April 13. doi: 10.1002/2211-5463.13612.
52. Rusnati M, Urbinati C, Tanghetti E, Dell’Era P, Lortat-Jacob H, Presta M. Cell membrane GM1 ganglioside is a functional coreceptor for fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;(99):4367–72.
53. Cararo-Lopes MM, Mazucanti CHY, Scavone C, Kawamoto EM, Berwick DC. The relevance of α -KLOTTHO to the central nervous system: Some key questions. *Ageing Res Rev.* 2017;(36):137–48.
54. Fantini J, Barrantes FJ. Sphingolipid/cholesterol regulation of neurotransmitter receptor conformation and function. *Biochim Biophys Acta.* 2009;(1788):2345–61.
55. Breiden B, Sandhoff K. Lysosomal Glycosphingolipid Storage Diseases. *Annu Rev Biochem.* 2019;(88):461–85.
56. Ryckman AE, Brockhausen I, Walia JS. Metabolism of Glycosphingolipids and Their Role in the Pathophysiology of Lysosomal Storage Disorders. *Int J Mol Sci.* 2020;(21):1–31.
57. 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;(124):230–7.
58. Li TA, Schnaar RL. Congenital Disorders of Ganglioside Biosynthesis. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2018;(156):63–82.
59. Simpson MA, Cross H, Proukakis C, Priestman DA, Neville DCA, Reinkensmeier G, i sur. Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase. *Nat Genet.* 2004;(36):1225–9.

60. Boccuto L, Aoki K, Flanagan-Steet H, Chen CF, Fan X, Bartel F, i sur. A mutation in a ganglioside biosynthetic enzyme, ST3GAL5, results in salt & pepper syndrome, a neurocutaneous disorder with altered glycolipid and glycoprotein glycosylation. *Hum Mol Genet.* 2014;(23):418–33.
61. Boukhris A, Schule R, Loureiro JL, Lourenço CM, Mundwiller E, Gonzalez MA, i sur. Alteration of Ganglioside Biosynthesis Responsible for Complex Hereditary Spastic Paraplegia. *Am J Hum Genet.* 2013;(93):118–123.
62. Harlalka G V., Lehman A, Chioza B, Baple EL, Maroofian R, Cross H, i sur. Mutations in B4GALNT1 (GM2 synthase) underlie a new disorder of ganglioside biosynthesis. *Brain.* 2013;(136):3618–24.
63. Wakil SM, Monies DM, Ramzan K, Hagos S, Bastaki L, Meyer BF, i sur. Novel B4GALNT1 mutations in a complicated form of hereditary spastic paraplegia. *Clin Genet.* 2014;(86):500–1.
64. Edvardson S, Baumann AM, Mühlenhoff M, Stephan O, Kuss AW, Shaag A, i sur. West syndrome caused by ST3Gal-III deficiency. *Epilepsia.* 2013;(54):e24-7.
65. Guo YL, Duan WJ, Lu DH, Ma XH, Li XX, Li Z, i sur. Autophagy-dependent removal of α -synuclein: a novel mechanism of GM1 ganglioside neuroprotection against Parkinson's disease. *Acta Pharmacol Sin.* 2021;(42):518–28.
66. Huebecker M, Moloney EB, van der Spoel AC, Priestman DA, Isacson O, Hallett PJ, i sur. Reduced sphingolipid hydrolase activities, substrate accumulation and ganglioside decline in Parkinson's disease. *Mol. Neurodegener.* 2019;(14):1–21.
67. Kakio A, Nishimoto S, Yanagisawa K, Kozutsumi Y, Matsuzaki K. Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *J Biol Chem.* 2001;(276):24985–90.
68. Yanagisawa K, Odaka A, Suzuki N, Ihara Y. GM1 ganglioside-bound amyloid β -protein (A β): A possible form of preamyloid in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 1995;(1):1062–6.
69. Yang R, Wang Q, Min L, Sui R, Li J, Liu X. Monosialoanglioside improves memory deficits and relieves oxidative stress in the hippocampus of rat model of Alzheimer's disease. *Neurol Sci.* 2013;(34):1447–51.

70. Dai R, Zhang S, Duan W, Wei R, Chen H, Cai W, i sur. Enhanced Autophagy Contributes to Protective Effects of GM1 Ganglioside Against A β 1-42-Induced Neurotoxicity and Cognitive Deficits. *Neurochem Res.* 2017;(42):2417–26.
71. Svennerholm L, Bråne G, Karlsson I, Lekman A, Ramström I, Wikkelsö C. Alzheimer disease - effect of continuous intracerebroventricular treatment with GM1 ganglioside and a systematic activation programme. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2002;(14):128–36.
72. Cloud LJ, Rosenblatt A, Margolis RL, Ross CA, Pillai JA, Corey-Bloom J, i sur. Seizures in juvenile Huntington's disease: Frequency and characterization in a multicenter cohort. *Mov. Disord.* 2012;(27):1797–800.
73. Su D, Ma J, Yang J, Kang Y, Lv M, Li Y. Monosialotetrahexosyl-1 ganglioside attenuates diabetes-associated cerebral ischemia/reperfusion injury through suppression of the endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Clin. Neurosci.* 2017;(41):54–9.
74. Ramirez MR, Muraro F, Zylbersztein DS, Abel CR, Arteni NS, Lavinsky D, i sur. Neonatal hypoxia–ischemia reduces ganglioside, phospholipid and cholesterol contents in the rat hippocampus. *Neurosci Res.* 2003;(46):339–47.
75. Henriques A, Huebeker M, Blasco H, Keime C, Andres CR, Corcia P, i sur. Inhibition of β -Glucocerebrosidase Activity Preserves Motor Unit Integrity in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Sci Rep.* 2017;(7):1–15.
76. Rapport MM, Donnenfeld H, Brunner W, Hungund B, Bartfeld H. Ganglioside patterns in amyotrophic lateral sclerosis brain regions. *Ann Neurol.* 1985;(18):60–7.
77. Takamiya K, Yamamoto A, Furukawa K, Yamashiro S, Shin M, Okada M, i sur. Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;(93):10662–7.
78. Mlinac K, Fabris D, Vukelić Ž, Rožman M, Heffer M, Bognar SK. Structural analysis of brain ganglioside acetylation patterns in mice with altered ganglioside biosynthesis. *Carbohydr Res.* 2013;(382):1–8.

79. Chiavegatto S, Sun J, Nelson RJ, Schnaar RL. A functional role for complex gangliosides: motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice. *Exp Neurol.* 2000;(166):227–34.
80. Pan B, Fromholt SE, Hess EJ, Crawford TO, Griffin JW, Sheikh KA, i sur. Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and PNS: Neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice. *Exp Neurol.* 2005;(195):208.
81. Ma Q, Kobayashi M, Sugiura M, Ozaki N, Nishio K, Shiraishi Y, i sur. Morphological study of disordered myelination and the degeneration of nerve fibers in the spinal cord of mice lacking complex gangliosides. *Arch Histol Cytol.* 2003;(66):37–44.
82. Yoshikawa M, Go S, Takasaki K, Kakazu Y, Ohashi M, Nagafuku M, i sur. Mice lacking ganglioside GM3 synthase exhibit complete hearing loss due to selective degeneration of the organ of Corti. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;(106):9483–8.
83. Yamashita T, Hashiramoto A, Haluzik M, Mizukami H, Beck S, Norton A, i sur. Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;(100):3445–9.
84. Yamashita T, Wu YP, Sandhoff R, Werth N, Mizukami H, Ellis JM, i sur. Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glia interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;(102):2725–30.
85. Okada M, Itoh MI, Haraguchi M, Okajima T, Inoue M, Oishi H, i sur. b-series Ganglioside deficiency exhibits no definite changes in the neurogenesis and the sensitivity to Fas-mediated apoptosis but impairs regeneration of the lesioned hypoglossal nerve. *J Biol Chem.* 2002;(277):1633–6.
86. Tajima O, Egashira N, Ohmi Y, Fukue Y, Mishima K, Iwasaki K, i sur. Reduced motor and sensory functions and emotional response in GM3-only mice: emergence from early stage of life and exacerbation with aging. *Behav. Brain Res.* 2009;(198):74–82.
87. Inoue M, Fujii Y, Furukawa K, Okada M, Okumura K, Hayakawa T, i sur. Refractory skin injury in complex knock-out mice expressing only the GM3 ganglioside. *J Biol Chem.* 2002;(277):29881–8.

88. Kawai H, Allende ML, Wada R, Kono M, Sango K, Deng C, i sur. Mice expressing only monosialoganglioside GM3 exhibit lethal audiogenic seizures. *J Biol Chem.* 2001;(276):6885–8.
89. Dunn TM, Tiffit CJ, Proia RL. A perilous path: the inborn errors of sphingolipid metabolism. *J Lipid Res.* 2019;(60):475–483.
90. Meter D, Racetin A, Vukojević K, Balog M, Ivić V, Zjalić M, i sur. A Lack of GD3 Synthase Leads to Impaired Renal Expression of Connexins and Pannexin1 in *St8sia1* Knockout Mice. *IJMS.* 2022;(23):6237.
91. Wang J, Cheng A, Wakade C, Yu RK. Ganglioside GD3 Is Required for Neurogenesis and Long-Term Maintenance of Neural Stem Cells in the Postnatal Mouse Brain. *J Neurosci.* 2014;(34):13790–13800.
92. Kittaka D, Itoh MI, Ohmi Y, Kondo Y, Fukumoto S, Urano T, i sur. Impaired hypoglossal nerve regeneration in mutant mice lacking complex gangliosides: Down-regulation of neurotrophic factors and receptors as possible mechanisms. *Glycobiology.* 2008;(18):509–16.
93. Furukawa K, Tokuda N, Okuda T, Tajima O, Furukawa K. Glycosphingolipids in engineered mice: insights into function. *Semin Cell Dev Biol.* 2004;(15):389–96.
94. Tang FL, Wang J, Itokazu Y, Yu RK. Ganglioside GD3 regulates dendritic growth in newborn neurons in adult mouse hippocampus via modulation of mitochondrial dynamics. *J Neurochem.* 2021;(156):819–33.
95. Mouse phenotype core metabolism and behavior summary mouse strain: *ST8Sia-I* *ST8Sia-I* *+/+* *ST8Sia-I* *-/-*-Startle Response Curve dB Percent PPI (SEM). National consortium for functions genomics [Internet]. 2015 [pristupljeno 24.12.2022.]. Dostupno na: <http://www.functionalglycomics.org/glycomics/BehaviorFileServlet?pageType=downloadSummary&fileKey=1000022&fileType=SUM>.
96. Ribeiro-Resende VT, Gomes TA, de Lima S, Nascimento-Lima M, Bargas-Rega M, Santiago MF, i sur. Mice lacking GD3 synthase display morphological abnormalities in the sciatic nerve and neuronal disturbances during peripheral nerve regeneration. *PLoS One.* 2014;(9):e108919.

97. Handa Y, Ozaki N, Honda T, Furukawa K, Tomita Y, Inoue M, i sur. GD3 synthase gene knockout mice exhibit thermal hyperalgesia and mechanical allodynia but decreased response to formalin-induced prolonged noxious stimulation. *Pain*. 2005;(117):271–9.
98. Abreu CA, Teixeira-Pinheiro LC, Lani-Louzada R, da Silva-Junior AJ, Vasques JF, Gubert F, i sur. GD3 synthase deletion alters retinal structure and impairs visual function in mice. *J Neurochem*. 2021;(158):694–709.
99. Kasprowicz A, Sophie GD, Lagadec C, Delannoy P. Role of GD3 Synthase ST8Sia I in Cancers. *Cancers*. 2022;(14):1299.
100. Liu J, Zheng X, Pang X, Li L, Wang J, Yang C, i sur. Ganglioside GD3 synthase (GD3S), a novel cancer drug target. *Acta Pharm Sin B*. 2018;(8):713–20.
101. Cao S, Hu X, Ren S, Wang Y, Shao Y, Wu K, i sur. The biological role and immunotherapy of gangliosides and GD3 synthase in cancers. *Front Cell Dev Biol*. 2023;(11):1076862.
102. Ohkawa Y, Zhang P, Momota H, Kato A, Hashimoto N, Ohmi Y, i sur. Lack of GD3 synthase (St8sia1) attenuates malignant properties of gliomas in genetically engineered mouse model. *Cancer Sci*. 2021;(112):3756–68.
103. Kühlbrandt W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;(5):282–95.
104. Dürr KL, Abe K, Tavraz NN, Friedrich T. E2P State Stabilization by the N-terminal Tail of the H,K-ATPase β -Subunit Is Critical for Efficient Proton Pumping under in Vivo Conditions. *J Biol Chem*. 2009;(284):20147–20154.
105. Pivovarov AS, Calahorra F, Walker RJ. Na⁺/K⁺-pump and neurotransmitter membrane receptors. *Invert Neurosci*. 2019;(19):1–16.
106. Boldyrev AA. Functional activity of Na⁺, K⁺-pump in normal and pathological tissues. *Mol Chem Neuropathol*. 1993;(19):83–93.
107. Xie Z, Askari A. Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem*. 2002;(269):2434–9.
108. Benarroch EE. Na⁺, K⁺-ATPase. *Neurology*. 2011;(76):287–93.
109. Xie Z. Molecular mechanisms of Na/K-ATPase-mediated signal transduction. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;(986):497–503.

110. Li Z, Xie Z. The Na/K-ATPase/Src complex and cardiotoxic steroid-activated protein kinase cascades. *Pflugers Arch.* 2009;(457):635–44.
111. de Lores Arnaiz GR, Alberici M, de Robertis E. Ultrastructural and enzymic studies of cholinergic and non-cholinergic synaptic membranes isolated from brain cortex. *J Neurochem.* 1967;(14):215–25.
112. Cai T, Wang H, Chen Y, Liu L, Gunning WT, Quintas LEM, i sur. Regulation of caveolin-1 membrane trafficking by the Na/K-ATPase. *J Cell Biol.* 2008;(182):1153–69.
113. Clausen M v., Hilbers F, Poulsen H. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Front Physiol.* 2017;(8):371.
114. Rodríguez De Lores Arnaiz G, Graciela M, Ordieres L, de Biología Celular I, de Robertis NE. Brain Na⁺, K⁺-ATPase Activity In Aging and Disease. *Int J Biomed Sci.* 2014;(10):85–102.
115. Desfrere L, Karlsson M, Hiyoshi H, Malmersjö S, Nanou E, Estrada M, i sur. Na,K-ATPase signal transduction triggers CREB activation and dendritic growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;(106):2212–7.
116. Erecińska M, Silver IA. Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol.* 1994;(43):37–71.
117. Johar K, Priya A, Wong-Riley MTT. Regulation of Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase by neuron-specific transcription factor Sp4: implication in the tight coupling of energy production, neuronal activity and energy consumption in neurons. *Eur J Neurosci.* 2014;(39):566–78.
118. Rice WJ, Young HS, Martin DW, Sachs JR, Stokes DL. Structure of Na⁺,K⁺-ATPase at 11-Å Resolution: Comparison with Ca²⁺-ATPase in E1 and E2 States. *Biophys J.* 2001;(80):2187–97.
119. Li Z, Langhans SA. Transcriptional regulators of Na,K-ATPase subunits. *Front Cell Dev Biol.* 2015;(3):66.
120. Sandtner W, Egwolf B, Khalili-Araghi F, Sánchez-Rodríguez JE, Roux B, Bezanilla F, i sur. Ouabain binding site in a functioning Na⁺/K⁺ ATPase. *JCB.* 2011;(286):38177–83.

121. Laursen M, Gregersen JL, Yatime L, Nissen P, Fedosova NU. Structures and characterization of digoxin- And bufalin-bound Na⁺,K⁺-ATPase compared with the ouabain-bound complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;(112):1755–60.
122. Benarroch EE. Na⁺, K⁺-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. *Neurology*. 2011;(76):287–93.
123. Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: Heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1998;(275):633–50.
124. Crambert G, Hasler U, Beggah AT, Yu C, Modyanov NN, Horisberger JD, i sur. Transport and pharmacological properties of nine different human Na,K- ATPase isozyms. *JCB*. 2000;(275):1976–86.
125. Blanco G. Na,K-ATPase Subunit Heterogeneity as a Mechanism for Tissue-Specific Ion Regulation. *Semin Nephrol*. 2005;(25):292–303.
126. Sun J, Zheng Y, Chen Z, Wang Y. The role of Na⁺-K⁺-ATPase in the epileptic brain. *CNS Neurosci Ther*. 2022;(28):1294–302.
127. Sweadner KJ. Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta*. 1989;(988):185–220.
128. Kaplan JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem*. 2002;(71):511–35.
129. Shamraj OI, Lingrel JB. A putative fourth Na⁺,K(+)-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;(91):12952–6.
130. Dempski RE, Friedrich T, Bamberg E. The β Subunit of the Na⁺/K⁺-ATPase Follows the Conformational State of the Holoenzyme. *J Gen Physiol*. 2005;(125):505–20.
131. Gottardi CJ, Caplan MJ. Molecular requirements for the cell-surface expression of multisubunit ion-transporting ATPases. Identification of protein domains that participate in Na,K-ATPase and H,K-ATPase subunit assembly. *JCB*. 1993;(268):14342–7.
132. McDonough AA, Geering K, Farley RA. The sodium pump needs its beta subunit. *FASEB J*. 1990;(4):1598–605.
133. Ghosh S, Hernando N, Martín-Alonso JM, Martín-Vasallo P, Coca-Prados M. Expression of multiple Na⁺,K(+)-ATPase genes reveals a gradient of isoforms along the nonpigmented ciliary epithelium: functional implications in aqueous humor secretion. *J Cell Physiol*. 1991;(149):184–94.

134. Gloor S, Antonicek H, Sweadner KJ, Pagliusi S, Frank R, Moos M, i sur. The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the beta subunit of the Na,K-ATPase. *JCB*. 1990;(110):165–74.
135. Hilbers F, Kopec W, Isaksen TJ, Holm TH, Lykke-Hartmann K, Nissen P, i sur. Tuning of the Na,K-ATPase by the beta subunit. *Sci Rep*. 2016;(6):1–11.
136. Mobasheri A, Avila J, Cózar-Castellano I, Brownleader MD, Trevan M, Francis MJO, i sur. Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; Comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci Rep*. 2000;(20):51–91.
137. Palmgren MG, Axelsen KB. Evolution of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta*. 1998;(1365):37–45.
138. Jaisser F, Jaunin P, Geering K, Rossier BC, Horisberger JD. Modulation of the Na,K-pump function by beta subunit isoforms. *J Gen Physiol*. 1994;(103):605–23.
139. Lutsenko S, Kaplan JH. Molecular events in close proximity to the membrane associated with the binding of ligands to the Na,K-ATPase. *J Biol Chem*. 1994;(269):4555–64.
140. Schmalzing G, Gloor S. Na⁺/K⁺-Pump Beta Subunits: Structure and Functions. *Cell Physiol Biochem*. 1994;(4):96–114.
141. Wang F, Cai B, Li KC, Hu XY, Lu YJ, Wang Q, i sur. FXD2, a γ subunit of Na⁺,K⁺-ATPase, maintains persistent mechanical allodynia induced by inflammation. *Cell Res*. 2015;(25):318–34.
142. Yap JQ, Seflova J, Sweazey R, Artigas P, Robia SL. FXD proteins and sodium pump regulatory mechanisms. *J Gen Physiol*. 2021;(153):e202012633.
143. Cornelius F, Habeck M, Kanai R, Toyoshima C, Karlisch SJD. General and specific lipid–protein interactions in Na,K-ATPase. *Biochim Biophys Acta - Biomembranes*. 2015;(1848):1729–43.
144. Liang M, Tian J, Liu L, Pierre S, Liu J, Shapiro J, i sur. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase. *J Biol Chem*. 2007;(282):10585–93.
145. Esmann M, Watts A, Marsh D. Spin-Label Studies of Lipid-Protein Interactions in (Na⁺,K⁺)-ATPase Membranes from Rectal Glands of *Squalus acanthias*. *Biochemistry*. 1985;(24):1386–93.

146. Habeck M, Haviv H, Katz A, Kapri-Pardes E, Ayciriex S, Shevchenko A, i sur. Stimulation, Inhibition, or Stabilization of Na,K-ATPase Caused by Specific Lipid Interactions at Distinct Sites. *J Biol Chem*. 2015;(290):4829–4842.
147. Puljko B, Stojanović 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? *Biomedicines*. 2022;(10).
148. Leon A, Facci L, Toffano G, Sonnino S, Tettamanti G. Activation of (Na⁺, K⁺)-ATPase by nanomolar concentrations of GM1 ganglioside. *J Neurochem*. 1981;(37):350–7.
149. Esmann M, Marsh D, Schwarzmann G, Sandhoff K. Ganglioside-protein interactions: spin-label electron spin resonance studies with (Na⁺,K⁺)-ATPase membranes. *Biochemistry*. 1988;(27):2398–403.
150. Puljko B, Stojanović M, Ilic K, Maček Hrvat N, Zovko A, Damjanović V, i sur. Redistribution of gangliosides accompanies thermally induced Na⁺, K⁺-ATPase activity alternation and submembrane localisation in mouse brain. *Biochim Biophys Acta - Biomembranes*. 2021;(1863):183475.
151. Mlinac K. Utjecaj gangliozida na izražaj membranskih proteina u mozgu miša [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2012.
152. Yu SP. Na⁺, K⁺-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem Pharmacol*. 2003;(66):1601–9.
153. Kumar AR, Kurup PA. Inhibition of membrane Na⁺-K⁺ ATPase activity: a common pathway in central nervous system disorders. *J Assoc Physicians India*. 2002;(50):400–6.
154. Zhang LN, Sun YJ, Pan S, Li JX, Qu YE, Li Y, i sur. Na⁺-K⁺-ATPase, a potent neuroprotective modulator against Alzheimer disease. *Fundam Clin Pharmacol*. 2013;(27):96–103.
155. Schlingmann KP, Bandulik S, Mammen C, Tarailo-Graovac M, Holm R, Baumann M, i sur. Germline De Novo Mutations in ATP1A1 Cause Renal Hypomagnesemia, Refractory Seizures, and Intellectual Disability. *Am J Hum Genet*. 2018;(103):808–16.

156. Deprez L, Weckhuysen S, Peeters K, Deconinck T, Claeys KG, Claes LRF, i sur. Epilepsy as part of the phenotype associated with ATP1A2 mutations. *Epilepsia*. 2008;(49):500–8.
157. Chatron N, Cabet S, Alix E, Buenerd A, Cox P, Guibaud L, i sur. A novel lethal recognizable polymicrogyric syndrome caused by ATP1A2 homozygous truncating variants. *Brain*. 2019;(142):3367–74.
158. Paciorkowski AR, McDaniel SS, Jansen LA, Tully H, Tuttle E, Ghoneim DH, i sur. Novel mutations in ATP1A3 associated with catastrophic early life epilepsy, episodic prolonged apnea, and postnatal microcephaly. *Epilepsia*. 2015;(56):422–30.
159. Rapport RL, Harris AB, Friel PN, Ojemann GA. Human epileptic brain Na, K ATPase activity and phenytoin concentrations. *Arch Neurol*. 1975;(32):549–54.
160. Öner P, Öztaş B, Koçak H. Brain cortex Na+K+atpase activities in streptozotocin-diabetic and pentylenetetrazol-epileptic rats. *Pharmacol Res*. 1997;(36):69–72.
161. Hunt WA, Craig CR. Alterations in cation levels and Na-K ATPase activity in rat cerebral cortex during the development of cobalt-induced epilepsy. *J Neurochem*. 1973;(20):559–67.
162. Grisar T, Guillaume D, Delgado-Escuet A v. Contribution of Na+,K+-ATPase to focal epilepsy: a brief review. *Epilepsy Res*. 1992;(12):141–9.
163. Chauhan NB, Lee JM, Siegel GJ. Na,K-ATPase mRNA levels and plaque load in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*. 1997;(9):151–66.
164. Dickey CA, Gordon MN, Wilcock DM, Herber DL, Freeman MJ, Morgan D. Dysregulation of Na+/K+ ATPase by amyloid in APP+PS1 transgenic mice. *BMC Neurosci*. 2005;(6):7.
165. Liguri G, Taddei N, Nassi P, Latorraca S, Nediani C, Sorbi S. Changes in Na+,K(+)-ATPase, Ca2(+)-ATPase and some soluble enzymes related to energy metabolism in brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1990;(112):338–42.
166. Mark RJ, Hensley K, Butterfield DA, Mattson MP. Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca2+ homeostasis and cell death. *The Journal of Neuroscience*. 1995;(15):6239–49.

167. Bores GM, Smith CP, Wirtz-Brugger F, Giovanni A. Amyloid beta-peptides inhibit Na⁺/K⁺-ATPase: tissue slices versus primary cultures. *Brain Res Bull.* 1998;(46):423–7.
168. Chauhan NB, Siegel GJ. In situ analysis of Na, K-ATPase alpha1- and alpha3-isoform mRNAs in aging rat hippocampus. *J Neurochem.* 1996;(66):1742–51.
169. Petrushanko IY, Mitkevich VA, Anashkina AA, Adzhubei AA, Burnysheva KM, Lakunina VA, i sur. Direct interaction of beta-amyloid with Na,K-ATPase as a putative regulator of the enzyme function. *Sci Rep.* 2016;(6):1–10.
170. Mann CN, Devi SS, Kersting CT, Bleem A v., Karch CM, Holtzman DM, i sur. Astrocytic α 2-Na⁺/K⁺ ATPase inhibition suppresses astrocyte reactivity and reduces neurodegeneration in a tauopathy mouse model. *Sci Transl Med.* 2022;(14):eabm4107..
171. El-Mallakh RS, El-Masri MA, O'Malley Huff M, Li XP, Decker S, Levy RS. Intracerebroventricular administration of ouabain as a model of mania in rats. *Bipolar Disord.* 2003;(5):362–5.
172. Kirshenbaum GS, Clapcote SJ, Duffy S, Burgess CR, Petersen J, Jarowek KJ, i sur. Mania-like behavior induced by genetic dysfunction of the neuron-specific Na⁺,K⁺-ATPase α 3 sodium pump. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;(108):18144–9.
173. Bagrov AY, Bagrov YY, Fedorova O v., Kashkin VA, Patkina NA, Zvartau EE. Endogenous digitalis-like ligands of the sodium pump: Possible involvement in mood control and ethanol addiction. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2002;(12):1–12.
174. Naylor GJ, Smith AHW, Dick EG, Dick DAT, McHarg AM, Chambers CA. Erythrocyte membrane cation carrier in manic-depressive psychosis. *Psychol Med.* 1980;(10):521–5.
175. Tochigi M, Iwamoto K, Bundo M, Sasaki T, Kato N, Kato T. Gene expression profiling of major depression and suicide in the prefrontal cortex of postmortem brains. *Neurosci Res.* 2008;(60):184–91.
176. Yu JJ, Zhang Y, Wang Y, Wen ZY, Liu XH, Qin J, i sur. Inhibition of calcineurin in the prefrontal cortex induced depressive-like behavior through mTOR signaling pathway. *Psychopharmacology (Berl).* 2013;(225):361–72.

177. Zhan L, Peng W, Sun W, Xu E. Hypoxic preconditioning induces neuroprotection against transient global ischemia in adult rats via preserving the activity of Na⁺/K⁺-ATPase. *Neurochem Int.* 2011;(59):65–72.
178. Mintorovitch J, Yang GY, Shimizu H, Kucharczyk J, Chan PH, Weinstein PR. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging of acute focal cerebral ischemia: comparison of signal intensity with changes in brain water and Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994;(14):332–6.
179. Brini M, Calì T, Ottolini D, Carafoli E. The plasma membrane calcium pump in health and disease. *FEBS J.* 2013;(280):5385–97.
180. Krebs J. The plethora of PMCA isoforms: Alternative splicing and differential expression. *Biochim Biophys Acta - Molecular Cell Research.* 2015;(1853):2018–24.
181. Jiang L, Bechtel MD, Bean JL, Winefield R, Williams TD, Zaidi A, i sur. Effects of gangliosides on the activity of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta - Biomembranes.* 2014;(1838):1255–65.
182. Foster TC. Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. *Brain Res Rev.* 1999;(30):236–49.
183. Miller RJ. The control of neuronal Ca²⁺ homeostasis. *Prog Neurobiol.* 1991;(37):255–85.
184. Strehler EE, Zacharias DA. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev.* 2001;(81):21–50.
185. Kip SN, Strehler EE. Characterization of PMCA isoforms and their contribution to transcellular Ca²⁺ flux in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;(284):122–32.
186. Prasad V, Okunade GW, Miller ML, Shull GE. Phenotypes of SERCA and PMCA knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;(322):1192–203.
187. Domi T, di Leva F, Fedrizzi L, Rimessi A, Brini M. Functional specificity of PMCA isoforms? *Ann N Y Acad Sci.* 2007;(1099):237–46.
188. Eakin TJ, Antonelli MC, Malchiodi EL, Baskin DG, Stahl WL. Localization of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform PMCA3 in rat cerebellum, choroid plexus and hippocampus. *Mol. Brain Res.* 1995;(29):71–80.

189. Krizaj D, Demarco SJ, Johnson J, Strehler EE, Copenhagen DR. Cell-Specific Expression of Plasma Membrane Calcium ATPase Isoforms in Retinal Neurons. *J Comp Neurol.* 2002;(451):1–21.
190. Zacharias DA, Kappen C. Developmental expression of the four plasma membrane calcium ATPase (Pmca) genes in the mouse. *Biochim Biophys Acta.* 1999;(1428):397–405.
191. Boczek T, Radzik T, Ferenc B, Zylinska L. The Puzzling Role of Neuron-Specific PMCA Isoforms in the Aging Process. *Int J Mol Sci.* 2019;(20):6338.
192. DeMarco SJ, Strehler EE. Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase Isoforms 2b and 4b Interact Promiscuously and Selectively with Members of the Membrane-associated Guanylate Kinase Family of PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) Domain-containing Proteins. *J Biol Chem.* 2001;(276):21594–600.
193. Demarco SJ, Chicka MC, Strehler EE. Plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoform 2b interacts preferentially with Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2 in apical plasma membranes. *J Biol Chem.* 2002;(277):10506–11.
194. Sgambato-Faure V, Xiong Y, Berke JD, Hyman SE, Strehler EE. The Homer-1 protein Ania-3 interacts with the plasma membrane calcium pump. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;(343):630–7.
195. Duan W, Zhou J, Li W, Zhou T, Chen Q, Yang F, i sur. Plasma membrane calcium ATPase 4b inhibits nitric oxide generation through calcium-induced dynamic interaction with neuronal nitric oxide synthase. *Protein Cell.* 2013;(4):286–98.
196. Schuh K, Uldrijan S, Gambaryan S, Roethlein N, Neyses L. Interaction of the plasma membrane Ca²⁺ pump 4b/Cl with the Ca²⁺/calmodulin-dependent membrane-associated kinase CASK. *J Biol Chem.* 2003;(278):9778–83.
197. Rabizadeh S, Xavier R, Ishiguro K, Bernabeortiz J, Lopez-Illasaca M, Khokhlatchev A, i sur. The scaffold protein CNK1 interacts with the tumor suppressor RASSF1A and augments RASSF1A-induced cell death. *J Biol Chem.* 2004;279(28):29247-54.
198. Castro J, Ruminot I, Porras OH, Flores CM, Hermosilla T, Verdugo E, i sur. ATP steal between cation pumps: a mechanism linking Na⁺ influx to the onset of necrotic Ca²⁺ overload. *Cell Death Differ.* 2006;(13):1675–85.

199. Nitsche J, Josts I, Heidemann J, Mertens HD, Maric S, Moulin M, i sur. Structural basis for activation of plasma-membrane Ca²⁺-ATPase by calmodulin. *Commun Biol.* 2018;(1):1–10.
200. Brown CS, Dean WL. Regulation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase in human platelets by calpain. *Platelets.* 2007;(18):207–11.
201. Zylinska L, Guerini D, Gromadzinska E, Lachowicz L. Protein kinases A and C phosphorylate purified Ca²⁺-ATPase from rat cortex, cerebellum and hippocampus. *Biochim Biophys Acta - Molecular Cell Research.* 1998;(1448):99–108.
202. Enyedi A, Verma AK, Filoteo AG, Penniston JT. Protein kinase C activates the plasma membrane Ca²⁺ pump isoform 4b by phosphorylation of an inhibitory region downstream of the calmodulin-binding domain. *J Biol Chem.* 1996;(271):32461–7.
203. Tang D, Dean WL, Borchman D, Paterson CA. The influence of membrane lipid structure on plasma membrane Ca²⁺ -ATPase activity. *Cell Calcium.* 2006;(39):209–16.
204. Niggli V, Adunyah ES, Carafoli E. Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte Ca²⁺ -ATPase. *J Biol Chem.* 1981;(256):8588–92.
205. Verbist J, Gadella TWJ, Raeymaekers L, Wuytack F, Wirtz KWA, Casteels R. Phosphoinositide-protein interactions of the plasma-membrane Ca²⁺-transport ATPase as revealed by fluorescence energy transfer. *Biochim Biophys Acta - Biomembranes.* 1991;(1063):1–6.
206. Jiang L, Fernandes D, Mehta N, Bean JL, Michaelis ML, Zaidi A. Partitioning of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase into lipid rafts in primary neurons: effects of cholesterol depletion. *J Neurochem.* 2007;(102):378–88.
207. Zhao Y, Fan X, Yang F, Zhang X. Gangliosides modulate the activity of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase from porcine brain synaptosomes. *Arch Biochem Biophys.* 2004;(427):204–12.

208. Ilic K, Lin X, Malci A, Stojanović M, Puljko B, Rožman M, i sur. Plasma Membrane Calcium ATPase-Neuroplastin Complexes Are Selectively Stabilized in GM1-Containing Lipid Rafts. *Int J Mol Sci.* 2021;(22):13590.
209. Khalid M, Raza H, Driessen TM, Lee PJ, Tejwani L, Sami A, i sur. Genetic Risk of Autism Spectrum Disorder in a Pakistani Population. *Genes.* 2020;(11):1206.
210. Carayol J, Sacco R, Tores F, Rousseau F, Lewin P, Hager J, i sur. Converging evidence for an association of ATP2B2 allelic variants with autism in male subjects. *Biol Psychiatry.* 2011;(70):880–7.
211. Kuhn A, Goldstein DR, Hodges A, Strand AD, Sengstag T, Kooperberg C, i sur. Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Hum Mol Genet.* 2007;(16):1845–61.
212. Inoue Y, Matsumura Y, Inoue K, Ichikawa R, Takayama C. Abnormal synaptic architecture in the cerebellar cortex of a new dystonic mutant mouse, Wriggle Mouse Sagami. *Neurosci Res.* 1993;(16):39–48.
213. Nicot A, Kurnellas M, Elkabes S. Temporal pattern of plasma membrane calcium ATPase 2 expression in the spinal cord correlates with the course of clinical symptoms in two rodent models of autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Neurosci.* 2005;(21):2660–70.
214. Zanni G, Cali T, Kalscheuer VM, Ottolini D, Barresi S, Lebrun N, i sur. Mutation of plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoform 3 in a family with X-linked congenital cerebellar ataxia impairs Ca²⁺ homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;(109):14514–9.
215. Cali T, Lopreiato R, Shimony J, Vineyard M, Frizzarin M, Zanni G, i sur. A Novel Mutation in Isoform 3 of the Plasma Membrane Ca²⁺ Pump Impairs Cellular Ca²⁺ Homeostasis in a Patient with Cerebellar Ataxia and Laminin Subunit 1 α Mutations. *J Biol Chem.* 2015;(290):16132–16141.
216. Tachibana T, Noguchi K, Ruda MA. Analysis of gene expression following spinal cord injury in rat using complementary DNA microarray. *Neurosci Lett.* 2002;(327):133–7.

217. Usachev YM, DeMarco SJ, Campbell C, Strehler EE, Thayer SA. Bradykinin and ATP accelerate Ca²⁺ efflux from rat sensory neurons via protein kinase C and the plasma membrane Ca²⁺ pump isoform 4. *Neuron*. 2002;(33):113–22.
218. Strehler EE, Thayer SA. Evidence for a role of plasma membrane calcium pumps in neurodegenerative disease: Recent developments. *Neurosci Lett*. 2018;(663):39–47.
219. Ho PWL, Pang SY, Li M, Tse ZHM, Kung MHW, Sham PC, i sur. PMCA4 (ATP2B4) mutation in familial spastic paraplegia causes delay in intracellular calcium extrusion. *Brain Behav*. 2015;(5):1–6.
220. Martins-De-Souza D, Gattaz WF, Schmitt A, Rewerts C, Marangoni S, Novello JC, i sur. Alterations in oligodendrocyte proteins, calcium homeostasis and new potential markers in schizophrenia anterior temporal lobe are revealed by shotgun proteome analysis. *J Neural Transm (Vienna)*. 2009;(116):275–89.
221. Zaidi A, Adewale M, McLean L, Ramlow P. The plasma membrane calcium pumps—The old and the new. *Neurosci Lett*. 2018;(663):12–7.
222. Berrocal M, Marcos D, Sepúlveda MR, Pérez M, Ávila J, Mata AM. Altered Ca²⁺ dependence of synaptosomal plasma membrane Ca²⁺-ATPase in human brain affected by Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2009;(23):1826–34.
223. Zaidi A, Barrón L, Sharov VS, Schöneich C, Michaelis EK, Michaelis ML. Oxidative inactivation of purified plasma membrane Ca²⁺-ATPase by hydrogen peroxide and protection by calmodulin. *Biochemistry*. 2003;(42):12001–10.
224. Ilic K, Mlinac-Jerkovic K, Sedmak G, Rosenzweig I, Kalanj-Bognar S. Neuroplastin in human cognition: review of literature and future perspectives. *Transl. Psychiatry*. 2021;(11):1–8.
225. Beesley PW, Herrera-Molina R, Smalla KH, Seidenbecher C. The Neuroplastin adhesion molecules: key regulators of neuronal plasticity and synaptic function. *J Neurochem*. 2014;(131):268–83.
226. Marzban H, Khanzada U, Shabir S, Hawkes R, Langnaese K, Smalla KH, i sur. Expression of the immunoglobulin superfamily neuroplastin adhesion molecules in adult and developing mouse cerebellum and their localisation to parasagittal stripes. *J. Comp. Neurol*. 2003;(462):286–301.

227. Herrera-Molin R, Sarto-Jackson I, Montenegro-Venegas C, Heine M, Smalla KH, Seidenbecher CI, i sur. Structure of excitatory synapses and GABA_A receptor localization at inhibitory synapses are regulated by neuroplastin-65. *J Biol Chem.* 2014;(289):8973–88.
228. Smalla KH, Matthies H, Langnäse K, Shabir S, Böckers TM, Wyneken U, i sur. The synaptic glycoprotein neuroplastin is involved in long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;(97):4327–32.
229. Walsh FS, Doherty P. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: Role in Axon Growth and Guidance. 2003;(13):425–56.
230. Bhattacharya S, Herrera-Molina R, Sabanov V, Ahmed T, Iscru E, Stöber F, i sur. Genetically Induced Retrograde Amnesia of Associative Memories After Neuroplastin Ablation. *Biol Psychiatry.* 2017;(81):124–35.
231. Owczarek S, Kiryushko D, Larsen MH, Kastrup JS, Gajhede M, Sandi C, i sur. Neuroplastin-55 binds to and signals through the fibroblast growth factor receptor. *FASEB J.* 2010;(24):1139–50.
232. Sarto-Jackson I, Milenkovic I, Smalla KH, Gundelfinger ED, Kaehne T, Herrera-Molina R, i sur. The Cell Adhesion Molecule Neuroplastin-65 Is a Novel Interaction Partner of γ -Aminobutyric Acid Type A Receptors. *J Biol Chem.* 2012;(287):14201–14214.
233. Vemula SK, Malci A, Junge L, Lehmann AC, Rama R, Hradsky J, i sur. The Interaction of TRAF6 With Neuroplastin Promotes Spinogenesis During Early Neuronal Development. *Front Cell Dev Biol.* 2020;(8):579513.
234. Ouchi Y, Kubota Y, Kuramasu A, Watanabe T, Ito C. Gene expression profiling in whole cerebral cortices of phencyclidine- or methamphetamine-treated rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005;(140):142–9.
235. Smith M, Spence MA, Flodman P. Nuclear and mitochondrial genome defects in autisms. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;(1151):102–32.
236. Li H, Liu Y, Gao X, Liu L, Amuti S, Wu D, i sur. Neuroplastin 65 modulates anxiety- and depression-like behavior likely through adult hippocampal neurogenesis and central 5-HT activity. *FEBS J.* 2019;(286):3401–15.

237. Ilic K, Mlinac-Jerkovic K, Jovanov-Milosevic N, Simic G, Habek N, Bogdanovic N, i sur. Hippocampal expression of cell-adhesion glycoprotein neuroplastin is altered in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med.* 2019;(23):1602–1607.
238. Schmidt N, Kollwe A, Constantin CE, Henrich S, Ritzau-Jost A, Bildl W, i sur. Neuroplastin and Basigin Are Essential Auxiliary Subunits of Plasma Membrane Ca²⁺-ATPases and Key Regulators of Ca²⁺ Clearance. *Neuron.* 2017;(96):827-838.e9.
239. Gong D, Chi X, Ren K, Huang G, Zhou G, Yan N, i sur. Structure of the human plasma membrane Ca²⁺-ATPase 1 in complex with its obligatory subunit neuroplastin. *Nat. Commun.* 2018;(9):1–9.
240. Mlinac-Jerkovic K, Ilic K, Zjalic M, Mandic D, Debeljak Ž, Balog M, i sur. Who's in, who's out? Re-evaluation of lipid raft residents. *J Neurochem.* 2021;(158):657–72.
241. Mlinac K, Jovanov Milošević N, Heffer M, Smalla KH, Schnaar RL, Kalanj Bognar S. Neuroplastin expression in the hippocampus of mice lacking complex gangliosides. *J Mol Neurosci.* 2012;(48):161–6.
242. du Sert NP, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, i sur. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol.* 2020;(18):e3000411.
243. Meszaros JG, Karin NJ. Osteoblasts express the PMCA1b isoform of the plasma membrane Ca(2+)-ATPase. *J Bone Miner Res.* 1993;(8):1235–40.
244. Stauffer TP, Hilfiker H, Carafoli E, Strehler EE. Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes. *J Biol Chem.* 1993;(268):25993–6003.
245. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods.* 2007;(39):175–91.
246. Ilic K, Auer B, Mlinac-Jerkovic K, Herrera-Molina R. Neuronal signaling by thy-1 in nanodomains with specific ganglioside composition: Shall we open the door to a new complexity? *Front Cell Dev Biol.* 2019;(7):27.

247. Zhang J, Li X, Yu H, Larre I, Dube PR, Kennedy DJ, i sur. Regulation of Na/K-ATPase expression by cholesterol: isoform specificity and the molecular mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020;(319):C1107–19.
248. Lin X, Brunk MGK, Yuanxiang P, Curran AW, Zhang E, Stöber F, i sur. Neuroplastin expression is essential for hearing and hair cell PMCA expression. *Brain Struct Funct.* 2021;(226):1533–51.
249. Yu RK, Itokazu Y. Glycolipid and glycoprotein expression during neural development. *Adv Neurobiol.* 2014;(9):185–222.
250. Itokazu Y, Fuchigami T, Morgan JC, Yu RK. Intranasal infusion of GD3 and GM1 gangliosides downregulates alpha-synuclein and controls tyrosine hydroxylase gene in a PD model mouse. *Molecular Therapy.* 2021;(29):3059–71.
251. Zhang L, Wang Y, Wang L, Cao T, Hyuga S, Sato T, i sur. Ganglioside GD1a negatively regulates hepatocyte growth factor expression through caveolin-1 at the transcriptional level in murine osteosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2011;(1810):759–68.
252. Wang L, Takaku S, Wang P, Hu D, Hyuga S, Sato T, i sur. Ganglioside GD1a regulation of caveolin-1 and Stim1 expression in mouse FBJ cells: augmented expression of caveolin-1 and Stim1 in cells with increased GD1a content. *Glycoconj J.* 2006;(23):303–15.
253. Cao T, Zhang T, Wang L, Zhang L, Adachi T, Sato T, i sur. Ganglioside GD1a Suppression of NOS2 Expression Via ERK1 Pathway in Mouse Osteosarcoma FBJ Cells. *J Cell Biochem.* 2010;(110):1165–74.
254. Saito M, Sugiyama K. Characterization of nuclear gangliosides in rat brain: Concentration, composition, and developmental changes. *Arch Biochem Biophys.* 2002;(398):153–9.
255. Wu G, Lu Z -H, Ledeen RW. GM1 ganglioside in the nuclear membrane modulates nuclear calcium homeostasis during neurite outgrowth. *J Neurochem.* 1995;(65):1419–22.
256. Bøttger P, Tracz Z, Heuck A, Nissen P, Romero-Ramos M, Lykke-Hartmann K. Distribution of Na/K-ATPase alpha 3 isoform, a sodium-potassium P-type pump

- associated with rapid-onset of dystonia parkinsonism (RDP) in the adult mouse brain. *J Comp Neurol.* 2011;(519):376–404.
257. Ferrington DA, Chen X, Krainev AG, Michaelis EK, Bigelow DJ. Protein half-lives of calmodulin and the plasma membrane Ca-ATPase in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;(237):163–5.
258. Sepúlveda MR, Berrocal-Carrillo M, Gasset M, Mata AM. The Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase Isoform 4 Is Localized in Lipid Rafts of Cerebellum Synaptic Plasma Membranes. *J Biol Chem.* 2006;(281):447–53.
259. 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;(8):e75720.
260. Mlinac K, Fon Tacer K, Heffer M, Rozman D, Kalanj Bognar S. Cholesterogenic genes expression in brain and liver of ganglioside-deficient mice. *Mol Cell Biochem.* 2012;(369):127–33.
261. Birklé S, Gao L, Zeng G, Yu RK. Down-Regulation of GD3 Ganglioside and Its O-Acetylated Derivative by Stable Transfection with Antisense V. *J Neurochem.* 2000;(74):547–54.
262. Zeng G, Gao L, Birklé S, Yu RK. Suppression of ganglioside GD3 expression in a rat F-11 tumor cell line reduces tumor growth, angiogenesis, and vascular endothelial growth factor production. *Cancer Res.* 2000;60(23):6670-6.
263. Ruckhäberle E, Karn T, Rody A, Hanker L, Gätje R, Metzler D, i sur. Gene expression of ceramide kinase, galactosyl ceramide synthase and ganglioside GD3 synthase is associated with prognosis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;(135):1005–13.
264. Cazet A, Bobowski M, Rombouts Y, Lefebvre J, Steenackers A, Popa I, i sur. The ganglioside GD2 induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the GD3 synthase. *Glycobiology.* 2012;(22):806–16.
265. Gaini SM, Riboni L, Cerri C, Grimoldi N, Sganzerla EP, Berra B. Ganglioside content and composition in human gliomas. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 1988;(43):126–9.

266. Yeh SC, Wang PY, Lou YW, Khoo KH, Hsiao M, Hsu TL, i sur. Glycolipid GD3 and GD3 synthase are key drivers for glioblastoma stem cells and tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;(113):5592–7.
267. Shan Y, Liu Y, Zhao L, Liu B, Li Y, Jia L. MicroRNA-33a and let-7e inhibit human colorectal cancer progression by targeting ST8SIA1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017;(90):48–58.
268. Xing P, Wang Y, Zhang L, Ma C, Lu J. Knockdown of lncRNA MIR4435 2HG and ST8SIA1 expression inhibits the proliferation, invasion and migration of prostate cancer cells in vitro and in vivo by blocking the activation of the FAK/AKT/ β catenin signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2021;(47).
269. Kang SK, Kim YS, Kong YJ, Song KH, Chang YC, Park YG, i sur. Disialoganglioside GD3 synthase expression recruits membrane transglutaminase 2 during erythroid differentiation of the human chronic myelogenous leukemia K562 cells. *Proteomics*. 2008;(8):3317–28.
270. Kwon HY, Kim SJ, Kim CH, Son SW, Kim KS, Lee JH, i sur. Triptolide downregulates human GD3 synthase (hST8Sia I) gene expression in SK-MEL-2 human melanoma cells. *Exp Mol Med*. 2010;(42):849–55.
271. Battula VL, Nguyen K, Sun J, Pitner MK, Yuan B, Bartholomeusz C, i sur. IKK inhibition by BMS-345541 suppresses breast tumorigenesis and metastases by targeting GD2+ cancer stem cells. *Oncotarget*. 2017;(8):36936–49.
272. Fuchigami T, Itokazu Y, Morgan JC, Yu RK. Restoration of Adult Neurogenesis by Intranasal Administration of Gangliosides GD3 and GM1 in The Olfactory Bulb of A53T Alpha-Synuclein-Expressing Parkinson's-Disease Model Mice. *Mol Neurobiol*. 2023;60(6):3329–3344
273. Torelli AG, Cristante AF, de Barros-Filho TEP, dos Santos GB, Morena BC, Correia FF, i sur. Effects of ganglioside GM1 and erythropoietin on spinal cord injury in mice: Functional and immunohistochemical assessments. *Clinics*. 2022;(77):100006..
274. Schneider JS, Gollomp SM, Sendek S, Colcher A, Cambi F, Du W. A Randomized, Controlled, Delayed Start Trial of GM1 Ganglioside in Treated Parkinson's Disease Patients. *J Neurol Sci*. 2013;(324):140–8.

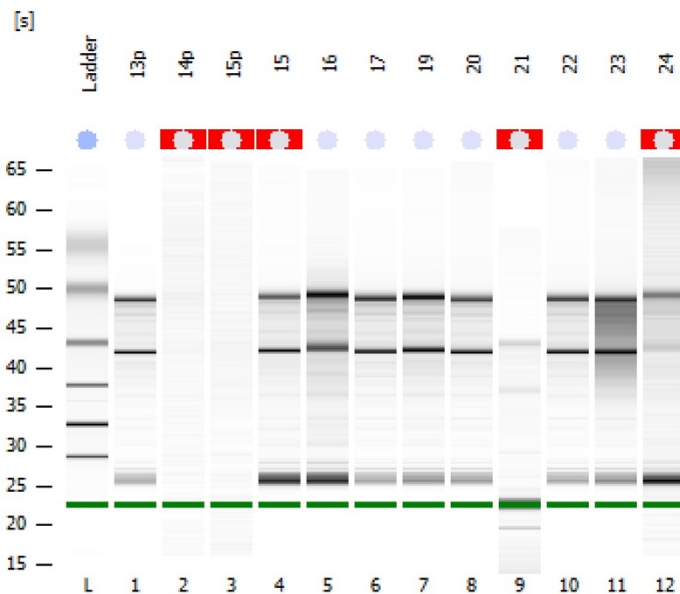
275. Fazzari M, Lunghi G, Chiricozzi E, Mauri L, Sonnino S. Gangliosides and the Treatment of Neurodegenerative Diseases: A Long Italian Tradition. *Biomedicines*. 2022;(10):363.

11. ŽIVOTOPIS

Borna Puljko rođen je 23. rujna 1993. godine u Slavonskom Brodu, gdje završava osnovnu školu i Klasičnu gimnaziju. 2012. godine upisuje preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje 2015. godine upisuje i istoimeni diplomski studij. 2019. godine upisuje doktorski studij Neuroznanost na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje se u sklopu znanstvenoistraživačkog projekta "Molekularni biljezi vulnerabilnosti, adaptacije i plastičnosti neurona u akutnoj i kroničnoj ozljedi mozga" voditeljice prof. dr. sc. Svjetlane Kalanj Bognar pridružuje radu Laboratorija za molekularnu neurobiologiju i neurokemiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga i Zavoda za kemiju i biokemiju, te pod vodstvom doc. dr. sc. Kristine Mlinac Jerković izrađuje ovu doktorsku disertaciju. Tijekom doktorskog studija sudjeluje u izvođenju nastave u sklopu kolegija Medicinska kemija i biokemija I i Medicinska kemija i biokemija II za studente medicine. 2022. godine dobitnik je Nagrade za mlade istraživače Međunarodnog društva za neurokemiju, te putne potpore za sudjelovanje na kongresu mladih istraživača FEBS-IUBMB-ENABLE u Seville. Autor je na četiri znanstvena rada, od kojih je na dva izrađena u sklopu doktorske disertacije prvi autor. Autor je na 19 sažetaka na međunarodnim kongresima, u sklopu kojih je održao dva usmena izlaganja. Član je Hrvatskog društva za neuroznanost i Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju.

DODACI

Dodatak 1. Prikaz rezultata kvalitativne i kvantitativne analize izoliranih uzoraka RNA iz mišjeg moždanog tkiva na mikročipovima



Dodatak 1.a. Prikaz virtualne elektroforeze nakon analize mikročipovima. L – standard, 13p-24. odabrani uzorci izolirane RNA iz mišjeg moždanog tkiva.

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE04103405_2020-02-19_12-43-06.xad

Created: 19.2.2020. 12:43:06
Modified: 19.2.2020. 13:08:39

Electrophoresis File Run Summary (Chip Summary)

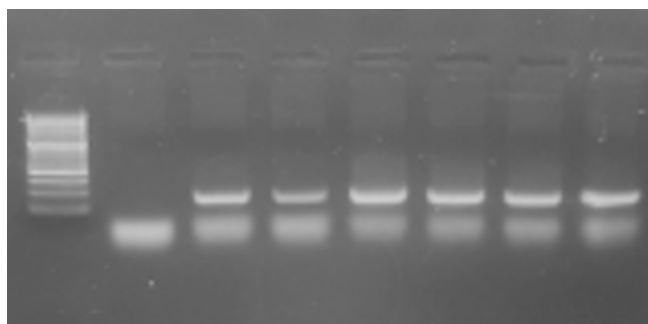
Sample Name	Sample Comment	Status	Result Label	Result Color
13p		✓	RIN: 7.90	
14p		✓	RIN N/A	
15p		✓	RIN N/A	
15		✓	RIN N/A	
16		✓	RIN: 7.30	
17		✓	RIN:8	
19		✓	RIN:8	
20		✓	RIN: 8.20	
21		✓	RIN N/A	
22		✓	RIN: 8.10	
23		✓	RIN: 6.20	
24		✓	RIN N/A	
Ladder		✓	All Other Samples	

Chip Lot #

Reagent Kit Lot #

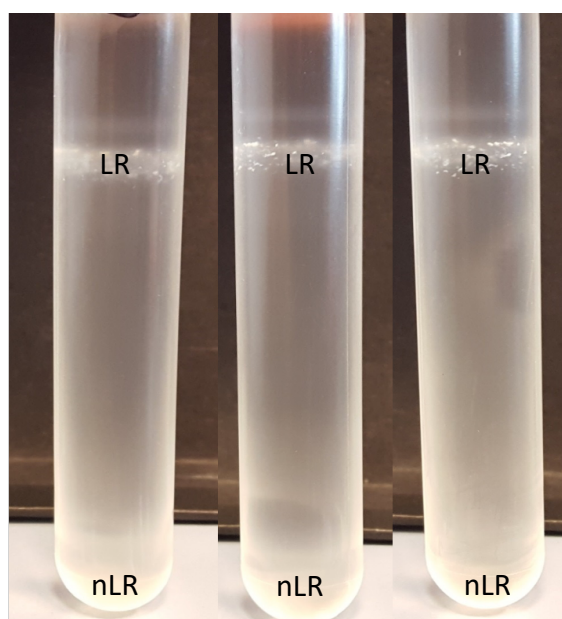
Dodatak 1.b. Prikaz rezultata analize broja RIN na mikročipu.

Dodatak 2. Prikaz rezultata utvrđivanja specifičnosti početnica korištenih za metodu q-RT PCR na agaroznom gelu



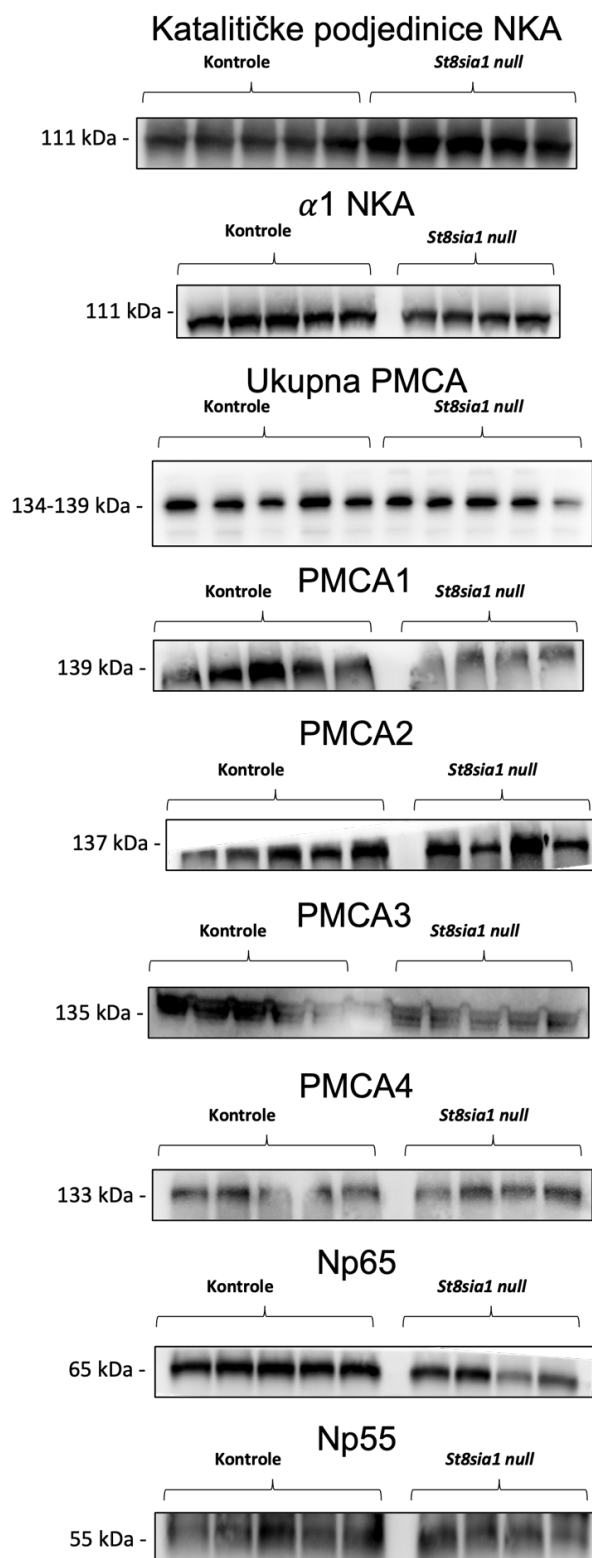
Dodatak 2. Prikaz agaroznog gela sa amplifikacijskim produktima gena *Atp1b3*.

Dodatak 3. Fotografije frakcija nakon izolacija lipidnih splavi

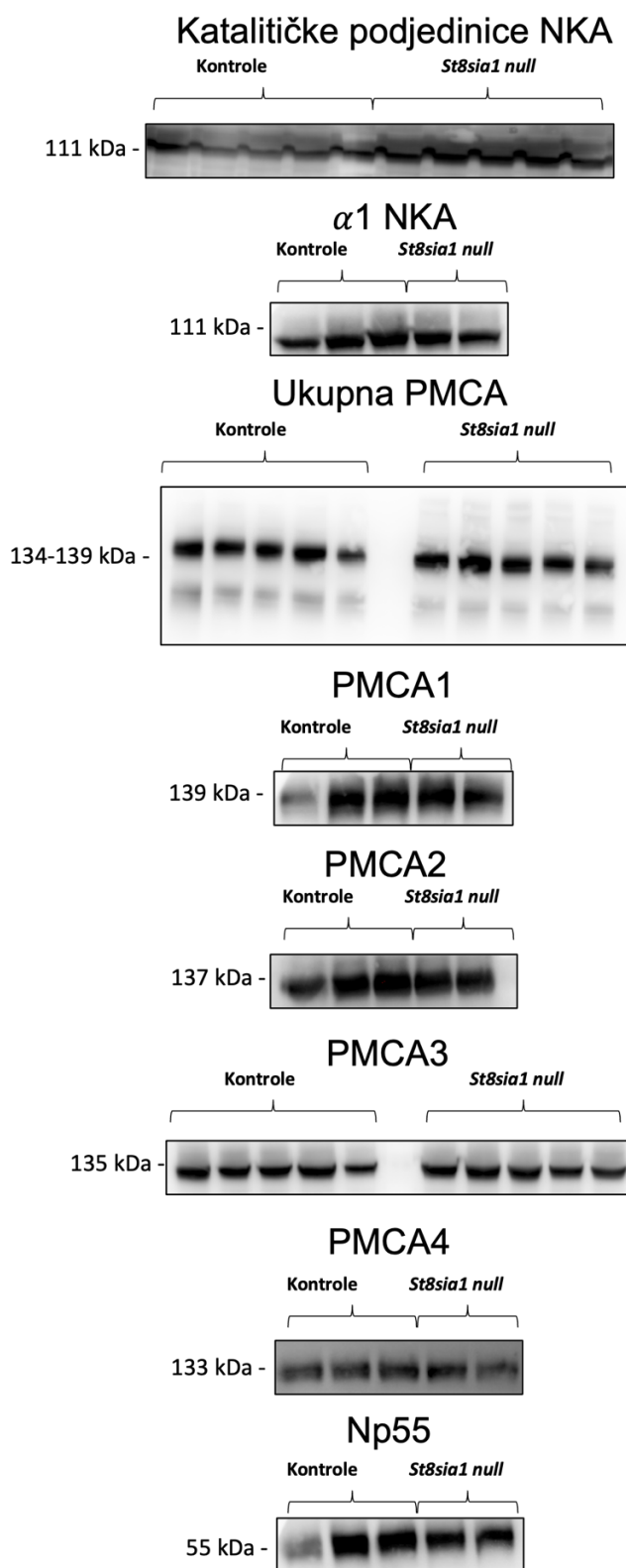


Dodatak 3. Fotografije frakcija nakon izolacija lipidnih splavi. LR – lipidne splavi; nLR – ne splavi.

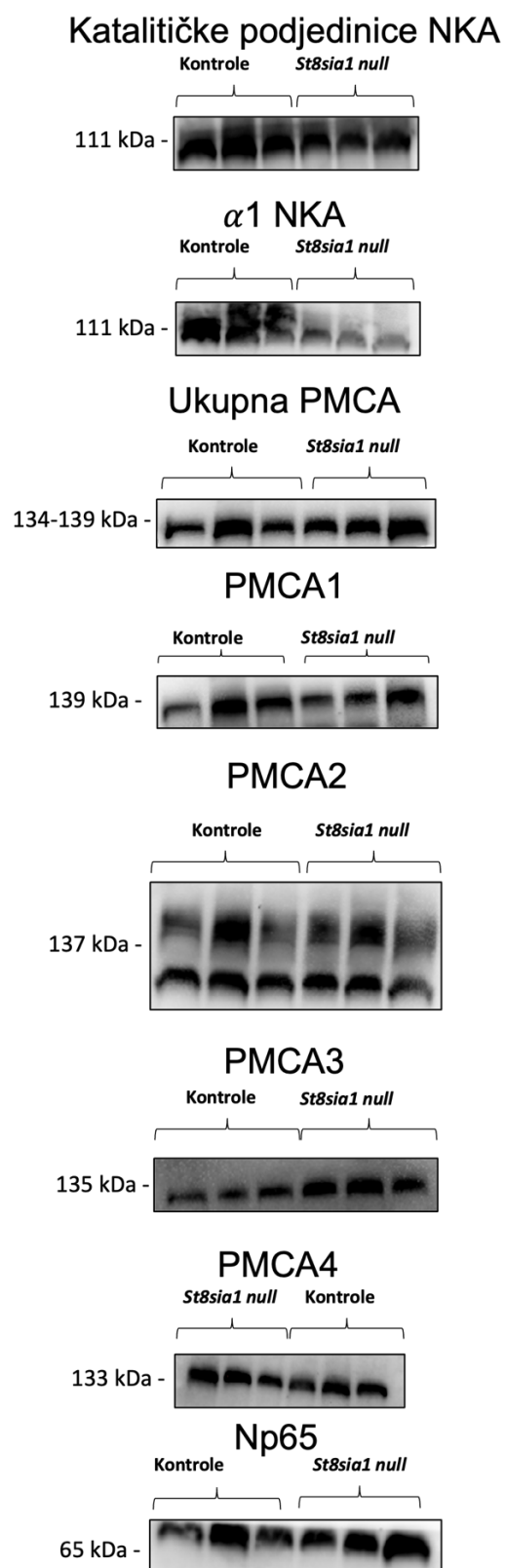
Dodatak 4. Fotografije cjelovitih membrana iz westernske metode otiska



Dodatak 4.a. Fotografije kemiluminiscentnih signala proteina od interesa u homogenatima moždane kore kontrolnih i *St8sia1 null* miševa. NKA - Na^+ , K^+ -ATPaza; PMCA - Ca^{2+} -ATPaze stanične membrane, Np - neuroplastin.

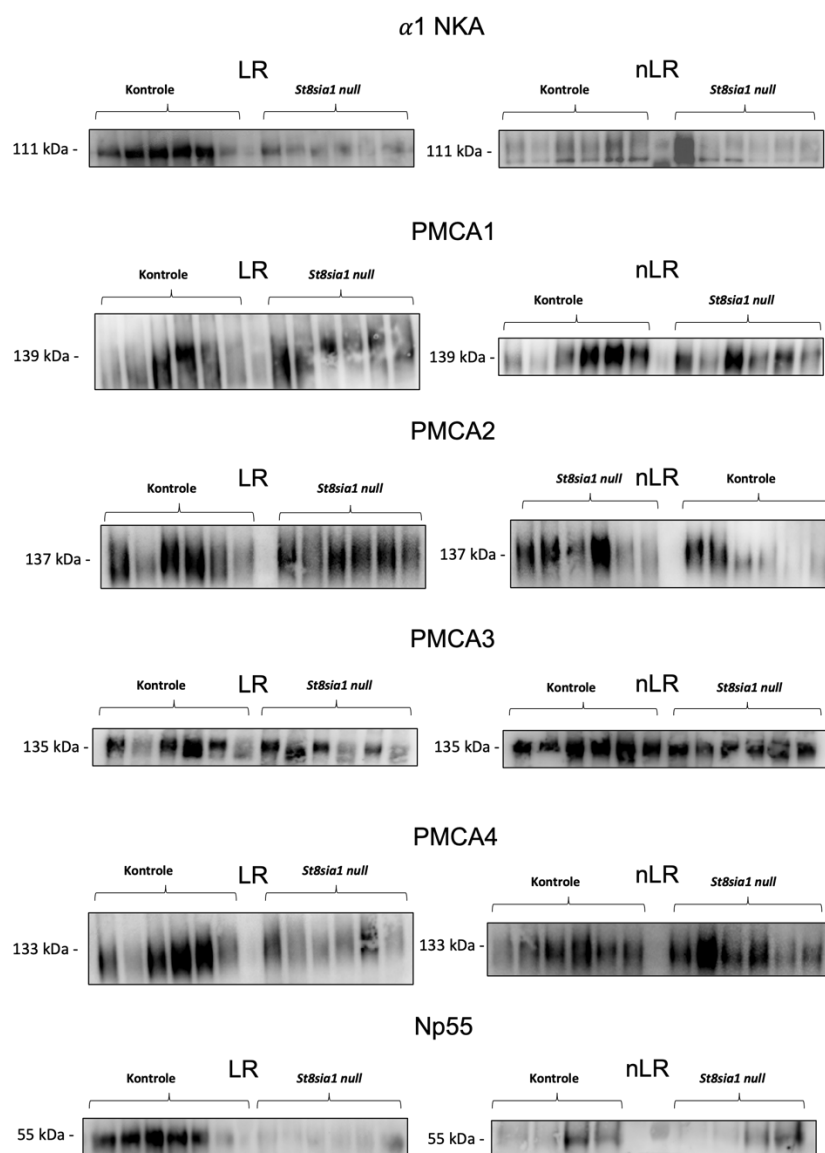


Dodatak 4.b. Fotografije kemiluminiscentnih signala proteina od interesa u homogenatima malog mozga kontrolnih i *St8sia1 null* miševa. NKA - Na^+ , K^+ -ATPaza; PMCA - Ca^{2+} -ATPaze stanične membrane, Np - neuroplastin.

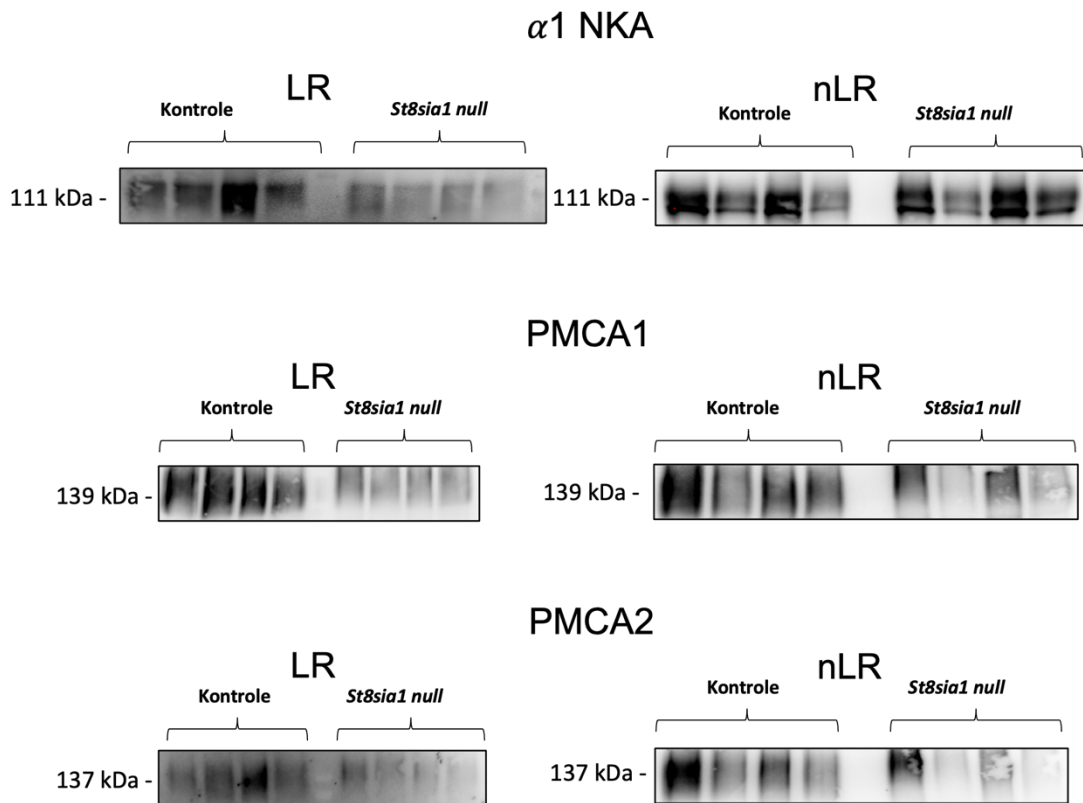


Dodatak 4.c. Fotografije kemiluminiscentnih signala proteina od interesa u homogenatima hipokampusu kontrolnih i *St8sia1 null* miševa. NKA - Na^+ , K^+ -ATPaza; PMCA - Ca^{2+} -ATPaze stanične membrane, Np - neuroplastin.

Dodatak 5. Fotografije cjelovitih membrana u frakcijama lipidnih splavi i ostatka stanične membrane



Dodatak 5.a. Fotografije kemiluminiscentnih signala proteina od interesa u frakcijama LR i nLR moždane kore kontrolnih i *St8sia1 null* miševa. NKA - Na⁺, K⁺-ATPaza; PMCA - Ca²⁺-ATPaze stanične membrane, Np - neuroplastin; LR- lipidne splavi; nLR-ostatak membrane.



Dodatak 5.b. Primjeri cjelovitih fotografija kemiluminiscentnih signala proteina od interesa u frakcijama LR i nLR maloga mozga kontrolnih i *St8sia1 null* miševa. NKA - Na⁺, K⁺-ATPaza; PMCA - Ca²⁺-ATPaze stanične membrane, Np -neuroplastin; LR- lipidne splavi; nLR-ostatak membrane.