Bubrežni fenotip miša s isključenim genom B4Galnt1

Anđić, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:155899

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Marija Anđić

BUBREŽNI FENOTIP MIŠA S ISKLJUČENIM GENOM *B4Galnt1*

Završni rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Marija Anđić

BUBREŽNI FENOTIP MIŠA S ISKLJUČENIM GENOM *B4Galnt1*

Završni rad

Osijek, 2020.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku. Mentor rada: Prof. dr. sc. Marija Heffer

Rad ima 43 lista, 2 tablice i 19 slika.

Zahvala

Želim prije svega zahvaliti mentorici prof. dr. sc. Mariji Heffer, dr. med. na savjetima, pomoći i ispravcima kojima je oblikovala ideju i omogućila provođenje ovoga istraživanja.

Zahvaljujem se dr. sc. Vedrani Ivić na nesebičnoj pomoći, brojnim savjetima i uputama, korisnim diskusijama te velikoj vjeri u zajednički uspjeh prilikom izrade ovoga rada kada nije sve bilo onako kako sam planirala.

Hvala i svim mojim prijateljima jer su tu.

I na kraju, najveće hvala mojoj baki Mari, koja je uvijek bila tu, uz mene, bez obzira da li se radilo o teškim ili sretnim trenutcima i bez koje ništa ne bi bilo moguće.

M.A.

SADRŽAJ:

1. UVOD 1

1.1. Glomerularne endotelne stanice i njihova stanična membrana 1

1.2. Lipidne splavi i gangliozidi 1

1.3. Posljedice izostanka sinteze kompleksnih gangliozida 3

1.4. Animalni model izostanka sinteze kompleksnih gangliozida izazvan isključivanjem gena *B4Galnt1* 4

1.5. Flotilin 1 i transferinski receptor 5

1.6. Akvaporin 1 i 2 5

2. HIPOTEZA 7

3. CILJEVI 8

4. MATERIJALI I METODE 9

4.1. Ustroj studije 9

4.3. Metode 10

4.3.1. Hemalaun-eozin bojenje tkiva 10

4.3.2. Fluorescentna imunohistokemija 11

4.3.3. Kvantifikacija fluorescentne imunohistokemije 13

4.4. Elektroforeza urina miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *B4Galnt1* 14

4.5. Statistička analiza 15

5. REZULTATI 16

5.1. Morfologija bubrega miševa s isključenim genom *B4Galnt1* 16

5.2. Analiza koncentracije proteina u urinu miševa s isključenim genom *B4Galnt1* 17

5.3. Analiza izražaja gangliozida GM3 u bubregu miša s isključenim genom *B4Galnt1* u odnosu na miševe divljeg tipa 18

5.4. Analiza izražaja gangliozida u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa 19
5.4.1. Analiza izražaja gangliozida GM1 22
5.4.2. Analiza izražaja gangliozida GD1a 22
5.4.3. Analiza izražaja gangliozida GD1b 23
5.4.4. Analiza izražaja gangliozida GT1b 24
5.5. Analiza izražaja transferinskog receptora i flotilina-1 u bubregu miševa s isključenim *B4Galnt1* genom u odnosu na miševe divljeg tipa 25
5.6. Analiza izražaja akvaporina-1 i 2 u bubregu miševa s isključenim genom *B4Galnt1* u odnosu na miševe divljeg tipa 28
6. RASPRAVA 32
7. ZAKLJUČAK 36
8. SAŽETAK 37
9. SUMMARY 38
10. LITERATURA 39
11. ŽIVOTOPIS 43

POPIS KRATICA:

BSA	albumin iz goveđeg seruma, engl. *bovine serum albumin*
Cer	ceramid, engl. *ceramide*
DAPI	4′,6-diamidino-2-fenilindol, engl. *4′,6-diamidino-2-phenylindole*
FITC	fluorescein izotiocijanat, engl. *fluorescein isothiocyanate*
Gal	galaktoza, engl. *galactose*
GalCer	galaktozilceramid, engl. *galactosylceramide*
GalNAc	N-acetilgalaktozamin, engl. *N- acetylgalactosamine*
GalNAc-T	acetilgalaktozamin transferaza, engl. *acetylgalactosamine transferase*
Glc	glukoza, engl. *glucose*
GlcCer	glukozileramid, engl. *glucosylceramide*
GPI sidro	glikozilfosfatidilinozitolsko sidro, engl. *glycosylphosphatidylinositol anchor*
KO	genetički izmijenjen organizam s posljedičnim gubitkom funkcije određenog gena, engl. *knockout*
LacCer	laktozilceramid, engl. *lactosylceramide*

NANA/NeuAc	N-acetilneuraminska kiselina, engl. *N-acetylneuraminic acid*
PBS	fosfatno puferirani salin, engl. *Phosphate buffered saline*
PFA	paraformaldehid, engl. *paraformaldehyde*
SA	sijalinska kiselina, engl. *sialic acid*
SDS-PAGE	natrij dodecil sulfat-poliakrilamid gel elektroforeza, engl. *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*
TRITC	tetrametilrodamin, engl. *tetramethylrhodamine*
UDP	uridin difosfat, engl. *uridine diphosphate*
WT	divlji tip, engl. *wild type*

1. UVOD

1.1. Glomerularne endotelne stanice i njihova stanična membrana

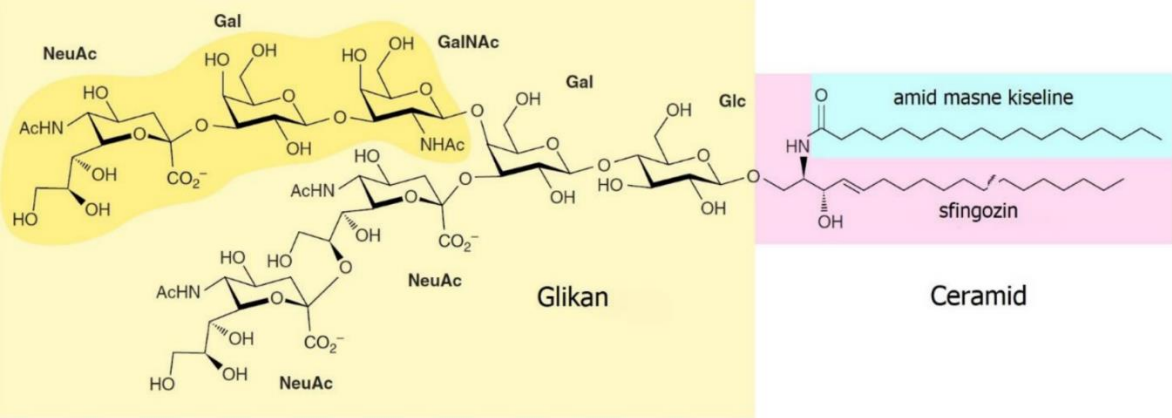
Glomerul je funkcionalna jedinica bubrega namijenjena filtriranju krvi. Čine ga glomerularne endotelne stanice, mezangijalne stanice, podociti i parijetalne epitelne stanice. Jedinstvene među ostalim polariziranim epitelnim stanicama su glomerularne endotelne stanice – visoko specijalizirane za filtriranje krvi i proizvodnju bubrežnog filtrata (1). Polariziranost se očituje u postojanju apikalne i bazalne domene stanice. Apikalne domene tipične su kod apsorpcijskih stanica, primjerice enterocita tankog crijeva ili stanica proksimalnog tubula bubrega, a imaju oblik „četkaste membrane". Četkaste membrane izgrađuju gusto formirani mikrovili. Kako bi stanica mogla normalno funkcionirati neophodno je ispravno formiranje lipidnih domena na staničnoj membrani.

1.2. Lipidne splavi i gangliozidi

Nicolson i Singer su prije pola stoljeća postavili model stanične membrane kao tekućeg mozaika. Početna pretpostavka je bila kako membranski fosfolipidi čine ocean unutar kojega plutaju membranski proteini kao sante leda. Unatrag dva desetljeća poznato je da unutar dvostruke ovojnice postoji dobro organizirane domene sastavljene od lipida i proteina. Ove mikrodomene, visokog sadržaja kolesterola i glikosfingolipida, definiraju se i kao membrane otporne na deterdžente ili lipidne splavi (engl. *lipid rafts*) (2). Lipidne splavi su male, heterogene i vrlo dinamične te su uklopljene u fluidne dijelove membrane (koje još zovemo i neuređene membrane za razliku od uređenih dijelova) poput platformi tako da je sfingolipidima i glikolipidima obogaćena strana okrenuta prema izvanstaničnom prostoru. Kolesterol ima ulogu dinamičkog ljepila i nalazi se na obje strane splavi – onoj okrenutoj prema citoplazmi i onoj okrenutoj prema izvanstaničnom prostoru (3). Poznato je da splavi obavljaju ključne funkcije u raznim staničnim procesima kao što su membranska signalizacija, regulacija prometa membrana, endocitoza i ulazak patogena i toksina bakterija. Endocitoza ovisna o lipidnim splavima je postupak induciran vezivanjem lipidnog splava za ligand (4). Istraživanja pokazuju kako se apikalne membrane epitelnih stanica ponašaju poput membranskih splavi. Također, ponašanje apikalne četkaste

granice membrane tankih crijevnih stanica opisana je kao velika domena super splavi stabilizirana galektinom-4 i intelektinom (5).

Proteini s citoplazmatske strane lipidnih splavi često imaju palmitoilna ili miristilna sidra, dok se s izvanstanične strane nalaze proteini s glikozilfosfatidilinozitolskim sidrima (engl. *glycosylphosphatidylinositol*, GPI). U vanjskom listu fosfolipidnog dvosloja stanične, endoplazmatske, Golgijeve i jezgrine membrane nalazi se posebna skupina glikosfingolipida koji su prepoznatljivi po sastavu osnovnog lanca na koji se veže jedna ili više sijalinskih kiselina (engl. *N-acetylneuraminic acid*, NANA ili NeuAc), nazvani gangliozidi (6). Gangliozidi su građeni od glikana povezanih s ceramidom (koji predstavlja lipidni dio molekule), pomoću kojeg su usidreni u vanjski list stanične membrane. Ceramid izgrađuje sfingozinska baza zajedno s različitim dugolančanim masnim kiselinama (Slika 1). Osnovna razlika između gangliozida i ostalih glikosfingolipida je određeni broj sijalinskih kiselina (engl. *sialic acid*, SA) vezanih na glikanu. Sinteza ceramida (Cer) odvija se pomoću enzima serin-palmitoil transferaze na membrani endoplazmatskog retikuluma (7). Biosinteza gangliozida započinje glukozilceramidom (GluCer), a iznimka je GM4 koji se sintetizira iz galaktozilceramida (GalCer). Prvo se sintetizira jednostavni gangliozid GM3 enzimom laktozilceramid sijaliltransferazom (GM3-sintaza). Potom se stvaraju GD3 i GT3. Nastali gangliozidi su preteče složenijih struktura 0, a, b i c serije gangliozida (8). Ovisno o broju molekula SA na unutrašnjoj galaktozi postoje tri serije gangliozida. 0-serija nema nijednu SA na unutrašnjoj galaktozi, a-serija ima vezanu jednu SA, b-serija dvije, a c-serija ima tri. Gangliozidi stupaju u interakcije s raznim molekulama, a osobito receptorima te tako reguliraju stanični rast, proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu. Osim toga, važni su i za međustanične interakcije te interakcije između stanica i izvanstaničnog matriksa (9). Pronalazimo ih u svim tkivima, međutim najviše su istraživani u tkivu mozga i otkriveno je kako u ovom tkivu prevladavaju GM1, GD1a, GD1b i GT1b (8,9). GD1 kojeg nalazimo u eritrocitima, jetri, slezeni i testisima, zatim GM2 kojeg nalazimo u koštanoj srži, GM3 kojega ima u crijevima te SSEA – su 4 specifična gangliozida u embrionalnim matičnim stanicama (10).

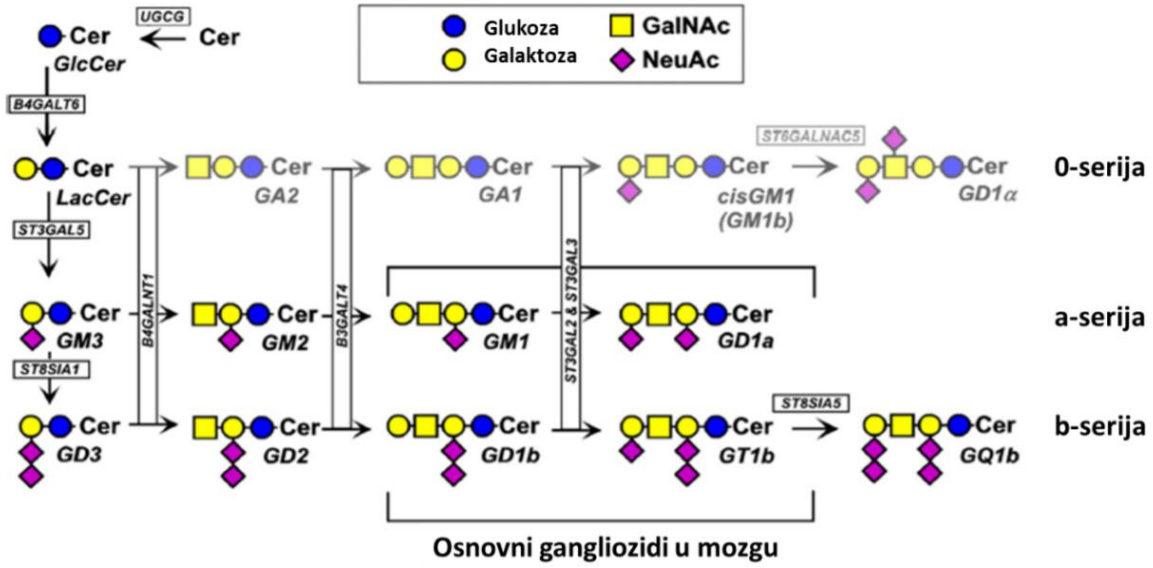


Slika 1. Struktura gangliozida GT1b (slika preuzeta uz dopuštenje iz rada autora Ronalda L. Schnaara (2), te prilagođena). Glikan (označen žutom bojom) glikozidnom vezom vezan je za ceramid koji je sastavljen od amida masne kiseline (plavo) i sfingozina (ružičasto). Gal – galaktoza, GalNAc – N-acetilgalaktozamin, Glc – glukoza, NeuAc – N-acetilneuraminska kiselina.

1.3. Posljedice izostanka sinteze kompleksnih gangliozida

U genetički izmijenjenom mišu s isključenim genom *B4Galnt1*, koji kodira enzim GM2/GD2 sintaza odgovornu za dodavanje N-acetilgalaktozamina (GalNAc) i nastanak složenih gangliozida, ne sintetiziraju se GM1, GD1a, GD1b i GT1b, međutim primijećeno je povećanje sinteze njihovih preteča GM3, GD3 i GT3 (11,12). Pretpostavka je da poremećaj sastava gangliozida dovodi do poremećaja distribucije proteina lipidnih splavi (Slika 2). Odstupanja od uobičajene sinteze gangliozida i nakupljanje GM3 imaju negativan učinak na inzulinski signalni put, te je potencijal razvitka patološkog stanja poput dijabetesa tipa 2 vrlo visok (13).

Imunohistokemijskim metodama vizualiziramo kolokalizacije gangliozida s receptorima. Ovaj tip genetički promijenjenog miša daje uvid u funkciju gangliozida te je u skladu s istovjetnim ljudskim kongenitalnim poremećajem, hereditarnom spastičnom paraperezom, u kojoj dolazi do demijelinizacije aksona i smanjene sinteze mijelinskih proteina te je prisutan i poremećaj strukture Ranvierova čvora (2,14).



Slika 2. Shematski prikaz biosinteze gangliozida u sisavaca (slika preuzeta uz dopuštenje iz rada autora Ronalda L. Schnaara (2), te prilagođena). Mozgom sisavaca i ptica dominiraju četiri gangliozida (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) koji ujedno čine 97 % svih gangliozida u mozgu čovjeka. Zasjenjen dio sheme je dio sinteze koji ne funkcionira u miša s isključenim genom *B4Galnt1*. Cer – ceramid, GalNAc – N-acetilgalaktozamin, LacCer – laktozilceramid, NeuAc – N-acetilneuraminska kiselina.

1.4. Animalni model izostanka sinteze kompleksnih gangliozida izazvan isključivanjem gena *B4Galnt1*

Miš s isključenim genom *B4Galnt1* napravljen je na genetičkoj podlozi miša C57black/6 (C57BL/6). *B4Galnt1* je gen na 12. kromosomu (12q13.3), a kodira 3 izoforme proteina koje su produkti alternativnog prekrajanja. Enzim *B4Galnt1* svrstava se u gensku porodicu β4 - glikoziltransferaza i sudjeluje u biosintezi složenih gangliozida, tj. glikosfingolipida koji sadrže jednu, dvije ili tri molekule sijalinske kiseline. Sudjeluje u sintezi gangliozida GM2 i GD2 (glikosfingolipidi koji sadrže sijalinsku kiselinu) te GA2 (asijalo-GM2, koji ne sadrži sijalinsku kiselinu) iz GM3, GD3 i laktozilceramida. Ključan je korak za kasniju biosintezu složenih gangliozida, kao što su GM1, GD1a, GD1b, GT1b i GQ1b (15). N-acetilgalaktozamin transferaza

(GalNAc-T) je enzim uključen u biosintezu GM2 i GD2 glikosfingolipida. GalNAc-T katalizira prijenos GalNAc na GM3 i GD3 beta -1,4 vezanjem, što rezultira sintezom GM2, odnosno GD2 (3). Kvarternarnu strukturu enzima čine homodimeri povezani disulfidnim mostovima, a koji se nalaze u kasnom Golgijevom aparatu. Kod miša s isključenim genom *B4Galnt1* događa se blok u sintezi glikosfingolipida te uslijed toga nema sinteze složenih gangliozida metaboličkih puteva 0, a, b i c. Protivno, u lizosomskim bolestima nakupljanja, gangliozidi se nakupljaju jer je blokirana njihova razgradnja (16, 17).

1.5. Flotilin 1 i transferinski receptor

Specifični marker splavi je protein flotilin (Flot 1), dok je marker nesplavi transferin (TfR).
Obitelj flotilina sastoji se od dva visoko homologna proteina, flotilina 1 i flotillina 2 koji dijele više od pola identičnih aminokiselinskih sekvenci te su pronađeni u svim do danas proučavanim tipovima stanica sisavaca. Flotilini su prisutni kao neovisno organizirani oligomeri visokog reda, a flotilin 1 je specifičan protein uključen u nekoliko staničnih procesa (18,19). Flotilin 1, protein lipidnih splavi omogućuje stabilnost mikrodomena. Aktivno sudjeluje u signalnim putovima kao što je stanična adhezija i migracija, signaliziranje receptorske tirozin kinaze te MAP kinaze (20, 21).
Transferinski receptor je primarni prijenosni protein za molekulu transferina, koji se nalazi na staničnoj membrani i omogućuje receptorom posredovanu endocitozu nakon vezivanja transferina i željeza. U mišjem bubregu transferinski receptor je otkriven u apikalnoj membrani proksimalnog tubula epitelnih stanica (22). U literaturi nije zabilježena značajna razlika u ekspresiji transferinskog receptora između bubrežne kore i srži (23).

1.6. Akvaporin 1 i 2

Akvaporini su obitelj membranskih kanala koji su vrlo propusni za vodu. Poznato je 13 akvaporina kod sisavaca, od kojih je prvi identificirani akvaporin bio akvaporin 1, izvorno nazvan CHIP28. Akvaporin 1 je izražen na brojnim mjestima uključujući vaskularni endotel, epitel proksimalnog bubrežnog tubula, bilijarni epitel i koroidni splet. Istraživanja na miševima i ljudima pokazuju kako akvaporini imaju veliku ulogu u koncentriranju urina, sudjeluju u staničnoj migraciji i

angiogenezi te plućnoj vaskularnoj permeabilnosti (24,25). Razvijeni modeli miša s delecijom akvaporina 1 ili akvaporina 2 uzrokuju poliuriju i smanjenje osmolalnost urina te oštećenje vodenog kanala važnog u koncentriranju urina, koji kontrolira vazopresin. Vodeni kanal akvaporin 1 posreduje većinsku reapsorpciju vode u bubrezima sisavaca. Protein je lokaliziran u luminalnoj i bazolateralnoj plazmatskoj membrani epitelnih stanica u proksimalnim tubulima i tankim silaznim segmentima Henleove petlje (26).

2. HIPOTEZA

Blok sinteze gangliozida kod genetički izmjenjenog miša *B4Galnt1* dovodi do poremećaja izražaja proteina karakterističnih za lipidne splavi (flotilina 1) i ne splavi (transferinski receptor) epitelnih stanica bubrega i promjene izražaja s njima povezanih proteina (akvaporin 1 i 2) što postaje vidljivo tijekom maturacije bubrega.

3. CILJEVI

1. Ispitati morfologiju bubrega miševa s isključenim genom *B4Galnt1* (engl. *knockout,* KO) u odnosu na miševe divljeg tipa (engl. *wild type,* WT) u starosti od 5 dana, 2 tjedna i 1 mjeseca.
2. Ispitati sadržaj proteina u urinu kod 30 dana starih životinja oba genotipa.
3. Ispitati promjene u distribuciji kompleksnih gangliozida (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) u bubregu WT miševa, odnosno gangliozida GM3 u bubregu KO miševa u starosti od 5 dana, 2 tjedna i 1 mjeseca.
4. Ispitati raspodjelu i količinu markera lipidnih splavi (flotilin) i ne-splavi (transferinski receptor) kod KO i WT miševa u starosti od 5 dana, 2 tjedna i 1 mjeseca.
5. Ispitati raspodjelu i količinu akvaporina 1 i 2 kod KO i WT miševa u starosti od 5 dana, 2 tjedna i 1 mjeseca.

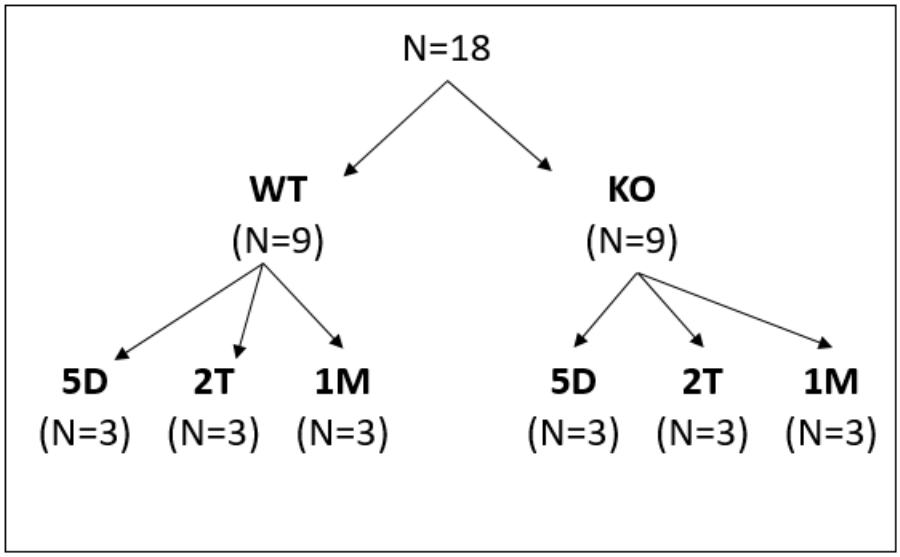
4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Ovo je istraživanje studija parova gdje su skupine životinja bile: WT i KO.

4.2. Pokusne životinje

Životinje su prije početka istraživanja boravile u Vivariju Medicinskog fakulteta Osijek. Kavezi su bili označeni identifikacijskim karticama te pod nadzorom veterinara. Svi postupci na miševima opisani su u projektu Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) „Patofiziološke posljedice promjene sastava lipidnih splavi“ (pod brojem IP-09-2014-2324) i odobreni od strane Etičkog povjerenstva za istraživanje Medicinskog fakulteta Osijek te Ministarstva poljoprivrede, Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane (KLASA: 602-04/16-08/15; URBROJ: 2158-61-07-16-143, dana 16. prosinca 2016.) čija je voditeljica prof. dr. sc. Marija Heffer. Ukupno je korišteno 18 miševa podijeljenih prema genotipu u WT i KO skupine. Navedene skupine su dodatno podijeljene prema starosti u 3 skupine: pet dana, dva tjedna i jedan mjesec, tako da je u svakoj skupini bilo po 3 životinje (Slika 3).



Slika 3. Raspodjela pokusnih životinja po skupinama. 1M – 1 mjesec starosti, 2T – 2 tjedna starosti, 5D – 5 dana starosti, KO - miševi s isključenim genom *B4Galnt*, N – broj, WT – kontrolna skupina divljeg tipa.

4.3. Metode

Nakon što su skupine miševa dosegle traženu dob od pet dana, dva tjedna ili mjesec dana žrtvovani su od strane za to obučenih djelatnika s Katedre za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Osijek, uz poštovanje svih etičkih načela određenih u Zakonu o zaštiti životinja Republike Hrvatske. Miševi su eutanazirani prema protokolu: omamljivanje anestetikom sevofuran (Aesica Queenborough Limited, Queenborough, Velika Britanija) do stadija kome. Nakon omamljivanja miševi su perfundirani kroz srce s 50 ml pufera 1x PBS (engl. *phosphate buffered saline*), a potom s 50 ml fiksativa, 4 %-tne otopine paraformaldehida (engl. *paraformaldehyde*, PFA) (Sigma-Aldrich, StLouis, MO, SAD) u 1x PBS-u. Bubrezi su disecirani te fiksirani u 4 %-tnom PFA tokom 24 sata. Slijedila je krioprotekcija u gradijentima saharoze (Acros Organics, Geel, Belgija) volumnog udjela 10 %, 20 % i 30 % u 1x PBS-u na +4 °C, a zatim smrzavanje u pothlađenom izopentanu (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, SAD) i pohranjivanje na -80 °C do rezanja na kriostatu. Tkiva bubrega uklapana su u medij za kriostatsko rezanje (Leica, Nussloch, Germany) te su izrezana kriostatom (Leica, CM3050S, Wetzlar, Njemačka) na debljinu od 20 μm pri temperaturi OT -15°C, CT -22°C. Rezovi su tokom rezanja zalijepljeni na predmetna stakalca presvučena želatinom. Potom su preparati spremljeni u histološku kutiju na sušenje do hemalaun-eozin (HE) bojanja i imunohistokemije.

4.3.1. Hemalaun-eozin bojenje tkiva

Hemalaun-eozin bojenje tkiva provedeno je pri sobnoj temperaturi prema sljedećem protokolu:

1. stakalca s rezovima stavljena su u ksilen na 10 min;
2. rezovi su rehidrirani u seriji etanola, po 5 min u svakom: (1) 100 %, (2) 100 %, (3) 96 %, (4) 70 %;
3. rezovi su isprani destiliranom vodom u trajanju od 5 min;
4. bojenje hemalaunom trajalo je 10 min;
5. rezovi su isprani destiliranom vodom u trajanju od 1 min;
6. uslijedilo je razvijanje boje vodovodnom vodom na 10 min;
7. rezovi su isprani destiliranom vodom u trajanju od 1 min;
8. bojenje eozinom trajalo je 1 min;

9. rezovi su isprani destiliranom vodom na 5 s;
10. uslijedila je dehidracija u seriji etanola, po 5 min u svakom: (1) 70 %, (2) 96 %, (3) 100 %, (4) 100 %;
11. etanol je uklonjen uranjanjem stakalaca s rezovima u ksilen na 5 min;
12. rezovi su pokriveni medijem „Histological Mount Medium“ (National Diagnostics, SAD, kat. br. HS-103, lot. 08-08-30) i pokrovnim stakalcem.

4.3.2. Fluorescentna imunohistokemija

Osušeni preparati su stavljeni u vlažnu komoru na 30 minuta pri sobnoj temperaturi, zatim su okruženi tekućim repelentom (Liquid blocker super PAP pen, Daido Sangyo Co., Ltd., Tokio, Japan). Kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela, rezovi su inkubirani 2 sata pri + 4 °C u otopini za blokiranje koju čine kozji serum u volumnom udjelu od 5 % (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD; kat. br. 16210072) i albumin iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) u volumnom udjelu od 1 % (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD) u 1x PBS-u. Rezovi su zatim inkubirani preko noći pri + 4 °C u vlažnoj komori s primarnim protutijelima na: GM1 (korišteno u razrjeđenju 1:500), GD1a (korišteno u razrjeđenju 1:5000), GD1b (korišteno u razrjeđenju 1:1000) i GT1b (korišteno u razrjeđenju 1:4000) (Tablica 1).

Slijedilo je ispiranje u 1x PBS-u tri puta tokom 10 minuta kako bi se uklonio višak primarnih protutijela koja se nisu vezala na epitope, a zatim se rezove prebacilo u otopinu sekundarnih protutijela. Upotrijebljena su sljedeća sekundarna protutijela: kozji protuzečji IgG konjugiran s tetrametilrodaminom (engl. *tetramethylrhodamine*, TRITC) (korišteno u razrjeđenju 1:300) i kozji protumišji IgG konjugiran s fluorescein izotiocijanatom (engl. *fluorescein isothiocyanate*, FITC) (korišteno u razrjeđenju 1:300) (Tablica 2). Inkubacija sekundarnih protutijela se provela u trajanju 4 sata pri + 4 °C, a zatim je uslijedilo ispiranje tri puta u 1x PBS-u u trajanju po 10 minuta. U slučaju da je sekundarno protutijelo bilo označeno biotinom, nakon ispiranja se napravila inkubacija s kompleksom streptavidin-Cy3 (Biolegend, San Diego, Kalifornija, SAD; kat. br. 405215) u trajanju od jednog sata na + 4 °C, nakon čega su rezovi tri puta isprani u 1xPBS. Rezovi su se potom inkubirali s 4′,6-diamidino-2-fenilindolom (engl. *4′,6-diamidino-2-phenylindole*, DAPI) (Boehringer Manheim GmBH, Njemačka; korišteno u razrjeđenju 1:1000) 10 minuta na

sobnoj temperaturi te je uslijedilo dvostruko ispiranje u 1x PBS-u tijekom 10 minuta. Kako bi onemogućili autoflorescenciju tkiva, bubrege smo inkubirali 10 minuta sa Sudan Black B bojom (Merck, Darmschtad, Njemčka; kat. br. 1.15928.0025) te ponovili dvostruko ispiranje u 1x PBS-u. Zadnji korak prije vizualizacije bilo je prekrivanje medijem Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, California, SAD; kat. br. H-1000) i pokrovnim stakalcem čiji su rubovi zalakirani.

Tablica 1. Primarna protutijela korištena u fluorescentnoj imunohistokemijskoj analizi

Epitop na kojeg je razvijeno protutijelo	Porijeklo	Klasa protutijela	Proizvođač (kataloški broj)
GM1	miš	IgG	Zavod za farmakologiju Medicinskog fakulteta Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, SAD
GD1a	miš	IgG	
GD1b	miš	IgG	
GT1b	miš	IgG	
GM3	miš	IgM	T.C.I. America, Portland, Oregon SAD (A2582)
Flotilin 1	miš	IgG	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, SAD (610821)
Transferinski receptor	miš	IgG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD (13-6800)
Akvaporin 1	zec	IgG	Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska
Akvaporin 2	zec	IgG	Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska

Tablica 2. Sekundarna protutijela korištena u fluorescentnoj imunohistokemijskoj analizi

Epitop na kojeg je razvijeno protutijelo	Porijeklo	Oznaka protutijela	Proizvođač (kataloški broj)
Zečji IgG	Koza	TRITC	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo (111-025-144)
Mišji IgG fragment $F(ab')_2$	Koza	FITC	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo (115-025-166)
Mišji IgM	Koza	Anti-ms IgM + biotin	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo (115-065-075)

4.3.3. Kvantifikacija fluorescentne imunohistokemije

Preparati su slikani digitalnim fotoaparatom Olympus D70 (Olympus, Tokio, Japan) spojenim na svjetlosni mikroskop Carl Zeiss Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss, Oberkochen, Njemačka) na povećanju objektiva od 40 x. Fotografije preparata spremljene su u tiff (engl. *Tagged Image File Format*) formatu te su analizirane računalnim programom ImageJ v.1.80, i njegovim FIJI dodatkom (engl. *plugin*) (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, SAD, dostupnim u javnoj domeni, https://imagej.nih.gov/ij/download.html) (27).

4.4. Elektroforeza urina miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *B4Galnt1*

Prikupljen je urin WT i KO mužjaka starih mjesec dana uzgajanih u uzgojnoj štali Vivarija Medicinskog fakulteta Osijek. Uzorci nanešeni na elektroforezu dobiveni su sakupljanjem mokraće od najmanje tri miša. Koristeći se Qubit 3 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD; kataloški broj Q33216) fluorometrom i priborom za određivanje koncentracije proteina urin je testiran na sadržaj proteina u urinu te se odredila koncentracija prisutnih proteina prema sljedećem protokolu proizvođača kako slijedi:

1. pripremljena je svježa radna otopina miješanjem proteinskog reagensa i pufera u omjeru 1:200;
2. radna otopina razdijeljena je u mikroepruvete (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD; kataloški broj Q32856) (190 µl u mikroepruvete za standarde, 198 µl za uzorke);
3. u mikroepruvete s radnom otopinom dodana je otopina standarda (10 µl), odnosno uzorci (2 µl);
4. smjesa je inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi;
5. fluorometrijski jeizmjerena koncentracija proteina.

Zatim je 30 µL svježeg urina iskorišteno za SDS-PAGE elektroforezu (elektroforeza u poliakrilamidnom gelu s natrijevim dodecilsulfatom, od engl. *sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*). Navedeni volumen urina pomiješan je s 10 µL pufera za uzorke (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD; kat. br. NP0007) i inkubiran 5 minuta pri 95 °C. Od tako pripremljenog uzorka volumen od 30 µL nanesen je u jažice TGX *Stain Free* poliakrilamidnog gela s posebnom kemikalijom za direktnu detekciju proteina (Bio-Rad, Hercules, California, SAD; kat. br. 4568123). Gel je prethodno bio uronjen u tris-glicinski pufer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Gly, 0,1 % SDS, pH = 8,3).

Uz uzorke je na gel naneseno i 5 µl proteinskog standarda *SeeBlue Plus2* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD; kat. br. LC5925). Elektroforeza je provedena pod naponom od 60 V u trajanju od dva sata.

Nakon elektroforeze, gel je aktiviran uređajem Chemi Doc MP (Bio-Rad, Hercules, California, SAD; kat. br. 17001402) pri čemu su proteini vizualizirani. Dobivena slika analizirana je

denzitometrijski u računalnom programu FIJI (27).

4.5. Statistička analiza

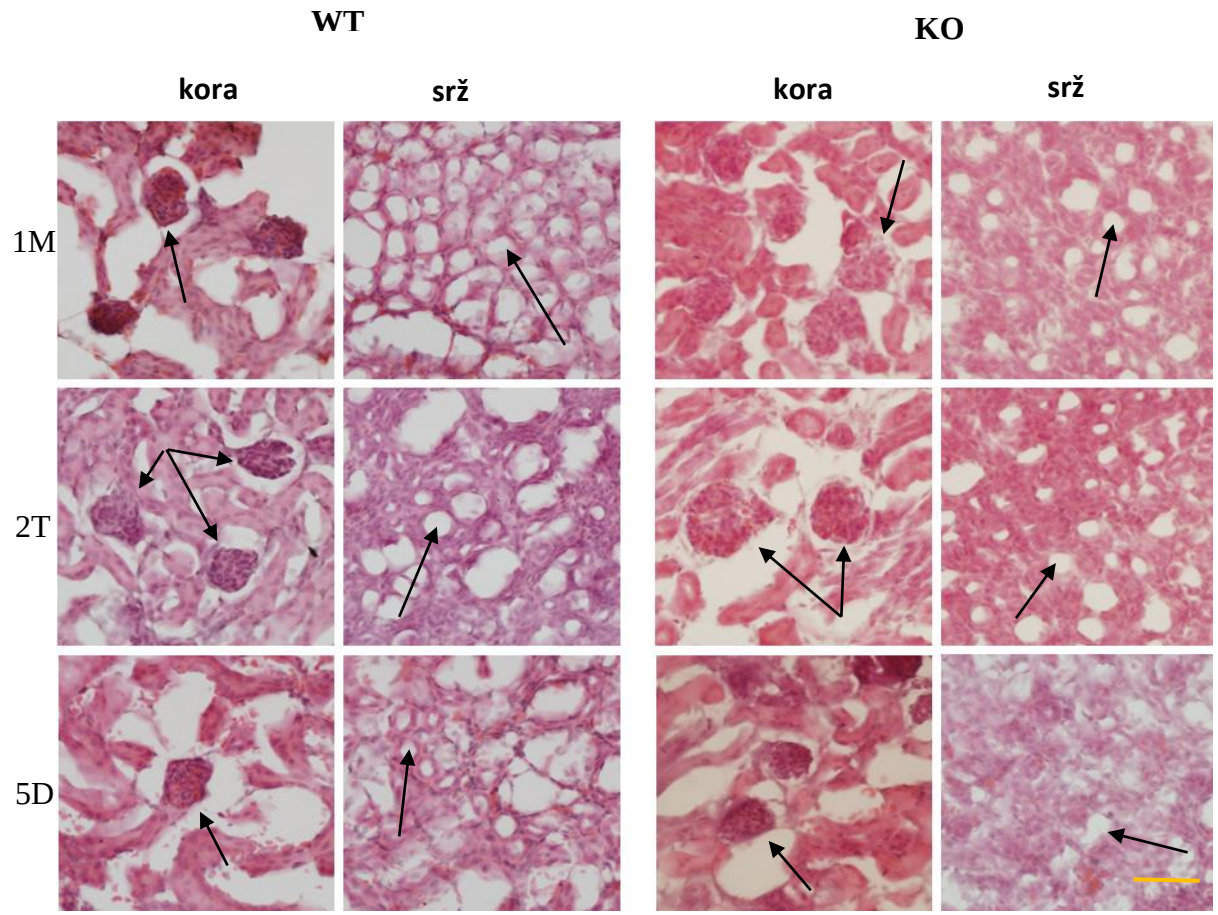
Statistička analiza napravljena je u računalnom programu Past (inačica 4.0, Universitetet i Oslo, Oslo, Norveška). Razlike normalno raspodijeljenih varijabli između nezavisnih skupina testirane su ANOVA testom. U slučaju da raspodjela varijabli nije bila normalna, a što se utvrdilo Shapiro-Wilkovim testom, razlike između nezavisnih skupina testirane su Kruskall-Wallisovim testom i *post hoc* testom prema Dunnu uz Bonferronijevu korekciju.

Za svaku statističku analizu koristio se uzorak u minimalnom biološkom triplikatu, a razina značajnosti je u svim analizama bila određena s $p < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Morfologija bubrega miševa s isključenim genom *B4Galnt1*

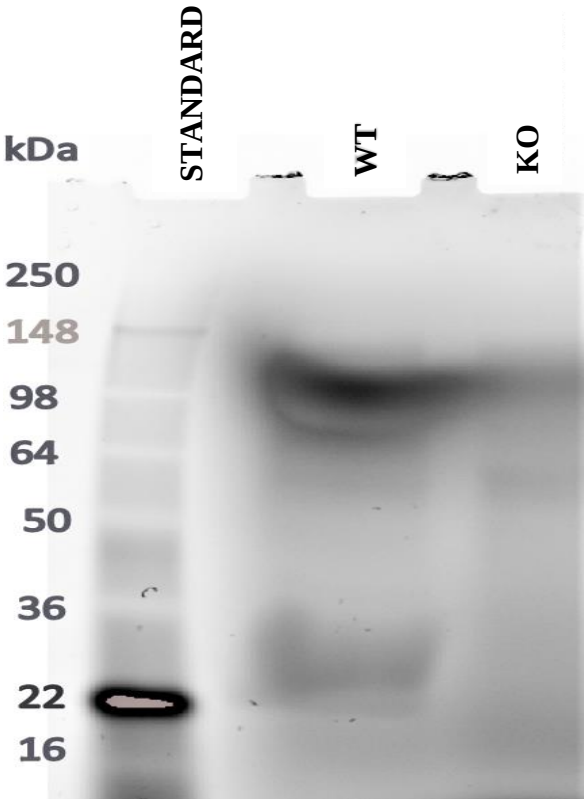
Klasičnim histološkim bojenjem hemalaun-eozinom prikazana je morfologija bubrega WT miševa u odnosu na KO miševe. Histološka bojenja tkiva bubrega miševa starosti 5 dana, 2 tjedna i 1 mjesec prikazana su na slici 4. Analizom morfologije bubrega WT i KO miševa bojanih hemalaun-eozinom utvrđeno je da su kod KO miševa u kori povećani glomeruli, dok je u srži smanjen promjer tubula, ali ova promjena nije dalje kvantificirana.



Slika 4. Morfologija kore i srži bubrega. Uspoređene su dvije skupine (WT i KO) miševa starih pet dana, dva tjedna i mjesec dana. Metoda bojenja: hemalaun-eozin. Skala 50 µm. 1M – 1 mjesec starosti, 2T – 2 tjedna starosti, 5D – 5 dana starosti, KO –skupina s isključenim *B4Galnt1* genom, WT – kontrolna skupina divljeg tipa.

5.2. Analiza koncentracije proteina u urinu miševa s isključenim genom *B4Galnt1*

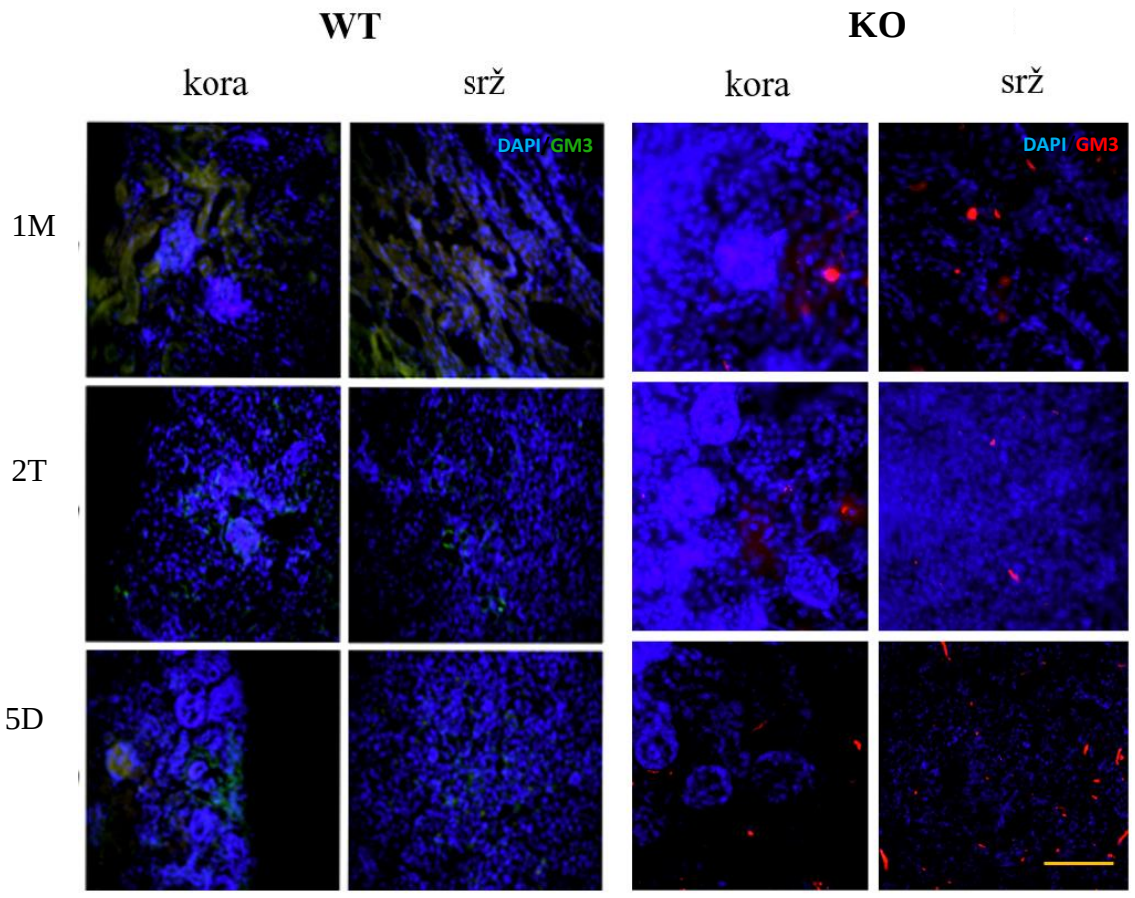
Analiza sadržaja proteina u urinu miševa pokazala je da i WT i KO miševi imaju prisutne proteine u urinu. KO miševi imali su 0,1 mg/mL proteina, a WT 2,01 mg/mL. SDS-PAG elektroforezom na TGX *stain free* gelovima utvrđeno je da WT imaju otprilike 4 puta veći sadržaj 100 kilodaltonskog proteina kojemu nije utvrđen identitet, 1,4 puta veći udio albumina (vrpca između 65-69 kDa) te isto toliko puta veći udio lipokaina (vrpca pri 19 kDa) (Slika 5.).



Slika 5. Proteini u urinu miševa. kDa – kilodalton, KO – miš s isključenim genom *B4Galnt1*, WT – divlji tip miša.

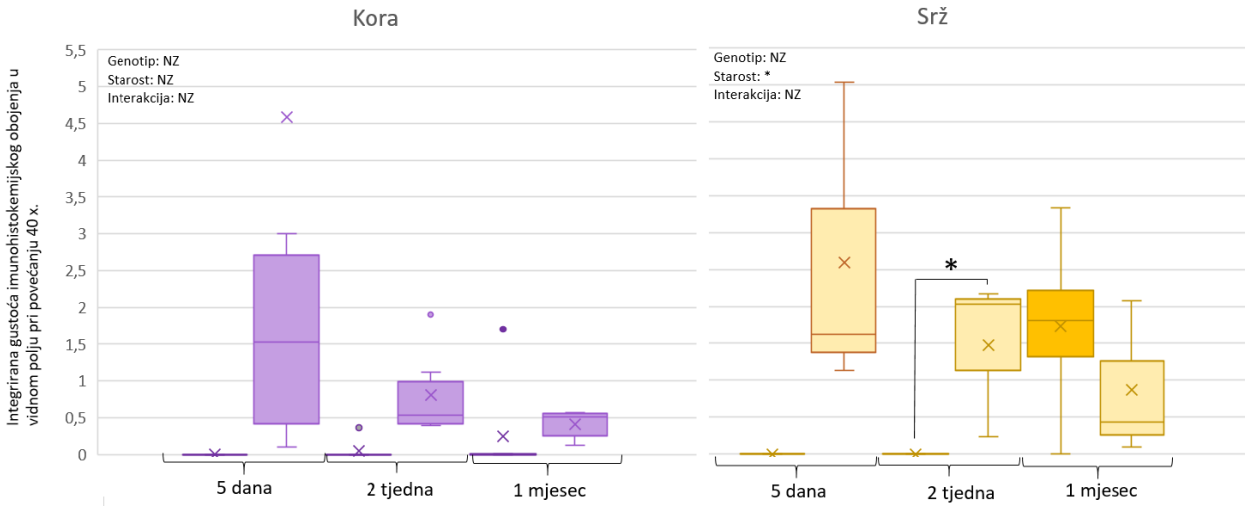
5.3. Analiza izražaja gangliozida GM3 u bubregu miša s isključenim genom *B4Galnt1* u odnosu na miševe divljeg tipa

Izražaj gangliozida GM3 u kori i srži bubrega WT i KO miševa u starosti od 5 dana, 2 tjedna i 1 mjesec dobiven imunohistokemijskom metodom prikazan je na slici 5. Gangliozid GM3 je detektiran u kori te u epitelnim stanicama distalnog i proksimalnog dijela zavijenih kanalića srži bubrega svih dobnih skupina KO miša, ali samo u dobi od mjesec dana kod WT miša (Slika 6).



Slika 6. Izražaj gangliozida GM3 u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *B4Galnt1*. Skala 50 µm. 1M – 1 mjesec starosti, 2T – 2 tjedna starosti, 5D – 5 dana starosti, *B4Galnt1*-KO – miš s isključenim *B4Galnt1* genom, WT – divlji tip.

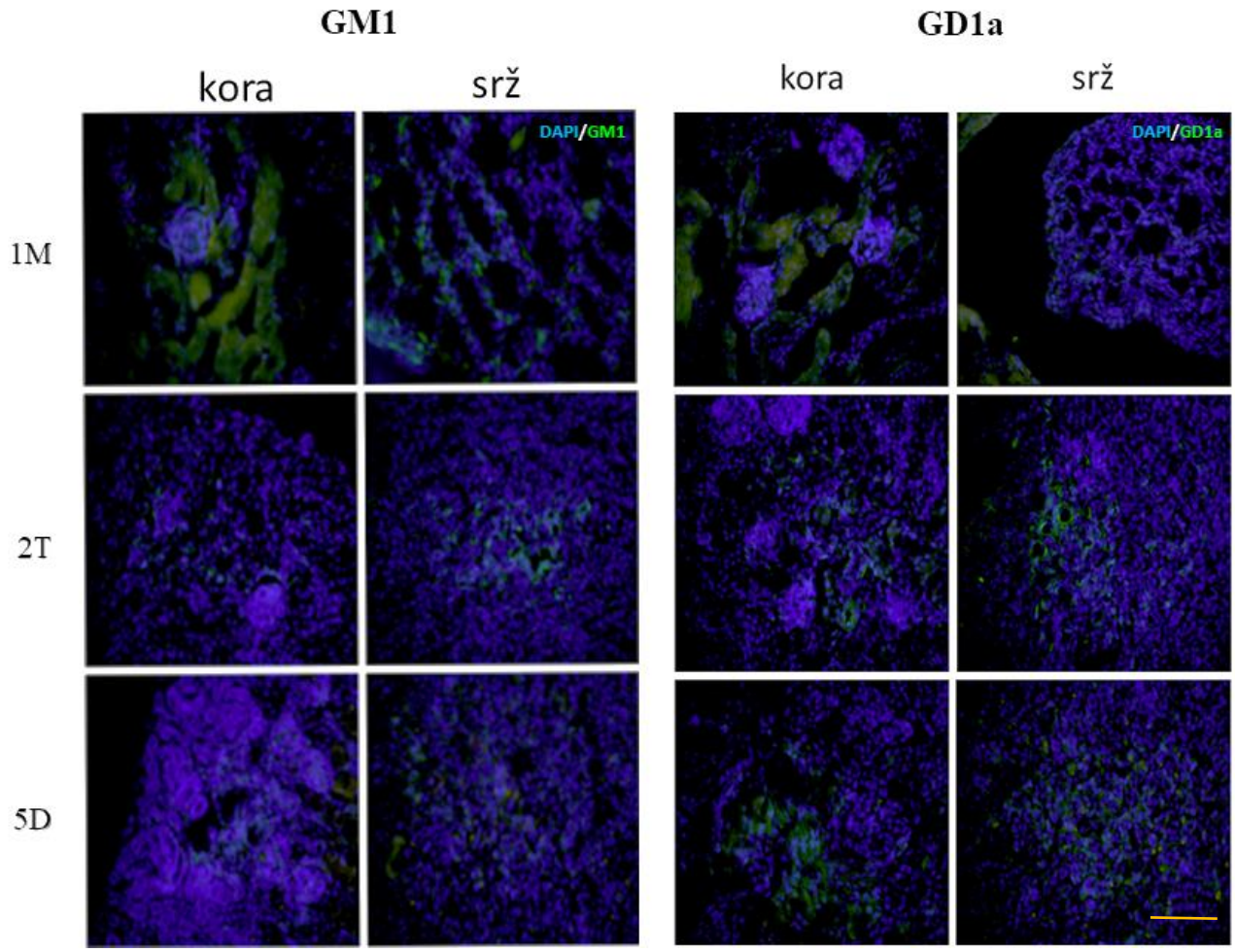
Iako je primijećen veći izražaj GM3 u kori KO miševa, u usporedbi s izražajem u WT miševa nije utvrđena statistička značajnost, kao ni u usporedbi s ostalim skupinama istog genotipa. Međutim, u srži su u dobi od 2 tjedna KO miševi imali značajno veći izražaj GM3 u odnosu na WT miševe ($p = 0,043$). Ostale razlike u izražaju GM3 u srži, poput većeg izražaja u KO 5D skupini i WT 1M skupini, nisu bile statistički značajne (Slika 7).



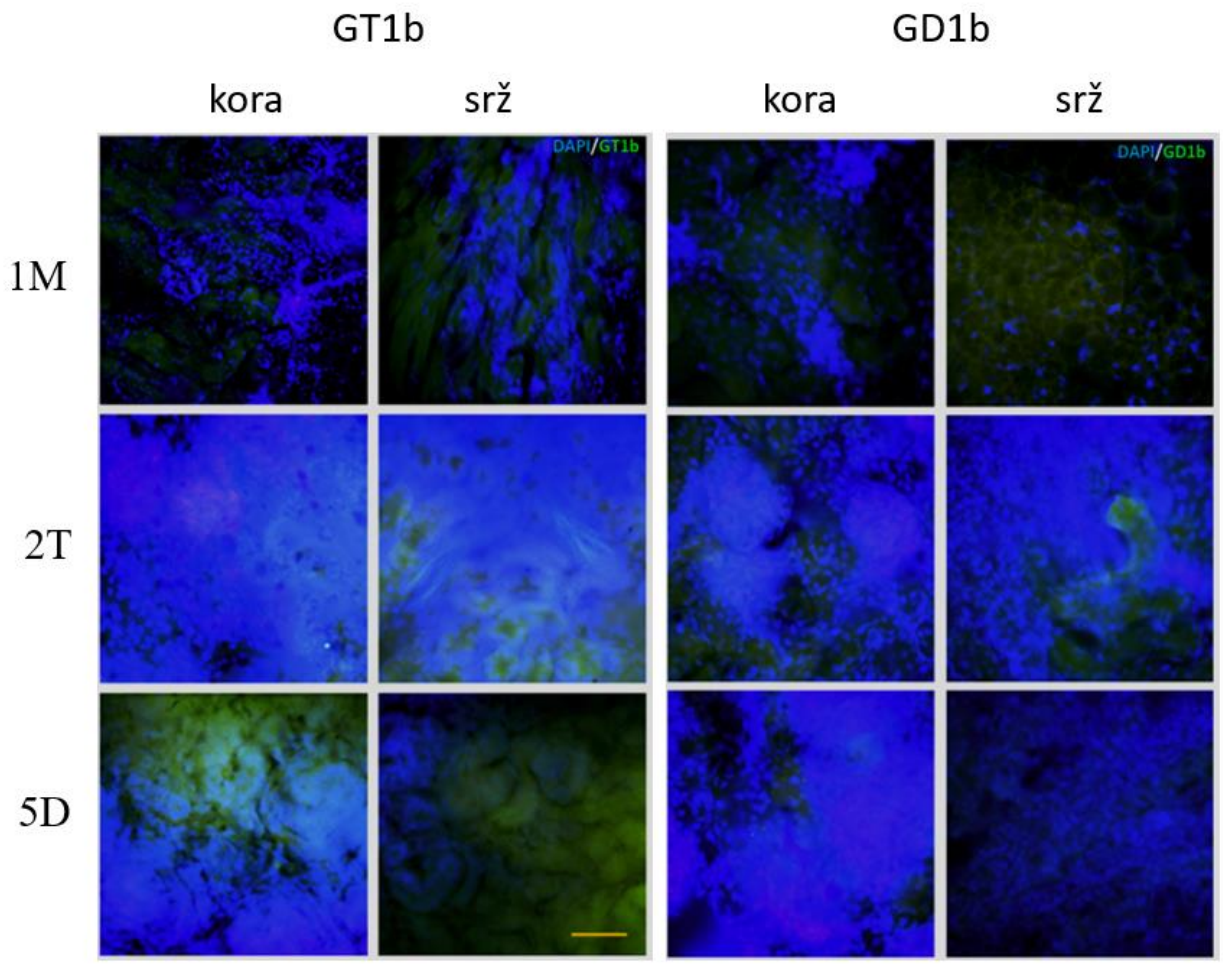
Slika 7. Izražaj gangliozida GM3 u kori i srži bubrega s obzirom na dob kod miševa s isključenim *B4Galnt1* genom i miševa divljeg tipa. Tijekom statističke analize primijenjen je Kruskall-Wallis test s Dunn *post hoc* testom, a vrijednost $p < 0,05$ uzeta je kao značajna. Značajnost je postignuta za starost od 2 tjedna ($p = 0,043$). **Legenda:** tamnoljubičasto/tamnožuto – WT, svjetloljubičasto/svjetložuto – KO. * $p < 0,05$, NZ - nije značajno.

5.4. Analiza izražaja gangliozida u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa

Kako kompleksne gangliozide sintetizira samo bubreg miševa WT, analiziran je izražaj gangliozida GM1, GD1a, GD1b i GT1b u kori i srži bubrega ovih životinja u starosti od 5 dana, 2 tjedna i 1 mjeseca. Izražaj gangliozida GM1 i GD1a prikazan je slikom 8, a izražaj gangliozida GD1b i GT1b slikom 9.



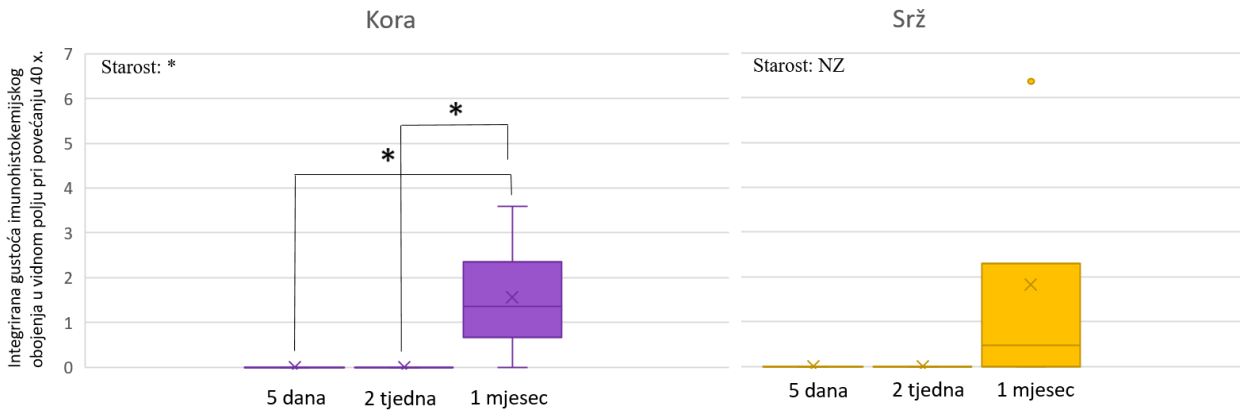
Slika 8. Izražaj gangliozida GM1 (lijevo) i GD1a (desno) u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa. Skala 50 µm. 1M – 1 mjesec starosti, 2T – 2 tjedna starosti, 5D – 5 dana starosti.



Slika 9. Izražaj gangliozida GD1b (lijevo) i GT1b (desno) u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa. Skala 50 µm. 1M – 1 mjesec starosti, 2T – 2 tjedna starosti, 5D – 5 dana starosti.

5.4.1. Analiza izražaja gangliozida GM1

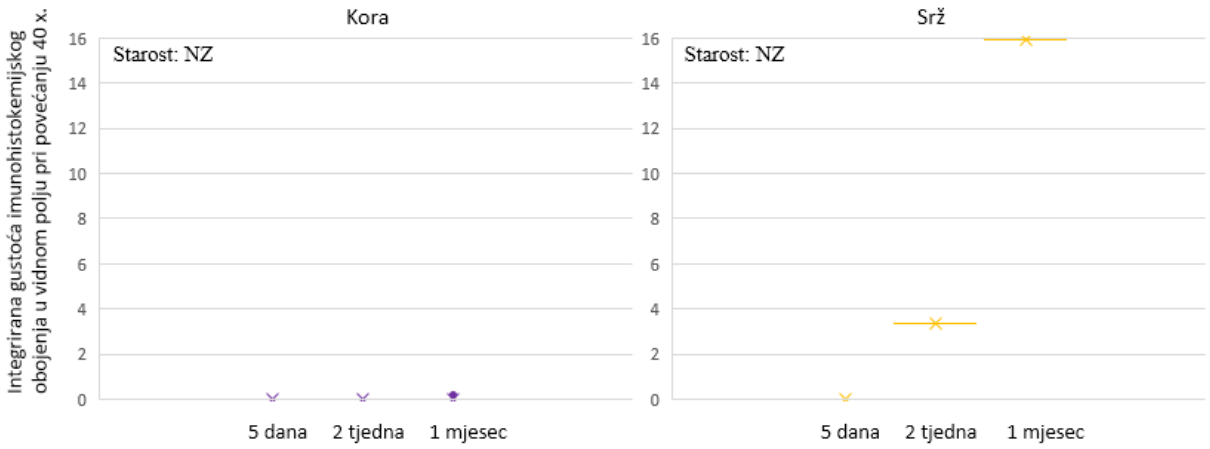
Izražaj gangliozida GM1 u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa rastao je sa sazrijevanjem bubrega. Između promatrane tri WT skupine utvrđena je statistički značajna razlika u izražaju GM1 u kori bubrega (p = 0,002). *Post hoc* testom utvrđeno je da 1M skupina ima značajno veći izražaj u odnosu na 5D skupinu (p = 0,006) i 2T skupinu (p = 0,006). Iako je u srži uočen sličan trend povećanja izražaja GM1, ovo povećanje nije bilo statistički značajno (Slika 10).



Slika 10. Izražaj gangliozida GM1 kore i srži bubrega miševa divljeg tipa. Tijekom statističke analize, pri kojoj je vrijednost p < 0,05 uzeta kao značajna, primijenjen je Kruskall-Wallis test koji otkriva značajne razlike između skupina (p = 0,002). Dunnovim *post hoc* testom utvrđeno je da se starosna skupina od 1 mjeseca razlikuje od starosne skupine 5 dana (p = 0,062) i 2 tjedna (p = 0,062). **Legenda:** tamnoljubičasto – kora bubrega, tamnožuto – srž bubrega. * p < 0,05, NZ – nije značajno.

5.4.2. Analiza izražaja gangliozida GD1a

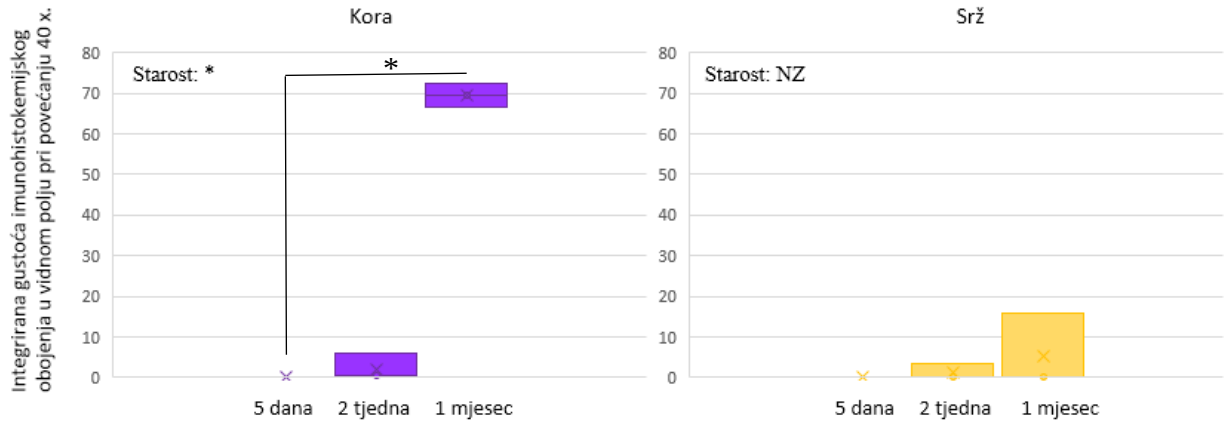
Izražaj gangliozida GD1a u kori bubrega WT životinja nije zapažen (Slika 11). U srži bubrega je po jedna WT životinja skupine 2T i 1M imala izražen GD1a, no to nije bio slučaj s ostalim životinjama iz iste skupine te nisu utvrđene statističke značajnosti (Slika 11).



Slika 11. Izražaj gangliozida GD1a kore i srži bubrega miševa divljeg tipa. Tijekom statističke analize primijenjena je dvosmjerna analiza varijance (ANOVA), a vrijednost $p < 0,05$ uzeta je kao značajna. Nema statistički značajnih razlika između promatranih skupina. **Legenda:** tamnoljubičasto – kora bubrega, tamnožuto – srž bubrega, NZ – nije značajno.

5.4.3. Analiza izražaja gangliozida GD1b

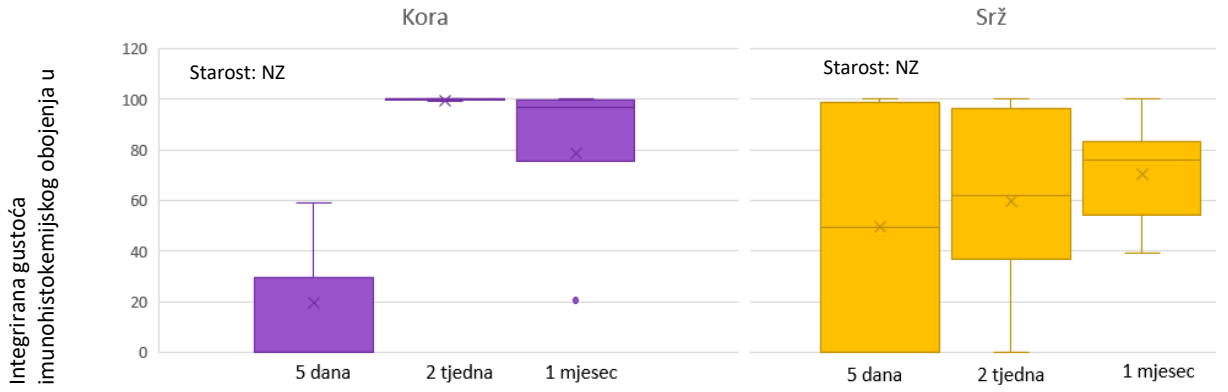
Izražaj gangliozida GD1b rastao je tijekom sazrijevanja bubrega. U kori bubrega WT miševa statistički značajno veći izražaj GD1b imala je 1M skupina (usporedba 5D i 1M, $p = 0,031$). Iako je u srži bubrega primijećen trend povećanja izražaja GD1b tijekom starenja, nisu utvrđene statistički značajne razlike među ispitivanim skupinama (Slika 12).



Slika 12. Izražaj gangliozida GD1b kore i srži bubrega miševa divljeg tipa. Tijekom statističke analize primijenjen je Kruskall-Wallis test s Dunn *post hoc* testom, a vrijednost $p < 0,05$ uzeta je kao značajna. Značajnost je postignuta za starost od 1 mjeseca u odnosu na 5D skupinu ($p = 0,034$). **Legenda:** tamnoljubičasto – kora bubrega, tamnožuto – srž bubrega. * $p < 0,05$), NZ – nije značajno.

5.4.4. Analiza izražaja gangliozida GT1b

Kora i srž bubrega miševa divljeg tipa izražavale su GT1b u svim promatranim dobnim skupinama, Nisu pronađene statistički značajne razlike u ekspresiji GT1b između bubrežne kore i srži WT miševa niti u jednom promatranom razdoblju (Slika 13).

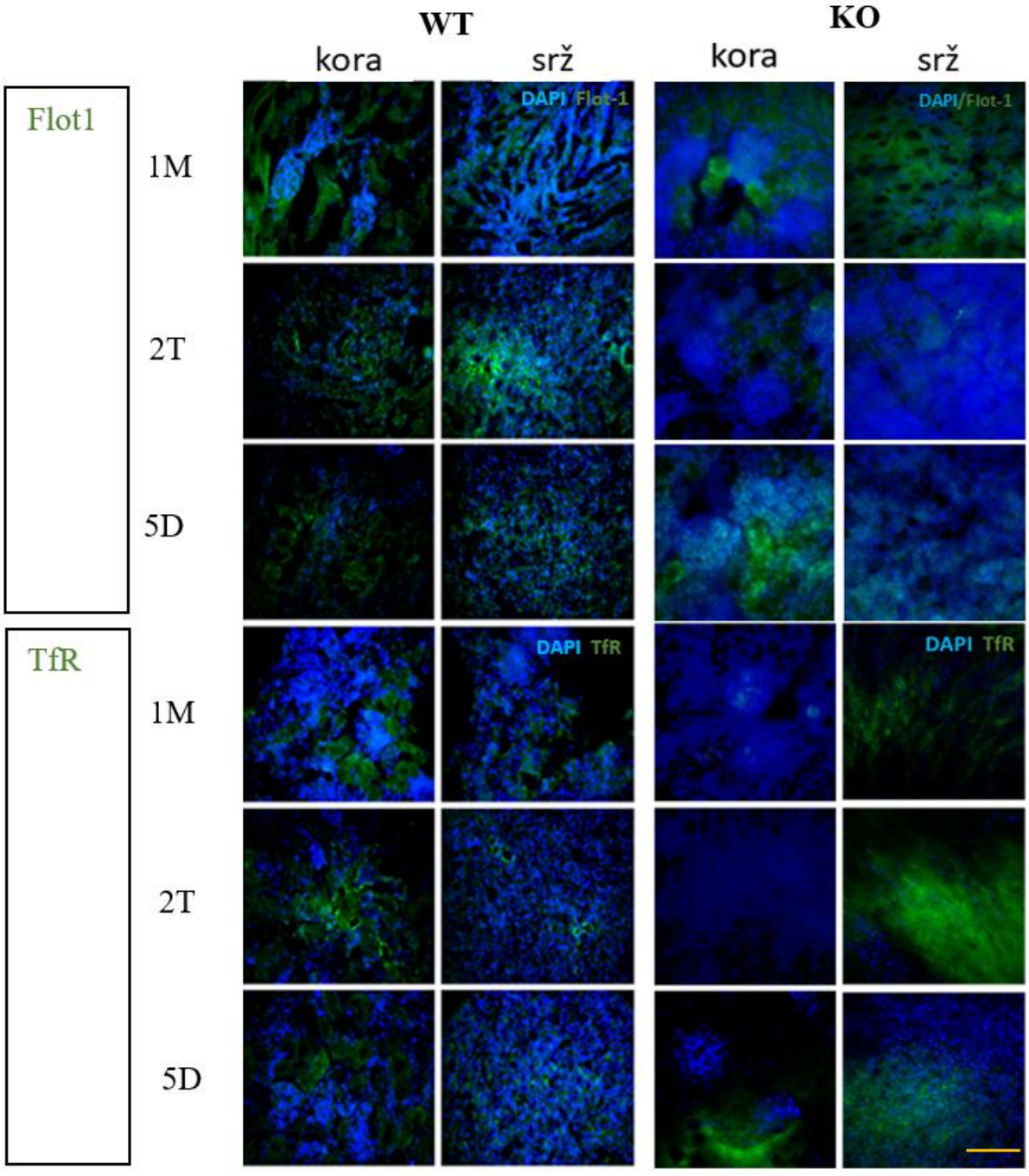


Slika 13. Izražaj gangliozida GT1b kore i srži bubrega miševa divljeg tipa. Tijekom statističke analize primijenjen je Kruskall-Wallis test, a vrijednost $p < 0,05$ uzeta je kao značajna. Nema statistički značajnih razlika između promatranih skupina. **Legenda:** tamnoljubičasto – kora bubrega, tamnožuto – srž bubrega, NZ – nije značajno.

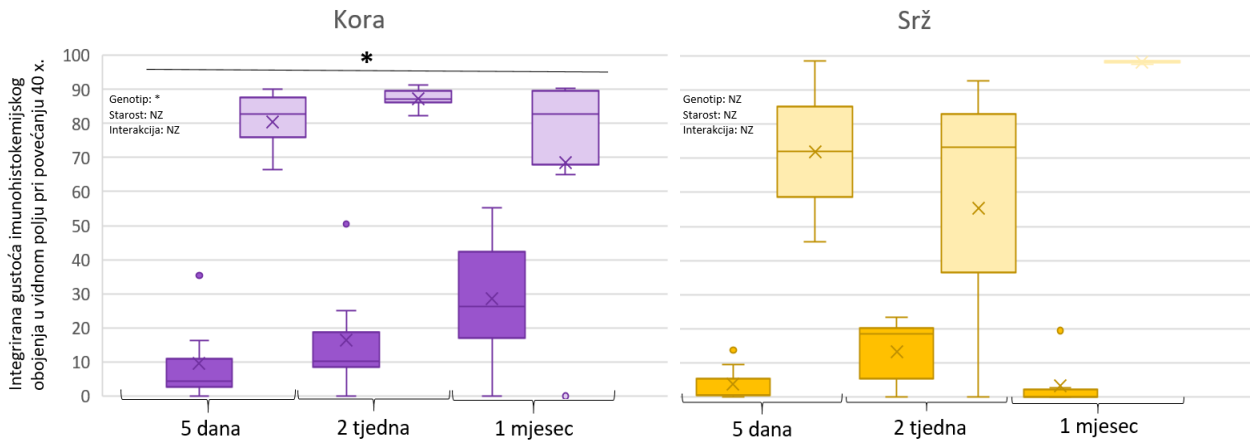
5.5. Analiza izražaja transferinskog receptora i flotilina 1 u bubregu miševa s isključenim *B4Galnt1* genom u odnosu na miševe divljeg tipa

Za analizu izražaja transferinskog receptora i flotilina-1 u kori i srži bubrega WT i KO miševa u starosti od 5 dana, 2 tjedna i 1 mjesec upotrijebljeni su imunohistokemijski prikazi (Slika 14). U kori bubrega KO miša izražaj transferinskog receptora bio je statistički značajno veći u odnosu na WT miševe, neovisno o promatranoj dobi ($p < 0,001$) (Slika 15). Također, izražaj flotilina-1 u kori KO miševa bio je značajno veći u odnosu na WT miševe, neovisno o promatranoj dobi (značajnost je postignuta za učinak genotipa: $p < 0,001$) (Slika 16).

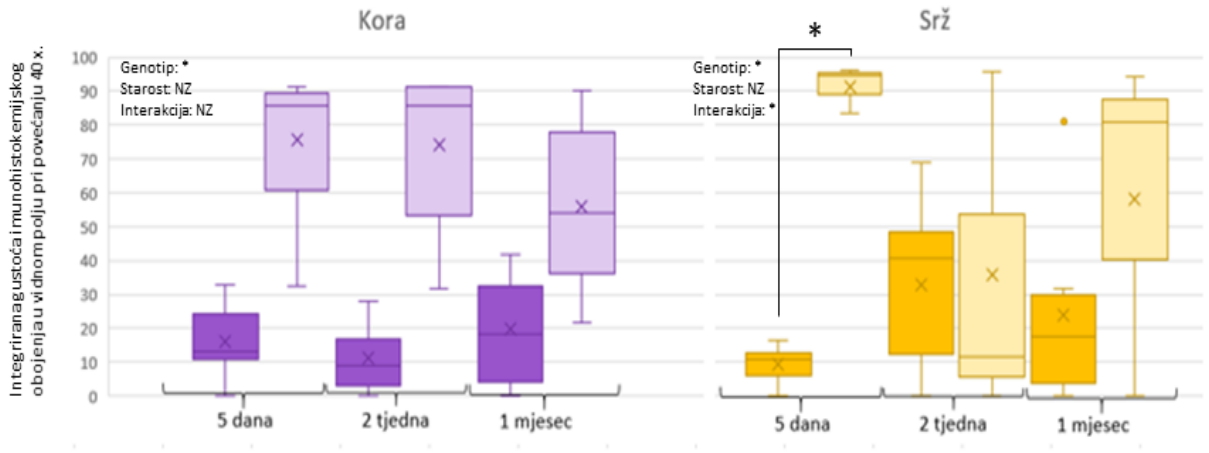
Interakcija genotipa i starosti utjecala je na izražaj Flot1 u srži bubrega ($p = 0,029$). U dobi od 5 dana KO životinje su imale značajno veći izražaj Flot1 u srži bubrega ($p = 0,004$). Tijekom starenja je navedeni izražaj postigao vrijednosti slične izražaju u WT životinja (Slika 16).



Slika 14. Izražaj flotilina-1 (gore) i transferinskog receptora (dolje) u kori i srži bubrega miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *B4Galnt1*. Skala 50 µm. 1M – 1 mjesec starosti, 2T – 2 tjedna starosti, 5D – 5 dana starosti, Flot1 – flotilin-1, KO – miš s isključenim *B4Galnt1* genom, TfR – transferinski receptor, WT – divlji tip.



Slika 15. Izražaj transferinskog receptora kore i srži bubrega kod miševa s isključenim *B4Galnt1* genom i miševa divljeg tipa. Tijekom statističke analize primijenjena je dvosmjerna analiza varijance (ANOVA), a vrijednost $p < 0,05$ uzeta je kao značajna. U KO miševa izražaj transferinskog receptora u kori bubrega bio je statistički značajno veći u odnosu na WT miševe ($F_{(1,33)} = 75,81$; $p < 0,001$) neovisno o promatranoj dobi. **Legenda:** tamnoljubičasto/tamnožuto – WT, svjetloljubičasto/svjetložuto – KO. * $p < 0,05$, NZ – nije značajno.

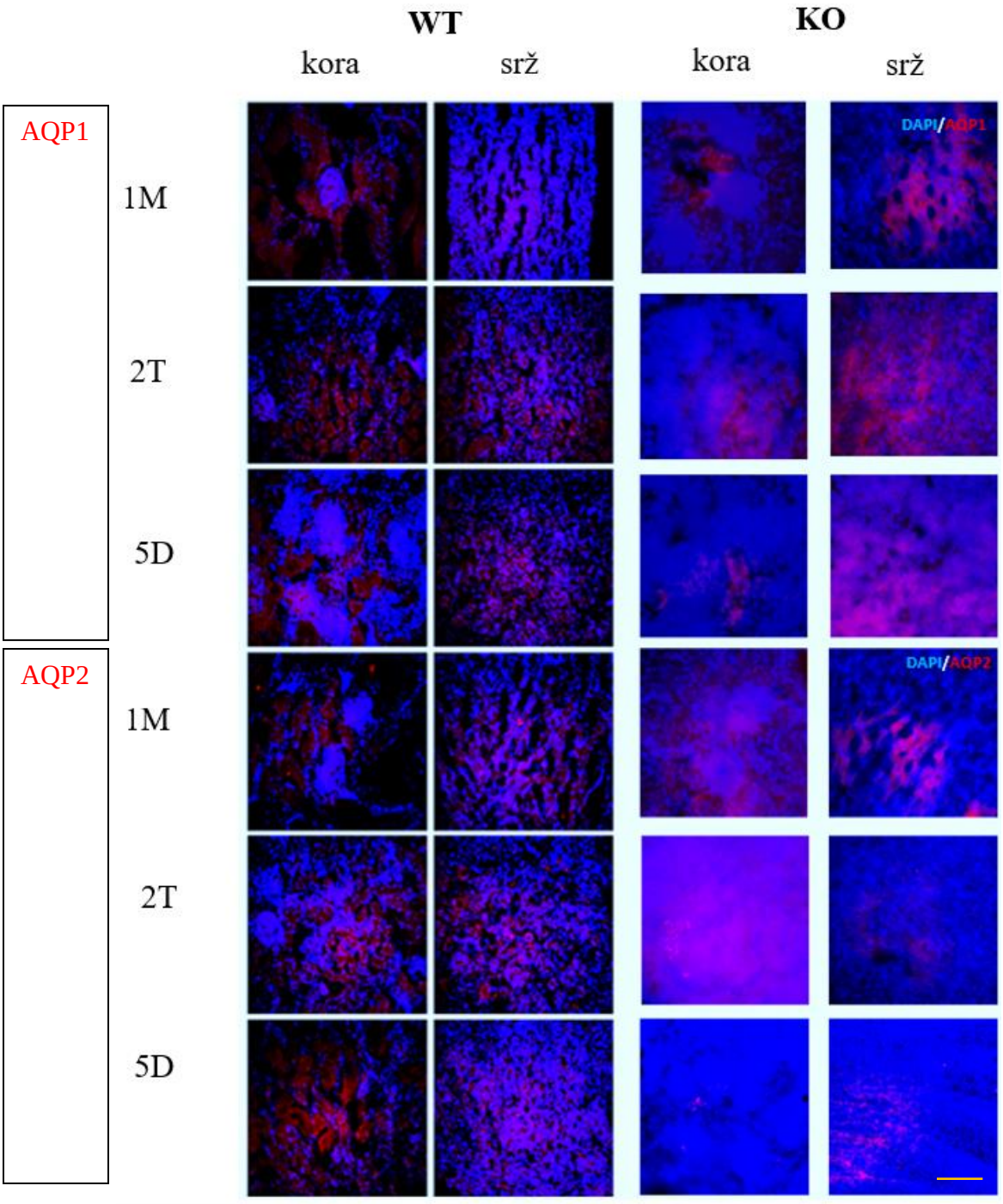


Slika 16. Izražaj flotilina-1 kore i srži bubrega kod miševa divljeg tipa i miševa s isključenim *B4Galnt1* genom. Tijekom statističke analize primijenjena je dvosmjerna analiza varijance (ANOVA) s *post hoc* Tukey testom, a vrijednost $p < 0,05$ uzeta je kao značajna. U KO miševa izražaj flotilina-1 u kori bubrega bio je statistički značajno veći u odnosu na WT miševe ($F_{(1,35)} = 68,79$; $p < 0,001$). U KO miševa izražaj flotilina-1 u srži bubrega bio je statistički značajno veći u odnosu na WT miševe ($F_{(1,26)} = 9,422$; $p = 0,006$) s obzirom na učinak genotipa. Interakcija genotipa i starosti utjecala je na izražaj flotilina-1 u srži bubrega ($F_{(2,26)} = 4,232$; $p = 0,029$). **Legenda:** tamnoljubičasto/tamnožuto – WT, svjetloljubičasto/svjetložuto – KO. * $p < 0,05$, NZ – nije značajno.

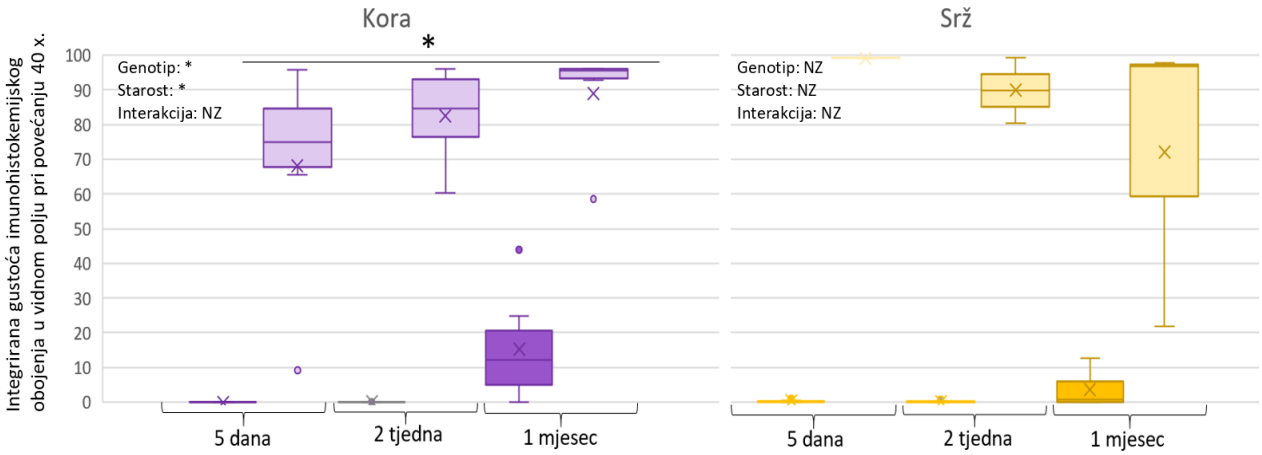
5.6. Analiza izražaja akvaporina 1 i 2 u bubregu miševa s isključenim genom *B4Galnt1* u odnosu na miševe divljeg tipa

Imunohistokemijski je analiziran izražaj akvaporina-1 i 2 u kori i srži bubrega WT i KO miševa u starosti od 5 dana, 2 tjedna i 1 mjesec (Slika 17). KO miševi su imali su statistički značajno veći izražaj akvaporina-1 u kori bubrega u odnosu na WT miševe ($p < 0,001$) i razlika u izražaju se zadržala unatoč starenju ($p = 0,021$). Starenjem se povećavao izražaj akvaporina-1 u kori bubrega u WT i KO miševa pri čemu su KO imali veći izražaj (Slika 18).

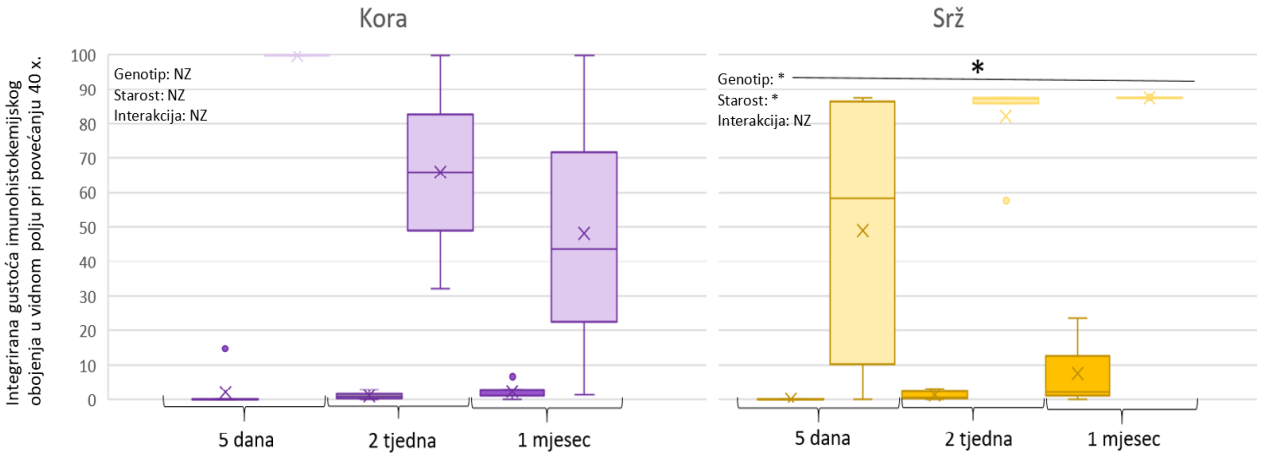
KO miševi imali su statistički značajno veći izražaj akvaporina-2 u srži bubrega ($p < 0,001$) u odnosu na WT miševe, bez obzira na starosnu dob (Slika 18).



Slika 17. Izražaj akvaporina-1 (gore) i 2 (dolje) kore i srži bubrega miševa divljeg tipa i miševa s isključenim *B4Galnt1* genom. Skala 50 µm. 1M – 1 mjesec starosti, 2T – 2 tjedna starosti, 5D – 5 dana starosti, AQP1 – akvaporin 1 , AQP2 – akvaporin 2, WT – divlji tip, *B4Galnt1*-KO – miš s isključenim *B4Galnt1* genom.



Slika 3. Izražaj akvaporina-1 kore i srži bubrega miševa divljeg tipa i miševa s isključenim *B4Galnt1* genom. Tijekom statističke analize primijenjena je dvosmjerna analiza varijance (ANOVA), a vrijednost $p < 0,05$ uzeta je kao značajna. KO miševi imali su statistički značajno veći izražaj akvaporina-1 u bubrežnoj kori u usporedbi s WT. Na izražaj akvaporina-1 u kori bubrega utjecao je genotip i to tako da je u KO miševa bio značajno veći u odnosu na WT miševe ($F_{(1,35)} = 186,7$; $p < 0,001$). Starenjem se povećao izražaj akvaporina-1 u kori bubrega u WT i KO miševa, pri čemu su KO imali veći izražaj ($F_{(2,35)} = 4,406$; $p = 0,021$). Unatoč uočenom povećanju akvaporina-1, u srži ne postoji statistička značajnost. **Legenda:** tamnoljubičasto/tamnožuto – WT, svjetloljubičasto/svjetložuto – KO. * $p < 0,05$, NZ – nije značajno.



Slika 4. Izražaj akvaporina-2 kore i srži bubrega miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *B4Galnt1*. Tijekom statističke analize primijenjen je Kruskall-Wallis test za analizu izražaja akvaporina-2 u kori, a za analizu izražaja akvaporina-2 u srži primijenjena je dvosmjerna analiza varijance (ANOVA). Vrijednost $p < 0,05$ uzeta je kao značajna. KO miševi imali su veći izražaj akvaporina-2 u srži nego WT ($F_{(1,35)} = 129,5$; $p < 0,001$), bez obzira na starosnu dob ($F_{(2,35)} = 5,385$; $p = 0,010$). **Legenda:** tamnoljubičasto/tamnožuto – WT, svjetločjubičasto/svjetložuto – KO. * $p < 0,05$, NZ – nije značajno.

6. RASPRAVA

Provedeno istraživanje potvrdilo je hipotezu da će izostanak sinteze kompleksnih gangliozida kod genetički izmjenjenog miša *B4Galnt1* dovesti do poremećaja izražaja proteina karakterističnih za lipidne splavi (flotilina-1) i ne splavi (transferinski receptor) epitelnih stanica bubrega te do promjene izražaja s njima povezanih proteina (akvaporin 1 i 2). Promjene u morfologiji bubrega i izražaju proteina praćenih ovom studijom postale su izraženije tijekom maturacije bubrega pa su zato najveće razlike između WT i KO životinja opisane kod životinja čija je starost bila mjesec dana. Neuravnoteženost u sintezi GSL-a, koje je karakteristično za ispitivani životinjski model, povezana s patološkim stanjima kao što su dijabetes tip 1 i 2, koji pogoršanjem dovode do dijabetičke nefropatije i smanjene brzine glomerularne filtracije (28). Navedeno bi bilo vrijedno istražiti na ovim životinjama u starijoj dobi.

Na histološkim preparatima bubrega WT i KO miševa obojanim hemalaun-eozinom uočene su promjene u veličini glomerula te smanjenje promjere mikrotubula srži. Kako se radi o mladim miševima, ne možemo sa sigurnošću tvrditi radi li se o bubrežnom fenotipu koji će tijekom starenja dovesti do ozbiljne bubrežne disfunkcije i još većih morfoloških odstupanja.

Analizom sadržaja urina ustanovljeno je da WT i KO miševi imaju proteinuriju pri čemu je udio 100 kilodaltonskog proteina dvostruko veći u urinu WT miša. U miševima WT također je i udio albumina i lipokaina povećan za 1,4 puta u odnosu na KO miševe. Jedan od prvih znakova dijabetičke nefropatije prisustvo je albumina u urinu (29). Dijabetička nefropatija nastaje zbog pojave dijabetesa tipa 1 i 2 te navedeno stanje dovodi do kronične bubrežne bolesti. U prvim stadijima bolesti u urinu oboljelih pojavljuje se manja količina albumina, dok kod napretka bolesti u urin dospijeva sve više albumina (30). Iako su dosadašnja istraživanja na miševima C57black/6 pokazala kako su te životinje otpornije na proteinuriju, u urinu testiranih životinja uočena je pojava proteina u WT i KO miševa. Reprezentativni model miša za ispitivanje bubrežnih bolesti dobiva se uz pomoć dostupnih genetski modificiranih miševa (31,32). Pronađeni protein lipokain proizvodi se u stanicama jetre, cirkulira krvotokom, a pročišćava se u bubrezima. Mužjaci proizvode otprilike 4 puta više ovog alergena nego ženke (33). Stoga bi u narednim istraživanjima bilo korisno uključiti u ispitivanje životinje oba spola. Koncentracija albumina u urinu KO I WT

miševa korištenih u našem istraživanju nije dovoljna da bi se mogla dijagnosticirati dijabetička nefropatija.

Korištenjem protutijela na GM3, u imunohistokemijskoj analizi došlo se do zaključka da je više zastupljen u KO u odnosu na WT miševe. GM2/GD2 sintetaza, koju kodira *B4Galnt1* gen, prenosi N-acetilgalaktozaminski ostatak na LacCer u proksimalnom dijelu Golgijeva aparata. GM3 je preteča za sintezu kompleksnih GSL-a serije ganglio, uključujući gangliozide koji sadrže sijalinsku kiselinu, odnosno GM1, GD1a, GD1b i GT1b (34). Ako se ugasi *B4Galnt1* gen dolazi do nedostatka složenih gangliozida i nakupljanja jednostavnih struktura kakve su GM3 i GD3 (31). Ne samo za gašenje ovog gena iz metaboličkog puta sinteze gangliozida, već i za ostale, dokazano je da dovode do istog fenomena – sinteze jednostavnijih struktura koje su količinom jednake kompleksnim strukturama u životinja divljeg tipa. Zato kažemo da dolazi do relativne kompenzacije kompleksnih strukturama manje složenim strukturama, što je obično praćeno raznim neurološkim ispadima jer su gangliozidi deset puta zastupljeniji u stanicama živčanog tkiva nego u stanicama bilo kojeg perifernog tkiva. Nadalje, kvantifikacijom intenziteta imunopozitivnih reakcija dobiveno je da je GM3 gangliozid izrazito zastupljen u srži bubrega u sve tri starosne dobi, dok u kori razlika u raspodjeli nije bila statistički značajna. Iz ovoga smo zaključili da bi gangliozidi mogli imati ulogu u funkciji zavijenih kanalića.

Prethodno istraživanje provedeno na bubrezima miševa pokazalo je bubrežno tkivo životinja divljeg tipa izražava u najvećoj mjeri gangliozide GM3 i GD3, dok su kompleksni gangliozidi (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) manje zastupljeni (32Istim istraživanjem dokazano je kako je GM3 izražen i u srži i kori bubrega. U našem istraživanju izražaj GM3 u kori bubrega nije se razlikovao između KO i WT životinja, ali su KO životinje u odnosu na WT imale značajno više ovog gangliozida u srži bubrega. Nakon što smo dobili ovaj rezultat, naša pretpostavka je bila da životinje divljeg tipa eksprimiraju kompleksne gangliozide na epitelnim stanicama zavijenih kanalića, a GM3 u glomerulima te da KO životinje kompenziraju nedostatak kompleksnih gangliozida u srži bubrega povećanom sintezom GM3. Zato smo tkiva bubrega životinja divljeg tipa podvrgli imunohistokemiji s protutijelima na kompleksne gangliozide. Naša se pretpostavka nije pokazala ispravnom jer smo kompleksne gangliozide pronašli i u kori i u srži bubrega životinja WT. Treba naglasiti da se izražaj kompleksnih gangliozida povećavao s dobi životinja te da su

količine, primjerice gangliozida GM1, bile najveće kod životinja starosti jednog mjeseca. GM1 je identificiran i u kori i srži bubrega, dok GD1a i GD1b samo u srži. Zbunjujuća je bila nehomogenost WT grupa životinja pa je tako samo jedna životinja imala povećanje izražaja GD1a i GD1b u srži bubrega u dobi od mjesec dana i samo jedna životinja u dobnoj skupini od 2 tjedna u odnosu na ostale članove iste skupine. Kod analize izražaja gangliozida GT1b rezultat je bio ujednačen: izražaj u kori je rastao s dobi dok je u srži bio konstantno visok. U narednim studijama moramo razjasniti podlogu ove neujednačenosti unutar skupina. Zaključak ovog dijela istraživanja bio je da se sinteza kompleksnih gangliozida povećava tijekom sazrijevanja bubrega, GM1 i GT1b su izraženi i u kori i u srži dok su GD1a i GD1b tipični za zavijene kanaliće srži. S obzirom na odstupanja među životinjama, rezultate je nužno potvrditi biokemijskom izolacijom gangliozida iz tkiva bubrega. Osim lipidne izolacije možemo se poslužiti i metodom slikovne masene spektrometrije koja je u stanju identificirati pojedine strukture i utvrditi njihovu histološku raspodjelu.

Korištenjem protutijela na flotilin-1 u imunohistokemijskoj analizi došlo se do zaključka da je isti više zastupljen u KO nego u WT miševima. Razlika se najviše primijeti u srži najmlađe starosne skupine. Budući da je flotilin-1 je marker lipidnih splavi zaključujemo kako kod KO miševa dolazi do poremećaja sastava lipidnih domena u čijoj tvorbi flotilin 1 ima funkciju. Prisutnost flotilina u bubregu neuobičajena jer je inače prisutan u mozgu, srčanom i skeletnom mišiću i plućima (35). S obzirom da je transferinski receptor bio jednoliko raspoređen u kori i srži bubrega WT miševa pretpostavili smo da proteini koji se nalaze u istim lipidnim domenama kao i transferinski receptor nisu pretrpjeli promjene u izražaju i funkciji kakve bi se mogle očekivati kod proteina koji se načlaze u lipidnim domenama u kojima je flotilin-1. Učinak genotipa naših životinja na izražaj transferina možda nije utvrđen radi malog broja životinja pa u narednim istraživanjima treba povećati broj životinja u skupinama.

Korištenjem protutijela na akvaporin-1 i 2 u imunohistokemijskoj analizi došlo se do zaključka da su akvaporini više zastupljeni u srži bubrega KO miševa u usporedbi s WT miševima. Akvaporin-1 je prisutan u bazolateralnoj i apikalnoj membrani proksimalnih tubula te u srži unutar Henleove petlje, a akvaporin-2 je raspodijeljen od spojnog tubula u kori do sabirnih kanalića u srži bubrega (35). Svaki akvaporin obuhvaća šest spiralnih domena koje obuhvaćaju membranu i ulaze unutar

membrane te funkcioniraju poput tetramerne strukture. Prisutnost akvaporina-1 povećava se tijekom starenja svih miševa WT i KO skupine. U usporedbi kore i srži, primjećujemo najviše akvaporina-1 u kori KO miševa, iako to ne možemo sa sigurnošću tvrditi zbog relativno malog broja životinja po skupini. Miševi s nedostatkom akvaporina- 1 očituju se ozbiljnim defektom koncentracije mokraće, koji je povezan sa smanjenom apsorpcijom proksimalne tubularne tekućine (35). Značajno je više zastupljen akvaporin-2 u srži bubrega kod KO miševa nego kod miševa divljeg tipa. To je ujedno i najbolje istraženi akvaporin u tkivu bubrega, reguliran antidiuretskim hormonom (35). Međutim, u srži razlike nisu vidljive u životinja starosti dva tjedna, dok su razlike u kori prisutne u svim ispitivanim starosnim grupama.

Prema našim spoznajama, ovo je prvo istraživanje morfologije, funkcije i izražaja proteina koji su markeri lipidnih domena splavi i nesplavi te akvaporina na životinjama s isključenim *B4Galnt1* genom. Zaključili smo kako ove životinje imaju bubrežni fenotip koji je za njih povoljniji u odnosu na životinje divlje tipa, ali kojeg treba dodatno opisati. Ovo bi moglo biti objašnjenje visoke dobi koju postižu ove životinje uprkos neurološkim smetnjama. U narednoj studiji grupe životinja svake starosne dobi trebaju biti veće, moraju biti zastupljena oba spola životinja i istraživanje treba nastaviti sa životinjama veće starosti.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

- Kod miševa s isključenim *B4Galnt1* genom povećani su glomeruli, dok je promjer tubula u srži smanjen u odnosu na miševe divljeg tipa.

- Miševi divljeg tipa i miševi s isključenim *B4Galnt1* genom imaju proteinuriju, ali je ona izraženija kod miševa divljeg tipa. Dobiveni nalaz upućuje na začetak razvitka bubrežne nefropatije.
- GM3 je više zastupljen u srži miševa s isključenim *B4Galnt1* genom, osobito u dobi od pet dana što dovodi do poremećaja distribucije proteina lipidnih splavi.
- GM1 i GD1b najveći izražaj postižu u dobi od mjesec dana dok sazrijevanje ne utječe na izražaj GD1a i GT1b u kori miševa divljeg tipa.
- Transferinski receptor i flotilin-1 su bili značajno više prisutni u kori miševa s isključenim *B4Galnt1* genom u odnosu na miševe divljeg tipa neovisno o promatranoj dobi. Postoji mogućnost značajnog poremećaja sastava lipidnih splavi,
- Akvaporini 1 i 2 više su izraženi u miševa s isključenim *B4Galnt1* genom u odnosu na miševe divljeg tipa te se maturacijom taj izražaj povećava.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Hemalaun-eozin bojenjem prikazati morfologiju bubrega *B4Galnt1*-KO i WT miševa starosti 5 dana, 2 tjedna i 1 mjesec, izmjeriti koncentraciju proteina u urinu KO i WT miševa starosti 1 mjesec, prikazati raspodjelu GM3, GM1, GD1b, GT1b i GD1a gangliozida protutijelima na gangliozide u kori i srži bubrega KO miševa starosti 5 dana, 2 tjedna i 1 mjesec, protutijelima na flotilin-1 i transferinski receptor prikazati raspodjelu markera lipidnih splavi i ne-splavi prema raspodjeli gangliozida u bubrezima KO i WT miševa starosti 5 dana, 2 tjedna i 1 mjesec i protutijelima na akvaporine, flotilin-1 i transferinski receptor odrediti položaj akvaporina u bubrezima KO i WT miševa starosti 5 dana, 2 tjedna i 1 mjesec.

Nacrt studije: Studija parova – životinje divljeg tipa prema životinjama s isključenim genom *B4Galnt1*.

Materijal i metode: U istraživanju je korišteno tkivo bubrega WT miševa i KO miševa s isključenim genom *B4Galnt1* te obje skupine obuhvaćaju životinje starosti 5 dana, 2 tjedna i 1 mjesec..

Rezultati: Hemalaun-eozin bojenje nije prikazalo značajnu razliku u morfologiji bubrega između WT i KO miševa, analiza urina pokazala je da WT i KO miševi imaju prisutne proteine u urinu, imunohistokemijska analiza pokazala je da su gangliozidi i flotilin-1 i transferinski receptor više zastupljeni u bubrezima KO miševa te je istom metodom dobiveno da su akvaporini-1 i 2 više rasprostranjeni u kori i srži bubrega KO miševa.

Zaključak: U bubrezima KO miševa došlo je do poremećaja raspodjele gangliozida, flotilina-1 i transferinskog receptora, akvaporina-1 i 2.

Ključne riječi: *B4Galnt1* gen; gangliozid; hemalaun-eozin; imunohistokemijska analiza; lipidne splavi.

9. SUMMARY

The Kidney Phenotype of *B4Galnt1* Knockout Mouse

Objectives: To show the morphology of the kidneys originating from *B4Galnt1*-KO and WT mice aging from 5 days, 2 weeks and 1 month using the haematoxylin-eosin staining. To measure the concentration of protein in urine from KO and WT one-month-old mice. To show distribution of GM3, GM1, GD1b, GT1b and GD1a gangliosides in cortex and medulla of kidneys originating from KO mice aging from 5 days, 2 weeks and 1 month using ganglioside antibodies. To show distribution of flotillin-1 and transferrin receptor in cortex and medulla of kidneys originating from KO and WT mice aging from 5 days, 2 weeks and 1 month using flotillin-1 and transferrin receptor antibodies. To determine the position of aquaporins-1 and 2 in kidneys originating from KO and WT mice aging from 5 days, 2 weeks and 1 month days using aquaporin-1, aquaporin-2, flotillin-1 and transferrin receptor antibodies.

Study design: Matched pair study – WT animals against animals with excluded *B4Galnt1* gene.

Material and Methods: The study includes kidney tissue originating from WT and KO mice with excluded *B4Galnt1* gene aging from 5 days, 2 weeks and 1 month.

Results: Haematoxylin-eosin staining did not present any morphological differences in WT and KO kidneys. Urine analysis showed that both WT and KO mice had protein in their urine samples. Immunohistochemical analysis showed that gangliosides were more present in kidneys originating from KO mice. Same analysis showed that flotillin-1 and transferrin receptor were more present in kidneys originating from KO mice and that aquaporins-1 and 2 are more widespread in the cortex and kidney medulla originating in KO mice.

Conclusion: A disorder in distribution of gangliosides, flotillin-1 and transferrin receptor, aquaporin-1 and 2 distribution occurred in kidneys originating from KO mice.

Keywords: *B4Galnt1* gene; ganglioside; haematoxylin-eosin; immunohistochemical analysis; lipid rafts.

10. LITERATURA

1. Danielsen EM, Hansen GH. Lipid raft organization and function in brush borders of epithelial cells (Review). Mol Membr Biol. 2006;23(1):71–9.

2. Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. Physiol Rev. 2014;94(2):461–518.

3. Tsui-Pierchala BA, Encinas M, Milbrandt J, Johnson EM. Lipid rafts in neuronal signaling and function. Trends Neurosci. 2002;25(8):412–7.

4. Verma DK, Gupta D, Lal SK. Host Lipid Rafts Play a Major Role in Binding and Endocytosis of Influenza A Virus. Viruses. 2018;10(11):650.

5. Yu RK, Ariga T, Yanagisawa M, Zeng G. Gangliosides in the Nervous System: Biosynthesis and Degradation. Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 2008;1671–95.

6. Merrill AH. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. Biochem Soc Trans. 2001;29(5).

7. Kolter T. Ganglioside biochemistry. ISRN Biochem. 2012:2012:1-36.

8. Gil-Tommee C, Vidal-Martinez G, Annette Reyes C, Vargas-Medrano J, Herrera GV, Martin SM, i sur. Parkinsonian GM2 synthase knockout mice lacking mature gangliosides develop urinary dysfunction and neurogenic bladder. Exp Neurol. 2019;311:265–73.

9. Zhang X, Kiechle LF. Glycosphingolipids in health and disease. Ann Clin Lab Sci. 2004;34(1):3-13.

10. Fishman PH, Brady RO. Biosynthesis and function of gangliosides. Science.

1976;194(4268):906–15.

11. Yu RK, Tsai Y-T, Ariga T. Functional roles of gangliosides in neurodevelopment - An overview of recent advances. Neurochem Res. 2012;37(6):1230–44.

12. Ledeen RW, Wu G. The multi-tasked life of GM1 ganglioside, a true factotum of nature. Trends Biochem Sci. 2015;40(7):407–18.

13. Zeng G, Yu RK. Cloning and Transcriptional Regulation of Genes Responsible for Synthesis of Gangliosides. Curr Drug Targets. 2008;9(4):317–24.

14. Li TA, Schnaar RL. Progress in Molecular Biology and Translational Science. 156. izd. Los Angeles. Academic Press; 2018.

15. Vukovic I, Bozic J, Markotic A, Ljubicic S, Ticinovic Kurir T. The Missing Link - Likely Pathogenetic Role of GM3 and Other Gangliosides in the Development of Diabetic Nephropathy. Kidney Blood Press Res. 2015;40(3):306–14.

16. Taniguchi N, Honke K, Fukuda M. Handbook of glycosyltransferases and related genes. 1. izd. Tokyo. Springer; 2002.

17. Yamaguchi T, Yamauchi Y, Furukawa K, Ohmi Y, Ohkawa Y, Zhang Q, i sur. Expression of B4GALNT1, an essential glycosyltransferase for the synthesis of complex gangliosides, suppresses BACE1 degradation and modulates APP processing. Sci Rep.2016;6(1).

18. Kolter T. Ganglioside biochemistry. ISRN Biochem. 2012;2012:1-36.

19. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol. 2000;1:31-41.

20. Lutz MS, Jaskiewicz E, Darling DS, Furukawa K, Young WW. Cloned beta 1,4 N-

acetylgalactosaminyltransferase synthesizes GA2 as well as gangliosides GM2 and GD2. GM3 synthesis has priority over GA2 synthesis for utilization of lactosylceramide substrate in vivo. J Biol Chem.1994;269(46):29227–31.

21. 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(20):10662–7.

22. Allende ML, Proia RL. Simplifying complexity: genetically resculpting glycosphingolipid synthesis pathways in mice to reveal function. Glycoconj J. 2014;31(9):613–22.

23. Zhang D, Meyron-Holtz E, Rouault TA. Renal iron metabolism: transferrin iron delivery and the role of iron regulatory proteins. J Am Soc Nephrol. 2007;18(2):401-6.

24. Matsuzaki T, Yaguchi T, Shimizu K, Kita A, Ishibashi K, Takata K. The distribution and function of aquaporins in the kidney: resolved and unresolved questions. Anat Sci Int. 2017;92(2):187–99.

25. Brown D. The Discovery of Water Channels (Aquaporins). Ann Nutr Metab 2017;70(1):37-42.

26. Research services branch. National Institut of Mental Health. National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Dostupno na: https://imagej.nih.gov/ij/download.html. Datum pristupa: 11.rujna 2019.

27. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al. (2012), "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", Nature methods. 9(7):676-682.

28. Novak A, Režić Mužinić N, Čikeš Čulić V, Božić J, Tičinović Kurir T, Ferhatović L, i sur. Renal distribution of ganglioside GM3 in rat models of types 1 and 2 diabetes. J Physiol Biochem. 2013;69(4):727–35.

29. Azushima K, Gurley SB, Coffman TM. Modelling diabetic nephropathy in mice. Nat Rev Nephrol. 2018;14(1):48-56.

30. Kim NH, Hyeon JS, Kim NH, Cho A, Lee G, Jang SY, i sur. Metabolic changes in urine and serum during progression of diabetic kidney disease in a mouse model. Arch Biochem Biophys. 2018; 15;646:90-97.

31. Ishola DA Jr, van der Giezen DM, Hahnel B, Goldschmeding R, Kriz W, Koomans HA,, i sur. In mice, proteinuria and renal inflammatory responses to albumin overload are strain-dependent. Nephrol Dial Transplant. 2006;21(3):591-7.

32. 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(20):10662–7.

33. Beynon RJ, Hurst JL, Gaskell SJ, Hubbard SJ, Humphries RE, Malone N, i sur. Mice, Mups and Myths: Structure-Function Relationships of the Major Urinary Proteins. 1. izd. Boston. Springer; 2001.

34. Journal of Cell Science. 2006;119:4486 − 4498.

35. Matsuzaki T, Yaguchi T, Shimizu K, Kita A, Ishibashi K, Takata K. The distribution and function of aquaporins in the kidney: resolved and unresolved questions. Anat Sci Int. 2017;92(2):187–99.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Anđić Marija
Datum i mjesto rođenja: 9.4.1996., Vinkovci
Adresa: Ulica Nikole Tesle 9A, Stari Jankovci, Republika Hrvatska
Mobitel: 098/ 92 11 951
E-mail: marijandic5@gmail.com

Obrazovanje:

2015.-2020. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Osijek

2011.-2015. Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

2014. Hrvatska vatrogasna zajednica, Vatrogasac

2003.-2011. Osnovna škola Stari Jankovci, Stari Jankovci

Kongresni sažeci:

Gender and genetic variations as background of placebo analgesia; Maja Jirouš; Marija Anđić; Martina Matanović; Petra Medač, OSCON-1st International TRANSLATIONAL MEDICINE Congress of Students and Young Physicians, 7th –8th February, 2019. Osijek, Croatia, Abstract book

Važnost biomarkera u laboratorijskoj medicini za pacijente koji boluju od reumatskog artritisa; Anđić Marija, DAMEO- Dani studenata Medicinskog fakulteta Osijek, 2018.

Aktivnosti:

Festival znanosti 2017., 2019.

Tjedan mozga 2019.,2020.

Znanstveni odbor OSCON

Vještine:

-vozačka dozvola B, AM kategorije

-aktivno služenje engleskim jezikom

-osnovno služenje njemačkim jezikom

- digitalno kompetentna u području obrade informacija i komunikacijskih vještina, neovisni korisnik