

# Utjecaj nedostatka receptora sličnog Tollu 2 na izražaj neuroplastina i ATPaza u mozgu miša

---

**Stojanović, Mario**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2023**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:832399>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-03**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Mario Stojanović**

**Utjecaj nedostatka receptora sličnog  
Tollu 2 na izražaj neuroplastina i ATPaza  
u mozgu miša**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2023.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Mario Stojanović**

**Utjecaj nedostatka receptora sličnog  
Tollu 2 na izražaj neuroplastina i ATPaza  
u mozgu miša**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2023.**

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za molekularnu neurobiologiju i neurokemiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga i Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Svjetlana Kalanj Bognar

Istraživanje je provedeno uz potporu Hrvatske zaklade za znanost, u okviru istraživačkog projekta „Molekularni biljezi vulnerabilnosti, adaptacije i plastičnosti neurona u akutnoj i kroničnoj ozljedi mozga“ (NeuroReact, HRZZ- IP-2016-06-8636) i projekta razvoja karijere mladih istraživača-izobrazba novih doktora znanosti (ESF DOK-2018-01). Dodatnu potporu za izradu doktorskog rada osigurao je Znanstveni centar izvrsnosti za temeljnu, kliničku i translacijsku neuroznanost, projekt: „Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi“, (KK.01.1.1.01.0007, voditelj: prof. dr. sc. Miloš Judaš).

Zahvaljujem svojoj mentorici, Svjetlani na izuzetnoj podršci i usmjeravanju tijekom izrade ove disertacije te članovima laboratorija za Molekularnu neurobiologiju i neurokemiju, Kristini, Katarini i Borni na pomoći i svim lijepim trenucima provedenim u labosu.

Izuzetno hvala članovima tima na Leibniz-Institutu za neurobiologiju (LIN), Magdeburg, Njemačka, Karl-Heinz Smalla, Thilo Kahne i Rodrigo Herrera Molina, za pomoć u usavršavanju i svladavanju tehnike spektroskopije masa.

## Popis kratica

5-HT	serotonin, 5-hidroksitriptamin
A	aktuatorska domena
ACN	acetonitril
ACT/N	aktin
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-izoksazol-propionska kiselina
AMPAR	$\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-izoksazol-propionatni tip receptora
ATP5MD	ATP sintaza membranska podjedinica DAPIT
ATPaza	adenozin-trifosfataza
C	kloroform
CA	<i>Cornu Ammonis</i>
CAM	molekule stanične adhezije, engl., <i>cell adhesion molecules</i>
CaM	kalmodulin
CaMKII	protein kinaza II aktivirana kalmodulinom
Cb	mali mozak, cerebelum
CD	antigen CD
cDNA	komplementarna DNA, engl., <i>complementary DNA</i>
CE	karboksieozin
CEND	protein izlaska iz staničnog ciklusa i neuronalne diferencijacije, engl., <i>cell cycle exit and neuronal differentiation 1</i>
Cer	ceramid
cGMP	ciklički gvanozin-monofosfat, engl., <i>cyclic guanosine monophosphate</i>
Chol	kolesterol, engl., <i>cholesterol</i>
CR	kolor reagens, engl., <i>color reagens</i>
CRMP	protein srodan dihidropirimidinazi, engl., <i>dihydropyrimidinase-related protein</i>
CTB	toksin kolere, engl., <i>cholera toxin <math>\beta</math> subunit</i>
CTS	kardiotonični steroidi, engl., <i>cardiotonic steroids</i>
Cx	moždana kora, korteks, engl., <i>cortex</i>
DAMP	molekularni obrasci povezani sa staničnim oštećenjem, engl., <i>danger associated molecular patterns</i>
DBN	debrin
DG	dentatni girus
DIA	neovisno prikupljanje podataka, engl., <i>data-independent acquisition</i>
DMSO	dimetilsulfoksid
DT	divlji tip
DTT	ditiotreitol
EAAT	prijenosnik glutamata, engl., <i>excitatory amino acid transporter</i>
eEF1A1	elongacijski čimbenik A1
eEF1a2	elongacijski čimbenik A2
EPB41L3	protein membrane eritrocita veličine 4.1, engl., <i>erythrocyte membrane protein band 4.1 like 3</i>
ESI-MS	spektrometrija masa tehnikom elektroraspršenja, engl., <i>electrospray ionization mass spectrometry</i>
FGFR	receptor čimbenika rasta fibrol <i>1gl fibroblast growth factor receptor</i>
FXYP	protein FXYP
GABA	$\gamma$ -amino-maslačna kiselina, engl., <i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid</i>
GABAR	receptor za GABA
Gal	galaktoza

Gal-Nac	<i>N</i> -acetil-galaktozamin
GAP43	protein pridružen rastu 43, engl., <i>growth associated protein 43</i>
GGI	gangliozidi
GL	granularni sloj, engl., <i>granular layer</i>
Glc	glukoza
Gln	glutamin
GLS	glutaminaza
Glu	glutamat
GlyR	receptor glicina, engl., <i>glycine receptor</i>
GNG7	podjedinica $\gamma$ 7 proteina G
GPHN	gefrin, engl., <i>gephyrin</i>
GRM	gen metabotropnog receptora glutamata, engl., <i>metabotropic glutamate receptor gene</i>
Hip	hipokampus
HPTLC	tankoslojna kromatografija visoke razlučivosti na silika-gelu, engl., <i>high-preformance thin layer chromatography</i>
IF	imunofluorescencija
Ig	imunoglobulin
IgCAM	molekule stanične adhezije imunoglobulinskog tipa
IL-1R	receptor interleukina 1
KO	životinja s izbačenim genom, engl., <i>knock-out</i>
KRT	keratin
Ld	tekuća neuređena faza, engl., <i>liquid disordered</i>
Lo	tekuća uređena faza, engl., <i>liquid ordered</i>
LPS	lipopolisaharid
LR	lipidne splavi, engl., <i>lipid rafts</i>
LTD	dugoročna depresija, engl., <i>long-term depression</i>
LTP	dugoročna potencijacija, engl., <i>long-term potentiation</i>
Ly6h	antigen 6 limfocita, lokus H
M	metanol
MAG	mijelinu pridruženi glikoprotein, engl., <i>myelin associated glycoprotein</i>
MAGUK	gvanilat-kinaza pridružena membrani, engl., <i>membrane-associated guanylate kinase</i>
MAPK	protein-kinaza aktivirana mitogenom, engl., <i>mitogen activated protein kinase</i>
MAPT	protein tau pridružen mikrotubulima, engl., <i>microtubule associated protein tau</i>
MBP	bazični protein pridružen mijelinu, engl., <i>myelin basic protein</i>
MCT2	prijenosnik monokarboksilata 2, engl. <i>monocarboxylate transporter 2</i>
mEPSC	minijaturne ekscitacijske postsinaptičke struje, engl., <i>miniature excitatory postsynaptic currents</i>
mGluR	metabotropni receptor glutamata
ML	molekularni sloj, engl., <i>molecular layer</i>
mRNA	glasnička RNA, engl., <i>messenger RNA</i>
MS	spektrometrija masa, engl., <i>mass spectrometry</i>
N	nukleotid vezujuća domena engl., <i>nucleotid binding domain</i>
nAChR	nikotinski receptor acetilkolina
NCAM	molekule stanične adhezije živčanog tkiva, engl., <i>neural cell adhesion molecules</i>
Neu5Ac	sijalinska kiselina
NF-kB	protein NF-kB
NHERF	regulatorni kofaktor Na/H izmjenjivača, engl., <i>Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulatory cofactor</i>

NKA	natrij/kalij-ATPaza
nLR	ne-splavi, engl., <i>non-lipid rafts</i>
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartat
NMDAR	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartatni tip receptora
nNOS	neuronalna sintaza dušikovog oksida, engl., <i>neuronal nitric oxide synthase</i>
Np	neuroplastin
NPC	neuronalne progenitorske stanice, engl., <i>neuronal progenitor cells</i>
OB	ouabain
OPC	oligodendrocitne progenitorske stanice, engl., <i>oligodendrocyte progenitor cells</i>
P	fosforilacijska domena
PAMP	molekularni obrasci pridruženi patogenima, engl., <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	fosfatni pufer, engl., <i>phosphate buffer saline</i>
PC	fosfatidilkolin, engl., <i>phosphatidyl choline</i>
PDS-95	protein postsinaptičkog zgusnuća 95, engl., <i>postsynaptic density 95</i>
PIP	fosfatidilinozitol-fosfat, engl., <i>phosphatidylinositol phosphate</i>
PKC	protein-kinaza C
PMCA	kalcijeva ATPaza stanične membrane, engl., <i>plasma membrane calcium ATPase</i>
PS	fosfatidilserin, engl., <i>phosphatidylserine</i>
qPCR	lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu/kvantitativni PCR, engl., <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RAB10	protein RAB10
RB	pufer za izolaciju lipidnih slavi, engl., <i>raft buffer</i>
RhoA	transformirajući protein Rho A
RTN	retikulum
SAMs	molekule sinaptičke adhezije, engl., <i>synaptic adhesion molecules</i>
sGC	solubilna gvanilat-ciklaza
SM	sfingomijelin
SynCAM	sinaptičke molekule stanične adhezije
TAB1	protein vezanja 1 kinaze 1 aktivirane TGF- $\beta$ , engl., <i>TGF-<math>\beta</math> activated kinase 1(MAP3K7)binding protein 1</i>
TLR	receptor sličan Toll-u, engl., <i>Toll like receptor</i>
TM	transmembranska domena
TNF- $\alpha$	čimbenik tumorske nekroze $\alpha$ , engl., <i>tumor necrosis factor-alpha</i>
TRAF6	čimbenik 6 pridružen receptoru TNF, engl., <i>TNF receptor associated factor 6</i>
UDMSe	razdvajanje visoke razlučivosti engl., <i>ultra-definition mobility separation</i>
UPLC	tekućinska kromatografija visoke razlučivosti, engl., <i>ultra-performance liquid chromatography</i>
W	voda, engl., <i>Water</i>
WB	Westernska metoda otiska, engl., <i>Western blot</i>

## Sadržaj

1.	UVOD .....	1
1.1	TOPOLOGIJA I FUNKCIJA MEMBRANA ŽIVČANOG TKIVA .....	1
1.2	SINAPSE I SINAPTIČKA PLASTIČNOST.....	3
1.3	NEUROPLASTIN, NP .....	6
1.3.1	Interaktom neuroplastina .....	7
1.3.2	Neuroplastin u membranskom okolišu .....	9
1.4	ATPAZE TIPA P.....	10
1.4.1	Natrij/kalij-ATPaza.....	11
1.4.2	Interaktom natrij/kalij-ATPaze .....	12
1.4.3	Natrij/kalij-ATPaza i lipidni okoliš .....	13
1.4.4	Kalcijska ATPaza stanične membrane.....	14
1.4.5	Interaktom kalcijske ATPaze stanične membrane .....	15
1.5	TOLL-U SLIČAN RECEPTOR 2 .....	17
1.5.1	Specifična obilježja živčanog sustava bez prisutnosti TLR2 .....	19
1.5.2	Međudjelovanje TLR2 i neuroplastina tijekom razvoja mozga .....	20
2.	HIPOTEZA .....	21
3.	CILJEVI RADA .....	22
4.	MATERIJAL I METODE .....	23
4.1	MATERIJAL .....	23
4.1.1	Etička odobrenja i usklađenost pokusa s ARRIVE smjericama.....	23
4.1.2	Pokusne životinje i uvjeti uzgoja životinja .....	23
4.2	METODE.....	26
4.2.1	Neuroanatomska disekcija .....	26
4.2.2	Analiza sinaptičkog proteoma metodom spektrometrije masa spregnute nano-tekućinskom kromatografijom .....	26
4.2.3	Analiza genskog izražaja odabranih proteina .....	30
4.2.4	Analiza prisutnosti odabranih proteina metodom Western blot.....	33
4.2.5	Analiza zastupljenosti odabranih proteina u rezovima tkiva metodom imunofluorescentnog obilježavanja .....	37
4.2.6	Izolacija gangliozida iz moždanog tkiva.....	40
4.2.7	Izolacija lipidnih splavi.....	42
4.2.8	Određivanje katalitičke aktivnosti ATPaza tipa P .....	43
4.2.9	Statističke analize .....	45
5.	REZULTATI.....	46
5.1	SINAPTIČKI PROTEOM U MOŽDANIM REGIJAMA TLR2KO MIŠEVA.....	46
5.1.1	Promjene sinaptičkog proteoma u mozgu TLR2KO miševa .....	46
5.1.2	Sinaptički proteom hipokampusu u mišjem modelu TLR2KO.....	50
5.1.3	Sinaptički proteom malog mozga u mišjem modelu TLR2KO.....	54
5.1.4	Sinaptički proteom moždane kore u mišjem modelu TLR2KO.....	59
5.2	IZRAŽAJ ODABRANIH GENA U IZOLIRANIM MOŽDANIM REGIJAMA TLR2KO MIŠEVA.....	64
5.2.1	Relativna količina mRNA odabranih proteina u hipokampusu .....	64
5.2.2	Relativna količina mRNA odabranih proteina u malom mozgu .....	66
5.2.3	Relativna količina mRNA odabranih proteina u moždanoj kori .....	67
5.3	ANALIZA ODABRANIH MEMBRANSKIH I CITOSOLNIH PROTEINA METODOM WESTERN BLOT .....	69
5.3.1	Analiza prisutnosti odabranih proteina u hipokampusu .....	70
5.3.2	Analiza prisutnosti odabranih proteina u malom mozgu .....	73
5.3.3	Analiza prisutnosti odabranih proteina u moždanoj kori .....	76
5.4	RASPODJELA IZABRANIH PROTEINA U MOŽDANOM TKIVU TLR2KO MIŠEVA.....	79
5.4.1	Raspodjela odabranih proteina u tkivu hipokampusu .....	79
5.4.2	Raspodjela odabranih proteina u tkivu malog mozga .....	85



5.5	REGIONALNI OBRAZAC GANGLIOZIDNIH VRSTA U MIŠEVA S UTIŠANIM GENOM ZA TLR2 .....	92
5.5.1	Promjene ganglioizidnog sastava hipokampusa mišjeg modela TLR2KO .....	92
5.5.2	Promjene ganglioizidnog sastava malog mozga mišjeg modela TLR2KO .....	93
5.6	LOKALIZACIJA PROTEINA U MEMBRANSKOM OKOLIŠU I RASPODJELE UNUTAR LIPIDNIH NANO-DOMENA.....	95
5.6.1	Hipokampus.....	95
5.6.2	Mali mozak .....	99
5.6.3	Moždana kora .....	102
5.7	AKTIVNOST ATPAZA TIPA P U HOMOGENATIMA MOŽDANIH REGIJA ŽIVOTINJA S UTIŠANIM TLR2 GENOM .....	106
5.7.1	Hipokampus.....	106
5.7.2	Mali mozak .....	106
5.7.3	Moždana kora .....	107
6.	RASPRAVA.....	109
6.1	PROMJENE SINAPTIČKOG PROTEOMA HIPOKAMPUSA UPUĆUJU NA PROMJENU RAVNOTEŽE EKSCITACIJSKIH I INHIBICIJSKIH SINAPSI USLIJED PROMJENA U INTEGRITETU AKSONSKIH PROJEKCIJA TLR2KO MIŠEVA 110	
6.2	BIOKEMIJSKE I MOLEKULARNE PROMJENE NEUROPLASTINA I ATPAZA TIPA P UKAZUJU NA SMANJEN VOLUMEN I REORGANIZACIJU MEMBRANSKOG OKOLIŠA U TKIVU HIPOKAMPUSU TLR2KO MIŠEVA.....	113
6.3	PROMJENE SINAPTIČKOG PROTEOMA MALOG MOZGA UPUĆUJU NA PROMJENU AKSONSKIH PROJEKCIJA TLR2KO MIŠEVA .....	117
6.4	BIOKEMIJSKE I MOLEKULARNE PROMJENE NEUROPLASTINA I ATPAZA TIPA P UKAZUJU NA REORGANIZACIJU MEMBRANSKOG OKOLIŠA U TKIVU MALOG MOZGA TLR2KO MIŠEVA .....	118
6.5	PROMJENE SINAPTIČKOG PROTEOMA MOŽDANE KORE UPUĆUJU NA INTENZIVNI METABOLIZAM I POVEĆANJE OBUJMA NEURONALNE POPULACIJE TLR2KO MIŠEVA.....	120
6.6	BIOKEMIJSKE I MOLEKULARNE PROMJENE NEUROPLASTINA I ATPAZA TIPA P UKAZUJU NA PROMJENE U DINAMICI MEMBRANSKOG OKOLIŠA U TKIVU MOŽDANE KORE TLR2KO MIŠEVA .....	121
7.	ZAKLJUČCI .....	123
8.	SAŽETAK.....	124
9.	ABSTRACT .....	125
10.	LITERATURA .....	126
11.	ŽIVOTOPIS .....	145

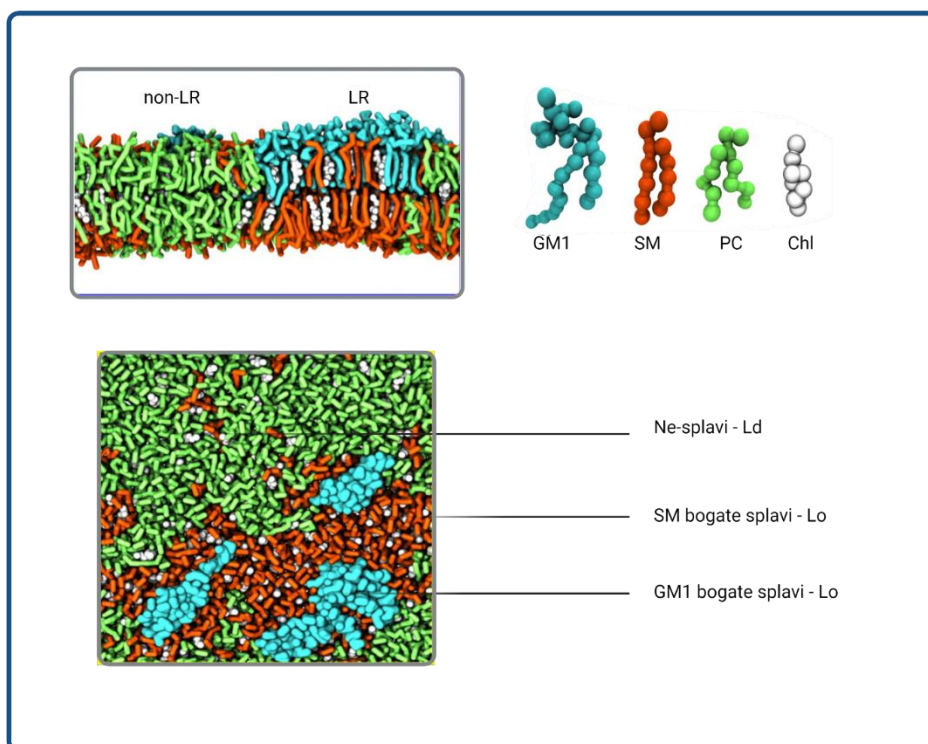
# 1. UVOD

## 1.1 Topologija i funkcija membrana živčanog tkiva

Fizikalno-kemijska svojstva staničnih membrana živčanog sustava, a ponajviše membrana živčanih stanica, razlikuju se od ostatka stanica u živom sustavu (1–3). Niz specifičnosti membrane omogućuju funkcionalne i jedinstvene radnje svojstvene samo neuronima. Jedna od značajki živčanih stanica je njihova velika propusnost za kalijeve ione ( $K^+$ ) i mala propusnost za natrijeve ( $Na^+$ ) i kloridne ( $Cl^-$ ) ione u stanju mirovanja (4). Elektro-neutralnost izvanstaničnog prostora je zadovoljena visokim koncentracijama  $Na^+$  i  $Cl^-$  te malim koncentracijama bikarbonatnih ( $HCO_3^-$ ), fosfatnih ( $PO_4^{3-}$ ) i sulfatnih ( $SO_4^{2-}$ ) ionskih vrsta. Unutar stanice, veliku koncentraciju  $K^+$  neutraliziraju negativno nabijeni proteini i  $PO_4^{3-}$ . Proteinske crpke za pojedine ionske vrste održavaju ionsku ravnotežu (5). Neuron ostvaruju elektrokemijsku ravnotežu spregnuvši osmotsku ravnotežu, polupropusnost i elektro-neutralnost. Elektronegativna vrijednost unutarstaničnog prostora osnova je za procese hiperpolarizacije i depolarizacije koji dovode do promjene u elektrokemijskoj ravnoteži te posljedično izazivaju odašiljanje signala (6).

Membrane živčanog tkiva zauzimaju 50 % suhe mase tkiva čiji je sadržaj izrazito bogat različitim vrstama lipida (7–9). Osim fosfolipida tipičnih za sve stanične membrane – kao što su fosfatidilkolin (engl., *phosphatidylcholine*, PC), fosfatidiletanolamin (engl., *phosphatidylethanolamine*, PE), fosfatidilserin (engl., *phosphatidylserine*, PS), fosfatidilinozitol i fosforilirani analozi (engl., *phosphatidylinositol*, PIP), sfingomijelin (engl., *sphingomyeline*, SM) – u membranama živčanih stanica nalazi se mnogo veći udio kolesterola (engl., *cholesterol*, Chol) i složenih glikosfingolipida (gangliozidi, engl., *gangliosides*, GGL). Sastav lipidnih vrsta diktira topologiju i fizikalna svojstva membrane (7,10–13). U membranama živčanog sustava, značajke koje su definirane kolesterolom, a koje dolaze do izražaja zbog njegove povećane koncentracije (14–18) su: 1. gusto pakiranje membranskih lipida, 2. organizacija membrane u uređene domene - Lo (engl., *liquid-ordered*) i neuređene domene - Ld (engl., *liquid-disordered*), 3. zakrivljenost membrane. Rigidna steroidna struktura kolesterola ostvaruje niz hidrofobnih interakcija s lancima masnih kiselina lipida membrane, te 'ravnanjem' lanaca omogućuje gusto pakiranje lipida u neposrednoj blizini kolesterola. Posljedica vezanja ovih kompleksa stvaranje je dvije faze unutar membrane, Lo i Ld (19–22). Lo je visoko-organizirana, bogata kolesterolom sa

smanjenom lateralnom difuzijom lipida. Ove karakteristike su prisutne u lipidnim domenama otpornima na deterdžente (23), lipidnim splavima (engl., *lipid rafts*, LR), te su LR definirane kao uređena smjesa kolesterola, specifičnih lipida, gangliozida, i proteina, posebice GPI-usidrenih proteina (engl., *glycophosphatidylinositol*, *GPI-anchored proteins*) (3,19,24–27). Za Ld karakteristična je manje uređena organizacija, brza lateralna difuzija lipida, manji udio kolesterola, pa se u literaturi navodi pod nazivom ne-splavi, nLR (engl., *Non-lipid Rafts*). Izvanstanični sloj stanične membrane zbog ovih svojstava postaje topološki bogat okoliš, tekuća faza u kojoj 'plutaju' rigidne i dinamične nano-domene. Slikovito, lipidne splavi možemo ilustrirati kao dinamične diskretno omeđene lipidne tokove, rukavce i bazene specifičnih karakteristika u čiji sadržaj su uronjeni proteini (Slika 1.1.).



*Slika 1.1.* Grafički prikaz organizacije specifičnih membranskih nanodomena, presjek membranskog okoliša i pogled odozgo na membranski okoliš. Preuzeto i prilagođeni iz Moutusi i sur. (28) Izrađeno u BioRender.com

Gangliozidi su skupina kiselih glikosfingolipida koji se s najvećom raznolikošću i najvišom koncentracijom nalaze u moždanom tkivu (1,3,29–31). Na ceramidnu, Cer, jezgru dodana je serija ugljikohidrata koja stvara lanac (najkraća serija - GalGlcCer, najduža serija – GalGal-NAcGalGlcCer; Glc (glukoza), Gal (galaktoza), Gal-NAc (*N*-acetilgalaktozamin), na čiju unutrašnju i/ili vanjsku galaktozu se može vezati jedan ili više

kiselih šećera sijalinske kiseline, Neu5Ac, N-acetilneuraminska kiselina (engl., *N-acetylneuraminic acid*) (1). Prostorno, glikanski dio molekule može zauzeti dva oblika: oblik pehara, na rubovima domena LR, i ravne površine, u unutrašnjosti domena LR (32). Ceramidni dio molekule gangliozida ostvaruje mnoštvo interakcija s planarnom steroidnom jezgrom kolesterola te omogućuje vrlo gusto 'pakiranje' gangliozida (32). Pokazano je da pojedini gangliozidi izazivaju različit stupanj zakrivljenosti membrane (33). Uz pomoć proteina, membrane se mogu saviti i poprimiti oblike poput udubljenja ili ispupčenja koja pridonose procesima endo- i egzocitoze. Struktura gangliozida omogućuje sposobnost 'sortiranja' (34). Gangliozidi se mogu izdvojiti unutar membrane u strukture visoke organizacije. Najveći udio gangliozida membrane nalazi se u LR (3). Strukturne karakteristike membrana na koje utječu gangliozidi su sljedeće (35): 1. zakrivljenost, 2. asimetrija, 3. kooperativnost, 4. izdvajanje, te 5. metamorfizam. Spomenute specifične odlike gangliozida odgovorne su za stvaranje splavi različita ustrojstva koje su specijalizirane za pojedine biokemijske aspekte prijenosa signala među neuronima (36). Gangliozidi u lipidnim splavima služe kao oznaka na karti za proteine koji se sidre na površini staničnih membrana (*in trans*; kolera toksin, CTB, mijelinu pridruženi protein, MAG) ili su smješteni unutar membrana gdje ostvaruju funkcionalne interakcije s gangliozidima (*in cis*, serotoninški receptor 5HT<sub>1A</sub>) (32,35). Prometovanje proteina posredovano gangliozidima izgrađuje biokemijske rute unutar membrane. Plastičnost ovih procesa i preciznost organizacije daju neuronima izrazitu moć u obradi podataka (37). Osim što oblikuju membranu neurona, gangliozidi čine površinu neurona negativno nabijenom što omogućuje odbijanje negativno nabijenih neurotransmitera, glutamata (Glu), i njihovo učinkovito uklanjanje dok privlače pozitivno nabijene neurotransmitere, serotonin, 5-HT, i katione (30,33).

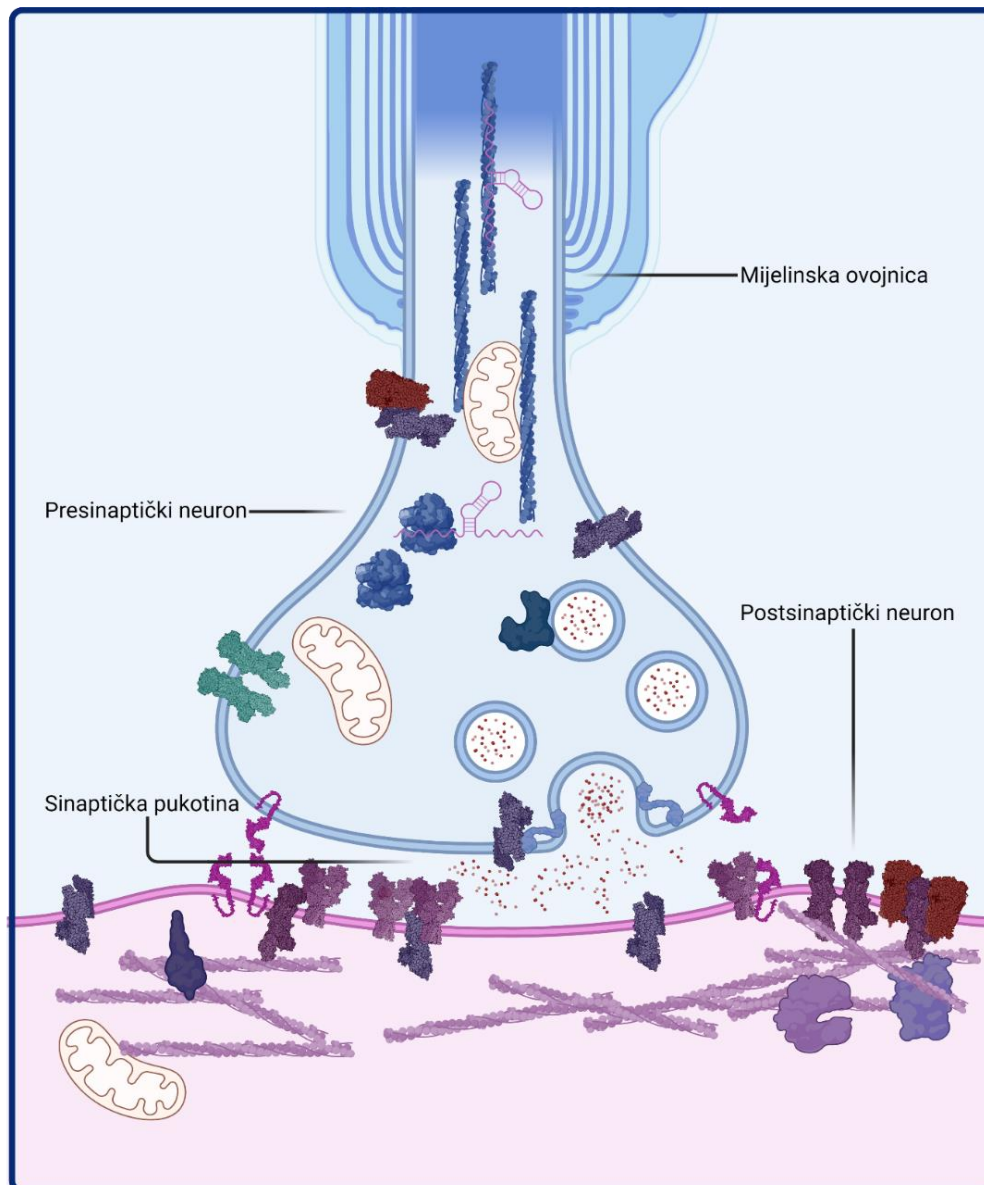
## **1.2 Sinapse i sinaptička plastičnost**

Osnovne funkcionalne jedinice neurona su sinapse, polivalentna, asimetrična kontaktna mjesta dvaju neurona specijalizirana za prijenos i obradu informacija (38–40). One su dvokomponentne strukture izgrađene na granici presinaptičkog i postsinaptičkog neurona s posebnom proteinskom i lipidnom garniturom (Slika 1.2) (41–44). Sinaptički lokaliteti, koji broje milijarde u živčanom sustavu, razlikuju se na temelju tipa neurotransmitera koji otpuštaju, učestalosti okidanja, vrstama receptora postsinaptičkog zgusnuća i mogućnosti neuromodulacije ekstrasinaptičkim receptorima (38). Obzirom na

dvije vrste neuronalnih populacija, inhibicijske ili ekscitacijske neurone, razlikujemo dvije osnovne vrste sinapsi (38,45–47). Inhibicijski neuroni izgrađuju dvije vrste sinapsi, GABAergičke ( $\gamma$ -aminomaslačna kiselina, engl., *gamma-aminobutyric acid*, GABA) u središnjem živčanom sustavu i glicinergičke u moždanom deblu i leđnoj moždini. Proteini gefrin (engl., *gephryn*, GPHN), receptori za GABA-u, GABAR, i receptori za glicin, GlyR, su biljezi postsinaptičkih inhibicijskih sinapsi (48). Ekscitacijski neuroni izgrađuju glutamatergičke, kolinergičke, adrenergičke, serotonergične i histaminergičke sinapse (48). Ekscitacijske postsinapse možemo prepoznati po strukturnom proteinu PSD-95, receptorima za glutamat, NMDAR (*N*-metil-D-aspartatni tip receptora) i AMPAR ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-izoksazol-propionatni tip receptora), te CaMKII (protein-kinaza II ovisna o kalciju/kalmodulinu) (48). Presinaptičke strukture ustrojene su na aksonima neurona, dok je manji broj takozvanih dendritodendritičkih sinapsi zastupljen u olfaktornom bulbusu i talamičkim jezgrama (38,39). Postsinaptičke strukture ustrojene su na spinama dendrita neurona ekscitacijskih sinapsi ili iza dendritičkih trnova te na somi neurona kod inhibicijskih sinapsi (38). Presinaptički dio specijaliziran je za otpuštanje neurotransmitera u sinaptičku pukotinu vođeno  $Ca^{2+}$ , dok je postsinaptički dio zadužen za primanje signala vezanjem neurotransmitera za receptor (38,39,43). Unutar sinapse jasno su definirane funkcionalne domene membranskog okoliša različitih karakteristika i veličina podijeljene hijerarhijski u tri skupine u rasponu veličina 2 - 300 nm (38,46): domene organizirane preko citoskeleta, aktina i membranskih lipida (40 - 300 nm); lipidne splavi (2 - 20 nm); dinamični proteinski kompleksi (3 - 10 nm). Presinaptički citosol i membranu čine lokacije formiranja vezikula, 'stanice' za punjenje vezikula neurotransmiterima pomoću kompleksa proteinskih pumpi te mjesta za sidrenje i recikliranje vezikula neurotransmitera (39,46). Postsinaptički citosol i membrana su ispunjeni unutarstaničnim strukturnim kompleksima citoskeleta visoke organizacije za sidrenje receptora neurotransmitera, domenama slobodnih receptora koje podliježu procesu endo- i egzocitoze (38,46). Presinaptički dijelovi neurona su vrlo slični po građi dok im sastav varira ovisno o neurotransmiterima kojeg otpuštaju. Postsinaptički dijelovi su različiti, s jedinstvenim ustrojstvom i sastavom proteina (38,39). Ove odlike čine sinapse vrlo šarolikom populacijom te se zbog svoje složenosti i kombinatorike, sinaptom može opisati kao računalni jezik moždanog tkiva. Iako se u počecima neuroznanstvene discipline mislilo da su sinapse statične strukture s jasno definiranim brojem proteinskih receptora,

višegodišnja istraživanja su pokazala kako je sinaptički okoliš izrazito dinamičan s vrlo brzom lateralnom difuzijom proteina i lipida. Sadržaj sinaptičkog okoliša podložan je promjenama u kontekstu dodavanja i oduzimanja sadržaja putem lateralne difuzije iz ekstrasinaptičkih dijelova neurona te endo- i egzocitozom. Ovi događaji i promjene strukture pridonose specifičnim funkcijama poput dugoročne potencijacije (engl., *long-term potentiation*, LTP) i depresije (engl., *long-term depression*, LTD) koji su osnova učenja i pamćenja, te osiguravaju neuronima izrazitu sinaptičku plastičnost koja utječu na uspostavu i održavanje informacijskih puteva unutar mreže neurona, a odraženi su kao specifični obrasci ponašanja (38,39,43,46). Uz receptore neurotransmitera i strukturne proteine, od velikog značaja su proteini stanične adhezije te ionski kanali čiji su pripadnici u fokusu ovog istraživanja. Neki značajni proteini su neureksini na presinaptičkoj membrani, neuroplastin na pre- i postsinaptičkoj membrani te naponski natrijevi i kalcijevi kanali i ionski izmjenjivači, tzv. crpke, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaza (NKA) i Ca<sup>2+</sup>-ATPaza stanične membrane (engl., *plasma membrane calcium ATPase*, PMCA) koji omogućuju izmjenu ionskih vrsta tijekom trajanja depolarizacije i njihovo vraćanje u ravnotežno stanje tijekom procesa repolarizacije (49).

Proteini sinaptičke adhezije, SAMs (engl., *synaptic adhesion molecules*) su komponente sinaptičkog proteoma uključene u sinaptogenezu, održavanje funkcija zrelih sinapsi i sinaptičku eliminaciju (38,42,43,50,51). Molekule SAM broje približno 20 obitelji od kojih su najpoznatije neuroigini, neureksini, kadherini, sindekani, integrini, NCAM (engl., *neuronal cell adhesion molecules*), SynCAM (engl., *synaptic cell adhesion molecules*) i IgCAM (engl., *immunoglobulin cell adhesion molecules*) (38,39). Svaka od navedenih obitelji posjeduje različite izoforme ili pripadnike unutar obitelji koje su funkcionalno vezane za post- ili presinaptičke elemente u *in trans* ili *in cis* konfiguraciji. Obzirom na asimetričnost sinaptičke pukotine, molekule SAM češće stupaju u interakcije heterofilne prirode, nego u homofilne. Presinaptički kompleksi za otpuštanje neurotransmitera regrutiraju vrlo specifične molekule SAM kao što su neureksini (43) što daje ujednačen okoliš gotovo svih presinaptičkih završetaka. Molekule SAM na postsinaptičkoj strani su vrlo različite te ovise o tipu i vrsti receptora, a specifične su za ekscitacijske i inhibicijske sinapse (38,39). Glavni predmet istraživanja u okviru ovog rada je neuroplastin (Np), postsinaptički pripadnik IgCAM obitelji molekula SAM.



*Slika 1.2.* Pojednostavljen grafički prikaz sinapse - dvokomponentno kontaktno mjesto između presinaptičkog (plavo) i postsinaptičkog (ljubičasto) neurona. Izrađeno u BioRender.com

### 1.3 Neuroplastin, Np

Visoko glikozilirani protein neuroplastin pripadnik je obitelji IgCAM molekula (52,53). Kao produkt jednoga gena (*NPTN*, *Nptn*), prepisuje se u dvije izoforme, Np55 i Np65, koje su građene od kratke citosolne regije, transmembranske  $\alpha$  uzvojnice, izvanstaničnih Ig2 i Ig3 domena, dok je strukturna razlika kod Np65 dodatna izvanstanična Ig1 domena (*Slika 2.*) (54,55). Izoforma Np55 pojavljuje se u gotovo svim tkivima dok se Np65 pojavljuje isključivo u moždanom tkivu kao sinaptički glikoprotein (52,54,56) s najjačim izražajem u amigdali, hipokampusu i strijatumu (55). Obje izoforme su visoko glikozilirane. Glikanski obrasci predstavljaju čak 38 % mase Np65 (25 kDa na 40 kDa

proteine mase) i 49 % mase Np55 (27 kDa na 28 kDa proteinske mase) (54). Zanimljivo je napomenuti da se glikozilacijski obrasci nalaze na domenama Ig2-Ig3 obje izoforme dok je Ig1 Np65 neglikoziliran vjerojatno zbog *in cis* te *in trans* protein-protein interakcija koje ostvaruje sa sinaptičkim partnerima (54,57). Uglikohidratni dio niskog je udjela visokomanoznih ostataka, dok najveći dio glikanske mase nose složeni ugljikohidratni motivi s jednakom količinom sijaliliranih ostataka u obje izoforme, ~ 5.5 kDa (54). Navedena strukturalna svojstva neuroplastina uzrokuju pojavnost širokih vrpci obje izoforme Np prilikom imunodetekcije što upućuje na veliki raspon glikanskih motiva proteina Np i postojanje podklasa proteina Np koje vjerojatno imaju specifične uloge u membranskom metabolizmu sinapsi i neurona.

### 1.3.1 Interaktom neuroplastina

Funkcionalne uloge neuroplastina dijele se na one specifične za neurone te ubikvitarne i neophodne za funkcioniranje organizma. Svojstveno svim stanicama, pokazano je da je protein Np uključen u aktivni transport  $\text{Ca}^{2+}$  preko stanične membrane. U studijama strukturne karakterizacije proteina PMCA pokazalo se da protein Np55 ostvaruje interakcije s ATPazom, te je u funkciji regulatorne podjedinice (Slika 1.3 B) (58,59). Kako je gotovo cijela populacija, 95% (59), proteina PMCA vezana za protein Np njegova uloga u homeostazi  $\text{Ca}^{2+}$  je univerzalna i od iznimne važnosti za održavanje ionske ravnoteže, ne samo u živčanom tkivu već u svim tipovima stanica (59,60). Također, literaturni izvori navode protein Np kao molekulu uključenu u održavanju homeostaze energetskog metabolizma neurona (61). Regulacijom i regrutacijom prijenosnika monokarboksilata 2 specifičnog za neurone (engl., *monocarboxylate transporter 2*, MCT2) u postsinaptičkom zgusnuću osigurava se neuronima dodatan izvor energije tijekom energetski zahtjevnih događaja (61). Kako pripada u IgCAM obitelj, bitna je komponenta komunikacije između stanica (62). U svojim radovima Owczarek i sur. (62) pokazali su kako mobilizirane Ig domene Np55 potiču neuritogenezu *in vitro* u neuronima hipokampusa procesima dimerizacije i aktivacije receptora FGFR (engl., *fibroblast growth factor receptor*). Uz navedene hipokampalne populacije, pokazan je utjecaj i na granularnim neuronima maloga mozga koji nakon izlaganja *in vitro* izvanstaničnim domenama Ig1–3 proteina Np65 pokazuju povišen stupanj neuritogeneze aktivacijom signalnog puta p38 MAPK (protein-kinaza aktivirana mitogenom, engl., *mitogen activated protein kinase*) preko već spomenutog receptora (57). Uz izrastanje neurita pokazano je da

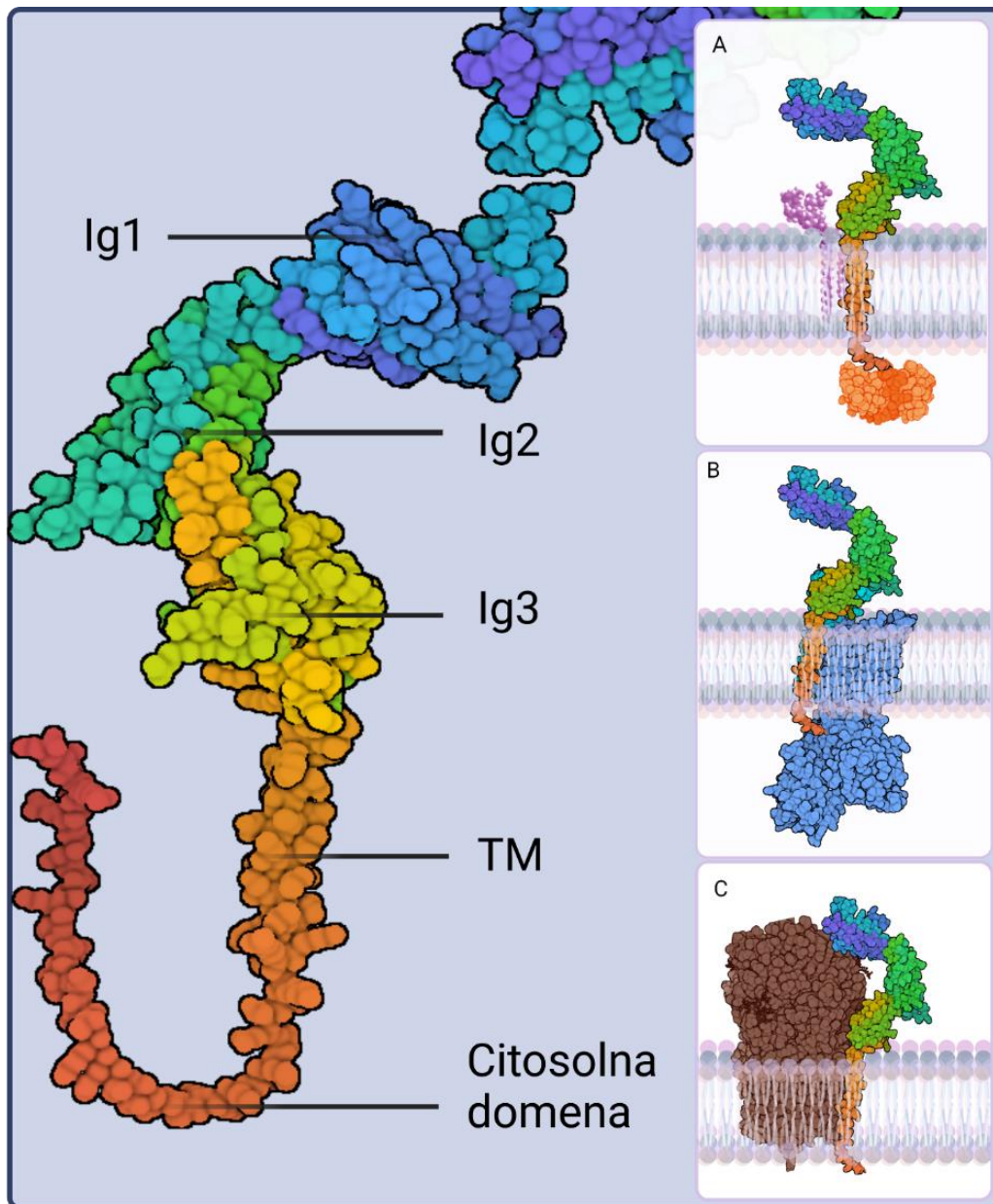


tretman moždanih rezova izvanstaničnim Ig domenama proteina Np65 uzrokuje internalizaciju AMPA receptora i zaustavljanje LTP-a u CA3 regiji hipokampusa (63,64). Ovi događaji vođeni su fosforilacijom p38 MAPK kao unutarstaničnog čvorišta signalnog puta ovisnog o proteinu Np (63). Kroz signalni put MAPK integrira se odgovor na izvanstanične podražaje i promjene u okolišu te se uređuje stanična aktivnost (65). Protein p38 koji aktivira protein-kinazu MAPK, osim klasičnog puta aktivacije interleukinima preko IL-1R (receptor interleukina-1, engl., *interleukine-1 receptor*) aktiviran je i signalnim putem TNF- $\alpha$  (engl., *tumor necrosis factor-alpha*) (65–67). Signalni put TNF- $\alpha$  mobilizira nizvodno protein TAB1 (engl., *TGF- $\beta$  activated kinase 1 (MAP3K7) Binding Protein 1*) i TRAF6 (engl., *TNF receptor associated factor*) koji pokreću signalni put p38 MAPK bez aktivacije klasičnih uzvodnih elemenata MAPK signalne kaskade. Pokazano je da međusobnim interakcijama proteina TAB1-TRAF6-p38 dolazi do autofosforilacije p38 MAPK koja dalje prenosi signal rezultirajući staničnim odgovorom neovisnim o uzvodnim protein-kinazama (65–67). Među novijim saznanjima o proteinu Np valja istaknuti da je pokazano kako unutarstanična regija proteina Np sadrži motiv koji veže protein TRAF6 (Slika 1.3. A) (51,68). Specifična interakcija između proteina Np i TRAF6 aktivira diferencijaciju na razini membranskog sustava koja uzrokuje strukturne promjene membrane svojstvenim neuronima. Vođeno interakcijama Np-TRAF6, na neuronima dolazi do izrastanja i formiranja dendritičkih filopodija što izravno utječe na sinaptogenezu te stvaranje ravnoteže između inhibicijskih/ekscitacijskih sinapsi (51). Tek će dodatne studije pokazati postoji li spregnuti mehanizam između proteina Np i aktivacije proteina p38 MAPK posredstvom proteina TRAF6. Za izoformu Np65, posebno su važne funkcije u sinaptičkom miljeu: odgovoran je za održavanje sinaptičke jakosti i plastičnosti mobiliziranjem GABA<sub>A</sub>R u inhibicijske sinapse (Slika 1.3. C) (69,70). Utišavanjem *Nptn* dolazi do disocijacije GABA<sub>A</sub>R iz inhibicijskih sinapsi u ekstrasinaptički prostor (69). Utjecaj na LTP pokazan je na rezovima mozga štakora nakon tretmana specifičnim protutijelom na protein Np65. Smalla i sur. (64) ističu homofilne interakcije proteina Np65 kao neizostavne čimbenike prilikom LTP-a u CA1 regiji hipokampusa i zaključuju da njihovim narušavanjem dolazi do prekida struja karakterističnih za LTP (63,64). Nadalje, poremećaji u LTP-u kod Np65KO štakora pokazali su pojavu retrogradne amnezije te promjene u ponašanju i procesima učenja i pamćenja (71,72) dok je za kompleks Np-PMCA pokazano da utječe na inicijalne procese LTP-a te njegovo održavanje preko

interakcije i modulacije receptora za AMPA i NMDA (73). Zbog navedenih utjecaja na procese u hipokampalnoj formaciji, predložena je uloga proteina Np kao kognitivnog pojačivača. Kako je ranije navedeno da je protein Np zadužen za prometovanje GABA<sub>A</sub>R, pokazano je da kod ishemijske ozljede u Np65KO životinja dolazi do gubitka neurona vjerojatno uslijed ekscitotoksičnog učinka neregulirane glutamatne transmisije (74). Mišji modeli s isključenim prepisivanjem obje ili samo izoforme Np65 pokazali su kako nedostatak proteina Np55 uzrokuje gluhoću zbog poremećene dinamike izmjene Ca<sup>2+</sup> u dlačicama osjetnih stanica Cortijevo organa (75).

### 1.3.2 Neuroplastin u membranskom okolišu

U membranskom okolišu, smještaj neuroplastina ovisi o gangliozidima i dominantno je vezan u LR (*Slika 1.3*). U miševa s nedostatkom enzima biosintetskog puta gangliozida, *St8sia1 null* kod kojih u tkivima nedostaju a i b serija gangliozida i *B4galnt1 null* s nedostatkom svih složenih gangliozida, promijenjen je izražaj proteina Np i narušena mu je pozicija u membrani (76). U hipokampusu *B4galnt1 null* miševa, imunohistokemijskom analizom, utvrđeno je da su razlike u izračaju proteina Np u usporedbi s kontrolnim uzorcima najveće u CA1 regiji gdje je predominantno izražen sadržaj gangliozida GM1 (77). Također promjena u raspodjeli između LR i nonLR te smanjen izražaj proteina Np praćen je istovjetnim promjenama izražaja svih izoformi PMCA s naglaskom na protein PMCA2 (78). Pokazano je da se proteinski kompleksi PMCA-Np stabiliziraju u lipidnim splavima obogaćenima gangliozidom GM1. Blokiranjem GM1 specifičnim protutijelom dolazi do promjene u trajanju struja Ca<sup>2+</sup> (78). Intuitivno slijedi, da narušavanje integriteta LR vodi do promjene pozicije PMCA-Np unutar membranskih domena, što uzrokuje promjenu u aktivnosti PMCA i dužeg trajanja koncentracijskih gradijenata Ca<sup>2+</sup>.



*Slika 1.3.* Strukturni model neuroplastina izrađen pomoću javno dostupnog sučelja AlphaFold; Ig – imunoglobulinske domene; TM – Transmembranska domena; A – Neuroplastin u kompleksu s gangliozidom GM1 i proteinom TRAF6 (PDB kod: 4Z8M); B – Neuroplastin u kompleksu s ionskom crpkom PMCA (PDB kod: 6A69); C – Neuroplastin u kompleksu s GABA<sub>A</sub> receptorom (PDB kod: 7PDB); Izrađeno u BioRender.com

#### 1.4 ATPaze tipa P

Adenozin-trifosfataze, ATPaze (engl., *ATPases*) tipa P su ubikvitarni proteini u svim carstvima živoga svijeta, dok su natrij/kalij-ATPaza (engl., *sodium(Na)/potassium(K) ATPase*, NKA) i PMCA, članovi obitelji ATPaza tipa P topološkog tipa II, esencijalni membranski proteini u viših eukariota (79,80). Vektorskim prijenosom kationa održavaju ionsku homeostazu. Specifičnost ATPaza tipa P topološkog tipa II postojanje je dodatne podjedinice koja nema katalitičku aktivnost, već funkciju molekularnog sustava za

navođenje koji pravilno pozicionira katalitičku podjedinicu u submembranske domene, stabilizira njezinu strukturu i sudjeluje u pravilnoj posttranslacijskoj obradi katalitičke podjedinice (79–81). Katalitička podjedinica  $\alpha$  i podjedinica  $\beta$  proteina NKA čine funkcionalni kompleks, dok je neuroplastin pandan podjedinici  $\beta$  u kompleksu s proteinom PMCA (58–60). Strukturno, proteini NKA i PMCA sastoje se od 10 transmembranskih (TM) regija od kojih 1-4 TM čine katalitičku jezgru, a ostatak 5-10 TM strukturnu i regulatornu domenu (79–81) (*Slika 1.4. i 1.5.*). Citosolna regija podijeljena je na 3 domene, pokretačku (engl., *actuator*; A) domenu između TM2 i TM3, nukleotid-vezujuću (engl., *nucleotide-binding*; N) domenu i fosforilacijsku (engl., *phosphorylation*, P) domenu između TM4 i TM5 (79–81) (*Slika 1.4. i 1.5.*). Fosforilacijom konzerviranog aspartatnog ostatka u P domeni pokreće se enzimski ciklus izmjene kationa (82). Za kompleks katalitičke i regulatorne podjedinice može se vezati modulacijski protein FXYD koji posjeduje evolucijski konzervirano vezno mjesto na katalitičkoj podjedinici ATPaza tipa P. Za ovaj kratki transmembranski protein pokazano je kako se vezanjem u kompleks proteina NKA ili PMCA ugađa aktivnost enzima ovisno o njegovom fosforilacijskom obrascu (83).

#### 1.4.1 Natrij/kalij-ATPaza

Procesom razmjene 3 intracelularna  $\text{Na}^+$  za 2 ekstracelularna  $\text{K}^+$  uz utrošak molekule ATP, protein NKA održava ionsku i osmotsku ravnotežu stanica (81). Obzirom na fiziološke zahtjeve stanice, protein NKA kodiran je različitim genima koji daju NKA jedinstvenih karakteristika. Katalitičke  $\alpha$  podjedinice proteina NKA prepisuju se s 4 različita gena (ATP1A1-4, Atp1a1-4), dok se regulatorna  $\beta$  i FXYD podjedinica prepisuju s 3 (ATP1B1-3, Atp1b1-3) odnosno 7 gena (FXYD1-7, Fxyd1-7) (84,85). Od moguće četiri izoforme katalitičke podjedinice, u moždanom tkivu izražene su 3. Ubikvitarna  $\alpha 1$  izoforma izražena je na svim stanicama živčanog sustava uz koju je na glijalnim stanicama predominantno izražena glijalna  $\alpha 2$  izoforma dok je  $\alpha 3$  izoforma heterogeno i točkasto izražena na GABAergičkim i glutamatergičkim neuronima (84). Razlikuju se po katalitičkim parametrima ovisno o supstratima ATP-u,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  i  $\text{Mg}^{2+}$  te osjetljivosti na njihovu koncentraciju. Podatci govore o razlici afiniteta prema  $\text{Na}^+$  kod izoformi podjedinica  $\alpha 1 > \alpha 2 > \alpha 3$ , dok je naponska osjetljivost podjedinica  $\alpha 2 > \alpha 1 > \alpha 3$  (84). Ova razlika u parametrima oslikava se na funkciji proteina NKA u pojedinim dijelovima neurona;  $\alpha 3$  izoforma daje prostora za nagomilavanje  $\text{Na}^+$  i trajanje  $\text{Na}^+$  koncentracijskih

gradijenata u sinapsama, dok joj visoki afinitet prema ATP omogućuje da u sinaptičkom prostoru, energetski najzahtjevnijim dijelovima neurona, neometano može vezati ATP i brzo i učinkovito održavati ionsku ravnotežu u prostoru i vremenu (84). Izoforma  $\alpha 1$  je odgovorna za bazalnu aktivnost izmjene  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  (84). Osim ovih parametara kombinacija heterodimera  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica pridonosi raznolikosti populacije proteina NKA. Njezina aktivnost se utišava fosforilacijom  $\alpha$  podjedinice (86,87).

#### 1.4.2 Interaktom natrij/kalij-ATPaze

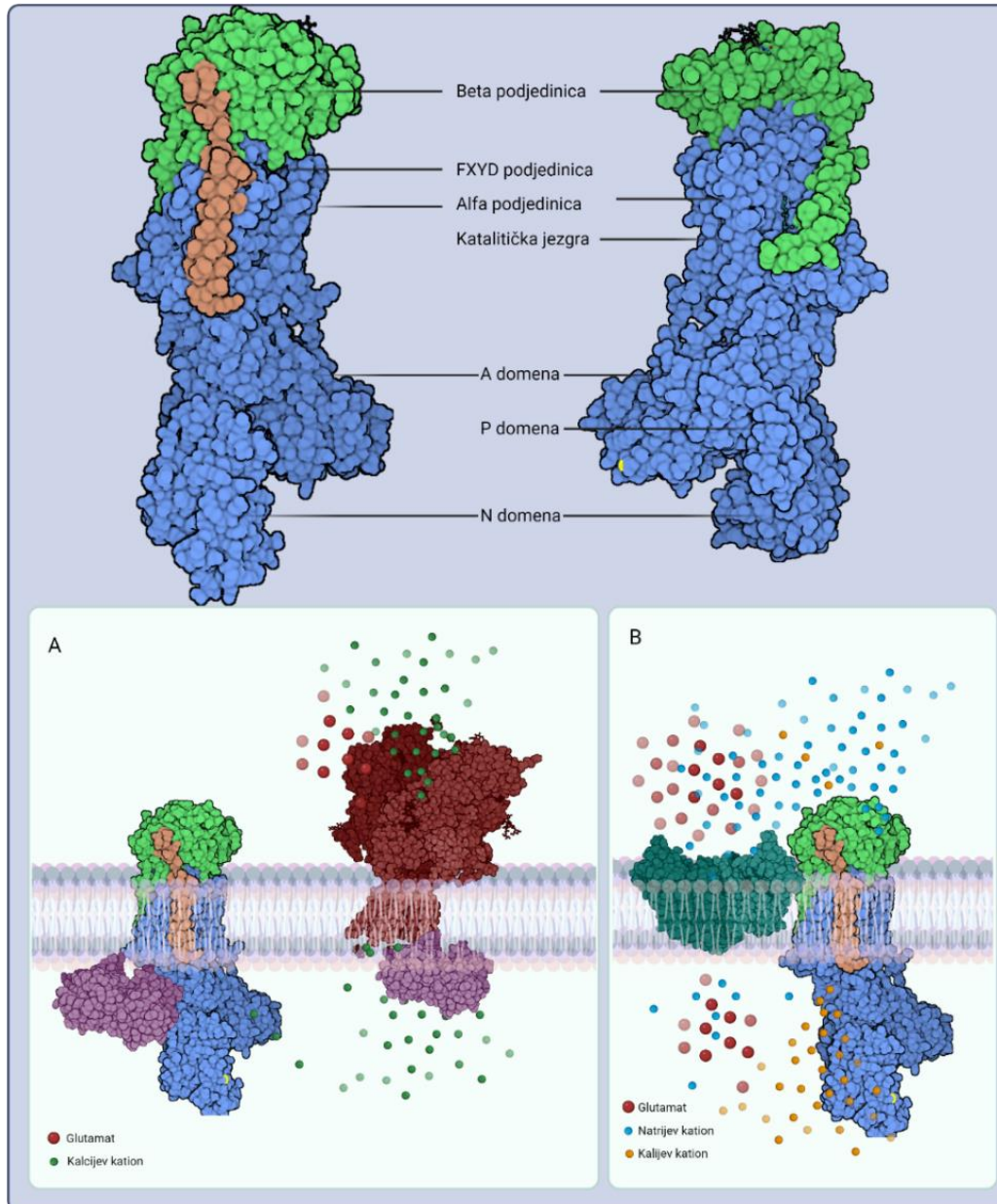
Funkcija proteina NKA ovisi o partnerskim odnosima s membranskim receptorima, prijenosnicima te regulatornim elementima ispod površine membrane. Uz katalitičku funkciju poznato je da vezanjem kardi toničnih steroida (engl., *cardiotonic steroids*, CTS) vrši funkciju 'receptora' (88–90). Katalitička podjedinica NKA proteinski je partner kinaze Src koja u neuronima ima ulogu u organizaciji elemenata postsinaptičke gustoće. Vezanjem CTS za ovaj bimolekularni kompleks, struktura NKA gubi fleksibilnost te postaje receptor preko kojeg se prenosi signal. Osim što fosforilira NKA, Src kinaza poznata je po fosforilaciji sinaptičkih receptora i strukturnih elemenata, NMDAR, AMPAR,  $\text{GABA}_{\text{A}}$ AR, PDS95, kaveolinom, što uzrokuje promjenu u aktivnosti i mobilnosti receptora (91). Tretman neurona glutamatom u kulturi dovodi do pojačane aktivnosti NKA (92,93). Ovaj učinak glutamata na NKA potvrđen je na rezovima mozga štakora te se tumači aktivacijom više različitih signalnih puteva. Pokazano je da je jedna od osi koja pojačava rad proteina NKA os glutamat-NO-cGMP (92). Struja  $\text{Ca}^{2+}$  koja nastaje aktivacijom receptora NMDA aktivira neuronalnu sintazu dušikovog oksida (engl., *neuronal nitric oxide synthase*, nNOS). Nastali NO aktivira citosolnu gvanilat-ciklazu (engl., *soluble guanylyl cyclase*, sGC). Potaknuta supstratom, cGMP-ovisna protein-kinaza (engl., *cGMP-dependant protein kinase*, PKG) fosforilira seriju proteina među kojima je i FXYD podjedinica NKA (92,94). Koristeći se inhibitorima receptora za glutamat, pokazano je da izostanak aktivacije NMDAR, AMPAR i KAR (kainatni receptor) rezultira povećanom aktivnošću  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$  podjedinice dok ima vrlo maleni učinak na aktivnost  $\alpha 1$  podjedinice NKA (95). Povratno, inhibicija neuron-specifičnih izoformi NKA vodi u promjenu dinamike prometovanja AMPAR u membranskom sastavu zbog promjene broja AMPAR izloženih u sinaptičkim pukotinama (96). Učinak poticanja proteina NKA glutamatom u potpunosti se gubi inhibicijom NMDAR (*Slika 3.A*) (92,97). Pretpostavka je da brzi ulazak  $\text{Ca}^{2+}$  aktivira kalcineurin,  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin-ovisnu protein-fosfatazu koja poništava efekt

protein-kinaze C (PKC) na NKA $\alpha$  i potiče izmjenu Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup>. Tijekom LTP-a, vjeruje se da specifični podražaji NMDAR nastaju udruživanjem i fosforilacijom NMDAR kinazom Src koju je prethodno aktivirala PKC. Podražljivost je osigurana sporijom izmjenom iona zbog fosforilacije NKA protein-kinazom C. CTS potiče prepisivanje i membranski izražaj NMDAR (95). U studiji na primarnim kulturama malog mozga štakora uočena je aktivacija puta NF- $\kappa$ B nakon tretmana CTS-om (98). Aktivacija ovog puta djelomično se ostvaruje preko osi NMDAR-Src-Ras-MAPK. Pokazano je da aktivnost NKA u astrocitima ovisi o glutamatergičkoj transmisiji. Prijenos glutamata unutar astrocita ovisi pak o koncentracijskom gradijentu kojeg generira NKA (99). Glutamatni prijenosnik EAAT2 (engl., *excitatory amino acid transporter 2*) prenosi glutamat, 3 Na<sup>+</sup> i H<sup>+</sup> iz sinaptičke pukotine u citosol te je odgovoran za 90% prijenosa glutamata (*Slika 3.B*). Vjeruje se da u astrocitima protein NKA stvara komplekse s proteinom EAAT2 i kinazom Src. Utvrđeno je da je protein EAAT2a izražen s NKA $\alpha$ 2 u astrocitima, dok je protein EAAT2b izražen s NKA $\alpha$ 3 u neuronima ukazujući na učinkovitost spregnutih mehanizama izmjene iona i neurotransmitera (92). Lepeza aktivnosti u koje je uključen protein NKA izravno utječe na funkcionalnost astrocita, neurona i pojedinih sinaptičkih elemenata i procesa.

### 1.4.3 Natrij/kalij-ATPaza i lipidni okoliš

NKA pokazuje promjene u aktivnosti ovisno o lipidima u membranskom okolišu u koji je uronjena (100,101). N-terminalna regija NKA bogata je pozitivno nabijenim lizinskim ostacima koji su u interakciji s negativno nabijenim lipidima i moguće proteinima (102). NKA ostvaruje niz interakcija s lipidima te je ustanovljeno kako kolesterol, neutralni fosfolipidi unutrašnje membrane, sfingomijelin i fosfolipidi sa zasićenim masnim kiselinama utječu na pokretljivost TM NKA. Ove interakcije posljedično se odražavaju na učestalost izmjene Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> (103–105). Kolesterol se veže na 2 različita mjesta; vezanjem između  $\alpha$  i FXYD podjedinice donosi strukturni integritet kompleksu, a vezanjem između  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice onemogućuje pokretanje i utišava rad crpke (103,104). Neutralni fosfolipidi potiču rad NKA dok ga sfingomijelin i zasićene masne kiseline fosfolipida zaustavljaju (103,104). Uz navedeno, na pripravcima sinaptosoma pokazano je da se aktivnost NKA pojačava uz dodatak nanomolarne koncentracije GM1 (106). Radovi naše skupine pokazali su da promjena membranskog okoliša utječe na učinkovitost crpke. Preraspodjela gangliozida u membrani, ponajviše

glavnih frakcija GM1, GD1a, GD1b i GT1 djeluje na enzimski obrtaj NKA (107). U membrani postoje aktivna i inaktivna populacija NKA. Vjeruje se da je aktivni dio populacije u lipidnim splavima, dok je neaktivni u kaveolama, posebnoj podklasi lipidnih splavi (90,108).



*Slika 1.4.* Natrij/Kalij-ATPaza (NKA) – strukturni model i karakteristike NKA (PDB kod: 2ZXE); A – u neuronima, NKA u kompleksu sa kinazom Src (PDB kod: 2SRC) uz regulatorni kompleks NMDAR (PDB kod: 4PE5), Src kinaze i PSD95 (PDB kod: 2XKX); B – U astrocitima, NKA u kompleksu s prijenosnikom za glutamat, EAAT2 (PDB kod: 7XR4) s NKA-ovisnim spregnutim prijenosom glutamata i Na<sup>+</sup>. Izrađeno u BioRender.com

#### 1.4.4 Kalcijaska ATPaza stanične membrane

Sinapse, kao i ostatak unutarstaničnog sadržaja, sadrže niske koncentracije Ca<sup>2+</sup>, pa stvaranje koncentracijskih gradijenata Ca<sup>2+</sup> postaje najbitniji čimbenik prilikom stvaranja



signala u neuronima (109). Aktivnošću proteina PMCA i SERCA (Sarko/endoplazmatska kalcijeva ATPaza) koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  održava se u rasponu nmol- $\mu\text{mol}$  koncentracije (109,110). Obzirom na tip tkiva i stanične potrebe metabolizma, PMCA dolazi u različitim izoformama. Četiri izoforme prepisuju se s četiri različita gena (*ATP2B1-4*, *Atp2b1-4*) koji daju: PMCA1 i PMCA4 najzastupljenije i ubikvitarne izoforme, dok su PMCA2 i PMCA3 neuronalne izoforme koje su filogenetski najmlađe i pojavljuju se kod organizama s kompleksnim živčanim ustrojstvom (111–113). Regulatorna podjedinica i karika koja spaja PMCA sa sinaptičkim partnerima, ranije je spomenuti protein Np (58–60). Enzimski obrtaj PMCA1 i 4 je sporiji, dok je kod PMCA2 i 3 izrazito brz (114,115). Uz razlike u katalitičkoj jakosti, alternativnim prekrajanjem na mjestima A (domena A) i C (C-terminalni kraj) nastaju 23 varijante PMCA s različitim biokemijskim kvalitetama: 5 varijanti PMCA1, 6 varijanti PMCA2, 4 varijante PMCA3 i 8 varijanti PMCA4 (115). U domeni A PMCA veže se C-terminalna petlja koja onemogućuje vezanje ATP-a u domenu N pa se prekrajanjem u domeni A dobivaju varijante s različitim stupnjem jačine autoinhibicije C-terminalnom petljom (114–117). Domena A je u bliskom kontaktu s membranskim lipidima pa strukturne preinake utječu na vezanje lipida i katalitičku aktivnost ovisnu o kiselim fosfolipidima, PIP i PS (118). Najvarijabilniji dio PMCA je C-terminalni kraj u kojem je smještena C regija prekrajanja. C-terminus vezno je mjesto za mnoge proteinske partnere, no najznačajniji učinak na aktivnost ima kalmodulin, CaM (114,119). Promjene u veznom mjestu za CaM daju varijante koje su ovisne ili neovisne o CaM. Primjer različitih biokemijskih parametara su PMCA2b i PMCA4b. Varijanta 2b ima visoku bazalnu aktivnost i nizak afinitet prema CaM-u dok varijanta 4b pokazuje aktivaciju ovisnu o CaM s niskom bazalnom aktivnošću (120,121). Između ostalog, C-kraj je supstrat protein-kinazama A i C te kinazi Src koje dodatno reguliraju aktivnost PMCA i vezno mjesto za sinaptičke elemente (122,123). Analizom sinaptičkih membrana utvrđeno je da se 60% populacije PMCA smješta u kaveolin-obogaćene lipidne splavi (120,124). Aktivnost PMCA ovisi o gangliozidnom okolišu, ponajviše o GM1 (78).

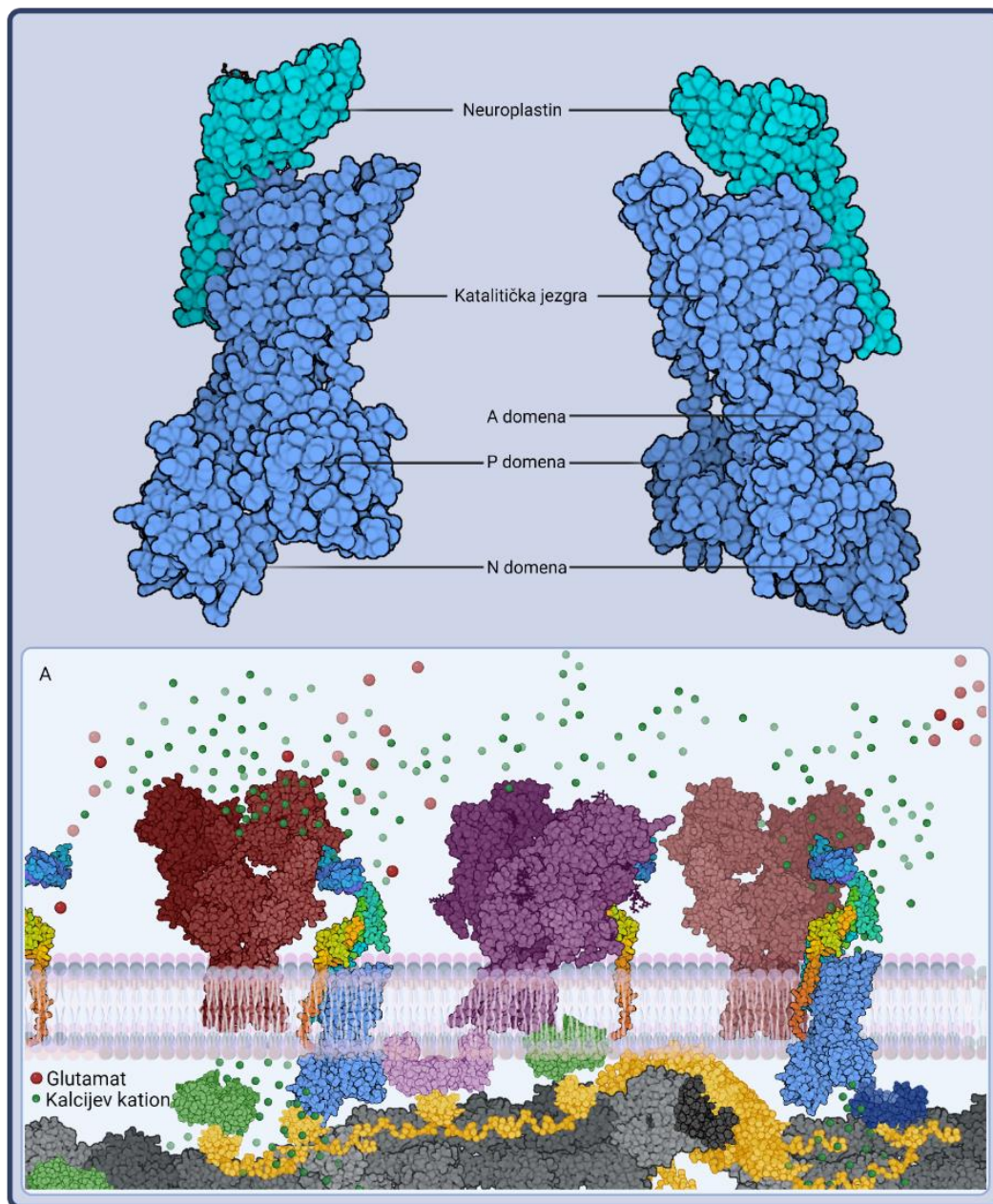
#### **1.4.5 Interaktom kalcijske ATPaze stanične membrane**

Stanice neurona strateški pomoću PMCA stvaraju lokalne  $\text{Ca}^{2+}$  oskudne, engl. *Ca<sup>2+</sup>-free*, zone u kojima se postrojavaju kompleksi i elementi osjetljivi na koncentraciju  $\text{Ca}^{2+}$  (115). PMCA dolazi s bogatim strukturnim razlikama omogućujući okupljanje različitih proteina u anularnoj regiji tvoreći jedinstvene  $\text{Ca}^{2+}$ -ovisne signalizacijske jedinice



(49,123). Može se zaključiti da je signalizacija kalcijevim ionima regulirana unutar uskih niša pojedinog signalizacijskog kompleksa što čini PMCA središnjom figurom pomoću koje trajanje impulsa i promjena u  $\text{Ca}^{2+}$  koncentraciji dobivaju informacijsku vrijednost. Proteinski partneri PMCA su receptori, prijenosnici, vezikularni proteini fuzijskog mehanizma, strukturni i regulatorni elementi postsinaptičkog zgusnuća (115,119,122,123). Presinaptički procesi endo- i egzocitoze sinaptičkih vezikula su mehanizmi ovisni o  $\text{Ca}^{2+}$ . PMCA u kompleksima s  $\text{Ca}^{2+}$  naponskim kanalima  $\text{Ca}_v1-2$  regulira dinamične procese izbacivanja neurotransmitera u sinaptičku pukotinu (125). Protein SNARE kompleksa, sintaksin, interakcijski je partner PMCA,  $\text{Ca}^{2+}$  naponskih kanala i Munc1-18 komponente SNARE kompleksa (123). Spregnutim djelovanjem, otvaranjem  $\text{Ca}^{2+}$  naponskih kanala, proteini SNARE kompleksa, Munc1-18, sinaptotagmin i kompleksin vežu  $\text{Ca}^{2+}$  te promjenom konformacije i stezanjem, pokreću  $\text{Ca}^{2+}$ -ovisnu fuziju vezikula s presinaptičkom membranom i otpuštanje neurotransmitera u sinaptičku pukotinu. Postsinaptički partneri PMCA su ionotropni receptori za glutamat AMPA i NMDA (73,116). Tijekom procesa LTP-a, u početnim stadijima pokazano je da Np65 uređuje aktivnost PMCA i interakciju s NMDAR, dok u kasnijoj fazi za održavanje LTP-a mobilizira AMPAR (73). PMCAb varijante na C-terminusu posjeduju motiv koji veže PDZ domene sinaptičkih elemenata poput PDS95/Dlg/ZO-1 (115,122). Iako posjeduju ovaj motiv, PMCAb nisu isključivo važne za vezanje proteina, dok PMCA2b može vezati regulacijski čimbenik  $2 \text{Na}^+/\text{H}^+$  izmjenjivača (engl., *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 2*, NHERF2), a PMCA4b ne može što govori u prilog biokemijskoj raznolikosti  $\text{Ca}^{2+}$  vektorskih kompleksa (115). PMCA regulira nNOS-ovisne signalne kaskade te je proteinski partner CASK (engl., *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependant serine protein kinase*), članica obitelji gvanilat-kinaza pridruženih membrani (engl., *membrane-associated guanylate kinase*, MAGUK) (115). MAGUK su zadužene za slaganje postsinaptičkih elemenata u funkcionalne jedinice, reguliraju signalizacijske puteve te uređuju sinaptički prostor. U kaveolama granularnih neurona, pokazana je sprega procesa  $\text{Ca}^{2+}$  i redoks signalizacije (124,126). Utvrđeno je udruživanje elemenata  $\text{Ca}^{2+}$  uzvodnog i nizvodnog prijenosa, pa se  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  izmjenjivači i PMCA nalaze u neposrednoj blizini NMDAR i naponskih  $\text{Ca}^{2+}$  kanala uz nNOS i citokrom b-reduktazu (124). U ovakvim kompleksima dinamika struja  $\text{Ca}^{2+}$  djeluje na više različitih puteva regulirajući i ugađajući informaciju nastalu

gradijentom  $\text{Ca}^{2+}$ . Višestruka uloga i funkcija PMCA smješta je među proteine koji reguliraju sinaptičke procese od stvaranja signala, prijenosa pa do integracije.



*Slika 1.5.* Kalcijaska ATPaza stanične membrane (PMCA) - strukturna obilježja PMCA; A - postsinaptička membrana s PMCA u kompleksu s Np te proteinski partneri CaM (tamno plavo; PDB kod: 6N5W) AMPAR (crveno; PDB kod: 5L1F), NMDAR (ljubičasto), Src-kinaza (zeleno), 14-3-3 kinaza (ružičasto; PDB kod: 6EIH), PSD95 (žuto; PDB kod: 2XKX, 3K82), aktin (sivo; PDB kod: 6BNO ); CASK (crno; PDB kod: 1KGD). Izrađeno u BioRender.com

## 1.5 Toll-u sličan receptor 2

Obitelj proteina TLR (engl., *Toll-like Receptor*), s najvećim izražajem na stanicama imunološkog sustava, zadužena je za održavanje homeostaze organizma (127–129). Zadaća ovih proteina nadziranje je izvanstaničnog prostora i signaliziranje u prisutnosti

molekularnih signala i obrazaca karakterističnih za patogene ili nastalih uslijed ozljede (engl., *pathogen/danger associated molecular pattern*, PAMP/DAMP) (127). Tako primjerice izoforma TLR2 prepoznaje specifične bakterijske lipopolisaharide (LPS) i stanične proteine HSP (130–133). Prilikom vezanja liganda, TLR2 dimerizira s TLR1 ili TLR6, aktivira se i nizvodno mobilizira protein-kinaze i ubikvitin-ligaze preko adaptorskih proteina. Krajnji odgovor aktivacije jest pokretanje signalnog puta NF- $\kappa$ B i priprema imunološkog sustava za odgovor na nastalu ozljedu ili navođenje stanice u programiranu staničnu smrt, apoptozu (134,135). Treba dodati da se u neuronima aktivira TLR2-neovisan signalni put NF- $\kappa$ B (136,137). Glutamatna transmisija aktivira put NF- $\kappa$ B koji u ekscitacijskim neuronima potiče rast spina i ustrojavanje ekscitacijskih sinapsi, a u inhibicijskim održava tonus inhibicije koji se izvršava na ekscitacijske neurone (136). Važni čimbenici prilikom integriranja signala su proteini MyD88 (engl., *myeloid differentiation primary response 88*) i TIRAP (engl., *TIR-domain adaptor protein*). Međusobnim interakcijama stvaraju kompleks i vežu adaptorski protein E3-ligazu TRAF6 (134,138–141). Udruživanje s proteinima TAB ili IRAK u konačnici dovodi do oslobađanja i premještanja proteina NF- $\kappa$ B iz citoplazme u jezgru, gdje kao transkripcijski čimbenik potiče prepisivanje NF- $\kappa$ B-ovisnih gena. Osim uloge u imunološkom sustavu, nekolicina proteina obitelji TLR, uključujući TLR2, pokazuje prisutnost mRNA i proteinskog produkta u gotovo svim stanicama moždanoga tkiva, od živčanih matičnih stanica do svih tipova neurona i stanica glije (142–145). Bitna uloga TLR2 u razvoju mozga pokazana je u regulaciji diferencijacije živčanih matičnih stanica (NPS, engl., *neuronal progenitor cells*, NPC) i matičnih stanica oligodendrocita (OPS, engl., *oligodendrocyte progenitor cells*, OPC) (143,146). Kombinirana aktivacija receptora TLR na matičnim stanicama živčanog sustava uzrokuje različite sudbine omogućujući pravilnu kontrolu izgradnje i održavanja neuronalne i glijalne citoarhitekture (142). U istraživanjima mišjeg modela kojemu nedostaje protein TLR2 najviše pažnje je posvećeno praćenju imunološkog odgovora na različite ozljede (147–152), neuroinflamaciji (153–155) i ulozi u razvitku mozga (156–158). Unatoč širokom području istraživanja u kojima se koristi mišji model s isključenim TLR2, nedostaju sustavni podaci koji bi omogućili bolju karakterizaciju njegovog biokemijskog i bihevioralnog fenotipa.

### 1.5.1 Specifična obilježja živčanog sustava bez prisutnosti TLR2

Kako je područje neuroimunologije još uvijek usmjereno na biokemiju i fiziologiju homeostatskih događaja u koja je uključen TLR2, jako je malo radova posvetilo pažnju funkcionalnosti TLR2 tijekom neurorazvojnih procesa obzirom da je TLR2 dio membranskog proteoma NPC-a. Okun i sur., pokazali su kako TLR2 utječe na diferencijaciju NPC-a te se njome regulira diferencijacijska sudbina živčanih stanica (146). Dodatno, radovi na gravidnim ženkama miševa koje su razvile bakterijsku infekciju i tretirane su antibiotikom ukazali su da nastali bakterijski LPS iz krvi ženki prelazi posteljicu i utječe na neurorazvojne procese mladunaca (159,160). Mladunci ženki koje su preboljele infekciju i mišji model TLR2KO pokazuju isti fenotip živčanog sustava. U slojevima moždane kore mozga muških mladunaca povećana je populacija neurona te je promijenjena citoarhitektura moždane kore. Nadalje, pokazano je da TLR2 utječe na stanični ciklus NPC-a i njihov diferencijacijski kapacitet. Ove informacije daju naslutiti da TLR2 ima endogeni supstrat koji utječe na broj mladih neurona koji se potom pravilno pozicioniraju u funkcionalnu 3D strukturu, a umrežavanjem daju informacijske puteve moždane kore. Zanimljiva je jedna bihevioralna studija na mladim TLR2KO miševima koja govori o njihovom shizofrenom obrascu ponašanja (161). Na životinjama je provedeno sveukupno 13 testova ponašanja: 4 testa raspoloženja, 3 testa socijalnog ponašanja, 4 testa učenja i pamćenja te 1 senzorno-motorički i 1 motorički test, te su razlike uočene u više od 90% analiziranih bihevioralnih parametara. Zaključak o shizofrenom obrascu ponašanja kod ovog mišjeg modela donesen je na temelju praćenja učinaka antipsihotika koji su pokazani samo u senzorno-motoričkom ponašanju. Druga bihevioralna studija tematizira promjene u ponašanju tijekom starenja TLR2KO miševa (156). Pokazano je da TLR2KO miševi starenjem gube kognitivne i motoričke funkcije brže no kontrolna skupina, dok kod mladih jedinki nema promjena u odnosu na kontrolnu skupinu. O biokemijskom i bihevioralnom fenotipu mišjeg modela TLR2KO nema dovoljno saznanja, no ako uzmemo u obzir neurorazvojne studije i svega nekoliko bihevioralnih studija (156,161,162) može se zaključiti da su životinje prirodnog ponašanja iako im je moždana arhitektonika vrlo različita. Nameće se zaključak da je navedeni TLR2KO fenotip vijabilan i vjerojatno učestao u populaciji, no, također, se nameće i pitanje ima li ovaj fenotip za posljedicu određene bihevioralne obrasce u miševa koji se ne mogu mjeriti, a opisani su kod ljudi.

### 1.5.2 Međudjelovanje TLR2 i neuroplastina tijekom razvoja mozga

Na temelju podataka dostupnih u znanstvenoj literaturi može se pretpostaviti međudjelovanje proteina TLR2 i Np budući da je pokazano kako protein TLR2 ima ulogu u određivanju broja neurona, dok protein Np orkestrira izrastanje sinapsi i definira informacijske puteve. Njihovim djelovanjem, koje je odvojeno u prostoru i vremenu, izgrađuje se funkcionalna mreža neurona i signalnih puteva. Valja napomenuti da proteini TLR2 i Np dijele adaptorski protein TRAF6 preko kojeg aktiviraju jedinstvene signalne puteve zadužene za promjene na staničnoj razini, NPC > aktivacija TLR2 > neuron/astrocit, te na lokalnoj razini neurona, Np > interakcije *in trans* > aktivacija MAPK > sinaptogeneza.

Svrha ovog rada bila je detaljno istražiti učinak nedostatka TLR2 u središnjem živčanom sustavu miševa na odabrane membranske proteinske sustave bitne za procese sinaptičke plastičnosti i prijenosa iona, temeljeno na pretpostavci o ulozi proteina TLR2 u održavanju omjera neurona i astrocita te funkcijama sinaptičkog miljea. Dodatno, membranski okoliš u živčanom sustavu pokazuje izuzetnu dinamiku koja omogućuje ključne stanične procese pa se nedostatak receptora TLR2 može odraziti na sve membranske sastojke, od lipida do proteina. Metodološki pristup korišten u ovom radu za istraživanje membranskog okoliša u izoliranim regijama mišjeg mozga razjašnjava odlike biokemijskog fenotipa TLR2KO miševa i predstavlja doprinos rasvjetljavanju funkcionalne uloge receptora TLR2 i utjecaju njegove (in)aktivacije u procesu izgradnje neuroarhitektonike.

## **2. HIPOTEZA**

Nedostatak receptora sličnog Toll-u 2 utječe na izraženost i submembranski smještaj neuroplastina i ATPaza tipa P u mozgu miša.

### **3. CILJEVI RADA**

#### **Opći cilj**

Odrediti izraženost i smještaj neuroplastina i ATPaza tipa P u moždanoj kori, hipokampusu i malom mozgu mišjeg modela B6.129-Tlr2tm1Kir/J, te istražiti moguću funkcionalnu povezanost proteina TLR2 i neuroplastina.

#### **Specifični ciljevi**

**I)** odrediti promjene u sinaptičkom proteomu u moždanim regijama miševa s nedostatkom proteina TLR2 u usporedbi s miševima divljeg tipa;

**II)** odrediti gensku i proteinsku izraženost neuroplastina, ATPaza tipa P u hipokampusu, malom mozgu i moždanoj kori u miševa s nedostatkom proteina TLR2 u usporedbi s miševima divljeg tipa;

**III)** analizirati tkivnu zastupljenost neuroplastina i ATPaza tipa P u pojedinim moždanim regijama u miševa s nedostatkom proteina TLR2 u usporedbi s miševima divljeg tipa;

**IV)** odrediti glikolipidomski profil hipokampusa i malog mozga miševa bez proteina TLR2 u usporedbi s miševima divljeg tipa;

**V)** utvrditi utjecaj nedostatka proteina TLR2 na submembranski smještaj neuroplastina i ATPaza tipa P;

**VI)** odrediti aktivnost ATPaza tipa P u uzorcima tkiva hipokampusa i malog mozga miševa bez proteina TLR2 i miševa divljeg tipa.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1 MATERIJAL

#### 4.1.1 Etička odobrenja i usklađenost pokusa s ARRIVE smjernicama

Rad s mišjim modelima odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u okviru HRZZ projekta „Molekularni biljezi vulnerabilnosti, adaptacije i plastičnosti neurona u akutnoj i kroničnoj ozljedi mozga“ (IP-2016-06-8636). Pokusne životinje uzgajane su i korištene u pokusima u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/2017), Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/2013) te Direktivom 2010/63/EU Parlamenta Europske unije. Pokusi su dizajnirani, planirani i izvođeni prema smjernicama ARRIVE 2.0 za rad s laboratorijskim životinjama uz poštovanje načela 3R (163).

#### 4.1.2 Pokusne životinje i uvjeti uzgoja životinja

U svrhu istraživanja uključeno je ukupno 68 životinja (*Tablica 4.1.2.*). Korišteni su miševi muškog spola u dobi od 3 do 4 mjeseca. Životinje su korištene isključivo u svrhu uzorkovanja tkiva, i nisu podvrgnute dodatnim eksperimentalnim postupcima. Istraživanje je provedeno na uzorcima živčanog tkiva mišjeg modela s utišanim genom za protein TLR2, B6.129-Tlr2<sup>tm1Kir</sup>/J(Tlr2<sup>-/-</sup>, engl., *TLR2KO* (Tlr2 *knock-out*)), te na tkivu kontrolnih miševa divljeg tipa usklađenih po dobi i spolu, mišji model visoko srođenog soja C57Bl/6NCrl (divlji tip, DT, engl., *Wild type*, WT). Mišji model soja B6.129-Tlr2<sup>tm1Kir</sup>/J proizveden je u tvrtki The Jackson Laboratory. Životinje TLR2KO su imunokompromitirane te nakon administracije bakterijskog LPS-a imuni sustav životinja ne rezultira proizvodnjom TNF alpha i interleukina kao biljega upalnog odgovora organizma. Jedinke su bez promjena u ponašanju i fiziološki istovjetne životinjama WT. Dodatne informacije i pojedinosti o genotipu i fenotipu TLR2KO miševa dostupni su na mrežnim stranicama tvrtke The Jackson Laboratory, a mišjeg soja C57Bl/6NCrl u dokumentaciji tvrtke Charles River. Miševi oba soja korišteni su uz ljubaznost i odobrenje prof. dr. sc. Srećka Gajovića, prof. dr. sc. Dinka Mitrečića i doc. dr. sc. Marine Radmilović sa Zavoda za histologiju i embriologiju, Medicinskog fakulteta u Zagrebu.



*Tablica 4.1.1.* Broj životinja korišten za pojedinu metodu istraživanja. 1. spektrometrija masa, 2. kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (qRT-PCR), 3. metoda *Western blot*, 4. imunohistokemija moždanih rezova (IHC), 5. izolacija i analiza gangliozida, 6. izolacija i analiza sastava lipidnih splavi, 7. određivanje katalitičke aktivnosti ATPaza tipa P

Metoda	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Broj životinja (kontrolna skupina, WT + TLR2KO)	4+4	5+5	5+5	3+3	6+6	6+6	5+5

Navedene linije miševa uzgajane su u prostorima Odsjeka za laboratorijske životinje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga pri Medicinskim fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. Životni uvjeti uzgoja definirani su ciklusima dan/noć u intervalima od 12 sati (12/12), od 7-19 sati uz stalno održavanje temperature i vlažnosti zraka. Hrana i voda bile su dostupne životinjama *ad libitum*. Prozirni polisulfonski kavezi propisani europskim standardima tip 3 (1290D, Tecniplast, Italy) korišteni su za uzgoj i smještaj životinja. Okoliš je bio obogaćen predmetima za igru.

#### 4.1.3. Primarna i sekundarna protutijela

Za utvrđivanje prisutnosti, izražaja i smještaja izabranih proteina metodama *Western blot* i imunohistokemijskim metodama analizom imunofluorescentnog signala korištena su primarna i sekundarna protutijela, navedena u tablici 4.1.2.

*Tablica 4.1.2.* Popis primarnih i sekundarnih protutijela korištenih za detekciju odabranih proteina metodama *Western blot* (WB) i imunofluorescencije (IF)

Primarna protutijela				
Naziv protutijela	Klasa protutijela	Porijeklo	Proizvođač i kataloški broj	Radno razrjeđenje
Anti-Neuroplastin (Np)	Poliklonalno, IgG	Ovca	R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD, AF7818	WB 1:1000 IF 1:200
Anti-Neuroplastin 65 (Np65)	Poliklonalno, IgG	Koza	R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD, AF5360	WB 1:1000 IF 1:200
Anti-Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPaza ( $\alpha$ 1) (NKA)	Monoklonalno, IgG	Kunić	Abcam, Cambridge, UK, AEP1845Y	WB 1:50000 IF 1:500
Anti-Membranska Ca <sup>2+</sup> ATPaza izooblik 1 (PMCA1)	Monoklonalno, IgG	Kunić	Abcam, Cambridge, UK, ab190355	WB 1:1000 IF 1:200
Anti-Membranska Ca <sup>2+</sup> ATPaza izooblik 2 (PMCA2)	Poliklonalno, IgG	Kunić	Abcam, Cambridge, UK, ab3529	WB 1:1000 IF 1:200
Anti-Membranska Ca <sup>2+</sup> ATPaza izooblik 3 (PMCA3)	Poliklonalno, IgG	Kunić	Novus Biologicals, Bio-Techne Ltd., Abingdon, UK, NBP1-59465	WB 1:1000 IF 1:200

Anti-Membranska Ca <sup>2+</sup> ATPaza izooblik 4 (PMCA4)	Monoklonalno, IgG	Miš	Abcam, Cambridge, UK, ab2783	WB 1:1000 IF 1:200
Anti-TNF receptoru pridruženi faktor 6 (TRAF6)	Monoklonalno, IgG	Kunić	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA,	WB 1:1000
Anti-Transferinski receptor (TfR)	Monoklonalno, IgG	Miš	Thermo Fisher, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA, 136800	WB 1:1000
Anti-Membranski glikoprotein Thy1 (Thy1)	Monoklonalno, IgG	Štakor	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA, 553009	WB 1:1000
Anti-Flotilin (Flot)	Monoklonalno, IgG	Miš	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA, 610821	WB 1:1000
Podjedinica beta toksina kolere (CTB) konjugirana HRP-om	Rekombinantni	/	Thermo Fisher, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA, C34780	WB 1:50000
<b>Sekundarna Protutijela</b>				
Anti-mišje protutijelo HRP- konjugirano	Poliklonalno, IgG	Magarac	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, SAD, 715- 035-150	WB 1:50000
Anti-zečje protutijelo HRP- konjugirano	Poliklonalno, IgG	Magarac	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, SAD, 711- 035-152	WB 1:50000
Anti-kozje protutijelo HRP- konjugirano	Poliklonalno, IgG	Magarac	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, SAD, 705- 035-003	WB 1:50000
Anti-ovčje protutijelo HRP- konjugirano	Poliklonalno, IgG	Magarac	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, SAD, 713- 035-147	WB 1:50000
Anti-štakorsko protutijelo HRP-konjugirano	Poliklonalno, IgG	Magarac	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, SAD, 712- 005-150	WB 1:50000
Anti-mišje protutijelo konjugirano fluoroforom Alexa 594	Poliklonalno, IgG	Magarac	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, SAD, 715- 585-151	IF 1:500
Anti-zečje protutijelo konjugirano fluoroforom Alexa 488	Poliklonalno, IgG	Magarac	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, SAD, 711- 605-152	IF 1:500
Anti-kozje protutijelo konjugirano fluoroforom Alexa 647	Poliklonalno, IgG	Magarac	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, SAD, 705- 585-003	IF 1:500
Anti-ovčje protutijelo konjugirano fluoroforom Alexa 594	Poliklonalno, IgG	Magarac	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, SAD, 713- 545-003	IF 1:500

## 4.2 METODE

### 4.2.1 Neuroanatomska disekcija

Životinje odgovarajuće dobi, prilikom pripreme za kardiopulmonalnu perfuziju, uspavane su intraperitonealnom administracijom tribromoetanol (Avertin, Sigma) (0,5 g/kg) ili inhaliranjem 2% izoflurana (Vetpharma Animal Health, S.L., Španjolska). Nakon uspavlivanja, uslijedilo je žrtvovanje cervikalnom dislokacijom. Postupci neuroanatomske disekcije provedeni su na ledu, te su za daljnje analize izdvojene sljedeće regije: moždana kora (engl., *cortex*, Cx), hipokampus (engl., *hippocampus*, Hip), mali mozak (engl., *cerebellum*, Cb) te moždano deblo s talamičkim i hipotalamičkim strukturama. Tkivni uzorci potom su smrznuti u tekućem dušiku te su pohranjeni na -80 °C do korištenja. Za kardiopulmonalnu perfuziju, životinje su uspavane i imobilizirane na podlozi. Kroz krvožilni sustav puštena je otopina fosfatnog pufera sastava 137 nM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (engl., *phosphate buffer saline*, PBS) obogaćena s 4% limunske kiseline nakon čega je injektirana 4% puferirana otopina formaldehida. Mozak je potom izvađen i proveden kroz otopine rastućeg udjela saharoze kroz 3 dana (početna 10%, konačna 30%). Ovako krioprotektirani mozgovi su na kratko uronjeni u pothlađeni izopentan (-80 °C) te su pospremljeni na -80 °C do rezanja na kriostatskom rezaču. Specifičan materijal i korišteni uređaji su navedeni u opisu pojedine metode.

### 4.2.2 Analiza sinaptičkog proteoma metodom spektrometrije masa spregnute nano-tekućinskom kromatografijom

#### 4.2.2.1 Izdvajanje membranskih frakcija obogaćenih sinaptičkim spojevima

U svrhu ciljane analize izražaja odabranih proteina, prvo je provedena globalna analiza sinaptičkog proteoma u mozgu mišjeg modela TRL2KO u usporedbi s kontrolnim miševima divljeg tipa. Priprema uzoraka za spektrometriju masa zahtijeva praćenje strogog protokola kako bi se osigurala izolacija čiste frakcije proteina, u ovom slučaju frakcije obogaćene sinaptičkim spojevima koja se podvrgava analizi. Ukupno 8 životinja je podvrgnuto kardiopulmonalnoj perfuziji. Nakon perfuzije i neuroanatomske disekcije, izdvojeni uzorci moždane kore, hipokampusu i malog mozga (4 kontrolna i 4 TRL2KO miša za svaku izoliranu regiju) zaleđeni su u tekućem dušiku i pospremljeni su na -80 °C. Daljnja obrada uzoraka provedena je na Leibniz-Institutu za neurobiologiju (LIN), Magdeburg, Njemačka, pod vodstvom prof. dr. sc. Karl-Heinz Smalla, a spektrometrija

masa pod vodstvom prof. dr. sc. Thilo Kahne na Institutu za eksperimentalnu internu medicinu, Medicinskog fakulteta, Sveučilišta Otto von Guericke, Magdeburg, Njemačka.

Svi koraci analize odvijali su se na ledu. Za potrebe izolacije priređeni su pufer A sastava 0,32 M saharoza, 5 mM HEPES i koktel inhibitora proteaza (Complete™ koktel inhibitora proteaza, Roche, Basel, Švicarska), pufer B sastava 1 mM Tris/HCl pH 8,1, 2M otopina saharoze. Frakcije obogaćene sinaptičkim spojevima se izdvajaju iz izoliranih moždanih regija sljedećim postupkom:

1. Tkivu je dodan pufer A u omjeru 10  $\mu$ L po mg tkiva.
2. Pri 900 rpm tkivo se sa 12 potisaka homogeniziralo u staklenom Potter-Elvehjem homogenizatoru s teflonskim tučkom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) pričvršćenim na sučelju za homogenizaciju (Braun Biotech Homogenisator Potter S, Melsung, Njemačka).
3. Homogenat je potom centrifugiran (5430 R, Eppendorf, Hamburg, Njemačka) pri 1000 g, 10 minuta na 4 °C. Citosolni proteini i membranske strukture prisutni u tekućoj fazi (engl., *supernatant*, S1) izdvojeni su, dok se talog nuklearne frakcije (engl., *pellet*, P1) podvrgnuo još jednom krugu homogenizacije radi povećanja prinosa.
4. S1 centrifugiran je (5430 R, Eppendorf, Hamburg, Njemačka) pri 12000 g 20 minuta na 4 °C, a P2 (cca 100  $\mu$ L) koji sadrži membranske strukture odvoji se dok se S2 podvrgnuo još jednom krugu centrifugiranja.
5. Talog P2 otopio se u 5 puta većem volumenu pufera B (cca 500  $\mu$ L), homogenizirao te inkubirao 30 minuta na 4 °C na rotirajućoj mješalici. U ovakvim uvjetima hipoosmotski šok oslobodio je sinaptičke spojeve iz sinaptosomalnih mjehurića.
6. U polipropilenske epruvete volumena 5 mL priređen je diskontinuirani gradijent saharoze. Otopina 2M saharoze razrijeđena je na otopine koncentracije 1,2 M i 1 M. Gradijent je izgrađen nadsvođivanjem 1 mL 1,2 M otopine saharoze s 3 mL 1M otopinom saharoze na koji je dodano 500  $\mu$ L uzoraka. Epruvete su tarirane, stavljene u pothlađeni rotor (MLS-50 Swinging bucket, Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD) i centrifugirane u ultracentrifugi (centrifuge: Optima MAX-XP i Optima TLX, Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD ) na 85000 g 2 sata pri 4 °C.
7. Rezultat centrifugiranja bio je frakcioniran membranski sustav. Na granici uzorak/1 M saharoza izdvojila se smjesa laganih membrana obogaćena mijelinskim

ovojnicama, granicu između 1 M/1,2 M saharoze činila je frakcija obogaćena sinaptičkim spojevima dok je na dnu bila frakcija bogata mitohondrijima, zaostalim jezgrama i težim staničnim materijalom.

8. Frakcije su skupljene od gore prema dnu pažljivo kako ne bi došlo do narušavanja granica između pojedinih slojeva.
9. Sakupljene frakcije obogaćene sinaptičkim spojevima razrijedile su se puferom B do konačnog volumena 2 mL kako bi se smanjila koncentracija saharoze i olakšalo taloženje. Uzorci su postavljeni u rotor (TLA-55, Fixed-angle rotor, Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD) i centrifugirani (centrifuga: Optima MAX-XP, Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD) pri maksimalnoj brzini 185000 g 1 sat na 4 °C.
10. Odvojeni P3 pospremljen je na -80 °C do nastavka obrade. Obzirom na fizikalno-kemijsku prirodu sinaptičkih spojeva, talog P3 je frakcija obogaćena sinaptičkim proteinima; uz većinski sadržaj sinaptičkih struktura u talogu se nalaze i tragovi ostalih membranskih sustava sličnih karakteristika. Ovaj način razdvajanja sinaptičkih membrana prihvaćena je metoda te je potvrđena bioinformatičkim tehnikama i tehnikama imuno-označavanja (*Western blot*) kao dodatna metoda za potvrdu prisutnosti sinaptičkih proteina.

#### 4.2.2.2 Proteolitička razgradnja sinaptičkih proteina na gelu

Kako bi se spriječila kontaminacija proteinima iz okoliša, s radnih površina, materijala i instrumenata radni prostor temeljito se obrisao otopinom metanola i vode. Proteini membranske frakcije obogaćene sinaptičkim spojevima, prije proteolize, razdvojeni su na poliakrilamidnom gelu (opisano pod 4.2.4.). Po završetku razlučivanja, gel je ispran u vodi te podvrgnut bojanju s *Coomassie Blue R250* (0,1 % *Coomassie Blue R250*, 10 % octena kiselina 50 % metanol). Nakon 15 minuta inkubacije u boji, gel se ispirao od viška boje kuhanjem ili 12 sati u vodi. Za ovaj korak pokusa priređeni su otapala i otopine: acetonitril (ACN); 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, otopina za redukciju; 10 mM DTT u 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, otopina za alkiliranje; 55 mM jodoacetamid u 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, otopina za odbojavanje; 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> u 50% ACN, otopina za taloženje; 1% trifluoroctena kiselina (TFA), koncentrirana TFA te svježe priređena otopina za triptičku digestiju; 12,5 ng/mL tripsina u 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Uzorci sinaptičkih proteina razlučeni na gelu obrađeni su serijom

otopina za odbojavanje, redukciju i alkiliranje te proteolitičkom digestijom na sljedeći način:

1. Pojedini uzorak izrezan je iz gela te je usitnjen pomoću skalpela na komadiće dimenzija  $\sim 1 \text{ mm}^2$ . Na njih je potom dodana otopina za odbojavanje. Uzorci su odbojani na tresilici, tijekom 30 minuta na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , nakon čega je otopina uklonjena.
2. Uzorci su potom tretirani otopinom za redukciju; 1 sat,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  na tresilici, a nakon pranja otopinom za alkiliranje, 1 sat u mraku. Alkiliranje se zaustavilo dodavanjem DTT-a, a zaostala otopina se uklonila pranjem u otopini za odbojavanje 15 minuta na tresilici.
3. Gel se potom dehidrirao u čistom ACN-u 15 minuta na sobnoj temperaturi. ACN se pažljivo odvojio i dehidrirani gel je ostavljen na sušenje na zraku.
4. Na osušene komadiće gela dodana je otopina za digestiju, a s obzirom da se gel rehidrira u otopini bilo je potrebno osigurati da su komadići gela tijekom cijelog postupka potpuno uronjeni u otopini. Uzorci su potom inkubirani na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  preko noći.
5. Otopina za digestiju s triptičkim peptidima odvojila se od gela. Na gel je potom dodana otopina za taloženje i inkubirana je 5 minuta na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Otopine su se potom združile i zakiselile otopinom TFA do konačnog volumnog udjela 1% te liofilizirale. Liofilizati proteina su tada spremni za analizu spektrometrijom masa.

#### 4.2.2.3 Analiza triptičkih peptida spektrometrijom masa spregnutom nano-tekućinskom kromatografijom (nanoLC-MS)

Uzorci peptida analizirani su na masenom spektrometru (Synapt G2-S HDMS, Waters Corporation, Milford, MA, USA) spregnutim tekućinskom kromatografijom najviše razlučivosti primjenom UPLC (engl., *ultra-performance liquid chromatography*) sustava (nanoAcquity UPLC system, Waters Corporation, Milford, MA, USA). Za UPLC sustav korištene su: mobilna faza - vodena otopina sastava 0,1% (v/v) mravlja kiselina, FA (engl., *formic acid*), 3% (v/v) dimetil-sulfoksid, DMSO (engl., *dimethyl sulfoxide*); stacionarna faza – 0,1% (v/v) FA, 3% (v/v) DMSO u ACN-u.

1. Triptički peptidi ( $\sim 200 \text{ ng}$ ) injektirani su u direktnom modalitetu na HSS-T3 C18 kolonu ( $1,8 \text{ } \mu\text{m}$ ,  $75 \text{ } \mu\text{m} \times 250 \text{ mm}$  kolona za kromatografiju obrnutih faza, Waters Corporation, Milford, MA, USA). Peptidi su razlučeni korištenjem gradijenta od

5% do 40% (v/v) mobilne faze u trajanju od 90 minuta. Protok je iznosio 300 nL po minuti.

2. Eluirani peptidi su analizirani u pozitivnom modalitetu pomoću spektrometrije masa elektroraspršenjem, ESI-MS, i pomoću separatora ionske mobilnosti, IMS (engl., *ion-mobility separation*).
3. Neovisno prikupljanje podataka, DIA (engl., *data-independant aquisition*) izvršeno je u UDMS<sup>E</sup> (engl., *ultra-definition mobility separation*) modalitetu.

#### 4.2.2.4 Obrada podataka i kvalitativna analiza

Podaci dobiveni analizom peptida obrađeni su pomoću programa PEAKS (164–166). Kvantifikacija peptida bila je bez korištenja biljega („*label-free quantification*“). Peptidi eluirani u vremenu od 0-130 min su bili predmet analize značajnosti. Ionizacijsko stanje je bilo postavljeno u rasponu od 1-10. Uzorci su normalizirani na ukupnu količinu iona očitanih u uzorku (engl., *total ion count*, TIC). Granične vrijednosti značajnosti određene su uporabom analize varijance ANOVA, a postavljene su za značajnosti na  $\geq 15$  te za red veličine promjene (engl., *fold change*)  $\geq 1,5$ . Program je uzimao u obzir moguće posttranslacijske modifikacije proteina nastale ionizacijom. Granične vrijednosti za toleranciju u pomaku mase su postavljene na 20 ppm, a za retencijsko vrijeme na koloni 10 min. Vjerojatnost lažno pozitivnih rezultata postavljena je na 1%.

### 4.2.3 **Analiza genskog izražaja odabranih proteina**

Količina glasničke RNA (engl., *messenger RNA*, mRNA) određena je kao komplementarna metoda proteomskim analizama. Za izolaciju ukupne RNA korišteno je tkivo 10 životinja, 5 kontrolnih i 5 TLR2KO miševa. Izolacija je obavljena prema uputama proizvođača korištenjem komercijalno dostupnog paketa reagensija za izolaciju RNA (GeneJET RNA Purification Kit, Thermo Fisher, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Nakon izolacije, mRNA je podvrgnuta tretmanu DNazom i prepisana je u komplementarnu DNA (engl., *copy/complementary DNA*, cDNA). Ovako pripremljena cDNA podvrgnuta je kvantitativnoj analizi mRNA pomoću kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu (engl., *quantitative real-time PCR*, qRT-PCR).

#### 4.2.3.1 Izolacija mRNA iz tkiva

Koristeći komercijalno dostupan paket GeneJET RNA je izolirana u sterilnom prostoru sljedećim koracima:

1. Prethodno izvagano tkivo homogenizirano je s 30 potisaka u puferu za lizu stanica obogaćenom antioksidansom (engl., *dithiothreitol*, DTT).
2. Na homogenat je dodana otopina proteinaze K, potom je smjesa snažno promiješana i inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi.
3. Otopina je centrifugirana na 12000 g. Dobiveni supernatant je prebačen u novu epruvetu te je na njega dodan odgovarajući volumen apsolutnog etanola.
4. 700  $\mu\text{L}$  otopine podvrgnuto je izolaciji temeljenoj na afinitetnoj kromatografiji na koloni. Otopina lizata adsorbira se na kolonu te se centrifugiranjem ukloni početna otopina, a vezani sadržaj na koloni se centrifugiranjem (1 minuta) ispire s 1 alikvotom pufera za ispiranje 1 i dva alikvota pufera za ispiranje 2.
5. Pročišćena RNA ispire se s kolone u 100  $\mu\text{L}$  sterilne vode bez nukleaze. Za povećanje prinosa, kolona se može još jednom oprati sa 50  $\mu\text{L}$  pročišćene vode.
6. Integritet izolirane RNA određen je pomoću RIN broja, a čistoća i koncentracija provjerene su pomoću spektrofotometra.

#### 4.2.3.2 Priprema cDNA

Pročišćena mRNA podvrgnuta je tretmanu DNazom I (DNase I Amplification grade, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i prepisivanju u komplementarnu cDNA pomoću komercijalno dostupnog paketa za reverzno prepisivanje (High-Capacity RNA-to-cDNA KIT, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Prema uputama proizvođača pripremljene su radne otopine enzima, DNaza I i reverzne transkriptaze.

1. Napravljena je reakcijska smjesa sastava 1 ng RNA, 1 puta puferska smjesa za optimalnu aktivnost i 1 U DNaze I u 10 mL.
2. Reakcija se inkubira 15 minuta na sobnoj temperaturi i zaustavi se dodatkom Stop otopine (EDTA aktivni sastojak).
3. DNaza I se denaturirala zagrijavanjem smjese na 70 °C 10 minuta te se potom ohladila na ledu.
4. Za reverznu transkripciju, u epruveti je zamiješana smjesa sastava 1 puta pufer za reverznu transkripciju, 9  $\mu\text{L}$  DNazom tretirane RNA i 1  $\mu\text{L}$  reverzne transkriptaze.
5. Reakcija se odvijala pri 37 °C 60 minuta te je zaustavljena tretmanom na 95 °C 5 minuta.
6. Uzorci su ohlađeni na ledu i izmjerena je koncentracija DNA na spektrofotometru.



#### 4.2.3.3 Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu

cDNA odabranih gena umnožena je uporabom nizvodne (engl., *forward*) i uzvodne (engl., *reverse*) početnice odabranih gena pomoću seta kemikalija za detekciju dvostruke uzvojnice DNA (SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) na uređaju (ABI PRISM™ 7000 Sequence Detection Systems, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). U svakom reakcijskom ciklusu umnaža se cDNA gena od interesa i daje dvolančani fragment DNA za koji se veže fluorescentna boja SYBER Green 1. Intenzitet fluorescencije proporcionalan je količini početne količine cDNA gena od interesa. Kvantitativno je određena relativna razina mRNA sljedećih gena: Np55/65, Np65, 4 izooblika katalitičke podjedinice PMCA, 4 izooblika katalitičke *alpha* podjedinice NKA i 3 izooblika pomoćne *beta* podjedinice NKA. Kao unutarnja kontrola korišten je genski produkt aktina. Početnice su dizajnirane ručno u našem laboratoriju te su im svojstva provjerena pomoću javno dostupnog programa (PrimerBlast, NCBI, Bethesda, MD, SAD). Početnice su naručene od dobavljača (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD), a popis početnica korištenih u istraživanju naveden je u Tablici 4.2.1. Specifičnost pojedinih početnica je povjerena klasičnom PCR metodom.

Reakcijske smjese u duplikatima priređene su na pločicama s 96 jažica do konačnog volumena 25  $\mu\text{L}$  dodavanjem sljedećih otopina:

1. 12,5  $\mu\text{L}$  SYBER Mix,
2. 1  $\mu\text{L}$  5  $\mu\text{molL}^{-1}$  odgovarajućih početnica,
3. 2  $\mu\text{L}$  1 ng cDNA,
4. 9,5  $\mu\text{L}$  vode.

Uvjeti umnažanja su definirani na sljedeći način: 1 ciklus na 95°C u trajanju od 10 minuta kojemu slijedi 40 ciklusa na 95°C u trajanju od 15 sekundi i 60°C u trajanju od 60 sekundi. Posljednjim ciklusom određena je specifičnost umnoženih produkata. Linearnim porastom temperature od 60 °C do 95 °C određena je temperatura mekšanja umnožene DNA što omogućuje izdvajanje uzoraka s umnoženim nespecifičnim produktima reakcije.

Tablica 4.2.1. Popis gena i početnica za transkriptomsku analizu. pb – duljina produkta u parovima baza

Gen	3' → 5'	5' → 3'	pb
<i>Nptn</i>	TCTCGCTCTTGCTGGTCTCT	TGGTGACAATTCTTGGTTCG	113
<i>Atp1a1</i>	TTGAAGAGACAGCCCTTGCT	GAGGGGATACATCCTAAGGGC	74

<i>Atp1a2</i>	AGTCCATCGCATACACCCTG	GGAAGGGGGATGTTGGCAAT	82
<i>Atp1a3</i>	TCGGCTTGTITGAGGAGACG	GAGAGGGTACATGCGAAGGG	83
<i>Atp1b1</i>	TTAAGAGCTGATCACAAGCACA	ACTTATTAAATGGCTAGTGGGAAAG	50
<i>Atp1b2</i>	TCAGCCTTTGGTGGCTGTAA	TGCGGCATTCAACATTCACC	68
<i>Atp1b3</i>	CATTCACAATGTGGGCCATGC	TCTGGTCTCGATATTCGGAACCTT	63
<i>Atp2b2</i>	GCTGAACTTGGTCACACAGTC	AGTGGAGCCCATGTCTTGC	50
<i>Atp2b4</i>	CAAGCTTCGGGTACTGGCAC	TTTCACCAATGTGTGCTTGTCTG	55
<i>Actb</i>	CATTGCTGACAGGATGCAGAA	GCTGATCCACATCTG CTGGA	53

#### 4.2.3.4 Obrada podataka

Očitane fluorescencije za pojedine gene korištene su za određivanje relativne količine mRNA u uzorku metodom  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Kritični broj ciklusa, vrijednost Ct, je određen kao arbitrarni prag na sredini linearnog dijela krivulje umnažanja. Za uzorke s Ct vrijednostima  $\geq 40$  smatra se da su ispod razine detekcije i nisu korišteni u analizi. Vrijednost  $\Delta Ct$  određena je kao razlika srednje vrijednosti tehničkih replika Ct gena od interesa i Ct unutarnje kontrole, aktina. Nadalje, vrijednost  $\Delta\Delta Ct$  određena je kao razlika  $\Delta Ct$  vrijednosti gena od interesa i kalibratora. Kalibrator je određen arbitrarno, te je korištena srednja vrijednost Ct bioloških replika unutarnje kontrole. Uvrštavanjem u formulu  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  dobivene su vrijednosti relativne količine mRNA za pojedini gen u odnosu na mRNA aktina kao endogene kontrole. Za statističku obradu podataka korištene su logaritamske vrijednosti  $\Delta\Delta Ct$ . Relativni izražaj mRNA prikazuje se u arbitrarnim jedinicama dakle kao srednja normalizirana kalibrirana vrijednost  $\pm$  standardna pogreška.

#### 4.2.4 **Analiza prisutnosti odabranih proteina metodom *Western blot***

Nakon analize sinaptičkog proteoma, pomoću *Western blot* metode praćena je promjena u ekspresiji obje inačice proteina neuroplastina,  $Na^+/K^+$  ATPaze, četiri inačice plazma membranske  $Ca^{2+}$  ATPaze i TRAF6 u pojedinim regijama mozga. Ovom metodom analizirano je tkivo izolirano iz 10 životinja, 5 kontrolnih i 5 uzoraka TLR2KO.

##### 4.2.4.1 Obrada tkiva i kvantitativna analiza ukupnih proteina

Predradnje potrebne za izvođenje metode uključivale su homogenizaciju tkiva i kvantitativno određivanje koncentracije proteina te su izvođene prema sljedećem koracima:

1. Tkivo je odmrznuto na ledu te je pripremljen 10%-tni vodeni homogenat za daljnje postupke i analizu enzimske aktivnosti.

2. U pothlađenom staklenom Potter-Elvehjem homogenizatoru s teflonskim tučkom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) tkivo je homogenizirano u vodi uz dodatak inhibitora proteaza (Complete™ koktel inhibitora proteaza, Roche, Basel, Švicarska).
3. Zatim, u odvojenu epruvetu priređeno je razrjeđenje vodenog homogenata (5x) za analizu koncentracije ukupnih proteina na mikrotitarskim pločicama.

Pripremljeni homogenat podvrgnut je kvantitativnoj analizi ukupnih proteina na mikrotitarskim pločicama. Pomoću očitane apsorbancije na uređaju (GloMax® Discover, Promega, Madison, WI, SAD) i priređenog baždarnog pravca određene su koncentracije ukupnih proteina u pojedinim uzorcima

1. Kvantitativna analiza provedena je prema uputama proizvođača uporabom komercijalno dostupnog paketa za kvantitativnu analizu proteina u uzorku (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD).
2. Načinjeno je serijsko razrjeđenje 2 mg/mL goveđeg serumskog albumina (engl., *bovine serum albumin*, BSA) u rasponu od 25 µg/mL do 1 mg/mL koje je korišteno za izradu baždarnog pravca.
3. Svježe je pripremljen radni reagens; smjesa otopina A i B (50:1) prema uputi proizvođača.
4. U jažice mikrotitaraske pločice dodano je 25 µL uzoraka u triplikatima na koje je potom dodano 200 µL radnog reagensa.
5. Sadržaj je zatim snažno promiješan na pločici 30 sekundi i inkubiran 30 minuta na 37 °C do razvijanja boje. Prije stavljanja u uređaj sadržaj pločice je ohlađen na sobnu temperaturu.
6. Apsorbancija je očitana pri 560 nm.
7. Vrijednosti apsorbancije (A) korištene su kao y varijabla u jednadžbi Lambert-Beerova zakona za izračunavanje varijable x, ukupne koncentracije proteina (c). Za nastavak analize korišteno je 15 µg/mL proteina.

#### 4.2.4.2 Razlučivanje proteina na gelu i prijenos na membranu

Sadržaj proteina u uzorcima razlučen je pomoću elektroforeze na poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (engl., *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS PAGE) u kadici (Mini Gel Tank, Invitrogen™, Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, SAD). Set za gelove TGX Stain-Free FastCast (BioRad, Hercules, CA, SAD) korišten je za izradu gelova različite umreženosti. Na 10% umreženim gelovima analizirani su proteini visokih molekulskih masa ( $>100$  kDa), a na 12% umreženim gelovima razlučeni su proteini srednjih molekulskih masa (35 kDa – 100 kDa). Puferi su svježe pripremljeni iz matičnih otopina: pufer za razdvajanje sastava 25 mM Tris, 192 mM glicin, 1% SDS i pufer za prijenos sastava 25 mM Tris, 192 mM glicin 20% metanol. Za razlučivanje proteina lipidnih splavi i ne-splavi su korišteni komercijalno dostupni 4-12% Bis Tris gelovi (NuPAGE™ 4-12%, Bis-Tris, 1.0 mm, Mini Gel, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) te puferi za razlučivanje (NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (20X), Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i prijenos (NuPAGE™ Transfer Buffer (20X), Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)

1. Uzorci proteina su zamiješani s 7,5  $\mu$ L pufera za nanošenje sastava 2:1, odnosno 2 dijela pufera za denaturaciju (NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4x), Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i 1 dio reducirajućeg agensa (NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X), Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD).
2. Uzorci su termički obrađeni na 95 °C 5 minuta te ohlađeni na sobnu temperaturu.
3. Na prethodno izlivene gelove nanoseni su uzorci masene koncentracije 15  $\mu$ g/mL te 5  $\mu$ L smjese označenih proteina poznate molekulske mase (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD).
4. Elektroforeza se odvijala u dvije etape; sabijanje – napon: 90 V; vrijeme: 15 minuta; i razdvajanje – napon: 125 V; vrijeme: 90 minuta. Za Bis-Tris gelove uvjeti razlučivanja su - napon: 120 V; vrijeme: 90 minuta.
5. Po završetku, gelovi su kratko isprani u vodi i podvrgnuti su aktivaciji (uređaj ChemiDoc MP Imaging System, BioRad, Hercules, CA, SAD). Aktivacijom sa UV zračenjem, trihalogeni spojevi u gelu modificiraju triptofanske ostatke proteina što olakšava kvantifikaciju.

Razlučeni proteini na gelu elektroforetski su prenešeni na polivinil-difluoridnu (PVDF) membranu (PVDF Transfer Membrane, 0,45  $\mu$ m, 26,5 cm x 3,75 m, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Prijenos proteina u polusuhim uvjetima (Mini Blot Module i kadica Mini Gel Tank, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,

SAD) odvijao se pri naponu 30 V, za Bis Tris gelove 20V, u trajanju od 1 sata. Membrana je nakon prijenosa kratko oprana u vodi te ponovno snimljena pod UV zračenjem. Digitalni snimak membrane s ukupnim prenesenim proteinima korišten je za normalizaciju kemiluminiscentnog signala. Ovaj korak omogućuje izostavljanje označavanja proteina unutarnje kontrole.

#### 4.2.4.3 Imunodetekcija proteina na membrani

Za imunodetekciju proteina na membrani priređene su svježe otopine pufera PBS s 1% deterdženta (Tween 20, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) (PBST), otopine za blokiranje sastava 5% obranog mlijeka u prahu u PBST-u.

1. Membrana je inkubirana u otopini za blokiranje sat vremena kako bi se onemogućilo nespecifično vezanje protutijela na membranu.
2. Primarna protutijela razrijeđena su u odgovarajućim omjerima u otopini za blokiranje. Membrane su potom inkubirane 18 sati na tresilici. Popis primarnih protutijela naveden je u tablici 4.1.2.
3. Membrana je za obilježavanje sekundarnim protutijelom isprana 3 puta po 10 minuta u puferu PBST. Ovaj korak ispire nespecifično vezana protutijela.
4. Sekundarna protutijela razrijeđena su u puferu PBST i inkubirana s membranom 1 sat na sobnoj temperaturi.
5. Prije detekcije membrana je oprana od viška sekundarnih protutijela u puferu PBST, 3 puta po 10 minuta.

Obilježeni proteini detektirani su pomoću komercijalno dostupnih reagensija visoke osjetljivosti za izazivanje kemiluminiscencije (SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Komponenta A i B pomiješaju se u jednakom omjeru (1:1) te se sa smjesom ravnomjerno zalije membrana. Intenzitet kemiluminiscentnog signala očita se na uređaju za detekciju kemiluminiscencije (ChemiDoc MP Imaging System, BioRad, Hercules, CA, SAD).

#### 4.2.4.4 Kvantitativna analiza intenziteta signala kemiluminiscencije

Kako bi se odredio red veličine promjene u intenzitetu signala kemiluminiscencije korišten je javno dostupan računalni program ImageLab 6.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) kompatibilan sa sustavom za detekciju ChemiDoc. Digitalni snimci ukupnih proteina na

membrani i kemiluminiscencije pojedinih proteina korišteni su za kvantitativnu analizu i dobivene vrijednosti su obrađene statističkim metodama.

1. Snimak ukupnih proteina te pojedinačno analiziranih proteina od interesa unesen je u računalni program ImageLab 6.1 u digitalnom obliku naredbom *Alatna traka izbornika > File > Open > Odabir slike*.
2. Nakon unosa, snimak ukupnih proteina i pripadajuće detektirane kemiluminiscencije objedinjuje se na sljedeći način: *Alatna traka izbornika > File > Create Multi Channel Image*. U novom prozoru pojavljuje se objedinjena slika spremna za analizu.
3. Pomoću naredbe *Lane and Bands* označe se pojedine jažice s ukupnim proteinima i sukladno tome kemiluminiscentni signal. Naredbom *Detect Bands*, unutar označenih jažica, automatski se detektiraju pojedine proteinske vrpce, ili signal, koji program koristi za ekstrapolaciju podataka o volumenu signala. Ukoliko program ne prepoznaje određene proteinske vrpce ili vrlo slabe signale, pomoću funkcije *Add band* oni se ručno mogu odabrati.
4. Naredbom *Analysis table* dobije se vrijednosti volumena intenziteta signala koji se dalje koriste za statističku obradu.

#### **4.2.5 Analiza zastupljenosti odabranih proteina u rezovima tkiva metodom imunofluorescentnog obilježavanja**

Nakon što su utvrđene promjene ekspresije proteina u homogenatima pojedinih moždanih regija pristupilo se utvrđivanju promjena na razini tkiva. U tu svrhu smo primijenili imunohistokemijsku metodu imunofluorescentnim obilježavanjem (IF) uz sekundarna protutijela konjugirana fluoroforom. Visoko specifična protutijela na neuroplastin, ATPaze tipa P (NKA i PMCA1-4) poslužila su za definiranje tkivne raspodjele proteina. Za ovu metodu korišteno je 6 životinja, 3 kontrolna i 3 TLR2KO miša.

##### **4.2.5.1 Rezanje tkiva**

Pojedini mozak miša odmrznut je i skalpelom podijeljen na dvije polutke. 6 polutki, 3 kontrolne i 3 TLR2KO polutke, uklopljene su u mediju za rezanje na kriostatu (TissueTech,) i zatim podvrgnute rezanju na kriostatu (Cryostat CM3050S, Leica, Nussloch, Njemačka). 6 rezova debljine 25 µm su pažljivo navučeni na stakla presvučena

polilizinom, tako da je na svakom staklu bilo po 3 reza kontrolna i 3 reza TLR2KO miša. Rezovi su potom kratko posušeni i pospremljeni na -20 °C.

#### 4.2.5.2 Višestruko obilježavanje proteina na rezovima

Za višestruko obilježavanje proteina određene su kombinacije protutijela proizvedenih u različitim organizmima. Zatim su odabrane kombinacije sekundarnih protutijela s fluoroforima različite valne duljine pobuđivanja. Opisani metodološki pristup omogućuje utvrđivanje kolokalizacije proteina koji ostvaruju međudjelovanja, primjerice neuroplastina i PMCA kao funkcionalnog para unutar membrane. Pokus se odvijao u vlažnoj komorici s poklopcem za imunohistokemijsko bojenje kako bi se spriječilo isparavanje radnih otopina s uzoraka. Pripremljene su sljedeće otopine: pufer PBS; citratni pufer sastava 8 mM natrijev citrat i 1,8 mM limunska kiselina, pH 6; otopina za blokiranje sastava 10% konjski serum u puferu PBS; otopina primarnih protutijela sastava protutijelo u odgovarajućem razrjeđenju u 10% konjski serum obogaćenom s 0,1% deterdženta (Triton™ X-100, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD); otopina sekundarnih protutijela u odgovarajućem razrjeđenju u 5% konjski serum u puferu PBS obogaćenom s 0,1% deterdženta Triton X-100. Protokol obilježavanja se sastojao od sljedećih koraka:

1. Rezovi su rehidrirani inkubacijom u puferu PBS 2 puta po 10 minuta.
2. Povratak antigena obavljen je kuhanjem na 80 °C 30 minuta u citratnom puferu. Rezovi su zatim ostavljeni da se ohlade na sobnoj temperaturi.
3. Citratni pufer je ispran u puferu PBS 3 puta po 10 minuta na orbitalnoj miješalici.
4. Tkivni rezovi su potom zaokruženi vodonepropusnim markerom (PAP Pen, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) da se spriječi curenje radnih otopina.
5. Otopina za blokiranje nakapana je na rezove i inkubirana na sobnoj temperaturi 1 sat u zatvorenoj komorici.
6. Potom je uklonjena otopina za blokiranje i nakapana je otopina primarnih protutijela. Komorica je zatvorena i pospremljena na 4 °C. Inkubacija traje 18 sati.
7. Sljedeći dan višak primarnih protutijela ispran je u puferu PBS 3 puta po 10 minuta.

8. U komorici zaštićenoj od svjetlosti rezovi su prekriveni otopinama sekundarnih protutijela te su pohranjeni na tamno mjesto 2 sata.
9. Sljedeći koraci su se odvijali u uvjetima minimalne osvjetljenosti kako bi se smanjila mogućnost izbjeljivanja fluorofora.
10. Višak sekundarnih protutijela ispran je puferom PBS, 3 puta po 10 minuta.
11. Jezgre stanica su zatim obilježene fluorescentnom DNA bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, razrjeđenje 1:1000 u puferu PBS).
12. Višak boje je ispran 3 puta po 10 minuta u puferu PBS.
13. Zatim su rezovi uklopljeni s otopinom za uklapanje (MOWIOL® 4-88 Reagent, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), nježno poklopljeni pokrovnim stakalcem i ostavljeni da se osuše na zraku preko noći nakon čega su pospremljeni na 4 °C do snimanja na konfokalnom mikroskopu (Olympus).

#### 4.2.5.3 Konfokalna mikroskopija i analiza slika

Obojeni rezovi analizirani su na konfokalnom mikroskopu Olympus FV3000. Na istom staklu su se nalazili rezovi TLR2KO i kontrolnih uzoraka te se svako staklo smatralo neovisnim pokusom. Za pojedino protutijelo korištena su 3 stakla, odnosno 3 neovisna pokusa. Za analizu je snimljeno po sedam slika malog mozga svake životinje pri povećanju 20x i dimenzija 1024x1024 piksela, a za pojedina područja hipokampusa po dvije slike pri istom povećanju i dimenzija. Korišteni su laseri određene valne duljine pobude za pojedine fluorofore (405, 488, 594 i 647). Jačina lasera određena je prema najintenzivnijem signalu fluorofora na rezovima, odnosno dok se nije pojavilo zasićenje signalom (405 – 0,5%; 488 – 1%; 594 – 1,5%; 647 – 1%). Nakon snimanja slike su analizirane pomoću programa ImageJ za obradu digitalnih snimaka i fotografija (NIH, Bethesda, MD, SAD). Slike su analizirane na sljedeći način:

1. Pri otvaranju slike zadana je automatska naredba *Split Channels*.
2. Na pojedinim kanalima iscertana je regija za analizu naredbom *Freehand Selection*, a naredbom *Add* kopirana je i translucirana na ostale kanale.
3. Na slikama je postavljena granična vrijednost za mjerenje integrirane gustoće signala naredbom *Image/Adjust/Threshold* modalitet Otzu.



4. Naredbom *Analyze/Analyze particle* dobiven je niz informacija od kojih je za analizu korištena srednja *Mean* vrijednost što odgovara *RawIntDen/Area of Pixels* kao prosječna vrijednost zbroja vrijednosti piksela u odabranom području po izmjerenoj površini u pikselima.
5. Signal je normaliziran na broj jezgara u mjerenom području.

#### **4.2.6 Izolacija gangliozida iz moždanog tkiva**

Kvalitativna analiza sastava gangliozida u uzorcima moždanog tkiva TLR2KO miševa u usporedbi s kontrolnim uzorcima provedena je metodom po Svennerholmu (167). Ova metoda se izvodi serijskim dodavanjem smjesa otapala u različitim omjerima te se postupcima ekstrakcije, reekstrakcije, fazne particije i gel-filtracijske kromatografije na koloni dobiju čisti gangliozidi koji se razluče metodom tankoslojne kromatografije na silika-gelu visoke razlučivosti (engl., *high-performance thin-layer chromatography*, HPTLC). Izolacija gangliozida izvršena je na uzorcima moždanih regija 12 životinja, 6 TLR2KO i 6 kontrolnih uzoraka. Za potrebe metode korišteni su metanol, kloroform i redestilirana voda i smjese C:M:W (engl., *chloroform*, C; *methanol*, M, *water*, W) i smjesa C:M:W=60:30:4,5. (168)

##### **4.2.6.1 Izolacija gangliozida**

Tkivni uzorci mase ~ 100 mg ( ~ 100 mg uzorka malog mozga - tkivo 2 životinje; ~ 100 mg uzorka hipokampus - tkivo 3 životinje) podvrgnuti su sljedećim postupcima:

1. Tkivo se homogeniziralo na ledu s 15 potisaka u staklenom Potter-Elvehjem homogenizatoru s teflonskim tučkom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) u odgovarajućem volumenu W kako bi se dobio 10% vodeni homogenat.
2. Vodenom homogenatu (W) dodani su odgovarajući volumeni M, smjesa je snažno promiješana te ostavljena na sobnoj temperaturi, a potom je dodan odgovarajući volumen C kako bi se dobila otopina C:M:W=1:2:0,75. Kako bi taloženje proteina bilo što uspješnije, smjesa je snažno miješana tijekom dana te je ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi.
3. Smjese su se potom centrifugirale na 3000 g 15 minuta pri 4 °C.
4. Bistri supernatant je izdvojen dok je talog podvrgnut procesu reekstrakcije; reekstrakcija se izvodila kao u koraku 1., uz korištenje dvostruko manjih volumena otapala.

5. Za faznu particiju združenim supernatantima za svakih 6 mL C:M=1:2 dodanih tijekom ekstrakcije i reekstrakcije dodano je po 2 mL W i 2,5 mL M. Sadržaj je lagano promiješan i ostavljen preko noći na sobnoj temperaturi.
6. Gornja faza bistrog supernatanta se izdvojila dok se na ostatku (proteinski prsten i donja faza) izvršila reparticija dodavanjem smjese otapala C:M:W=1:1:0,7 za svaki 6 mL C:M dodanih tijekom ekstrakcije i reekstrakcije.
7. Združeni supernatanti dobiveni particijom i reparticijom su se uparili do suha pri 37 °C u struji zraka.
8. Za gel-filtraciju na koloni, uparci su otopljeni u 150 µL C:M:W=60:30:4,5 te se dodani na kolonu ispunjenu stacionarnom fazom (Sephadex G25, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i filtrirani s 7.5 mL C:M:W=60:30:4,5. Filtrat se potom upario do suha na 37 °C u struji zraka.

Dobiveni uparci čistih gangliozida su pospremljeni na -20 °C do kromatografskog razlučivanja.

#### 4.2.6.2 Analiza sastava gangliozida metodom tankoslojne kromatografije visoke razlučivosti

Gangliozidi su razlučeni metodom HPTLC. Na HPTLC pločicu (Merck, Darmstadt, Njemačka) nanoseni su uzorci koji odgovaraju 10 mg tkiva te standard gangliozida Cronassial (Fidia Research Laboratories, Abano Terme, Italija). Gangliozidne vrste razlučene su u sustavu otapala C:M:W (*w/v*) 0,2% CaCl<sub>2</sub>=(50:40:10). Nakon sušenja, pristupilo se imuno-obilježavanju gangliozida i vizualizaciji.

#### 4.2.6.3 Kvantitativna karakterizacija gangliozida metodom imunokemijskog obilježavanja

Za potrebe imunodetekcije, pločica je impregnirana, a potom su razlučeni gangliozidi tretirani enzimom sijalidaza kako bi se sve gangliozidne vrste svele na GM1 okosnicu. Nastali šećerni ostatci GM1 su obilježeni β podjedinicom toksina kolere konjugiranom hrenovom peroksidazom. Izvršena je vizualizacija korištenjem diaminobenzidinskog (DAB) reagensa. Za potrebe imunodetekcije su priređene sljedeće otopine: 5% (*w/v*) poli(izobutil meta-akrilat) (Plexigum 28, PIBMA) u kloroformu, 0,3% (*v/v*) PIBMA u *n*-heksanu, otopina sijalidaze u PBS-u, 30 mU/mL, 1% BSA u PBS-u obogaćenim 0,1% Tween 20 (PBST).

1. Pločica je impregnirana uranjanjem u 0,3% PIBMA u *n*-heksan kroz 90 sekundi.
2. Nakon sušenja, razlučeni gangliozidi na pločici tretirani su sijalidazom 3h uz lagano miješanje
3. Višak sijalidaze ispran je dva puta u puferu PBST.
4. Pločica je uronjena u 1% BSA u PBST-u kako bi se spriječilo nespecifično vezanje.
5. Potom je pločica inkubirana u otopini CTB-a 1 h pri sobnoj temperaturi.
6. Višak CTB ispran je 5 puta puferom PBST po 1 minutu.
7. Gangliozidne frakcije su vizualizirane tretmanom SigmaFast otopinom pripremljenom prema uputama proizvođača.
8. Nakon razvijanja boje, pločica je isprana destiliranom vodom, osušena te skenirana.

Vizualizirane frakcije gangliozida kvantificirane su korištenjem javno dostupnog programa ImageJ za obradu digitalnih slika i fotografija (NIH, Bethesda, MD, SAD).

#### **4.2.7 Izolacija lipidnih splavi**

Za izolaciju splavi korištena je metoda uspostavljena u Laboratoriju za molekularnu neurobiologiju i neurokemiju (168). Umjesto deterdženta Triton X-100, ovaj protokol koristi deterdžent Brij O20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Pokazalo se da korištenjem Brij O20 sastav lipidnih i proteinskih vrsta lipidnih splavi ostaje očuvan što nije slučaj za Triton X-100. Lipidne splavi izolirane su iz moždanih regija 12 životinja, 6 kontrolnih i 6 TLR2KO miševa. Pripremljene su otopine sljedećih sastava: pufer za izolaciju lipidnih splavi (engl., *raft buffer*, RB) sastava 50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> i CaCl<sub>2</sub>; 0,32 M saharoza u RB-u, 1% Brij O20 u RB-u. Za izgradnju isprekidanog gradijenta pripremljene su 3%, 35% i 80% saharoza u 1% BrijO20 u RB-u uz dodatak 0,02% NaN<sub>3</sub>. Otopine pufera svježe su pripremljene uz dodatak koktela inhibitora proteaza (Complete™ koktel inhibitora proteaza, Roche, Basel, Švicarska). Izolacija se odvija na ledu i pratila je sljedeći protokol:

1. Izvagano tkivo je odmrznuto i s 30 potisaka homogenizirano u 3 mL 0,32 M saharoze u RB-u u staklenom Potter-Elvehjem homogenizatoru s teflonskim tučkom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
2. Smjesa je centrifugirana na 1000 g 20 minuta na 4 °C (uređaj: Hettich Universal 32 R, Andreas Hettich GmbH & Co., Tuttlingen, Njemačka)

3. Postnuklearni supernatant se odvojio u 50.4 Ti tubice (Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD) i ultracentrifugirao pri 100000 g 45 minuta pri 4 °C (uređaj: Beckman Optima XL-80K, rotor 50.4 Ti; Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD). U ovom koraku su se izdvojile membrane u obliku taloga dok je supernatant obogaćen citosolnim proteinima. Supernatant je pohranjen za potrebe analize citosolnih proteina.
4. Talog membrana se otopio u 1 mL 1% Brij u RB-u i homogenizirao s 15 potisaka.
5. 600 µL membranskog homogenata je zamiješano s 600 µL 80% saharoze na dnu pothlađene SW 28.1 Ti epruvete. Na zamiješani uzorak, pomoću propipete pažljivo je dodano 10 mL 35% saharoze i 3% saharoza. Ovako izgrađeni isprekidani gradijent saharoze je pažljivo premješten u rotor (SW 28.1 Ti) i centrifugiran na 141000 g 18 sati pri 4 °C (Beckman Optima XL-80K, Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD)
6. Po završetku, od gore prema dolje sakupljene su frakcije po 1,5 mL (1-11) te je iz svake tubice izdvojen alikvot za potvrdu uspješne izolacije splavi.

Potvrda izolacije lipidnih splavi izvršena je pomoću metode *Western Blot*. Frakcije su pripremljene za elektroforezu (20 µL alikvota frakcije + 5 µL LDS) i u redosljedu skupljanja nanešene su na gel te se dalje prate koraci opisani u protokolu za *Western blot*. Membrana se inkubirala s protutijelima koja prepoznaju biljege lipidnih splavi - protein Thy1 i gangliozid GM1 (CTB), te biljege ne-splavi, transferinski receptor (TfR). Uspješnu izolaciju potvrdila je prisutnost biljega splavi u frakcijama 3 i 4, a ne-splavi u 10 i 11. Analiza raspodjele odabranih proteina u izoliranim membranskim frakcijama je provedena metodom *Western blot*.

#### **4.2.8 Određivanje katalitičke aktivnosti ATPaza tipa P**

Katalitička aktivnost ATPaza tipa P određena je kako bi se odredio utjecaj mogućih promjena u njihovom submembranskom smještaju na intenzitet prijenosa kationa preko membrane. Katalitička aktivnost je mjerena spektrofotometrijskom metodom. Za prijenos kationa preko membrane, ATPaze tipa P energiju crpe cijepanjem molekule ATP-a na ADP i molekulu fosfata (engl., *inorganic phosphate*, P<sub>i</sub>). Oslobođene molekule fosfata dodavanjem reagensa stvaraju obojeni kompleks koji se detektira na spektrofotometru.

Dobivene apsorbancije služe za izračunavanje intenziteta enzimske reakcije prijenosa kationa.

#### 4.2.8.1 Mjerenje aktivnosti detekcijom slobodnog fosfata

Za potrebe metode korišteni su vodeni homogenati tkiva (priprema i određivanje koncentracije proteina opisana je u metodi 4.2.3). Korišteno je tkivo moždane kore, hipokampusa i malog mozga izdvojeno disekcijom iz ukupno 8 eksperimentalnih životinja - 4 TKR2KO i 4 kontrolna uzorka. Aktivnost NKA mjerena je uz pomoć specifičnog inhibitora, kardiotoničnog glikozida, ouabaina (OB), a ukupna aktivnost PMCA uporabom nespecifičnog inhibitora karboksieozina (engl., *carboxy-eosine*, CE). Pripremljene su četiri različite otopine za potrebe pokusa; reakcijska otopina - 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> i 30 mM Tris/HCl pH 7,4; reakcijska otopina za inhibiciju NKA – 1 mM OB, 3 mM MgCl<sub>2</sub> i 30 mM Tris/HCl pH 7,4; reakcijska otopina za inhibiciju PMCA – 10 µL CE, 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> i 30 mM Tris/HCl pH 7,4, 30 mM ATP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD); stop otopina – 10% trikloroacetične kiseline (engl., *trichloroacetic acid*, TCA) i svježe pripremljeni reagens za detekciju fosfata (engl., *color reagents*, CR) sastava 1% molibdat, 4% FeSO<sub>4</sub> u 0,6 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Priređene su 4 tubice u kojima je potvrđena:

- A. bazalna količina oslobođenog fosfata;
- B. ukupna količina oslobođenog fosfata;
- C. količina oslobođenog fosfata uz inhibiranu NKA;
- D. količina oslobođenog fosfata uz inhibiranu ukupnu PMCA.

Daljnja priprema se odvijala na ledu. Za pojedinu reakciju (A-D) pripremljene su matične otopine koje su razdijeljene po tubicama: A - 450 µL reakcijske otopine, B - 400 µL reakcijske otopine, C – 400 µL reakcijske otopine za inhibiciju NKA; D – 400 µL reakcijske otopine za inhibiciju PMCA. U tubice odgovarajućih otopina dodano je 50 µL homogenata konačne koncentracije proteina 50 µg na 500 mL reakcijske smjese. Protokol slijedi daljnje korake:

1. Sadržaj tubica promiješan je i inkubacija traje 10 min na 37°C, na tresilici.
2. Reakcija u tubicama B, C i D pokrenula se dodavanjem 50 µL ATP-a.
3. Sadržaj tubica je promiješan, te slijedi inkubacija na 37°C 15 min, na tresilici.

4. Reakcija je zaustavljena na ledu dodavanjem 500  $\mu\text{L}$  pothlađene stop otopine.
5. Proteini reakcijske smjese su se istaložili centrifugiranjem na 14 000 rpm 10 min na 4 °C.
6. U međuvremenu se svježe zamiješalo otopinu CR.
7. Iz tubica je uzeto 500  $\mu\text{L}$  supernatanta i dodatno 500  $\mu\text{L}$  CR.
8. Boja se razvijala 45 min na sobnoj temperaturi.
9. Apsorbancija je mjerena na 700 nm.

#### **4.2.8.2 Obrada podataka**

Za kvantifikaciju izmjerenih vrijednosti načinjen je baždarni pravac pomoću poznatih koncentracija otopine fosfata (raspon od 50  $\mu\text{g}$  do 500  $\mu\text{g}$ ). U jednadžbu pravca dodaju se vrijednosti dobivene sljedećim načinom:

1. vrijednostima reakcija B, C i D se oduzela vrijednost bazalne količine oslobođenog fosfata A;
2. vrijednost B - C dale su vrijednost ouabain-osjetljive aktivnosti NKA;
3. vrijednost B - D dale su vrijednost CE-osjetljive aktivnosti PMCA;
4. umetanjem vrijednosti u jednadžbu pravca dobivena je masa ( $\mu\text{L}$ ) oslobođenog fosfata;
5. vrijednosti aktivnosti su izražene kao mmol oslobođenog fosfata po mg proteina po satu ( $\mu\text{mol P}_i / (\text{mg}_{\text{proteina h}}$ ).

#### **4.2.9 Statističke analize**

Za statističke analize i izradu grafičkih prikaza korišten je program GraphPad Prism (GraphPad Software). Nakon prikupljanja, za svaki skup podataka provjerena je normalnost distribucije podataka Shapiro-Wilkovim testom. U slučaju normalne distribucije i dovoljne veličine uzorka korišten je t-test. Neparometrijski Mann-Whitney test je primijenjen kod analiza manjeg uzorka i kada podaci nisu slijedili normalnu raspodjelu. Statistička značajnost je definirana kod vrijednosti  $p < 0,05$ . Za analizu je korišten uzorak u minimalnom biološkom triplikatu.

## 5. REZULTATI

Integriranim pristupom analize sinaptičkog proteoma, kao i pojedinačno odabranih proteina od interesa u funkciji sinaptičke plastičnosti (neuroplastin) i ionskog transporta (NKA i PMCA) na razini genske i proteinske ekspresije, njihove tkivne zastupljenosti, membranskog smještaja te enzimske aktivnosti, dobiveni su podaci koji nadopunjuju opis biokemijskih promjena živčanog tkiva mišjeg modela s ugašenim genom za TLR2.

### 5.1 Sinaptički proteom u moždanim regijama TLR2KO miševa

U ovom radu prikazane su specifične promjene sinaptičkog proteoma moždanog tkiva u miševa s nedostatkom TLR2. Podaci dobiveni analizom frakcija obogaćenih sinaptičkim spojevima analizirani su pomoću programa PEAKS (164–166). Proteini s najizraženijim promjenama podvrgnuti su analizi pomoću programa GeneCodis (169,170) i SynGO (171). Pomoću programa, genima/proteinima s najvećom promjenom pridružena su biološka i molekularna funkcija te stanična lokalizacija. Stanična lokalizacija obzirom na specifični odabir analiziranog staničnog odjeljka odražava razlike u organizaciji sinaptičkih lokaliteta dok molekularna i biološka funkcija odgovaraju promjenama na fiziološkoj razini.

Dobiveni rezultati upućuju na proteinske sustave koji trpe najveću promjenu u odnosu na kontrolnu skupinu te je omogućen uvid u promjene u okolini i izražaju potencijalnih partnera ispitivanih proteina ionskog transporta i sinaptičkog integriteta.

#### 5.1.1 Promjene sinaptičkog proteoma u mozgu TLR2KO miševa

Indikacije iz literature o promjenama koje zahvaćaju živčani sustav TLR2KO životinja ovdje su potvrđene na razini sinapse što povlači pitanje razlika u konektomu pojedinih moždanih regija. Rezultati prikazani u *Tablici 5.1.1.* pokazuju sve proteine čija je relativna količina promijenjena u odnosu na kontrolni uzorak, granične vrijednosti značajnosti postavljene su za signifikantnosti na  $\geq 15$  te za red veličine promjene (engl., *fold change*)  $\geq 1.5$ . U sve tri regije, nađena je značajna promjena količine 79 proteina, od toga je 47 s nižim izražajem, a 32 su s višim izražajem. Najveći broj proteina s trendom povećanog izražaja nađen je u moždanoj kori (13), dok je u malom mozgu utvrđeno više proteina s trendom smanjenog izražaja (25). U uzorcima hipokampusa nađen je podjednak broj proteina koji pokazuju bilo manji bilo veći izražaj u odnosu na kontrole (19 i 14).

Tablica 5.1.1. Popis specifično promijenjenih proteina u sinaptičkom proteomu moždanog tkiva TLR2KO miševa. PDB - engl. *Protein Data Bank*

	PDB kod	Naziv	Simbol
		↑	
Moždana kora 14	Q99PU5	<i>acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1</i>	Acsbg1
	P14231	<i>ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting, beta 2 polypeptide</i>	Atp1b2
	Q80XN0	<i>3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1</i>	Bdh1
	P06837	<i>growth associated protein 43</i>	Gap43
	Q61016	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 7</i>	Gng7
	Q8CAQ8	<i>inner membrane protein, mitochondrial</i>	Immt
	Q6WVG3	<i>potassium channel tetramerisation domain containing 12</i>	Kctd12
	P04370	<i>myelin basic protein</i>	Mbp
	Q9CR21	<i>NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit AB1</i>	Ndufab1
	Q9DCS9	<i>NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B10</i>	Ndufb10
	Q9CQJ8	<i>NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B9</i>	Ndufb9
	Q922S4	<i>phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated</i>	Pde2a
	Q9Z2Q6	<i>septin 5</i>	Septin5
	Q9R0P9	<i>ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1</i>	Uchl1
Hipokampus 13	P00158	<i>cytochrome b</i>	CYTB
	Q9JKC6	<i>cell cycle exit and neuronal differentiation 1</i>	Cend1
	P48771	<i>cytochrome c oxidase subunit 7A2</i>	Cox7a2
	Q9QXS6	<i>drebrin 1</i>	Dbn1
	Q9WV92	<i>erythrocyte membrane protein band 4.1 like 3</i>	Epb4113
	Q6R0H7	<i>GNAS (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating) complex locus</i>	Gnas
	Q8BUV3	<i>gephyrin</i>	Gphn
	Q9WUC3	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus H</i>	Ly6h
	Q791V5	<i>mitochondrial carrier 2</i>	Mtch2
	Q62425	<i>Ndufa4, mitochondrial complex associated</i>	Ndufa4
	Q9DBJ1	<i>phosphoglycerate mutase 1</i>	Pgam1
	P61027	<i>RAB10, member RAS oncogene family</i>	Rab10
	P09671	<i>superoxide dismutase 2, mitochondrial</i>	Sod2
Mali mozak 5	Q78IK2	<i>ATP synthase membrane subunit DAPIT</i>	Atp5md
	P63082	<i>ATPase, H<sup>+</sup> transporting, lysosomal V0 subunit C</i>	Atp6v0c
	P17182	<i>enolase 1B, retrotransposed</i>	Eno1b
	P19096	<i>fatty acid synthase</i>	Fasn
	P97772	<i>glutamate receptor, metabotropic 1</i>	Grm1



Moždana kora  
3

Q80TL4	<i>PHD finger protein 24</i>	Phf24
A2AQ07	<i>tubulin, beta 1 class VI</i>	Tubb1
Q8R4H2	<i>rho guanine nucleotide exchange factor 12</i>	Arhgef12

Hipokampus  
19

P60710	<i>actin, beta</i>	Actb
P14094	<i>ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide</i>	Atp1b1
Q8BLQ9	<i>cell adhesion molecule 2</i>	Cadm2
P80314	<i>chaperonin containing Tcp1, subunit 2 (beta)</i>	Cct2
Q62188	<i>dihydropyrimidinase-like 3</i>	Dpysl3
P10126	<i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1</i>	Eef1a1
P62631	<i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2</i>	Eef1a2
D3Z7P3	<i>glutaminase</i>	Gls
P08752	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting 2</i>	Gnai2
P02535	<i>keratin 10</i>	Krt10
Q6IFZ6	<i>keratin 77</i>	Krt77
P31938	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>	Map2k1
Q9QYG0	<i>N-myc downstream regulated gene 2</i>	Ndrg2
P52480	<i>pyruvate kinase, muscle</i>	Pkm
Q9Z2Q6	<i>septin 5</i>	Septin5
Q6X893	<i>solute carrier family 44, member 1</i>	Slc44a1
P31648	<i>solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 1</i>	Slc6a1
P60879	<i>synaptosomal-associated protein 25</i>	Snap25
O35526	<i>syntaxin 1A (brain)</i>	Stx1a

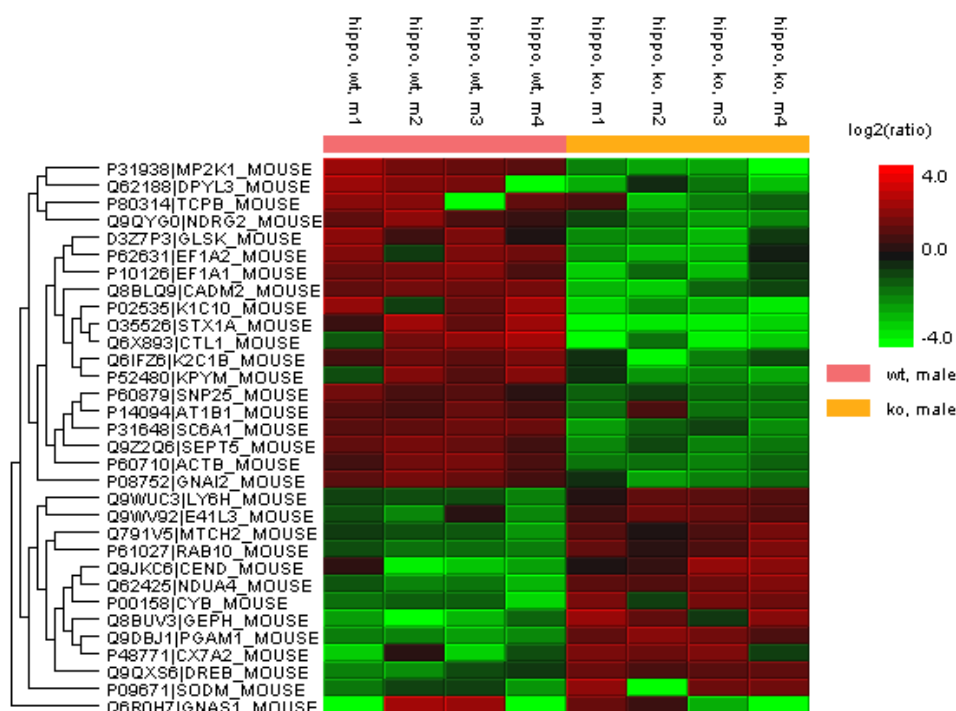
Mali mozak 25

P57780	<i>actinin alpha 4</i>	Actn4
P56135	<i>ATP synthase, H<sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F2</i>	Atp5j2
Q9CQQ7	<i>ATP synthase peripheral stalk-membrane subunit b</i>	Atp5pb
P42932	<i>chaperonin containing Tcp1, subunit 8 (theta)</i>	Cct8
P40240	<i>CD9 antigen</i>	Cd9
Q9JKC6	<i>cell cycle exit and neuronal differentiation 1</i>	Cend1
Q9CRB9	<i>coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3</i>	Chchd3
P62897	<i>cytochrome c, somatic</i>	Cycc
P60904	<i>DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C5</i>	Dnajc5
O08553	<i>dihydropyrimidinase-like 2</i>	Dpysl2
P10649	<i>glutathione S-transferase, mu 1</i>	Gstm1
Q8BMS1	<i>hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit alpha</i>	Hadha
Q8VED5	<i>keratin 79</i>	Krt79

P10637	<i>microtubule-associated protein tau</i>	Mapt
P04370	<i>myelin basic protein</i>	Mbp
Q9DCJ5	<i>NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A8</i>	Ndufa8
Q8K3J1	<i>NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S8</i>	Ndufs8
Q9D6J6	<i>NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit V2</i>	Ndufv2
Q505D7	<i>optic atrophy 3</i>	Opa3
O55022	<i>progesterone receptor membrane component 1</i>	Pgrmc1
P52480	<i>pyruvate kinase, muscle</i>	Pkm
Q9QUI0	<i>ras homolog family member A</i>	RhoA
Q9ES97	<i>reticulon 3</i>	Rtn3
Q8K2B3	<i>succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)</i>	Sdha
P17751	<i>triosephosphate isomerase 1</i>	Tpi1

Podaci su potom analizirani bioinformatičkim alatima te je opisano kako razlike u izražaju zahvaćaju pojedini specifični stanični odjeljak ili proteinsku aparaturu, te koje biološke i molekularne funkcije su promijenjene u proteomu sinaptičkih spojeva TLR2KO životinja.

## 5.1.2 Sinaptički proteom hipokampusa u mišjem modelu TLR2KO



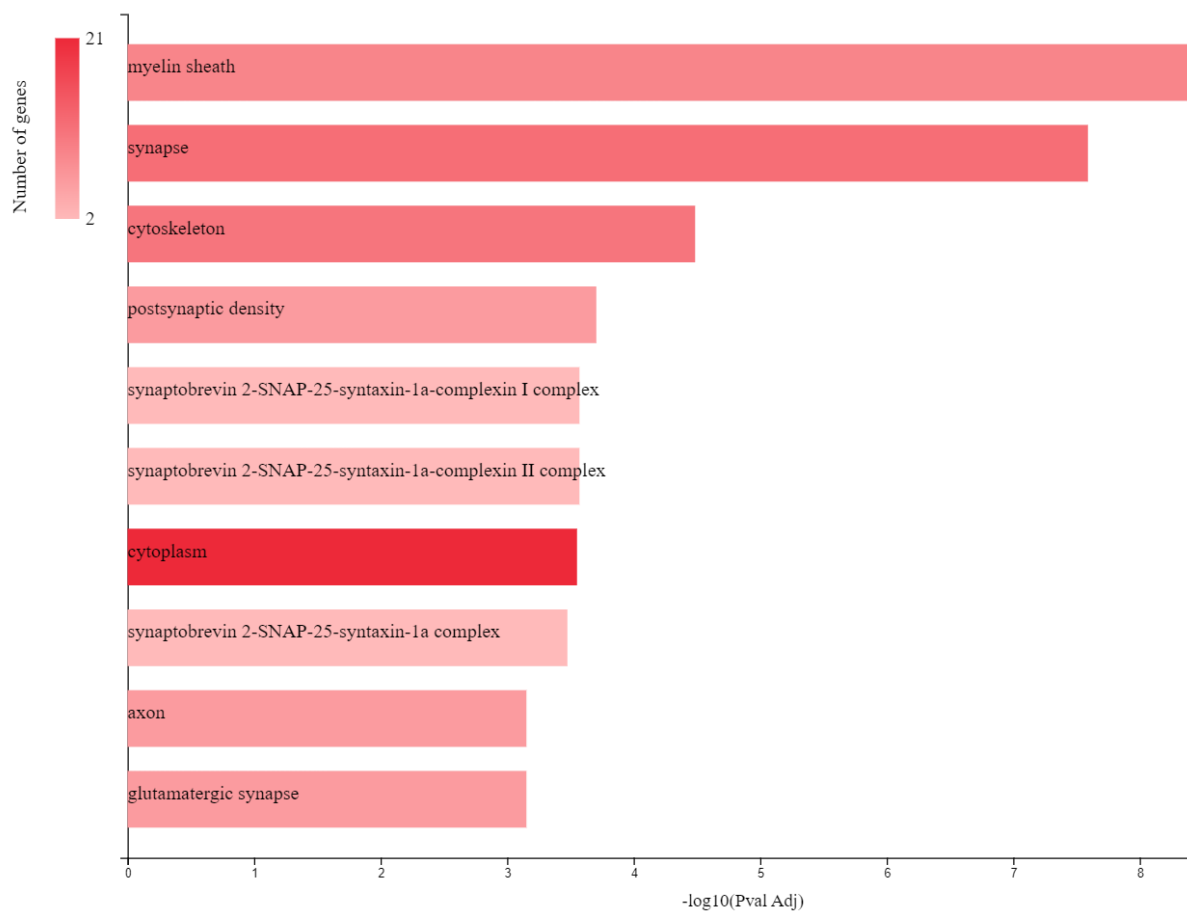
Slika 5.1.1. Grafički prikaz ekspresije sinaptičkih proteina hipokampusa TLR2KO miševa s višim i nižim relativnim količinama u odnosu na kontrolni uzorak.

Promjene u hipokampusu su najznačajnije te broje 32 proteina od kojih 19 sniženog i 13 povišenog izražaja (Slika 5.1.1.). Rezultati grupiranja proteina po staničnim odjeljcima i specifičnim proteinskim aparatima prikazani su u tablici 5.1.2. i na slici 5.1.2. Dijagram stanične lokalizacije pokazuje da su proteini grupirani oko funkcionalnih jedinica mijelinske ovojnice, sinapse, citoskeleta i aksona, postsinaptičkog zgusnuća, SNARE kompleksa endocitoze sinaptičkih vezikula te glutamatergičke transmisije (Slika.5.1.2.). Većina proteina je solubilna i nalazi se u citoplazmatskom prostoru sinapse. Analiza pokazuje da je u navedenim grupama najviše proteina s nižim izražajem što ukazuje na potencijalnu sinaptičku neravnotežu u ekscitacijskim i inhibicijskim krugovima.

Tablica 5.1.2. Rezultati analize grupiranja proteina u hipokampusu po specifičnim staničnim odjeljcima.

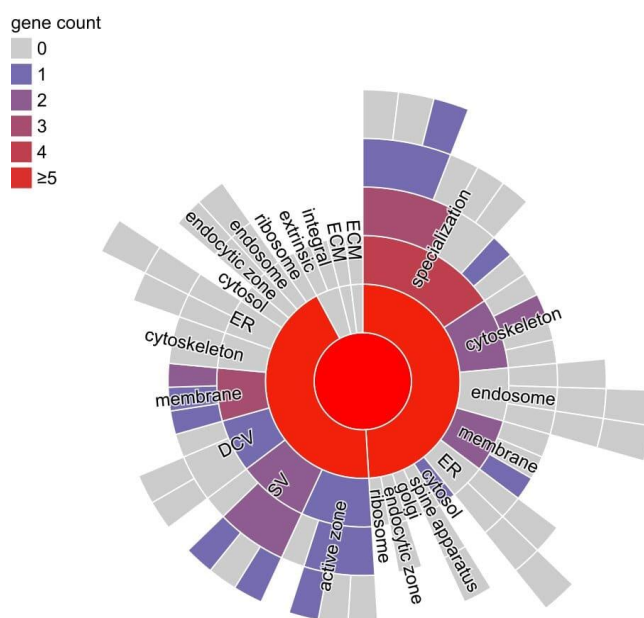
Specifični stanični odjeljak	broj proteina	p vrijednost	Zastupljenost u grupi	proteini
mijelinska ovojnica	9	3,01E+04	3,67E+15	Actb, Atp1b1, Cct2, Eef1a1, Eef1a2, Pgam1, Pkm, Snap25, Sod2
sinapsa	12	2,60E+07	1,08E+16	Actb, Cadm2, Dpysl3, Eef1a2, Gls, Gnai2, Gphn, Ly6h, Septin5, Slc6a1, Snap25, Stx1a

citoskelet	11	3,25E+11	6,25E+15	Actb, Dbn1, Epb4113, Gnai2, Gphn, Krt10, Krt77, Map2k1, Rab10, Septin5, Snap25
postsinaptičko zgušnuće	6	2,00E-04	1,35E+16	Actb, Dbn1, Epb4113, Gphn, Map2k1, Stx1a
kompleks sinaptobrevin 2-SNAP-25-sintaksin-1a-kompleksin I	2	2,67E-04	3,96E+15	Snap25, Stx1a
kompleks sinaptobrevin 2-SNAP-25-sintaksin-1a-kompleksin II	2	2,67E-04	3,96E+15	Snap25, Stx1a
citosol	21	2,78E-04	2,30E+15	Actb, Cadm2, Cct2, Dbn1, Dpysl3, Eef1a1, Eef1a2, Epb4113, Gls, Gnai2, Gnas, Gphn, Krt10, Map2k1, Ndrgr2, Pgam1, Pkm, Rab10, Septin5, Snap25, Sod2
kompleks sinaptobrevin 2-SNAP-25-sintaksin-1a	2	3,33E-04	3,17E+15	Snap25, Stx1a
akson	6	7,07E-04	9,15E+15	Actb, Cadm2, Map2k1, Slc6a1, Stx1a
glutamatergičke sinapse	6	7,07E-04	9,31E+15	Actb, Dbn1, Map2k1, Ndrgr2, Snap25, Stx1a



*Slika 5.1.2.* Grafički prikaz rezultata iz tablice 5.1.2. prema analizi provedenoj u programu GeneCodis. Dijagram grupa staničnih odjeljaka i specifičnih proteinskih aparatura promijenjen u sinaptoproteomu hipokampusa TLR2KO životinja.

Detaljniji dijagram izrađen je korištenjem podataka o sinaptomu miša a pokazuje da su promjene lokalizirane u presinaptičkim i postsinaptičkim dijelovima neurona (Slika 5.1.3.). Presinaptičke promjene su vidljive u aktivnoj zoni, metabolizmu sinaptičkih vezikula i proteinima membrane, a postsinaptičke u specijaliziranoj organizaciji, arhitekturi citoskeleta, membrani i citosolu. Obje metode ukazuju na promjene u istovjetnim dijelovima sinaptičkog proteoma. Molekularne funkcije su analizirane pomoću globalne baze funkcionalnih grupa, a pokazuju promjene u funkcijama vezanja proteina, s naglaskom na citoskeletne proteine, vezanje nukleotida, ponajviše GTP-a, te aktivnosti vođene GTP-om. Rezultati su prikazani u Tablici 5.1.3 i Slici 5.1.4.

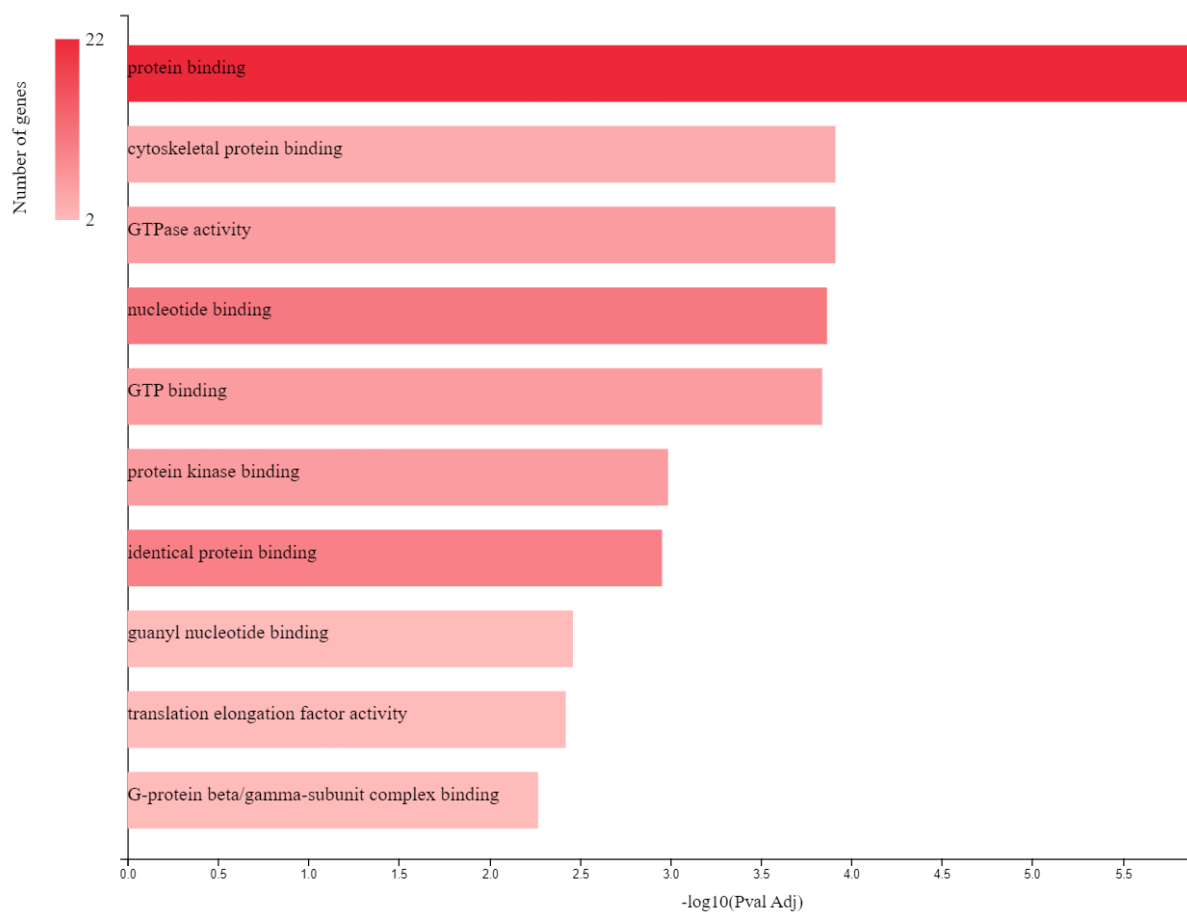


*Slika 5.1.3.* Grafički prikaz je izrađen uporabom programa SynGO. Prikaz promjena u sinaptičkim lokalitetima u TLR2KO tkivu hipokampusa. Specialization – specijalizacija, cytoskeleton – citoskelet, endosome – endosomi, membrane – membrana, ER – endoplazmatska mrežica, cytosol – citosol, spine apparatus – ustrojstvo dendritičkih trnova, golgi – Golgijev aparat, endocytic zone – zona endocitoze, ribosome – ribosomi, active zone – aktivna zona, SV – sinaptičke vezikule, DCV – vezikule gustog sadržaja, extrinsic – ekstrinzična svojstva sinapse, integral – integralna svojstva sinapse, ECM – izvanstanični matriks.

*Tablica 5.1.3.* Rezultati analize grupiranja proteina u hipokampusu po molekularnim funkcijama

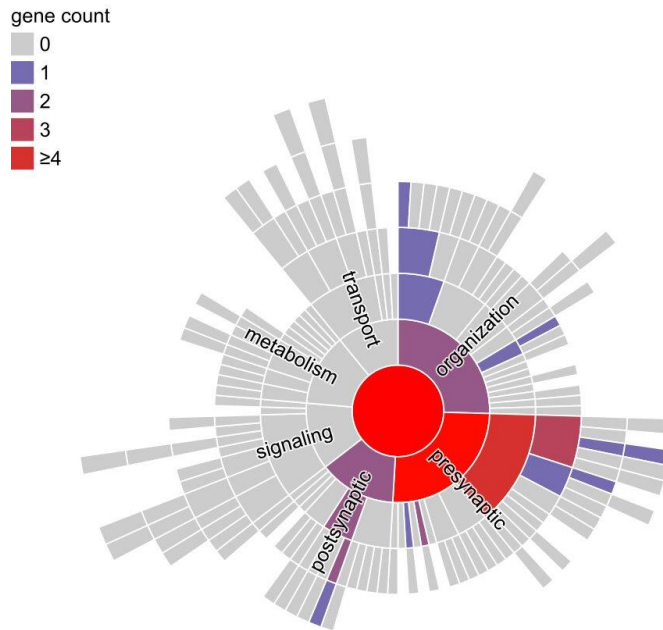
Molekularna funkcija	broj proteina	p vrijednost	Zastupljenost u grupi	proteini
Vežanje proteina	22	2,22E+09	1,73E+07	Actb, Atp1b1, Cadm2, Cend1, Dbn1, Dpysl3, Eef1a1, Epb4113, Gls, Gnai2, Gnas, Gphn, Krt10, Map2k1, Mtch2, Ndufa4, Pkm, Rab10, Septin5, Snap25, Sod2, Stx1a
Vežanje proteina citoskeleta	4	1,22E-04	2,85E+10	Dbn1, Epb4113, Gphn, Krt10

GTPazna aktivnost	6	1,22E-04	1,97E+10	Eef1a1, Eef1a2, Gnai2, Gnas, Rab10, Septin5
Vežanje nukleotida	11	1,35E-04	4,23E+10	Actb, Cct2, Eef1a1, Eef1a2, Gnai2, Gnas, Gphn, Map2k1, Pkm, Rab10, Septin5
Vežanje GTP-a	6	1,44E-04	5,63E+09	Eef1a1, Eef1a2, Gnai2, Gnas, Rab10, Septin5
Vežanje protein-kinaza	6	1,04E-03	4,85E+10	Actb, Atp1b1, Eef1a1, Eef1a2, Map2k1, Pgam1
Vežanje identičnih proteina	10	1,11E-03	6,05E+11	Actb, Dpysl3, Eef1a1, Gls, Gphn, Pkm, Septin5, Slc6a1, Sod2, Stx1a
Vežanje gvanilata	2	3,43E-03	2,14E-04	Gls, Gnai2
Aktivnost translacijskih elongacijskih faktora	2	3,78E-03	2,66E-04	Eef1a1, Eef1a2
Vežanje kompleksa G-proteina podjedinic beta/gamma	2	5,35E-03	4,18E-04	Gnai2, Gnas



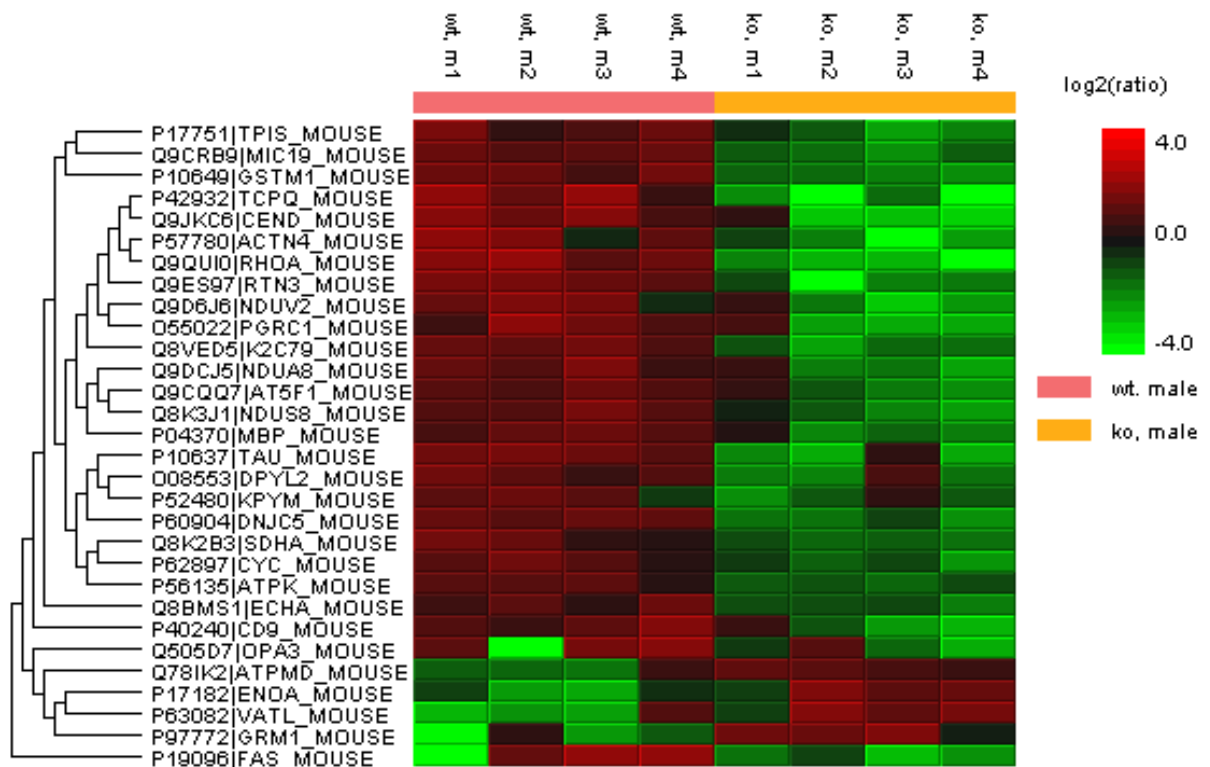
*Slika 5.1.4.* Grafički prikaz rezultata iz tablice 5.1.3. prema analizi provedenoj u programu GeneCodis. Dijagram funkcionalnih grupa promijenjen u sinaptoproteomu hipokampusa TLR2KO životinja.

Provjerom specifičnih sinaptičkih funkcija pokazalo se da najviše promjena trpi presinaptički neuron s funkcijom sidrenja vezikula na membranu te specijalizirani dijelovi postsinaptičkog aparata (Slika 5.1.5). Generalna organizacija sinapse je, također, pogođena nedostatkom proteina TLR2.



Slika 5.1.5. Grafički prikaz je izrađen uporabom programa SynGO. Prikaz promjena molekularnih funkcija sinapse u tkivu hipokampusa TLR2KO miševa.

### 5.1.3 Sinaptički proteom malog mozga u mišjem modelu TLR2KO



Slika 5.1.6. Grafički prikaz izražaja sinaptičkih proteina malog mozga TLR2KO miševa s višim i nižim relativnim količinama u odnosu na kontrolni uzorak.

Mali mozak je druga regija po broju značajnih razlika te broji 30 proteina (Slika 5.1.6.). Od njih 80% proteina ima niži izražaj u miševa TLR2KO. Prema analizi rezultata pokazano je da je mitohondrij mjesto najvećih promjena kao i procesi i proteinski kompleksi vezani za energetske metabolizam.

*Tablica 5.1.4.* Rezultati analize grupiranja proteina u malom mozgu po specifičnim staničnim odjeljcima.

Specifični stanični odjeljak	broj proteina	p vrijednost	Zastupljenost u grupi	proteini
Mijelinska ovojnica	10	3,89E+03	4,08E+16	Atp5pb, Cyps, Dpysl2, Eno1, Eno1b, Gstm1, Mbp, Ndufv2, Pkm, Sdha
Mitohondrij	17	4,12E+06	7,35E+15	Atp5j2, Atp5md, Atp5pb, Cend1, Chchd3, Cyps, Dpysl2, Fasn, Hadha, Ndufa8, Ndufs8, Ndufv2, Opa3, Pgrmc1, Pkm, RhoA, Sdha
Unutrašnja mitohondrijska membrana	9	8,12E+06	1,68E+16	Atp5j2, Atp5md, Atp5pb, Chchd3, Hadha, Ndufa8, Ndufs8, Ndufv2, Sdha
Respirasom	4	1,96E+11	5,97E+16	Cyps, Ndufa8, Ndufs8, Ndufv2
Mitohondrijski transport protona kompleks ATP sintaze	3	2,71E+11	1,48E+16	Atp5j2, Atp5md,
Kompleks fosfopiruvat hidrataze	2	3,44E-04	3,17E+15	Eno1, Eno1b
Kompleks I respiratornog lanca	3	3,88E-04	5,65E+15	Ndufa8, Ndufs8, Ndufv2
Membrane	22	4,98E-04	2,08E+16	Atp5j2, Atp5md, Atp5pb, Atp6v0c, Cd9, Cend1, Chchd3, Dnajc5, Dpysl2, Eno1, Eno1b, Grm1, Hadha, Mapt, Mbp, Ndufa8, Ndufs8, Ndufv2, Pgrmc1, RhoA, Rtn3
Kompleks prijenosa elektrona ATP sintaze, factor sprege F(o)	2	9,26E-04	1,58E+16	Atp5j2, Atp5pb
Projekcije neurona	7	9,26E-04	1,70E+04	Actn4, Dpysl2, Eno1, Eno1b, Grm1, Mapt, Pgrmc1

S obzirom na veliki broj proteina sniženog izražaja može se zaključiti da su energetske potrebe tkiva malog mozga promijenjene. Rezultati analize su prikazani u tablici 5.1.4. i na slici 5.1.7. Uz ove razlike pojavila se i istovjetna razlika kod mijelinskih ovojnica koja potvrđuje navode u literaturi o regulaciji funkcije oligodendrocita. S obzirom na to što je prilikom izolacije moguće da se mitohondrijska frakcija ne razdvoji do kraja, dolazi do zasićenja proteinima energetskeg metabolizma koji su u neurona izrazito obogaćeni zbog visoke energetske potrebe neurona.

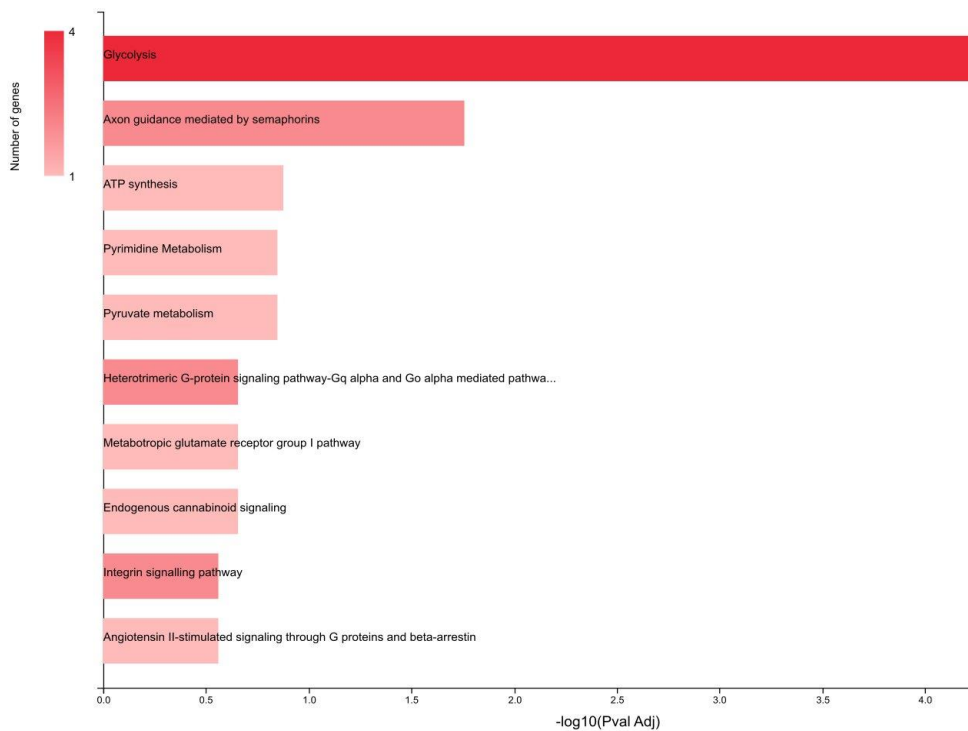




Preglednom analizom proteina s promijenjenim izražajem u biblioteci sinaptičkog proteoma pokazalo se da je vrlo malo onih koji su uključeni u specifične sinaptičke funkcije. Svega je 6 proteina pokazano da pripada sinaptičkom miljeu: Dnajc5, Grm1, Dpysl2, Rtn3, RhoA, Atp6v0c (Slika 5.1.8.). Od navedenih Dnajc5, Grm1, Rtn3, Atp6v0c su integralni dijelovi aparature sidrenja sinaptičkih vezikula dok su Dpysl2 i RhoA regulatorni elementi postsinaptičke gustoće. Unatoč rezultatima na koje utječu podaci o mitohondrijskim proteinima, mogu se razlučiti promjene kao slične onima zabilježenima u hipokampusu TKR2KO životinja. Dodatno fokusiranje rezultata na sinaptički proteom je postignuto korištenjem drugog algoritma za funkcionalno grupiranje proteina.

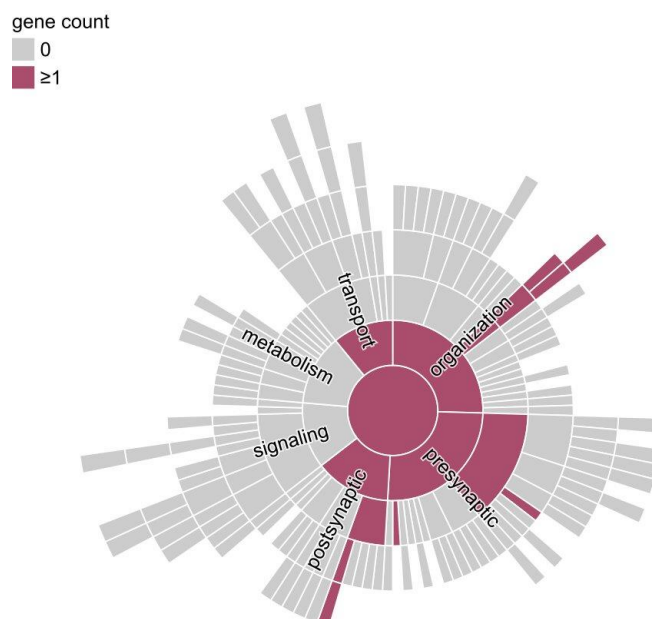
*Tablica 5.1.5* Rezultati analize grupiranja proteina u malom mozgu po molekularnim funkcijama.

Molekularna funkcija	broj proteina	p vrijednost	Zastupljenost u grupi	proteini
Glikoliza	4	1,62E+10	4,44E+15	Enol1,Enol1b, Pkm, Tpi1
Navođenje aksona posredovano semaforinima	2	1,75E-02	2,81E+16	Dpysl2, RhoA
Sinteza ATP	1	1,33E-01	4,22E+16	Cycs
Metabolizam pirimidina	1	1,43E-01	2,34E+16	Dpysl2
Metabolizam piruvata	1	1,43E-01	2,34E+16	Pkm
Signalni put heterotrimernog G-proteina – put posredovan Gq alpha i Go alpha	2	2,21E-01	3,80E+15	Grm1, RhoA
Signalni put metabotropnih glutamatnih receptora groupe I	1	2,21E-01	9,17E+15	Grm1
Signalizacija endogenim kanabinoidima	1	2,21E-01	9,59E+15	Grm1
Signalni put aktiviran integrinima	2	2,75E-01	2,74E+14	Actn4, RhoA
Signalizacija posredovana G proteinom i beta arestinom stimulirana angiotenzinom	1	2,75E-01	6,03E+16	RhoA



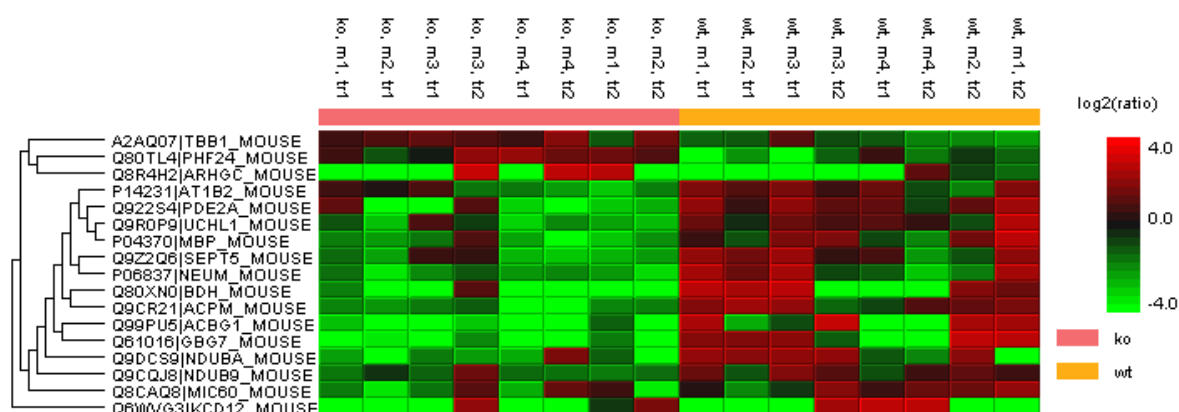
*Slika 5.1.9.* Grafički prikaz rezultata iz tablice 5.1.5. prema analizi provedenoj u programu GeneCodis. Dijagram funkcionalnih grupa promijenjen sinaptoproteomu malog mozga TLR2KO miševa.

Analiza podataka molekularne funkcije, sa sinaptičkim proteomom kao pozadinom pretrage, za mali mozak je pokazala niski odaziv u rezultatu no, kao i za hipokampus rezultati su grupirani oko jednakih funkcija u sinaptičkoj organizaciji, presinaptičkim i postsinaptičkim funkcijama te transportu.



*Slika 5.1.10.* Grafički prikaz je izrađen uporabom programa SynGO. Prikaz promjena molekularnih funkcija sinapsi a u tkivu malog mozga TLR2KO miševa.

## 5.1.4 Sinaptički proteom moždane kore u mišjem modelu TLR2KO

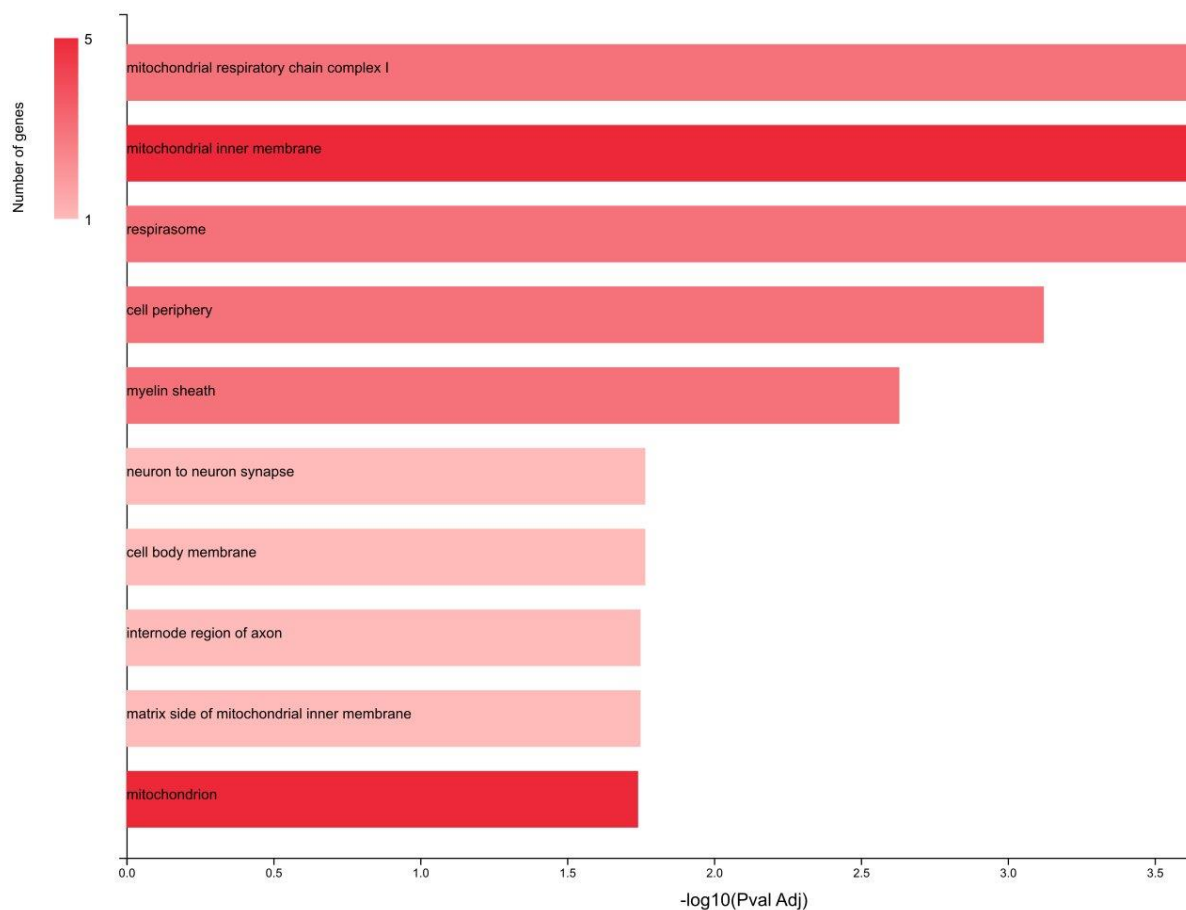


Slika 5.1.11. Grafički prikaz sinaptičkih proteina moždane kore TLR2KO miševa s višim i nižim relativnim količinama u odnosu na kontrolni uzorak.

Rezultati analize proteina sinaptičkih spojeva moždane kore pokazuju najmanje proteina zahvaćenih promjenama uzrokovanih nedostatkom TLR2. Od ukupno 17 proteina samo su tri sniženog izražaja dok je ostalih 14 povećanog izražaja u TLR2KO miševa u odnosu na kontrolnu skupinu te ga ovo čini zanimljivom regijom u odnosu na hipokampus i mali mozak. Proteini su grupirani, slično malom mozgu ali s manjim udjelom, oko mitohondrijskih proteina energetskeg metabolizma. Ostatak se odnosi na mijelinsku ovojnicu te staničnu membranu.

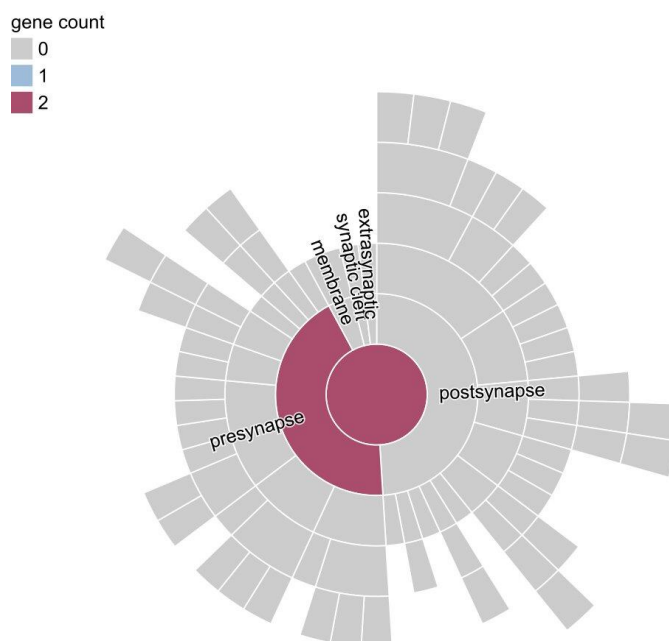
Tablica 5.1.6. Rezultati analize grupiranja proteina u moždanoj kori po specifičnim staničnim odjeljcima

specifični stanični odjeljak	broj proteina	p vrijednost	Zastupljenost u grupi	proteini
Kompleks I respiratornog lanca	3	7,95E+09	1,25E+16	Ndufab1, Ndufb10, Ndufb9
Unutrašnja membrana mitohondrija	5	7,95E+09	2,07E+15	Bdh1, Immt, Ndufab1, Ndufb10, Ndufb9
Respirasom	3	7,95E+09	9,92E+15	Ndufab1, Ndufb10, Ndufb9
Stanična periferija	3	7,52E-04	4,27E+15	Atp1b1, Gap43, Mbp
Mijelinska ovojnica	3	2,33E-03	2,71E+15	Immt, Mbp, Uchl1
Neuron-neuron sinapse	1	1,71E-02	5,84E+15	Atp1b1
Stanična membrana	1	1,71E-02	5,84E+15	Atp1b1
Internodalna regija aksona	1	1,77E-02	4,38E+05	Mbp
Unutrašnja membrana mitohondrija – strana prema matriksu	1	1,77E-02	4,38E+05	Bdh1
Mitohondrij	5	1,82E-02	4,79E+15	Bdh1, Immt, Ndufab1, Ndufb10, Ndufb9



*Slika 5.1.12.* Grafički prikaz rezultata iz tablice 5.1.6. prema analizi provedenoj u programu GeneCodis. Dijagram grupa staničnih odjeljaka i specifičnih proteinskih aparatura promijenjen u sinaptoproteomu moždane kore TLR2KO miševa.

Rezultati grupiranja na sinaptičke odjeljke sa sinaptičkim proteomom kao pozadinom pretrage pokazali su razliku u izraženosti samo dva proteina sa sinaptičkom grupacijom, Septin5 i Gap43 koji su članovi postsinaptičkih lokaliteta. Ostatak proteina, iako pokazuju vrlo specifična djelovanja, poput kalijevog kanala Kctd12 koji je dio regulacijskog kompleksa GABA<sub>R</sub> ili Gng7 koji je zadužen za otvaranje GTP-om stimuliranih kalijevih kanala, nisu pridruženi niti jednoj.

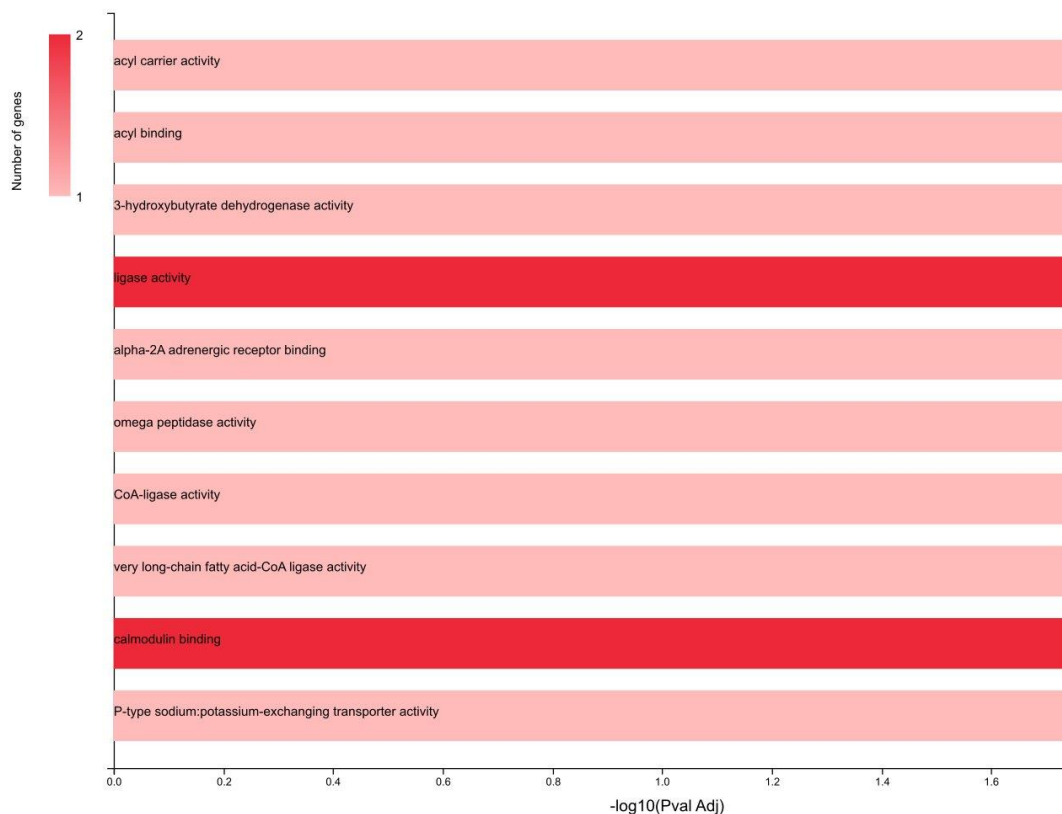


Slika.5.1.13. Grafički prikaz je izrađen uporabom programa SynGO. Prikaz promjena u sinaptičkim lokalitetima u tkivu moždane kore TLR2KO miševa.

Kod molekularnih funkcija zabilježen je rasap među funkcionalnim grupama te je nekolicina proteina s vrlo šarolikom funkcijom dospjela na vrh ljestvice.

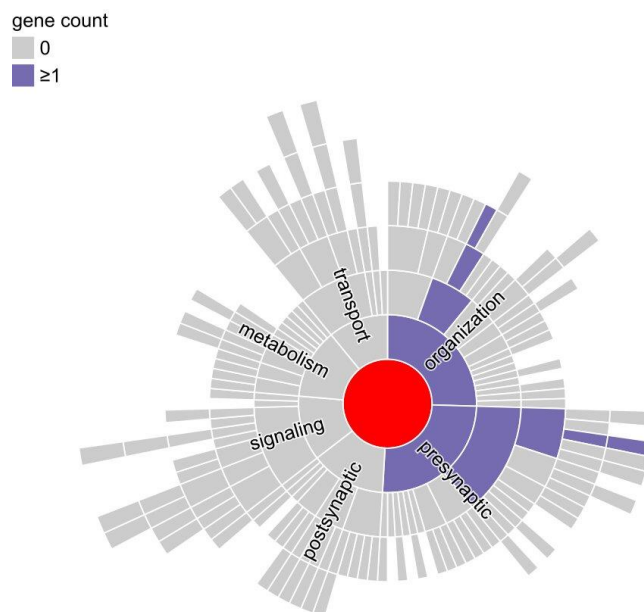
Tablica 5.1.7. Rezultati analize grupiranja proteina u moždanoj kori po molekularnim funkcijama.

Molekularna funkcija	broj proteina	p vrijednost	Zastupljenost u grupi	proteini
prijenos acilnih lanca	1	1,08E-02	1,99E+16	<i>Ndufab1</i>
vezanje acilnih lanaca	1	1,08E-02	1,99E+16	<i>Ndufab1</i>
3-hidroksibutirat-dehidrogenazna aktivnost	1	1,44E-02	9,97E+15	<i>Bdh1</i>
ligazna aktivnost	2	1,46E-02	2,93E+16	<i>Acsbg1, Uchl1</i>
vezanje alfa-2A adrenergičnih receptora	1	1,46E-02	4,98E+15	<i>Acsbg1</i>
omega peptidazna aktivnost	1	1,46E-02	6,65E+15	<i>Acsbg1</i>
CoA-ligazna aktivnost	1	1,54E-02	3,99E+16	<i>Uchl1</i>
dugolančane masne kiseline-CoA ligazna aktivnost	1	1,79E-02	2,22E+14	<i>Uchl1</i>
vezanje kalmodulina	2	1,79E-02	2,03E+16	<i>Gap43, Mbp</i>
P tip izmjene natrij:kalijskim posredstvom transportera	1	1,79E-02	1,99E+16	<i>Atp1b1</i>



*Slika 5.1.14.* Grafički prikaz rezultata iz tablice 5.1.7. prema analizi provedenoj u programu GeneCodis. Dijagram funkcionalnih grupa promijenjen u sinaptoproteomu moždane kore TLR2KO miševa.

S obzirom na sinaptički proteom, molekularne funkcije se naziru na područjima sinaptičke organizacije u vidu organiziranja postsinaptičke gustoće posredstvom proteina Gap43, te presinaptičkog neurona i sidrenja sinaptičkih vezikula preko septinskih kompleksa.



*đSlika 5.1.15.* Grafički prikaz je izrađen uporabom programa SynGO. Prikaz promjena molekularnih funkcija sinapsi u tkivu moždane kore TLR2KO miševa.

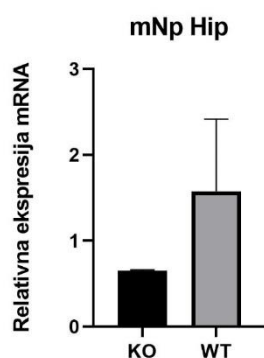


## 5.2 Izražaj odabranih gena u izoliranim moždanim regijama TLR2KO miševa

Nakon uočenih razlika u sinaptičkom proteomu u mozgu životinja TLR2KO pristupilo se analizi genskog izražaja odabranih proteina. U uzorcima izoliranim od 5 TLRKO i 5 kontrolnih miševa analiziran je relativni izražaj mRNA za Np, dvije inačice PMCA2 i 4, te tri varijante  $\alpha$  podjedinice NKA i 3 varijante  $\beta$  podjedinice NKA. Izbor PMCA 2 i 4 je temeljen na literaturnim navodima gdje je pokazano da Np - PMCA2 i 4 kompleksi ovise o lipidnom okolišu te se zajedno nalaze u lipidnim splavima. Varijante NKA $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2 su izražene u astrocitima dok su NKA $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 3 izražene u neuronima. Kombinacija NKA $\alpha$ 2 $\beta$ 2 je pokazana kao najzastupljeniji kompleks u astrocitima, a NKA $\alpha$ 3 $\beta$ 1 i NKA $\alpha$ 1 $\beta$ 1 u neuronima. U sljedećim podnaslovima navedeni TLR2KO i kontrolni uzorci se odnose na uzorke tkiva hipokampusa, malog mozga odnosno moždane kore izolirane iz miševa TLR2KO i kontrolnih uzoraka miševa divljeg tipa.

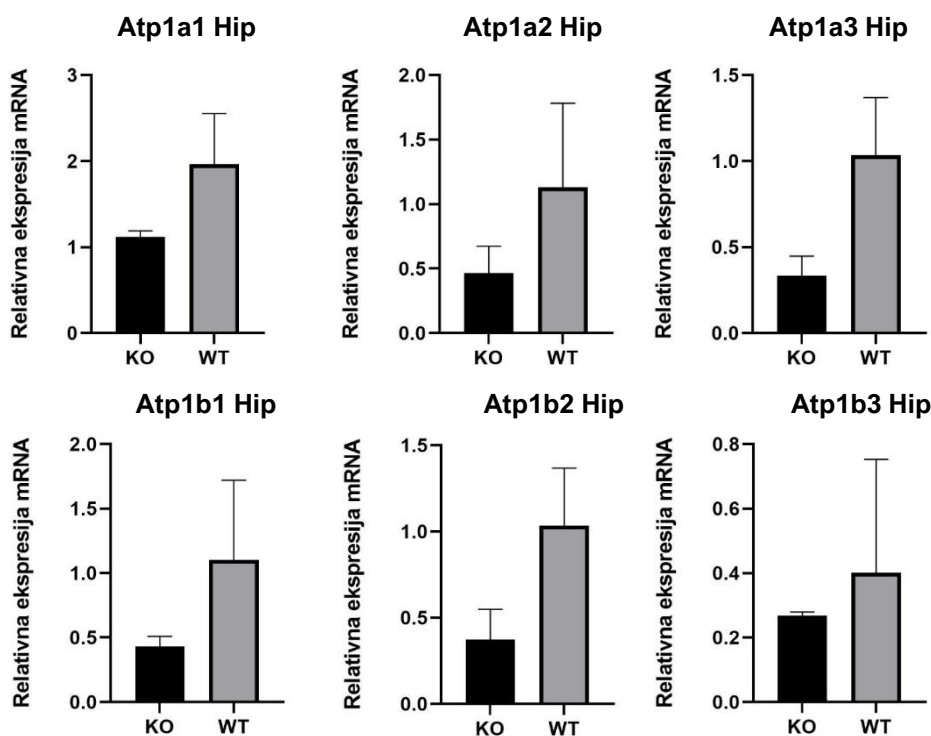
### 5.2.1 Relativna količina mRNA odabranih proteina u hipokampusu

Metodom RT-qPCR definirana je relativna količina mRNA gena *Ntpn*. Np55 i Np65 se prepisuju s istovjetne mRNA te se posttranskripcijskom doradom istovjetna mRNA obrađuje u konačni produkt koji rezultira s dvije izoforme. Analizom je pokazano da je produkt prepisivanja snižen u TLR2KO uzoraka hipokampusa u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Nije pokazana statistički značajna razlika u relativnom izražaju pNp mRNA između navedenih grupa (Mann-Whitney-ev test) (Slika 5.2.1.).



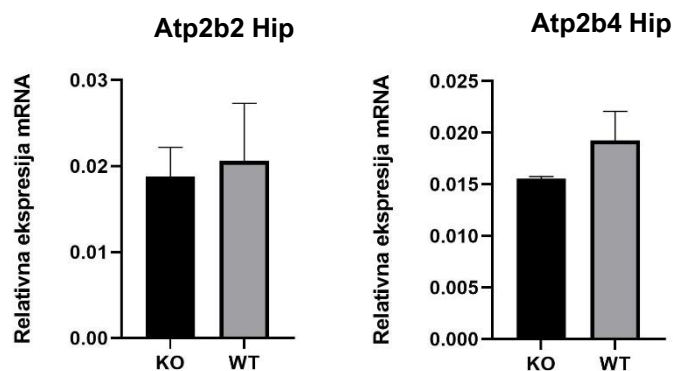
Slika 5.2.1. Grafički prikaz analize relativne ekspresije mRNA gena *Ntpn* u tkivu hipokampusa. KO – uzorak hipokampusa TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljeg tipa.

Kod izooblika NKA $\alpha$  i NKA $\beta$  pokazano je da relativna količina genskog produkta svih inačica  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica pokazuje donekle nižu ekspresiju u TLR2KO uzoraka u odnosu na kontrolne uzorke divljega tipa (Slika 5.2.2.), no bez statističke značajnosti (Mann-Whitney-ev test).



Slika 5.2.2. Grafički prikaz analize relativne ekspresije mRNA u tkivu hipokampusa za gene *Atp1a1*, *Atp1a2*, *Atp1a3*, koji kodiraju za katalitičku  $\alpha$  podjedinicu i gene *Atp1b1*, *Atp1b2*, *Atp1b3* koji kodiraju za  $\beta$  podjedinicu NKA. KO – uzorak hipokampusa TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljeg tipa.

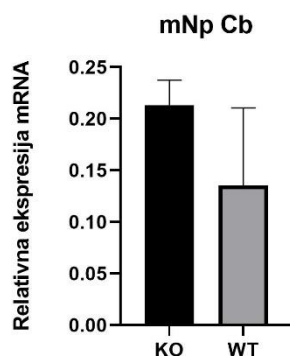
Kod mRNA koje kodiraju za neuronalnu inačicu PMCA2 i ubikvitarnu inačicu PMCA4 uočen je također trend snižene relativne količine u TLR2KO uzoraka u usporedbi s kontrolnim uzorkom, no ponovo bez statistički značajnih razlika (Mann-Whitney-ev test) (Slika 5.2.3.).



Slika 5.2.3. Grafički prikaz analize relativne ekspresije mRNA gena *Atp2b2* i *Atp2b4* u tkivu hipokampusa. KO – uzorak hipokampusa TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljeg tipa.

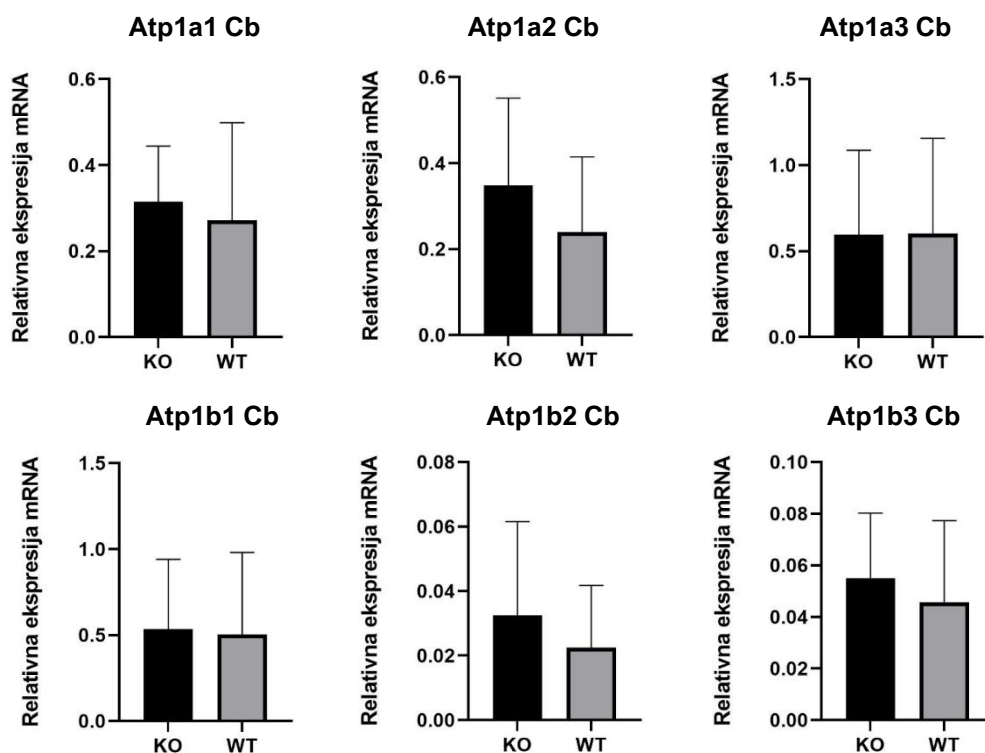
## 5.2.2 Relativna količina mRNA odabranih proteina u malom mozgu

U tkivu malog mozga genski produkt gena *Nptn* pokazuje relativno povećanje razine u TLR2KO uzoraka u odnosu na kontrolni uzorak divljeg tipa (Slika 5.2.4.). Ovaj porast nije praćen statističkom značajnošću (Mann-Whitney-ev test).

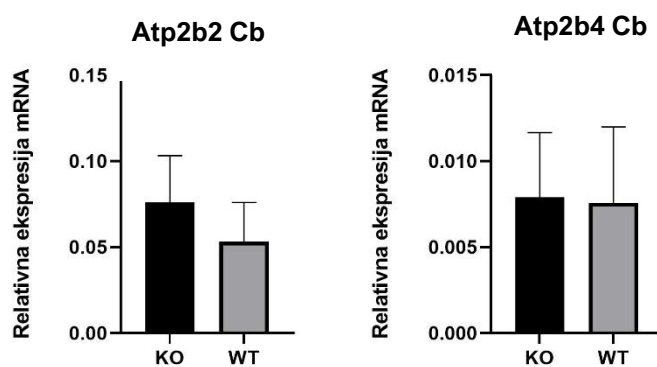


Slika 5.2.4. Grafički prikaz analize relativne ekspresije mRNA gena *Nptn* u tkivu malog mozga. KO – uzorak malog mozga TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak malog mozga miševa divljeg tipa.

Analiza količine mRNA za pojedine gene  $NKA\alpha$  i  $NAK\beta$  pokazala je da je relativna količina mRNA svih inačica podjedinica povećana u uzorcima TLR2KO u odnosu na kontrolni uzorak (Slika 5.2.5.). Kao i u hipokampusu relativno povećanje količine mRNA u uzorcima TLR2KO nije popraćeno statističkom značajnošću nakon analize statističkim testovima. Dvije inačice PMCA pokazale su da je relativna količina mRNA PMCA2 viša u uzorcima TLR2KO, nego u kontrolnom uzorku, dok je za inačicu PMCA4 pokazano da je relativna količina mRNA jednaka u obje promatrane skupine (Slika 5.2.6.). Statistički testovi (Mann-Whitney-ev test) nisu utvrdili značajnu razliku izražaja mRNA proteina PMCA2.



Slika 5.2.5. Grafički prikaz analize relativne ekspresije mRNA u tkivu malog mozga za gene *Atp1a1*, *Atp1a2*, *Atp1a3*, koji kodiraju za katalitičku  $\alpha$  podjedinicu i gene *Atp1b1*, *Atp1b2*, *Atp1b3* koji kodiraju za  $\beta$  podjedinicu NKA. KO – uzorak malog mozga TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak malog mozga miševa divljeg tipa.

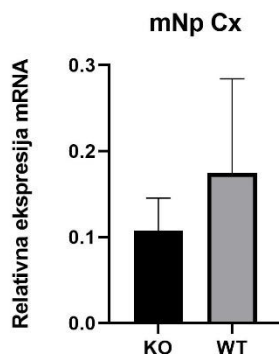


Slika 5.2.5. Grafički prikaz analize relativne ekspresije mRNA gena *Atp2b2* i *Atp2b4* u tkivu malog mozga. KO – uzorak malog mozga TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak malog mozga miševa divljeg tipa.

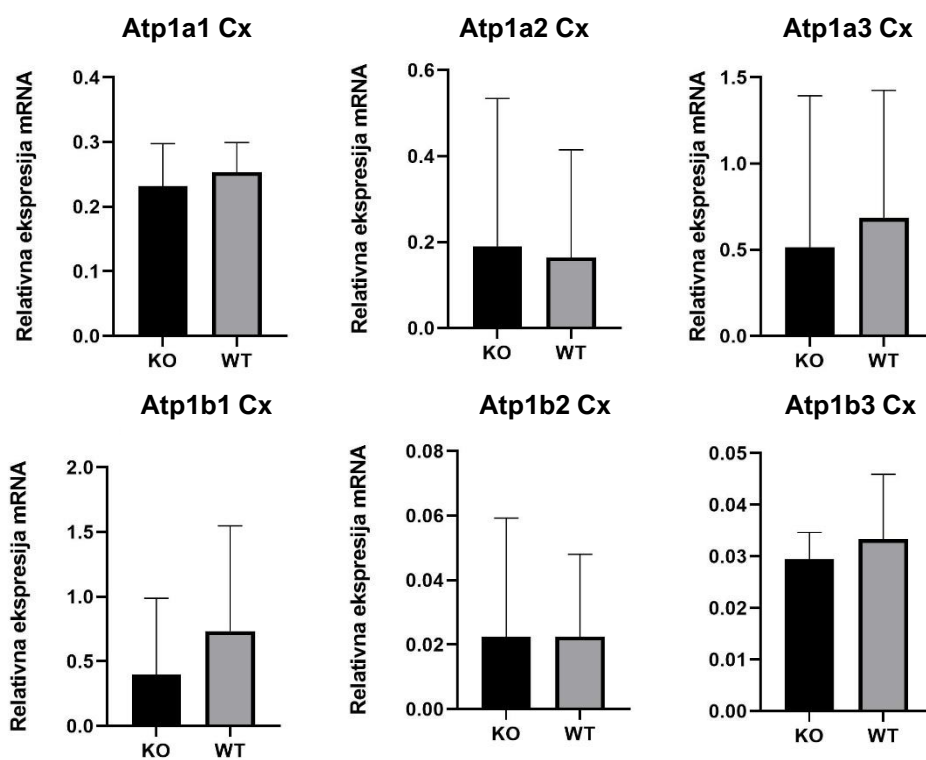
### 5.2.3 Relativna količina mRNA odabranih proteina u moždanoj kori

Tkivo moždane kore pokazalo je smanjenu relativnu količinu mRNA gena *Nptn* u uzorcima TLR2KO životinja u odnosu na tkivo kontrolnih uzoraka (Slika 5.2.6.), uočena razlika nije bila statistički značajna (Mann-Whitney-ev test). Genski produkti podjedinca NKA pokazuju smanjenje relativne količine mRNA  $\alpha 1$  i  $\alpha 3$  te  $\beta 1$  i  $\beta 3$  podjedinica dok promjene nisu uočene u relativnoj količini genskog produkta *Atp1a2* i *Atp1b2* (Slika 5.2.7.).

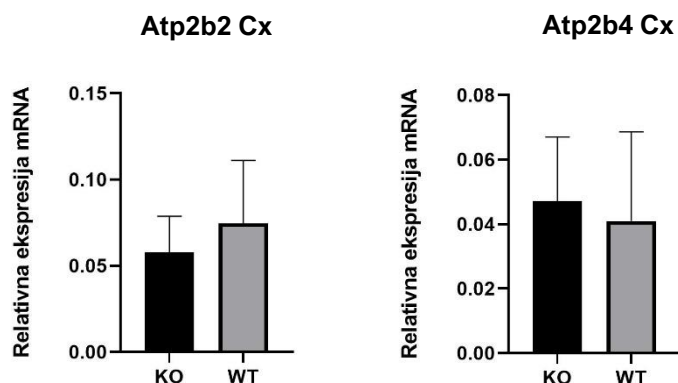
U uzorcima TLR2KO relativno smanjenje je uočeno u količini genskog produkta *Atp2b2*, dok je kod *Atp2b4* uočeno relativno povećanje genskog produkta (Slika 5.2.8.). Utvrđene razlike nisu bile statistički značajne (Mann-Whitney-ev test).



Slika 5.2.6. Grafički prikaz analize relativne ekspresije mRNA gena *Nptm* u tkivu moždane kore. KO – uzorak moždane kore TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak moždane kore miševa divljeg tipa.



Slika 5.2.7. Grafički prikaz analize relativne ekspresije mRNA u tkivu moždane kore za gene *Atp1a1*, *Atp1a2*, *Atp1a3*, koji kodiraju za katalitičku  $\alpha$  podjedinicu i gene *Atp1b1*, *Atp1b2*, *Atp1b3* koji kodiraju za  $\beta$  podjedinicu NKA. KO – uzorak moždane kore TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak moždane kore miševa divljeg tipa.

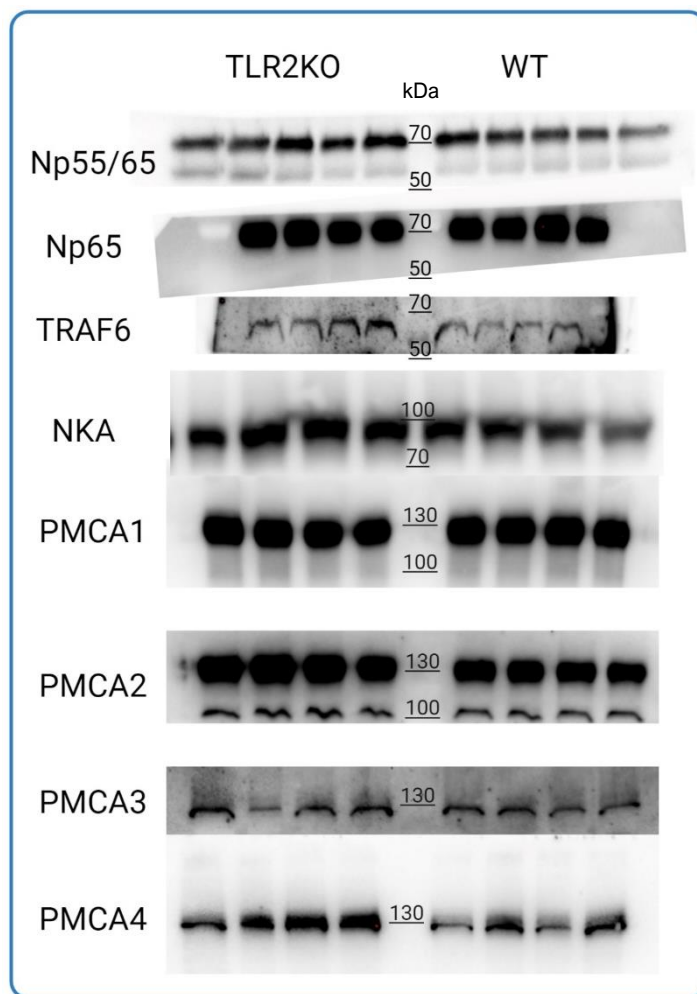


Slika 5.2.8. Grafički prikaz analize relativne ekspresije mRNA gena *Atp2b2* i *Atp2b4* u tkivu moždane kore. KO – uzorak moždane kore TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak moždane kore divljeg tipa.

### 5.3 Analiza odabranih membranskih i citosolnih proteina metodom *Western blot*

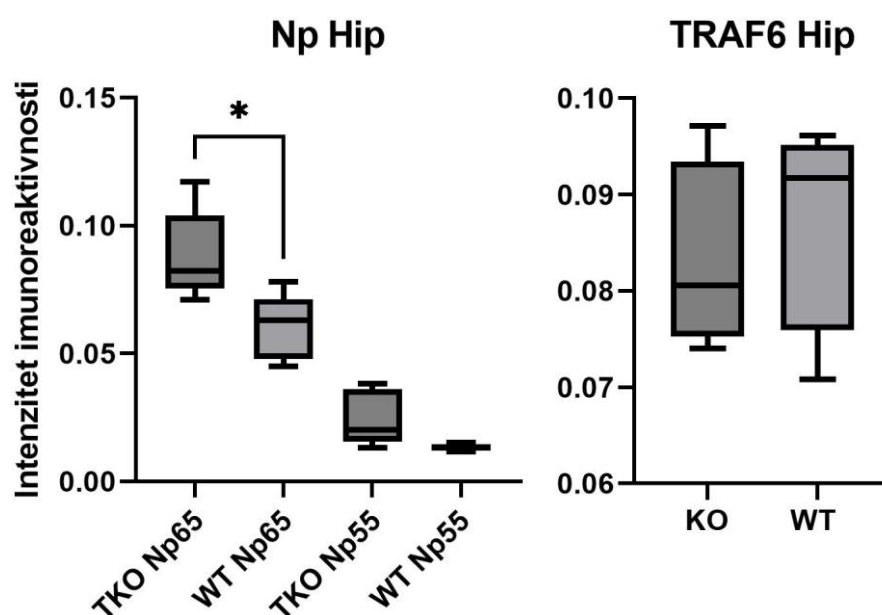
Nakon uvida u stanje sinaptičkog proteoma i genske ekspresije pristupilo se imunoznačavanju proteina Np, NKA, PMCA1-4 te TRAF6 kako bi se definirao utjecaj nedostatka TLR2 na navedene proteine od interesa. S obzirom na opisane funkcije TLR2 u izgradnji živčanog sustava i rezultate proteomske analize očekivali smo promjene u kontekstu membrane živčanih stanica i ukupnih membranskih sustava. Promatrajući sinaptičke i neuronalne izooblike proteina od interesa te izražaj proteina koji održavaju ionsku homeostazu živčanog sustava opisani rezultati upotpunjuju položaj i uloge TLR2 u membranskom metabolizmu. Korištenjem specifičnih protutijela za Np65, Np55 i TRAF6 vizualiziran je izražaj proteina po regijama. Protutijelo Np55 prepoznaje obje inačice Np te se uočavaju dvije proteinske vrpce, dok je protutijelo za detekciju Np65 specifično za dodatnu Ig-3 domenu te definira samo jednu proteinsku vrpcu. Sadržaj NKA je detektiran protutijelom specifičnim za katalitičku  $\alpha 1$  podjedinicu NKA, a sadržaj PMCA je provjeren pomoću specifičnih protutijela za 4 izooblika PMCA. Za kvantifikaciju je provedena *Stain-free* metoda koja koristi ukupnu količinu proteina kao standard prema kojemu se normalizira intenzitet imunokemijskog signala. Analizirani su tkivni homogenati 5 TLR2KO i 5 kontrolnih uzoraka. U sljedećim podnaslovima navedeni TLR2KO i kontrolni uzorci se odnose na tkivne homogenate hipokampusu, malog mozga odnosno moždane kore izolirane iz miševa TLR2KO genotipa i kontrolnih uzoraka miševa divljeg tipa.

### 5.3.1 Analiza prisutnosti odabranih proteina u hipokampusu



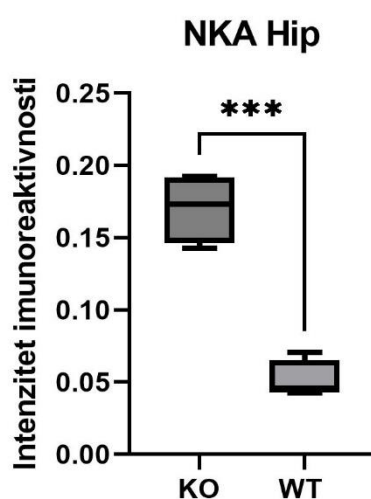
*Slika 5.3.1.* Reprezentativni prikaz imunodetekcije proteina od interesa u hipokampusu; Proteini su detektirani pomoću kemiluminiscencije i odnosa prema biljevu molekulskih masa (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD, slika u dodatku); Proteini Np55 i 65 su detektirani na visini između 50 i 70 kDa, TRAF6 na visini od ~70 kDa, NKA 100 kDa, PMCA1-4 između 100 i 150 kDa. TLR2KO – uzorak hipokampusa TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljeg tipa.

U hipokampusu TLR2KO miševa, analizom izražaja Np utvrđena je značajno veća količina proteinskog produkta Np65 u usporedbi s kontrolnim uzorcima; zabilježen je i veći izražaj Np55, ali bez statističke značajnosti (Mann-Whitney-ev test) (Slika 5.3.1. i Slika 5.3.2 Np55/65). Protein TRAF6 ne pokazuje odstupanja u izraženosti u uzorcima TLR2KO u odnosu na kontrolni uzorak (Slika 5.3.1. i Slika 5.3.2. TRAF6).



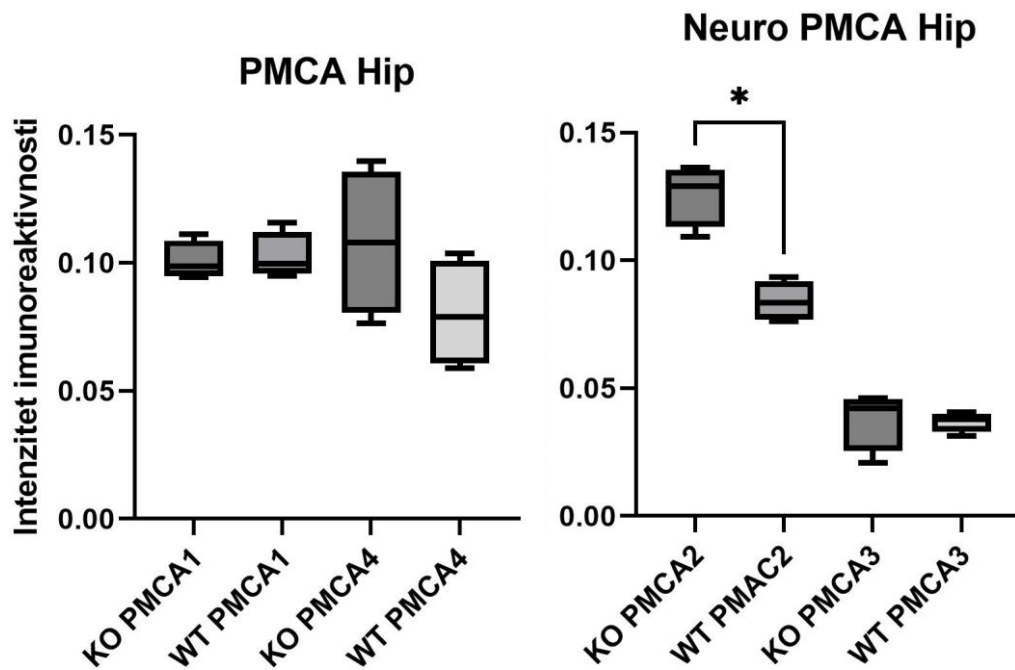
*Slika 5.3.2.* Grafički prikaz analize proteina Np55, Np65 i TRAF6 u hipokampusu. Podatci su statistički analizirani Mann-Whitney-evim testom te su pokazali značajnu promjenu u izražaju Np65 u TLR2KO uzorcima u usporedbi s kontrolnim uzorkom WT \* $p < 0,05$ . TKO ili KO – uzorak hipokampusa TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljeg tipa.

Proteinska zastupljenost ATPaza tipa P u hipokampusu pokazuje varijabilnost u proteinskom sadržaju proteina NKA i PMCA2 (Slika 5.3.1.) te je statistička značajnost utvrđena Mann-Whitney-evim testom pokazala povećanje izražaja u TLR2KO uzorcima za NKA ( $p < 0,001$ ), i za PMCA1 ( $p < 0,05$ ) (Slika 5.3.3. i Slika 5.3.4.). Izoforme PMCA1, 3 i 4 ne pokazuju odstupanja u proteinskom sadržaju u odnosu na kontrolni uzorak.



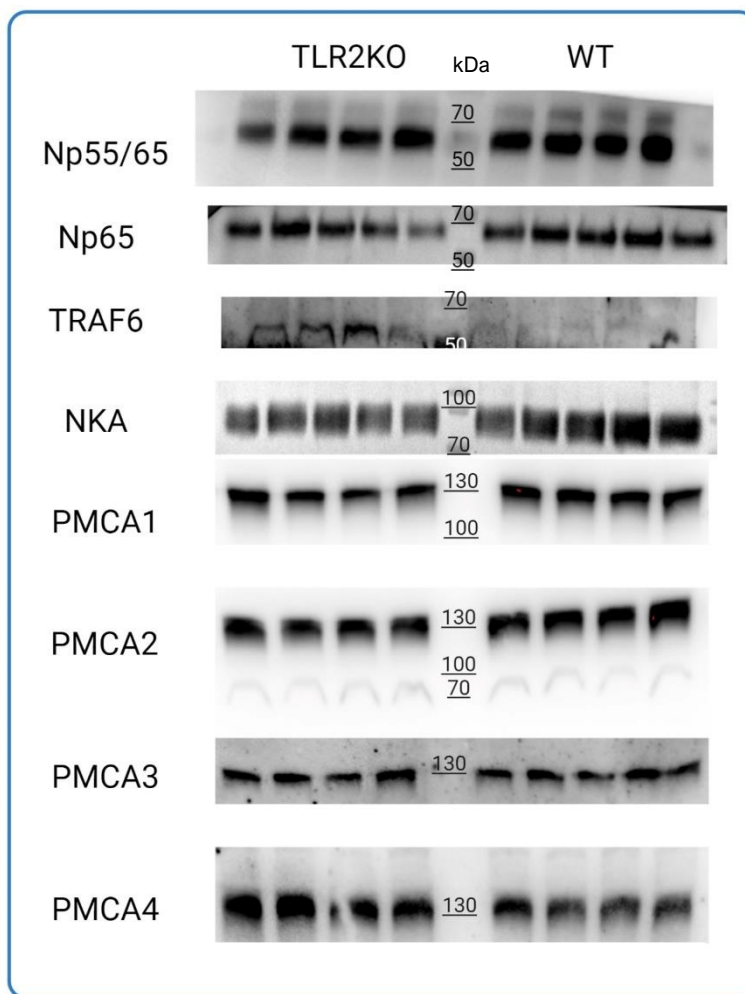
*Slika 5.3.3.* Grafički prikaz analize proteina NKA u hipokampusu. Statistička analiza podataka Mann-Whitney-evim testom pokazala je značajnu promjenu izražaja u TLR2KO uzorka u odnosu na kontrolni WT uzorak \*\*\* $p < 0,001$ . KO – uzorak hipokampusa TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljeg tipa.





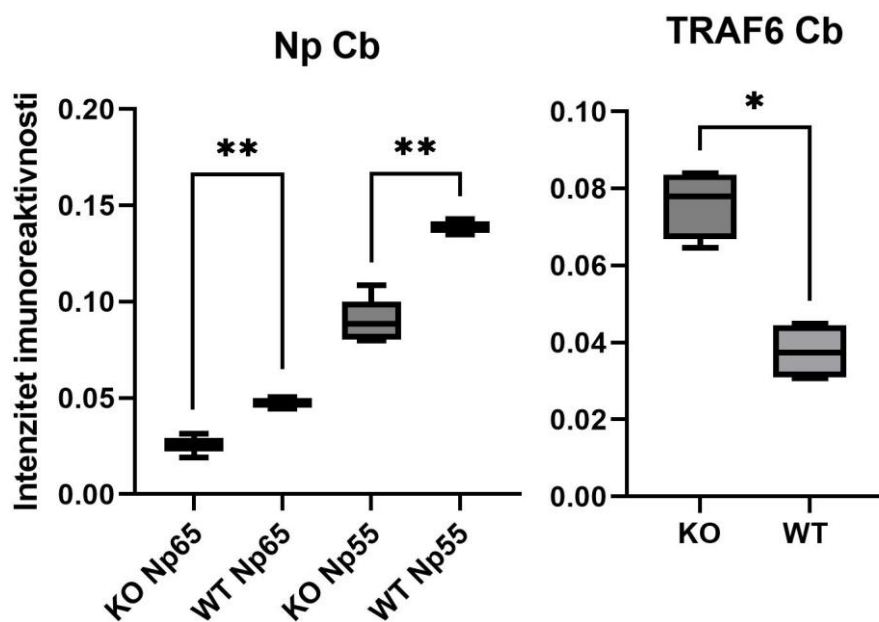
Slika 5.3.4. Grafički prikaz analize izooblika proteina PMCA u hipokampusu. Prvi grafički prikaz (PMCA Hip) prikazuje usporedbu ubikvitarnih izoformi PMCA1 i 4 između uzoraka TLR2KO i kontrolnog uzorka. Grafički prikaz Neuro PMCA Hip prikazuje usporedbu neuronalnih izooblika PMCA2 i 3 između TLR2KO i kontrolnog uzorka divljeg tipa. Mann-Whitney-ev test ukazuje na statistički značajnu razliku između TLR2KO i kontrolnih uzoraka u korist TLR2KO,  $*p < 0,05$ . KO – uzorak hipokampusa TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljeg tipa.

### 5.3.2 Analiza prisutnosti odabranih proteina u malom mozgu



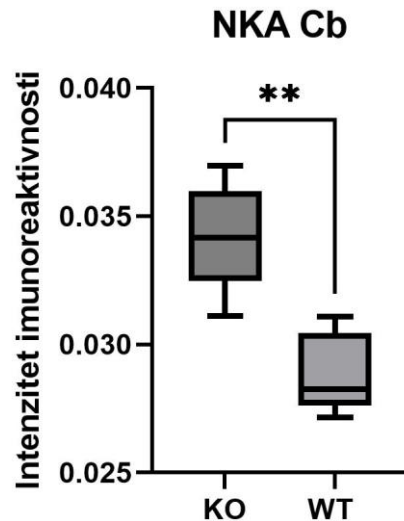
*Slika 5.3.5.* Reprezentativni prikaz imunodetekcije proteina od interesa u malom mozgu; Proteini su detektirani pomoću kemiluminiscencije i odnosa prema biljegu molekulskih masa (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD); Proteini Np55 i 65 su detektirani na visini između 50 i 70 kDa, TRAF6 na visini od ~70 kDa, NKA 100 kDa, PMCA1-4 između 100 i 150 kDa. TLR2KO – uzorak TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak miševa divljeg tipa.

Proteinski sadržaj proteina Np i TRAF6 u malom mozgu pokazuje obrnuti trend zastupljenosti nego što je zabilježeno u hipokampusu. Proteini Np55 i Np65 su se pokazali promijenjeni u uzorcima TLR2KO u odnosu na kontrolni uzorak divljeg tipa. Smanjeni sadržaj obje izoforme Np je zabilježen u uzorcima TLR2KO te je statistička značajnost utvrđena Mann-Withneyjevim testom jednaka za oba proteina i iznosi  $p < 0,01$  (Slika 5.3.5. Np55/65 i Slika 5.3.6. Np). Protein TRAF6 pokazuje povećan izražaj u uzorcima TLR2KO. Povećani sadržaj u uzorcima TLR2KO u usporedbi s kontrolnim uzorkom divljeg tipa statistički je značajan (Mann-Whitney test,  $p < 0,05$ ) (Slika 5.3.5. i Slika 5.3.6. TRAF6).

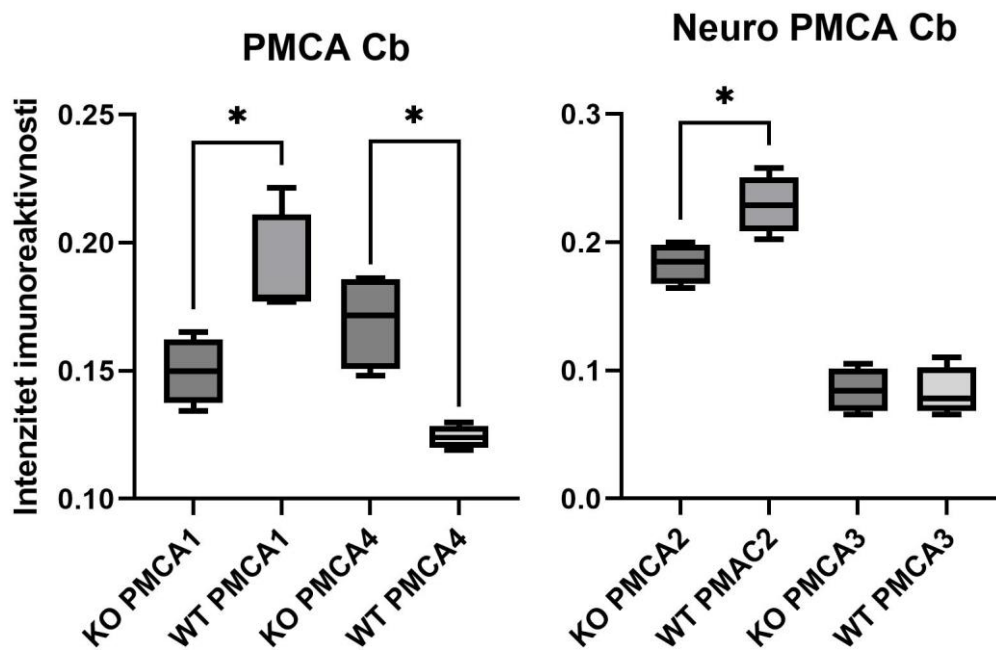


Slika 5.3.6. Grafički prikaz analize proteina Np55, Np65 i TRAF6 u malom mozgu. Mann-Whitney-ev test je pokazao statistički značajno smanjenje sadržaja navedenih proteina u uzorcima TLR2KO, za Np55 i Np65,  $**p < 0,01$ , a za TRAF6,  $*p < 0,05$ . KO – uzorak malog mozga TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak malog mozga miševa divljeg tipa.

Analiza ATPaza tipa P u malom mozgu TLR2KO miševa pokazala je razlike u izražaju proteina NKA i PMCA1, 2 i 4 u usporedbi s kontrolnim uzorkom divljeg tipa (Slika 5.3.5.). U uzorcima malog mozga TLR2KO miševa utvrđen je veći izražaj NKA i PMCA4 (Slika 5.3.7. i Slika 5.3.8.), dok je izražaj PMCA1 i 2 (Slika 5.3.8.) smanjen u odnosu na kontrolni uzorak. PMCA3 je jedini protein koji nije pokazao promjene u uzorcima TLR2KO u odnosu na izražaj u kontrolnom uzorku.

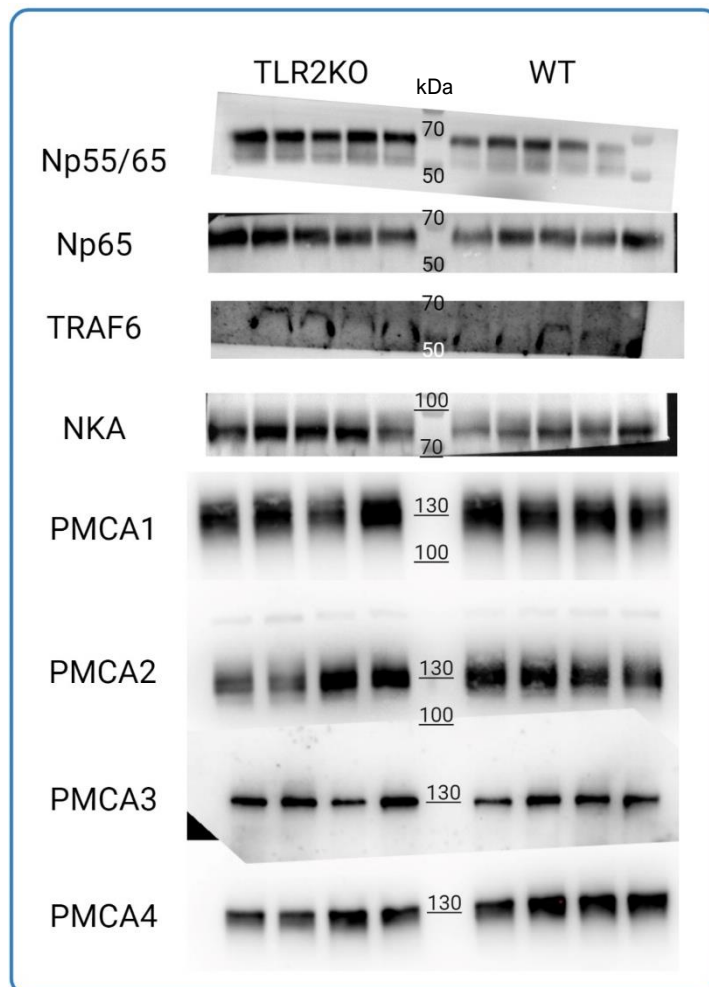


Slika 5.3.7. Grafički prikaz analize proteina NKA u malom mozgu. Statistička analiza podataka Mann-Whitney-evim testom pokazala je statistički značajnu promjenu u izražaju proteina NKA u uzorcima TLR2KO u odnosu na kontrolne uzorke,  $**p < 0,01$ . KO – uzorak malog mozga TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak malog mozga miševa divljeg tipa.



Slika 5.3.8. Grafički prikaz analize izooblika proteina PMCA u malom mozgu. Grafički prikaz PMCA Cb prikazuje usporedbu ubikvitarnih izoformi PMCA1 i 4 između uzoraka TLR2KO i kontrolnih uzoraka. Grafički prikaz neuronalne PMCA Cb prikazuje usporedbu neuronalnih izooblika PMCA2 i 3 između TLR2KO i kontrolnog uzorka divljeg tipa. Mann-Whitney-ev test ukazao je na statistički značajnu razliku: povećanu razinu proteina PMCA4,  $*p < 0,05$ , u uzorka TLR2KO u odnosu na kontrolne uzorke, a smanjenu razinu proteina PMCA1 i 2,  $*p < 0,05$  u oba slučaja, u uzorka TLR2KO u odnosu na kontrolne uzorke. KO – uzorak malog mozga TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak malog mozga miševa divljeg tipa.

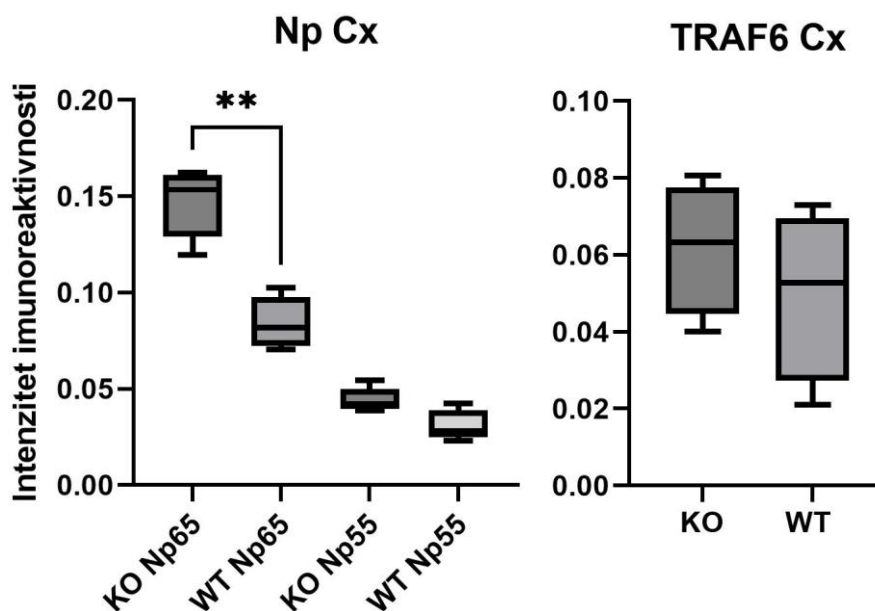
### 5.3.3 Analiza prisutnosti odabranih proteina u moždanoj kori



*Slika 5.3.9.* Reprezentativni prikaz imunodetekcije proteina od interesa u moždanoj kori; Proteini su detektirani pomoću kemiluminiscencije i odnosa prema bilježu molekulskih masa (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD, slika u dodatku); Proteini Np55 i 65 su detektirani na visini između 50 i 70 kDa, TRAF6 na visini od ~70 kDa, NKA 100 kDa, PMCA1-4 između 100 i 150 kDa. TLR2KO – uzorak moždane kore TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak moždane kore miševa divljeg tipa.

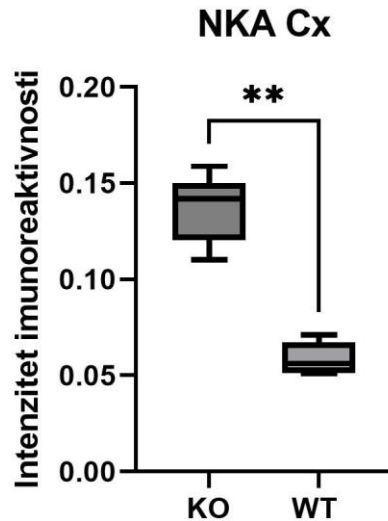
Količina odabranih proteina u uzorcima moždane kore, Np, TRAF6 i ATPaza tipa P je pokazala promjene u uzorcima TLR2KO u odnosu na kontrolni uzorak u sadržaju proteina Np65, NKA te PMCA2 i 4 (Slika 5.3.9.). Analiza proteina Np55 i Np65 pokazala je sličnost s trendom izražaja ovih proteina u hipokampusu TLR2KO miševa (Slika 5.3.9. Np). Protein Np65 u uzorcima TLR2KO pokazuje povećanu količinu u usporedbi s kontrolnim uzorkom dok je izražaj proteina Np55 samo neznatno povećan u odnosu na kontrolni uzorak (Slika 5.3.10. Np). Obrada podataka Mann-Whitney-evim testom je pokazala statistički značajne razlike u razini proteina Np65 ( $p < 0,01$ ) u uzorcima TLR2KO

u odnosu na kontrolni uzorak. Protein TRAF6 nije odstupao u izražaju u uzoraka TRL2KO u usporedbi s kontrolnim uzorkom divljeg tipa (Slika 5.3.9 i Slika 5.3.10. TRAF6).

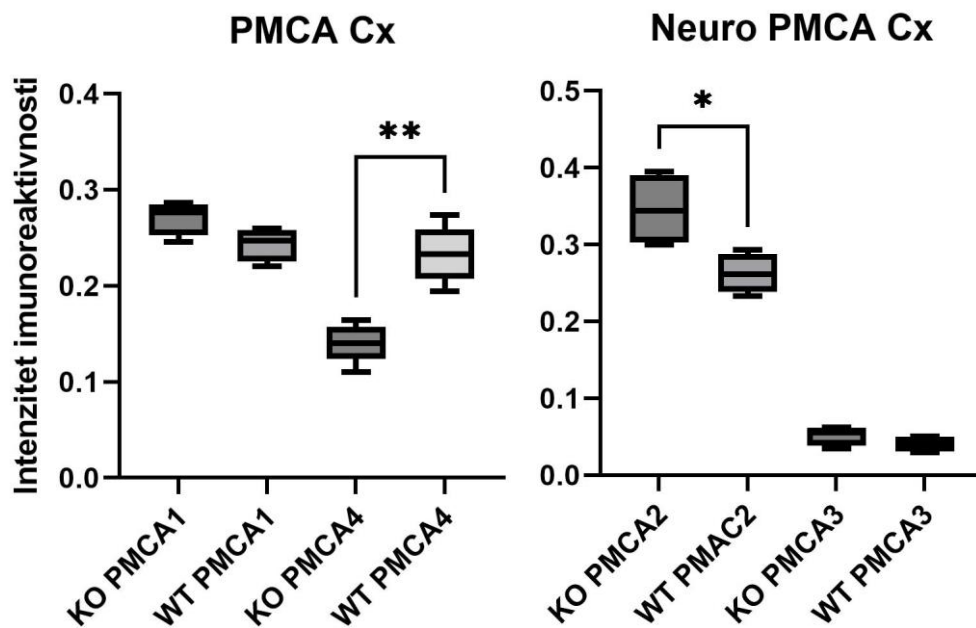


Slika 5.3.10. Grafički prikaz analize proteina Np55, Np65 i TRAF6 u moždanoj kori. Mann-Whitney-ev test pokazao je statistički značajno povećanje sadržaja proteina Np65 u uzorcima TLR2KO,  $**p < 0,01$ , u odnosu na kontrolni uzorak. KO – uzorak moždane kore TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak moždane kore miševa divljeg tipa.

Izražaj ATPaza tipa P je u uzorcima moždane kore TLR2KO miševa pokazao da se izražaj proteina NKA te proteina PMCA2 i 4 razlikuje u usporedbi s kontrolnim uzorkom divljega tipa (Slika 5.3.9.). U uzorcima TLR2KO, povećani sadržaj je zabilježen za proteine NKA i PMCA2 (Slika 5.3.11. i Slika 5.3.12. Neuro PMCA), dok je za protein PMCA4 izražaj smanjen u usporedbi s kontrolnim uzorkom (Slika 5.3.12. PMCA). Statistička značajnost razlika u izražaju proteina u moždanoj kori je određena Mann-Whitney-evim testom te iznosi  $p < 0,01$  za izražaj proteina NKA i PMCA2, a za izražaj proteina PMCA4 značajnost utvrđenih razlika u istraživanih skupina je utvrđena na razini  $p < 0,05$ .



Slika 5.3.11. Grafički prikaz analize proteina NKA u moždanoj kori. Statistička analiza podataka Mann-Whitney-evim testom pokazala je statistički značajnu promjenu u izražaju proteina NKA u uzorcima TLR2KO u odnosu na kontrolni uzorak  $**p < 0,01$ . KO – uzorak moždane kore TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak moždane kore miševa divljeg tipa.



Slika 5.3.12. Grafički prikaz analize izooblika proteina PMCA u moždanoj kori. Grafički prikaz PMCA Cx prikazuje usporedbu ubikvitarnih izoformi PMCA1 i 4 između uzoraka TLR2KO i kontrolnog uzorka. Grafički prikaz neuronalne PMCA Cx prikazuje usporedbu neuronalnih izooblika PMCA2 i 3 između uzoraka TLR2KO i kontrolnog uzorka. Mann-Whitney-ev test ukazuje na statistički značajno povećanu razinu proteina PMCA 2,  $*p < 0,05$ , a smanjenu razinu proteina PMCA 4,  $**p < 0,01$  u uzorcima TLR2KO u odnosu na uzorke kontrolne skupine. KO – uzorak moždane kore TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak moždane kore miševa divljeg tipa.

## 5.4 Raspodjela izabranih proteina u moždanom tkivu TLR2KO miševa

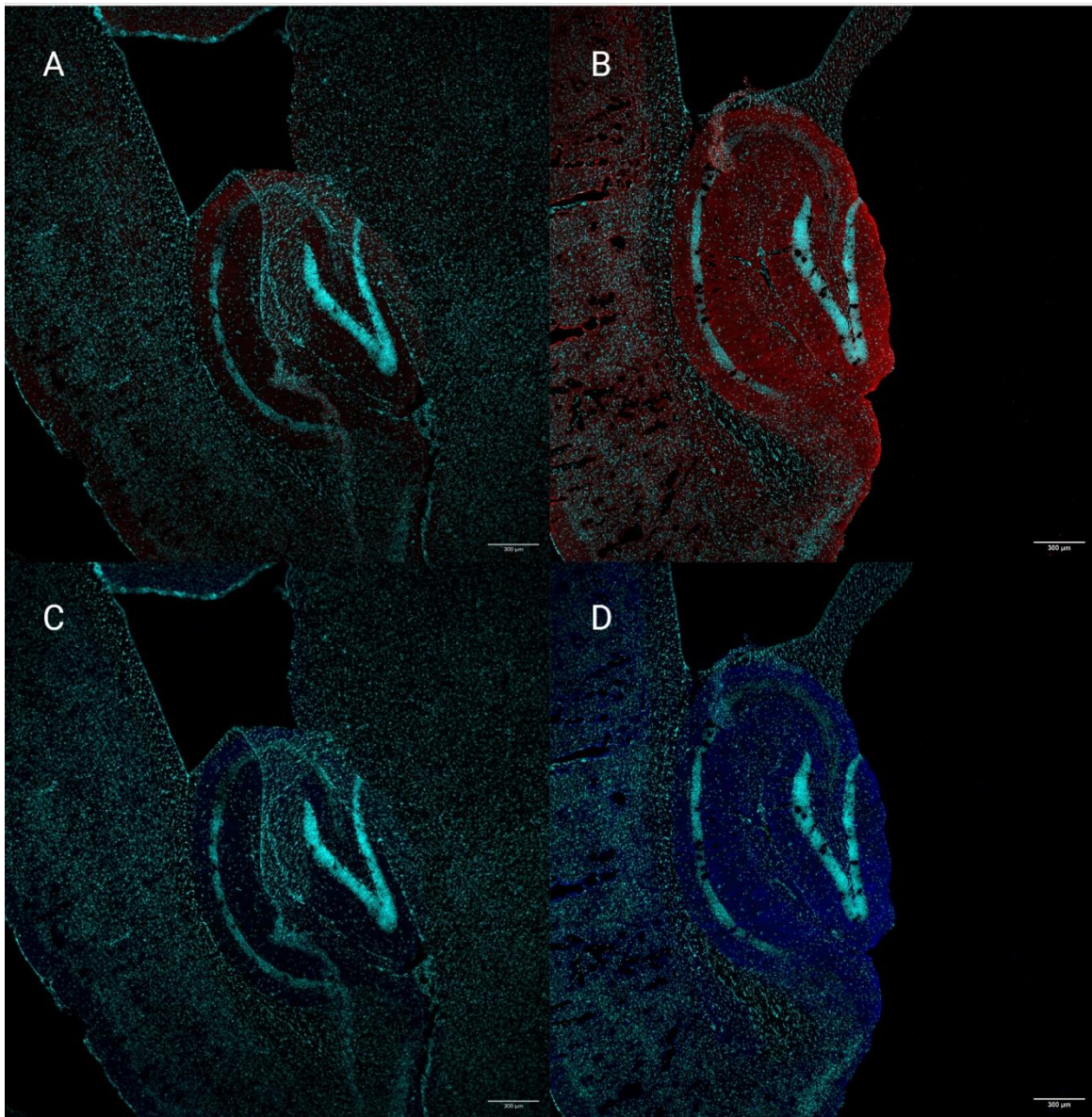
Rezultati analiza metodom *Western blot* pokazali su razlike u izražaju odabranih proteina u tkivnim uzorcima hipokampusa, malog mozga i moždane kore miševa s nedostatkom TLR2 u usporedbi s kontrolnim uzorcima. Daljnja imunohistokemijska analiza s ciljem utvrđivanja promjena raspodjele proteina u tkivu provedena je u tkivu hipokampusa i malog mozga. U hipokampusu je praćena promjena u podregijama *Cornu Ammonis*, CA1, CA2 i CA3, te *Gyrus Dentatus*, DG. U malom mozgu, praćene su promjene u molekularnom (ML) i granularnom sloju (GL). Za analizu tkivnih rezova korišteno je jednostruko i višestruko imunoobilježavanje proteina. Protein NKA je obilježen jednostrukim bojanjem te su se jezgre lokalizirale DNA interkalirajućom bojom DAPI, proteini PMCA1 i PMCA4 su utvrđeni dvostrukim bojanjem, dok su tkivni prerezi višestruko obilježeni protutijelima reaktivnim na proteine Np55, Np65 i PMCA2 te bojom DAPI. Protutijelo za Np55 prepoznaje oba izooblika te je kumulativno označen kao pan-neuroplastin (pNp). U sljedećim podnaslovima navedeni TLR2KO i kontrolni uzorci se odnose na rezove tkiva hipokampusa, malog mozga dobivenih iz miševa TLR2KO genotipa i kontrolnih uzoraka miševa divljeg tipa.

### 5.4.1 Raspodjela odabranih proteina u tkivu hipokampusa

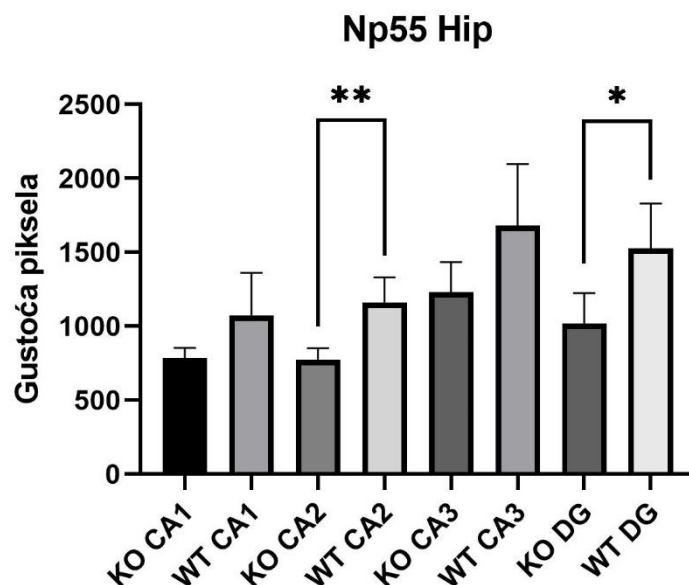
Pokazana je razlika raspodjele proteina Np55 i Np65 u hipokampusu TLR2KO životinja u usporedbi s kontrolnim uzorcima divljeg tipa. Gledajući hipokampus na globalnoj razini, divlji tip miševa ima veći stupanj proteinske zastupljenosti oba izooblika proteina Np (Slika 5.4.1. A-D), odnosno analizom intenziteta signala u pojedinim regijama pokazana je manja zastupljenost proteina Np55 i Np65 u svim regijama hipokampusa u TLR2KO miševa. U regijama CA2 i DG utvrđena je značajna razlika intenziteta imunoreaktivnosti usporedbom uzoraka hipokampusa TLR2KO miševa i kontrolnih životinja. Razlika u zastupljenosti pNp proteina u CA2 regiji hipokampusa između TLR2KO miševa i kontrolne skupine miševa divljeg tipa statistički je značajna,  $**p < 0,01$  (Slika 5.3.2.), dok je u DG regiji značajna razlika utvrđena u izražaju pNp (Slika 5.3.2) i proteina Np65 (Slika 5.3.3.),  $*p < 0,05$ . Ostale regije hipokampusa pokazuju također smanjeni intenzitet signala za ove proteine, ali bez statistički značajnih razlika (Slika 5.3.2 i 5.3.3.). Ovi rezultati potvrđuju rezultate utvrđene metodom *Western blot* u izražaju Np u



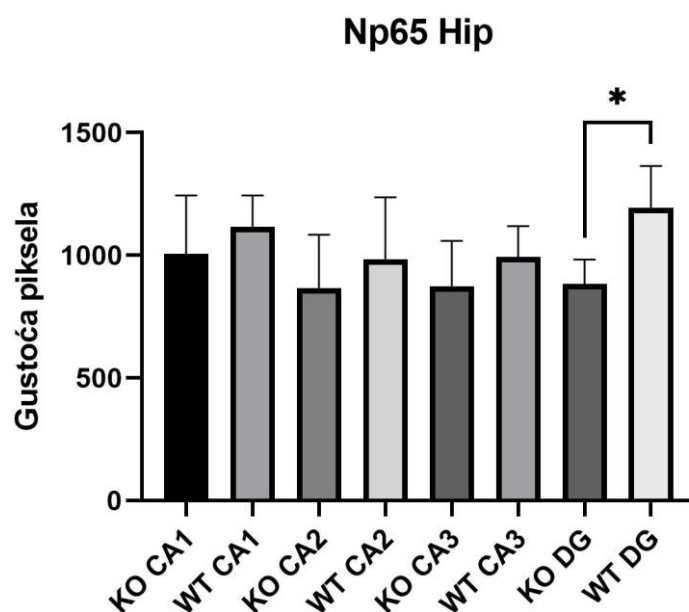
tkivnom homogenatu hipokampusa dobivenom iz TLR2KO miševa i kontrolne skupine miševa divljeg tipa.



*Slika 5.4.1.* Imunoreaktivnost proteina Np55(A-B) i Np65 (C-D) u mišjem hipokampusu. Protutijelo za Np55 protein prepoznaje obje izoforme proteina dajući mješoviti signal Np55 i 65, takozvani pan-neuroplastinski (pNp) signal (A i B), dok se Np65 signal razlučuje specifičnim protutijelom (C i D). pNp u hipokampusu: A – pNp signal u hipokampusu TLR2KO miševa; B – pNp signal u hipokampusu miševa divljeg tipa; C – Np65 signal u hipokampusu TLR2KO miševa; D - Np65 signal u hipokampusu miševa divljeg tipa; Skala - 300; svijetloplavo – DAPI, crveno - Alexa 564; plavo – Alexa 647; Skala - 300  $\mu\text{m}$ .

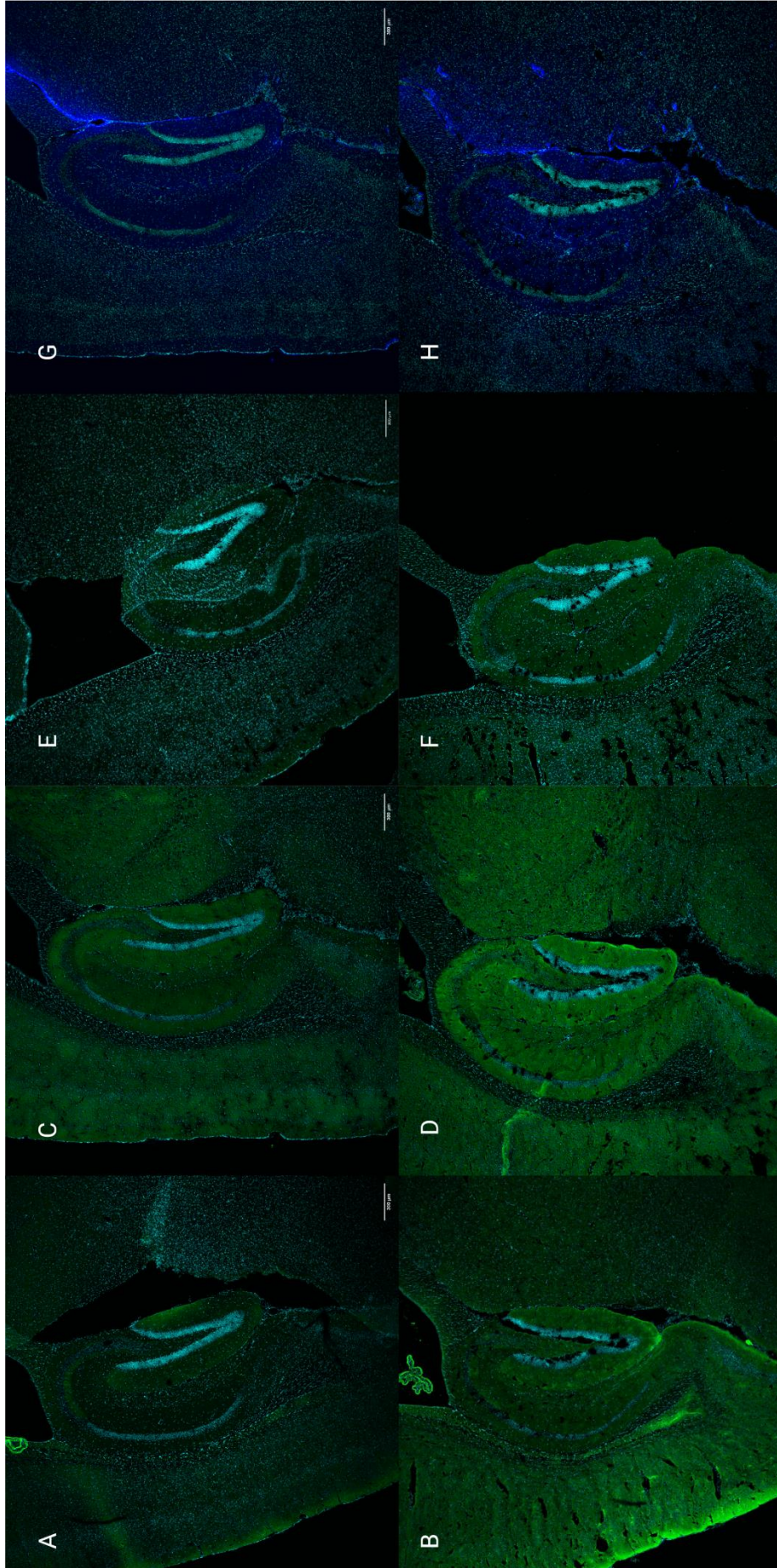


*Slika 5.4.2.* Grafički prikaz analize intenziteta signala pNp u pojedinim regijama hipokampusa TLR2KO životinja i životinja divljeg tipa. Smanjenje signala je uočeno u svim regijama hipokampusa, dok je u regijama CA2 i DG ta razlika bila statistički značajna. Mann-Whitney-ev test  $**p < 0,01$  i  $*p < 0,05$ . KO – uzorak hipokampusa TLR2KO miševa; WT – uzorak hipokampusa miševa divljeg tipa; CA1 - *Cornu Ammonis 1*; CA2 - *Cornu Ammonis 2*; CA3 - *Cornu Ammonis 3*; DG - *Gyrus Dentatus*.



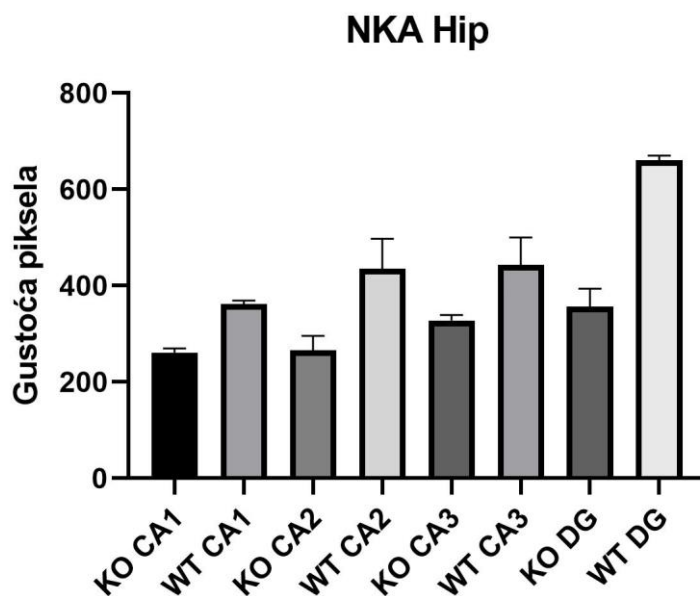
*Slika 5.4.3.* Grafički prikaz analize intenziteta signala Np65 u pojedinim regijama hipokampusa TLR2KO životinja i životinja divljeg tipa. Smanjenje signala je uočeno u TLR2KO miševa u svim regijama hipokampusa, dok je u regijama CA2 i DG ta razlika bila statistički značajna. Mann-Whitney-ev test  $*p < 0,05$ . KO – uzorak hipokampusa TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljeg tipa; CA1 - *Cornu Ammonis 1*; CA2 - *Cornu Ammonis 2*; CA3 - *Cornu Ammonis 3*; DG - *Gyrus Dentatus*.



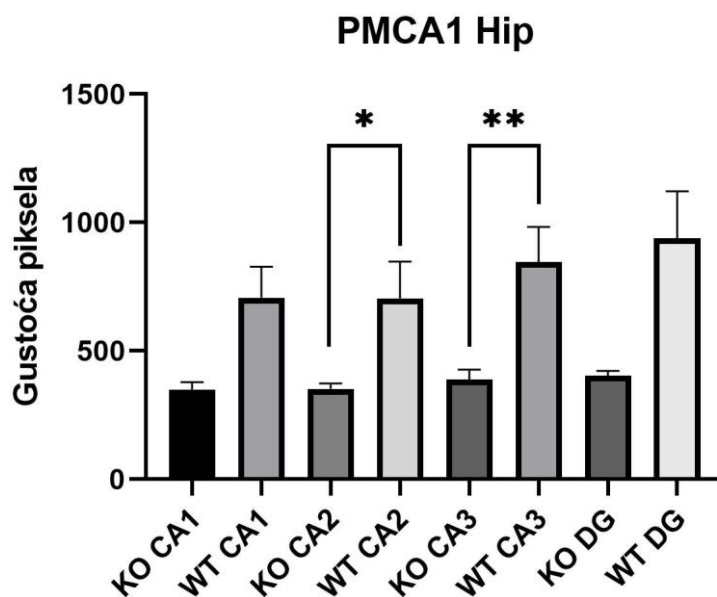


**Slika 5.4.4.** Imunohistokemijska analiza proteina NKA (A-B); PMCA1 (C-D); PMCA2 (E-F) i PMCA4 (G-H). A – NKA signal u hipokampusu TLR2KO miševa; B – NKA signal u hipokampusu miševa divljeg tipa; C – PMCA1 signal u hipokampusu TLR2KO miševa; D – PMCA1 signal u hipokampusu miševa divljeg tipa; E – PMCA2 signal u hipokampusu TLR2KO miševa; F – PMCA2 signal u hipokampusu miševa divljeg tipa; G – PMCA4 signal u hipokampusu TLR2KO miševa; H – PMCA4 signal u hipokampusu miševa divljeg tipa; svjetloplavo – DAPI, zeleno – Alexa 488, plavo – Alexa 647; Skala - 300 µm.

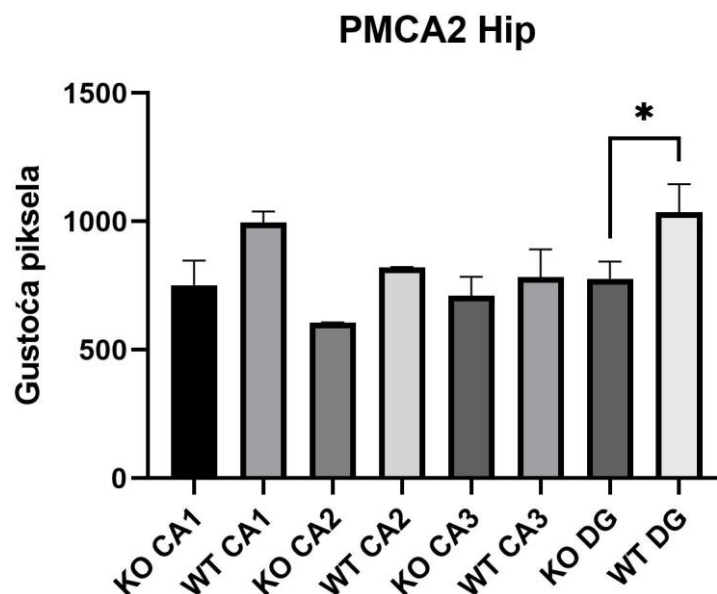
Analiza raspodjele ATPaza tipa P pokazala je da su gotovo svi pripadnici ove obitelji sniženog izražaja u TRL2KO miševa. NKA pokazuje snižen izražaj u svim regijama hipokampusa (Slika 5.4.4.A-B), koji međutim nije statistički značajan. Kalcijske ATPaze pokazuju snižen trend intenziteta signala (Slika 5.4.4.C-H). Ubikvitarna izoforma PMCA1 pokazuje statistički najznačajnije razlike (Slika 5.4.4. C-D). Statistički značajna razlika je utvrđena Mann-Whitneyevim testom te iznosi  $**p<0,01$  u CA1 i  $*p<0,05$  CA2 regiji hipokampusa. Ubikvitarna izoforma PMCA4 pokazala je nejednaku raspodjelu signala po regijama (Slika 5.4.4. G-H). Snižen trend intenziteta signala nađen je u regijama CA3 i DG. Signal u regiji CA1 približno je jednakog intenziteta kao i u kontrolnom uzorku divljega tipa, a u CA2 regiji zanemarivo je viši u uzorka TLR2KO u odnosu na kontrolni uzorak. Neuronalna izoforma PMCA2 prati trend sniženja kao ostale članice obitelji (Slika 5.4.4. E-F). Pokazano je da je u regiji DG najveća razlika u intenzitetu signala PMCA2, gdje je Mann-Whitney-ev test utvrdio značajnost od  $*p<0,05$ . U regijama CA1 i CA2 PMCA2 signal je smanjen u uzorcima TLR2KO u odnosu na kontrolni, dok je CA3 regija pokazala podjednak intenzitet signala u obje ispitivane skupine.



*Slika 5.4.5.* Grafički prikaz analize intenziteta signala NKA u pojedinim regijama hipokampusa. Smanjenje signala je uočeno u svim regijama hipokampusa bez statistički značajnih razlika. KO – uzorak hipokampusa TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljeg tipa; CA1 - *Cornu Ammonis 1*; CA2 - *Cornu Ammonis 2*; CA3 - *Cornu Ammonis 3*; DG - *Gyrus Dentatus*.

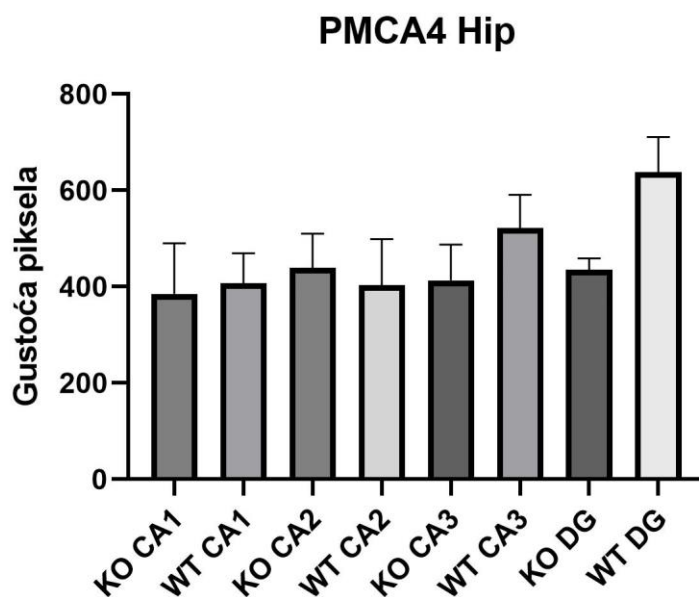


Slika 5.4.6. Grafički prikaz analize intenziteta signala PMCA1 u pojedinim regijama hipokampusa. Smanjenje signala je uočeno u svim regijama hipokampusa TLR2KO miševa, dok je za regije CA2 i CA3 Mann-Whitney-ev test pokazao značajne razlike (\*\* $p < 0,01$ ) i ( $p < 0,05$ ). KO – uzorak hipokampusa TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljeg tipa; CA1 - *Cornu Ammonis 1*; CA2 - *Cornu Ammonis 2*; CA3 - *Cornu Ammonis 3*; DG - *Gyrus Dentatus*.



Slika 5.4.7. Grafički prikaz analize intenziteta signala PMCA2 u pojedinim regijama hipokampusa. Smanjenje signala je uočeno u svim regijama hipokampusa, dok je za regiju DG Mann-Whitney-ev test pokazao značajne razlike ( $p < 0,05$ ). KO – uzorak hipokampusa TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljeg tipa; CA1 - *Cornu Ammonis 1*; CA2 - *Cornu Ammonis 2*; CA3 - *Cornu Ammonis 3*; DG - *Gyrus Dentatus*.

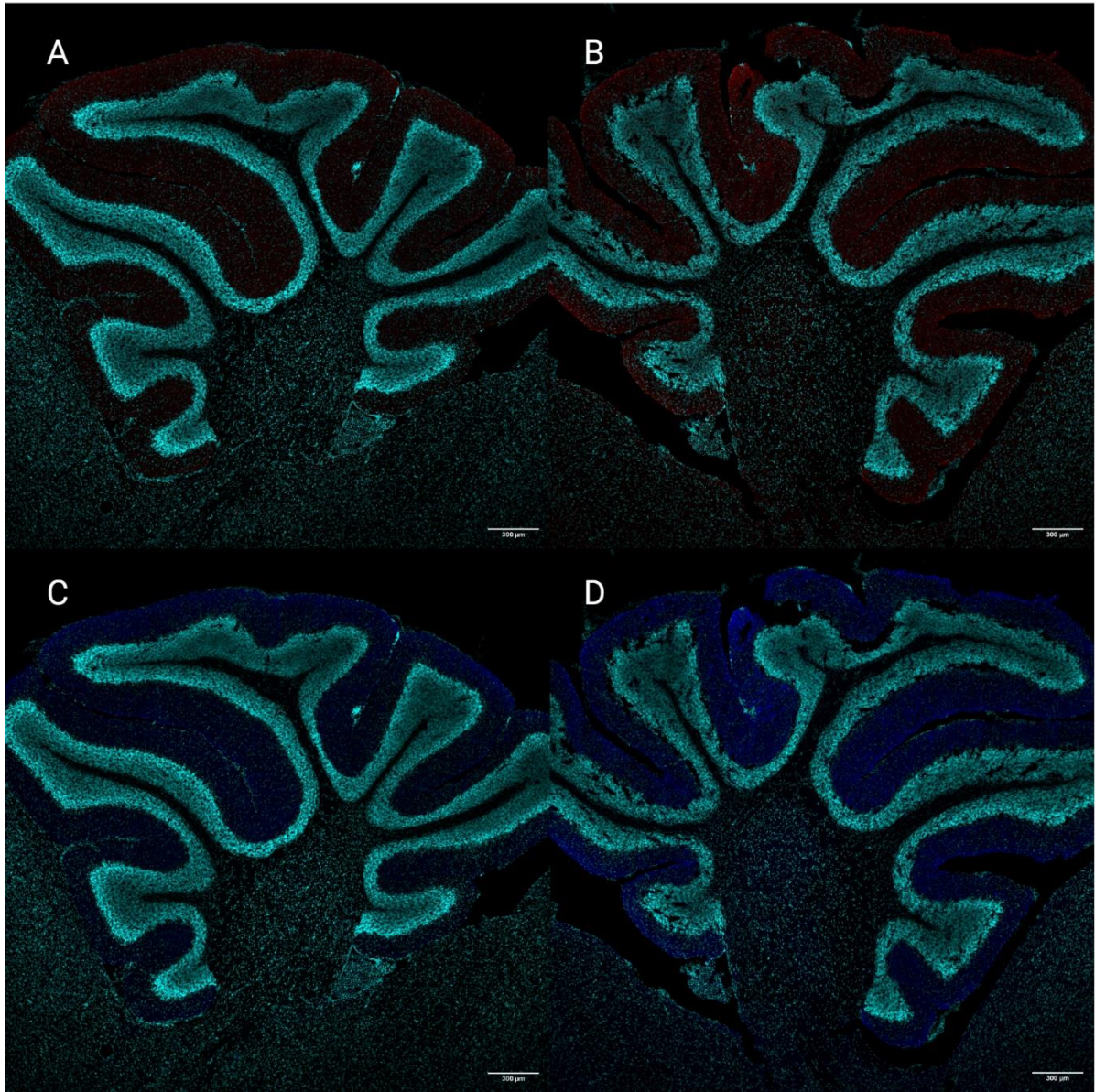




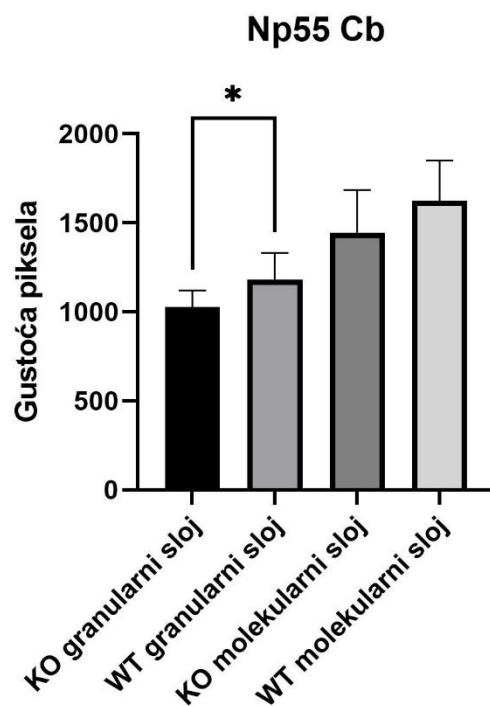
*Slika 5.4.8.* Grafički prikaz analize intenziteta signala PMCA4 u pojedinim regijama hipokampusa. Smanjenje signala je uočeno u svim regijama hipokampusa, CA1, CA3 i DG, dok je u regiji CA2 intenzitet signala bio veći u uzorcima TLR2KO miševa. KO – uzorak hipokampusa TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljeg tipa; CA1 - *Cornu Ammonis 1*; CA2 - *Cornu Ammonis 2*; CA3 - *Cornu Ammonis 3*; DG - *Gyrus Dentatus*.

#### **5.4.2 Raspodjela odabranih proteina u tkivu malog mozga**

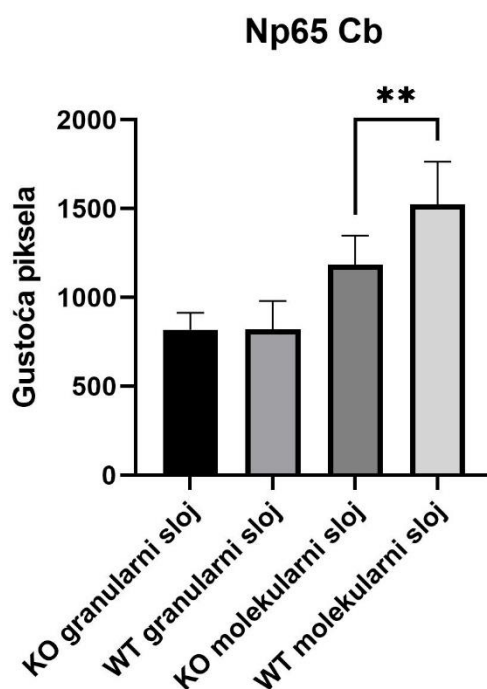
Kod analize raspodjele odabranih proteina u tkivu malog mozga, fokus je bio na analizi molekularnog (ML) i granularnog sloja (GL) cerebelarnog tkiva. Intenzitet Np signala prati trend sniženog izražaja za obje izoforme (Slika 5.3.9. A-D). Granularni sloj malog mozga prati sniženi trend intenziteta signala te je za pNp signal pokazana statistički značajna razlika u granularnom sloju. Značajnost dobivena Mann-Whitneyevim testom je  $*p < 0,05$  (Slika 5.3.10.). Dendriti Purkinjeovih stanica i aksoni granularnih neurona u molekularnom sloju pokazali su smanjenu zastupljenost pNp i Np65 intenziteta signala u uzoraka malog mozga TLR2KO miševa u usporedbi s kontrolnim uzorkom malog mozga miševa divljega tipa. Analiza signala Np65 pokazala je statistički značajno smanjen intenzitet signala u molekularnom sloju (Mann-Whitneyev test,  $**p < 0,01$ ) (Slika 5.4.11.).



*Slika 5.4.9.* Imunoreaktivnost proteina Np55 (A-B) i Np65 (C-D) u mišjem malom mozgu. pNp u malom mozgu: A - TRL2KO miševa i B - miševa divljeg tipa. Np65 u malom mozgu: C - TRL2KO miševa i D - miševa divljeg tipa; svijetloplavo – DAPI, crveno - Alexa 564; plavo – Alexa 647; Skala - 300 µm; Skala - 300 µm.



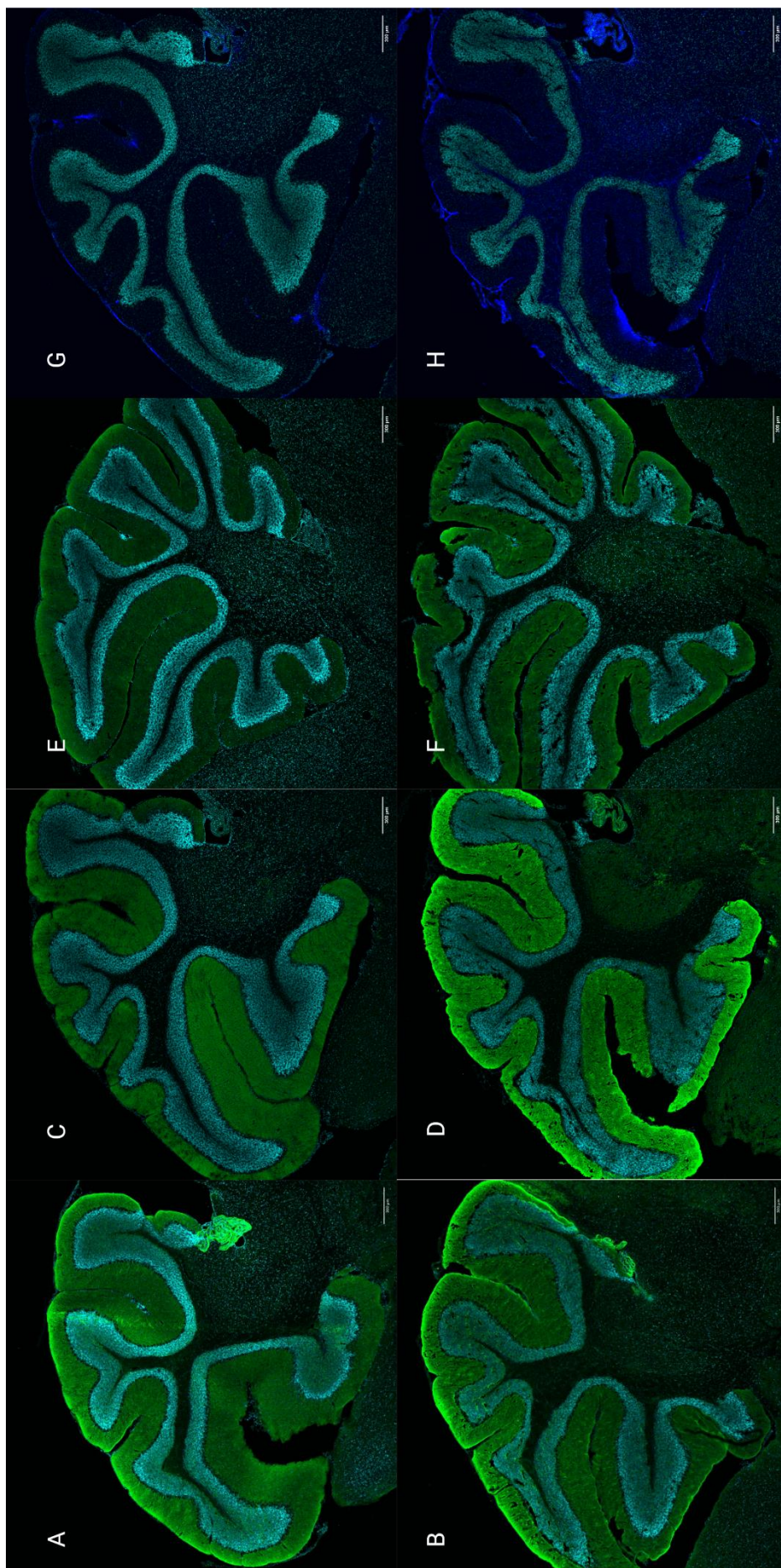
*Slika 5.4.10.* Grafički prikaz analize intenziteta signala pNp u analiziranim slojevima malog mozga. Smanjenje signala je uočeno u svim slojevima malog mozga, dok je u granularnom sloju razlika bila statistički značajna. Mann-Whitney-ev test  $*p < 0,05$ . KO – uzorak malog mozga TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak malog mozga miševa divljeg tipa.



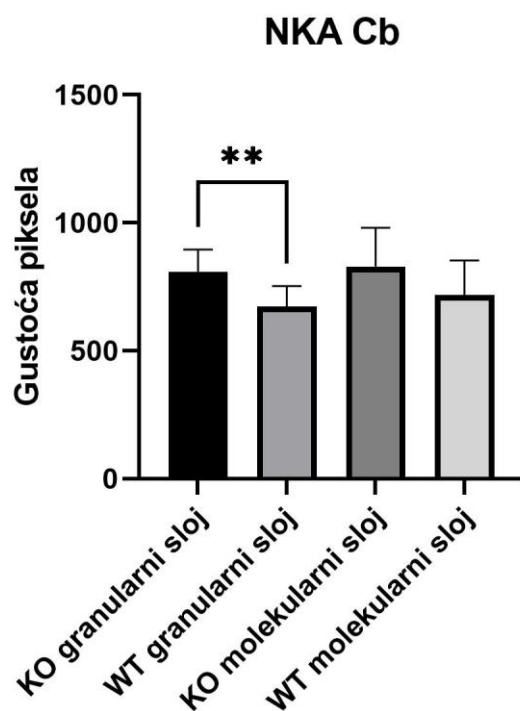
*Slika 5.4.11.* Grafički prikaz analize intenziteta signala Np65 u pojedinim slojevima malog mozga. Smanjenje signala je uočeno u svim slojevima malog mozga, dok je u molekularnom sloju razlika bila statistički značajna. Mann-Whitney-ev test  $**p < 0,01$ . KO – uzorak malog mozga TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak malog mozga miševa divljeg tipa.



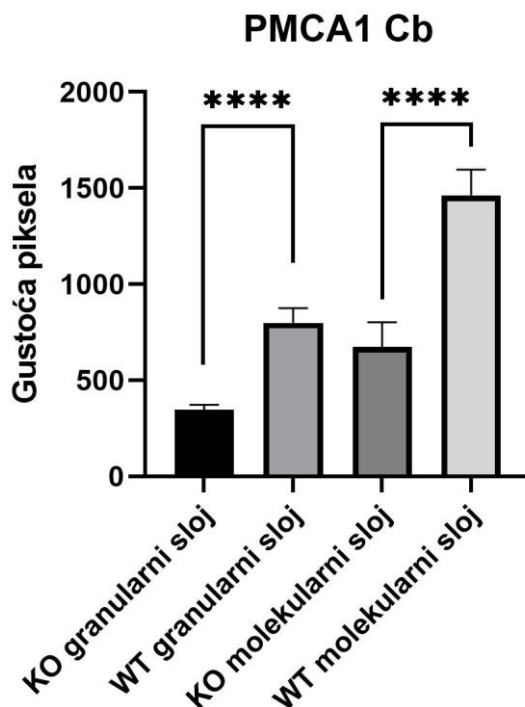
Analiza raspodjele ATPaza pokazala je razlike u sadržaju između različitih obitelji. Za NKA je pokazan porast intenziteta signala u uzorcima malog mozga TLR2KO miševa u odnosu na kontrolni uzorak miševa divljega tipa. Razlika je uočljiva u oba ispitivana sloja malog mozga, dok je u granularnom sloju Mann-Whitney-ev test utvrdio statistički značajnu razliku od  $**p < 0,01$  (Slika 5.3.13.). Kalcijske ATPaze pokazuju trend sniženog izražaja u analiziranim regijama malog mozga TLR2KO miševa. PMCA1 pokazuje najdrastičnije sniženje u uzorcima malog mozga TLR2KO miševa u odnosu na kontrolni uzorak miševa divljega tipa. Promjena u intenzitetu PMCA1 signala statistički je značajna u promatranim slojevima malog mozga TLR2KO miševa. Mann-Whitneyev test ukazuje na značajnost  $****p < 0,0001$  (Slika 5.3.14.). Za PMCA2 i PMCA4 je uočen sniženi trend intenziteta signala, ali bez značajnih razlika između uzoraka malog mozga TLR2KO miševa i kontrolnih uzoraka miševa divljega tipa (Slika 5.3.15. i 5.3.16.).



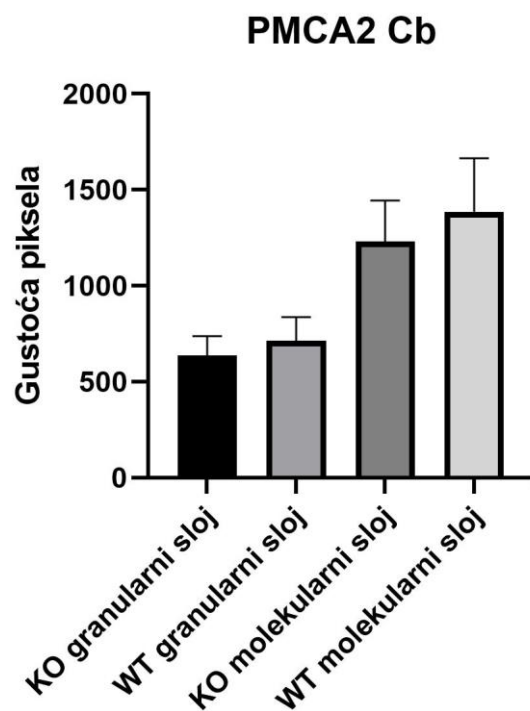
**Slika 5.4.12.** Imunohistokemijska analiza proteina NKA (A-B); PMCA1 (C-D); PMCA2 (E-F) i PMCA4 (G-H). A – NKA signal u malom mozgu TLR2KO miševa; B – NKA signal u malom mozgu miševa divljeg tipa; C – PMCA1 signal u malom mozgu TLR2KO miševa; D - PMCA1 signal u malom mozgu miševa divljeg tipa; E – PMCA2 signal u malom mozgu TLR2KO miševa; F - PMCA2 signal u malom mozgu miševa divljeg tipa; G – PMCA4 signal u uzorku malom mozgu TLR2KO miševa; H - PMCA4 signal u malom mozgu miševa divljeg tipa; svjetloplavo – DAPI, zeleno – Alexa 488, plavo – Alexa 647; Skala - 300 µm.



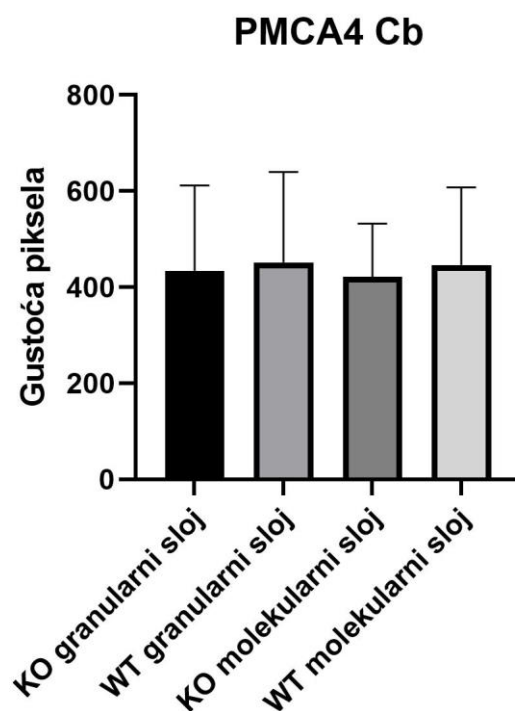
*Slika 5.4.13.* Grafički prikaz analize intenziteta signala NKA u slojevima malog mozga. Povećanje intenziteta signala je uočeno u svim slojevima malog mozga, a statistički značajna razlika utvrđena je Mann-Whitney-evim testom  $**p < 0,01$ . KO – uzorak malog mozga TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak malog mozga miševa divljeg tipa.



*Slika 5.4.14.* Grafički prikaz analize intenziteta signala NKA u slojevima malog mozga. Smanjen intenzitet signala je uočen u svim slojevima malog mozga, a statistički značajna razlika utvrđena je Mann-Whitney-evim testom ( $****p < 0,0001$ ). KO – uzorak malog mozga TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak malog mozga miševa divljeg tipa.



*Slika 5.4.15.* Grafički prikaz analize intenziteta signala PMCA2 u slojevima malog mozga. Smanjen intenzitet signala je uočen u svim slojevima malog mozga, ali bez statističke značajnosti. KO – uzorak malog mozga TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak malog mozga miševa divljeg tipa.



*Slika 5.4.16.* Grafički prikaz analize intenziteta signala PMCA4 u slojevima malog mozga. Podjednak intenzitet signala je uočen u svim slojevima malog mozga bez utvrđenih statistički značajnih razlika.. KO – uzorak malog mozga TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak malog mozga miševa divljeg tipa.

## **5.5 Regionalni obrazac gangliozidnih vrsta u miševa s utišanim genom za TLR2**

Gotovo svi ispitivani proteini su membranski, a jedan od ciljeva je definirati povezanost membranskog smještaja analiziranih proteina s lipidnim membranskim sastavom, stoga je ispitan sastav moždanih gangliozida u TLR2KO životinja. Lokalizacija i aktivnost membranskih proteina ovisi o okolišu u kojemu se nalaze, stoga utvrđivanje promjena u sastavu glikosfingolipida koji čine glavne frakcije lipida u lipidnim nanodomenama LR može doprinijeti razjašnjenju razlika u promjena lokalizacije i aktivnosti određenih proteina. Nakon izolacije i utvrđivanja gangliozidnih vrsta pristupilo se analizi po pojedinim regijama. Ovdje prikazujemo rezultate analize gangliozidnog sastava uzoraka hipokampusa i malog mozga TLR2KO miševa u usporedbi s kontrolnim uzorcima miševa divljeg tipa. U uzorcima moždane kore nije nađena razlika gangliozidnog profila između TLR2KO i kontrolnih uzoraka miševa divljeg tipa (slika u dodatku).

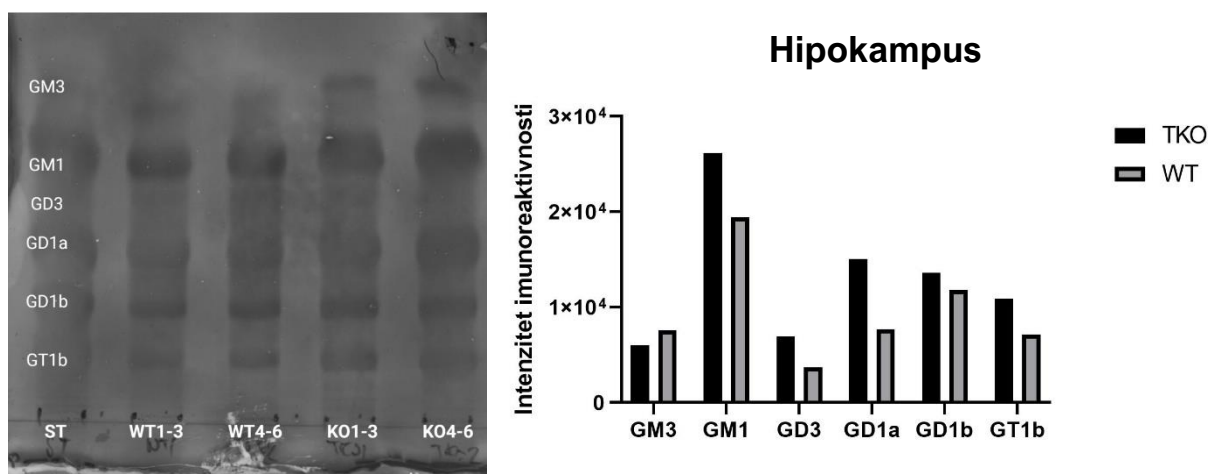
### **5.5.1 Promjene gangliozidnog sastava hipokampusa mišjeg modela TLR2KO**

Gangliozidni profil hipokampusa pokazao se vrlo različit u TLR2KO životinja uspoređujući s kontrolnim uzorkom hipokampusa životinja divljega tipa. Uočeno je povećanje udjela gotovo svih detektiranih gangliozidnih vrsta u uzorku hipokampusa TLR2KO miševa (Slika 5.5.1.). Ovo povećanje je dovelo i do promjene u zastupljenosti pojedinih gangliozidnih vrsta u ukupnom uzorku gangliozida u hipokampusu TLR2KO miševa, gdje je u usporedbi s uzorkom hipokampusa miševa divljeg tipa uočeno smanjenje u zastupljenosti frakcije GM3, dok su frakcije GD3, GD1a i GT1b pokazale veću zastupljenost. Udjeli pojedinih gangliozidnih frakcija prikazani su u tablici 5.5.1. Razlika u ukupnoj količini gangliozidnih vrsta u hipokampusu između TLR2KO miševa i miševa divljeg tipa je statistički značajna (\* $p < 0,05$ ; t-test) Razlike u zastupljenosti pojedinih gangliozidnih frakcija u hipokampusu su također statistički značajne između ovih skupina životinja.



*Tablica 5.5.1.* Udio pojedinih gangliozidnih vrsta u smjesi gangliozida u uzorcima hipokampusa TLR2KO miševa i miševa divljeg tipa; KO – uzorci hipokampusa TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljega tipa

FRAKCIJA	KO	WT
GM3	7,60%	13,25%
GM1	33,26%	33,89%
GD3	8,81%	6,41%
GD1a	19,16%	13,39%
GD1b	17,28%	20,61%
GT1b	13,88%	12,45%



*Slika 5.5.1.* Reprezentativni prikaz imunokemijskog bojenja gangliozida u hipokampusu TLR2KO miševa i miševa divljeg tipa i grafički prikaz analize pojedinih gangliozidnih frakcija membrana hipokampusa. ST-standard, TKO- uzorci hipokampusa TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljega tipa.

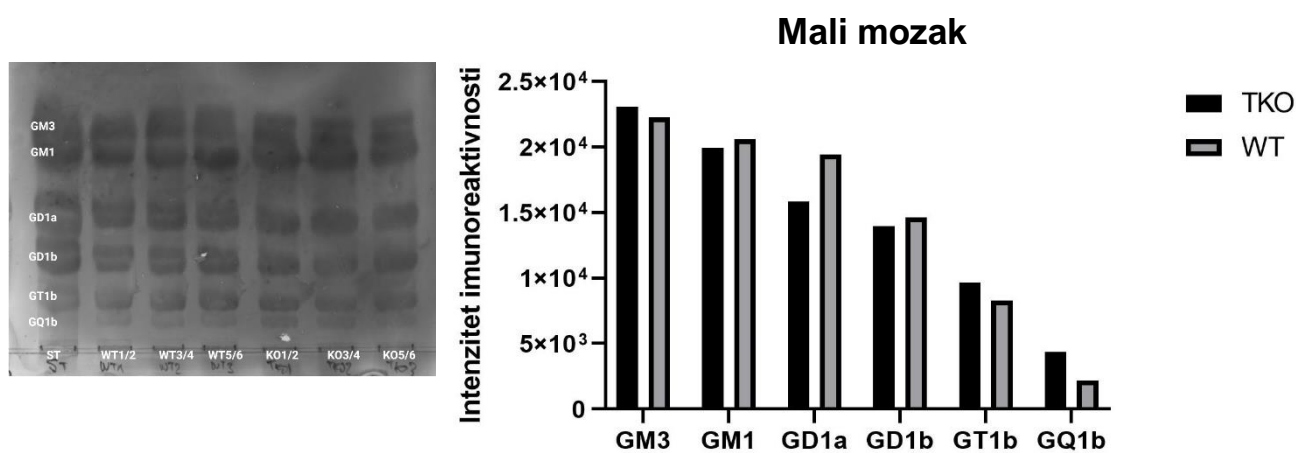
### 5.5.2 Promjene gangliozidnog sastava malog mozga mišjeg modela TLR2KO

U malom mozgu TLR2KO miševa jednostavne i kompleksne gangliozidne vrste, GM3, GT1b i GQ1b, pokazuju povećani sadržaj u odnosu na kontrolne uzorke malog mozga miševa divljeg tipa. Frakcije, GM1 i GD1a pokazuju smanjenje u uzorcima TLR2KO uspoređujući s kontrolnim uzorcima, dok je GD1b približno jednako zastupljen u obje grupe. Obzirom na udio u ukupnom sadržaju gangliozida, najveći porast uočen je kod GQ1b, te nešto manjeg intenziteta porast kod GT1b i najmanje kod GM3. Smanjenje u ukupnoj smjesi gangliozida najveće je u GD1a frakciji te je vrlo malo u GM1 frakciji.

Vrijednosti pojedinih gangliozidnih frakcija su prikazane u tablici 5.5.2. Statistički t-test pokazao je značajnu razliku u pojedinim gangliozidnim frakcijama usporedbom ispitivanih uzoraka (\*\*\*) $p < 0,001$ ).

*Tablica 5.5.2.* Udio pojedinih gangliozidnih vrsta u smjesi gangliozida u uzorcima malog mozga TLR2KO miševa i miševa divljeg tipa; KO – uzorci malog mozga TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak malog mozga miševa divljega tipa

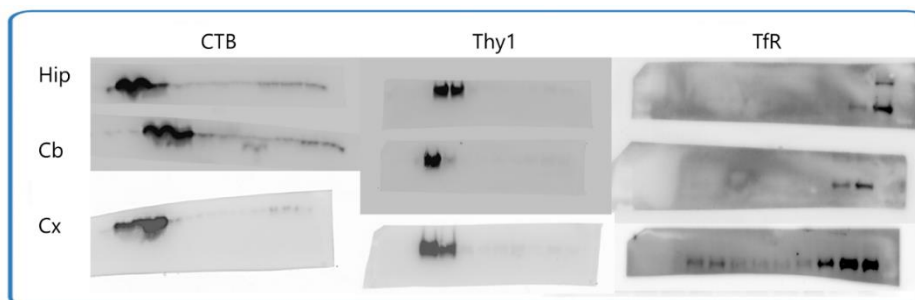
FRAKCIJA	KO	WT
GM3	26,59%	25,50%
GM1	22,95%	23,58%
GD1a	18,24%	22,20%
GD1b	16,09%	16,73%
GT1b	11,14%	9,49%
GQ1b	5,00%	2,51%



*Slika 5.5.2.* Reprezentativni prikaz imunokemijskog bojenja gangliozida u malom mozgu TLR2KO miševa i miševa divljeg tipa i grafički prikaz analize pojedinih gangliozidnih frakcija membrana malog mozga. ST- standard, TKO- uzorci malog mozga TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak malog mozga miševa divljega tipa

## 5.6 Lokalizacija proteina u membranskom okolišu i raspodjele unutar lipidnih nano-domena

Proteini analizirani u ovom istraživanju su smješteni u membrani te je provjerena njihova raspodjela između splavi (LR) i membranskih domena bogatih fosfolipidima (nLR). Uspješnost izolacije lipidnih splavi iz hipokampusa, malog mozga i moždane kore potvrđena je detekcijom biljega LR (CTB i Thy1) i nLR (TfR) (Slika.5.6.1.) Pokazano je da aktivnost i funkcija membranskih ATPaza ovise o lipidnom okolišu u koji su uronjene. Za protein Np, također, je pokazan smještaj unutar lipidnih splavi te je zbog navedenih činjenica ispitano događaju li se promjene u membranskom smještaju odabranih proteina u životinja bez proteina TLR2. U sljedećim podnaslovima navedeni TLR2KO i kontrolni uzorci se odnose na tkivo hipokampusa, malog mozga odnosno moždane kore izolirane iz miševa TLR2KO genotipa i kontrolnih uzoraka miševa divljeg tipa.

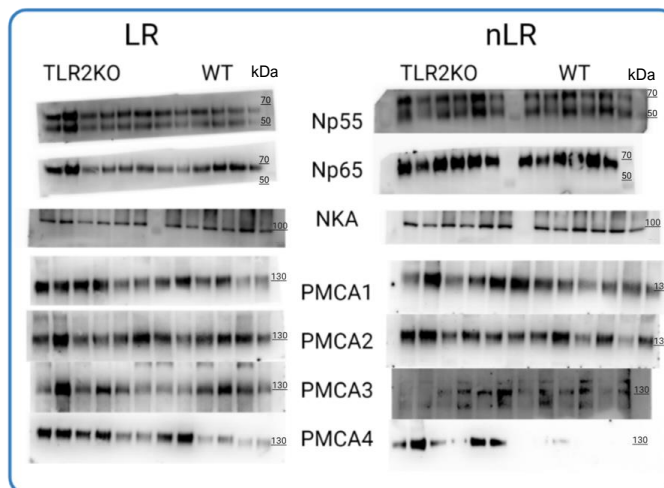


*Slika 5.6.1.* Detekcija biljega LR i nLR; protein Thy1 i gangliozid GM1 su biljezi splavi (frakcije 3 i 4), a TfR je biljeg ne-splavi (frakcije 9 i 10)

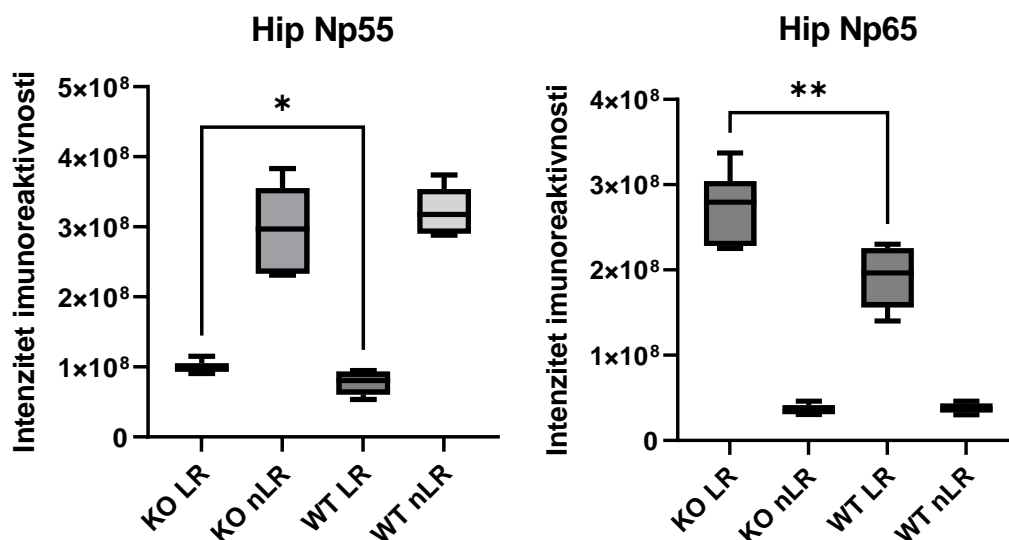
### 5.6.1 Hipokampus

U membranskim sustavima izoliranima iz tkiva hipokampusa TLR2KO životinja ustanovljeno je da se izoforme Np55 i Np65 nalaze u većoj količini u domenama LR nego u uzorcima hipokampusa kontrolne skupine miševa divljeg tipa (Slika 5.5.1.). Np55 je većinski smješten u domenama nLR, dok se Np65 gotovo u potpunosti nalazi u domenama LR. Np65 je statistički značajno obilniji u domenama splavi (t-test,  $**p < 0,01$ ), kao i Np55 protein, iako je za njega značajnost nešto niža (t-test  $*p < 0,05$ ).





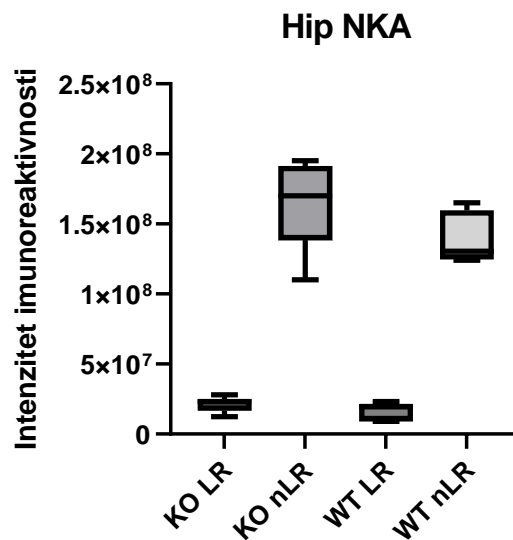
*Slika 5.6.2.* Reprezentativni prikaz kemilumiscencije proteina od interesa u hipokampusu TLR2KO miševa i miševa divljeg tipa. LR lipidne splavi; nLR – nesplavi; TLR2KO – uzorak hipokampusa TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljeg tipa.



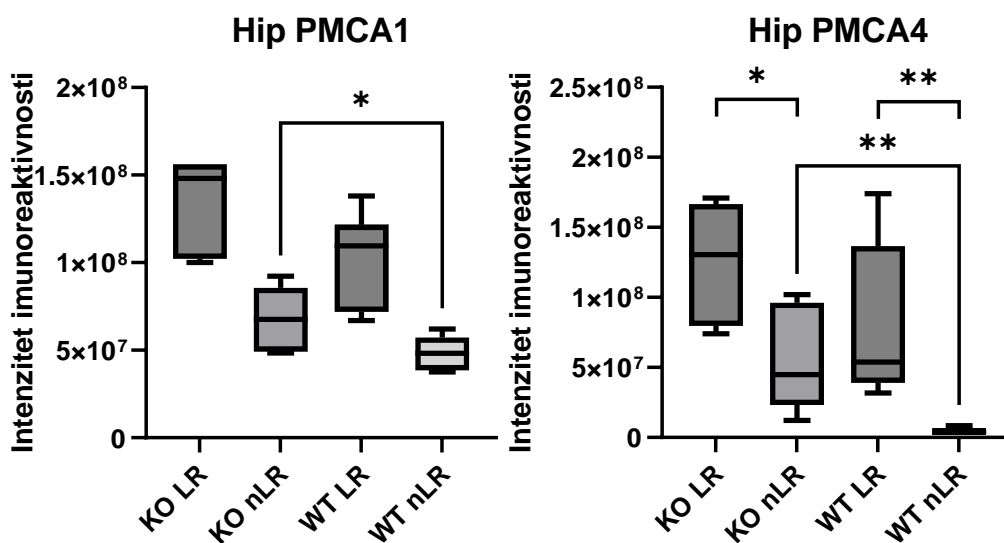
*Slika 5.6.3.* Raspodjela proteina Np55 i Np65 između domena LR i nLR u uzorcima hipokampusa TLR2KO miševa i miševa divljeg tipa. (t-test \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). KO LR – lipidne splavi hipokampusa TLR2KO miševa, KO nLR – ne-splavi hipokampusa TLR2KO miševa, WT LR – lipidne splavi kontrolnog uzorka hipokampusa miševa divljeg tipa, WT nLR – ne-splavi kontrolnog uzorka hipokampusa miševa divljeg tipa.

Za nekolicinu ATPaza tipa P je također utvrđeno da mijenjaju položaj u membrani. Izoforme PMCA1 i 4 se pojavljuju u većoj količini u domenama nLR nego u kontrolnim uzorcima (Slika 5.6.4.). PMCA 1 pokazuje povećanu zastupljenost u domenama nLR u uzorcima hipokampusa TLR2KO miševa (t-test, \* $p < 0,05$ ). PMCA 4 se u kontrolnom

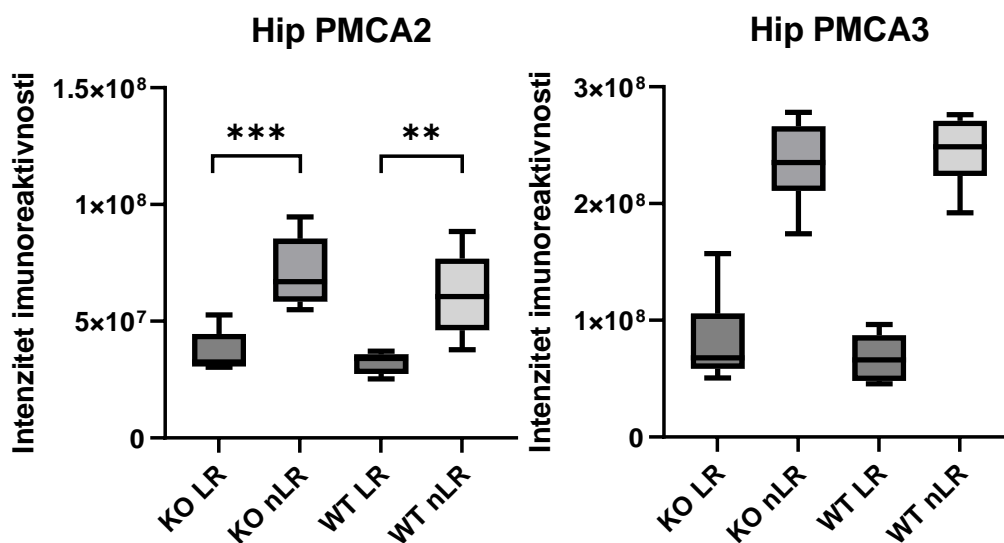
uzorku hipokampusa miševa divljeg tipa u zanemarivoj količini nalazi u domenama nLR, dok je u uzorcima hipokampusa TLR2KO miševa količina PMCA 4 izrazito velika u domenama nLR (t-test,  $**p < 0,01$ ). Uz razlike između istovjetnih domena, pokazano je da je raspodjela PMCA 2 i 4 unutar skupine različita (Slika 5.5.3-4). Za PMCA 2 je utvrđena veća razlika u raspodjeli između domena u uzorcima hipokampusa TLR2KO miševa (t-test,  $***p < 0,001$ ) u usporedbi s kontrolnim uzorcima hipokampusa miševa divljeg tipa (t-test,  $p < 0,01$ ), a za PMCA 4 ta razlika u raspodjeli u uzorcima hipokampusa TLR2KO miševa je smanjena (t-test,  $*p < 0,05$ ), u odnosu na kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljeg tipa (t-test,  $**p < 0,01$ ). Pokazano je da pozicija NKA i neuronalne izoforme PMCA3 ostaje nepromijenjena uspoređujući uzorak hipokampusa TLR2KO miševa i kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljeg tipa (Slika 5.5.2 i 5.5.4.).



*Slika 5.6.4.* Raspodjela proteina NKA između domena LR i nLR u uzorcima hipokampusa TLR2KO miševa i miševa divljeg tipa. KO LR – lipidne splavi hipokampusa TLR2KO miševa, KO nLR – ne-splavi hipokampusa TLR2KO miševa, WT LR – lipidne splavi kontrolnog uzorka hipokampusa miševa divljeg tipa, WT nLR – ne-splavi kontrolnog uzorka hipokampusa miševa divljeg tipa.



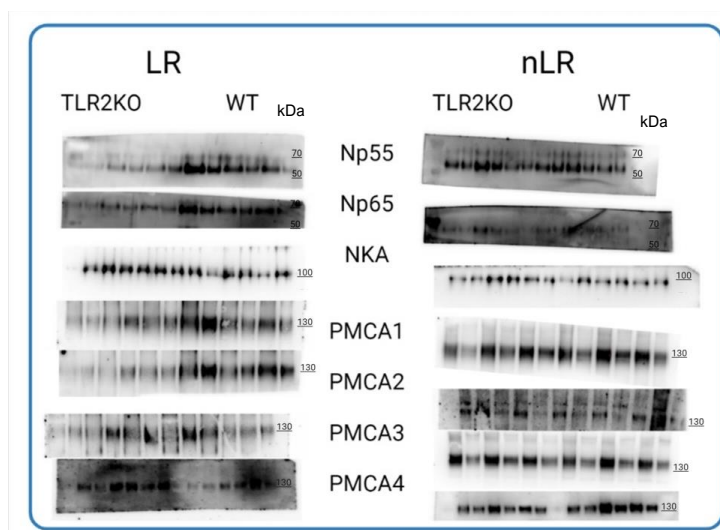
Slika 5.6.5. Raspodjela proteina PMCA 1 i 4 između domena LR i nLR u uzorcima hipokampusa TLR2KO miševa i miševa divljeg tipa. (t- test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). KO LR – lipidne splavi hipokampusa TLR2KO miševa, KO nLR – ne-splavi hipokampusa TLR2KO miševa, WT LR – lipidne splavi kontrolnog uzorka hipokampusa miševa divljeg tipa, WT nLR – ne-splavi kontrolnog uzorka hipokampusa miševa divljeg tipa.



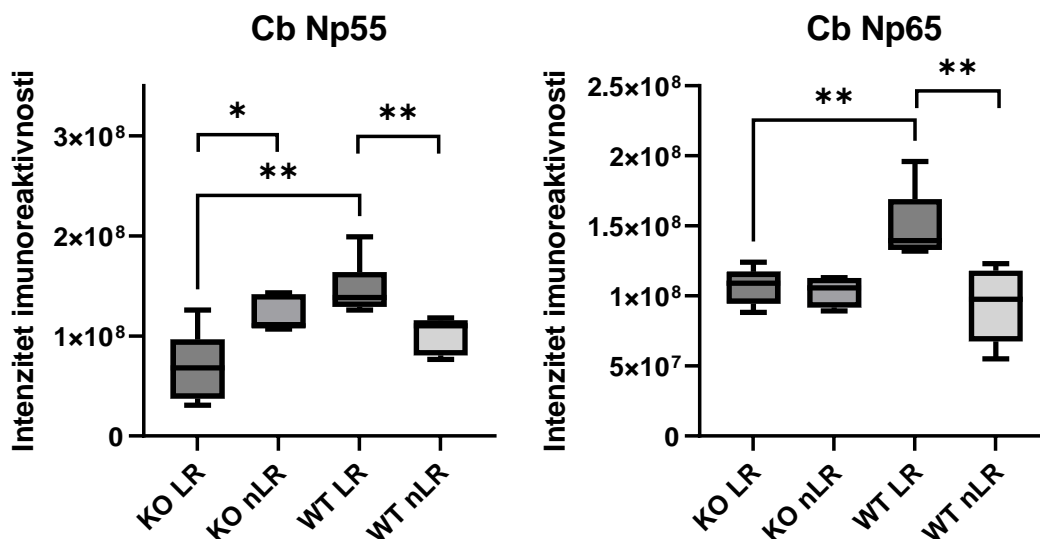
Slika 5.6.6. Raspodjela proteina PMCA 2 i 3 između domena LR i nLR u uzorcima hipokampusa TLR2KO miševa i miševa divljeg tipa WT. (t-test \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). KO LR – lipidne splavi hipokampusa TLR2KO miševa, KO nLR – ne-splavi hipokampusa TLR2KO miševa, WT LR – lipidne splavi kontrolnog uzorka hipokampusa miševa divljeg tipa, WT nLR – ne-splavi kontrolnog uzorka hipokampusa miševa divljeg tipa.

## 5.6.2 Mali mozak

U uzorcima maloga mozga utvrđene su promjene u smještaju proteina Np (Slika 5.6.7.). Protein Np mijenja svoj položaj između membranskih domena LR i nLR. Za izoformu Np55 pokazalo se da LR uzoraka malog mozga TLR2KO u odnosu na kontrolni uzorak sadrži manje proteina (t-test  $**p < 0,01$ ). Nadalje, zbog ove razlike dogodila se i promjena u distribuciji između LR-nLR unutar skupina gdje je manja razlika u uzorku TLR2KO ( $*p < 0,05$ ) dok je u kontrolnom uzorku razlika veća (t-test,  $**p < 0,01$ ). Sličan obrazac smanjenja uočen je za protein Np65 u domeni LR uzoraka TLR2KO u usporedbi s kontrolnim uzorcima (t-test,  $**p < 0,01$ ). Podjednake količine Np65 u domenama LR i nLR razbijaju asimetričnu podjelu koja se može uočiti u kontrolnom uzorku gdje je većinski Np65 u domenama LR (t-test,  $**p < 0,01$ ) (Slika 5.6.8.).

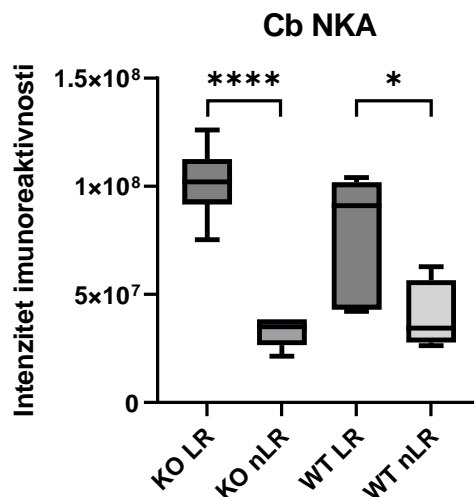


*Slika 5.6.7.* Reprezentativni prikaz kemilumiscencije proteina od interesa u malom mozgu. LR lipidne splavi; nLR – nesplavi; TLR2KO – uzorak malog mozga TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak malog mozga miševa divljeg tipa

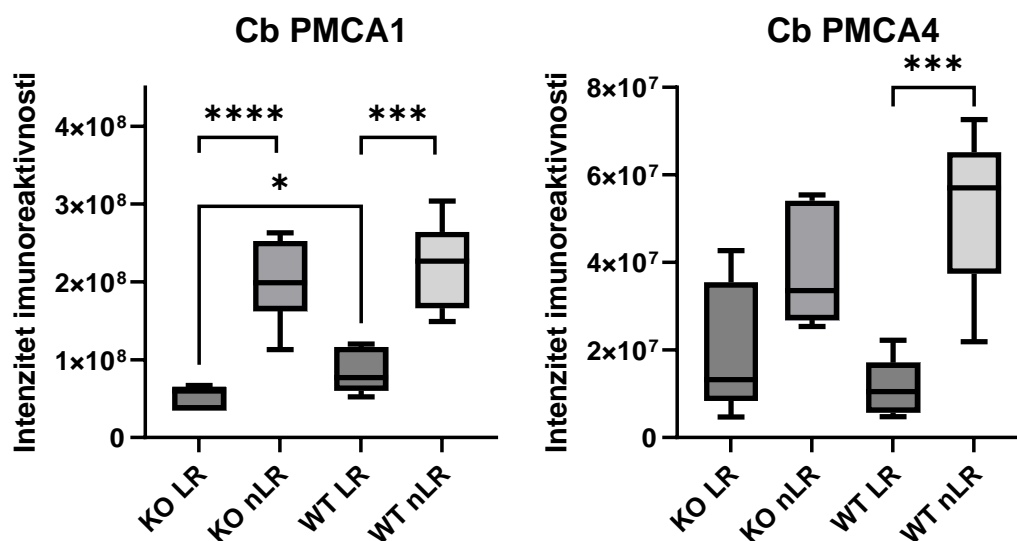


Slika 5.6.8. Raspodjela proteina N p55 i N p65 između domena LR i nLR u uzorcima malog mozga TLR2KO miševa i miševa divljeg tipa WT. t-test \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . KO LR – lipidne splavi malog mozga TLR2KO miševa, KO nLR – ne-splavi malog mozga TLR2KO miševa, WT LR – lipidne splavi kontrolnog uzorka malog mozga miševa divljeg tipa, WT nLR – ne-splavi kontrolnog uzorka malog mozga miševa divljeg tipa.

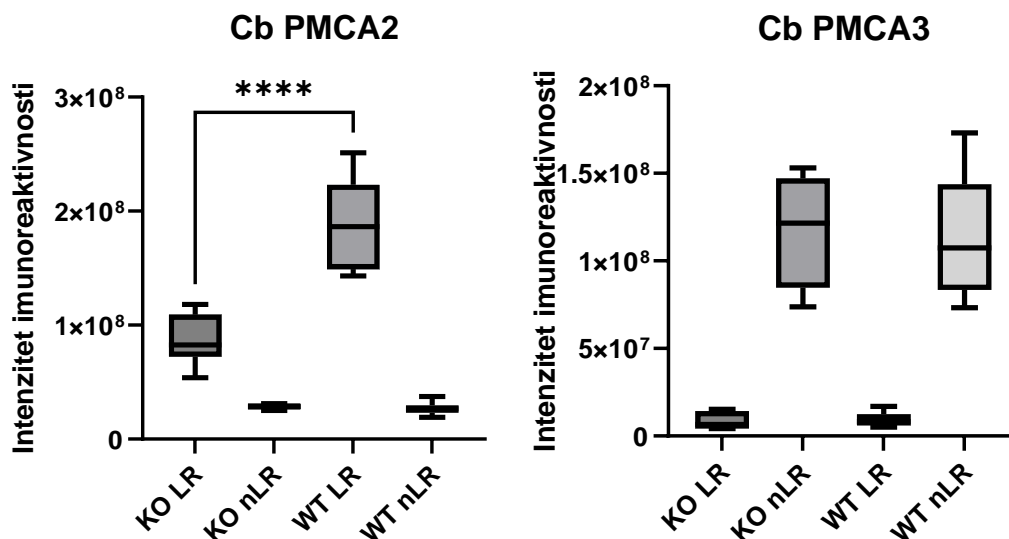
Kod smještaja ATPaza tipa P u malom mozgu utvrđeno je nekoliko promjena u membranskoj lokalizaciji. NKA u uzorcima TLR2KO pokazuje asimetričniju podjelu između LR i nLR domena (t-test, \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) u odnosu na kontrolne uzorke gdje je asimetrična podjela manjeg opsega (t-test, \* $p < 0,05$ ) (Slika 5.6.9.). Kod PMCA inačica, pokazalo se da PMCA1, u uzorcima TLR2KO u odnosu na kontrolni uzorak, sadrži manju količinu proteina u LR domenama nego što je uočeno u kontrolnom uzorku (t-test, \* $p < 0,05$ ). Uočena je povećana razlika raspodjele proteina u LR i nLR domenama u uzorcima TLR2KO ( $p < 0,0001$ ) u odnosu na kontrolni uzorak (t-test, \*\*\* $p < 0,001$ ) (Slika 5.6.10.). Za neuronalnu izoformu PMCA2 je, također, utvrđena smanjena količina proteina u domenama LR uzorka TLR2KO u odnosu na kontrolni uzorak (t-test \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) (Slika 5.6.10.). PMCA4 pokazuje povećanje simetričnosti distribucije u uzorka TLR2KO dok je ta razlika u kontrolnom uzorku značajna (t-test \*\*\* $p < 0,001$ ) (Slika 5.6.10).



Slika 5.6.9. Raspodjela proteina NKA između domena LR i nLR u uzorcima malog mozga TLR2KO i miševa divljeg tipa. (t-test, \*\* $p < 0,01$ ). KO LR – lipidne splavi malog mozga TLR2KO miševa, KO nLR – ne-splavi malog mozga TLR2KO miševa, WT LR – lipidne splavi malog mozga kontrolnog uzorka miševa divljeg tipa, WT nLR – ne-splavi malog mozga kontrolnog uzorka miševa divljeg tipa.



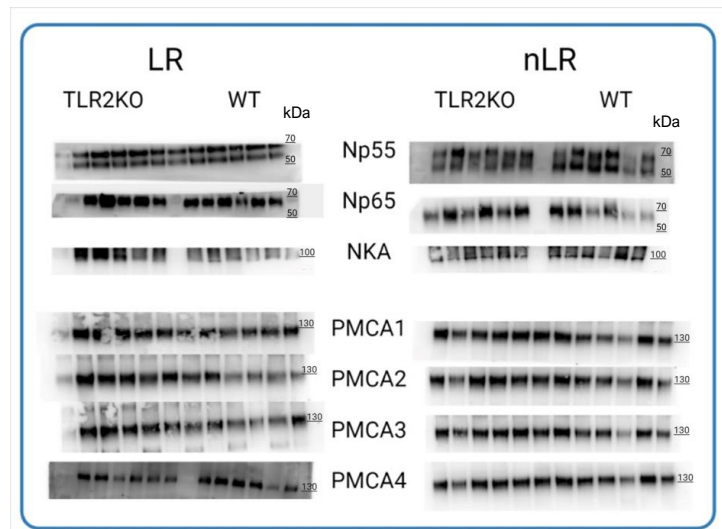
Slika 5.6.10. Raspodjela proteina PMCA1 i 4 između domena LR i nLR u uzorcima malog mozga TLR2KO miševa i miševa divljeg tipa. (t-test, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). KO LR – lipidne splavi malog mozga TLR2KO miševa, KO nLR – ne-splavi malog mozga TLR2KO miševa, WT LR – lipidne splavi kontrolnog uzorka malog mozga miševa divljeg tipa, WT nLR – ne-splavi kontrolnog uzorka malog mozga miševa divljeg tipa.



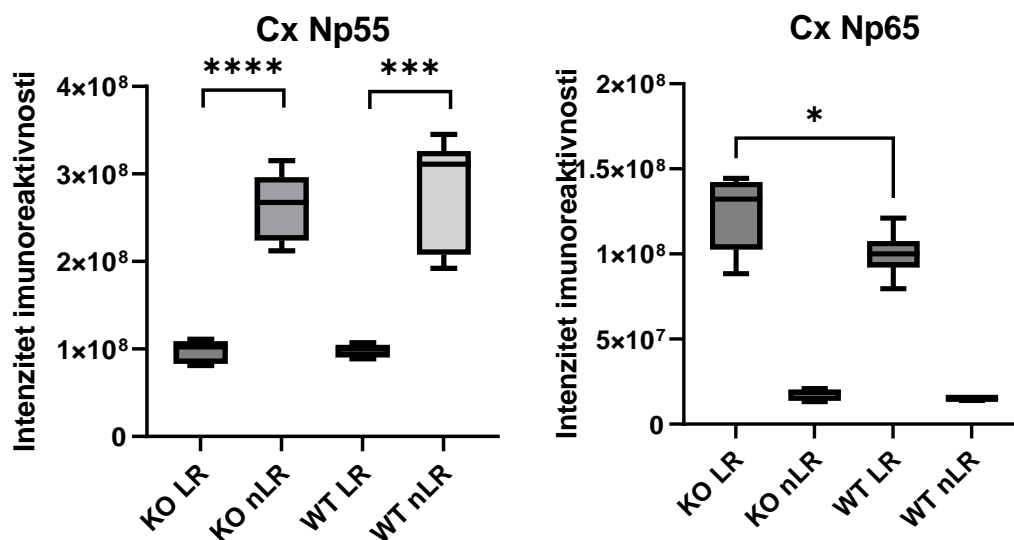
*Slika 5.6.11.* Raspodjela proteina PMCA2 i 3 između domena LR i nLR u uzorcima malog mozga TLR2KO i miševa divljeg tipa. (t-test, \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). KO LR – lipidne splavi malog mozga TLR2KO miševa, KO nLR – ne-splavi malog mozga TLR2KO miševa, WT LR – lipidne splavi kontrolnog uzorka malog mozga miševa divljeg tipa, WT nLR – ne-splavi kontrolnog uzorka malog mozga miševa divljeg tipa.

### 5.6.3 Moždana kora

Membranski položaj proteina u moždanoj kori TLR2KO miševa se, također, pokazao promijenjen. Protein Np65 se u većoj količini nalazi u domenama LR u moždanoj kori TLR2KO miševa u odnosu na kontrolni uzorak moždane kore miševa divljeg tipa (t-test,  $*p < 0,05$ ), dok se kod Np55 razlika između pojedinih domena u moždanoj kori između TLR2KO miševa i miševa divljeg tipa ne uočava. Postoji veća razlika u LR-nLR raspodjeli u uzorcima moždane kore TLR2KO miševa (t-test, \*\*\*\* $p < 0,0001$ ), dok je raspodjela u kontrolnom uzorku moždane kore miševa divljeg tipa nešto niža (t-test, \*\*\*\* $p < 0,001$ ) (Slika 5.5.9.). Također se može uočiti da je kod obje izoforme količina proteina u LR domenama u uzorcima moždane kore TLR2KO miševa veća nego u kontrolnom uzorku moždane kore miševa divljeg tipa.



Slika 5.6.12. Reprezentativni prikaz kemilumiscencije proteina od interesa u moždanoj kori TLR2KO miševa i miševa divljeg tipa, LR lipidne splavi; nLR – nesplavi; TLR2KO – uzorak moždane TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak moždane kore miševa divljeg tipa.

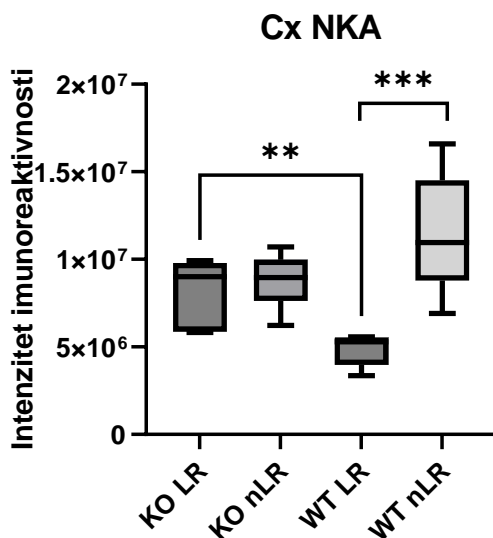


Slika 5.6.13. Raspodjela proteina Np55 i Np65 između domena LR i nLR u uzorcima moždane kore TLR2KO miševa i miševa divljeg tipa. (t-test, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). KO LR – lipidne splavi moždane kore TLR2KO miševa, KO nLR – ne-splavi moždane kore TLR2KO miševa, WT LR – lipidne splavi kontrolnog uzorka moždane kore miševa divljeg tipa, WT nLR – ne-splavi kontrolnog uzorka moždane kore miševa divljeg tipa.

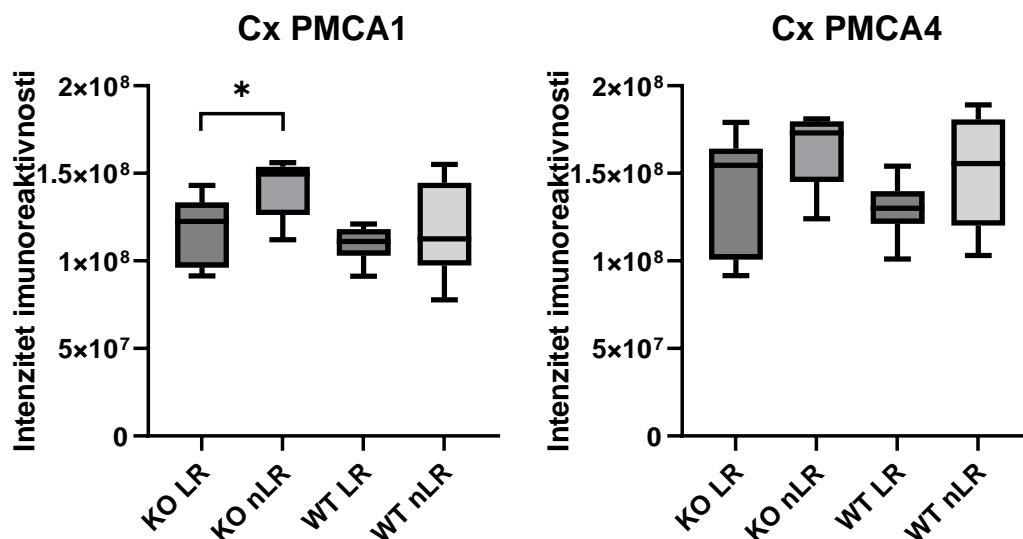
Raspodjela u membrani pojedinih izooblika ATPaza tipa P je promijenjena na više razina. Pokazalo se da je NKA raspodjela između LR i nLR smanjena u uzorcima moždane kore TLR2KO u odnosu na kontrolni uzorak moždane kore miševa divljeg tipa, gdje je ona značajna (t-test, \*\*\* $p < 0,001$ ), a promjena je u korist povećane količine unutar domena LR u uzorku korteksa TLR2KO miševa ( $p < 0,01$ ) (Slika 5.5.10.). U obitelji neuronalnih izoformi PMCA, povećana je količina proteina u domenama LR, više za PMCA 2 (t-test,



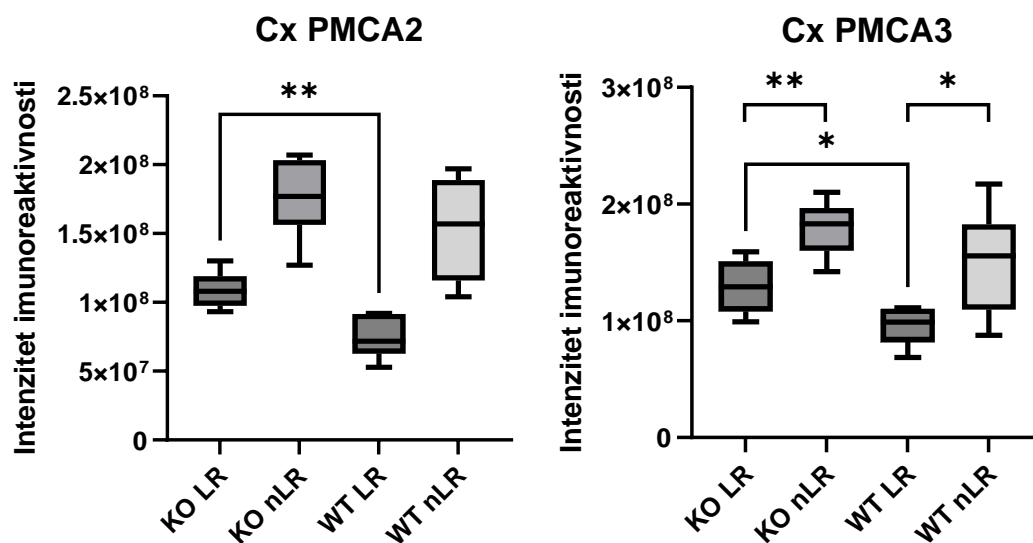
\*\*p<0,01), nego za PMCA 3 (t-test, \*p<0,05) (Slika 5.5.12). Kod PMCA 1 i 3. uočava se promjena u globalnoj raspodjeli između domena LR i nLR. PMCA 1 u uzorku korteksa TLR2KO miševa je asimetrično raspodijeljena (t-test, \*p<0,05) za razliku od kontrolnog uzorka korteksa miševa divljeg tipa (slika 5.5.11.), dok je kod PMCA 3 raspodjela asimetričnija u moždanoj kori TLR2KO miševa (t-test, \*\*p<0,01) nego u kontrolnim uzorcima korteksa miševa divljeg tipa (t-test, \*p<0,05) (Slika 5.5.12).



*Slika 5.6.14.* Raspodjela proteina NKA između domena LR i nLR u uzorcima moždane kore TLR2KO i miševa divljeg tipa. (t-test, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001). KO LR – lipidne splavi TLR2KO miševa, KO LR – lipidne splavi moždane kore TLR2KO miševa, KO nLR – ne-splavi moždane kore TLR2KO miševa, WT LR – lipidne splavi kontrolnog uzorka moždane kore miševa divljeg tipa, WT nLR – ne-splavi kontrolnog uzorka moždane kore miševa divljeg tipa.



Slika 5.6.15. Raspodjela proteina PMCA1 i 4 između domena LR i nLR u uzorcima moždane kore TLR2KO i miševa divljeg tipa. (t-test,  $**p < 0,01$ ). KO LR – lipidne splavi moždane kore TLR2KO miševa, KO nLR – ne-splavi moždane kore TLR2KO miševa, WT LR – lipidne splavi kontrolnog uzorka moždane kore miševa divljeg tipa, WT nLR – ne-splavi kontrolnog uzorka moždane kore miševa divljeg tipa.



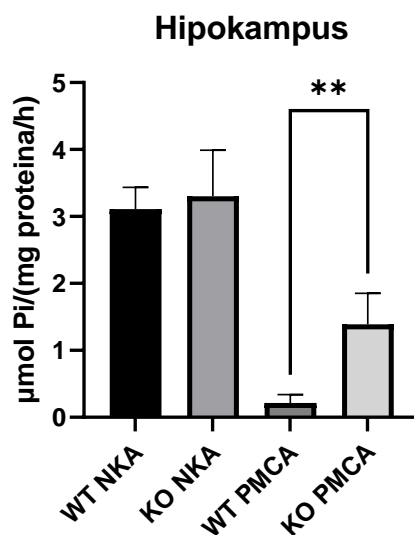
Slika 5.6.16. Raspodjela proteina PMCA2 i 3 između domena LR i nLR u uzorcima moždane kore TLR2KO i miševa divljeg tipa. (t-test,  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ). KO LR – lipidne splavi moždane kore TLR2KO miševa, KO nLR – ne-splavi moždane kore TLR2KO miševa, WT LR – lipidne splavi kontrolnog uzorka moždane kore miševa divljeg tipa, WT nLR – ne-splavi kontrolnog uzorka moždane kore miševa divljeg tipa.

## 5.7 Aktivnost ATPaza tipa P u homogenatima moždanih regija životinja s utišanim TLR2 genom

Mjerenjem aktivnosti ATPaza provjeren je utjecaj promjene membranske lokalizacije ATPaza na njezinu funkcionalnost i kapacitet prijenosa iona. Ukupna enzimska aktivnost podložna inhibiciji ouabainom je mjerena za NKA, a u slučaju PMCA mjerena je aktivnost podložna inhibiciji karboksieozinom.

### 5.7.1 Hipokampus

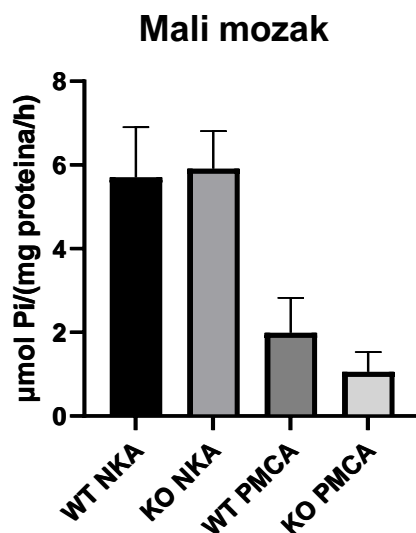
U homogenatima hipokampusa pokazano je kako aktivnost NKA u uzorcima TLR2KO miševa ne odstupa od vrijednosti kontrolnog uzorka miševa divljeg tipa, dok je za aktivnost PMCA pokazano da je u uzorcima hipokampusa TLR2KO miševa aktivnost povećana u odnosu na kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljeg tipa za 600% (0,2 vs. 1,3  $\mu\text{mol Pi}/(\text{mg proteina}/\text{h})$ ).



Slika 5.7.1. Aktivnost NKA i PMCA u homogenatima hipokampusa TLR2KO miševa i kontrolni uzorak miševa divljeg tipa (t- test, \*\*  $p < 0,01$ ). KO – uzorak hipokampusa TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak hipokampusa miševa divljeg tipa.

### 5.7.2 Mali mozak

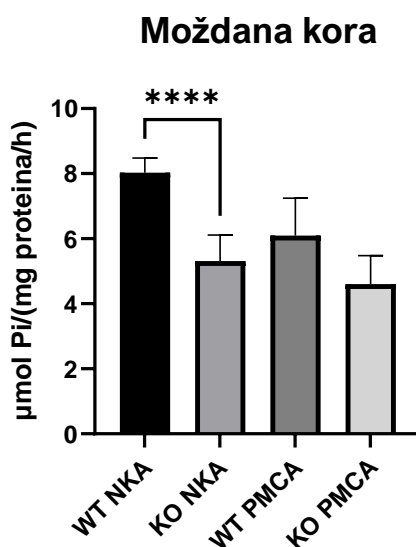
U uzorcima maloga mozga aktivnost NKA bila je bez razlika između ispitivanih skupina dok je aktivnost PMCA u uzorcima malog mozga TLR2KO miševa za 15% niža nego u kontrolnom uzorku miševa divljeg tipa, ali bez statističke značajnosti.



*Slika 5.6.2.* Aktivnost NKA i PMCA u homogenatima malog mozga TLR2KO miševa i miševa divljeg tipa. KO – uzorak malog mozga TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak malog mozga miševa divljeg tipa.

### 5.7.3 Moždana kora

Mjerenjem aktivnosti pokazano je da je enzimski obrtaj obje ATPaze promijenjen u moždanoj kori TLR2KO miševa. Aktivnost NKA u uzorcima moždane kore TLR2KO miševa je tek na razini 50% aktivnosti kontrolnog uzorka moždane kore miševa divljeg tipa s velikom statističkom značajnošću. Aktivnost PMCA je za 25% snižena u uzorcima moždane kore TLR2KO miševa u odnosu na kontrolni uzorak moždane kore miševa divljeg tipa.



*Slika 5.6.3.* Aktivnost NKA i PMCA u homogenatima malog mozga moždane kore TLR2KO miševa i miševa divljeg tipa (t-test, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). KO – uzorak moždane kore TLR2KO miševa; WT – kontrolni uzorak moždane kore miševa divljeg tipa.

Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti pokazuju da je PMCA aktivnost osjetljivija i ovisi o lokalizaciji unutar membranskog okoliša. Iako je samo u hipokampusu pokazana statistički značajna razlika (t- test,  $p < 0,01$ ) u malom mozgu i moždanoj kori pad aktivnosti PMCA od 15% i 25% ne bi trebalo zanemariti s obzirom da je mjerena kumulativna aktivnost te promjene u aktivnosti jedne inačice mogu imati utjecaj na signalizacijske i informacijske rute posredovane kalcijem. Aktivnost NKA je najviše promijenjena u moždanoj kori ( $p < 0,0001$ ), upućujući da je došlo do mogućih promjena u ionskom bazalnom metabolizmu.

## 6. RASPRAVA

Ovim istraživanjem načinjena je iscrpna analiza fenotipa membrana u mišjem modelu s ugašenim genom za protein TLR2 te su utvrđene razlike na razini biokemijskih i molekularnih obilježja membranskog okoliša. Molekularni aspekti promjena praćeni su na razini sinapse, te su masenom spektrometrijom utvrđene promjene u sinaptičkom miljeu hipokampusa, malog mozga i moždane kore koje su ukazale na velike promjene u sastavu proteina sinaptičkih spojeva TLR2KO miševa. Metodom *Western blot* i imunoobilježavanjem u homogenatima i tkivu je opisan sadržaj i zastupljenost proteina membrane, neuroplastina i ATPaza tipa P. Provjereno je i prepisivanje proteina od interesa na razini mRNA kako bi se opisala stanična potreba i obrtaj navedenih proteina. Analizom raspodjele neuroplastina i ATPaza tipa P unutar membrana zabilježene su promjene u lokalizaciji proteina u membranskim nano-domenama lipidnih splavi. Opisan je biokemijski aspekt promjena sastava ganglioizidnih vrsta koje u moždanom tkivu čine najvažniju frakciju glikosfingolipida te su sastavni dio lipidnih splavi. Promjena u ganglioizidnom sastavu odražava se na lokalizaciju proteina u opisanom membranskom okolišu. Mjerenjem aktivnosti ATPaza tipa P provjerena je dodatna dimenzija promjena sastava ATPaza i lipidnog okoliša. Svi rezultati ovog rada su prikazani tablično kako bi se lakše uočile razlike zabilježene u membranskim sustavima moždanog tkiva mišjeg modela TLR2KO (*Tablica 6.*).

**Tablica 6.** Skupni opis rezultata svih provedenih analiza u uzorcima moždanih regija TLR2KO. ↓ - sniženje u odnosu na kontrolni uzorak miševa divljeg tipa; ↑ - povećanje u odnosu na kontrolni uzorak miševa divljeg tipa, 0 – bez promjena u odnosu na kontrolni uzorak miševa divljeg tipa, nd – nedefinirano; Hip - hipokampus, Cb – mali mozak; Cx – moždana kora; WB - Western blot, IHC – imunohistokemija, LR/nLR – membranska pozicija, Ea – enzimski aktivnost, GGL – gangliozidni sastav, MS – spektroskopija masa; \* - rezultati prikazani u dodatku.

Metoda	Regija	Np55	Np65	TRAF6	NKA	PMCA 1	PMCA 2	PMCA 3	PMCA 4	
WB	Hip	↑	↑	0	↑	0	↑	0	0	
IHC		↓	↓	nd	↓	↓	↓	0	0	
qPCR		↓	nd	nd	0	nd	↓	nd	↓	
LR/nLR		↑/0	↑/0	nd	0/0	0/↑	0/0	0/0	0/↑	
Ea						0	↑			
GGL		↓GM3 ↑GD3 ↑GD1a ↓GD1b								
MS		Mijelin, sinapse, PDS, sidrenje vezikula, aksoni, glutamatergičke sinapse.								
WB	Cb	↓	↓	↑	↑	↓	↓	0	↑	
IHC		↓	↓	nd	↑	↓	0	0	0	
qPCR		↑	↑*	nd	0	nd	↑	nd	0	
LR/nLR		↓/0	↓/0	nd	0/0	↓/0	↓/0	0/0	0/0	
Ea						0	0			
GGL		↓GD1a ↑GT1b ↑GQ1b								
MS		Mijelin, energetski metabolizam, membrane, neuronalne projekcije.								
WB	Cx	0	↑	0	↑	0	↑	0	↓	
qPCR		↓	↑*	nd	0	0	↓	0	↑	
LR/nLR		0/0	↑/0	nd	↑/0	0/0	↑/0	↑/0	0/0/	
Ea						↓	0			
GGL		0*								
MS		Energetski metabolizam, mijelin, sinapse, internodalne regije aksona.								
IHC		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

### 6.1 Promjene sinaptičkog proteoma hipokampusa upućuju na promjenu ravnoteže ekscitacijskih i inhibicijskih sinapsi uslijed promjena u integritetu aksonskih projekcija TLR2KO miševa

Zabilježene promjene u sinaptičkom proteomu hipokampusa TLR2KO miševa ukazuju na razlike u sinaptičkom izgledu, ravnoteži GABAergičkih i glutamatergičkih sinapsi te neuronalnim krugovima zbog vjerojatne smanjene količine mijeliniziranih aksona. Kako je bioinformatičkim alatima utvrđena smanjena zastupljenost proteina u hipokampusu TLR2KO miševa možemo pretpostaviti da su promjenjene i određene

sinaptičke funkcije. Dio proteina promjenjenog izražaja uključen je u procese razvoja i diferencijacije neurona. Cend1 i Epb4113 su proteini s većom zastupljenošću u TLR2KO miševa u usporedbi s kontrolnim uzorkom miševa divljeg tipa što upućuje na neurogenezu i sinaptogenezu u hipokampusu (172). Poznato je da je protein Cend1 odgovoran za neurogenezu pravilnog broja GABAergičkih neurona u moždanoj kori, hipokampusu i amigdali (172). Povećana koncentracija ovih proteina u hipokampusu TLR2KO miševa može upućivati na promjenu u broju GABAergičkih neurona u hipokampusu što ima za posljedicu promjenu u ravnoteži između ekscitacijskih (E) i inhibicijskih (I) sinapsi. Također povećanje izražaja proteina energetskog metabolizma u hipokampusu TLR2KO miševa ukazuje na povećane zahtjeve za energijom što može biti rezultat sinaptogeneze ili povećanog intenziteta visokoenergetskih sintetskih i razvojnih procesa. Proteini eEf1a1 i za živčani sustav specifični eEf1a2 zaduženi su za regulaciju staničnog ciklusa i diferencijaciju neuronalnih progenitorskih stanica dok se pretpostavlja da su u sinapsama zaduženi za sintezu proteina uključenih u održavanje sinaptičke plastičnosti i konsolidaciju pamćenja (173,174). Njihova smanjena količina u sinaptičkom proteomu hipokampusa TLR2KO miševa ukazuje na deregulaciju navedenih procesa sinaptičke plastičnosti i smanjenje kapaciteta osnove za procese učenja i pamćenja. Dodatne promjene u organizaciji citoskeleta upućuju na moguće promjene u integritetu neuronalnih projekcija. Može se zaključiti da je integritet citoskeleta aksona narušen u hipokampusu TLR2KO miševa. Možemo pretpostaviti da je obzirom na sniženu količinu proteina Act $\beta$ , Krt10, Krt77 u TLR2KO miševa došlo do promjena u metabolizmu, razvoju i integritetu aksonskih projekcija. Smanjena količina ovih proteina u TLR2KO miševa može ukazivati na kraće projekcije u kojima je sadržaj citoskeletnih elemenata manji nego što bi bio u dugim i razgranatim projekcijama ili na smanjen broj oligodendrocita koji bi stvarali mijelin i omogućili integritet aksonskih projekcija. U grupi proteina u funkciji organizacije citoskeletne građe Dbn1 i Rab10 su više zastupljeni, dok je Crmp4 (Dpysl3) manje zastupljen u hipokampusu TLR2KO miševa. Rab10 je zadužen za rast aksona i razgranatost dendritičkih projekcija (175,176), dok je Dbn bitna komponenta u usmjeravanju aksona prilikom rasta (177,178). Protein Crmp4 u sinaptičkom okolišu sudjeluje u produljivanju aksona (179), a u interakciji s Act $\beta$  organizira citoskelet u rastućim aksonima i dendritima dok njegov izostanak i mutacije u razvoju živčanog tkiva rezultiraju patologijama autističnog spektra (180). Budući da je utvrđena i povećana i smanjena količina ova tri



proteina, a obavljaju istu funkciju moguće je da u zrelih neurona imaju kumulativno djelovanje ili su pak aktivni samo u određenim populacijama neurona, gdje kod jedne populacije neurona Dbn1 i Rab10 stimuliraju izrastanje aksona dok kod Crmp4 u drugoj populaciji neurona inhibira iste procese. Promjene u količini aksonskih elemenata i njihovih regulatornih čimbenika potkrepljuju pretpostavku o promjenama u ravnoteži E/I sinapsi preko metabolizma citoskeleta aksona te upućuju na promijenjenu mrežu informacijskih puteva hipokampusa TLR2KO miševa. Uz to TLR2 igra bitnu ulogu u oligodendrocitima i održavanju njihove populacije stoga deregulacija aksona u TLR2KO miševa može biti uzrokovana promjenama u populaciji oligodendrocita i statusu mijelinskog omotača. Nadalje, protein Gphn je ključan igrač u organizaciji inhibicijskih sinapsi (39,69,181), te njegova povišena količina u uzorcima hipokampusa TLR2KO miševa u odnosu na kontrolne uzorke miševa divljeg tipa upućuje na promjene u organizaciji GABAergičkih sinapsi. U TLR2KO miševa zabilježene su uglavnom snižene količine proteina koji su funkcionalno vezani za glutamatergičke sinapse, što govori u prilog utjecaja nedostatka TLR2 na specifične funkcije sinapsi u hipokampalnoj formaciji. Također, proteini SNARE kompleksa, Snap25, sintaksin i septin5 vezikularnog transporta, sidrenja i otpuštanja neurotransmitera govore o deregulaciji vezikularnog metabolizma i obzirom na smanjen izražaj ovih proteina u TLR2KO miševa može se pretpostaviti kako u ovom mišjem modelu postoji poremećaj sinaptičke transmisije.. Kako su povećane količine GPHN proteina utvrđene u TLR2 mutiranih miševa, a poznato je da I sinapse reguliraju otpuštanje neurotransmitera iz E sinapse (38,43) postoji mogućnost da je povećan intenzitet inhibicijskih signala u glutamatergičkim sinapsama što dovodi do promjena u vezikularnom metabolizmu i frekvenciji otpuštanja neurotransmitera te rezultira smanjenom ekscitacijom u hipokampusu TLR2KO miševa. Uočeno je i da glavni enzim koji katalizira reakciju nastajanja neurotransmitera Glu iz Gln, glutaminaza GLS, također ima smanjenu zastupljenost u hipokampusu TLR2KO miševa, što ukazuje da potencijalno postoje razlike u potrebi neurona za ekscitacijskim neurotransmitterom. Dodatno, utvrđene su također smanjene razine prijenosnika GABA-e, Slc6a1 u hipokampusu TLR2KO miševa, što može govoriti o trajanju inhibicijskog signala obzirom na smanjeni klirens GABA-e. Dodatnu potvrdu o promjenama u glutamatergičkoj transmisiji u hipokampusu TLR2KO miševa donosi protein Ly6h, čija je funkcija transport  $\alpha 7$  nAChR. Funkcija ovog proteina u sinapsi je vezana za sinaptogenezu glutamatergičkih sinapsi i uspostavljanje

neuralnih krugova piramidalnih neurona, te je pokazano da njegovo smanjenje potiče pojačanje amplituda glutamatergičkih mEPSC (182). S obzirom na njegovu povišenu količinu u hipokampusu TLR2KO životinja očekivano je smanjenje glutamatergičke sinaptogeneze i samim time glutamatergičke struje posredstvom aktivacije  $\alpha 7$  nAChR. Ove pretpostavke upućuju da bi hipokampus TLR2KO životinja mogao biti opterećen viškom I sinapsi, te da potencijalno dolazi do promjena u normalnim funkcijama hipokampalne formacije. Kako bi se potvrdila ova pretpostavka valja istražiti u detalje neuralne populacije i njihovu povezanost s oligodendrocitima, sinaptičku zastupljenost E/I sinapsi te koja je priroda deregulacije glutamatergičke transmisije i koji je točan mehanizam koji dovodi do uočenih sinaptičkih promjena. Zaključno, literaturni navodi govore o ulozi TLR2 u procesu diferencijacije i regulacije staničnog ciklusa neuralnih i oligodendrocitnih progenitorskih stanica moždane kore, te se postavlja pitanje je li TLR2 protein odgovoran za održavanje i integritet projekcija glutamatergičkih neurona u hipokampusu.

## **6.2 Biokemijske i molekularne promjene neuroplastina i ATPaza tipa P ukazuju na smanjen volumen i reorganizaciju membranskog okoliša u tkivu hipokampusu TLR2KO miševa**

Promjene izražaja neuroplastina i ATPaza tipa P u mišjem modelu TLR2KO potvrđuju na više razina da nedostatak TLR2 bitno utječe na reorganizaciju unutar membranskog okoliša u hipokampusu. *Western blot* metodom utvrđene su povećane količine Np55, Np65, NKA i PMCA2 proteina u hipokampusu TLR2KO miševa u odnosu na kontrolni uzorak miševa divljeg tipa, što je u oprečnosti s nalazima ostale dvije metode koje su pokazale nižu zastupljenost navedenih proteina u tkivu i na razini prepisivanja njihovih gena. Ovaj nalaz *Western blot* metode može se protumačiti ako se pogledaju slike tkivnih rezova (Slika 5.3.1 i 5.3.4.), gdje se jasno može uočiti da je hipokampalna formacija TLR2KO životinja izrazito manjeg volumena, nego u kontrolnom uzorku hipokampusu miševa divljeg tipa. Iz ovoga proizlazi da je za analizu uzoraka hipokampusu bilo potrebno nanošenje veće količine proteina na gel. Gustoća proteinskog uzorka hipokampusu TLR2KO životinja je vjerojatno dovela do povišenog signala u usporedbi s kontrolnim uzorkom hipokampusu miševa divljeg tipa. Nadalje, sama vrijednost enzimске aktivnosti za koje je korištena iznova određena koncentracija proteina je upitna, premda je za aktivnost PMCA u uzorcima TLR2KO miševa pokazan porast od 200% u odnosu na uzorke hipokampusu miševa divljeg tipa. Za raspravu, vodit ćemo se pretpostavkom da su ovi

proteini sniženog izražaja u hipokampusu TLR2KO miševa, kako je zabilježeno detekcijom proteina u tkivu i na razini mRNA. Smanjeni izražaj ovih proteina u hipokampusu TLR2KO miševa potkrepljuje promjene zabilježene masenom spektrometrijom i upućuje na moguće smanjenje broja stanica hipokampalne formacije modela TLR2KO. Smanjena količina Np65 proteina u hipokampusu TLR2KO miševa ukazuje na smanjen volumen sinaptičkog okoliša, u skladu s utvrđenim razlikama u sinaptičkom proteomu i ukazuje na smanjenu zastupljenost sinaptičkih lokaliteta što podupire hipotezu o neravnoteži E/I sinapsi u hipokampusu TLR2KO miševa. Također, smanjena količina Np55/65 proteina kao regulatorne podjedinice PMCA, prati smanjeni izražaj PMCA1 i PMCA 2 u tkivu hipokampusa TLR2KO miševa. Izražaj Np55 proteina prati smanjenje PMCA 1 u svim regijama hipokampusa TLR2KO miševa, s najvećom značajnošću u CA2 regiji, dok je PMCA 1 također značajno smanjena u CA3 regiji. Izražaj obje Np izoforme prate značajno smanjeni izražaj PMCA 2 u DG regiji hipokampusa TLR2KO miševa. Ove promjene mogu ukazivati na promjene u trisinaptičkom putu neurona hipokampalne formacije TLR2KO miševa. Pokazano je da neuroplastin u hipokampusu čovjeka lokalizira s neuronima trisinaptičkog puta, te neuronima entorinalnog korteksa, te da njegova eliminacija u piramidalnim neuronima hipokampalne formacije uzrokuje promjene u signalizaciji  $Ca^{2+}$  i smanjeni kapacitet obrade podataka u ovom putu (183). To upućuje na smanjen kapacitet obrade podataka to jest ulazni signal u područje dentatnog girusa TLR2KO miševa, gdje je uočena najveća razlika u izražaju proteina Np65. Ovi nalazi potkrepljuju nalaze bihevioralnih testova na TLR2KO miševima koji pokazuju promjene ponašanja kojima upravlja upravo obrada i protok informacija kroz trisinaptički put, dakle formiranje i konsolidiranje učenja i pamćenja, prepoznavanje i obrada osjetilnih podražaja vizualne i auditivne prirode, te snalaženje u vremenu i prostoru. Možemo zaključiti da obrazac izražaja proteina u hipokampusu TLR2KO miševa odgovara promjenama kognitivnih i bihevioralnih funkcija u TLR2KO životinja, s obzirom na smanjenu količinu sinapsi trisinaptičkog puta praćenih izražajem Np65 proteina. Količina proteinskog produkta PMCA u TLR2KO tkivu hipokampusa ide u prilog smanjenoj transmisiji i promjenama u metabolizmu neurotransmiterskih vezikula koje su najznačajnije u DG regiji. Lokalizacija PMCA u presinaptičkim neuronima regulira  $Ca^{2+}$ -ovisno otpuštanje neurotransmitera aktivirajući proteine SNARE kompleksa, Munc1-18, sinaptotagmin i kompleksin, koji su strukturni partneri SNAP25, sintaksina i septina5 čija

je smanjena količina potvrđena na razini sinaptičkog proteoma u uzorcima TLR2KO miševa. Pokazan smanjen izražaj PMCA2 također upućuje na promjene u zastupljenosti glutamatergičkih sinapsi, čija transmisija ovisi o  $\text{Ca}^{2+}$  tranzijentima. Naime, PMCA2 u kompleksima s ionotropnim glutamatnim receptorima regulira trajanje koncentracijskog gradijenta nastalog povećanjem lokalne koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ . Može se zaključiti da je količina PMCA2 dostatna za potrebe održavanja  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracijskih gradijenata i ukazuje na već spomenutu promjenu ravnoteže E/I sinaptičkih lokaliteta u hipokampusu TLR2KO miševa. Niska razina proteinskog produkta ubikvitarnе neuronalne i astrocitne katalitičke izoforme NKA $\alpha$ 1 u hipokampusu TLR2KO miševa ide u prilog razlikama utvrđenima u ranijim istraživanjima glutamatergičkih sinapsi, neuronalnih projekcija i zastupljenosti u staničnim linijama. Promjene na razini genskog produkta mRNA upućuju na smanjenje razvoja/diferencijacije pojedinih staničnih populacija, pa tako smanjenje NKA $\alpha$ 2 $\beta$ 2 ukazuje na smanjenu količinu astrocita, dok smanjenje NKA $\alpha$ 1 $\beta$ 1 i NKA $\alpha$ 3 $\beta$ 1 indicira smanjenu zastupljenost neuronalnih populacija. Kako je aktivnost NKA u astrocita povezana s unosom Glu iz sinaptičkih pukotina, smanjen izražaj NKA u tkivu i na genskoj razini potvrđuje promjenu opisane deregulacije glutamatergičke transmisije u hipokampusu TLR2KO miševa. Smanjeno prepisivanje navedenih gena i količina njihovog proteinskog produkta ukazuju na sniženu staničnu potrebu za navedenim proteinima, te da je njihova zabilježena količina dovoljna za održavanje sinaptičkih i homeostatskih procesa u hipokampusu TLR2KO miševa.

Promatramo li promjene u poziciji proteina u membrani i njezinom sastavu glikosfingolipida uočavamo promijenjene dvije jednostavne vrste GD3 i GM3 u ukupnoj frakciji gangliozida promijenjene u hipokampusu TLR2KO miševa. GD3 i GM3 su najzastupljeniji gangliozidi tijekom razvoja moždanog tkiva, te su najveća gangliozidna frakcija u neuronalnim progenitorskim stanicama (1,184). Osim toga, GD3 je najzastupljeniji u nezrelim neuronima i astrocitima koji migriraju, te njegovo povećanje u ukupnoj frakciji gangliozida potkrepljuje literaturne navode da nedostatak TLR2 uzrokuje povećanje populacije neuronalnih progenitorskih stanica ili, pak, ukazuje na veliki broj iznova rastućih aksonskih i dendritičkih projekcija. Podatci o promijenjenom metabolizmu citoskeletnih elemenata u hipokampusu TLR2KO miševa, također, potkrepljuju činjenicu o različitom metabolizmu aksona i/ili dendrita. GM3 gangliozid je povezan s energetske metabolizmom, gdje vezanjem inzulinskog receptora omogućuje njegovu internalizaciju i

smanjeni prijenos signala preko inzulinskog receptora (184). Kako je pokazano da u hipokampusu TLR2KO miševa postoji povećan izražaj proteina energetskog metabolizma, a ukupna količina GM3 je smanjena, može se pretpostaviti da je signalna kaskada inzulinskog receptora aktivna. Između ostalog, biosintetski put kompleksnih gangliozida kreće s GM3. Serija a gangliozida iz GM3 daje GM2, GM1, GD1a, a serija b gangliozida iz GM3 daje GD3, GD1b i GT1b. Smanjena količina GM3 gangliozida može ukazivati i na veliku potrebu za kompleksnim gangliozidima a-serije kao što je zabilježeno za GD1a i GD3 gangliozidima b-serije. Pad u količini GT1b gangliozida, pripadnika b-serije, može biti posljedica povećane potrebe za njegovim prekursorom GD3. Razlike u količini gangliozida utječu na sastav lipidnih splavi. GM1, GD1a, GD1b i GT1b su glavne frakcije gangliozida u splavima (107,168). Unatoč nepromijenjenoj količini GM1, može se pretpostaviti da su GM1 obogaćene splavi nepromijenjene, te da im je integritet očuvan uz pretpostavku da je GM1 najbitniji čimbenik u održavanju strukture splavi. GD1a i GD1b imaju različitu zastupljenost u uzorcima hipokampusa TLR2KO miševa, a njihova količina je povezana sa specifičnim funkcijama proteina. U uzorcima hipokampusa TLR2KO miševa utvrđena je povećana zastupljenost Np55 i Np65 u membranskim frakcijama LR, što prati povećanje asimetrične raspodjele PMCA 2. Kompleksi Np-PMCA su stabilizirani u GM1 splavima i to posebice za Np-PMCA2 (78). Povećana učestalost Np-PMCA2 kompleksa u splavima hipokampusa TLR2KO miševa rezultat je novonastale razlike u sinaptičkom okolišu i potencijalno razlike u E/I ravnoteži. PMCA1 i PMCA4 su ubikvitarne izoforme koje su bitne za održavanje  $Ca^{2+}$  homeostaze kako na neuronima tako i na glijalnim i progenitorskim stanicama. Njihovo premještanje iz područja lipidnih splavi u membranu bogatu fosfolipidima u hipokampusu TLR2KO miševa upućuje da je membrana u kojoj se nalaze potencijalno manje kompleksna od membrane zrelih sinaptičkih lokaliteta u neuronima. Nađena povećana koncentracija GD3 gangliozida u hipokampusu TLR2KO miševa upućuje na postojanje većeg broja progenitorskih stanica ili nediferenciranih staničnih projekcija što može objasniti uočenu promjenu u položaju PMCA1 i 4. Migracija stanica, kao i izrastanje aksona i dendrita te unutarstanična dinamika citoskeleta ovisi o  $Ca^{2+}$  ionima, te bi prisutnost ove dvije izoforme PMCA u frakcijama nLR mogla ukazivati na status izrastanja projekcija. Sumarno, analiza proteina Np i ATPaza tipa P potkrepljuje rezultate masene spektrometrije koja upućuje na postojanje

sinaptičkog disbalansa, promijenjene neuronalne krugove i moguće opetovano formiranje aksona zbog nestabilnosti mijelinskog omotača u hipokampusu TLR2KO miševa.

### **6.3 Promjene sinaptičkog proteoma malog mozga upućuju na promjenu aksonskih projekcija TLR2KO miševa**

Masena spektrometrija sinaptičkog proteoma malog mozga TLR2KO miševa također upućuje na deregulaciju razvojnih procesa neuronalnih populacija i promjene u aksonskom i dendritičkom sadržaju. I u malom mozgu, kao prethodno u hipokampusu, uočena je promjena u metabolizmu citoskeletnih elemenata i mijelinske ovojnice što odražava aksonski metabolizam i integritet. Proteini Actn4, Krt79, CD9, Cend1, Mapt, Mbp, RhoA i Rtn3 vezani su za aksonske projekcije i njihovo izrastanje. Kako su svi od navedenih proteina smanjene zastupljenosti u malom mozgu TLR2KO miševa u odnosu na miševe divljeg tipa nameće se pretpostavka o smanjenom broju aksonskih projekcija. Citoskeletni elementi Actn4, Krt79 i Mapt su osnovne jedinice mikrotubula koji se protežu aksonskim projekcijama. Kako im je količina smanjena u malom mozgu TLR2KO miševa može se zaključiti da je odnos sličan u hipokampusu, odnosno da postoji problem integriteta aksona uzrokovan promjenama u statusu mijelinske ovojnice. Proteini CD9 i Mbp su klasični proteini oligodendrocita uključeni u sintezu mijelinskih ovojnica (185,186). Zaključak koji proizlazi iz snižene zastupljenosti ovih proteina u malom mozgu TLR2KO miševa jest narušen aksonski integritet te je oligodendrocitna linija uvelike zahvaćena nedostatkom TLR2 proteina. Također RhoA i Rtn3 proteini su zaduženi za inhibiciju rasta aksona. Snižena zastupljenosti može generirati signal za opetovanim izrastanjem i stvaranjem novih aksonskih projekcija. Zanimljivo je uočiti da se od rijetkih proteina s povišenom zastupljenošću u malom mozgu TLR2KO miševa pojavljuje podjedinica Grm1 mGluR. mGluR receptori u malom mozgu su pokazani da sudjeluju u stvaranju LTD-a koji potiče sinaptičku eliminaciju (187–189). Očito je postojanje mehanizma koji preko aktivacije mGluR i stvaranja LTD-a potiče eliminaciju viška sinapsi. Utvrđeno je i povišenje ATPaze tipa V koja je zadužena za zakiseljavanje sinaptičkih vezikula. Grm1 i ATPaza tipa V su dio presinaptičkog miljea te moguće imaju ulogu u stvaranju LTD-a. Ostali proteini sa promijenjim izražajem vezani su za energetske metabolizam što je jasna indikacija da su potrebe za ATP-om smanjene, a kako su utvrđene u sinaptičkom okružju možemo zaključiti da je došlo do promjena procesa koji zahtijevaju energiju, poput ATP-om vođene translokacije iona, smanjene signalne transdukcije koja koristi energijom bogate spojeve i

organizacijskih događaja koji su vođeni utroškom ATP-a. Jedna od podjedinica ATP sintaze *Usmg5* (*Atp5md*) je eksprimirana u inzulino-osjetljivim tkivima (190) što nastavno na uočene promjene u inzulinskoj signalizaciji u hipokampusu, također može ukazivati da je tkivo malog mozga pod povećanim utjecajem inzulinske signalizacije te je sam energetska metabolizam prilagođen kako bi odgovarao na njegove podražaje i potrebu za energijom.

#### **6.4 Biokemijske i molekularne promjene neuroplastina i ATPaza tipa P ukazuju na reorganizaciju membranskog okoliša u tkivu malog mozga TLR2KO miševa**

Nastavno na proteomsku analizu i zaključke o promjenama u hipokampusu, u malom mozgu je uočen isti trend promjena za većinu ispitanih proteina. Izražaj neuroplastina i PMCA1 i 2 je snižen dok je izražaj NKA, PMCA4 i TRAF6 povišen u malom mozgu TLR2KO miševa. Promjene u izražaju proteina Np65 ukazuju na smanjenu količinu sinaptičkih lokaliteta u malom mozgu TLR2KO miševa. Manje sinapsi u TLR2KO miševa odgovara i nalazima proteomske analize i nalazu smanjene količine aksonskih projekcija. Osim toga proteini Np55 i Np65 prate po izražaju svoje najučestalije proteinske partnere PMCA1 i PMCA2 što govori o smanjenoj homeostatskoj kao i o sinaptičkoj regulaciji koncentracije  $Ca^{2+}$  u malom mozgu TLR2KO miševa. Od proteina s povećanim izražajem valja prokomentirati NKA. Povećana količina NKA na razini genskog produkta mRNA i proteina ukazuje na povećanu potrebu održavanja ionske homeostaze, staničnog volumena i procesa uključenih u sinaptičku transmisiju. Izražaj  $NKA\alpha 1$  utvrđen metodom *Western blot* upućuje na povećanje broja stanica ili njihove veličine u malom mozgu TLR2KO miševa. Podrobnijim promatranjem razine mRNA s obzirom na povećanje u izražaju astroglijalnih izoformi možemo pretpostaviti blagi porast njihove populacije u malom mozgu TLR2KO miševa u odnosu na ostale stanične linije. S obzirom na sposobnost TLR2 u regulaciji broja progenitorskih stanica moguće je da je jedan njihov dio diferenciran u astrocite što neposredno bilježimo povećanjem NKA specifičnim izoformama. Protein TRAF6 je biljeg astroglijalnih stanica u kojima igra ulogu u interleukinskoj signalizaciji (135,191). Kako je uočeno povećanje izražaja proteina TRAF6, možemo pretpostaviti da je astrocitna populacija povećana u malom mozgu TLR2KO miševa. Također, uočeno imunoobilježavanjem, protein PMCA4 bilježi porast zastupljenosti u malom mozgu TLR2KO miševa što s obzirom na ubikvitarnost same izoforme možemo pripisati astrocitnoj populaciji. Na tkivnim presjecima čini se da je došlo do povećanja izražaja

proteina PMCA4 u malom mozgu TLR2KO miševa, no izraziti intenzitet bojenja dolazi od nespecifično obojanih stanica mikroglije. Kako bi se izbjeglo krivo tumačenje signala, ručno je namještena granica detekcije intenziteta kako bi se izostavio signal mikroglije u analizi. Za ostale promatrane proteine najznačajnije promjene u tkivnoj raspodjeli u malom mozgu TLR2KO miševa primijećene su u području granularnih stanica i to za proteine Np55, NKA i PMCA1, dok je nešto manje zastupljena promjena u dendritičkim projekcijama Purkinjeovih stanica za proteine Np65 i PMCA1. Iz ovoga možemo zaključiti da je u području granularnog sloja malog mozga TLR2KO miševa moguće povećanje populacije astrocita koju detektiramo ubikvitarnim Np55-PMCA1 kompleksom i povećanom količinom NKA, dok je za molekularni sloj u malom mozgu TLR2KO miševa karakteristično smanjenje izražaja proteina Np65 koji ukazuje na gubitak sinapsi, te jednako tako kao partner PMCA1 na promjene u regulaciji dinamike kalcijevih koncentracijskih gradijenata. Zanimljivo je da količina mRNA pNp, Np65 i PMCA2 ne odgovara količini proteinskog produkta u malom mozgu TLR2KO miševa, te premda je riječ o sinaptičkim proteinima i u proteomskoj analizi zabilježena je deregulacija aksonskih projekcija pretpostavljamo kako je povećana potreba neurona za sinaptičkim proteinima, moguće zbog istovremenog odvijanja procesa LTD-a koji će završiti sinaptičkom eliminacijom.

Također utvrđene su promjene u sastavu membrana stanica malog mozga u odsustvu TLR2. U ukupnoj frakciji gangliozida u malom mozgu TLR2KO miševa u odnosu na kontrolne uzorke miševa divljeg tipa uočeno je povećanje kompleksnih gangliozidnih vrsta GT1b i GQ1b, dok je zastupljenost GD1a smanjena. GT1b je interakcijski partner proteina Mag te preko njega inhibira izrastanje aksona (192,193), te je jedan od liganada za receptore TLR2 (149). Njegova povećana količina može služiti kao membranski signal koji onemogućuje rast aksona u malom mozgu što može objasniti smanjenu količinu aksonskih elemenata u proteomu. Kao što je već navedeno GD1a i GT1b su u splavima malog mozga TLR2KO miševa vezani za funkciju proteina te možemo pretpostaviti da je u splavima došlo do promjene u funkcioniranju određenih proteinskih vrsta. Kako je uočena manja zastupljenost Np55, Np65 i PMCA1 i 2 u splavima, zaključujemo da je njihova funkcionalnost u najaktivnijim membranskim regijama malog mozga TLR2KO miševa smanjena. Naime, uslijed manjeg broja sinapsi došlo je do smanjene prisutnosti sinaptičkog kompleksa Np55/65-PMCA2 u aktivnim regijama membrane. Kompleks Np55/65-



PMCA1 također ukazuje na promjene u regulaciji kalcijevog metabolizma iako ukupna aktivnost proteina PMCA ne pokazuje varijacije u malom mozgu TLR2KO miševa u odnosu na kontrolni uzorak miševa divljeg tipa. Specifične funkcije PMCA signalizacije upućuju na manjak aktivnosti ionotropnih glutamatnih receptora koji su najveći izvor  $\text{Ca}^{2+}$  tranzijenata. Globalno gledajući slični mehanizmi koji su doveli do promjena u hipokampusu prisutni su i u malom mozgu, no kako neuronalni milje nije jednak prilagodba pojedine moždane regije dovela je do različitih membranskih fenotipa, zastupljenosti proteina u membrani i membranskim domenama.

### **6.5 Promjene sinaptičkog proteoma moždane kore upućuju na intenzivni metabolizam i povećanje obujma neuronalne populacije TLR2KO miševa**

U literaturi je dostupan podatak o povećanom broju neurona u pojedinim slojevima moždane kore u mišjem modelu s utišanim genom za TLR2, čime se može objasniti veća zastupljenost većine proteina analiziranih u ovom istraživanju usporedbom s kontrolnim tkivom. Veći izražaj proteina energetskeg metabolizma govori o velikoj potrebi energije u moždanoj kori TLR2KO miševa, što se može zaključiti na temelju rezultata izražaja proteina koji se javljaju u stanju gladovanja poput Bdh1 koji prevodi acetoacetat u  $\beta$ -hidroksibutirat čiji nizvodni produkti daju energiju u ciklusu limunske kiseline. Zabilježena je i povećana ekspresija kompleksa I respiracijskog lanca, što može biti posljedica povećanog broja neurona moždane kore TLR2KO miševa, te njihovih ogromnih energetskeg zahtjeva za održavanje i provođenje sinaptičke transmisije većeg intenziteta nego u hipokampusu i malom mozgu. S druge strane, možda se radi o mehanizmu za preživljavanje i održavanje s obzirom na mogućnost da je u ostala dva tkiva inzulinska signalizacija u porastu, što u konačnici može rezultirati manjkom glukoze i alternativnim načinima proizvodnje energije u moždanom tkivu. Također izražaj proteina Mbp ukazuje na prekomjernu količinu aksona u moždanoj kori TLR2KO miševa u usporedbi s kontrolnim uzorkom korteksa miševa divljeg tipa, te se može zaključiti da je u TLR2KO modelu povećana umreženost neurona. Protein Gap43 pokazatelj je stimulacije izrastanja neuronalnih projekcija (194) što navodi na zaključak da je u tkivu moždane kore TLR2KO miševa aktivno izrastanje projekcija neurona i potencijalno povećan intenzitet stvaranja sinapsi. Povećana količina proteina Gng7 u moždanoj kori TLR2KO miševa čija je lokalizacija isključivo u aksonima i sinapsama podupire ovaj nalaz. Septin5 je različito zastupljen u moždanoj kori TLR2KO miševa u usporedbi s hipokampusom TLR2KO

miševa što upućuje da je vezikularni transport i sama transmisija povećanog obujma u moždanoj kori TLR2KO miševa. Ovi podatci potvrđuju nalaze predstavljene u literaturi.

## **6.6 Biokemijske i molekularne promjene neuroplastina i ATPaza tipa P ukazuju na promjene u dinamici membranskog okoliša u tkivu moždane kore TLR2KO miševa**

Za razliku od malog mozga i hipokampusa u moždanoj kori pojedini analizirani biljezi pokazuju povećanu zastupljenost na razini proteina. Povećan sadržaj proteina Np65 u moždanoj kori TLR2KO miševa upućuje na povećanje sinaptičkih lokaliteta na što ukazuje i povećan izražaj proteina PMCA2. Ovi nalazi potvrđuju saznanja o povećanoj neuronalnoj populaciji u moždanoj kori TLR2KO miševa. Također, količina proteina NKA ide u prilog istom zaključku, jer zahtjevi za održavanjem homeostaze postaju mnogo veći za više stanica u populaciji. Međutim, aktivnost NKA snižena je u moždanoj kori TLR2KO miševa u odnosu na kontrolni uzorak korteksa miševa divljeg tipa, što može biti razlog promjena u sastavu membrana. Protein PMCA4 kao ubikvitarna izoforma koja je izražena na stanicama ne-neuronalne populacije ukazuje na smanjen broj glijalnih stanica u moždanoj kori TLR2KO miševa, zbog diferencijacije progenitorskih stanica u korist neuronalne populacije. Genski izražaj Np65 pokazuje povećano prepisivanje i potražnju neuronalnih stanica u moždanoj kori TLR2KO miševa što govori o velikoj potrebi u sinaptičkom miljeu. Np55 je sniženog izražaja što rezultira manjom pojavnošću ubikvitarne izoforme koja je zastupljena najvećim dijelom na glijalnim stanicama za koje se pretpostavlja da imaju manju zastupljenost. PMCA izoforme u moždanoj kori TLR2KO miševa imaju različit izražaj mRNA u odnosu na proteinski produkt. Povećanje u prepisivanju PMCA4 i sniženje prepisivanja PMCA2 u moždanoj kori TLR2KO miševa može biti rezultat povratne sprege. Ostali analizirani proteini u moždanoj kori TLR2KO miševa ne pokazuju različit izražaj od kontrolnih uzoraka korteksa miševa divljeg tipa.

Što se tiče membranskog okoliša, u dodatku je prikazana analiza ganglioizidnih vrsta u moždanoj kori TLR2KO miševa koja je istovjetna u odnosu na kontrolne uzorke korteksa miševa divljeg tipa, te se može zaključiti da u TLRKO modelu nema prevelikih promjena u ganglioizidnom i lipidnom okolišu. Proteini Np65, NKA, PMCA2 i 3 pokazuju veću zastupljenost u domenama lipidnih splavi u moždanoj kori TLR2KO miševa sugerirajući da je nastupila reorganizacija ponajviše u sinaptičkim i neuronalnim membranama o čemu

govori promjena pozicije proteina Np65 i PMCA 2 i 3. Ovaj rezultat ukazuje na povećan broj kontaktnih mjesta između neurona i na povećanje umreženosti u regiji moždane kore TLR2KO miševa.

Skupno, razlike uočene u hipokampusu TLR2KO miševa sugeriraju da niz događaja tijekom razvitka moždane kore smanjuje migraciju progenitorskih stanica u područje hipokampalne formacije, što objašnjava promjenu u staničnom volumenu hipokampusa. Osim toga, promjene uočene u hipokampusu i malom mozgu TLR2KO miševa sugeriraju na promijenjen fenotip neurona, te da manjak dugih aksonskih projekcija može ukazivati na povećanu interneuronalnu umreženost ove dvije regije. Opisane promjene u moždanoj kori TLR2KO miševa potkrepljuju već opisane nalaze u literaturi. Zaključno, u mišjem modelu s nedostatkom TLR2 nađene su značajne razlike na razini sinaptoproteomske, transkriptomске i proteinske analize koje ukazuju na dosad nedovoljno opisane uloge TLR2 u mozgu. Rezultati rada potvrdili su hipotezu o očekivanom utjecaju nedostatka transmembranskog receptora TLR2 u moždanom tkivu posebice na proteinske sustave uključene u neuroplastičnost i membranski prijenos iona. Također, rad je otvorio posve nova istraživačka pitanja na koja vrijedi odgovoriti u svrhu rasvjetljavanja funkcija TLR2 u moždanom tkivu sisavaca. Predloženi novi smjerovi istraživanja trebali bi obuhvatiti: a) sustavno utvrđivanje specifičnosti citoarhitektonskog i prostorno-vremenskog izražaja TLR2 u mozgu; b) dokazivanje utjecaja TLR2 na održavanje ionske homeostaze primjenom elektrofizioloških metoda i praćenja transporta kalcijevih iona; c) detaljnu analizu bihevioralnih karakteristika mišjeg modela TLR2KO; d) istraživanje utjecaja spola na razvojnu i funkcionalnu ekspresiju TLR2 u mozgu zdravih jedinki, kao i vjerojatne spolno-vezane razlike u promjenama proteinskih sustava uzrokovanih nedostatkom TLR2, opaženima i analiziranim u ovome radu.

## 7. ZAKLJUČCI

Istraživanjem je potvrđena hipoteza da nedostatak proteina TLR2 utječe na izraženost neuroplastina i ATPaza tipa P kao i na promjene u sastavu membrane i submembranskom smještaju navedenih proteina. Stoga su zaključci istraživanja sljedeći:

I. U sinaptičkom proteomu hipokampusa i malog mozga životinja s ugašenim genom za TLR2 nađene su promjene u zastupljenosti proteina koje upućuju na deregulaciju aksona, mijelinske ovojnice i aksonskih završetaka, promjene u glutamatergičkoj i GABAergičkoj transmisiji te varijacije u energetske metabolizmu.

II. Izraženost proteina neuroplastina i ATPaza tipa P je smanjena u mozgu miševa s ugašenim genom za TLR2 u odnosu na miševe divljeg tipa što potkrepljuje nalaze sinapto-proteomske analize masenom spektrometrijom, i vjerojatno je povezana s manjim brojem sinapsi unutar analiziranih regija.

III. Smanjeni tkivni izražaj neuroplastina i PMCA u mišjem modelu TLR2KO upućuje na promjene u regulaciji kalcijevog metabolizma i zastupljenosti sinaptičkih struktura u svim ispitanim regijama hipokampalne formacije i malog mozga.

IV. Razlike u zastupljenosti pojedinih gangliozidnih vrsta u hipokampusu i malom mozgu miševa TLR2KO ukazuju na varijacije sastava membranskog okoliša. Povećanje udjela frakcija jednostavnih gangliozida u hipokampusu životinja s ugašenim genom za TLR2 ukazuje na vjerojatnu aktivaciju proliferativnih procesa u tkivu hipokampusa, dok povećanje udjela kompleksnih vrsta u tkivu malog mozga može biti povezano s poremećenim transportom kalcijevih iona.

V. Povećana zastupljenost neuroplastina u lipidnim splavima hipokampusa životinja s ugašenim genom za TLR2 upućuje na promjene u sinaptičkom okolišu, dok smještaj ATPaza tipa P u manje kompleksne lipidne domene (ne-splavi) podupire nalaze o utjecaju nedostatka TLR2 na citoarhitektoniku. U nedostatku TLR2, smanjena zastupljenost proteina od interesa u regijama lipidnih splavi u malom mozgu upućuje na smanjenje količinu sinaptičkih lokaliteta.

## 8. SAŽETAK

Dosadašnja istraživanja pokazala su da receptor sličan Toll-u 2 (TLR2) u mozgu sisavaca sudjeluje u neuroinflamaciji dok tijekom razvoja utječe na proliferacijski i diferencijacijski status progenitorskih stanica. Cilj ovog rada je bio utvrditi utjecaj nedostatka TLR2 na izražaj proteina uključenih u sinaptičku plastičnost (neuroplastin) i membranski prijenos iona (ATPaze tipa P) u mišjem mozgu. Provedena je analiza sinaptičkog proteoma, genske i proteinske ekspresije navedenih proteina, njihovog tkivnog i membranskog smještaja, utvrđen je gangliozidom i određena katalitička aktivnost ATPaza u uzorcima moždane kore, hipokampusa i malog mozga mišjeg modela s nedostatkom TLR2 u usporedbi s kontrolnim tkivom. Rezultati su pokazali da je nedostatak TLR2 u mišjem mozgu povezan s: a) značajnim promjenama sinaptičkog proteoma, posebice zastupljenosti proteina nužnih za regulaciju aksonskih projekcija i mijelinizacije, glutamatergičke transmisije i energetskog metabolizma; b) manjim izražajem neuroplastina u hipokampusu i malom mozgu što vjerojatno ukazuje na smanjenje broja sinapsi, dok utvrđena količina ATPaza tipa P upućuje na manji broj sinapsi hipokampusa i povećani broj astrocita u malom mozgu; c) većim izražajem i katalitičkom aktivnošću membranske kalcijeve ATPaze u hipokampusu, što govori u prilog poremećenog transporta kalcijevih iona; d) većim udjelom jednostavnog gangliozida GD3 u hipokampusu te većim udjelom složenih gangliozida GT1b i GQ1b u malom mozgu, što može odražavati promjenu membranske homeostaze i poremećene specifične membranske procese poput proliferacije i ionskog transporta. Zaključno, u ovom radu je dokazano da nedostatak TLR2 u mišjem mozgu utječe na izražaj i funkciju membranskih sustava neophodnih za sinaptičku plastičnost i ionski transport, što predstavlja temelj za daljnje istraživanje novih uloga TLR2 u moždanom tkivu sisavaca.

## 9. ABSTRACT

### **Influence of Toll-like receptor 2 deficiency on neuroplastin and ATPases expression in mouse brain, 2023.**

Mario Stojanović, Ms Mol.Biol.

Previous studies have shown that roles of Toll-like receptor 2 (TLR2) in mammalian brain encompass its involvement in neuroinflammation and neurodevelopmental processes such as proliferation and differentiation of neuronal progenitor cells. The aim of this study was to determine whether lack of TLR2 influences on the expression of proteins which participate in synaptic plasticity (neuroplastin) and membrane ion transport (P-type ATPases) in mouse brain. The variations of the synaptic proteome, gene and protein expression of neuroplastin and P-type ATPases as well as their tissue and membrane localization, ATPases catalytic activity, and gangliosidome were analyzed in the tissue samples of cortex, hippocampus, and cerebellum derived from mouse model lacking TLR2 in comparison to control tissue. Results demonstrate that the lack of TLR2 is associated with: a) adjustments in the synaptic proteome related markedly to protein systems involved in regulation of axon projections and myelinization, glutamatergic transmission, and energy metabolism; b) lower expression of neuroplastin in the hippocampus and cerebellum indicating potential loss of synapses, while detected variable content of P-type ATPases may suggest reduced number of synapses in the hippocampus and increased number of astrocytes in the cerebellum; c) higher expression and increased catalytic activity of plasma membrane calcium ATPase in hippocampus arguing for deranged calcium transport; d) increased ratio of simple ganglioside specie GD3 in the hippocampus and complex gangliosides GT1b and GQ1b in the cerebellum which may reflect alteration of membrane homeostasis and specific membrane functions such as proliferation and ion transport. In conclusion, presented findings reveal that the lack of TLR2 in mouse brain effects on the expression and function of membrane systems essential for synaptic plasticity and ion transport, opening new avenues for investigation of yet undescribed roles of TLR2 in the mammalian brain.

## 10. LITERATURA

1. 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.
2. Yu RK, Macala LJ, Taki T, Weinfeld HM, Yu FS. Developmental Changes in Ganglioside Composition and Synthesis in Embryonic Rat Brain. *J Neurochem.* 1988;50(6):1825–9.
3. Sonnino S, Chiricozzi E, Grassi S, Mauri L, Prioni S, Prinetti A. Gangliosides in Membrane Organization. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2018;156:83–120.
4. Krishnan GP, González OC, Bazhenov M. Origin of slow spontaneous resting-state neuronal fluctuations in brain networks. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 2018;115(26):6858–63. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1715841115>
5. Sigrid A. Langhans, Olga Vagin, Laura Andrea Dada. P-Type Atpases in Health and Disease. *Frontiers media.* 2019. 264 p.
6. Purves D. *Neuroscience*, 6. izd. Oxford; Oxford University Press; 2018. 31–169 p.
7. Ingólfsson HI, Carpenter TS, Bhatia H, Bremer PT, Marrink SJ, Lightstone FC. Computational Lipidomics of the Neuronal Plasma Membrane. *Biophys J.* 2017;113(10):2271–80.
8. Lorent JH, Levental KR, Ganesan L, Rivera-Longworth G, Sezgin E, Doktorova MD, Lyman E LI. Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape. *Nat Chem Biol [Internet].* 2020; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41589-020-0529-6>
9. Casares D, Escribá P V., Rosselló CA. Membrane lipid composition: Effect on membrane and organelle structure, function and compartmentalization and therapeutic avenues. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9).
10. Gu RX, Ingólfsson HI, De Vries AH, Marrink SJ, Tieleman DP. Ganglioside-Lipid and Ganglioside-Protein Interactions Revealed by Coarse-Grained and Atomistic Molecular Dynamics Simulations. *J Phys Chem B.* 2017;121(15):3262–75.

11. Hannich JT, Umebayashi K, Riezman H. Distribution and functions of sterols. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3:47–62.
12. Frolov VA, Shnyrova A V., Zimmerberg J. Lipid polymorphisms and membrane shape. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(11).
13. Kaltenegger M, Kremser J, Frewein MPK, Zihlerl P, Bonthuis DJ, Pabst G. Intrinsic lipid curvatures of mammalian plasma membrane outer leaflet lipids and ceramides. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2021;1863(11).
14. Pfrieger FW. Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2003;1610(2):271–80.
15. Ickenstein LM, Arfvidsson MC, Needham D, Mayer LD, Edwards K. Disc formation in cholesterol-free liposomes during phase transition. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2003;1614(2):135–8.
16. Mouritsen OG, Jørgensen K. Dynamical order and disorder in lipid bilayers. *Chem Phys Lipids.* 1994;73(1–2):3–25.
17. Das A, Brown MS, Anderson DD, Goldstein JL, Radhakrishnan A. Three pools of plasma membrane cholesterol and their relation to cholesterol homeostasis. *Elife.* 2014;2014(3):1–16.
18. Doktorova M, Symons JL, Levental I. Structural and functional consequences of reversible lipid asymmetry in living membranes. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2020;16(12):1321–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41589-020-00688-0>
19. Swamy MJ, Ciani L, Ge M, Smith AK, Holowka D, Baird B, i sur. Coexisting domains in the plasma membranes of live cells characterized by spin-label ESR spectroscopy. *Biophys J* [Internet]. 2006;90(12):4452–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.105.070839>
20. Tamba Y, Tanaka T, Yahagi T, Yamashita Y, Yamazaki M. Stability of giant unilamellar vesicles and large unilamellar vesicles of liquid-ordered phase membranes in the presence of Triton X-100. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2004;1667(1):1–6.
21. Pinigin K V., Kondrashov O V., Jiménez-Munguía I, Alexandrova V V., Batishchev O V., Galimzyanov TR, i sur. Elastic deformations mediate interaction of the raft boundary



- with membrane inclusions leading to their effective lateral sorting. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–18.
22. Cornell CE, Mileant A, Thakkar N, Lee KK, Keller SL. Direct imaging of liquid domains in membranes by cryo-electron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(33):19713–9.
  23. Aureli M, Grassi S, Sonnino S, Prinetti A. Isolation and Analysis of Detergent-Resistant Membrane Fractions. In: Platre MP, Jaillais Y, editors. *Methods in Molecular Biology*. 2016. p. 11–22.
  24. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* (80). 2010;327(5961):46–50.
  25. Bieberich E. Sphingolipids and lipid rafts: Novel concepts and methods of analysis. *Chem Phys Lipids* [Internet]. 2018;216:114–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.08.003>
  26. Westerlund B, Slotte JP. How the molecular features of glycosphingolipids affect domain formation in fluid membranes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2009;1788(1):194–201. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.11.010>
  27. Lee IH, Imanaka MY, Modahl EH, Torres-Ocampo AP. Lipid Raft Phase Modulation by Membrane-Anchored Proteins with Inherent Phase Separation Properties. *ACS Omega*. 2019;4(4):6551–9.
  28. Manna M, Javanainen M, Monne HMS, Gabius HJ, Rog T, Vattulainen I. Long-chain GM1 gangliosides alter transmembrane domain registration through interdigitation. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2017;1859(5):870–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.01.033>
  29. Sandhoff R, Schulze H, Sandhoff K. Ganglioside Metabolism in Health and Disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2018;156:1–62.
  30. Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology*. 2007;17(1):1–13.
  31. Posse de Chaves E, Sipione S. Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction. *FEBS Lett* [Internet]. 2010;584(9):1748–59.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.010>

32. Azzaz F, Yahi N, Di Scala C, Chahinian H, Fantini J. Ganglioside binding domains in proteins: Physiological and pathological mechanisms. In: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 2022. p. 289–324.
33. Prinetti A, Loberto N, Chigorno V, Sonnino S. Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2009;1788(1):184–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.09.001>
34. Di Biase E, Lunghi G, Fazzari M, Maggioni M, Pomè DY, Valsecchi M, et al. Gangliosides in the differentiation process of primary neurons: the specific role of GM1-oligosaccharide. *Glycoconj J*. 2020;37(3):329–43.
35. Cantu' L, Corti M, Brocca P, Del Favero E. Structural aspects of ganglioside-containing membranes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2009;1788(1):202–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.11.003>
36. Joly E. Hypothesis: Could the signalling function of membrane microdomains involve a localized transition of lipids from liquid to solid state? *BMC Cell Biol*. 2004;5:1–6.
37. Rahmann H. Brain gangliosides and memory formation. *Behav Brain Res*. 1995;66(1–2):105–16.
38. Südhof TC. The cell biology of synapse formation. *J Cell Biol*. 2021;220(7):1–18.
39. Südhof TC. Towards an Understanding of Synapse Formation. *Neuron*. 2018;100(2):276–93.
40. Schafer DP, Lehrman EK, Stevens B. The “quad-partite” synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia*. 2013;61(1):24–36.
41. Zhang X, Lin PY, Liakath-Ali K, Südhof TC. Teneurins assemble into presynaptic nanoclusters that promote synapse formation via postsynaptic non-teneurin ligands. *Nat Commun*. 2022;13(1).
42. Sando R, Südhof TC. Latrophilin gpcr signaling mediates synapse formation. *Elife*. 2021;10:1–22.
43. Jiang X, Sando R, Südhof TC. Multiple signaling pathways are essential for synapse formation induced by synaptic adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

- 2021;118(3).
44. Allen JA, Halverson-Tamboli RA, Rasenick MM. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(2):128–40.
  45. Braet K, Cabooter L, Paemeleire K, Leybaert L. Calcium signal communication in the central nervous system. *Biol Cell*. 2004;96(1):79–91.
  46. Choquet D, Triller A. The dynamic synapse. *Neuron* [Internet]. 2013;80(3):691–703. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.013>
  47. Jones EG. Gabaergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. *Cereb Cortex*. 1993;3(5):361–72.
  48. Micheva KD, Busse B, Weiler NC, O'Rourke N, Smith SJ. Single-synapse analysis of a diverse synapse population: Proteomic imaging methods and markers. *Neuron* [Internet]. 2010;68(4):639–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.024>
  49. Kawamoto EM, Vivar C, Camandola S. Physiology and pathology of calcium signaling in the brain. *Front Pharmacol*. 2012;3 APR(April):1–17.
  50. Neniskyte U, Gross CT. Errant gardeners: Glial-cell-dependent synaptic pruning and neurodevelopmental disorders. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2017;18(11):658–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2017.110>
  51. Vemula SK, Rama R, Hradsky J, Matute RA. TRAF6 controls excitatory spinogenesis and excitation-inhibition balance through binding neuroplastin. *bioRxiv Cell Biol* [Internet]. 2019;1–39. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/768341v1.abstract>
  52. Beesley PW, Herrera-Molina R, Smalla KH, Seidenbecher C. The Neuroplastin adhesion molecules: Key regulators of neuronal plasticity and synaptic function. *J Neurochem*. 2014;131(3):268–83.
  53. Owczarek S, Berezin V. Neuroplastin: Cell adhesion molecule and signaling receptor. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2012;44(1):1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.006>
  54. Willmott T, Skitsa I, Hill I, Mummery R, Beesley PW. Molecular Characterisation and

- Structural Relationship of the Synapse-Enriched Glycoproteins gp65 and gp55. *J Neurochem.* 1992;58(6):2037–43.
55. Langnaese K, Mummery R, Gundelfinger ED, Beesley PW. Immunoglobulin superfamily members gp65 and gp55: Tissue distribution of glycoforms. *FEBS Lett.* 1998;429(3):284–8.
  56. Buckby LE, Mummery R, Crompton MR, Beesley PW, Empson RM. Comparison of neuroplastin and synaptic marker protein expression in acute and cultured organotypic hippocampal slices from rat. *Dev Brain Res.* 2004;150(1):1–7.
  57. Owczarek S, Soroka V, Kiryushko D, Hald Larsen M, Yuan Q, Sandi C, i sur. Neuroplastin-65 and a mimetic peptide derived from its homophilic binding site modulate neuritogenesis and neuronal plasticity. *J Neurochem* [Internet]. 2011;117:984–94. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1471-4159.2011.07269.x>
  58. Schmidt N, Kollwe A, Constantin CE, Henrich S, Ritzau-Jost A, Bildl W, i sur. Neuroplastin and Basigin Are Essential Auxiliary Subunits of Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPases and Key Regulators of Ca<sup>2+</sup> Clearance. *Neuron* [Internet]. 2017;96(4):827-838.e9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.038>
  59. Go CK, Soboloff J. Hold the door: hPMCA1/neuroplastin interactions regulate Ca<sup>2+</sup>-binding site accessibility. *Cell Calcium.* 2018;(October).
  60. Gong D, Chi X, Ren K, Huang G, Zhou G, Yan N, i sur. Structure of the human plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase 1 in complex with its obligatory subunit neuroplastin. *Nat Commun* [Internet]. 2018;9(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-06075-7>
  61. Wilson MC, Kraus M, Marzban H, Sarna JR, Wang Y, Hawkes R, i sur. The neuroplastin adhesion molecules are accessory proteins that chaperone the monocarboxylate transporter MCT2 to the neuronal cell surface. *PLoS One.* 2013;8(11).
  62. Owczarek S, Kiryushko D, Larsen MH, Kastrup JS, Gajhede M, Sandi C, i sur. Neuroplastin-55 binds to and signals through the fibroblast growth factor receptor. *FASEB J.* 2010;24(4):1139–50.
  63. Empson RM, Buckby LE, Kraus M, Bates KJ, Crompton MR, Gundelfinger ED, i sur.

- The cell adhesion molecule neuroplastin-65 inhibits hippocampal long-term potentiation via a mitogen-activated protein kinase p38-dependent reduction in surface expression of GluR1-containing glutamate receptors. *J Neurochem.* 2006;99(3):850–60.
64. Smalla KH, Matthies H, Langnäse K, Shabir S, Böckers TM, Wyneken U, i sur. The synaptic glycoprotein neuroplastin is involved in long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(8):4327–32.
  65. Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, i sur. MAPKK-independent activation of p38 $\alpha$  mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38 $\alpha$ . *Science* (80- ). 2002;295(5558):1291–4.
  66. Cowan KJ, Storey KB. Mitogen-activated protein kinases: New signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol.* 2003;206(7):1107–15.
  67. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J.* 2010;429(3):403–17.
  68. Vemula SK. Neuroplastin-dependent signaling in neurons. 2018;
  69. Sarto-Jackson I, Milenkovic I, Smalla KH, Gundelfinger ED, Kaehne T, Herrera-Molina R, i sur. The cell adhesion molecule neuroplastin-65 is a novel interaction partner of  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem.* 2012;287(17):14201–14.
  70. Herrera-Molin R, Sarto-Jackson I, Montenegro-Venegas C, Heine M, Smalla KH, Seidenbecher CI, i sur. Structure of excitatory synapses and GABA $\alpha$  receptor localization at inhibitory synapses are regulated by neuroplastin-65. *J Biol Chem.* 2014;289(13):8973–88.
  71. Bhattacharya S, Herrera-Molina R, Sabanov V, Ahmed T, Iscru E, Stöber F, i sur. Genetically Induced Retrograde Amnesia of Associative Memories After Neuroplastin Ablation. *Biol Psychiatry.* 2017;81(2):124–35.
  72. Li H, Liu Y, Gao X, Liu L, Amuti S, Wu D, i sur. Neuroplastin 65 modulates anxiety- and depression-like behavior likely through adult hippocampal neurogenesis and central 5-HT activity. *FEBS J.* 2019;1–15.
  73. Malci A, Lin X, Sandoval R, Gundelfinger ED, Naumann M, Seidenbecher CI, i sur. Ca<sup>2+</sup> signaling in postsynaptic neurons: Neuroplastin-65 regulates the interplay

- between plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPases and ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium* [Internet]. 2022;106(July):102623. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2022.102623>
74. Hu Y, Zhan Q, Zhang H, Liu X, Huang L, Li H, i sur. Increased susceptibility to ischemic brain injury in neuroplastin 65-deficient mice likely via glutamate excitotoxicity. *Front Cell Neurosci*. 2017;11(April):1–9.
  75. Zeng WZ, Grillet N, Dewey JB, Trouillet A, Krey JF, Barr-Gillespie PG, i sur. Neuroplastin isoform Np55 is expressed in the stereocilia of outer hair cells and required for normal outer hair cell function. *J Neurosci*. 2016;36(35):9201–16.
  76. Ilic K, Mlinac-Jerkovic K, Sedmak G, Rosenzweig I, Kalanj-Bognar S. Neuroplastin in human cognition: review of literature and future perspectives. *Transl Psychiatry* [Internet]. 2021;11(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-021-01509-1>
  77. Mlinac K, Jovanov Milošević N, Heffer M, Smalla KH, Schnaar RL, Kalanj Bognar S. Neuroplastin expression in the hippocampus of mice lacking complex gangliosides. *J Mol Neurosci*. 2012;48(1):161–6.
  78. Ilic K, Lin X, Malci A, Stojanović M, Puljko B, Rožman M, i sur. Plasma membrane calcium ATPase-neuroplastin complexes are selectively stabilized in GM1-containing lipid rafts. *Int J Mol Sci*. 2021;22(24).
  79. Chan H, Babayan V, Blyumin E, Gandhi C, Hak K, Harake D, i sur. The P-Type ATPase superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2010;19(1–2):5–104.
  80. Lutsenko S, Kaplan JH. P-type ATPases. *Trends Biochem Sci*. 1996;21(12):467.
  81. Kaplan JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem*. 2002;71(1):511–35.
  82. Dyla M, Kjærgaard M, Poulsen H, Nissen P. Structure and Mechanism of P-Type ATPase Ion Pumps. *Annu Rev Biochem*. 2020;89:583–603.
  83. Cortes VF, Ribeiro IM, Barrabin H, Alves-Ferreira M, Fontes CFL. Regulatory phosphorylation of FXYD2 by PKC and cross interactions between FXYD2, plasmalemmal Ca-ATPase and Na,K-ATPase. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2011;505(1):75–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.017>

84. Shrivastava AN, Triller A, Melki R. Cell biology and dynamics of Neuronal Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in health and diseases. *Neuropharmacology*. 2020;169.
85. Stahl WL. The Na,K-ATPase of nervous tissue. *Neurochem Int*. 1986;8(4):449–76.
86. Skou JC, Esmann M. The Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr*. 1992;24(3):249–61.
87. Teriete P, Thai K, Choi J, Marassi FM. Effects of PKA phosphorylation on the conformation of the Na,K-ATPase regulatory protein FXYD1. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2009;1788(11):2462–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.09.001>
88. Theos AC, Martina A, Hurbain I, Peden AA, Sviderskaya E V, Stewart A, i sur. Binding of Src to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Forms a Functional Signaling Complex. *Mol Biol Cell*. 2006;17(January):317–26.
89. Bagrov AY, Shapiro JI, Fedorova O V. Endogenous Cardiotonic Steroids: Physiology, Pharmacology, and Novel Therapeutic Targets. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2009;61(1):9–38. Available from: <http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/pr.108.000711>
90. Wang H, Haas M, Liang M, Cai T, Tian J, Li S, i sur. Ouabain Assembles Signaling Cascades through the Caveolar Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem*. 2004;279(17):17250–9.
91. Nie L, Ye W-R, Chen S, Chirchiglia D, Wang M. Src Family Kinases in the Central Nervous System: Their Emerging Role in Pathophysiology of Migraine and Neuropathic Pain. *Curr Neuropharmacol*. 2020;19(5):665–78.
92. Kinoshita PF, Leite JA, Orellana AMM, Vasconcelos AR, Quintas LEM, Kawamoto EM, i sur. The influence of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase on glutamate signaling in neurodegenerative diseases and senescence. *Front Physiol*. 2016;7(JUN):1–19.
93. Hernandez-R J, Vizi ES, Oberfrank F, Phillis JW. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Regulation by neurotransmitters. *Neurochem Int*. 1992;20(1).
94. Munhoz CD, Kawamoto EM, de Sá Lima L, Lepsch LB, Glezer I, Marcourakis T, i sur. Glutamate modulates sodium-potassium-ATPase through cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in rat striatum. *Cell Biochem Funct* [Internet]. 2005 Mar;23(2):115–23. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbf.1217>

95. Kawamoto EM, Lima LS, Munhoz CD, Yshii LM, Kinoshita PF, Amara FG, i sur. Influence of N-methyl-D-aspartate receptors on ouabain activation of nuclear factor- $\kappa$ B in the rat hippocampus. *J Neurosci Res* [Internet]. 2012 Jan;90(1):213–28. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jnr.22745>
96. Zhang D, Hou Q, Wang M, Lin A, Jarzylo L, Navis A, i sur. Na,K-ATPase Activity Regulates AMPA Receptor Turnover through Proteasome-Mediated Proteolysis. *J Neurosci* [Internet]. 2009 Apr 8;29(14):4498–511. Available from: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.6094-08.2009>
97. Marcaida G, Kosenko E, Miñana M-D, Grisolia S, Felipe V. Glutamate Induces a Calcineurin-Mediated Dephosphorylation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase that Results in Its Activation in Cerebellar Neurons in Culture. *J Neurochem* [Internet]. 2002 Nov 19;66(1):99–104. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-4159.1996.66010099.x>
98. de Sá Lima L, Kawamoto EM, Munhoz CD, Kinoshita PF, Orellana AMM, Curi R, i sur. Ouabain activates NF $\kappa$ B through an NMDA signaling pathway in cultured cerebellar cells. *Neuropharmacology* [Internet]. 2013 Oct;73:327–36. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390813002669>
99. Zhang L-N, Sun Y-J, Wang L-X, Gao Z-B. Glutamate Transporters/Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Involving in the Neuroprotective Effect as a Potential Regulatory Target of Glutamate Uptake. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2016 Mar 14;53(2):1124–31. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-014-9071-4>
100. Post RL, Klodos I. Interpretation of extraordinary kinetics of Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-ATPase by a phase change. *Am J Physiol*. 1996;271(5 Pt 1):C1415–23.
101. Esmann M, Marsh D. Lipid-protein interactions with the Na,K-ATPase. *Chem Phys Lipids*. 2006;141(1–2):94–104.
102. Nguyen K, Garcia A, Sani MA, Diaz D, Dubey V, Clayton D, i sur. Interaction of N-terminal peptide analogues of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase with membranes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2018;1860(6):1282–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.03.002>
103. Cornelius F, Habeck M, Kanai R, Toyoshima C, Karlisch SJD. General and specific lipid-



- protein interactions in Na,K-ATPase. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2015;1848(9):1729–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.012>
104. Habeck M, Haviv H, Katz A, Kapri-Pardes E, Ayciriex S, Shevchenko A, i sur. Stimulation, inhibition, or stabilization of Na,K-ATPase caused by specific lipid interactions at distinct sites. *J Biol Chem*. 2015;290(8):4829–42.
  105. Puljko B, Stojanović M, Ilic K, Kalanj-Bognar S, Mlinac-Jerkovic K. Start Me Up: How Can Surrounding Gangliosides Affect Sodium-Potassium ATPase Activity and Steer towards Pathological Ion Imbalance in Neurons? *Biomedicines*. 2022;10(7).
  106. Leon A, Facci L, Toffano G, Sonnino S, Tettamanti G. Activation of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase by Nanomolar Concentrations of GM1 Ganglioside. *J Neurochem*. 1981;37(2):350–7.
  107. Puljko B, Stojanović M, Ilic K, Maček Hrvat N, Zovko A, Damjanović V, i sur. Redistribution of gangliosides accompanies thermally induced Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity alternation and submembrane localisation in mouse brain. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2021;1863(1):183475.
  108. Procedures E, Liang M, Tian J, Liu L, Pierre S, Liu J, i sur. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase. *J Biol Chem*. 2007;282(14):10585–93.
  109. DeCoster MA. Calcium dynamics in the central nervous system. *Adv Neuroimmunol*. 1995;5(3):233–9.
  110. Clapham DE. Calcium Signaling. *Cell*. 2007;131(6):1047–58.
  111. Hajieva P, Baeken MW, Moosmann B. The role of Plasma Membrane Calcium ATPases (PMCAs) in neurodegenerative disorders. *Neurosci Lett* [Internet]. 2018;663(September 2017):29–38. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.09.033>
  112. Zaidi A, Adewale M, McLean L, Ramlow P. The plasma membrane calcium pumps—The old and the new. *Neurosci Lett* [Internet]. 2018;663(September 2017):12–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.09.066>
  113. Lopreiato R, Giacomello M, Carafoli E. The plasma membrane calcium pump: New ways to look at an old enzyme. *J Biol Chem* [Internet]. 2014;289(15):10261–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.O114.555565>

114. Strehler EE, Zacharias DA. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev.* 2001;81(1):21–50.
115. Strehler EE. Plasma membrane calcium ATPases: From generic Ca<sup>2+</sup> sump pumps to versatile systems for fine-tuning cellular Ca<sup>2+</sup>. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2015;460(1):26–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.121>
116. Burette AC, Strehler EE, Weinberg RJ. A plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase isoform at the postsynaptic density. *Neuroscience* [Internet]. 2010;169(3):987–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.05.062>
117. Boczek T, Radzik T, Ferenc B, Zylinska L. The puzzling role of neuron-specific PMCA isoforms in the aging process. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24).
118. Conrard L, Tyteca D. Regulation of membrane calcium transport proteins by the surrounding lipid environment. Vol. 9, *Biomolecules.* 2019.
119. Girard F, Venail J, Schwaller B, Celio MR. The EF-hand Ca<sup>2+</sup>-binding protein superfamily: A genome-wide analysis of gene expression patterns in the adult mouse brain. *Neuroscience* [Internet]. 2015;294:116–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.018>
120. Sepúlveda MR, Berrocal-Carrillo M, Gasset M, Mata AM. The plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform 4 is localized in lipid rafts of cerebellum synaptic plasma membranes. *J Biol Chem.* 2006;281(1):447–53.
121. Jensen TP, Filoteo AG, Knopfel T, Empson RM. Presynaptic plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase isoform 2a regulates excitatory synaptic transmission in rat hippocampal CA3. *J Physiol.* 2007;579(1):85–99.
122. Sgambato-Faure V, Xiong Y, Berke JD, Hyman SE, Strehler EE. The Homer-1 protein Ania-3 interacts with the plasma membrane calcium pump. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;343(2):630–7.
123. Garside ML, Turner PR, Austen B, Strehler EE, Beesley PW, Empson RM. Molecular interactions of the plasma membrane calcium ATPase 2 at pre- and post-synaptic sites in rat cerebellum. *Neuroscience* [Internet]. 2009;162(2):383–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.04.059>

124. Marques-da-Silva D, Gutierrez-Merino C. Caveolin-rich lipid rafts of the plasma membrane of mature cerebellar granule neurons are microcompartments for calcium/reactive oxygen and nitrogen species cross-talk signaling. *Cell Calcium* [Internet]. 2014;56(2):108–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2014.06.002>
125. Krick N, Ryglewski S, Pichler A, Bikbaev A, Götz T, Kobler O, i sur. Separation of presynaptic Cav2 and Cav1 channel function in synaptic vesicle exo- And endocytosis by the membrane anchored Ca<sup>2+</sup> pump PMCA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(28).
126. Fakira AK, Gaspers LD, Thomas AP, Li H, Jain MR, Elkabes S. Purkinje cell dysfunction and delayed death in plasma membrane calcium ATPase 2-heterozygous mice. *Mol Cell Neurosci* [Internet]. 2012;51(1–2):22–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2012.07.001>
127. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004;16(1):3–9.
128. Salunke DB, Shukla NM, Yoo E, Crall BM, Balakrishna R, Malladi SS, i sur. Structure-activity relationships in human toll-like receptor 2-specific monoacyl lipopeptides. *J Med Chem*. 2012;55(7):3353–63.
129. Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, i sur. Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. *Cell*. 2007;130(6):1071–82.
130. Schenk M, Belisle JT, Modlin RL. TLR2 Looks at Lipoproteins. *Immunity* [Internet]. 2009;31(6):847–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.008>
131. Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn SJ, Ryu YH, Mah S, i sur. Recognition of Lipopeptide Patterns by Toll-like Receptor 2-Toll-like Receptor 6 Heterodimer. *Immunity* [Internet]. 2009;31(6):873–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.018>
132. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Baré O, Auron PE, i sur. Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular HSP70 [Internet]. Vol. 277, *Journal of Biological Chemistry*. 2002. 15028–15034 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11836257> <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M200497200>

133. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Häcker H, i sur. Endocytosed HSP60s use TLR2 and TLR4 to activate the TIR signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem*. 2001;276(33):31332–9.
134. Verstak B, Nagpal K, Bottomley SP, Golenbock DT, Hertzog PJ, Mansell A. MyD88 adapter-like (Mal)/TIRAP interaction with TRAF6 is critical for TLR2- and TLR4-mediated NF- $\kappa$ B proinflammatory responses. *J Biol Chem*. 2009;284(36):24192–203.
135. Matsumura T, Degawa T, Takii T, Hayashi H, Okamoto T, Inoue JI, i sur. TRAF6-NF- $\kappa$ B pathway is essential for interleukin-1-induced TLR2 expression and its functional response to TLR2 ligand in murine hepatocytes. *Immunology*. 2003;109(1):127–36.
136. Dresselhaus EC, Meffert MK. Cellular specificity of NF- $\kappa$ B function in the nervous system. *Front Immunol*. 2019;10(MAY).
137. Yagi T, Asada R, Kanekura K, Eesmaa A, Lindahl M, Saarma M, i sur. Neuroplastin Modulates Anti-inflammatory Effects of MANF. *iScience* [Internet]. 2020;23(12):101810. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101810>
138. Luo L, Lucas RM, Liu L, Stow JL. Signalling, sorting and scaffolding adaptors for Toll-like receptors. *J Cell Sci*. 2019;133(5).
139. Smoak KA, Aloor JJ, Madenspacher J, Merrick BA, Collins JB, Zhu X, i sur. Myeloid differentiation primary response protein 88 couples reverse cholesterol transport to inflammation. *Cell Metab* [Internet]. 2010;11(6):493–502. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2010.04.006>
140. Horng T, Medzhitov R. Drosophila MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(22):12654–8.
141. Anthony N, Foldi I, Hidalgo A. Toll and toll-like receptor signalling in development. *Dev*. 2018;145(9):1–6.
142. Okun E, Griffioen KJ, Mattson MP. Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends Neurosci* [Internet]. 2019;34(5):269–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2011.02.005>
143. Barak B, Feldman N, Okun E. Toll-like receptors as developmental tools that regulate neurogenesis during development: an update. *Front Neurosci*. 2014;8(August):1–6.

144. Shmueli A, Shalit T, Okun E, Ophir GS. The Toll Pathway in the Central Nervous System of Flies and Mammals. *NeuroMolecular Med* [Internet]. 2018;0(0):0. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12017-018-8515-9>
145. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, Van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002;61(11):1013–21.
146. Okun E, Griffioen KJ, Gen Son T, Lee JH, Roberts NJ, Mughal MR, i sur. TLR2 activation inhibits embryonic neural progenitor cell proliferation. *J Neurochem*. 2010;114(2):462–74.
147. Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. Role of TLR-2 in the Activation of Nuclear Factor  $\kappa$ B by Oxidative Stress in Cardiac Myocytes. *J Biol Chem*. 2001;276(7):5197–203.
148. Lalancette-Hbert M, Phaneuf D, Soucy G, Weng YC, Kriz J. Live imaging of toll-like receptor 2 response in cerebral ischaemia reveals a role of olfactory bulb microglia as modulators of inflammation. *Brain*. 2009;132(4):940–54.
149. Lim H, Lee J, You B, Oh JH, Mok HJ, Kim YS, i sur. GT 1b functions as a novel endogenous agonist of toll-like receptor 2 inducing neuropathic pain . *EMBO J*. 2020;1–14.
150. Reed-Geaghan EG, Savage JC, Hise AG, Landreth GE. CD14 and Toll-Like Receptors 2 and 4 Are Required for Fibrillar A -Stimulated Microglial Activation. *J Neurosci* [Internet]. 2009;29(38):11982–92. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3158-09.2009>
151. Gorup D, Škokić S, Kriz J, Gajović S. Tlr2 Deficiency is Associated with Enhanced Elements of Neuronal Repair and Caspase 3 Activation Following Brain Ischemia. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–10.
152. Winters L, Winters T, Gorup D, Mitrečić D, ćurlin M, Kriz J, i sur. Expression analysis of genes involved in TLR2-related signaling pathway: Inflammation and apoptosis after ischemic brain injury. *Neuroscience* [Internet]. 2013;238:87–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.001>
153. Balan I, Aurelian L, Schleicher R, Boero G, O'Buckley T, Morrow AL. Neurosteroid allopregnanolone (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP) inhibits inflammatory signals induced by activated MyD88-dependent toll-like receptors. *Transl Psychiatry* [Internet]. 2021;11(1):1–11.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-021-01266-1>

154. Re F, Strominger JL. Toll-like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 Differentially Activate Human Dendritic Cells. *J Biol Chem*. 2001;276(40):37692–9.
155. Du Y, Yang M, Lee S, Behrendt CL, Hooper L V., Saghatelian A, i sur. Maternal western diet causes inflammatory milk and TLR2/4-dependent neonatal toxicity. *Genes Dev*. 2012;26(12):1306–11.
156. Hu Y, Sun X, Wang S, Zhou C, Lin L, Ding X, i sur. Toll-like receptor-2 gene knockout results in neurobehavioral dysfunctions and multiple brain structural and functional abnormalities in mice. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2020;91(October):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.10.004>
157. Madar R, Rotter A, Ben-Asher HW, Mughal MR, Arumugam T V., Wood WH, i sur. Postnatal TLR2 activation impairs learning and memory in adulthood. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2015;48:301–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.020>
158. Zeng D, He S, Ma C, Wen Y, Song W, Xu Q, i sur. Network-based approach to identify molecular signatures in the brains of depressed suicides. *Psychiatry Res* [Internet]. 2020;294:113513. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2020.113513>
159. Humann J, Mann B, Gao G, Moresco P, Ramahi J, Loh LN, i sur. Bacterial Peptidoglycan Traverses the Placenta to Induce Fetal Neuroproliferation and Aberrant Postnatal Behavior. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2016 Mar;19(3):388–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.009>
160. Mann B, Crawford JC, Reddy K, Lott J, Youn YH, Gao G, i sur. Fetal neural progenitors process TLR signals from bacterial components to enhance proliferation and rework brain development. *bioRxiv* [Internet]. 2021;(901):2021.10.19.464985. Available from: <https://doi.org/C>
161. Park SJ, Lee JY, Kim SJ, Choi SY, Yune TY, Ryu JH. Toll-like receptor-2 deficiency induces schizophrenia-like behaviors in mice. *Sci Rep*. 2015;5.
162. Zhou C, Sun X, Hu Y, Song J, Dong S, Kong D, i sur. Genomic deletion of TLR2 induces aggravated white matter damage and deteriorated neurobehavioral functions in mouse models of Alzheimer’s disease. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(17):7257–73.

163. du Sert NP, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, i sur. The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2020;18(7):1–12.
164. Xin L, He L, Rahman Z, Andersen T, Morse B, Yang R, i sur. Towards Real-time Proteomics Data Analysis using PEAKS Online 8 . 5. *ASMS ThP 461.* :8.
165. Lightbend I (2011-2019). Akka: Build powerful reactive, concurrent, and distributed applications more easily. <https://akka.io/>.
166. The Apache Software Foundation. *Apache Cassandra.* 2016. 2016;
167. Svennerholm L, Fredman P. A procedure for the quantitative isolation of brain gangliosides. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 1980;617(1):97–109.
168. Mlinac-Jerkovic K, Ilic K, Zjalic M, Mandić D, Debeljak Ž, Balog M, i sur. Who’s in, who’s out? Re-evaluation of lipid raft residents. *J Neurochem.* 2021;158(3):657–72.
169. Nogales-Cadenas R, Carmona-Saez P, Vazquez M, Vicente C, Yang X, Tirado F, i sur. GeneCodis: Interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(SUPPL. 2).
170. Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. GENECODIS: A web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* 2007;8(1):1–8.
171. Koopmans F, van Nierop P, Andres-Alonso M, Byrnes A, Cijssouw T, Coba MP, i sur. SynGO: An Evidence-Based, Expert-Curated Knowledge Base for the Synapse. *Neuron.* 2019;103(2):217-234.e4.
172. Gaitanou M, Segklia K, Matsas R. CEND1, a story with many tales: From regulation of cell cycle progression/exit of neural stem cells to brain structure and function. *Stem Cells Int.* 2019;2019.
173. Bayés À, Collins MO, Croning MDR, van de Lagemaat LN, Choudhary JS, Grant SGN. Comparative Study of Human and Mouse Postsynaptic Proteomes Finds High Compositional Conservation and Abundance Differences for Key Synaptic Proteins. *PLoS One.* 2012;7(10).
174. Davies FCJ, Hope JE, McLachlan F, Nunez F, Doig J, Bengani H, i sur. Biallelic

- mutations in the gene encoding eEF1A2 cause seizures and sudden death in F0 mice. *Sci Rep*. 2017;7(March):1–11.
175. Zou W, Yadav S, DeVault L, Nung Jan Y, Sherwood DR. RAB-10-Dependent Membrane Transport Is Required for Dendrite Arborization. *PLoS Genet*. 2015;11(9):1–28.
176. Wang T, Liu Y, Xu XH, Deng CY, Wu KY, Zhu J, i sur. Lgl1 activation of Rab10 Promotes axonal membrane trafficking underlying neuronal polarization. *Dev Cell* [Internet]. 2011;21(3):431–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.007>
177. Dun X peng, Bandeira de Lima T, Allen J, Geraldo S, Gordon-Weeks P, Chilton JK. Drebrin controls neuronal migration through the formation and alignment of the leading process. *Mol Cell Neurosci* [Internet]. 2012;49(3):341–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2012.01.006>
178. Chen C, Chu CH, Chu Y, Chang TY, Chen SW, Liang SY, i sur. Neuronal paxillin and drebrin mediate BDNF-induced force transduction and growth cone turning in a soft-tissue-like environment. *Cell Rep* [Internet]. 2022;40(7):111188. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111188>
179. Ohtani-Kaneko R. Crmp4-KO mice as an animal model for investigating certain phenotypes of autism spectrum disorders. *Int J Mol Sci*. 2019;20(10):1–15.
180. Tan M, Cha C, Ye Y, Zhang J, Li S, Wu F, i sur. CRMP4 and CRMP2 interact to coordinate cytoskeleton dynamics, regulating growth cone development and axon elongation. *Neural Plast*. 2015;2015.
181. Chooi G, Ko J. Gephyrin: a central GABAergic synapse organizer. *Exp Mol Med*. 2015;47(4).
182. Puddifoot CA, Wu M, Sung RJ, Joiner WJ. Ly6h regulates trafficking of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors and nicotine-induced potentiation of glutamatergic signaling. *J Neurosci*. 2015;35(8):3420–30.
183. Herrera-Molina R, Mlinac-Jerkovic K, Ilic K, Stöber F, Vemula SK, Sandoval M, i sur. Neuroplastin deletion in glutamatergic neurons impairs selective brain functions and calcium regulation: Implication for cognitive deterioration. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–17.



184. Sipione S, Monyor J, Galleguillos D, Steinberg N, Kadam V. Gangliosides in the Brain: Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Applications. *Front Neurosci.* 2020;14(October):1–24.
185. Yaseen IH, Monk PN, Partridge LJ. Tspan2: A tetraspanin protein involved in oligodendrogenesis and cancer metastasis. *Biochem Soc Trans.* 2017;45(2):465–75.
186. Boggs JM. Myelin basic protein: A multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(17):1945–61.
187. Mitoma H, Honnorat J, Yamaguchi K, Manto M. Cerebellar long-term depression and auto-immune target of auto-antibodies: the concept of LTDpathies. *Mol Biomed.* 2021;2(1).
188. Wilkerson JR, Albanesi JP, Huber KM. Roles for Arc in metabotropic glutamate receptor-dependent LTD and synapse elimination: Implications in health and disease. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2018;77:51–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.09.035>
189. Kang SJ, Kaang BK. Metabotropic glutamate receptor dependent long-Term depression in the cortex. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2016;20(6):557–64.
190. Ohsakaya S, Fujikawa M, Hisabori T, Yoshida M. Knockdown of DAPIT (Diabetes-associated Protein in Insulin-sensitive Tissue) results in loss of ATP synthase in mitochondria. *J Biol Chem.* 2011;286(23):20292–6.
191. Range K, M D, Moser YA. TRAF6 upregulation in spinal astrocytes maintains neuropathic pain by integrating TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  signaling. *Bone.* 2012;23(1):1–7.
192. Schnaar RL, Lopez PHH. Myelin-associated glycoprotein and its axonal receptors. *J Neurosci Res.* 2009;87(15):3267–76.
193. Mehta NR, Lopez PHH, Vyas AA, Schnaar RL. Gangliosides and Nogo receptors independently mediate myelin-associated glycoprotein inhibition of neurite outgrowth in different nerve cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2007;282(38):27875–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M704055200>
194. Aigner L, Arber S, Kapfhammer JP, Laux T, Schneider C, Botteri F, i sur. Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice. *Cell.* 1995;83(2):269–78.

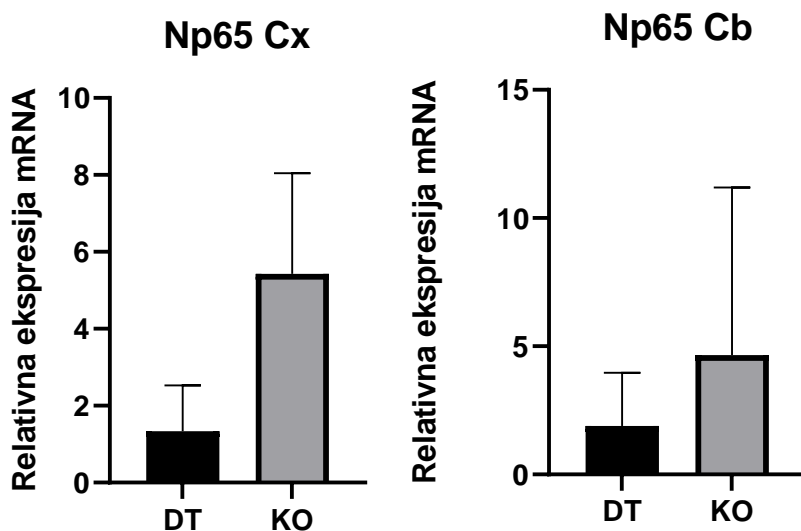
## 11. ŽIVOTOPIS

Mario Stojanović rođen je 13. travnja 1991. u Osijeku gdje je završio osnovnu i srednju školu. 2010. godine upisao je studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu pri Sveučilištu u Zagrebu. Diplomski rad pod nazivom „Stabilnost i strukturna karakterizacija proteina FlgD iz bakterije *Helicobacter pylori*“ izradio je u Laboratoriju za proteinsku kristalizaciju na Zavodu za opću i anorgansku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Dubravke Matković-Čalogović te ga uspješno obranio 2016. godine. Od 2018. godine je zaposlen na Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te je iste godine upisao doktorski studij Neuroznanost.

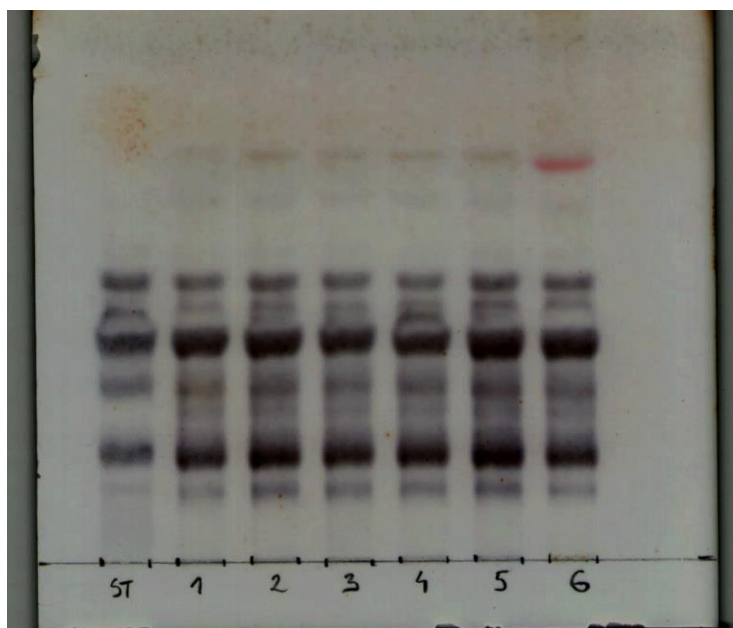
Kao suradnik sudjelovao je na tri istraživačka projekta Hrvatske zaklade za znanost: „Esencijalni metalni ioni u proteinima iz *Helicobacter pylori* i modelnim spojevima – struktura i funkcija/svojstvo“ (HRZZ-IP-2014-09-4244, voditeljice prof. dr. sc. Dubravke Matković-Čalogović), „Biolška važnost dipeptidil-peptidaze III i njezin utjecaj na zdravlje čovjeka“ (HRZZ-IP-2018-01-2936, voditeljice prof. dr. sc. Sanje Tomić), i „Molekularni biljezi vulnerabilnosti, adaptacije i plastičnosti neurona u akutnoj i kroničnoj ozljedi mozga“ (NeuroReact, HRZZ- IP-2016-06-863, voditeljice prof. dr. sc. Svjetlane Kalanj Bognar).

Autor je jednog znanstvenog rada, koautor na dva znanstvena rada te je autor 8 kongresnih sažetaka i jednog umjetničkog rada.

## 12. DODATAK



Slika 12.1. Grafički prikaz rezultata prepisivanja mRNA za protein Np65 u malom mozgu i moždanoj kori. DT – divlji tip, KO – TLR2KO



Slika 12.2. Reprezentativni prikaz analize gangliozida moždane kore metodom po Svenerholmu. Uzorci 1-3 – TLR2KO, uzorci 4-6 – kontrolni uzorak divljeg tipa