Izolacija lipidnih splavi prije i nakon procesa mijelinizacije u mozgu divljeg tipa miša C57Bl6

Ilijašević, Mihaela

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:152:799131

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Mihaela Ilijašević

IZOLACIJA LIPIDNIH SPLAVI PRIJE I NAKON PROCESA MIJELINIZACIJE U MOZGU DIVLJEG TIPA MIŠA C57BI6

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Mihaela Ilijašević

IZOLACIJA LIPIDNIH SPLAVI PRIJE I NAKON PROCESA MIJELINIZACIJE U MOZGU DIVLJEG TIPA MIŠA C57BI6

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je izrađen u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: doc. dr. sc. Barbara Viljetić.

Rad ima 46 listova, 12 slika i 9 tablica.

Hvala profesorici Mariji Heffer koja mi je omogućila izradu ovoga rada.

Hvala mentorici doc. dr. sc. Barbari Viljetić na pomoći u realizaciji rada.

Veliko hvala asistentici Vedrani Ivić na svoj pomoći prilikom rada u laboratoriju.

Hvala Miloradu Zjaliću koji me je naučio metodama te radu u laboratoriju.

Hvala kolegici Ani Krmpotić na izradi grafova.

Hvala prijateljici Lari Bakir i dečku Marku Horvatu na pomoći prilikom izrade rada i što su cijelo vrijeme bili uz mene, bili mi podrška.

Hvala mojim roditeljima koji su mi omogućili školovanje te uvijek bili moja potpora.

Veliko hvala svima!

Bez vas ovaj rad ne bi bio moguć!

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. Mijelinizacija 1
1.2.Građa mijelina 2
1.2.1. MBP 3
1.2.2. PLP 4
1.2.3. MAG 4
1.3. Demijelinizacijske bolesti 5
1.3.1. Multipla skleroza 5
1.3.2. Leukodistrofije 6
1.4. Lipidne splavi 6
1.5. Gangliozidi 8
2. HIPOTEZA 11
3. CILJEVI 12
4. MATERIJALI I METODE 13
4.1. Materijali 13
4.2. Kemikalije 13
4.3. Metode 15
4.3.1. Genotipizacija miševa 15
4.3.2. Žrtvovanje životinja 16
4.3.3. Izolacija lipidnih splavi 16
4.3.4. Određivanje koncentracije proteina prema Bradfordu 17
4.3.5. Određivanje koncentracije kolesterola 18
4.3.6. Western blot analiza proteina flotilina, transferina, MAG-a i MBP-a u lipidnim splavima moždanog debla 20
5. REZULTATI 22
5.1. Spektrofotometrijska analiza proteina u moždanom tkivu 22
5.2. Western blot analiza proteina flotilina, transferina, MBP-a i GAPDH-a u moždanom tkivu miša divljeg tipa 22
5.2.1. Analiza izražaja flotilina 23
5. REZULTATI 23
5.2.2. Analiza izražaja transferina 25

5.2.3. Analiza izražaja MBP-a 27
5.2.4. Analiza izražaja GAPDH-a 29
5.3. Spektrofotometrijska analiza kolesterola u moždanom tkivu 31
6. RASPRAVA 33
6.1. Analiza izražaja flotilina i transferina 33
6.2. Analiza izražaja MAG-a i MBP-a 34
6.3. Analiza izražaja kolesterola 36
7. ZAKLJUČAK 37
8. SAŽETAK 38
9. SUMMARY 39
10. LITERATURA 40
11. ŽIVOTOPIS 46

Popis kratica:

BSA – albumin iz seruma goveda (engl. *bovine serum albumine*)

CNS – središnji živčani sustav (engl. *central nervous system*)

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

MAG – glikoprotein vezan za mijelin (engl. *myelin-associated glycoprotein*)

MBP – bazični mijelinski protein (engl. *myelin basic protein*)

MAPK – proteinska kinaza aktivirana mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinase*)

MS – multipla skleroza (engl. *multiple sclerosis*)

PBST – fosfatni pufer s detergentom Tween-20 (engl. *phosphate buffered saline-Tween-20*)

PLP – proteolipidni protein (engl. *proteolipid protein*)

PMSF – fenilmetilsulfonil fluorid, inhibitor serinskih proteaza (engl. *phenylmethylsulphonyl fluoride*)

PNS – periferni živčani sustav (engl. *peripheral nervous system*)

WT – divlji tip (engl. *wild type*)

1. UVOD

1.1. Mijelinizacija

Najbolji znanstvenici diljem svijeta proučavali su strukturu mijelina još od 18. stoljeća. Mijelin je prvi puta opisan još u renesansi kao bijela tvar unutar mozga. U to vrijeme mijelin se smatrao najvažnijim elementom živčanog sustava. Zbog svoje složene kemijske strukture i funkcije, mijelin je bio težak za proučavanje. Tri su stoljeća bila potrebna da se shvati njegova funkcija. Danas se približavamo razumijevanju molekularnih mehanizama te biološke strukture koja nam je omogućila postojanje (1).

Mijelinska ovojnica evolucijska je prilagodba kralježnjaka koja je omogućila razvoj složenih živčanih sustava promicanjem učinkovitog i brzog provođenja živčanog impulsa (2) . Mijelin je izolacijska membrana koja je koncentrično omotana oko aksona te ubrzava širenje impulsa. Unatoč ovim prednostima, nisu svi aksoni mijelinizirani te su neki samo povremeno mijelinizirani. Schwannove stanice u perifernom živčanom sustavu (engl. *peripheral nervous system*, PNS) mijeliniziraju aksone velikoga promjera pri čemu svaka pojedinačna Schwannova stanica obavija po jedan odsječak aksona (3). Tijekom razvoja prekursorske stanice oligodendrocita, koje su raspodijeljene središnjim živčanim sustavom, diferenciraju se u mijelinizacijske oligodendrocite te se mijelinizacija odvija u različitim regijama u različito vrijeme (3). Mijelinizacija i diferencijacija prekursorskih stanica oligodendrocita nastavlja se u odrasloj dobi, ali mnogo sporije. Najmanji aksoni središnjeg živčanog sustava nikada se ne mijeliniziraju (4).

Kao što je ranije spomenuto, različita područja mozga prolaze proces mijelinizacije u različito vrijeme. Taj proces započinje u četvrtom mjesecu ljudskog embrionalnog razvoja te se nastavlja do trećeg ili četvrtog desetljeća života (5). Moždano deblo i leđna moždina ranije se mijeliniziraju, dok se druga područja, kao što je hipokampus, kasnije mijeliniziraju (6).

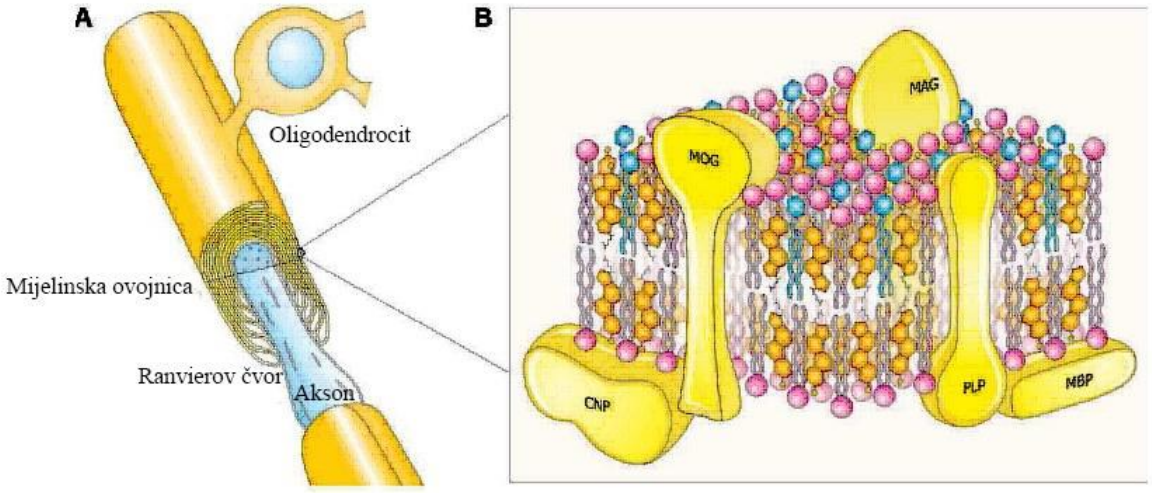
Razlikujemo dvije faze mijelinizacije: jedna je intrinzična, a druga je adaptivna (7). Intrinzični kodirani program usmjerava oligodendrocitnu mijelinizaciju i diferencijaciju aksona. Za vrijeme te unutarnje faze oligodendrociti generiraju duljinu mijelinske ovojnice. Druga faza predstavlja adaptaciju unutarnjih slojeva mijelina. Broj i veličina mijelinskih omotača modificirana je signalima aktivnih neurona nakon završetka ili tijekom unutarnje mijelinizacije. Takve promjene uzrokuju prilagođavanje provodljivosti neurona, posebice u

područjima s rijetko mijeliniziranim aksonima. Takav model mijelinizacije pomaže u razumijevanju plastičnosti CNS-a (8).

Proces učenja i pohrane novih znanja odvija se pomoću živčanih stanica koje u mozgu stvaraju nove veze, odnosno sinapse (9). Mijelin tu ima bitnu ulogu jer velike količine mijelina ubrzavaju živčane impulse. Kada nešto novo naučimo, produkcija mijelina poveća se u dijelu mozga gdje se odvija učenje. Takva interakcija, u kojoj se mozak oblikuje prema zahtjevima koji su mu nametnuti, danas je ono što znamo kao plastičnost mozga (10). Kako kroz život stječemo nova iskustva, tako se neke veze među neuronima osnažuju, a neke slabe i nestaju. Neuronski putevi koji se češće koriste stvaraju čvršće veze, a oni koji se koriste jako rijetko ili se uopće ne koriste odumiru. Procesom stvaranja novih puteva i odumiranjem onih koji se ne koriste mozak ima sposobnost prilagodbe na promjenjivu okolinu (11).

1.2.Građa mijelina

Mijelin je vrsta membrane koja je građena od posebnih glija stanica: oligodendrocita i Schwannovih stanica (12). Oligodendrociti nalaze se u središnjem živčanom sustavu, dok se Schwannove stanice nalaze u perifernom živčanom sustavu. Svaka Schwannova stanica oblikuje jednu mijelinsku ovojnicu oko aksona, dok svaki oligodendrocit stvara više slojeva mijelinskih ovojnica (12). Mijelin ima jedinstvenu molekulsku građu koja mu osigurava izolacijska svojstva (13). Sadrži veliku količinu lipida i kolesterola, a također je obogaćen plazmalogenima. Od glikofosfolipida najzastupljeniji su: galaktozilceramid i sulfatid (14). Cerebrozidi u mijelinu sadrže duge i normalno zasićene lance te se po tome razlikuju od drugih lipida (15). Nezasićenost je ograničena na jednu *cis* dvostruku vezu, dok su lanci od 24 ugljika uobičajeni. U mijelinskoj membrani prevladavaju tri vrste proteina: bazični mijelinski protein (engl. *myelin basic protein*, MBP), proteolipidni protein (engl. *proteolipid protein*, PLP) te glikoprotein vezan za mijelin (eng. *myelin-associated glycoprotein*, MAG) (15).



Slika 1. Prikaz građe mijelina (slika preuzeta iz rada autora Podbielska M, Hogan EL. i prilagođena (16))

1.2.1. MBP

Molekularna masa četiriju glavnih izoformi bazičnog mijelinskog proteina iznosi 14,0 kDa, 17,0 kDa, 18,5 kDa te 21,5 kDa (17). Izoforme MBP-a nastaju u zrelim oligodendrocitima. U odraslom mijelinu prevladava izoforma od 18,5 kDa (18). MBP je pozitivno nabijen protein koji je glavna komponenta PNS-a i CNS-a. Veže se na negativno nabijene površine membrana. α-heliksni odsječak MBP-a može prodrijeti u lipidni sloj te tako proširiti citoplazmu mijelinske membrane. Organizaciji lipida u membrani doprinosi interakcija membrane s MBP-om. Sljedeća važna uloga MBP-a je stvaranje barijera koje ograničavaju ulazak proteina s velikim citoplazmatskim domenama u membranske slojeve (19). Takva barijera formira dvodimenzionalno molekularno sito koje je nepropusno za većinu proteina, ali ne i za lipide. Barijera je preduvjet za stvaranje membrane bogate lipidima. MBP održava homeostazu kalcija, neutralizira naboje fosfolipida i potiče omatanje aksona (20). Možemo zaključiti da MBP organizira lipide mijelinske membrane i formira difuzijsku barijeru za proteine. Ovakvi mehanizmi preduvjet su da mijelin izvršava funkciju električnog izolatora (21).

1.2.2. PLP

Proteolipidni protein (PLP) pojavljuje se u dvije izoforme: kao PLP te kao njegova alternativna izoforma DM20 (22). Tijekom embrionalnog razvoja najviša je ekspresija DM20 proteina u CNS-u. Ekspresija PLP proteina povećana je za vrijeme postnatalnog razvoja (22). Molekularna masa PLP-a iznosi približno 30 kDa, dok molekularna masa DM20 iznosi 20 kDa. Protein DM20 formira se cijepanjem 35 aminokiselinskih ostataka iz PLP proteina (23).

Proteolipidni protein glavna je komponenta mijelina CNS-a (12). To je hidrofobni membranski protein koji grade četiri transmembranska α-heliksa koja su raspoređena sa svojim karboksilnim i amino krajevima u citoplazmi. PLP sadrži veliku izvanstaničnu petlju između transmembranskih α-heliksa. Prema tome zaključujemo da PLP posreduje u interakcijama između vanjskih površina mijelinske membrane. On je protein aciliran sa šest palmitata vezanih preko tioesterskih veza na cisteinskim ostacima. Njegove mutacije dovode do Pelizaeus-Merzbacherove bolesti (15).

1.2.3. MAG

Glikoprotein vezan za mijelin, MAG tip-1, transmembranskog je proteina te je istaknuti član IgG superobitelji (24). Molekularna masa MAG-a iznosi 100 kDa te on predstavlja manju komponentu mijelina. Čini 0,1 % mijelinskih proteina perifernog živčanog sustava i 1 % mijelinskih proteina središnjeg živčanog sustava (25). Nalazimo ga na unutarnjoj strani mijelinske membrane gdje sudjeluje u aksonsko-mijelinskim interakcijama. Genetska modifikacija MAG-a dovodi do smanjenja fosforilacije te progresivne degeneracije aksona. MAG je vrlo važna signalna molekula u interakcijama akson-mijelin jer je ovakva interakcija važna za dugoročnu stabilnost aksona (26). MAG inhibira regeneraciju aksona nakon ozljede te s visokim afinitetom veže moždane gangliozide GD1a i GT1b. Navedeni gangliozidi nose MAG vezujuću terminalnu sekvencu NeuAcal-3Galp3-3GalNAc (27).

MAG inhibicija regeneracije aksona posredovana je složenim gangliozidima (28). MAG sadrži receptore na aksonima koji vežu signalne molekule pri čemu se inhibira rast aksona. Istraživanja su pokazala da je MAG inhibicija izrastanja aksona iz neurona cerebeluma u potpunosti ovisna o gangliozidima, dok su neuroni hipokampusa djelomično ovisni o gangliozidima (29).

Kompleksni gangliozidi su nužno potrebni za dugoročno preživljavanje aksona (30). Gubitak gangliozida dovodi do paraplegije u ljudi. Modeliranje gangliozidnih struktura na životinjskim modelima i na stanicama *in vitro* umanjuje inhibiciju i povećava ishode nakon ozljede aksona. Poznavanje gangliozida mozga dovodi do boljeg razumijevanja glikoznanosti u patologiji i fiziologiji (31).

1.3. Demijelinizacijske bolesti

Postoji velik broj demijelinizacijskih bolesti koje pogađaju CNS i PNS te su raznolike etiologije. Mogu postojati kao genetičke bolesti, metaboličke, pa čak i kao infektivne i autoimune bolesti (32).

1.3.1. Multipla skleroza

Multipla skleroza (engl. *multiple sclerosis*, MS) je bolest koja je karakterizirana degenerativnim gubitkom aksona i upalnom mijelinolizom – neurološkim stanjem koje uključuje oštećenje mijelinske ovojnice na živčanim stanicama (33). Više od 300 000 Amerikanaca pogođeno je ovom bolešću, dok se u više od 200 mladih odraslih osoba dijagnosticira tjedno. U prosjeku, polovica bolesnika s MS-om razvija progresivnu neurodegeneraciju (33).

MS je najraširenija od svih demijelinizacijskih bolesti. Simptomi bolesti različiti su kod svakoga pacijenta. Pojavljuje se gubitak funkcija kao što su slabost u mišićima, gubitak ravnoteže, sljepoća, nerazgovijetan govor i poremećaj hoda. Rani dijagnostički kriteriji uključuju Lhermitteov znak (fleksija vrata) i Uthoffov fenomen (pogoršanje simptoma ovisno o temperaturi) (34). Proces demijelinizacije počinje na početku bolesti, dolazi do promjene u sastavu lipida u mijelinskoj membrani što dovodi do gubitka mijelina. Bez vitalnog mijelina središnji živčani sustav ne može pravilno funkcionirati. Tijekom MS-a sadržaj kolesterola mijelina fluktuira te tako može utjecati na lipidni profil mikrodomena u membranama (34).

Rani gubitak MAG-a u MS-u govori da bi mogao imati važnu ulogu u molekularnoj patogenezi (35). Gubitak MAG-a karakterističan je za patologiju umiruće oligodendroglije koja se javlja kod nekih MS bolesnika (35). Gubitak MAG-a povezan je s djelovanjem neutralne proteaze koja je vezana za mijelin. Ona cijepa MAG na dužinu od 90 kDa, tzv.

dMAG. Gubitak MAG-a dovodi do degeneracije aksona koja uzrokuje neurološke deficite u MS-u (36).

Liječenje MS-a uključuje modulaciju imunološkog odgovora s lijekovima. Modulacija ionskog kanala pokazala se boljom alternativom za liječenje MS-a (37). Blokada kalijevih kanala omogućuje povećanje podražljivosti aksona, ali nažalost, može pogoršati pozitivne simptome MS-a (38).

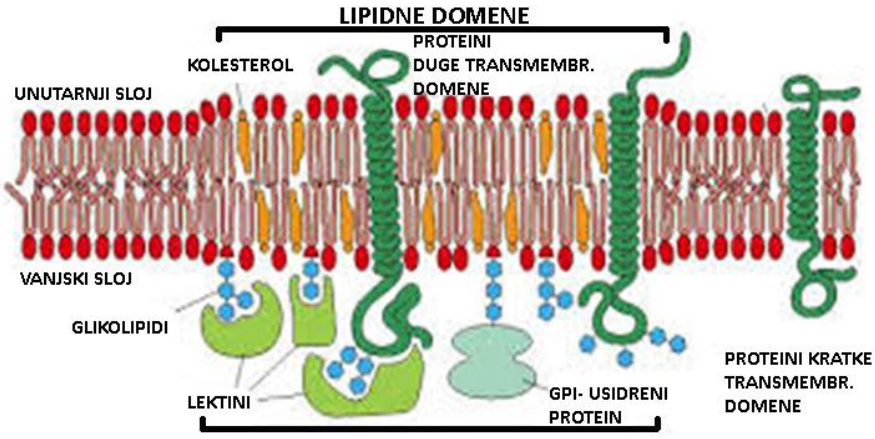
1.3.2. Leukodistrofije

Leukodistrofije su genetički poremećaji koje karakterizira selektivno zahvaćanje bijele tvari središnjeg živčanog sustava (39). One se mogu pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi te su mnoge degenerativne prirode. Pojedine leukodistrofije narušavaju funkciju bijele tvari. Klinički tijek bolesti progresivan je, a s vremenom se klinički tijek može i poboljšati. Za progresivne leukodistrofije ne postoji efikasno liječenje te su često takve bolesti smrtonosne (40). Neke leukodistrofije uzrokovane su defektima u drugim komponentama bijele tvari središnjeg živčanog sustava (41).

1.4. Lipidne splavi

Već prije 40 godina model tekućeg mozaika Singera i Nicolsona omogućio je bolje razumijevanje strukture stanične membrane (42). U modelu tekućeg mozaika membranski proteini promatraju se poput ledenjaka koji plutaju u moru lipida. Međutim, danas se zna da unutar dvostruke ovojnice postoji organizirana struktura proteina i lipida. Lipidne strukture unutar membrane nazivaju se lipidnim splavima (43). Lipidne splavi ili mikrodomene stanične membrane lokalizirane su regije koje sadrže kolesterol i glikosfingolipide u staničnoj membrani. Bočni lanci masnih kiselina fosfolipida imaju težnju da budu zasićeniji od lanaca masnih kiselina koji se nalaze u okolnoj membrani. To ukazuje na blisko pakiranje sa zasićenim lancima sfingolipida. Zbog prisutnosti velike količine kolesterola, formira se domena koja predstavlja manju fluidnost od okolne membrane. Takva uređenost membrane omogućila je lipidnim splavima netopljivost u detergentima (44). Proučavajući veličinu lipidnih splavi uočavaju se manja ulegnuća stanične membrane koje nazivamo kaveole (45).

One sadrže visok udio glikosfingolipida i kolesterola i razlikuju se po svome sastavu od lipidnih splavi. Sadrže protein koji veže kolesterol-kaveolin-1 (45) koji omogućuje stabilizaciju strukture. Kaveole imaju sposobnost prenositi molekule preko endotelnih stanica (46). Tvore jedinstveni unutarstanični i izvanstanični dio na površini stanica, također imaju sposobnost uvoziti molekule te ih isporučivati na različita mjesta unutar stanice. Kaveole predstavljaju cijeli membranski sustav s mnogobrojnim funkcijama koje su bitne za održavanje stanica (47).



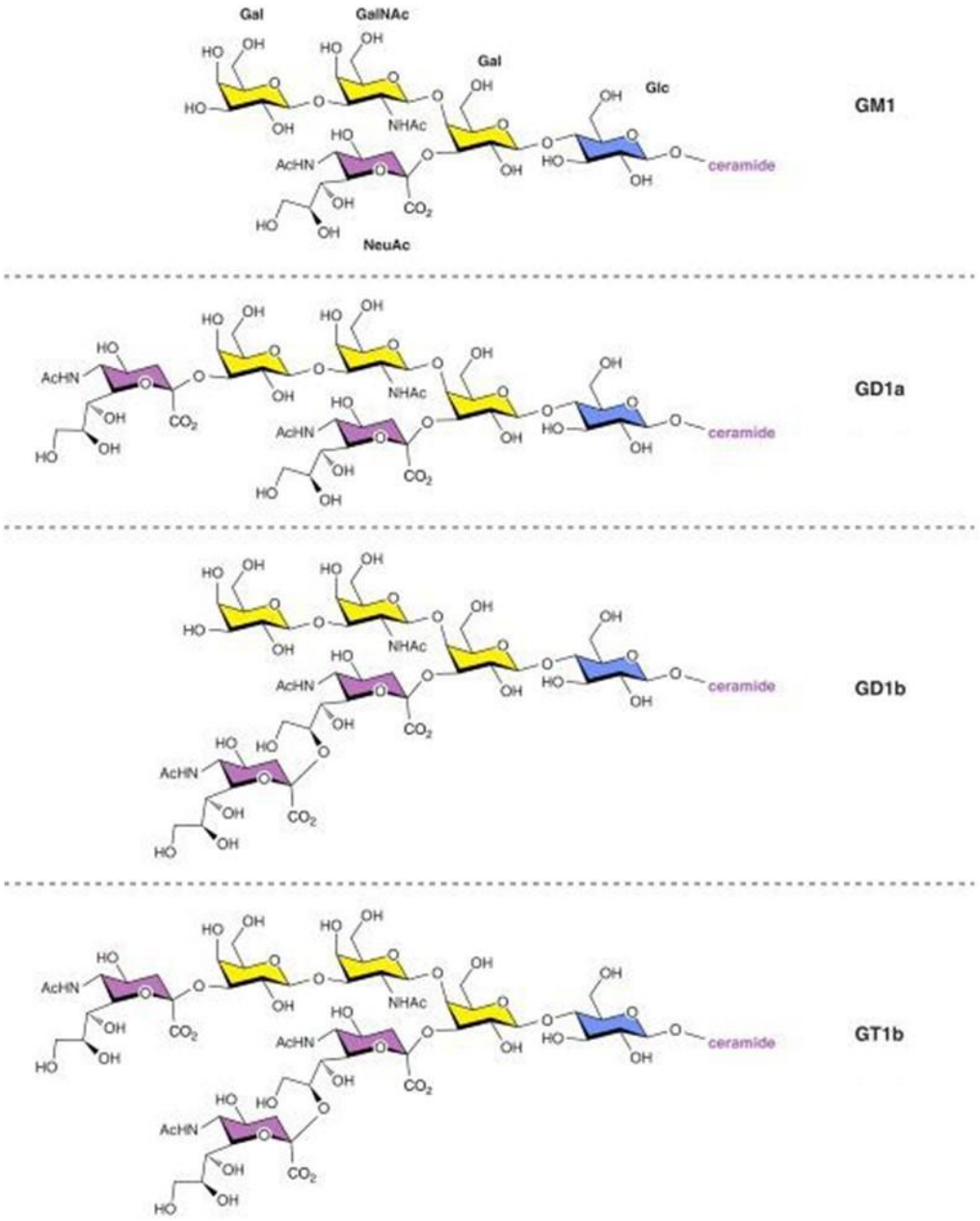
Slika 2. Prikaz strukture lipidnih splavi (slika preuzeta iz rada autora Tauber U.C., Forste-Wiliams K. i prilagođena (48))

Visoka organiziranost lipida unutar lipidnih splavi dovodi do bolje organiziranosti membranskih proteina (43). S izvanstanične strane lipidnih splavi nalaze se proteini s glikozilfosfatidil-inozitolskim sidrima (GPI-sidro), dok s citoplazmatske strane lipidnih splavi proteini imaju miristilna ili palmitoilna sidra. Dosad je opisano više od 200 proteina povezanih sa splavima. Flotilin je jedan specifičan protein za splavi koji omogućuje stabilnost mikrodomena (49) (50). Mnogi proteini sudjeluju u prijenosu signala te tako omogućuju uspješnu signalizaciju unutar membrane (49). Neki od tih proteina su: G-protein receptora čimbenika rasta, protein kinaza C, mitogenima aktivirana protein kinaza (MAPK) i mnogi drugi proteini. Lipidne splavi zaslužne su za izgradnju membrane, prijenos signala B i T stanica te signalizaciju ceramid/sfingomijelin za rast, smrt i preživljavanje stanica. Lipidne splavi uključene su u mehanizme nastanka patoloških stanja kao što su anafilaksa, Parkinsonova bolest, hipertenzija, šećerna bolest, bakterijske i virusne infekcije te mnoga druga stanja (51).

1.5. Gangliozidi

Gangliozidi su glikosfingolipidi koji sadrže sialinsku kiselinu te su najzastupljeniji u živčanom sustavu. Heterogenost i raznolikost struktura u njihovim ugljikohidratnim lancima karakterističan su zaštitni znak tih lipida. Otkrio ih je Ernst Klenk 1930-ih godina prilikom analize postmortenskih tkiva mozga pacijenata s Tay-Sachsovom bolešću, fatalnim infantilnim oblikom amaurotskog idiotizma (52). To je nasljedna bolest koju karakterizira visok broj lipidnih stanica u živčanom sustavu i visceralnim organima, mentalna retardacija i oštećen vid ili sljepoća (53). Gangliozidi se primarno sintetiziraju u endoplazmatskom retikulumu i dalje modificiraju u Golgijevom aparatu uzastopnim dodavanjem dijelova ugljikohidrata na postojeću molekulu lipida akceptora. Ta reakcija katalizirana je nizom specifičnih glikoziltransferaza (54).

Gangliozidi imaju funkciju u staničnom prepoznavanju, adheziji i prijenosu signala pomoću specifičnih površinskih mikrodomena tzv. kaveolama, lipidnim splavima ili mikrodomenama obogaćenim glikosfingolipidima (55). Također, imaju važnu ulogu u modulaciji intracelularne i intranuklearne homeostaze kalcija i ostalih staničnih funkcija. Biološka važnost gangliozida otkrivena je analizama genetički modificiranih miševa koji imaju nedostatak enzima za sintazu gangliozida. Kod tih miševa došlo je do selektivne degeneracije Cortijevog organa te poremećaja pažnje što ukazuje na njihovu ulogu u održavanju neuropsihološke ravnoteže (56).



Slika 3. Prikaz kompleksnih gangliozida (slika preuzeta iz rada autora Schnaar, R. L., Gerardy-Schahn, R., Hildebrandt, H. i prilagođena (57))

U mozgu odraslih sisavaca dominiraju četiri vrste gangliozida: GM1, GD1a, GD1b, GT1b (58). Ta četiri kompleksna gangliozida predstavljaju čak 97 % gangliozida mozga odrasle osobe. Ti gangliozidi dijele identičnu neutralnu glikansku jezgru (Gal β1-3 GalNAc β1-4 Gal β1-4 Glc β1-1 Cer). Razlikuju se po broju sialinskih kiselina koje su vezane na terminalne i unutarnje galaktozne ostatke (59).

Gangliozidi su nejednako distribuirani u mozgu (60). GM1 nalazimo u bijeloj tvari mozga, GD1a nalazi se u sivoj tvari mozga, dok GT1b i GD1b nalazimo i u bijeloj i u sivoj

tvari mozga. U mozgu u ranome razvoju prevladavaju jednostavne strukture gangliozida, GM3 i GD3. Četrnaestog dana embrionalnog razvoja kod štakora, GM3 i GD3 predstavljaju gotovo sve gangliozide u mozgu. Već dvadesetog dana embrionalnog razvoja počinju se sintetizirati složeniji gangliozidi. Pri rođenju kompleksni gangliozidi GD1a i GT1b zauzimaju svoje mjesto u mozgu (60). Prilikom sazrijevanja mozga u odrasloj dobi, ekspresija GM1 i GD1b raste sve dok četiri glavna kompleksna gangliozida ne počnu predstavljati većinu gangliozida u mozgu sisavaca. Koncentracija gangliozida naglo se povećava prilikom sazrijevanja mozga u odrasloj dobi. Njihova gustoća povećava se tijekom posljednjeg tromjesečja fetalnog razvoja te se nastavlja povećavati prve dvije godine života (60). Možemo zaključiti da se povećava složenost strukture gangliozida i gustoća kako mozak sazrijeva i razvija se.

2. HIPOTEZA

Sastav lipidnih splavi na mijelinskim membranama mijenjat će se tijekom procesa mijelinizacije u mozgovima miševa divljeg tipa (engl. *wild type*, WT) C57BI6 različite starosti.

3. CILJEVI

- Izolirati lipidne splavi iz mozgova miševa divljeg tipa (engl. *wild type*, WT) C57BI6 prije (5 dana starosti), tijekom (15 dana starosti) i nakon završenog procesa mijelinizacije (30 dana starosti).
- Utvrditi kako se pojavljuju markeri mijelina u odnosu na kompleksne gangliozide u lipidnim splavima.

4. MATERIJALI I METODE

Rad je napravljen u sklopu projekta „Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi“ (IP-09-2014-2324). Za rad s navedenim životinjama dobiveno je dopuštenje etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek.

4.1. Materijali

U istraživanje su uključeni miševi divljeg tipa C57BI6 (engl. *wild type*, WT) različite starosti (5 dana, 15 dana i 30 dana starosti) koji se koriste za izolaciju lipidnih splavi. Po 3 miša iz svake skupine, odnosno njihova moždana tkiva korištena su za analizu kako bi se potvrdili rezultati.

4.2. Kemikalije

- NaOH (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- AE pufer (Qiagen, Hilden, Germany)
- SYBR Safe (Invitrogen-Carlsbad CA, USA)
- Izofluran (Forane, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, USA)
- Homogenizacijski pufer:
    - Tris (Fisher Bioreagents, Hampton, New Hampshire, USA)
    - NaCl (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)
    - $MgCl_2$ (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)
    - $CaCl_2$ (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Inhibitori enzimatske aktivnosti:
    - PMSF (Acros Organics, New Jersey, USA)
    - NaF (Acros Organics, New Jersey, USA)
    - Na_3VO_4 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
    - Smjesa inhibitora: Complete Mini EDTA-free (Roche, Basel, Švicarska)
- D (+) – saharoza (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) pripremljena u 1x PBS puferu

- Fosfatni pufer, PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM NaH_2PO_4, 2 mM KH_2PO_4)
    - NaCl (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
    - KCl (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
    - NaH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
    - KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- BSA (engl. *bovine serum albumine*, BSA) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- Tween-20 (Fisher Bioreagents, Hampton, New Hampshire, USA)
- Bradfordov reagens (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- Kolesterol reagens (Greiner Diagnostics, Bahlingen, Germany)
- Kolesterol standard (Greiner Diagnostics, Bahlingen, Germany)
- Leammlijev pufer za uzorke (Bio-Rad, Hercules CA, USA)
- Proteinski standard (Invitrogen-Carlsbad CA, USA)
- Pufer za elektrofozeru:
    - 25 mM Tris (Invitrogen-Carlsbad CA, USA)
    - 192 mM Glicin (Invitrogen-Carlsbad CA, USA)
    - 0,1 % SDS (engl. *sodium dodecyl sulfate*) (Acros Organis, New Jersey, USA)
- Pufer za prijenos:
    - 184 mM Tris (Invitrogen-Carlsbad CA, USA)
    - 140 mM Glicin (Invitrogen-Carlsbad CA, USA)
    - 20 % Metanol (CH_3OH) (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Primarna protutijela:
    - mišji anti-flotilin (BD Biosciences, San Diego USA)
    - mišji anti-transferin (Invitrogen-Carlsbad CA, USA)
    - mišji anti-MAG (Chemicon, Temecula CA, USA)
    - mišji anti-MBP (Chemicon, Temecula CA, USA)
    - GAPDH konjugiran s enzimom peroksidazom hrena (Proteintech, Manchester, UK)
- Sekundarno protutijelo:
    - protumišje IgG protutijelo konjugirano s enzimom peroksidazom hrena (Santa Cruz Biotechnologa, Texas, USA)

- Kemiluminiscentni supstrat (Amersham BioSciences, Buckinghamshire, UK)

4.3. Metode

Prvo je učinjena genotipizacija miševa radi potvrde genotipa. DNA je izoliran metodom s NaOH. Prije eutanazije miševi su bili duboko anestezirani, a eutanazija je provedena u skladu sa svim etičkim principima. Uzorci su izuzeti i direktno smrznuti u tekućem dušiku, a nakon toga su pohranjeni na -80 °C do analize. Iz smrznutih uzoraka napravljena je izolacija lipidnih splavi ultracentrifugiranjem u gradijentu saharoze. Sastav dobivenih frakcija određen je Western blot metodom korištenjem markera splavi i nesplavi. Rezultati su analizirani u računalnom programu *ImageJ* (*Fiji 101*) (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, SAD).

4.3.1. Genotipizacija miševa

DNA je izoliran korištenjem visokih koncentracija natrijevog hidroksida (NaOH) (50 mM). NaOH se dodaje na uzorke te se inkubiraju 30 minuta na 95 °C. Nakon toga dodaje se AE pufer. Potom je korištena metoda lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). Odsječci DNA umnoženi su korištenjem specifičnih početnica. Korištene početnice su SA269 (GCA AGA CGT TGT CAT AGT AGT), SA270 (CAC AGT TAC ATC TAC ATG CCT) te SA271 (TCG CCT TCT TGA CGA GTT CTT CTG AG). Odsječci DNA razdvojeni su elektroforezom u agaroznom gelu u koji je dodana boja *Syber Safe* i vizualizirani su pod UV svjetlom.

4.3.2. Žrtvovanje životinja

Miševi su anestezirani izofluranom. Uzorci su izuzeti i direktno smrznuti u tekućem dušiku. Nakon toga su pohranjeni na -80 °C do analize.

4.3.3. Izolacija lipidnih splavi

Za izolaciju lipidnih splavi iz smrznutih uzoraka mozgova izolirano je moždano deblo zbog najvećeg sadržaja mijelina. Postupak izolacije lipidnih splavi razvijen je u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta Osijek te je u postupku objave.

Cijeli postupak izolacije lipidnih splavi provodi se na ledu.

Postupak izolacije lipidnih splavi:

- prirediti homogenizacijski pufer (50 mM Tris Baza, 150 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM PMSF, 5 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4, 1x smjesa inhibitora proteaza);
- odvagati masu moždanoga tkiva (Tablica 1, 2, 3);
- moždano tkivo prebaciti u Whatmanov stakleni homogenizator s tijesnim klipom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- dodati 750 µL homogenizacijskog pufera (potrebno je da tkivo potone na dno homogenizatora);
- potiskivanjem klipa homogenatora homogenizirati uzorak, nakon toga klip ukloniti te dodati preostalih 450 µL homogenizacijskog pufera;
- nastalu otopinu izmiješati te ju prebaciti u tubicu od 2 mL koja se nalazi na ledu;
- nakon mehaničke homogenizacije prirediti hladnu kupelj za hlađenje uzoraka prilikom ultrazvučne homogenizacije;
- uzorak sonicirati korištenjem Bandelin Sonopuls 2070 sonikatora (Bandelin, Berlin, Germany) u ukupnom trajanju od 20 sekundi;
- homogenat zatim centrifugirati u S9 frakciju 20 minuta na 4 °C (Rotina 420R, Hettich, Tuttlingen, Germany);
- nakon centrifugiranja uzeti supernatant, a pellet odbaciti (pellet sadrži jezgre i mitohondrije koji nisu homogenizirani);
- zatim u tubice staviti jednaku količinu 80 % saharoze i supernatanta te dobro izmiješati;

- dobiveni uzorak nadslojiti s otopinom 35 % saharoze, a zatim i s otopinom 5 % saharoze;
- tubicama se izmjeri masa te im se masa izjednači;
- na kraju slijedi centrifugiranje uzoraka u ultracentrifugi (Optima XPN-100 Ultracentrifuge, Beckman Coulter CA, USA) na 200 000 g 20 h na 4 °C;
- nakon ultracentrifugiranja skupljeno je 11 frakcija;
- specifični proteinski biljezi splavi i nesplavi određeni su metodom Western blot.

Tablica 1. Prikaz mase moždanog debla miša starog 5 dana

5 dana	Masa tkiva (mg)	Masa tube (g)	Broj tube
WT1	46	15,15	1
WT2	41	15,19	2
WT3	32	15,20	3

Tablica 2. Prikaz mase moždanog debla miša starog 15 dana

15 dana	Masa tkiva (mg)	Masa tube (g)	Broj tube
WT1	55	15,21	1
WT2	54	15,21	2
WT3	49	15,22	3

Tablica 3. Prikaz mase moždanog debla miša starog 30 dana

30 dana	Masa tkiva (mg)	Masa tube (g)	Broj tube
WT1	51	15,11	1
WT2	48	15,23	2
WT7	45	15,20	3

4.3.4. Određivanje koncentracije proteina prema Bradfordu

Budući da se u skupljenim frakcijama nakon izolacije lipidnih splavi nalaze proteini nepoznate koncentracije, koncentracija proteina određena je metodom prema Bradfordu.

Princip metode je obojenje otopljenih proteina s bojom Coomasie Brilliant Blue G-250 (CBB). Boja je otopljena u smjesi metanola i fosforne kiseline te se naziva Bradfordov reagens. Dolazi do vezanja anionske boje za amino skupine proteina što se vidi kao promjena boje reagensa (smeđa boja u plavu boju) i pojavom apsorpcijskog maksimuma pri 595 nm. Donji prag osjetljivosti iznosi 0,5 μg/mL proteina (61).

Za određivanje proteina korišten je komercijalno dostupan Bradfordov reagens. Protokol određivanja koncentracije proteina prema Bradfordu:

- Priprema slijepe probe koja sadrži sve što i uzorak, osim proteina, kako bismo oduzimanjem njenog signala dobili koncentraciju proteina u uzorcima. Za slijepu probu u tubicu odpipetirati 50 μL destilirane vode.
- Priprema standardnih otopina: u duplikatu pripremiti četiri otopine od stock otopine BSA (1 mg/mL) ukupnog volumena 50 μL sljedećih koncentracija:
    - standard 1 : 20 μg/mL
    - standard 2 : 100 μg/mL
    - standard 3 : 200 μg/mL
    - standard 4 : 1000 μg/mL
- Određivanje proteina nepoznate koncentracije također je rađeno u duplikatu, a uzorci su korišteni direktno iz izolata bez razrjeđivanja po 10 μL.
- U mikrotitarske jažice odpipetirano je 200 μL Bradfordova reagensa u koji su zatim dodani slijepa proba, standardne otopine i uzorci. Nakon inkubacije 5 − 10 minuta na sobnoj temperaturi pomoću spektrofotometra (iMark Microplate Reader, Bio-Rad, Hercules CA, USA) izmjerena je apsorbancija pri 595 nm.
- Koncentracije proteina u uzorcima izračunate su unošenjem apsorbancije uzoraka u jednadžbu baždarnog pravca. Pravac je nacrtan u koordinativnom sustavu pri čemu su na apscisu nanesene vrijednosti koncentracija proteina, a na ordinati vrijednosti apsorbancija.

4.3.5. Određivanje koncentracije kolesterola

Budući da se lipidne splavi većim dijelom sastoje od kolesterola, njegova bi koncentracija trebala biti velika ukoliko su u frakcijama izolirane lipidne splavi. Koncentraciju kolesterola odredili smo spektrofotometrijski. Reagens sadržava enzime koji

hidroliziraju esterificirani kolesterol i zajedno sa slobodnim plazmatskim kolesterolom prevode ga postupno u produkte koji se mogu mjeriti spektrofotometrijski (62).

Protokol određivanja koncentracije kolesterola:

- Priprema slijepe probe koja sadrži sve što i uzorak, osim kolesterola, kako bismo oduzimanjem njenog signala dobili koncentraciju kolesterola u uzorcima. Za slijepu probu u mikrotitarske jažice odpipetirati u duplikatu 200 µL reagensa.
- Priprema standarda: u mikrotitarske jažice odpipetirati u duplikatu 200 µL reagensa i 2 µL standarda.
- Određivanje kolesterola nepoznate koncentracije također je rađeno u duplikatu, a uzorci su direktno korišteni iz izolata bez razrjeđivanja po 10 µL.
- U mikrotitarske jažice odpipetirano je 200 µL reagensa u koji su zatim dodani slijepa proba, standardne otopine i uzorci. Nakon inkubacije 5 − 10 minuta na sobnoj temperaturi pomoću spektrofotometra (iMark Microplate, Bio-Rad, Hercules CA, USA) izmjerena je apsorbancija pri 490 nm.
- Prema navedenoj formuli izračunata je koncentracija kolesterola u uzorcima:

$$C_{uz} = \frac{A_{uz}}{A_{st}} \times C_{st}$$

4.3.6. Western blot analiza proteina flotilina, transferina, MAG-a i MBP-a u lipidnim splavima moždanog debla

Western blot metodom analizirani su markeri mijelina u odnosu na marker splavi i marker ostatka membrane kako bismo utvrdili prisutnost lipidnih splavi u uzorcima moždanog debla.

Prema izmjerenoj koncentraciji proteina određen je volumen uzorka koji se pomiješa s puferom za uzorke. Smjesa pufera za uzorke i uzorci inkubirani su 5 minuta na 95 °C na grijaćem bloku (Thermo mixer compact, Eppendorf, Hamburg, Germany). Poliakrilamidni gel smješten je u kadicu za elektroforezu (Mini gel tank; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Uzorci i proteinski standard (See Blue Plus 2 Pre-staind Protein Standard) naneseni su na gel te je elektroforeza vožena u puferu za elektroforezu. Proteini se razdvajaju elektroforezom u trajanju od jednog sata i trideset minuta (gornji sabijajući gel 60 V, donji razdvajajući gel 100 − 120 V). Nakon završetka elektroforeze proteina, gel se izvadi iz kalupa te se prenese u pufer za prijenos da se ispere od soli i detergenta.

Polivinilidendifluorid (PVDF) membrana (Immobilon-P PVDF Membrane, Waltham, Massachusetts, USA) aktivira se inkubacijom s metanolom na 30 sekundi. Potom se ispire mlazom destilirane vode sve dok ne izgubi masni sjaj te se prenosi u pufer za prijenos. Sustav za prijenos slaže se prema uputama proizvođača (Mini blot module, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) u nekoliko koraka: na katodu natopljenu puferom za prijenos nanosi se puferom natopljena spužva, zatim se na spužvu stavlja filtar-papir, poliakrilamidni gel, polivinilidendifluorid membrana, filtar-papir, spužva te anoda (63).

Prijenos na membranu proveden je pri naponu 20 – 25 V u trajanju od jednog sata i trideset minuta. Nakon toga membrana je inkubirana u otopini za blokiranje 3 % BSA pripremljena u 0,1 % Tween-20 u puferu 1xPBST u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi. Uslijedila je inkubacija membrane s primarnim protutijelima preko noći pri 4 °C na rotatoru (Bio RS-24, Biosan, Riga, Latvija). Korištena su primarna protutijela na flotilin (korišteno u razrjeđenju 1 : 2000), transferin (korišteno u razrjeđenju 1 : 2000), MAG (korišteno u razrjeđenju 1 : 500), MBP (korišteno u razrjeđenju 1 : 500). Primarna protutijela pripremljena su u otopini za blokiranje (3 % BSA u 1xPBST). Nakon toga membrane su isprane 3x10 minuta u 1xPBST-u.

Inkubacija sa sekundarnim protutijelom konjugiranim s enzimom peroksidazom hrena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi na tresilici (Rotamax 120, Heidolph, Schwabach, Germany). Korišteno je sekundarno protutijelo protumišje IgG konjugirano s HRP-om. Protutijelo je pripremljeno u otopini za blokiranje u razrjeđenju 1 : 5000. Uslijedilo je ispiranje membrane 3x10 minuta u 1xPBST-u. Nakon toga učinjeno je razvijanje s kemiluminiscentnim supstratom. Uređajem Chemidoc MP (Biorad, Hercules CA, USA) prikupljene su slike membrana uz automatski određeno vrijeme ekspozicije.

Nakon vizualizacije membrane na kojima se nalazio receptor na flotilin isprane su 3x10 minuta u 1xPBST-u. Uslijedila je inkubacija membrana s protutijelom na gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu konjugiranim s HRP-om (engl. *glyceraldehide-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH) pripremljenim u razrjeđenju 1 : 10 000 u otopini za blokiranje (3 % BSA u 1xPBST) na 4 °C preko noći na rotatoru. Nakon toga, membrane su se ispirale 3x 10 minuta u 1xPBST-u. Uslijedila je vizualizacija membrana s kemiluminiscentnim supstratom i prikupljanje slika pomoću uređaja Chemidoc MP. U računalnom programu *Fiji* učinjena je denzitometrija izražaja flotilina, transferina, MAG-a, MBP-a, GAPDH-a. Slika rezultata u TIFF digitalnom obliku unesena je u program te je dobiven grafički prikaz izražaja proteinskih vrpci. Određene su pojedinačne površine svake proteinske vrpce i dobivene su njihove vrijednosti. Rezultati su korišteni za izračun izražaja svakog od analiziranih proteina. Analiza MAG-a nije dala rezultate iz nekoliko mogućih razloga: podloga ili konjugat slabi ili neaktivni zbog starosti ili nepravilnog skladištenja, protein od interesa nije prisutan ili je prisutan u malim količinama te loš prijenos proteina.

4.3.7. Statistička analiza

Statistička analiza izradila se pomoću računalnog programa *IBM SPSS Statistics v22* (Quest Software Inc., Aliso Viejo, CA, SAD). Numerički podatci opisani su standardnom devijacijom i aritmetičkom sredinom u slučaju normalne raspodjele, a u ostalim slučajevima opisani su granicama interkvartilnog raspona i medijanom. Razlike među distribucijama dviju nezavisnih neprekidnih slučajnih varijabli analizirane su Mann-Whitney-Wilcoxonovim testom. Razina značajnosti određena je s $p < 0,05$. Za više nezavisnih uzoraka učinila se neparametrijska analiza − Kruskal-Wallisov test.

5. REZULTATI

5.1. Spektrofotometrijska analiza proteina u moždanom tkivu

Spektrofotometrijskom metodom analizirana je koncentracija proteina u moždanom tkivu miša divljeg tipa.

Tablica 4. Prikaz vrijednosti apsorbancija i koncentracija proteina u frakcijama uzorka moždanog debla miša starog 5 dana, 15 dana i 30 dana

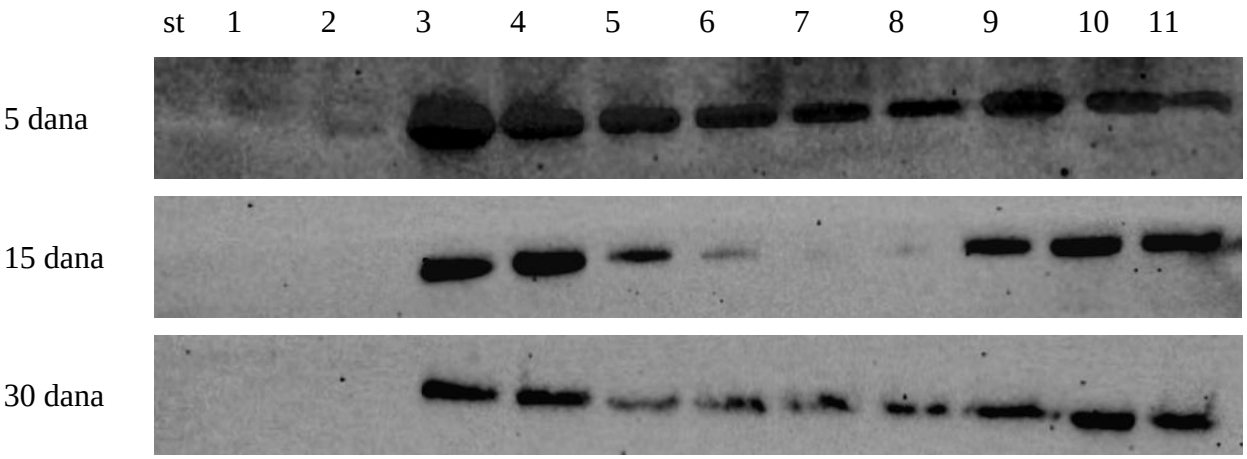
Frakcije uzorka moždanog debla	5 dana		15 dana		30 dana	
	Apsorbancija (srednja vrijednost)	Koncentracija proteina (mg/mL)	Apsorbancija (srednja vrijednost)	Koncentracija proteina (mg/mL)	Apsorbancija (srednja vrijednost)	Koncentracija proteina (mg/mL)
1	0,5050	0	0,4855	0,032855	0,4545	0,002371
2	0,5650	0,061562	0,4800	0,021418	0,4645	0,02213
3	0,5640	0,067407	0,5490	0,164899	0,5050	0,102154
4	0,6840	0,203779	0,6140	0,300062	0,6275	0,344201
5	0,7915	0,220339	0,5885	0,247037	0,6025	0,294803
6	0,6075	0	0,5980	0,266791	0,5680	0,226635
7	0,6385	0,125852	0,7015	0,482013	0,5555	0,201936
8	0,6560	0,163842	0,6435	0,361406	0,5165	0,124877
9	0,5500	0	0,6470	0,368684	0,5365	0,164394
10	0,6780	0,565167	0,9335	0,964442	0,7690	0,62379
11	0,6330	0,816482	0,5980	0,266791	0,6420	0,372851

5.2. Western blot analiza proteina flotilina, transferina, MBP-a i GAPDH-a u moždanom tkivu miša divljeg tipa

Western blot metodom analiziran je sadržaj proteina flotilina, transferina, MBP-a i GAPDH-a u moždanom tkivu, odnosno u uzorcima moždanog debla. Rezultati su prikazani za svaki protein posebno te je prikazana usporedba starosti moždanog tkiva za svaki protein. Analiza MAG-a nije dala rezultate.

5.2.1. Analiza izražaja flotilina

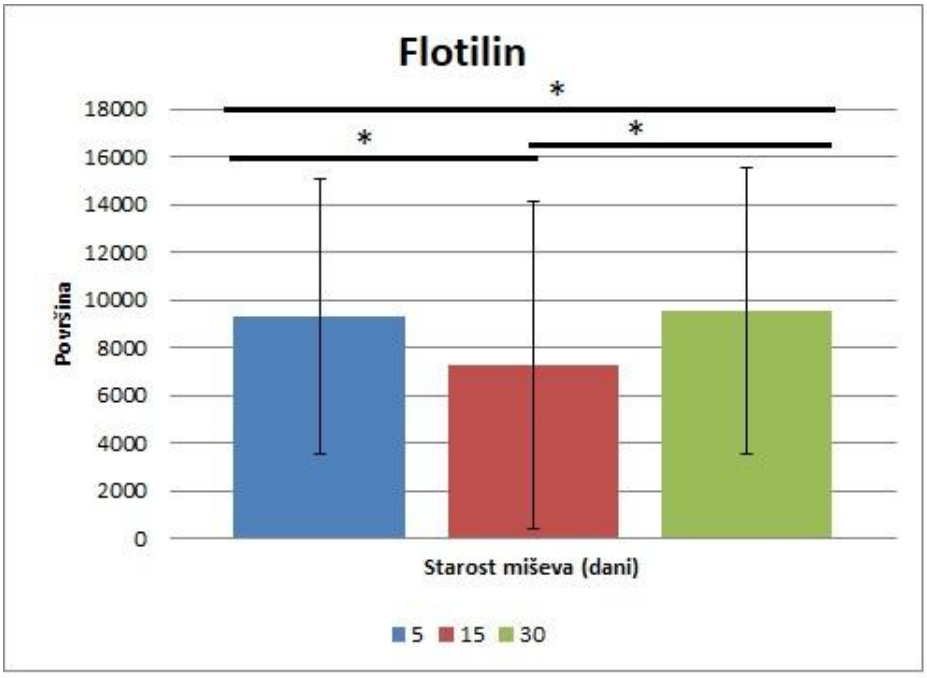
Razlike među distribucijama dviju nezavisnih neprekidnih slučajnih varijabli analizirane su Mann-Whitney-Wilcoxonovim testom. Za više nezavisnih uzoraka učinila se neparametrijska analiza Kruskal-Wallisovim testom. Testirana je izraženost markera splavi flotilina u moždanom tkivu miševa starih 5 dana, 15 dana i 30 dana. Usporedbom frakcija 5 dana (X=9319,593, SD=5753,028) naprema 15 dana (X=7259,453, SD=6886,514) naprema 30 dana (X=9554,464, SD=5980,584) dobivena je statistički značajna razlika (p=0,021). Usporedbom starosti unutar pojedine frakcije dobiveno je da frakcije 1 − 2 nisu statistički značajne, dok frakcije 3 − 11 imaju statistički značajnu razliku (p=0,018). Na Slici 5 rezultati su grafički prikazani. Denzitometrijski je analizirana veličina proteina flotilina od 47 kDa (Slika 4).



Slika 4. Analiza izražaja proteina flotilina Western blot metodom moždanog tkiva starog 5 dana, 15 dana i 30 dana. st – standard, 1 - 11 označavaju broj frakcije.

Tablica 5. Denzitometrijski prikaz analize veličine proteina flotilina u moždanom deblu starom 5 dana, 15 dana i 30 dana

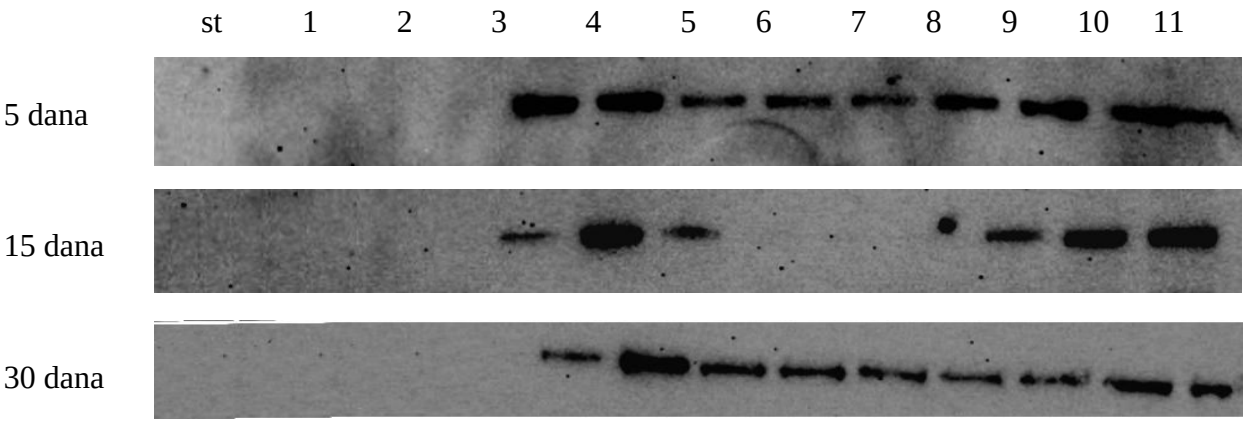
Broj frakcija	5 dana		15 dana		30 dana	
	Površina	%	površina	%	površina	%
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	19056,150	18,589	12004,210	15,033	15810,740	15,044
4	15064,620	14,695	12924,910	16,186	14351,150	13,655
5	10059,450	9,813	6037,912	7,561	6116,376	5,820
6	12039,280	11,744	2620,912	3,282	7977,619	7,591
7	11517,210	11,235	1351,790	1,693	8417,619	8,009
8	7344,326	7,164	1447,912	1,813	7856,619	7,475
9	10395,150	10,140	9075,912	11,366	12592,620	11,982
10	10794,080	10,529	13892,910	17,398	17095,280	16,266
11	6245,255	6,092	20497,520	25,669	14881,080	14,159



Slika 5. Usporedba vrijednosti izražaja proteina flotilina u moždanom tkivu starom 5 dana, 15 dana i 30 dana. * označuje značajnu razliku, p=0,021

5.2.2. Analiza izražaja transferina

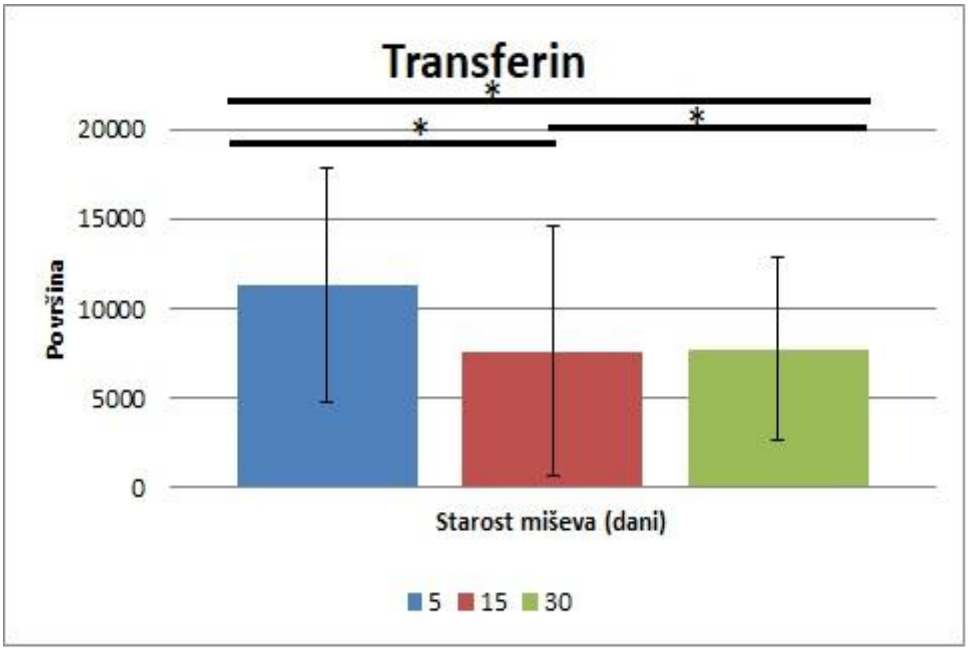
Razlike među distribucijama dviju nezavisnih neprekidnih slučajnih varijabli analizirane su Mann-Whitney-Wilcoxonovim testom. Za više nezavisnih uzoraka učinila se neparametrijska analiza Kruskal-Wallisovim testom. Testirana je izraženost markera nesplavi transferina u moždanom tkivu miševa starih 5 dana, 15 dana i 30 dana. Usporedbom frakcija 5 dana (X=11316,14, SD=6523,477) naprema 15 dana (X=7582,73, SD=6954,233) naprema 30 dana (X=7740,945, SD=5063,389) dobivena je statistički značajna razlika (p=0,021). Usporedbom starosti unutar pojedine frakcije dobiveno je da frakcije 1 − 2 nisu statistički značajne, dok frakcije 3 − 11 imaju statistički značajnu razliku (p=0,018). Na Slici 7 rezultati su grafički prikazani. Denzitometrijski je analizirana veličina proteina transferina od 85 kDa (Slika 6).



Slika 6. Analiza izražaja proteina transferina Western blot metodom moždanog tkiva starog 5 dana, 15 dana i 30 dana. st – standard, 1 - 11 označavaju broj frakcije.

Tablica 6. Denzitometrijski prikaz analize veličine proteina transferina u moždanom deblu starom 5 dana, 15 dana i 30 dana

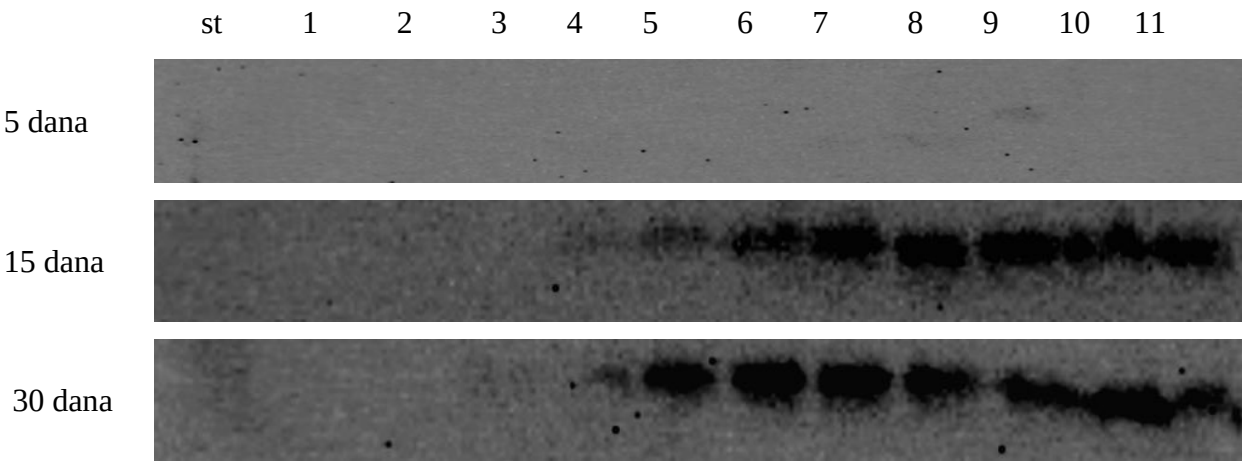
Broj frakcija	5 dana		15 dana		30 dana	
	Površina	%	površina	%	površina	%
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	13567,860	10,900	9267,962	11,111	7632,083	4,661
4	12634,740	10,150	19342,100	23,189	18806,280	11,485
5	7187,619	5,774	8594,740	10,304	10167,620	6,209
6	15787,100	12,683	1738,255	2,084	8822,033	5,388
7	18440,860	14,815	897,012	1,075	7924,033	4,839
8	10275,210	8,255	4039,326	4,843	6550,912	4,001
9	13950,280	11,207	8302,740	9,954	7762,447	4,740
10	19215,620	15,437	13949,740	16,724	10078,030	6,155
11	13418,210	10,780	17278,150	20,715	7406,962	4,523



Slika 7. Usporedba vrijednosti izražaja proteina transferina u moždanom tkivu starom 5 dana, 15 dana i 30 dana. * označuje značajnu razliku, p=0,021

5.2.3. Analiza izražaja MBP-a

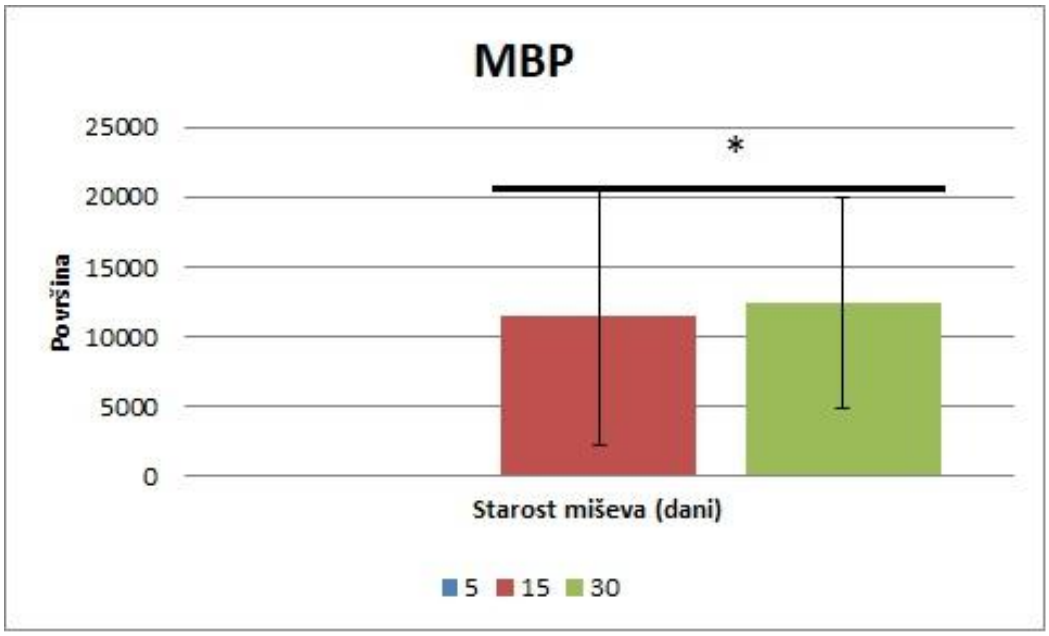
Razlike među distribucijama dviju nezavisnih neprekidnih slučajnih varijabli analizirane su Mann-Whitney-Wilcoxonovim testom. Za više nezavisnih uzoraka učinila se neparametrijska analiza Kruskal-Wallisovim testom. Testirana je izraženost proteina MBP-a u moždanom tkivu miševa starih 5 dana, 15 dana i 30 dana. Usporedbom frakcija 5 dana (X=0, SD=0) naprema 15 dana (X=11418,91, SD=9195,123) naprema 30 dana (X=12421,58, SD=7562,775) dobivena je statistički značajna razlika (p=0,021). Usporedbom starosti unutar pojedine frakcije dobiveno je da frakcije 1 − 2 nisu statistički značajne, dok frakcije 3 − 11 imaju statistički značajnu razliku (p=0,018). Na Slici 9 rezultati su grafički prikazani. Marker MBP pojavljuje se u moždanom tkivu starom 15 dana i 30 dana, dok se u tkivu starom 5 dana ne pojavljuje. Denzitometrijski je analizirana veličina proteina MBP-a od 42,5 kDa (Slika 8).



Slika 8. Analiza izražaja proteina MBP-a Western blot metodom moždanog tkiva starog 5 dana, 15 dana i 30 dana. st – standard, 1 - 11 označavaju broj frakcije.

Tablica 7. Denzitometrijski prikaz analize veličine proteina MBP-a u moždanom deblu starom 5 dana, 15 dana i 30 dana

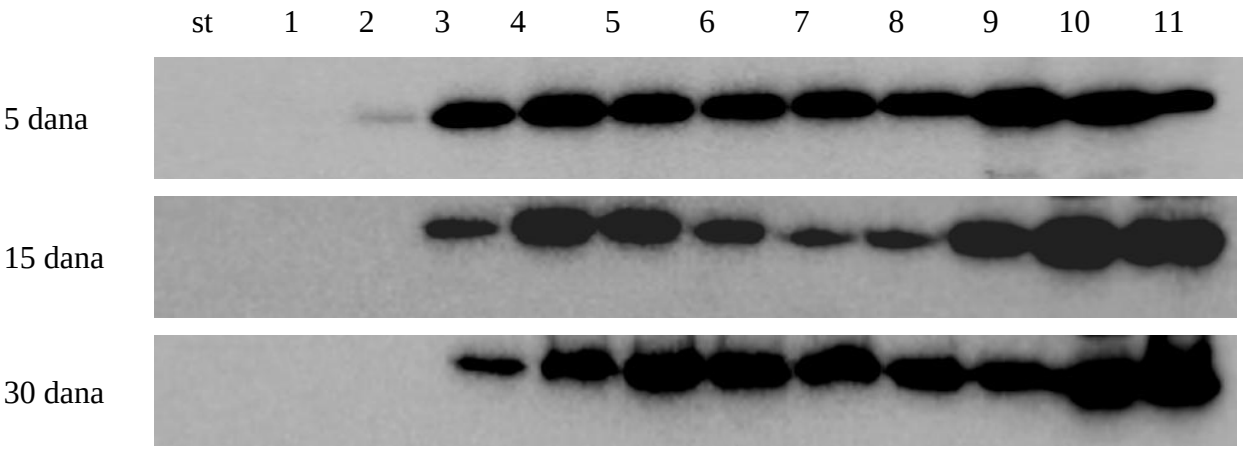
Broj frakcija	5 dana		15 dana		30 dana	
	Površina	%	površina	%	površina	%
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	5311,962	3,888
4	0	0	3466,569	2,760	9197,447	6,731
5	0	0	7477,861	5,953	18253,150	13,359
6	0	0	15975,520	12,719	18180,740	13,306
7	0	0	18734,280	14,915	18789,150	13,751
8	0	0	19300,150	15,365	17855,280	13,068
9	0	0	21569,520	17,172	16288,450	11,921
10	0	0	20984,100	16,706	19452,740	14,237
11	0	0	18100,050	14,410	13308,450	9,740



Slika 9. Usporedba vrijednosti izražaja proteina MBP-a u moždanom tkivu starom 5 dana, 15 dana i 30 dana. * označuje značajnu razliku, p=0,021

5.2.4. Analiza izražaja GAPDH-a

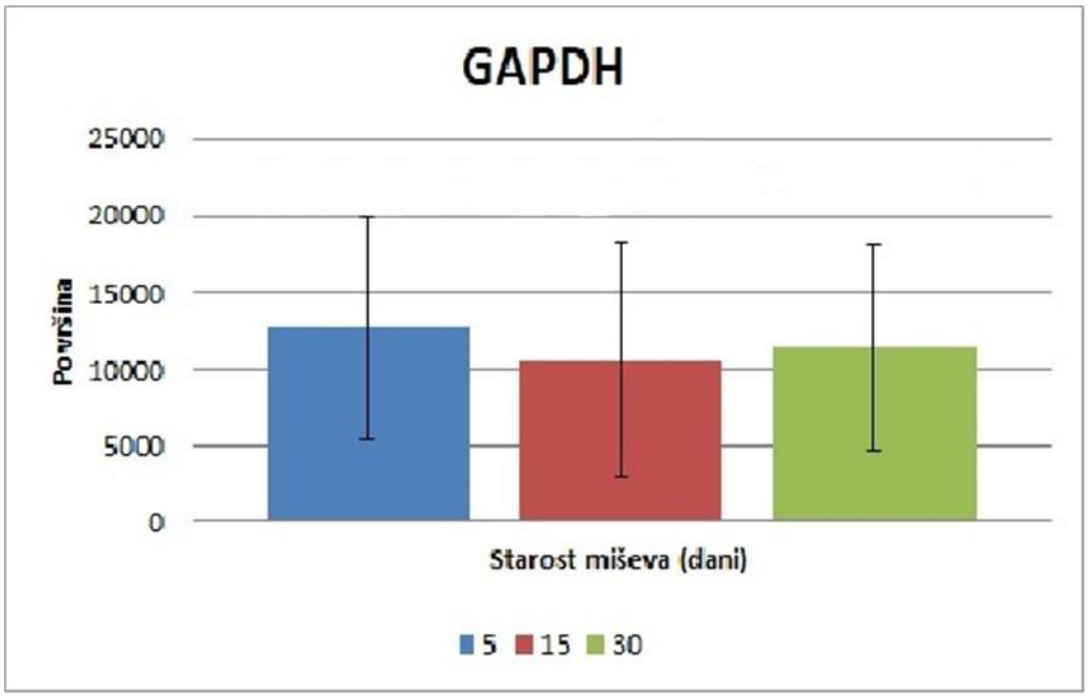
Testirana je izraženost proteina GAPDH-a u moždanom tkivu miševa starih 5 dana, 15 dana i 30 dana. Uspoređivane su frakcije tkiva starog 5 dana (X=12676,52, SD=7357,726) naprema 15 dana (X=10593,05, SD=7610,614) naprema 30 dana (X=11393,66, SD=6764,888). Na Slici 11 rezultati su grafički prikazani. Denzitometrijski je analizirana veličina proteina GAPDH-a od 37 kDa (Slika 10).



Slika 10. Analiza izražaja proteina GAPDH-a Western blot metodom moždanog tkiva starog 5 dana, 15 dana i 30 dana. st – standard, 1 - 11 označavaju broj frakcije.

Tablica 8. Denzitometrijski prikaz analize veličine proteina GAPDH-a u moždanom deblu starom 5 dana, 15 dana i 30 dana

Broj frakcija	5 dana		15 dana		30 dana	
	površina	%	površina	%	površina	%
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	12598,980	9,035	7614,861	6,535	5835,841	4,656
4	16654,500	11,944	14396,150	12,355	11676,500	9,317
5	16431,210	11,784	13126,380	11,265	15772,260	12,585
6	14853,670	10,652	9712,669	8,335	14575,010	11,629
7	15991,790	11,468	6497,497	5,576	13898,790	11,090
8	13917,260	9,981	6230,134	5,347	12284,380	9,802
9	22238,690	15,948	14399,280	12,357	12399,960	9,894
10	19716,450	14,140	21527,640	18,475	19608,620	15,646
11	7039,234	5,048	23018,900	19,755	19278,860	15,382



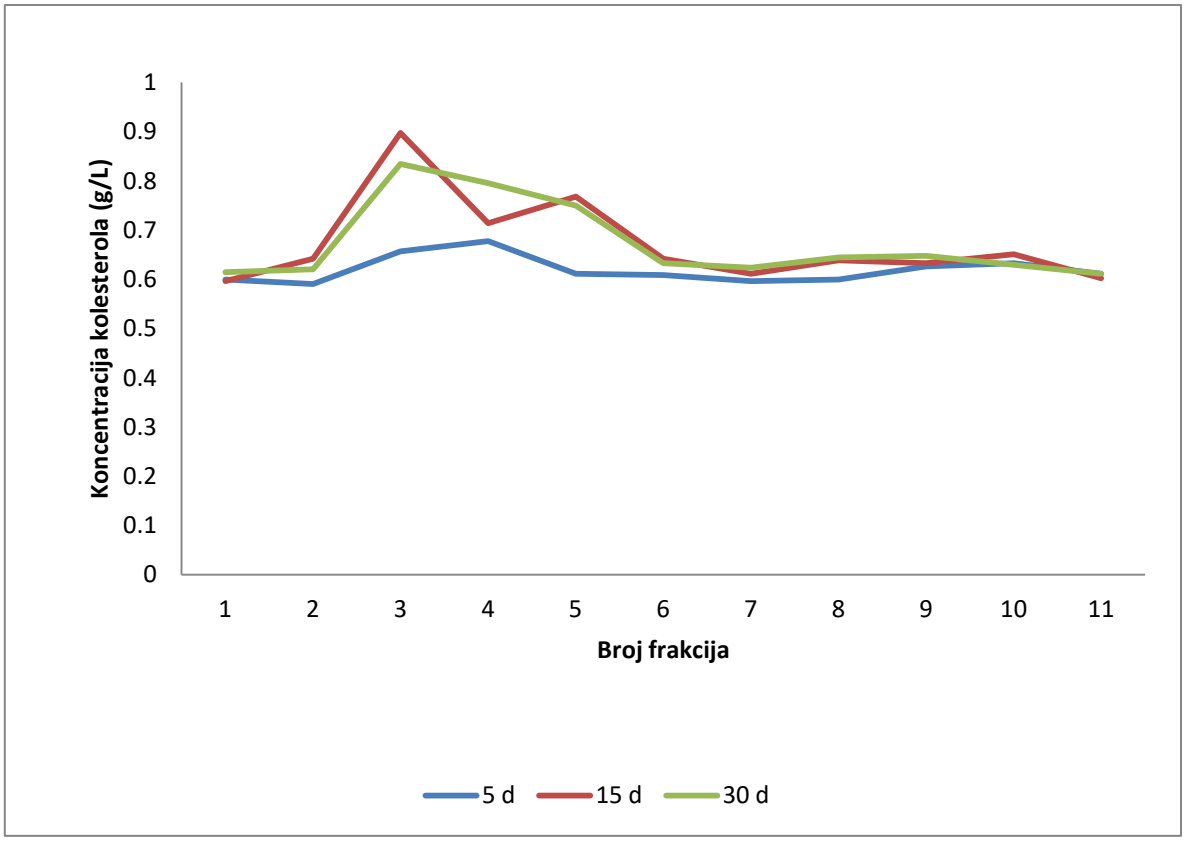
Slika 11. Usporedba vrijednosti izražaja proteina GAPDH-a u moždanom tkivu starom 5 dana, 15 dana i 30 dana

5.3. Spektrofotometrijska analiza kolesterola u moždanom tkivu

Spektrofotometrijskom metodom analizirana je koncentracija kolesterola u moždanom tkivu. Rezultati su prikazani usporednom pojedinačnih frakcija tkiva starosti 5 dana, 15 dana i 30 dana (Slika 12).

Tablica 9. Prikaz koncentracije kolesterola u moždanom deblu miševa starih 5 dana, 15 dana i 30 dana

Broj frakcija moždanog debla	Koncentracija kolesterola (g/L)		
	5 dana	15 dana	30 dana
1	0,5994	0,5964	0,6145
2	0,5904	0,6416	0,6205
3	0,6566	0,8976	0,8343
4	0,6777	0,7138	0,7952
5	0,6114	0,7681	0,7500
6	0,6084	0,6416	0,6325
7	0,5964	0,6114	0,6235
8	0,5994	0,6385	0,6446
9	0,6265	0,6325	0,6476
10	0,6325	0,6506	0,6295
11	0,6114	0,6024	0,6114



Slika 12. Koncentracija kolesterola u svim frakcijama moždanog debla miševa starih 5 dana, 15 dana i 30 dana

6. RASPRAVA

6.1. Analiza izražaja flotilina i transferina

Mikrodomene stanične membrane, odnosno lipidne splavi lokalizirane su regije koje u staničnoj membrani sadrže glikosfingolipide i kolesterol. Lipidne splavi obiluju kolesterolom te im to omogućuje formiranje domena koje predstavljaju manju fluidnost u odnosu na okolnu membranu (44). Visoka organiziranost lipida unutar lipidnih splavi dovodi do bolje organiziranosti membranskih proteina. Proteini sudjeluju u prijenosu signala te omogućuju uspješnu signalizaciju unutar membrane (49). Specifični marker splavi je protein flotilin (Flot), dok je marker nesplavi transferin (TfR). Flotilin je uključen u nekoliko staničnih procesa. Aktivno sudjeluje u signalnim putovima kao što je stanična adhezija i migracija, signaliziranje receptorske tirozin kinaze te MAP kinaze. Transferin je lokaliziran u različitim tkivima. Primarna mu je zadaća opskrba stanice željezom, a također sudjeluje i u staničnoj signalizaciji (64) (65).

Uloga lipidnih splavi u patogenezi poremećaja kod ljudi dovela je do sve većeg interesa za istraživanje dinamike lipidnih splavi. Mnogi su izazovi pri izolaciji lipidnih splavi, pri čemu poteškoću predstavlja odvajanje od velikih membrana. Membrane koje su obogaćene kolesterolom i sfingomijelinom izoliraju se upotrebom neionskog detergenta Triton X-100 (Tx-100). Tx-100 uzrokuje preraspodjelu gangliozida te zbog toga nije prigodan kao detergent za izolaciju lipidnih splavi. Međutim, Brij 98 je detergent koji se pokazao prikladnim za izolaciju te ne uzrokuje preraspodjelu membranskih gangliozida (66). Studija Persaud-Sawin i sur. iz 2009. godine prikazala je novu metodu izolacije lipidnih splavi bez prisutnosti detergenata (67). Metoda se temelji na sljedećim točkama: nizak sadržaj proteina, visok udio kolesterola, prisutnost flotilina, odsutnost receptora transferina korištenjem OptiPrep^{TM} kao gradijentni medij. Ovakvi kriteriji zadovoljeni su u frakcijama lipidnih splavi izoliranih bez prisutnosti detergenta u gradijentu saharoze od 5 % / 35 % / 42.5 %. Uz OptiPrep^{TM} kao gradijentni medij, flotilin, marker splavi, prisutan je u frakcijama 1 − 5 te s povećanjem frakcija prisutnost mu opada. Transferin, marker nesplavi, odsutan je u frakcijama 1 − 2, ali najviši je u frakcijama 3 − 5. Prisutnost transferina smanjuje se u frakcijama veće gustoće. Na temelju ove metode možemo zaključiti da su frakcije 1 − 2 frakcije markera splavi (67).

Western blot analizom nevedenih markera splavi i markera ostatka membrane u našim uzorcima dobiveno je da postoji statistički značajna razlika u frakcijama proteina u

moždanom tkivu miševa starih 5 dana, 15 dana i 30 dana (p=0,021). Statistički značajna razlika postoji u frakcijama 3 − 11 (p=0,018) kod markera splavi flotilina i markera nesplavi transferina. Za markere splavi i nesplavi u frakcijama 1 − 2 ne postoji statistički značajna razlika. Razlog takvih rezultata mogla bi biti pouzdanost metode izolacije lipidnih splavi ultracentrifugiranjem u gradijentu saharoze 5 % / 35 % / 80 %. Nedostatak ovog istraživanja je to što se nije učinila izolacija splavi nekom drugom metodom, npr. izolacija s detergentima kako bi se mogli usporediti dobiveni rezultati.

6.2. Analiza izražaja MAG-a i MBP-a

Lipidna komponenta biološke membrane omogućuje propusnost i potporu membranskim proteinima. Ovakve uloge zahtijevaju prisutnost lipida s određenim fizičkim karakteristikama i strukturama. Još jedna od uloga je stvaranje lipidnih splavi u membrani koje mogu prenositi proteine do odgovarajućih odredišta unutar stanice. Rad Simonsa i sur. predstavlja ulogu lipidnih splavi u formiranju mijelinske membrane (68). Mijelin služi kao jednostavan model membranskog sustava te tvori električno izoliranu ovojnicu oko aksona. Mijelinska ovojnica ima različiti proteinski i lipidni sastav od ostatka membrane. Mijelin izgrađuje kolesterol i glikofosfolipidi. Oko 85 % komponente proteina mijelina sastoji se od tri vrste proteina: mijelinski bazični protein (MBP), proteolipidni protein (PLP) te glikoprotein povezan s mijelinom (MAG) (68).

Glikoprotein povezan s mijelinom (MAG) transmembranski je protein te istaknuti član IgG superobitelji (24). MAG predstavlja manju komponentu mijelina. Smješten je na unutarnjoj strani mijelinske membrane gdje sudjeluje u aksonsko-mijelinskim interakcijama. Ovakva interakcija je vrlo važna za dugoročnu stabilnost aksona. MAG inhibira regeneraciju aksona nakon ozljede te se veže na moždane gangliozide, GD1a i GT1b (27). Proteini mijelina, kao dijelovi lipidnih splavi, mogu se izolirati uz pomoć detergenata. TX-100 je najčešće korišten detergent za izolaciju lipidnih splavi. Studija Marta i sur. iz 2004. godine prikazala je izolaciju MAG-a pomoću TX-100 pri 4 °C (69). Provedenim istraživanjem uvidjelo se da se MAG podijelio u frakciju koja je netopljiva u detergentu nakon umrežavanja izazvanog antitijelom (anti-MAG plus sekundarno protutijelo). MAG se raspodijelio između frakcija male i velike gustoće u gradijentima saharoze. Iz ovoga istraživanja možemo zaključiti da je značajan dio MAG-a koji je netopljiv u detergentima prisutan u lipidnim splavima (69).

MBP je glavna komponenta PNS-a i CNS-a. Interakcija membrane s MBP-om dovodi do bolje organiziranosti lipida unutar membrane. MBP stvara barijeru koja ograničava ulazak proteina u membranske ploče. Takva barijera predstavlja molekularno sito koje je nepropusno za većinu proteina, ali ne i za lipide. Također, MBP organizira lipide mijelinske membrane te formira difuzijsku barijeru za proteine (20).

Studija Leeja otkrila je da je obrada s detergentom CHAPS ostavila netopljivu frakciju obogaćenu galaktocrebrozidom te je ovim istraživanjem utvrđena prikladnost navedenog detergenta za studije mijelina (70). Međutim, studija Persaud-Sawin i sur. iz 2009. godine prikazala je novu metode izolacije, izolaciju bez prisutnosti detergenta. Ovim istraživanjem utvrđena je prisutnost MBP-a u frakcijama 3, 4, 5. Razlog ove ograničene distrubucije MBP-a po frakcijama govori da postoji minimalna kontaminacija drugim membranama. Prilikom izolacije treba imati na umu starosnu dob i vrstu tkiva iz koje se planira vršiti izolacija jer su to vrlo bitni faktori koji kasnije mogu utjecati na dobivene rezultate (67).

Rezultati dobiveni našim istraživanjem uvelike se razlikuju od rezultata dosad provedenih studija. Usporedbom frakcija markera mijelina MBP-a starosti 15 dana i 30 dana dobivena je statistički značajna razlika ($p=0,021$); usporedbom starosti unutar pojedine frakcije dobivena je statistički značajna razlika ($p=0,018$); dok frakcije $1 - 2$ nisu pokazale statistički značajnu razliku.

6.3. Analiza izražaja kolesterola

Lipidne splavi u staničnoj membrani sadrže kolesterol te se zbog njegove velike količine formira domena koja predstavlja manju fluidnost od okolne membrane. Ukoliko su u frakcijama izolirane lipidne splavi, očekivane su velike koncentracije kolesterola (44).

Rezultati analize kolesterola pokazuju vrlo male koncentracije kod miševa starih 5, 15 i 30 dana kao i međusobno zanemarive razlike. Razlog ovakvih rezultata mogla bi biti pouzdanost metode izolacije lipidnih splavi ultracentrifugiranjem u gradijentu saharoze 5 % / 35 % / 80 %. S obzirom na to da u frakcijama u kojima su trebale biti izolirane splavi nisu dobiveni veliki udjeli kolesterola te uzimajući u obzir rezultate proteina flotilina i transferina, kao i nemogućnosti kvantifikacije MAG-a možemo zaključiti da ova metoda nije do kraja razvijena te bi trebalo učiniti izolaciju nekom drugom metodom radi usporedbe rezultata. Unatoč nezadovoljavajućim rezultatima, metoda ima potencijal zbog pojavljivanja flotilina i transferina i u očekivanim frakcijama.

7. ZAKLJUČAK

- U moždanom deblu miševa starih 5, 15 i 30 dana postoji statistički značajna razlika u frakcijama proteina flotilina i transferina – razvojem se njihova koncentracija povećava.
- Marker MBP pojavljuje se u uzorcima od 15 dana i 30 dana.
- Rezultati mjerenja koncentracije kolesterola ne pokazuju velike vrijednosti u frakcijama u kojima su trebale biti izolirane splavi što pokazuje da one nisu izolirane ili su izolirane samo djelomično.

8. SAŽETAK

Izolacija lipidnih splavi prije i nakon procesa mijelinizacije u mozgu divljeg tipa miša C57BI6

Uvod: Mijelin je izolacijska membrana koja je koncentrično omotana oko aksona. Ona sadrži tri vrste proteina: glikoprotein vezan za mijelin (MAG), bazični mijelinski protein (MBP) i proteolipidni protein (PLP) te lipide i kolesterol. Lipidi se nalaze u lokaliziranim regijama koje se nazivaju lipidne splavi. Glavne molekule koje izgrađuju lipidne splavi su kolesterol, sfingomijelin i glikosfingolipidi, posebice gangliozidi. Gangliozidi osiguravaju pravilnu funkciju lipidnih splavi te im se povećava koncentracija starenjem mozga. Marker splavi je flotilin, a nesplavi transferin.

Ciljevi: Izolirati lipidne splavi iz mozgova miševa divljeg tipa (engl. *wild type*, WT) C57BI6 prije (5 dana starosti), tijekom (15 dana starosti) i nakon završenog procesa mijelinizacije (30 dana starosti) te utvrditi kako se pojavljuju markeri mijelina u lipidnim splavima.

Materijali i metode: U istraživanju su korišteni uzorci moždanog tkiva divljeg tipa miša C57BI6 različite starosti (5 dana, 15 dana i 30 dana starosti). Nakon potvrde genotipa životinje su žrtvovane, a uzorci mozgova su smrznuti u tekućem dušiku. Iz smrznutih uzoraka izolirano je moždano deblo te je provedena izolacija lipidnih splavi ultracentrifugiranjem u gradijentu saharoze. Sastav dobivenih frakcija odredio se Western blot metodom korištenjem markera splavi i nesplavi te markera mijelina MAG i MBP. Rezultati su analizirani u računalnom programu *Fiji* i *IBM SPSS Statistics v22*.

Rezultati: Istraživanjem je utvrđena statistički značajna razlika u izražaju proteina flotilina, transferina i MBP-a u moždanom deblu miševa starih 5, 15 i 30 dana. Izmjerene koncentracije kolesterola pokazuju niske vrijednosti.

Zaključak: Sastav lipidnih splavi moždanog debla miša mijenja se tijekom razvoja i diferencijacije što dobro prikazuju markeri flotilin i transferin.

Ključne riječi: flotilin; transferin; gangliozidi; lipidne splavi; MAG; MBP; mijelinizacija

9. SUMMARY

Lipid rafts isolation before and after myelination process in brain of wild type mouse C57BI6

Introduction: Myelin is an insulation membrane that is wrapped in concentric circles around the axons. It contains three types of protein: myelin-associated glycoprotein (MAG), myelin basic protein (MBP) and proteolipid protein (PLP), as well as lipids and cholesterol. Lipids are located in localized regions commonly known as lipid rafts. The main molecules that form lipid rafts are cholesterol, sphingomyelin, glycosphingolipids, and especially gangliosides, which ensure the proper function of lipid rafts and whose concentration is increased with brain aging. Flotillin and transferrin are the markers of lipid rafts and lipid non-rafts respectively.

Research objectives: To isolate lipid rafts from brains of C57BI6 wild-type mice (WT) before (5 days of age), during (15 days of age) and after the completion of the myelination process (30 days of age) and to determine the manner of appearance of myelin markers in lipid rafts.

Materials and methods: The research was carried out using samples of brain tissue of C57BI6 wild-type mice of different age (5, 15 and 30 days of age). After confirming the genotype, the animals were sacrificed and the mice brain samples were frozen in liquid nitrogen. The brain stem was isolated from the frozen samples and the lipid rafts were isolated by sucrose gradient centrifugation. The composition of the obtained fractions was determined by the Western blot method using markers of rafts and non-rafts as well as MAG and MBP myelin markers. The results were analyzed using the computer programs *Fiji* and *IBM SPSS Statistics v22*.

Results: The research has shown a statistically significant difference in results of proteins flotillin, transferrin and MBP in brain stems of mice of 5, 15 and 30 days of age. The measured concentrations of cholesterol show low values.

Conclusion: The composition of the lipid rafts of the mouse brainstem changes during development and differentiation, which are well demonstrated by the flotillin and transferrin markers.

Key words: flotillin; transferrin; gangliosides; lipid rafts; MAG; MBP; myelination

10. LITERATURA

1. Boullerne AI. The history of myelin. Experimental Neurology. 2016 June; (283): p. 431 − 445.

2. Gould RM, Oakley T, Goldstone JV, Dugas JC, Brady ST. Myelin sheaths are formed with proteins that originated in vertebrate lineages. Neuron Glia Biol. 2008 May; 4(2): p. 137 − 152.

3. Voyvodic JT. Target size regulates calibre and myelination of sympathetic axons. International journal of science. 1989 November; 342: p. 430 − 433.

4. Sturrock RR. Myelination of the mouse corpus callosum. Neuropathology and Applied Neurobiology. 1980 November; 6: p. 415 − 420.

5. Brody BA, Kinney HC, Kloman AS, Gilles FH. Sequence of Central Nervous System Myelination in Human Infancy. I. An Autopsy Study of Myelination. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. 1987 May; 46(3): p. 283 − 301.

6. Braak H, Braak E. Development of Alzheimer-related neurofibrillary changes in the neocortex inversely recapitulates cortical myelogenesis. Acta Neuropathologica. 1996 July; 92(2): p. 197 − 201.

7. Bechler ME, Swire M, Constant C. Intrinsic and Adaptive Myelination - A Sequential Mechanisam for Smart Wiring in the Brain. Developmental Neurobiology. 2018;(78): p. 68 − 79.

8. Bechler ME, Byrne L, Ffrench-Constant C. CNS MyelinSheath Lengths are in Intrinsic Property of Oligodendrocytes. Current Biology. 2015 September; 25(18): p. 2411 − 2416.

9. Kaller MS, Lazari A, Blanco-Duque C, Sampaio-Baptista C, Johansen-Berg H. Myelin plasticity and behaviour- connecting the dots. Current Opinion in Neurobiology. 2017;(47): p. 86 − 92.

10. Wang S, Young KM. White matter plasticity in adulthood. Neuroscience. 2014;(276): p. 148 − 160.

11. Kuppens AH. Incidental foreign language acquisition from media exposure. Learning, Media and Technology. 2010; 35(1): p. 65 − 85.

12. Salzer JL, Zalc B. Myelination. Current Biology. 2016;(206): p. 937 − 980.

13. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. Physiological Reviews. 2001 April; 81(2): p. 871 − 927.

14. Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R. The oligodendrocyte and its many cellular processes. Trends in Cell Biology. 1993 June; 3(6): p. 191 − 197.

15. Coet T, Suzuki K, Popko B. New perspectives on the function of myelin galactolipids. Trends in Neurosciences. 1998 March; 21(3): p. 126 − 130.

16. Podbielska M, Hogan EL. Molecular and immunogenic features of myelin lipids: incitants or modulators od multiple sclerosis. SAGE Publications. 2009;(15): p. 1011 − 1029.

17. Aruga J, Okano H, Mikoshiba K. Identification of the New Isoforms of Mouse Myelin Basic Protein: The Existence of Exon 5a. Journal of Neurochemistry. 1991 April; 56(4): p. 1222 − 1226.

18. Harauz G, Boggs JM. Myelin managment by the 18.5 kDa and 21.5 kDa classic myelin basic protein isoforms. J Neurochem. 2013; 125(3): p. 334 − 361.

19. Fitzner D, Schneider A, Kippert A, Mobius W, Willing KI, Hell SW,a. Myelin basic protein-dependent plasma membrane reorganization in the formation of myelin. EMBO J. 2006 November; 25(21): p. 5037 − 5048.

20. Aggarwal S, Yurlova L, Snaidero N, Reetz C, Frey S, Zimmermann J, et al. A Size Barrier Limits Protein Diffusion at the Cell Surface to Generate Lipid-Rich Myelin-Membrane Sheets. Developmental Cell. 2011 September; 21(3): p. 445 − 456.

21. Yurlova L, Kahya N, Aggarwal S, Kaiser HJ, Chiantia S, Bakhti M, et al. Self-Segregation of Myelin Membrane Lipids in Model Membranes. Biophyscal Journal. 2011;(101): p. 2713 − 2720.

22. LeVine SM, Wong D, Macklin WB. Developmental Expression of Proteolipid Protein and DM20 mRNAs and Proteins in the Rat Brain. Dev Neurosci. 1990; 12: p. 235 − 250.

23. Stecca B, Southwood CM, Gragerov A, Kelley KA, Friedrich VL, Gow A. The Evolution of Lipophilin Genes from Invertabrates to Tetrapods: DM-20 Cannot Replace Proteolipid Protein in CNS Myelin. Journal of Neuroscience. 2000 June; 20(11): p. 4002 − 4010.

24. Trapp BD, Andrews BS, Cootauco C, Quarles R. The myelin-associated glycoprotein is enriched in multivesicular bodies and periaxonal membranes of actively myelinating oligodendrocytes. J Cell Biol. 1989 November; 109(5): p. 2417 − 2426.

25. Trapp BD. Myelin-Associated Glycoprotein Location and Potential Functions. Annals of the New York Academy of Sciences. 1990 November; 605(1): p. 29 − 43.

26. Schachner M, Bartsch U. Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin. GLIA. 2000 January; 29(2): p. 154 − 165.

27. Collins BE, Kiso M, Hasegawa A, Tropak MB, Roder JC, Crocker PR, et al. Binding Specificities of the Sialoadhesin Family of 1-type Lectins. The Journal of Biological Chemistry. 1997 July; 272: p. 16889 − 16895.

28. Cao Z, Gao Y, Deng K, Williams G, Doherty P, Walsh FS. Receptors for myelin inhibitors: Structures and therapeutic opportunities. Molecular and Cellular Neuroscience. 2010 January; 43(1): p. 1 − 4.

29. Venkatesh K, Chivatakarn O, Sheu SS, Giger RJ. Molecular dissection of the myelin-associated glycoprotein receptor complex reveals cell type-specific mechanisms for neurite outgrowth inhibition. J Cell Biol. 2007 May; 177(3): p. 393 − 399.

30. Mutoh T, Tokuda A, Niyadai T, Hamaguchi M, Fujiki N. Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 May; 92(11): p. 5087 − 5091.

31. Yang LJS, Lorenzini I, Vajn K, Mountney A, Schramm LP, Schnaar RL. Sialidase enhances spinal axon outgrowth in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 July; 103(29): p. 11057 − 11062.

32. Coggan JS, Bittner S, Stiefel KM, Meuth S, Prescott SA. Physiological Dynamics in Demyelinating Diseases: Unraveling Complex Relationships through Computer Modeling. Int J. Mol Sci. 2015 Septembar; 16(9): p. 21215 − 21236.

33. Franklin RJM, Goldman SA. Glia Disease and Repair- Remyelination. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015; 7: p. 1 − 29.

34. Lewis PA, Spillane JE. The Molecular and Clinical Pathology of Neurodegenerative Disease: Elsevier Inc; 2018.

35. Georgiou J, Tropak MB, Roder JC. Myelin-Associated Glycoprotein Gene. Myelin Biology and Disorders. 2004; 1: p. 421 − 467.

36. Quarles RH. Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formatio, maintenance and degeneration. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. 2002 November; 59(11): p. 1851 − 1871.

37. Gobel K, Wedell JH, Herrmann AM, Wachsmuth L, Pankratz S, Bittner S. 4-Aminopyridine ameliorates mobility but not disease course in an animal model of multiple sclerosis. Experimental Neurology. 2013 October; 248: p. 62 − 71.

38. Bowe CM, Kocsis JD, Targ EF, Waxmann SG. Physiological effects of 4-aminopyridine on demyelinated mammalian motor and sensory fibers. Annals of Neurology. 1987 August; 22(2): p. 264 − 268.

39. Merzbacher L. Eine eigenartige familiarhereditare Erkrankungform (Aplasia axialis extra-corticalis congenita). Z Gesamte Neurol Psychiat. ; 3: p. 1 − 138.

40. van der Knaap MS, Bugiani M. Leukodistrophie: a proposed classification system based on pathological changes and pathogenetic mechanisms. Acta Neuropathol. 2017; 134(3): p. 351 − 372.

41. Kevelam SH, Steenweg ME, Srivastava S, Helman G, Naidu S, Schiffmann R. Update on leukodystrophies: a historical perspective and adapted definition. Neuropediatrics. 2016; 47: p. 349 − 354.

42. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science. 1972; 175: p. 720 − 731.

43. Pike LJ. Lipid rafts: bringing order to chaos. Journal of Lipid Research. 2003; 44(4): p. 655 − 677.

44. Brown DA, London E. Structure and function of sphingolipid-and cholesterol-rich membrane rafts. J. Biol. Chem. 2000; 275: p. 17221 − 17224.

45. Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995; 92: p. 10339 − 10343.

46. Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, et al. Caveolins, Liquid-Ordered Domains, and Signal Transduction. Molecular and Cellular Biology. 1999 November;: p. 7289 − 7304.

47. Anderson RGW. The caveoale membrane system. Annu. Rev. Biochem. 1998; 67: p. 199 − 225.

48. Tauber UC, Forsten-Wiliams K. Biophysics Theory. [Online]. [cited 2019 July 14. Available from: HYPERLINK "http://www.mpipks-dresden.mpg.de/~manoj/res.html" http://www.mpipks-dresden.mpg.de/~manoj/res.html .

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

50. Stuermer C. The reggie/flotillin connection to growth. Treends Cell Biol. 2010; 20(1): p. 6 − 13.

51. van Meer G. Cellular lipidomics. EMBO J. 2005; 24(18): p. 3159 − 3165.

52. Sandhoff K, Harzer K. Gangliosides and Gangliosidoses: Principles of Molecular and Metabolic Pathogenesis. Journal of Neuroscience. 2013 June; 33(25): p. 10195 − 10208.

53. Jalanko A, Braulke T. Neuronal ceroid lipofuscinoses. Biochim Biophys Acta. 2009; 1793: p. 697 − 709.

54. Yu RK, Tsai YT, Ariga T, Yanagisawa M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides. J Oleo Sci. 2011; 60(10): p. 537 − 544.

55. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2000; 1: p. 31 − 39.

56. Yoshikawa M, Go S, Takasaki K, Kakazu Y, Ohashi M, Nagafuku M, et al. Mice lacking ganglioside GM3 synthase exhibit complete hearing loss due to selective degeneration of the organ of Corti. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.. 2009; 106: p. 9483 − 9488.

57. Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt. Sialic acid in the brain: Gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stabilitiy,disease, and regeneration. Physiol Rev. 2014;(94): p. 461 − 518.

58. Tettamanti G, Bonali F, Marchesini S, Zambotti V. A new procedure for the extraction, purification and fractionation of brain gangliosides. Biochim Biophys Acta. 1973; 296: p. 160 − 170.

59. Steenackers A, Vanbeselaere J, Cazet A, Bobowski M, Rombouts Y, Colomb F, et al. Accumulation of unusual gangliosides G(Q3) and G(P3) in brast cancer cells expressing the G(D3) synthase. Molecules. 2012; 17: p. 9559 − 9572.

60. Svennerholm L, Bostom K, Fredman P, Manson JE, Rosengren B, Rynmark BM. Human brain gangliosides: developmental changes from early fetal stage to advanced age. Biochim Biophys Acta. 1989; 1005: p. 109 − 117.

61. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry. 1976; 72: p. 248 − 254.

62. Glavaš-Obrovac Lj, Baus Lončar M, Ćurić G, Mišković K, Šerić V, Wagner J, et al. In Glavaš-Obrovac Lj. Priručnik za seminare i vježbe iz medicinske kemije i biokemije 2. Osijek: Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku; 2014.

63. Mini Blot Module. [Online]. [cited 2019 August 23. Available from: HYPERLINK "https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mini_blot_module_man.pdf" https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mini_blot_module_man.pdf .

64. Calzolari A, Raggi C, Deaglio S, Sposi NM, Stafnes M, Fecchi K, et al. TfR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. Journal of Cell Science. 2006; 119: p. 4486 − 4498.

65. Meister M, Tikkanen R. Endocytic Trafficking of Membrane-Bound Cargo: A Flotillin Point of View. Memranes (Basel). 2014 September; 4(3): p. 356 − 371.

66. Ilić K, Mlinac Jerković K, Habek N, Balog M, Kalanj Bognar S, Heffer M, et al. Lipid raft isolation from mouse brain tissue under conditions that retain submembrane distribution of gangliosides and proteins. Book of Abstracts. 2017.

67. Persaud-Sawin DA, Lightcap S, Harry GJ. Isolation of rafts from mouse brain tissue by a detergent-free method. J Lipid Res. 2009 April; 50(4): p. 759 − 767.

68. Simons M, Kramer EM, Thiele C, Stoffel W, Trotter J. Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. J Cell Biol. 2000; 151: p. 143 − 153.

69. Marta CB, Taylor CM, Cheng S, Quarles RH, Bansal R, Pfeiffer SE. Myelin associated glycoprotein cross-linking triggers its partitioning into lipid rafts, specific signaling events and cytoskeletal rearrangements in oligodendrocytes. Neuron Glia Biol. 2004 February; 1(1): p. 35 − 46.

70. Lee AG. Myelin: Delivery by Raft. Current Biology. 2001;(11): p. 60 − 62.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Mihaela Ilijašević

Datum i mjesto rođenja: 15. 8. 1995., Virovitica

Obrazovanje:

- ✓ 2017. – 2019. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku
- ✓ 2014. – 2017. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku
- ✓ 2010. – 2014. Medicinska škola Bjelovar – zdravstveno-laboratorijski tehničar